

Genetische und molekulare Analyse
von zwei neuen Komponenten der Oocytenpolarität
in *Drosophila melanogaster*

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von

Claudia Wunderlich

aus Freiburg i. Br.

Köln, 2008

Berichtersteller/in: Prof. Dr. Siegfried Roth
Prof. Dr. Maria Leptin

Tag der mündlichen Prüfung: 21. 04. 2008

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGEN	1
1. EINLEITUNG.....	3
1.1 Die Oogenese von <i>Drosophila melanogaster</i>	4
1.2 Spezifizierung und Positionierung der Oocyte.....	5
1.3 Polarisierung der Oocyte und Ausbildung der Achsen	7
1.4 Spezifische Lokalisierung von mRNA bei Achsenbildung	10
1.5 GFP-Stau-Screen.....	13
1.6 Zielsetzung.....	14
2. MATERIAL UND METHODEN.....	15
2.1 Material.....	15
2.1.1 Chemikalien	15
2.1.2 Lösungen/Medien	15
2.1.3 Antikörper, Farbstoffe, Seren.....	18
2.1.4 Fliegenstämme	19
2.1.5 Oligonucleotide	21
2.1.6 Verwendete Vektoren und Plasmide	27
2.1.7 Computer-Software.....	28
2.1.8 Mikroskope	28
2.2 Methoden	28
2.2.1 Fliegenhaltung	28
2.2.2 Generierung homozygoter Keimbahnklone mittels FLP/FRT/DFS-Technik	28
2.2.3 Generierung von Exelixis Deletionen.....	28
2.2.4 Herstellung transgener Fliegen.....	29
2.2.5 Ei-Präparation.....	29
2.2.6 Präparation genomischer DNA	29
2.2.7 Präparation von RNA.....	30
2.2.8 Quantifizierung von DNA und RNA.....	31
2.2.9 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	31
2.2.10 Gel-Elektrophorese.....	32
2.2.11 DNA Sequenzierung.....	33
2.2.12 RT-PCR Analyse von <i>osk</i> und <i>grk</i> mRNA	33
2.2.13 Identifizierung von Polymorphismen.....	34
2.2.14 Klonierung von <i>thoc5</i>	34
2.2.15 Isolierung von Plasmid-DNA.....	35
2.2.16 Herstellung von RNA-Sonden.....	35
2.2.17 Fixierung von Ovarien.....	36
2.2.18 <i>In situ</i> Hybridisierung von Ovarien.....	36
2.2.19 Fluoreszente <i>in situ</i> Hybridisierung von Ovarien	38
2.2.20 Antikörperfärbung von Ovarien	38

2.2.21 Western Blot Analyse	39
2.2.22 Co-Immunopräzipitation.....	40
2.2.23 Herstellung eines Peptid-Antikörpers gegen Thoc5	40
3. ERGEBNISSE.....	42
3.1 Generierung einer molekularen Kartierungskarte für Chromosom 2R.....	42
3.2 Phänotypische Analyse der letalen Komplementationsgruppe 32.17/11.229.....	52
3.2.1 Störung der AP Oocytenpolarität	52
3.2.2 Störung der DV Oocytenpolarität.....	59
3.3 Identifizierung von <i>thoc5</i> durch Kartierung von 32.17/11.229.....	62
3.4 Molekulare Charakterisierung von <i>thoc5</i>.....	67
3.4.1 Expression von <i>thoc5</i> mRNA.....	68
3.4.2 Lokalisation von Thoc5 Protein.....	68
3.4.3 Co-Lokalisation von Thoc5 mit Tho2 und Hpr1	70
3.4.4 Co-Lokalisation des THO-Komplexes mit Mago und Y14 in den Zellkernen der Nährzellen.....	71
3.4.5 Einfluss von <i>thoc5</i> auf die Lokalisation von Y14 und Btz	73
3.4.6 Keine Beteiligung von <i>thoc5</i> am Spleißen von <i>osk</i> mRNA und <i>grk</i> mRNA.....	75
3.5 Phänotypische Analyse der letalen Komplementationsgruppe 7.460/7.134.....	76
3.5.1 Störung der AP Oocytenpolarität	76
3.5.2 Störung der DV Oocytenpolarität.....	81
3.6 Kartierung von 7.460/7.134.....	84
4. DISKUSSION	89
4.1 Molekulare Genkartierung für Chromosom 2R.....	89
4.2 Regulation der AP und DV Oocytenpolarität durch <i>thoc5</i>.....	91
4.2.1 Identifizierung und Charakterisierung von <i>thoc5</i>	91
4.2.2 Thoc5 im THO-Komplex als Komponente der <i>osk</i> mRNP	92
4.2.3 Einfluss von Thoc5 auf den <i>osk</i> mRNP Transport.....	93
4.2.4 Funktion von Thoc5 bei der Ausbildung der AP Oocytenpolarität	96
4.2.5 Rolle von Thoc5 bei der Ausbildung der DV Oocytenpolarität.....	99
4.3 Regulation der AP und DV Oocytenpolarität durch 7.460/7.134.....	101
5. LITERATURVERZEICHNIS	105
6. ZUSAMMENFASSUNG	118
7. ABSTRACT.....	119
8. DANKSAGUNG	120

9. ERKLÄRUNG	121
10. LEBENSLAUF	122

Abkürzungen

2R	rechter Arm des zweiten Chromosoms
a	arc
al	aristaless
AP	anterior-posterior
b	black
BicD	Bicaudal D
bcd	bicoid
Bl	Bristle
bw	brown
c	curved
cdc2rk	cdc2-related-kinase
cn	cinnabar
„cpxsp“	al dp b pr cn vg c a px bw mi sp
CyO	Curley of Oster
DFS	dominant female sterile
Dlar	<i>Drosophila</i> leukocyte-antigen-related-like
dp	dumpy
DV	dorso-ventral
EGF	epidermal growth factor
EGFR	epidermal growth factor receptor
egl	egalitarian
egr	eiger
EJC	Exon-Exon-Junction-Komplex
eve	even-skipped
FLP	flipase
FMIP	fms interacting protein
FRT	flipase recombination target
fSAP-7	functional spliceosome-associated protein-74
fzr2	fizzy-related 2
GFP	grün fluoreszierendes Protein
Gla	Glazed
grk	gurken
hnRNP	heterogenes nucleäres Ribonucleoprotein
hpr1	hyperrecombination 1
hrp48	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein 48
hs	Hitzeschock-Promotor
L	Lob
LacZ	β-Galactosidase-Gen
mago	mago nashi
Mex67p	messenger RNA export factor of 67 kDa
Mft1p	mitochondrial fusion targeting protein 1
mi	minus
mRpL4	mitochondrial ribosomal protein L42
MS	male sterile
MTOC	Mikrotubuli-Organisationszentrum
Mtr2p	mRNA transport regulator protein 2
mtub	maternaler Tubulin Promotor
nos	nanos
osk	oskar
PigN	Phosphatidylinositolglycan class N
PLP	PCR-product-length-polymorphism
pr	purple

px	plexus
Rad-1, -9, -17	radiation sensitive protein-1, -9, -17
REF1	RNA export adaptor family 1
RFLP	restriction-fragment-length-polymorphism
RNP	Ribonucleoprotein
Sb	Stubble
SNP	single-nucleotide-polymorphism
sp	speck
stau	staufen
Sub2p	suppressor of Brr1-1 protein 2
THO	suppression of the <u>t</u> ranscriptional defects of <u>h</u> pr1Δ by <u>o</u> verexpression
TGF-α	transforming growth factor-α
Thp2p	Tho2-Hpr1 phenotype protein 2
Thoc5-7	THO-complex 5-7
Tho2	suppression of the <u>t</u> ranscriptional defects of <u>h</u> pr1Δ by <u>o</u> verexpression 2
UAP56	56 kDa U2AF65-associated protein
UAS	upstream activating sequence
vg	vestigial
w	white
wg	wingless
WT	Wildtyp
Yra1	Yeast RNA annealing protein 1

1. Einleitung

Die Taufliege *Drosophila melanogaster* ist in der Biologie eines der best untersuchten Modellorganismen. Auf Grund seiner kurzen Generationszeit von nur 10 Tagen und seiner großen Anzahl von Nachkommen hat sich *Drosophila* besonders zur Durchführung groß angelegter genetischer Screens zur Identifizierung von Genen und deren Funktion während der Entwicklung bewährt. Hierfür kann auf eine Vielzahl molekularer und genetischer Techniken zurückgegriffen werden, wie der Adaption des aus *Saccharomyces cerevisiae* stammenden FLP/FRT Rekombinationssystems zur Generierung von mitotischen Klonen in Zellen und des UAS/Gal4-Systems zur zell- und gewebespezifischen Expression von Genen (Fischer *et al.*, 1988; Golic *et al.*, 1991; Brand und Perrimon, 1993; Xu und Rubin, 1993). Durch diese Techniken kann der multizelluläre Organismus *Drosophila* phänotypisch nach Mutationen in nahezu jeder Zelle in jedem Stadium der Entwicklung untersucht werden. Seit dem Jahr 2000 ist das *Drosophila* Genom durchsequenziert: Es umfasst ca. 13000 Gene (Adams *et al.*, 2000; Rubin *et al.*, 2000). Trotz der frühen evolutionären Trennung vor ca. 700 Millionen Jahren sind viele entwicklungsbiologische Prozesse, wie z.B. die Bildung der dorso-ventralen Achse im Embryo oder der Wnt Signaltransduktionsweg zwischen *Drosophila* und Vertebraten, konserviert (Holley *et al.*, 1995; Logan und Nusse, 2004). Für mindestens 62% der bekannten Krankheitsgene im Menschen lassen sich homologe Gene in *Drosophila* finden (Fortini *et al.*, 2000; Rubin *et al.*, 2000). Daher wird *Drosophila* auch als Modell zur Erforschung zahlreicher Krankheiten, wie z.B. Parkinson oder Alzheimer, eingesetzt (Bilen und Bonini, 2005; Sang und Jackson, 2005).

Ein weiteres aktuelles Gebiet zellbiologischer Forschung ist die Entstehung und Etablierung von Polarität in Zellen. Das Verhalten der polarisierten Zelle ist von der asymmetrischen Verteilung der Proteine innerhalb der Zelle abhängig. Diese spezifische Verteilung erfolgt oft schon über die Lokalisierung der entsprechenden mRNA. Die Zellpolarität lässt sich während der Oogenese von *Drosophila* gut untersuchen. Denn bereits die Lokalisierung von drei verschiedenen mRNA an unterschiedlichen Positionen in der Oocyte entscheidet über die spätere korrekte Ausbildung der beiden Hauptachsen des Embryos (St Johnston, 1995; van Eden und St Johnston, 1999; Riechmann und Ephrussi, 2001; Huynh und St Johnston, 2004; St Johnston, 2005; Steinhauer und Kalderon, 2006).

1.1 Die Oogenese von *Drosophila melanogaster*

Das adulte weibliche Fortpflanzungsorgan von *Drosophila* besteht aus zwei Ovarien, die je ca. 16 Ovariolen enthalten. Die Ovariolen setzen sich aus dem Germarium und dem Vitellarium zusammen. Das anterior gelegene Germarium beherbergt die Stammzellen der Keimbahn und der somatischen Follikelzellen und ist der Entstehungsort der Eikammern. Die sich zum fertigen Ei entwickelnden Eikammern wandern im Vitellarium zum posterior gelegenen Uterus. Die Eikammern bestehen aus dem somatischen, einschichtigen Follikelepithel und den Zellen der Keimbahn. Das einschichtige Follikelepithel umhüllt dabei schützend die Keimbahn und sekretiert später die Eihüllen. Die Keimbahn besteht aus der Oocyte, der späteren Eizelle, und den Nährzellen. In den Nährzellen werden große Mengen an Proteinen und mRNA produziert und in die Oocyte transportiert. Die Entwicklung der Eikammern zum fertigen Ei lässt sich auf Grund von spezifischen morphologischen Eigenschaften in 14 Stadien (Abb. 1) unterteilen (King, 1970; Mahowald und Kambysellis, 1980; Spradling, 1993). Hierbei definiert Stadium 1 die neu gebildete Eikammer und Stadium 14 das reife Ei.

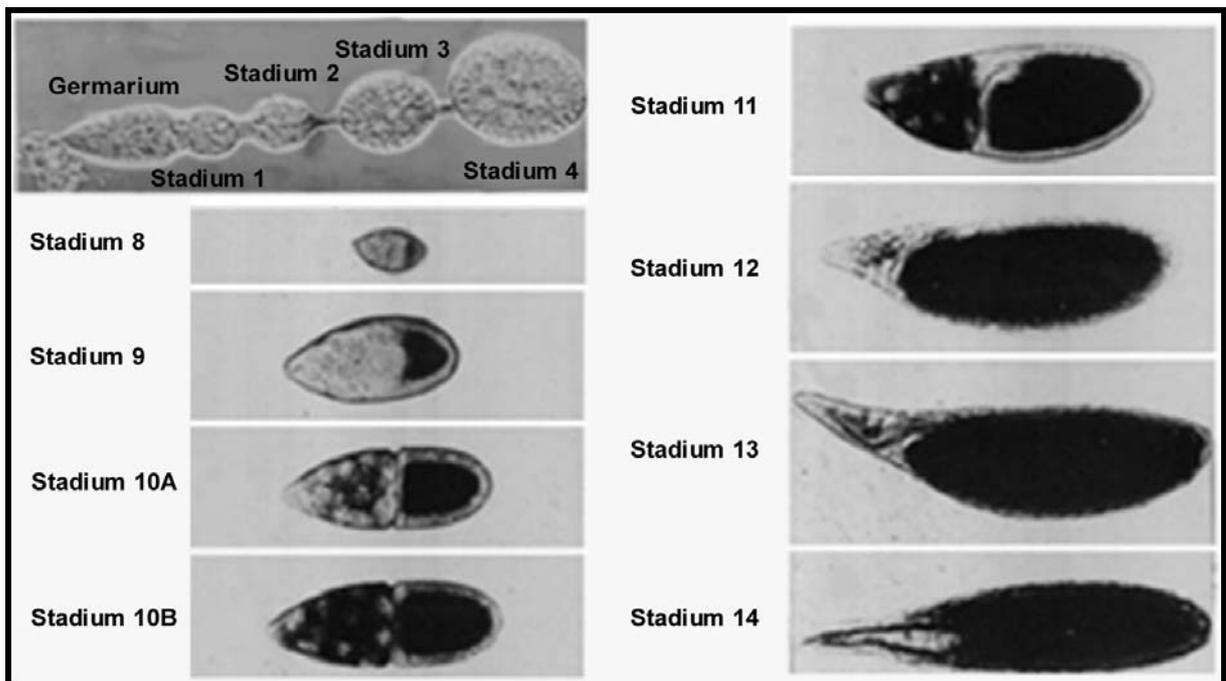


Abb. 1: Entwicklung der Eikammern in *Drosophila melanogaster*.

Lichtmikroskopische Aufnahme unterschiedlich reifer Stadien von Eikammern. Abb. modifiziert nach King (1970).

Das fertige *Drosophila* Ei ist oval und hat eine Länge von ca. 0,5 mm sowie einen Durchmesser von ca. 0,2 mm. Die ventrale Seite ist konkav, während die dorsale Seite leicht abgeflacht ist. Auf der anterioren Seite liegt die Mikropyle, durch die die Spermien eintreten.

Posterior befindet sich die Aeropyle. Auf der dorsalen Seite befinden sich zwei filamentöse Anhänge, die der Sauerstoffaufnahme dienen, sowie das Operculum, der Schlupfort der Larve.

1.2 Spezifizierung und Positionierung der Oocyte

Die Oogenese beginnt im anterioren Bereich des Germariums durch die asymmetrische Zellteilung einer Stammzelle, die zur Bildung einer neuen Stammzelle und eines Cystoblasten führt (Abb. 2: 1) (Deng und Lin, 1997). Der Cystoblast durchläuft vier mitotische Teilungen mit unvollständiger Cytokinese und bildet eine 16-zellige Cyste. Die 16 Zellen der Cyste sind durch cytoplasmatische Brücken, die sog. Ringkanäle, miteinander verbunden (Abb. 2: 1) (Spradling, 1993). Die beiden Zellen, die über vier Ringkanäle verfügen, werden zu Pro-Oocyten und treten in die Meiose ein (Abb. 2: 2a). Eine der Pro-Oocyten entwickelt sich zur Oocyte (Abb. 2: 2b). Die andere Pro-Oocyte und die übrigen 14 Zellen der Cyste entwickeln sich zu den polyploiden Nährzellen. Bei der Spezifikation der Oocyte ist die asymmetrische Segregation des Fusoms während der vier mitotischen Teilungen entscheidend. Das Fusom ist ein vesikuläres Organell reich an Cytoskelett-Proteinen und Dynein, das die Zellen der Cyste durch die Ringkanäle verbindet (Lin *et al.*, 1994; de Cuevas *et al.*, 1996). Bei der Mitose ist das ursprüngliche Fusom immer mit einem Pol der mitotischen Spindel assoziiert, während auf der gegenüberliegenden Seite, im neu gebildeten Ringkanal, sich neues Fusomenmaterial bildet (Storto und King, 1989; de Cuevas und Spradling, 1998). Das neu gebildete Fusomenmaterial fusioniert dann mit dem schon existierenden Fusom. Das ursprüngliche Fusomenmaterial endet folglich immer in einer der beiden Pro-Oocyten. Aus dieser Pro-Oocyte soll sich dann nach der heute gültigen Lehrmeinung die Oocyte entwickeln (de Cuevas und Spradling, 1998; Huynh und St Johnston, 2004).

Das Fusom reguliert zudem die Bildung eines polarisierten Mikrotubuli-Netzwerks, welches nach dem Abbau des Fusoms die Zellen der Cyste miteinander verbindet (Theurkauf *et al.*, 1992; Grieder, *et al.*, 2000; Bolivar *et al.*, 2001). In der Region 2b des Germariums kommen die Minus-Enden der Mikrotubuli in der Oocyte zu liegen (Abb. 2). Die weitere Spezifizierung der Oocyte erfolgt durch die Akkumulation der Centrosomen sowie oocyten-spezifischer mRNA und Proteine zunächst in beiden Pro-Oocyten und schließlich in der zukünftigen Oocyte (Huynh und St Johnston, 2004).

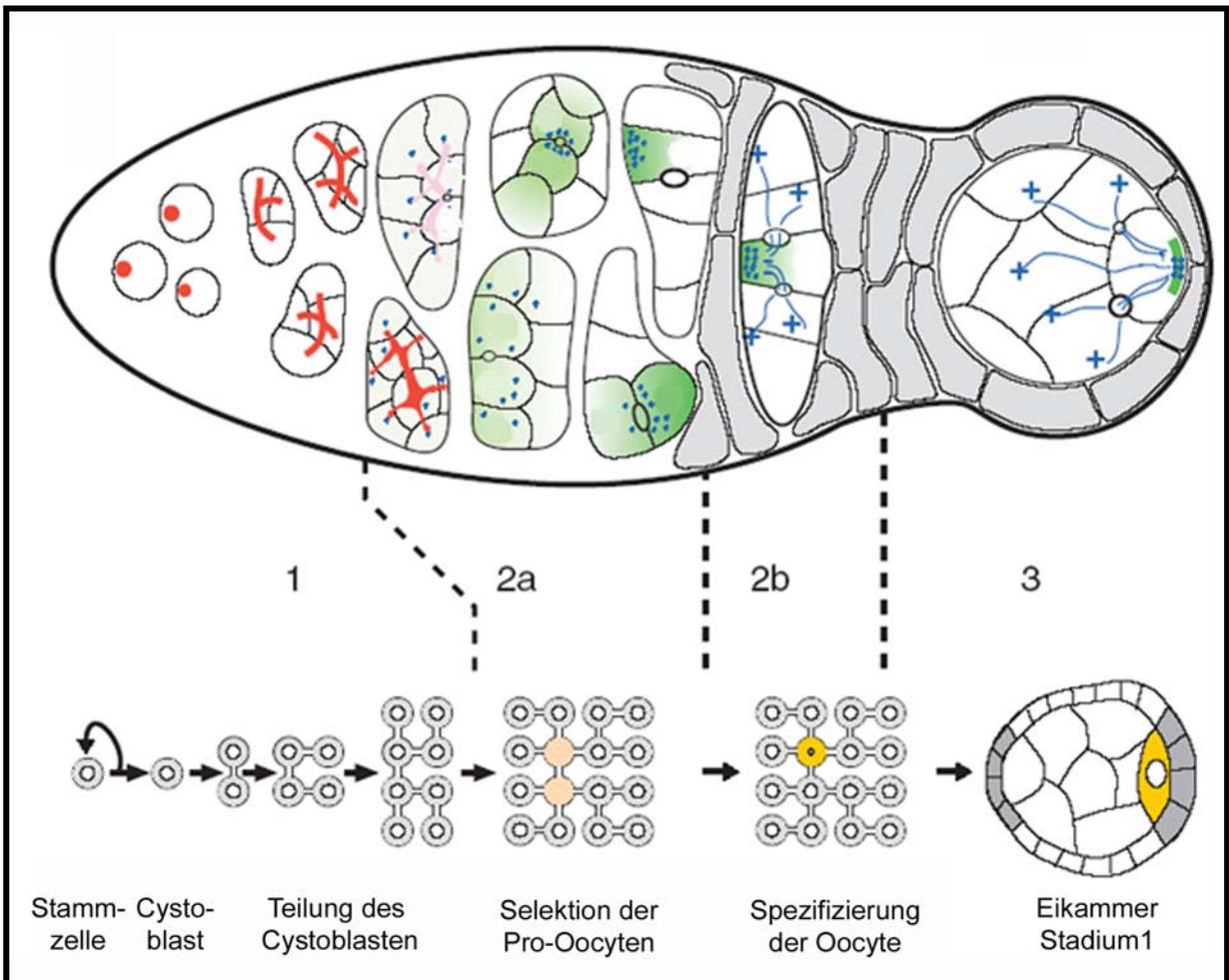


Abb. 2: Spezifizierung der Oocyte.

Schematische Darstellung des GERMARIUMS mit der Spezifizierung der Oocyte aus den Stammzellen. Das GERMARIUM lässt sich in die vier Regionen 1, 2a, 2b und 3 unterteilen. In Region 1 des GERMARIUMS (links) teilt sich der aus den Stammzellen hervorgegangene Cystoblast in vier mitotischen Teilungen mit unvollständiger Cytokinese in eine Cyste. Die 16 Zellen der Cyste sind durch cytoplasmatische Brücken miteinander verbunden, durch die sich das Fusom (rot) zieht. In Region 2a findet die Selektion der Pro-Oocyten (rosa) statt. Die Centrosomen (blaue Punkte), mRNA und Proteine (grün) akkumulieren zunächst in den beiden Pro-Oocyten und schließlich in Region 2b in der Oocyte (gelb). Die Minus-Enden der Mikrotubuli (blau) befinden sich nun in der Oocyte, während die Plus-Enden der Mikrotubuli durch die Ringkanäle in die Nährzellen ragen. Zudem wandern die somatischen Follikelzellen (grau) ein und umschließen die Cyste. Auf dem Weg zur Region 3 des GERMARIUMS erfolgt die posteriore Positionierung der Oocyte innerhalb der sich bildenden Eikammer. Gleichzeitig lokalisieren die Minus-Enden der Mikrotubuli und spezifische cytoplasmatische Komponenten am posterioren Kortex. Abb. modifiziert nach Huynh und St Johnston (2004).

Nach der Spezifizierung der Oocyte wird diese innerhalb der Cyste posterior zu den Nährzellen positioniert (Gonzalez-Reyes und St Johnston, 1994). In Region 2a/b wird die Cyste durch die einwandernden somatischen Follikelzellen umschlossen (Abb. 2) (Margolis und Spradling, 1995). Die posteriore Positionierung der Oocyte erfolgt dann durch die transiente Hochregulierung der Expression des Adhäsionsmoleküls Cadherin sowohl in der Oocyte als auch in den posterioren Follikelzellen (Godt und Tepass, 1998; Gonzalez-Reyes

und St Johnston, 1998). Die nun fertige Eikammer verlässt das Germarium und tritt in das Vitellarium ein, in dem die Eikammer auf dem Weg zum Uterus zum fertigen Ei heranreift.

1.3 Polarisierung der Oocyte und Ausbildung der Achsen

Die Etablierung der anterior-posterioren (AP) Achse und der dorso-ventralen (DV) Achse des *Drosophila* Embryos erfolgt während der Oogenese durch die Polarisierung des Mikrotubuli-Cytoskeletts der Oocyte und der darauf folgenden spezifischen Lokalisation dreier mRNA. Dieser Prozess erfordert den Austausch von Signalen zwischen der Oocyte und dem umschließenden Follikelepithel. Dieser Vorgang ist in Abb. 3 dargestellt.

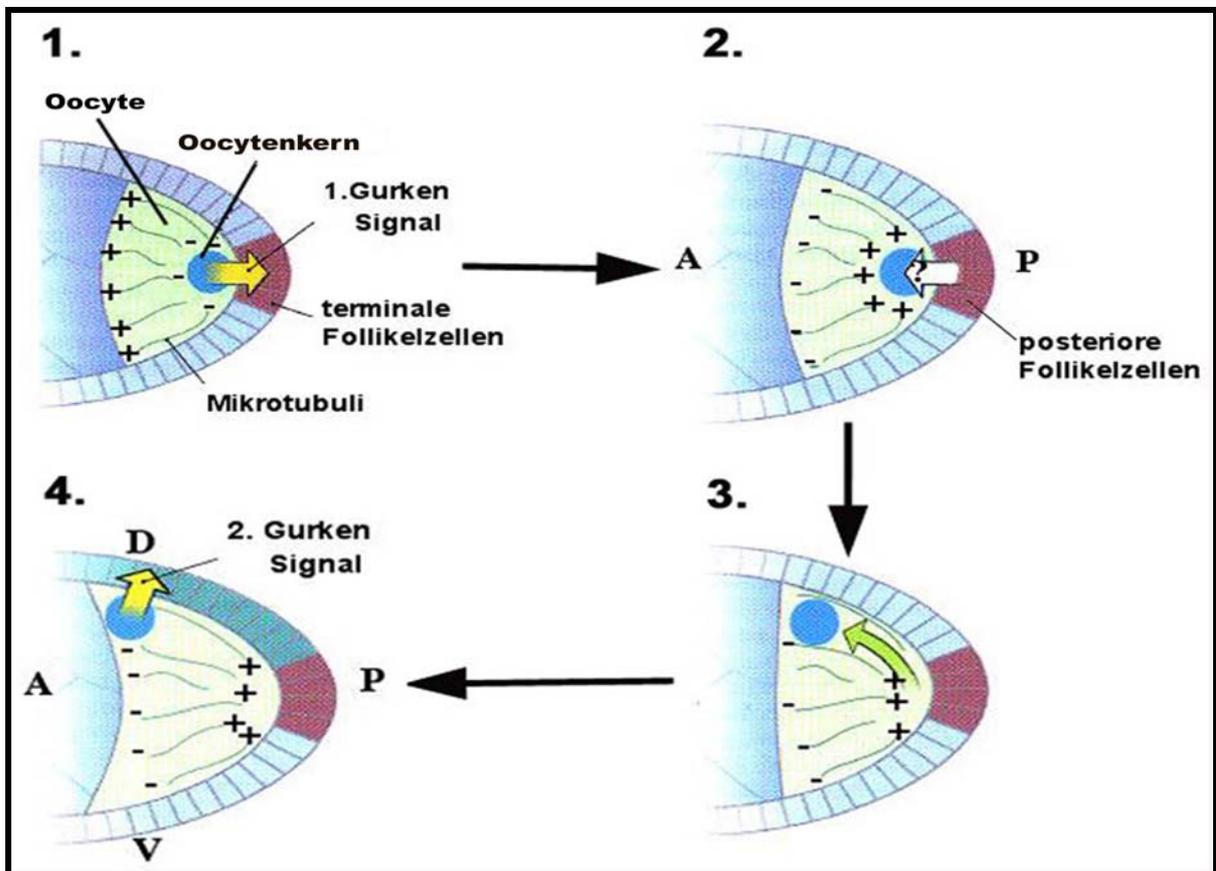


Abb. 3: AP und DV Achsenbildung.

Schematische Darstellung der posterioren Region einer Eikammer. (1.) Das erste Grk Signal in den Stadien 5-6 führt zur Spezifizierung der terminalen Follikelzellen in posteriore Follikelzellen. (2.) Die posterioren Follikelzellen geben ein noch unbekanntes Signal an die Oocyte zurück, was zur Umstrukturierung des Mikrotubuli-Cytoskeletts und der Ausbildung der AP Achse führt. (3.) In den Stadien 6-7 wandert der posterior gelegene Oocytenkern zur anterior-dorsalen Seite der Oocyte, wo (4.) das zweite Grk Signal in den Stadien 9-10 die DV Achsenbildung initialisiert. Abb. modifiziert nach Anderson (1995).

In den frühen Stadien der Oogenese befindet sich das Mikrotubuli-Organisationszentrum (MTOC) und somit die Minus-Enden der Mikrotubuli am posterioren Ende der Oocyte, wohingegen die Plus-Enden in die Nährzellen hineinreichen (Abb. 3: 1.) (Theurkauf *et al.*, 1992). Entlang dieses Mikrotubuli-Netzwerks werden mRNA und Proteine mittels des Dynein-BicD-Egl-Komplexes aus den Nährzellen in die Oocyte transportiert (Bullock und Ish-Horowicz, 2001). Hierbei ist die zunächst posteriore Lokalisation der *gurken (grk)* mRNA und des Grk Proteins in der Oocyte von entscheidender Bedeutung. Das Gen *grk* kodiert für einen sekretierten TGF- α -artigen (transforming growth factor- α -like) Liganden (Neuman-Silberberg und Schüpbach, 1993), welcher den in den Follikelzellen exprimierten EGF-Rezeptor (epidermal growth factor receptor) aktiviert (Livneh *et al.*, 1985; Wadsworth *et al.*, 1985; Schejter *et al.*, 1986; Shilo *et al.*, 1986; Price *et al.*, 1989). In den Stadien 5-6 erfolgt das erste Grk Signal (Abb. 3: 1.) aus der Oocyte, welches die angrenzenden somatischen Follikelzellen zu posterioren Follikelzellen determiniert (Gonzalez-Reyes *et al.*, 1995; Roth *et al.*, 1995). Ein noch unbekanntes Signal (Abb. 3: 2.) dieser posterioren Zellen an die Oocyte in den Stadien 6-7 führt dann zum Zusammenbruch des posterioren MTOC und zur Neuausrichtung des Mikrotubuli-Cytoskeletts in der Oocyte (Abb. 3: 3.) (Theurkauf *et al.*, 1992).

Obwohl bisher kein direktes Signal von den posterioren Follikelzellen an die Oocyte nachgewiesen werden konnte, geben u. a. Arbeiten an den Genen *merlin*, *lamininA*, *Dlar* und *dystroglycan* Hinweise auf die Existenz dieses Signals (Deng und Ruohola-Baker, 2000; Frydman und Spradling, 2001; MacDougall *et al.*, 2001; Poulton und Deng, 2006). So führt das Ausschalten der Gene in den posterioren Follikelzellen zu Polarisationsdefekten in der Oocyte. Dagegen haben die Gene keinen Einfluss auf die Differenzierung der posterioren Follikelzellen. Dies deutet darauf hin, dass das erste Grk Signal von den terminalen Follikelzellen erkannt und umgesetzt werden kann, die Weiterleitung des Signals an die Oocyte aber ausbleibt. Das in den Follikelzellen apikal lokalisierte Gen *merlin* kodiert für ein Protein, das mit der Familie der Ezrin-Radixin-Moesin Protein verwandt ist (McCartney und Fehon, 1996). Diese Proteine sind an der Verknüpfung von Aktinfilamenten an Transmembranproteine beteiligt (Tsukita *et al.*, 1994; Turunen *et al.*, 1998; Mangeat *et al.*, 1999). Daher wird angenommen, dass Merlin das unbekannte Signal nach apikal lokalisiert (MacDougall *et al.*, 2001). Dagegen handelt es sich bei LamininA, Dlar und Dystroglycan um Komponenten der extrazellulären Matrix (Gutzeit *et al.*, 1991). Hierbei könnte das Signal durch Verstärkung oder Verringerung der Adhäsion zwischen posterioren Follikelzellen und Oocyte an die Oocyte weitergegeben werden (Poulton und Deng, 2007).

Durch die Umstrukturierung des Mikrotubuli-Cytoskeletts im Stadium 7 kommt es zur Ausbildung eines anterior-posterioren Gradienten von Mikrotubuli, bei dem die Minus-Enden der Mikrotubuli nun vom anterioren und lateralen Kortex nucleieren, während die Plus-Enden der Mikrotubuli zum posterioren Pol gerichtet sind (Theurkauf *et al.*, 1992; Clark *et al.*, 1994; 1997; Cha *et al.*, 2001; 2002). Wie es zur Bildung der Mikrotubuli am anterioren und lateralen Kortex kommt, ist weitgehend unverstanden. Verschiedene Komponenten des γ -Tubulin-Ring-Komplexes sowie die Centrosomen-Komponente Centrosomin lassen sich mittels Antikörperfärbung am gesamten Kortex der Oocyte nachweisen (Cha *et al.*, 2002). Dies weist darauf hin, dass der gesamte Kortex als Entstehungsort für Mikrotubuli dienen kann. Für die Verankerung der Minus-Enden der Mikrotubuli am Oocytenkortex ist die Struktur des Aktin-Cytoskeletts bedeutsam (Wang und Riechmann, 2008). Durch die Umstrukturierung des Mikrotubuli-Cytoskeletts im Stadium 7 wird zudem die Wanderung des Oocytenkerns vom posterioren Pol zum anterioren Kortex der Oocyte induziert (Abb. 3: 3.). Die Position des Oocytenkerns definiert dort die dorsale Seite der Oocyte (Spradling, 1993). Die verstärkte Akkumulation von MTOC-Markern an der Kernhülle weist darauf hin, dass der Oocytenkern Entstehungsort der Mikrotubuli sein könnte (Januschke *et al.*, 2006). Zudem konnte gezeigt werden, dass nach vollständiger Depolymerisation der Mikrotubuli in der Oocyte die Neupolymerisation immer in Assoziation mit dem Oocytenkern steht. Die Autoren postulieren daher, dass der Oocytenkern Ausgangspunkt für die Entstehung der Mikrotubuli ist, die dann von dort entlassen, entlang des Kortex transportiert und verankert werden (Januschke *et al.*, 2006).

Bei der Lokalisierung der Plus-Enden der Mikrotubuli zum posterioren Pol spielt die Kinase Par-1 eine entscheidende Rolle. In *par-1* mutanten Oocyten nucleieren die Minus-Enden der Mikrotubuli am gesamten Kortex der Oocyte, wohingegen die Plus-Enden in die Mitte der Oocyte hineinragen (Shulman *et al.*, 2000; Tomancak *et al.*, 2000). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass eine Isoform von Par-1, Par-1 N1, schon im Stadium 7 mikrotubuli-unabhängig am posterioren Pol lokalisiert wird (Doerflinger *et al.*, 2006). Es wird postuliert, dass Par-1 N1 dort für die erste Rekrutierung der Plus-Enden der Mikrotubuli nach posterior zuständig ist. Dadurch können geringe Mengen von *oskar* (*osk*) mRNA posterior lokalisiert und translatiert werden, Osk Protein rekrutiert dann weiteres Par-1 nach posterior. Dies soll dann zu einer positiven Rückkopplung führen, indem mehr posteriores Par-1 mehr positive Plus-Enden nach posterior zieht und somit mehr *osk* mRNA posterior lokalisiert werden kann (Doerflinger *et al.*, 2006; Zimyanin *et al.*, 2007).

Gleichzeitig mit der Wanderung des Oocytenkerns im Stadium 7 zum anterioren Pol der Oocyte wird die *grk* mRNA zwischen Oocytenkern und anteriorem Kortex lokalisiert

(Neuman-Silberberg und Schüpbach, 1993). Dort erfolgt dann das zweite Grk Signal (Abb. 3: 4.) an die umgebenden Follikelzellen, welches die Bildung der DV Achse initialisiert (Gonzalez-Reyes *et al.*, 1995; Roth *et al.*, 1995).

1.4 Spezifische Lokalisierung von mRNA bei Achsenbildung

Die Polarisierung des Mikrotubuli-Cytoskeletts führt neben der Lokalisierung der *grk* mRNA auch zur spezifischen Lokalisierung der *osk* mRNA und *bicoid* (*bcd*) mRNA (Abb. 4). Am posterioren Pol der Oocyte wird die *osk* mRNA positioniert, wo sie die Bildung des Polplasmas induziert (Ephrussi *et al.*, 1991; Kim-Ha *et al.*, 1991). Das Polplasma enthält Determinanten, die für die Bildung des Abdomens und der Keimbahn gebraucht werden (Ephrussi und Lehmann, 1992). Dagegen wird die *bcd* mRNA anterior lokalisiert und definiert dort nach der Fertilisation durch die Bildung eines Morphogen-Gradienten von Bcd Protein den Kopf und den Thorax des Embryos (St Johnston *et al.*, 1989; Driever, 1993). Mutationen in *osk* bzw. *bcd* führen zum Verlust der posterioren bzw. anterioren Strukturen im Emryo. Dagegen führt die Missexpression von Osk bzw. Bcd zur ektopischen Ausbildung von posterioren bzw. anterioren Strukturen (Ephrussi und Lehmann, 1992). Daher ist die spezifische Lokalisation der mRNA von essentieller Bedeutung.

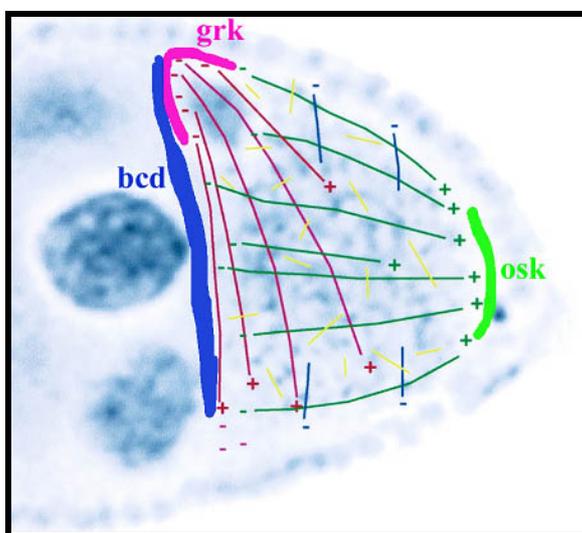


Abb. 4: Lokalisierung von mRNA in der Oocyte

Schematische Darstellung der posterioren Region einer Eikammer im Stadium 9. Mit der Polarisation des Mikrotubuli-Cytoskeletts im Stadium 7 erfolgt der Transport und die Lokalisierung der mRNA *osk* (grün), *bcd* (blau) und *grk* (pink) zum posterioren, anterioren bzw. anterior-dorsalen Pol der Oocyte. Der Transport erfolgt über vermutlich verschiedene Populationen von Mikrotubuli (grüne, pinke, blaue und gelbe Striche), die vom anterioren Kortex, vom Oocytenkern und dem lateralen Kortex nucleieren. Abb. modifiziert nach MacDougall *et al.* (2003).

Da die Lokalisierung der *grk*, *bcd* und *osk* mRNA von der Polarisation des Mikrotubuli-Cytoskeletts abhängt, wird davon ausgegangen, dass diese mRNA durch die minus-end bzw. plus-end gerichteten Mikrotubuli-Motoren Dynein und Kinesin I nach anterior und posterior transportiert werden (Clark *et al.*, 1994; Pokrywka und Stephenson, 1995).

Sowohl der Transport von *bcd* mRNA zum anterioren Pol der Oocyte als auch der Transport von *grk* mRNA in die anterior-dorsale Ecke der Oocyte scheint abhängig von Dynein zu sein. So führt die Überexpression von Dynamitin, einer Untereinheit des Dynactin-Komplexes, der für die Aktivität des Dynein entscheidend ist, zur Misslokalisierung der *grk* mRNA (Duncan und Warrior, 2002; Januschke *et al.*, 2002). Weitere Hinweise liefern Injektionsexperimente von fluoreszenter *grk* mRNA in die Oocyte (MacDougall *et al.*, 2003). So wird die injizierte *grk* mRNA zunächst nach anterior transportiert und dann in einem zweiten Schritt nach dorsal zum Oocytenkern. Erfolgt eine Co-Injektion von *grk* mRNA und Dynein Antikörper, wird *grk* mRNA nicht lokalisiert. Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen zudem Dynein und *grk* mRNA in unmittelbarer Nähe von Mikrotubuli (Delanoue *et al.*, 2007)

Für die Lokalisation von *bcd* mRNA wird das Protein Swallow benötigt. Es bindet direkt an die leichte Kette der Untereinheit von Dynein (Schnorrer *et al.*, 2000). Ferner konnten Cha *et al.* (2001) zeigen, dass injizierte *bcd* mRNA nur dann korrekt am anterioren Kortex der Oocyte lokalisiert wird, wenn die injizierte *bcd* mRNA zuvor mit dem Cytoplasma der Nährzellen in Kontakt gekommen ist. Die *bcd* mRNA benötigt folglich - im Gegensatz zur *grk* mRNA - die Interaktion mit Faktoren aus den Nährzellen für die korrekte Lokalisation. Einen dieser Faktoren stellt das Gen *Exuperantia* dar (Cha *et al.*, 2001). Die unterschiedliche Zusammensetzung von Transport-Komplexen erklärt auch, wie dasselbe Motorprotein zwei verschiedene mRNA zu unterschiedlichen Positionen innerhalb der Oocyte transportieren kann. Zudem wird postuliert, dass es verschiedene Subpopulationen von Mikrotubuli in der Oocyte gibt, die strukturelle und biochemische Unterschiede durch post-translationale Modifikationen oder assoziierte Proteine aufweisen können (Abb. 4) (Cha *et al.*, 2001; Schnorrer *et al.*, 2002; MacDougall *et al.*, 2003).

Im Gegensatz zur *bcd* und *grk* mRNA benötigt die posteriore Lokalisation der *osk* mRNA das plus-end gerichtete Motorprotein Kinesin I (Brendza *et al.*, 2000; Duncan und Warrior, 2002; Palacios und St Johnston, 2002) sowie die Assoziation weiterer Proteine, die mit der *osk* mRNA Ribonucleoprotein (mRNP)-Partikel bilden. Eine direkte Assoziation der *osk* mRNP mit Kinesin I ist noch nicht gezeigt worden. Es ist daher unklar, ob Kinesin I die *osk* mRNP direkt transportiert oder ob es sich eher um einen indirekten Transport handelt. Kinesin I kontrolliert während der Oogenese alle Bewegungen des Cytoplasmas und könnte so die Diffusion der *osk* mRNA zu einem posterior lokalisierten Anker unterstützen (Glotzer *et al.*, 1997; Palacios und St Johnston, 2002).

Eine Reihe von weiteren Genen ist bekannt, die für die posteriore Lokalisation der *osk* mRNA von Bedeutung sind, nachdem das Mikrotubuli-Cytoskelett polarisiert wurde. Das

dsRNA bindende Protein Staufen (Stau) co-lokalisiert mit der *osk* mRNA während der gesamten Oogenese (St Johnston *et al.*, 1991; 1992). In *stau* Mutanten akkumuliert die *osk* mRNA in den frühen Stadien der Oogenese zwar in der Oocyte, wird aber im Stadium 9 nicht zum posterioren Pol transportiert, sondern verbleibt im anterioren Bereich der Oocyte (Ephrussi *et al.*, 1991; Kim-Ha *et al.*, 1991).

Ähnliche *osk*-Phänotypen zeigen hypomorphe Allele von *mago nashi* (*mago*) und *y14* (auch *tsunagi* genannt) (Newmark und Boswell, 1994; Micklem *et al.*, 1997; Hachet und Ephrussi, 2001; Mohr *et al.*, 2001). Auch sie co-lokalisieren mit *osk* mRNA - wenngleich auch nur transient - am posterioren Pol im Stadium 9. Mago und Y14 sind Komponenten des Exon-Exon-Junction-Komplexes (EJC), die speziell an gespleißte mRNA binden (Le Hir *et al.*, 2000; 2001; Kataoka *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2001). Für Hrp48 aus der Familie der hnRNPA/B (heterogenes nucleäres Ribonucleoprotein A/B) konnte gezeigt werden, dass es direkt an die *osk* mRNA bindet und wie Stau während der gesamten Oogenese mit *osk* mRNA co-lokalisiert (Huynh *et al.*, 2004; Yano *et al.*, 2004). Für diese und weitere Faktoren wird postuliert, dass sie gemeinsam mit *osk* mRNA dynamische mRNP bilden. Diese mRNP sind nicht nur für den Transport der mRNA zum posterioren Pol verantwortlich, sondern auch für die dortige Verankerung der *osk* mRNA und seine dortige Translation. Wie diese mRNP gebildet werden und wie die mRNP mit Kinesin I interagiert, ist noch weitgehend unklar.

Die spezifische und gerichtete Lokalisation von *grk*, *bcd* und *osk* mRNA in den Stadien 7-10 ist essentiell für die Etablierung und Ausbildung der Achsen. Im späten Stadium 10 ändert sich der Mechanismus der mRNA Lokalisierung aufgrund der erneuten Umstrukturierung des Mikrotubuli-Cytoskeletts. Das Mikrotubuli-Cytoskelett depolarisiert und bildet kurze, parallel verlaufende Mikrotubuli entlang des Oocytenkortex (Theurkauf *et al.*, 1992). Die zuvor ungerichteten Cytoplasma-Bewegungen in der Oocyte werden ab Stadium 10B gerichtet und fünf mal schneller (Gutzeit, 1986; Bohrmann und Biber, 1994). Dieser Prozess wird „ooplasmic streaming“ genannt. Es wird davon ausgegangen, dass das „ooplasmic streaming“ durch den Kinesin I gerichteten Transport von Vesikeln entlang den subkortikalen Mikrotubuli erfolgt (Palacios und St Johnston, 2002; Serbus *et al.*, 2005). Nahezu gleichzeitig beginnt das Nährzell-Dumping, bei dem die nun degenerierenden Nährzellen ihr Cytoplasma und die darin enthaltenen mRNA und Proteine in die Oocyte entleeren (Gutzeit, 1986). Der größte Teil der *bcd* mRNA wird zu diesem Zeitpunkt anterior lokalisiert und erfordert den kontinuierlichen und aktiven Transport entlang den Mikrotubuli (Weil *et al.*, 2006). Dagegen wird die *osk* mRNA ab Stadium 9 stabil am posterioren Kortex verankert. Bei der Verankerung sind verschiedene aktin-bindende Proteine und das Osk Protein selbst erforderlich (Ephrussi *et al.*, 1991; Kim-Ha *et al.*, 1991; Rongo *et al.*, 1995; Tetzlaff *et al.*,

1996; Jankovics *et al.*, 2002; Polesello *et al.*, 2002; Babu *et al.*, 2004). Injektionsexperimente mit *osk* mRNA in späten Stadien der Oogenese und Lebendbeobachtungen mit einem Osk-GFP Fusionsprotein weisen darauf hin, dass die späte Lokalisation der *osk* mRNA nicht über einen gerichteten Transport, sondern durch Diffusion und Abfangen der *osk* mRNA am posterioren Pol erfolgt (Glotzer *et al.*, 1997; Snee *et al.*, 2007).

1.5 GFP-Stau-Screen

Zusätzlich zu den oben genannten Genen sind weitere Gene bekannt, die an der Ausbildung der Polarität der Oocyte und somit an der Achsenbildung in *Drosophila* beteiligt sind. Die Mehrzahl dieser Gene wurde in Screens für weiblich-sterile und maternal-letale Mutationen entdeckt (Nüsslein-Volhard *et al.*, 1987; Schüpbach und Wieschaus, 1989; 1991). Der Nachteil dieser Screens war, dass sich nur homozygot lebensfähige Mutanten identifizieren ließen. Um diesen limitierenden Schritt zu umgehen und essentielle Gene zu finden, die an der Polarisierung der Oocyte beteiligt sind, wurde ein Screen in Keimbahnklonen mittels des FLP/FRT/DFS-Systems in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe um Daniel St Johnston (Cambridge, England) in unserem Labor durchgeführt (Januschke, 2001; Huynh, 2002; Martin *et al.*, 2003). Im Folgenden wird der Screen GFP-Stau-Screen genannt. Die Verwendung des FLP/FRT/DFS-Systems macht es möglich, homozygot mutante Keimbahnklone in heterozygoten Müttern zu generieren (Xu und Rubin, 1993; Chou und Perrimon, 1996).

Zur Identifizierung von mutanten Linien wurde die Lokalisation des Fusionsproteins GFP-Stau sowie die Position des Oocytenkerns in den mutanten Keimbahnklonen analysiert. Hierbei handelt es sich um ein Fusionsprotein aus GFP und dem in der Keimbahn essentiellen Stau Protein (Schuldt *et al.*, 1998). Das voll funktionsfähige GFP-Stau colokalisiert mit *osk* mRNA am posterioren Pol der Oocyte ab Stadium 9. Seine Lokalisation ist abhängig von der Polarisation des Mikrotubuli-Cytoskeletts sowie von der Lokalisation der *osk* mRNA am posterioren Pol der Oocyte. Dadurch wird es ermöglicht, Störungen der AP Polarität der Oocyte zu detektieren, d. h. es können Gene identifiziert werden, die am Signal der posterioren Follikelzellen an die Oocyte beteiligt sind, die die Umstrukturierung und Polarisierung des Mikrotubuli-Cytoskeletts kontrollieren bzw. die für die Lokalisation, den Transport und die Verankerung von mRNA zuständig sind. Als zusätzlicher Marker wurde die Positionierung des Oocytenkerns verwendet, da die Misslokalisierung des Oocytenkerns auf mutante Gene schließen lässt, die die DV Polarität der Oocyte bzw. die Wanderung des Oocytenkerns selbst regulieren.

In der Arbeitsgruppe um St Johnston wurde nach Mutationen auf dem dritten Chromosom sowie auf dem linken Arm des zweiten Chromosoms gesucht (Huynh, 2002; Martin *et al.*, 2003). In unserem Labor wurde der GFP-Stau-Screen für den rechten Arm des zweiten Chromosoms (2R) durchgeführt (Januschke, 2001). Von 5429 EMS (Ethylmethylsulfat) mutagenisierten Linien wurden 65 homozygot letale Mutationen identifiziert. Durch Kreuzen der Linien untereinander konnten sieben Komplementationsgruppen identifiziert werden.

Unter den mutanten Linien konnten bisher vier Gene identifiziert werden: vier Allele für das Motorprotein Kinesin I (Januschke *et al.*, 2002), ein Allel für die Serin/Threonin-Kinase Par-1, zwei Allele für die 1-Phosphatidylinositol-4-Phosphat 5-Kinase Skittles (Gervais *et al.*, zur Publikation eingereicht) und ein Allel für das ATF7IP/MCAF/AM-Protein Ebu gogo (Niccoli *et al.*, zur Publikation eingereicht).

1.6 Zielsetzung

Die Bildung der AP und der DV Achsen in *Drosophila melanogaster* manifestiert sich bereits während der Oogenese durch die Polarisierung des Mikrotubuli-Cytoskeletts und der anschließenden spezifischen Lokalisierung von mRNA in der Oocyte. Ziel der vorliegenden Arbeit war die Identifizierung von neuen Genen, die an der Oocytenpolarität beteiligt sind. Speziell sollten die beiden letalen Komplementationsgruppen 32.17/11.229 und 7.460/7.134 aus dem o. a. GFP-Stau-Screen kartiert und phänotypisch charakterisiert werden. Als Voraussetzung hierfür wurde zunächst eine molekulare Kartierungskarte für das Chromosom 2R generiert.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden, sofern nicht anders gekennzeichnet, von den Firmen Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) und Sigma (Steinheim) bezogen.

2.1.2 Lösungen/Medien

Die verwendeten Lösungen und Medien wurden, sofern nicht anders gekennzeichnet, in destilliertem H₂O (Milli-Q Water Purification System, Millipore, Eschborn) angesetzt.

Ampicillin:

100 mg/ml Stocklösung in 50% Ethanol

Anderson Sammel-Gel 15%:

30% Acrylamid, 1% Bis-Acrylamid, 1,5 M Tris (Tris-[hydroxymethyl]-Aminomethan) pH 8,8, 10% Ammoniumpersulfat (APS), 1% Temed (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin)

Apfelsaftagar:

40 g Agar, 1 l H₂O, 333,4 ml handelsüblicher Apfelsaft, 16,7 g handelsüblicher Zucker, 2,66 g flüssiges Nipagin

BBT1:

1% BSA (Rinder-Serumalbumin), 1% Triton in PBS

BBT2:

1% BSA, 0,3% Triton in PBS

CAPS 10X (5 l):

110,65 g 3-Cyclohexylamino-1-Propansulfonsäure, 14 g NaOH, pH 11

DAB 20X:

10 mg/ml Diaminobenzidin in Tris/HCl

DEPC-behandeltes H₂O:

2 ml DEPC (Diethylpyrocarbonat) auf 1 l H₂O, über Nacht bei 37°C schütteln, autoklavieren

Extraktions-Puffer:

20 mM Hepes pH 7,5, 400 mM NaCl, 0,1 mM EGTA (1,2-Bis-[2-aminoethoxyethan]-N, N, N', N'-tetraessigsäure), 10% Glycerol, 1X Protein-Inhibitor-Cocktail (Roche, Mannheim)

Hoyers-Medium:

20 g Glycerin, 30 g Gummi-Arabicum, 200 g Chloralhydrat, 50 ml H₂O

Hybridisierungslösung:

5X SSC, 50% Formamid, 50 µl/ml Heparin, 0,2% Tween20, in H₂O (DEPC)

Hybridisierungslösung/DNA:

Hybridisierungslösung mit 100 µg/ml Lachs-Sperma DNA

IP-Puffer

40 mM Hepes 2-(4-[2-Hydroxyethyl]-1-piperazino)-ethansulfonsäure, pH 7,5, 300 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 500 mM Saccharose, 2X Protein-Inhibitor-Cocktail (Roche)

Ladepuffer (6X):

0,25% Bromophenol, 0,25% Xylan, 15% Ficoll

Laufpuffer:

60 g Tris, 288 g Glycin, 10% w/v SDS 100 ml (10 g), auf 2 l

LB-Medium:

1% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 1% NaCl, pH 7, autoklavieren

LB-Agar:

LB-Medium, 15 g/l Agar

Maisgrießagar (10 l):

85 g Agar-Agar, 766 g Maisschrot (Küper, Oberhausen), 100 g Sojamehl (Edelsoja, Hamburg), 180 g Trockenhefe (Biospringer, Maisons Alford, Frankreich), 408 g Rübensirup (Grafschafter Krautfabrik, Meckenheim), 816 g Malzextrakt (Leyh-Pharma GmbH, Trusetal), 150 ml Nipagin-Lösung, 45 ml Propionsäure

NBT:

75 mg/ml 4-Nitroblau-tetrazolium-chlorid in 70% DMF (Dimethylformamid)

PBS:

137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, 1,7 mM KH₂PO₄, pH 7, 2 ml DEPC/1 l, bei 37°C über Nacht schütteln, autoklavieren

PBST:

0,1% TritonX100 in PBS

RNA-AP-Puffer:

100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂, 100 mM Tris pH 9,5, 0,2% Tween20

SDS-Poben-Puffer 5X:

300 mM Tris pH 6,8, 32% Glycerol, 10% SDS, 0,5 M DTT (Dithiothreitol), Bromophenol blau

SOC-Medium (1 l):

20 g Bacto-Trypton, 5 g Bacto-Yeast-Extrakt, 0,5 g NaCl, 10 ml 250 mM KCl, pH 7, 5 ml 2 M MgCl₂, autoklavieren, 20 ml sterile 1M Glukose

SquiB-Puffer:

10 mM Tris pH 8,2, 1 mM EDTA (Ethyldiamin-N, N, N', N'-tetraessigsäure, Dinatriumsalz), 25 mM NaCl

SSC 20X (1 l):

175 g NaCl, 88 g Natriumcitrat, pH 7, autoklavieren

Stopplösung:

0,2 M Natriumacetat, 1% Essigsäure, pH 6

Strip-Lösung (250 ml):

16,5 ml 1 M Tris pH 6,8, 50 ml 10% SDS, 1,8 ml β -Mercapthoethanol

TAE 50X (1 l):

242 g Tris, 57,1 ml Essigsäure, 100 ml 0,5 M EDTA, pH 8

TBS:

25 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl

TE-Puffer:

10 mM Tris pH 8, 1 mM EDTA

Transferpuffer:

10% Methanol, 10 mM CAPS-NaOH pH 11

Trenngel:

30% Acrylamid, 1% Bis-Acrylamid, 1,5 M Tris pH 6,8, 10% APS, 1% Temed

tRNA:

20 mg/ml tRNA aus der Bäckerhefe (Roche)

TTBS:

0, 1% Tween in TBS

Wasch-Puffer:

20 mM HEPES pH 7,5, 400 mM NaCl, 0,01% BSA, 0,5% Triton, 0,5% NP40, 1X Protein-Inhibitor-Cocktail (Roche)

X-Gal:

100 mg/ml Stocklösung in DMF

X-Phosphat:

50 mg/ml 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphat in DMF

2.1.3 Antikörper, Farbstoffe, Seren

Folgende Antikörper wurden mit den angegebenen Konzentrationen für Antikörperfärbungen an Ovarien und Western Blots (W) verwendet:

Primäre Antikörper:

Anti-1D12 (Gurken) aus Maus, 1:100 (Developmental Studies Hybridoma Bank)
Anti-Aktin aus Kaninchen, 1:10000 (W) (Sigma)
Anti-βGal aus Kaninchen, 1:1000 (Cappel)
Anti-Barentsz aus Kaninchen, 1:50 (van Eden *et al.*, 2001)
Anti-Digoxygenin aus Schaf, 1:50 (Boehringer, Mannheim)
Anti-Digoxygenin-Alkalische-Phosphatase aus Maus 1:5000 (Dianova, Hamburg)
Anti-FMIP (Thoc5) aus Ziege 1:50/1:250 (W) (Santa Cruz Biotechnology)
Anti-GFP aus Maus, 1:500 (W) (Roche)
Anti-GFP aus Kaninchen, 1:100 (Roche)
Anti-Hämagglutinin (HA) aus Ratte, 1:500 (W) (Roche)
Anti-Hpr1 aus Ratte 1:50 (Rehwinkel *et al.*, 2004)
Anti-Lamin (T40) aus Maus, 1:50 (Buchenau *et al.*, 1997)
Anti-Mago-nashi aus Kaninchen, 1:50 (Hachet und Ephrussi, 2001)
Anti-Oskar aus Kaninchen, 1:100/1:1000 (W) (Markussen, *et al.*, 1995)
Anti-Tho2 aus Ratte 1:50 (Rehwinkel *et al.*, 2004)
Anti-Tyr-Tubulin aus Ratte 1:1000 (SeroTec, Düsseldorf)
Anti-Y14 aus Ratte, 1:50/1:5000 (W) (Hachet und Ephrussi, 2001)

Sekundäre Antikörper:

Anti-Maus-Alexa488 aus Ziege, 1:400 (Invitrogen, Karlsruhe)
Anti-Maus-Alexa555 aus Ziege, 1:400 (Invitrogen)
Anti-Maus-HRP aus Ziege, 1:2000 (W) (Dianova)
Anti-Ratte-Alexa488 aus Ziege, 1:400 (Invitrogen)
Anti-Ratte-Alexa555 aus Ziege, 1:400 (Invitrogen)
Anti-Ratte-HRP aus Ziege, 1:1000 (W) (Amersham, Braunschweig)
Anti-Kaninchen-Alexa488 aus Ziege, 1:400 (Invitrogen)
Anti-Kaninchen-Alexa555 aus Ziege, 1:400 (Invitrogen)
Anti-Kaninchen-HRP aus Ziege, 1:1000 (W) (Dianova)

Farbstoffe und Seren:

Phalloidin-Rhodamin, 1:200 (Invitrogen)

Phalloidin-FITC, 1:200 (Invitrogen)
 Ziegenserum (Dianova)
 Rinder-Serumalbumin (Sigma)

2.1.4 Fliegenstämme

Die hier aufgeführten Stämme sind, wenn nicht anders gekennzeichnet, aus der Stammsammlung von Prof. Dr. Siegfried Roth (Institut für Entwicklungsbiologie, Universität Köln).

Mutante Stämme aus dem GFP-Stau-Screen:

32.17: dp FRT42B G13/ CyO
 11.229: dp FRT42B G13/ CyO
 7.460: dp FRT42B G13/ CyO
 7.134: dp FRT42B G13/ CyO

Stämme zur Kartierung

al dp ^{ovi} b1 pr1 Bl c px sp/ CyO	Stammsammlung Tübingen
„cpxsp“: al dp ^{ovi} b pr cn vg c a px bw mi sp/ CyO	Stammsammlung Tübingen isogenised 2002
FRT42B/CyO: dp FRT42B G13/ CyO	St Johnston, Cambridge, England
FRT42B: w ⁻ ; dp FRT42B G13/ dp FRT42B G13	St Johnston, Cambridge, England
P{ry[+7.2]=neoFRT}42D bw[1]	
G-salpa60A[R60]/ SM6b, P{eve-lacZ8.0}SB1	Bloomington

Rekombinante Stämme zur Kartierung von 32.17/11.229

1-43 -cpx+/CyO	diese Arbeit
1-45 FRT++sp/CyO	diese Arbeit

Rekombinante Stämme zur Kartierung von 7.460/7.134

1-100 FRTcpxsp/CyO	diese Arbeit
--------------------	--------------

Defiziente Stämme

596: Df(2R)stan2, b[1] pr[1] P{ry[+7.2]=neoFRT}42D/ CyO	Bloomington
1545: Df(2R)eve, cn[1]/CyO	Bloomington

1702: Df(2R)X1, Mef2[X1]/CyO, Adh[nB]	Bloomington
1719: Df(2R)X3/CyO, Adh[nB]	Bloomington
1743: w[1118]; Df(2R)B5, px[1] sp[1]/CyO, Adh[nB]	Bloomington
5425: w[*]; Df(2R)12/CyO	Bloomington
6864: y[1] w[67c23]; Df(2R)01D09Y-M073/SM6a	Bloomington
6863: y[1] w[67c23]; Df(2R)01D09Y-M092/SM6a	Bloomington
6862: y[1] w[67c23]; Df(2R)01D09Y-M186/SM6a	Bloomington
d03029: P{XP}d03029	Harvard Exelixis
d03191: P{XP}d03191	Harvard Exelixis
e00053: PBac{RB}CG2264e00053	Harvard Exelixis
e00439: PBac{RB}CG2264[e00439]	Harvard Exelixis
e01890: PBac{RB}e01890	Harvard Exelixis
e01891: PBac{RB}e01891	Harvard Exelixis
e02270: PBac{RB}e02270	Harvard Exelixis
e03010: PBac{RB}CG18445[e03010]	Harvard Exelixis
e04167: PBac{RB}e04167	Harvard Exelixis
EX3191-1890	diese Arbeit
EX3191-53	diese Arbeit
EX3191-439	diese Arbeit
EX3191-2270	diese Arbeit
EX3191-3010	diese Arbeit
EX3191-4167	diese Arbeit
EX3029-1891	diese Arbeit

Stämme zur Generierung von Keimbahnklonen

stauGFP hs flp; L/ CyO	St Johnston, Cambridge, England
hs flp; sp/SM6; TM6	Bloomington
P(w+ FRT42B w+ ovoD1)/ MS(2) M(1) wg sp-1/ CyO	St Johnston, Cambridge, England

thoc5-transgene Stämme

1A w; Gl ^a / CyO; mtubGFP- <i>thoc5</i> w+/ TM2	diese Arbeit
16D w; Gl ^a / CyO; pUASP2:: <i>thoc5</i> w+/ TM2	diese Arbeit
2B w; Gl ^a / CyO; pUASP2:: <i>HA-thoc5</i> w+/ TM2	diese Arbeit

Sonstige Stämme*w**w*; Gl⁺/ CyO; MKRS/ TM2

tub Gal4 VG10/ TM3 Sb

w; Bl⁺/ CyO; nos Gal4 Sb/ TM6 Hu

mtub Gal4 VP16; Sco/ CyO

GFP 342 GFPmago 4.1M

St Johnston, Cambridge, England

2.1.5 Oligonucleotide

Die Synthese der Oligonucleotide wurden bei den Firmen Eurogentec (Köln) und Sigma-Aldrich (Steinheim) in Auftrag gegeben.

PLP Oligonucleotide**Bezeichnung****der Oligonucleotide****Sequenz der Oligonucleotide 5'-3'**

R008L	GAGACGCGACACAGTTGCACAGA
R008R	ACCGCCTTTCAACACCTTCAACAAA
R017L	CTCGACGGTGGGCTGAGATATGAA
R017R	TCAACAAACGAAGGAGAGGAAGGAGTG
R036L	CGAACTCAAGGCACCGAATACGAAA
R036R	TGAATGCAAATTGAAACGCAGCAAG
R039L	CATCGCCGTTCTGCGTTTCAGTTT
R039R	GCCCGCCATTGTTGTTGCTCTTT
R046L	CCCAACTGAGGGAGCTGCGCTAT
R046R	GCTTTCCCCATTTTCCCTACCCATTT
R068L	TCACCCTTAAATAGTTTGTGTTGGTCTGAAAA
R068R	TGGGCAGCAATGACAACAATAGACC
R083L	TCACAAGCCCCTCAACCAATACCATC
R083R	CGATGGCTTTCAAGGGCACACA
R094L	GCAACAAGTGCCTGCGAAAACTG
R094R	CACACACATACACGCACGCTGAAAA
R096L	CAGGATTGATGGAGTTTATTGCTTTGCT
R096R	TGTAAAAATGTAAGTGTAGGGCTTCCGTGT
R097L	GCGTTTCTCTTTCCCCGGCATT
R097R	GCCCCTTGGGTCATTTGTCCATTC
R097Li	GACAGAGACGGGTATGGTGGAAAAGAGAA
R097Ri	TTTGGGAATCGCTCGAAATGGATG
R109L	CCTGCCTCCATGCACTGAAAGAAAT
R109R	TGTCTGCACAGGGAAATCAGATCAAG
R111L	CCCACACATTGCTAAAATGCAAAA
R111R	TCCTTAACCTAATAGAGCAAAAACAAATTAAGCA
R114L	CGGGACATGAAGAGAATGGGCAAA
R114R	GCCGAGAAGGCAGCAGAGGAATAAAA
R114Li	CCCCCGAGCTGTCTCCTGGTATTT
R114Ri	CGGTACGGTCTTTAGCAACTGTGGTTTTG

R117L	CGTGGCATCGAAAACAAAAACCAA
R117R	GCCCAAGTGAAAGTGATGAAGAGGAGAA
R120L	TGTCAACGAATCTCCACGCCTAATGTAA
R120R	ACAAAACCTCGCAAACGCACACACAC
R124L	AGATTCATCTCCTGCCTTACATCAGCTCTAT
R124R	AGCCCAGCCCAGACTAAAGTCAGAA
R134L	GCCCCGGACTGCTATCCCTGCT
R134R	GGCCAGCTTTCTATGCGAATCCTCTATTGT
R139L	AAGTAGAGAACTTTCGTATCAGCCCCCTTGA
R139R	AGTGACGCAGGCAAAATCGGAGAA

RFLP und SNP Oligonucleotide

Bezeichnung der Oligonucleotide	Sequenz der Oligonucleotide 5'-3'
2R012L	CACACACACAGACAGACAGACGGAATGA
2R012R	GAAAATGGGACGGCGATGGAGAG
2R016L	GGACAGGACACACACACACAAAGAGACC
2R016R	GCGTCATCCCAGCATTATCCAACC
2R017R	GGTGGTTCAGGTGGTTGTTTCGTGTT
2R017L	CGTATTCGGTTTCGCTTCACTCATCCT
2R018L	AACATTGGAGCCTGGTGGAGTTGG
2R018R	TAGAGCAGAGGGAGCGATGCGAGT
2R019R	GACAAAGACAACGACAAAGACAACGACAGA
2R019L	ACAAAACAACAAGACCTCCCACCAA
2R020L	GAGTAGAACCGAAGCCGAGGGGTAAATC
2R020R	CACAGGAAAACGCAATGAGAGGAGAAAA
2R021L	CTTAAGGGCGCCTGCGCTGTTTACTTTGTGTA
2R021R	CTCTTGGGCGGATTTACGATACGGGTCTGTTT
2R022L	TGCGTCGTGCTCAATGTCCTTTTGT
2R022R	TCCGATCTGGCTGTGGGATGTGTT
2R023L	TTTGTGGCGGCGAGTTCATTCT
2R023R	TGCGGTATTTGATTTGCTTGGCTTTG
2R032L	CAGACAACCATCCACCGAAGCACA
2R032R	CGGGCCATAAGCACCGAGTATTGAC
2R033L	TTGTTGTTGTTGTGTGTTGCTTGTGTTGTT
2R033R	AAAAGGTGGTGAAGGGGTTGGAAGG
2R035L	AGGTGCGGAACAACACACACTGAAAA
2R035R	CAACAAGAGCGGCCCAAAGGTAAAA
2R039L	CCCCAAAAGGGTAGCAAAAACAACCAA
2R039R	GGAGATAGACCAGGAGCAGGGCAGA
2R041L	TCGTCCCATTCCCATACCCATACCC
2R041R	GCAGTTGCTCGCTGCCCGTTTT
2R048L	GCTCTGGATTGTTTTGCGGTGTAGGA
2R048R	GAAAGGTGCCAAAGTCCCACGCTAA
2R051L	GCTAACCAACCAACCATCCGAGCA
2R051R	GCACACAGCGGCATCCATAAACAA
2R053L	TGCTACACACACGCACACGAACACTC
2R053R	CTCCTGCCCACTTGCTCCACTCC
2R054L	GGTTGCTTGCTTGGTTGCCTGCT
2R054R	ATCGCCCGTTTCCATTCCCATCT
2R055L	GGTTTTCTTCCGTTTGGGCTTTG
2R055R	ACATTTATTGCGCTGGCATTGTTGG
2R061L	CACTTCCCATTCCCATTCCCATTCC

2R061R GACCACGGACCACAGACCCCAAC
2R064L CCCCATAAAATCGCATAAAAGCGCATAA
2R064R CAGACTTCTTCACGCACAAAGGCAAA
2R067L GCCTTTCCACCTCCCCATTTTCC
2R067R GAGAGCGAGAGAGCATTTCCCCAGA
2R068L CGACACCCTGAAATGCGAAAGAACA
2R068R AGCAATGGGCAGCAATGACAACAA
2R075L CAGGAGGAAAATCGCAGGAAAATCGT
2R075R CTGTCCCAGCATCAGTGGCTCGT
2R076L ATCTTGCGGCGGCTGGCGGCTTGTAAGTAG
2R076R GCGGTGCGACGGCATATGCCAGATTGCTAAATA
2R081L CGCATAAAAGAAATGTAAAACCGCAAAA
2R081R CCGCAGGAGACAAACAACCAAC
2R083L AAGCCCCCTTCACAAGCCCCTCAACCAATACC
2R083R CAATTCCCAGCGCCAACTTGCCCATCTATCAA
2R089L GCCAAGCAAAGGAAAACACACACAAA
2R089R CCCATCAGCACCACCCACAATACTC
2R094L CCTCTTCTCTCACTCTCTTCACCGCTATCT
2R094R TTTCCCTTCTCACCCACTCACCT
2R096L GTGCCTCCTCATTTTTCGGTTTTGTTTT
2R096R TTTTCTCCGTATTTGCCGTATTTTCCTTTC
2R097L TTTGCCCTGGGTGCGGACCGAAAATA
2R097R GGGGGTATGCGAGGGGATGAATGGGAAGAG
2R103L GCCATCTTTTGTGCTTCTGCCTTCTGT
2R103R TCTCGCTTTTATCCCCTTCCGTTTCC
2R104L GAACGCCAACCGTCGAAGGGGACAGTCGTA
2R104R CGCGCCGGCGGCAAGAAGAAGAGC
2R107L ACCAAACCAAACCAAACCGAACCAAC
2R107R ACCCGCACACCTCATCACCATAACC
2R109L TCAGGTAACGACGCAATGGAAGGAA
2R109R TCAGAACCAGCCAGCAGCAACAAA
2R111L CTTGGGCACATAGACTGCGAACGA
2R111R TTTTGATTTGACTAAACGGGGCACTCAC
2R116L AGGAGCCAAGCGGTATCAGCAGTTTT
2R116R ATTCCGAGCAACGGCACTTTTGG
2R118L GCACGACGACAGACGAGTAAACAAACA
2R118R AAAGAGCAAGAGCCAGACAAAAGATAAGCA
2R119L TTGCTCCCTTCTTGCGCCGCTTTTTATTTGTTG
2R119R GCGGCGCCCGCTGCCTTGAGTATGA
2R120L TACCGATGAGATGGCGAAGGCGAAG
2R120R AAAAGGACGAGAGGAGGCGGATGGA
2R127L GGCGGTGTGAATGCCAAGAACAA
2R127R GGGTCAAATGCAAAGTGAAGGCACA
2R130L TTGGCCGCGGCTTAACCCTTGGGATTCA
2R130R GGCCGAGGGAGGGGGCAACAAGGAAGAC
2R131L CACGAGGGGTAAAGTGAGTGGCAGA
2R131R GAAAGCAAATAGTGGGCGGAAAGCA
2R132L GCATTTGGATTTATGTGCGTGCCGTTTG
2R132R CATTGCCACCGAGCCAGGACGAG
2R133L CGGAGTGGATTTGAGCCTATTACCAAG
2R133R TTCATTTTACGGTCAGTTAGGAGGAAGGA
2R134L TGAAACCGATGAGCGTGGAATGAA
2R134R GGAAATGGTGGGGAAAGGCGTAGAAA
2R135L GCCCTTTGTGAGCGAAACATCCAA
2R135R GAAGACAGCGGTTGAGTGGGGAAAA
2R136L TTCCTCGCCTTGTTTGGGTTTGT

2R136R	AGCCAGCCACATCTTCCCTTCCTC
2R137L	TAGTACCACCGCCAAAAGCAGGCAGATGTTTCATAC
2R137R	AGCCGCATTAATCTTCTTGGCAGTGCATTTACCTT
2R138L	CTATCACCGCACCGCACCGCACT
2R138R	CACTGACGAACTGGGACACAACGCAGA
2R140L	AGGAGGCGGATGAAACGAAACGA
2R140R	GCTGGCTGGCTGACTGACTGACTG
2R141L	TGGAGGAGGGTTTTGAGTATCGTGAGG
2R141R	TCTCTGTGTGTCGGGTCTGGATGTG
2R142L	CGAAGGACGACAGACGATGACGAAG
2R142R	GAGGGTGTGGGTGGTTGGGATTG
2R143L	TTGAGTTTGAAGCACGGTTTTCGAGTG
2R143R	ATTTGGGCTGGGATTTGGGATCTGT
2R143.AL	GGAGTTATGGAATTATTAATGGGTGAAT
2R143.AR	TGTAGATAGATATGTTACTGGGCCAAAAAC
2R143.1L	ATGATGCAGATAACCACCGACGACAG
2R143.1R	GGAAACCCTAAAGGCAGCAGACACAG
2R143.12L	CCAGGGTTGTCATGCCGGATTAGTT
2R143.12R	GGTCACCGATTAGCGCGTCATAGTA
2R143.BL	TTCGCAGTTTAGCGTGGGAAAAGACGA
2R143.BR	CCCGCCTGATAGCCCTGCAAAAGTT
2R143.13L	CTGATTGATGACGCTTCTATATGGGGTGAT
2R143.13R	ACGTATAGTTTGCAGGGTGAGCTCGGTTTT
2R143.15L	TAAAGGGGCACCGAATCAAATAAAGAAT
2R143.15R	GCAACGAAACCGAAGCGATGAGATA
2R143.2L	AGACACGCGGGCTCGGCTATTTATT
2R143.2R	GATGTTGAGGGGAGCTTTTGTGTTGA
2R143.3L	TGGTAGGCTCCTTCGTAAATATGTTGTTGG
2R143.3R	TATTTTATCCGCCTAGGTTCCCGAGTGA
2R144L	GCAAAGAAGTCGGGAATAGCCAGCA
2R144R	ATGTCCTTACCACCCACCCCTCCTC
2R145L	ATAAATACCCGCCAATTGCACCTGCACCCAGTCA
2R145R	ATTAGCGGCCACGGGGCGTATGAGTGATGTTACA
2R147L	ACCCACACCCAGCACACAAGCAC
2R147R	CACACTCCCGCAGACAAGAGGACAA
2R148L	GAAGTAGTCAGCCCAACAGCCAACA
2R148R	AGCCGAGAGCCCAACATGAAACAC

sonstige Oligonucleotide

Bezeichnung der Oligonucleotide	Sequenz der Oligonucleotide 5'-3'
thoc5L	ATGGAAACAATATTGAACACGC
thoc5LBglII	GGAAGATCTATGAAACAATATTGAACACGC
thoc5R	TAGCTTTAAATGTTACTTATTTATTG
thoc5RXbal	GCTCTAGATAGCTTTAAATGTTACTTATTTATTG
thoc5RSpel	GGACTAGTTAGCTTTAAATGTTACTTATTTATTG
thoc5aR	TCGTAATAAACGCAACTGTGAG
thoc5aRXbal	GCTCTAGATCGTAATAAACGCAACTGTGAG
thoc5aRSpel	GGACTAGTTCGTAATAAACGCAACTGTGAG
1CG2970	GTTAACCGCGAATCCCATTC
2CG2970	TAAACAAAAGATTCGTTCCG
3CG2970	TGCCCAAACAGAGCGCTATT

4CG2970	TTTTCAGCTGCCACCAGGGTT
5CG2970	CACTTTGGCATCACACTACG
6CG2970	GCTGCTCAGCATCTTCAAGA
7CG2970	ATTTTGCAGCGGGATATCCG
8CG2970	TATCCCTCGCTGAAGCAGAT
9CG2970	CCATGATCTTGCCCTCGAAT
1CG2980	TGTTTGCGCAATCGTCTGGT
2CG2980	GCAAGGTAAGTCCGATTTC
3CG2980	AAGGCACTCGACAAGCAGTA
4CG2980	ACAACCTGGACGACTCACTC
5CG2980	ATTACGCTCTTTCAGCTACG
6CG2980	TACGTACAACTTTACCGCG
7CG2980	CTCACGCCCTACAAATACA
5CG2980R	CGTAGCTGAAAGAGCGTAAT
7CG2980R	TGTATTTGTAGGGGCGTGAG
1cateninre	ATCACACACAAATCTGGGGG
2cateninre	TGTCCGGGATAACTTTCCGT
3cateninre	ATCGAGCCCCTTAAGGACTA
4cateninre	GCCATGGACCTCATCCATTT
5cateninre	CCTACATCAGCCACAACCAT
6cateninre	CACATTGCGCCACGGAGCG
7cateninre	AACAACGGAGATCTGAACAC
8cateninre	GAAGGTCGATCACGTCATCA
9cateninre	GTATTGAGTTTTGAGTTGAG
10cateninre	AGTCTACACTGTTGGCACTG
grkL	CTTCCCGCGCTTGCTGCTCTTT
grkR	GTTGCTGCTGCTTCCGGCGATAAT
osk1intrL	TGAGCCACGCCAGAATG
osk1intrR	GACAGAGCCCTCCGTTTGAAG
osklongL	CGAATTGCCGGAGTTGTGG
osklongR	TGGCGATATCCTTGGTCTTTTCAT
osk2intrL	AAAGACCAAGGATATCGCCACCAG
osk2intrR	AGCATAAAATCATCGCCATAAGC
osk3intrL	GCACCGCTGGGCAACTA
osk3intrR	TTAATACTCCAGACTCGTTTC
d03191L	CGCCCGTCCGAGTGTATG
d01210L	CCGGGTCAAGCTAATTATCTCCAT
d01891L	TTGGGATTGTGGAGAAAGTAAA
e01890R	CGGCACTGGGAGCACAAATG
e02270R	ACTGCTCGCCTGTTGCCTGTAT
e03029R	CTGATTGGGCTGCTATTGGGTAA
e04167R	TCGCTTGCGGTTTTTGTAGAC
XP	TTTACTCCAGTCACAGCTTTG
Xpout	AATGATTTCGCAGTGGAAGGCT
RB	CCTCGATATACAGACCGATAAAAC
RBout	TGCATTTGCCTTTCGCCTTAT
CG2264seq1	TTGCTCGGTTAATTGATA
CG2264seq2	ACATGTTCTTCGCATCC
CG2264seq6	GATAAGAGCAAATACAG
CG2264seq7	TACACAGCTACACAGTTG
CG2264seq8	TTTCTACCCCGCCCTTA
CG2264seq9	GCAAGAGGGGGCAGTTAT
CG2264seq12	AGTTATATGATGATGACG
CG2264seq13	AACGAACGTGTTTCTTAT
CG2264seq14	TGTCACTAAGCTGCCTGA
CG2264seq15	CATTTAACACACTTTTGC

CG2264seq16	GTATGTTGGGGCAACAAG
CG2264seq1R	TATCAATTAACCGAGCAA
CG2264seq3R	GTTTGC GTTGTACTTTAA
CG2292For	TTCAGAGCCGATTCCTTAACC
CG2292Rev	CGACGTCAATGGTGACAAAA
CG2292seq1	AGGCTAATATACAGTTAC
CG2292seq2	TGGGCGTGTCACGCACTCG
CG2292seq3	GACATGTCCACAAGCCAG
CG2292seq4	CACCGCCCATGAACAACCT
CG2292seq5	TAAAGTGGAATTGGTCCT
CG2292seq6	TGCTTTCCGCTGCTGCCG
CG2292seq7	CGGGCAGAGAGATCAGTT
CG2292seq1For	GTAAGTGTATATTAGCCT
CG2292seq2For	CGAGTGCGTGACACGCCCA
cdc2rkFor	GCGCCCGCGACAGGAAGG
cdc2rkRev	GTATTGCCCGCGATGACGAGTTT
cdc2rkSeq1	TTGGCCAATCATGTGAAA
cdc2rkSeq2	ACCAACTTTAATGCAGCC
cdc2rkSeq3	ACCGAATGCGTTAAATGC
cdc2rkSeq4	TCCGATAGCCCGCAAGAA
CG12920L	CGCGCAAAGCCACAACAACGAC
CG12920R	GGTGCGCAAGAACGAGCCAATCAA
CG12920seq1	CAACTATAATTTTAGTTAGC
CG12920seq2	CGTGAAACCTTCTTCAA
CG12920seq3	GCCAGTTTCGAGCCCTAT
CG12920seq4	AAATGGAGTTTAGATCCA
CG1371L	GCGACGAGCCAAGCACA
CG1371R	GCCACACTGTTGCCCGTATT
CG1371FORX	CCCTGGCTGCAAACGTCCGTCTT
CG1371seq1	GTTCTTGCGCACCTGTGT
CG1371seq2	GAACACAGGAGAATCCGA
CG1371seq3	CTTTAAAAATAGAGAAATGC
CG1371seq4	CAATTGGGCCAAACTTAA
CG1371seq5	TCTTGTGGGCCACTGCAT
CG1371seq6	AGAGATTTCCCTGGGGAA
CG1371seq7	TCTATGGTTAAATTGCTG
CG1371seq8	CTTGGTAAGTCCCACATT
CG1371seq9	GCTTGCAACAGGTACTTT
CG1371seq10	GTGTTGCCGCTAACCACA
CG1371seq11	GTTAGAGGGTGAGCAGTC
1371egrseq1	TAAAATTACGAAAACGCC
1371egrseq 2	CCTTACATTTTCGATGAT
1371egrseq2R	GGCCCATCCTTAACGATA
1371egrseq 3	CTATTGCGGCGCATGTCT
1371egrseq 4	TTAACACTGCATAAAACC
1371egrseq 5	AAACTAATTAGCTGACCA
1371egrseq5R	TAGATAAGCCAAATGAAC
1371egrseq 6	ATGAAGCGAAAACCCGGG
1371egrseq6R	TTATGTGCACTTAAAACC
1371egrseq 7	TTATTTAGTGTTATATCG
EgrFOR	AATCCGTTGTCCCTCTTGCT
EgrREV	TTTCAATTGCAACTGGTAGCA
egrFor2	AAAACACCACCCCGGGAGAACCTT
egrRev2	CAGATGTTGCCCGGGACAGACG
egrFORneu	TCATCATCATCATCGTCGTCATTATCA
egrREVneu	TTGGGACGTTCAATTTTAGACACA

egrREVX	CCCCTCGGGCTGCTGATGGTG
egrseq1	GCAAACAAGAACTGATAA
egrseq2	CAATTATGACTGCCGAGA
egrseq2R	TCTCGGCAGTCATAATTG
egrseq3	AATTGGGGCTACGTTAAA
egrseq3R	AATTGTTACACACTCATT
egrseq4	AATGAACGTCCCAAATGG
egrseq5	ATAAACTCAACAATGCAC
egrseq6	GATAGTTAACTGCGTAAC
egrseq7	ACGAGAGAAACTCTTATC
egrseq8	GAATGCGATTCATCGCCA
egrneuseq1	AATTGATAACATTGCGTC
egrneuseq 2	TAGGAATGAGTTGTTATG
egrneuseq2R	ATACCTTTACACTCGTTT
egrneuseq3	TGCAAATTGGACTTTAAC
egrneuseq 4	CCGATTTAAATGCCACTG
egrneuseq 5	CCCTCTAAGAAAGTGACA
egrneuseq5R	TGTATAAATTATGGACTT
egrneuseq 6	ATATATTTTTTCGGGTGTC
egrneuseq 7	TACCTCGAATTGTTTACA
egrneuseq 8	TCCGCAAGGAAACACTCA

2.1.6 Verwendete Vektoren und Plasmide

Vektor/Plasmid	Quelle
pCRII-TOPO	Invitrogen, Karlsruhe
pUASp2	Riechmann (Rorth, 1998)
pUASp2-HA	Riechmann (Rorth, 1998)
tubGFP	Januschke J.
pUChs π Δ 2–3	Roth (Rubin <i>et al.</i> 1982)
osk-Plasmid	Roth
bcd-Plasmid	Roth
grk-Plasmid	Roth
pCRII-TOPO- <i>thoc5</i>	diese Arbeit, s. 2.2.14
pCRII-TOPO-BgIII- <i>thoc5</i> -SpeI	diese Arbeit, s. 2.2.14
pUASp2:: <i>thoc5</i>	diese Arbeit, s. 2.2.14
pUASP2:: <i>HA-thoc5</i>	diese Arbeit, s. 2.2.14
tubGFP- <i>thoc5</i>	diese Arbeit, s. 2.2.14

2.1.7 Computer-Software

Adobe Photoshop 6.0

Lasergene Package, DNA-Star

NEBcutter V2.0 (New England Biolabs [NEB], Schwalbach)

2.1.8 Mikroskope

Axioplan2 (Zeiss, Göttingen) mit HBO 100 W UV Lampe und AxioCam color 412-312

Digitalkamera

TCS SP II Laser Scanning Spectral Confocal Microscope (Leica, Wetzlar)

2.2 Methoden

2.2.1 Fliegenhaltung

Die verwendeten Stämme von *Drosophila melanogaster* wurden gezüchtet, wie bei Ashburner (1989) beschrieben. Die Fliegen wurden normalerweise bei 18°C auf Maisgrießagar gehalten. Zur Verkürzung der Generationszeit wurden sie bei 25°C herangezogen. Um die genetische Reinheit der angesetzten Kreuzungen zu garantieren, wurden für Kreuzungen nur unbefruchtete Weibchen verwendet. Diese Weibchen waren nicht älter als 8 h (bei 25°C) bzw. nicht älter als 20 h (bei 18°C).

2.2.2 Generierung homozygoter Keimbahnklone mittels FLP/FRT/DFS-Technik

Zur Generierung von homozygot mutanten Keimbahnklonen wurde das FLP/FRT/DFS-System verwendet (Chou *et al.* 1993; Xu und Rubin, 1993; Chou und Perrimon, 1996).

2.2.3 Generierung von Exelisis Deletionen

Defizienzen wurden generiert, wie bei Parks *et al.* (2004) beschrieben. Die Defizienzen wurden durch PCR-Analyse mit den jeweiligen Oligonucleotiden überprüft.

2.2.4 Herstellung transgener Fliegen

Die Herstellung transgener Fliegen erfolgte über P-Element-vermittelte Transformation von *Drosophila*-Embryonen (Rubin *et al.*, 1982). Diese Methode erlaubte die stabile Integration von DNA in das Genom der Fliege. Es wurden die Transformationsvektoren pUASP2, pUASP2-HA und tubGFP und zusätzlich ein Helferplasmid mit $\Delta 2-3$ Transposase (pUChstT $\Delta 2-3$) verwendet.

Mit Chlorix wurden 1/2 h alte *w*-Embryonen 1-2 min dechorionisiert, mit H₂O gewaschen und auf einer Apfelsaftagarplatte aufgereiht. Dann wurden die Embryonen auf ein Deckgläschen mit Heptankleber überführt. Für etwa 10 min wurden die Embryonen in einem Exsikator getrocknet und anschließend mit 10S-Voltalef-Öl überschichtet. Mit Hilfe einer Mikroinjektionsapparatur wurden dann geringe Mengen an DNA injiziert. Der Injektionsmix bestand aus 2 μ l Transformationsvektor (1 μ g/ μ l), 0,75 μ l Helferplasmid (1 μ g/ μ l) und 2,25 μ l H₂O. Anschließend wurde das Deckgläschen mit den Embryonen in eine Petrischale überführt und mit 3S-Voltalef-Öl überschichtet. Die geschlüpften Larven wurden nach 24 h abgesammelt und in ein Futterröhrchen überführt. Die geschlüpften Fliegen wurden mit *w*-Fliegen gekreuzt. In der nächsten Generation konnte nun anhand der roten Augenfarbe nach transgenen Fliegen gesucht werden. Der Integrationsort des Transgens wurde mit Hilfe eines Doppel-Balancerstamms für das zweite und dritte Chromosom lokalisiert.

2.2.5 Ei-Präparation

Um die Morphologie der Eier zu bestimmen, wurden Fliegen des entsprechenden Genotyps in Legekäfige überführt. Diese wurden mit einer Apfelsaftagarplatte mit zentralem Hefeklecks verschlossen. Die Eier wurden zum Altern 24 h bei 25°C aufbewahrt, anschließend mit H₂O gewaschen, dann in Hoyers-Medium/Milchsäure (1:1) eingebettet, mit einem Deckglas abgedeckt und zur Klärung über Nacht bei 60°C inkubiert.

2.2.6 Präparation genomischer DNA

Adulte Fliegen wurden in einem Eppendorfgesäß gesammelt und für 5 min auf Eis gestellt. Nach der Zugabe von 50 μ l SquiB-Puffer/Fliege wurden die Fliegen mit einer möglichst großen Pipettenspitze zerquetscht und mit 2 μ l Proteinase-K (5 mg/ml)/ Fliege 30 min bei 37°C inkubiert. Die Inaktivierung der Proteinase-K erfolgte durch 3 min Inkubation bei 95°C,

bevor 1 Vol. Phenol/Chloroform (1:1) dazugegeben wurde. Nach kurzem Schütteln und 10 min Zentrifugation bei 9600 rpm (5417R, Eppendorf, Hamburg) wurde die DNA aus der oberen wässrigen Phase in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Diese beiden Schritte wurden jeweils 1x wiederholt. Danach wurde die Lösung noch 2x mit Chloroform ausgeschüttelt, jeweils 4 min bei 9600 rpm zentrifugiert und die genomische DNA aus der wässrigen Phase mit dem 2,5-fachen Vol. 100% Ethanol und 1/10 Vol. 3 M Natriumacetat präzipitiert. Um bei geringer DNA Konzentration die Ausbeute der Fällung zu erhöhen, wurde das DNA-Salz-Alkohol-Gemisch 1-2 h auf -20°C gestellt. Nach 30 min Zentrifugation bei 13000 rpm wurde der Überstand verworfen, das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen und 10 min lang bei 13000 rpm zentrifugiert. Nach Dekantieren des Überstands wurde das Pellet an der Luft getrocknet und schließlich in einer geeigneten Menge H_2O oder TE-Puffer aufgenommen und die DNA bei -20°C gelagert.

In der späteren Phase der Arbeit wurde die DNA von rekombinanten Fliegen vereinfacht präpariert. Nach Proteinase-K Inaktivierung wurden die Zelltrümmer bei 9600 rpm abzentrifugiert, der Überstand mit der genomischen DNA in ein neues Eppendorfgefäß überführt und bei -20°C gelagert. Für eine PCR-Reaktion wurden 2 μl benutzt.

2.2.7 Präparation von RNA

Ca. 100 μl Ovarien von *w*-Fliegen wurden in DEPC-behandeltem PBST präpariert und in 750 μl Trizol homogenisiert. Die homogenisierten Ovarien wurden dann 10 min bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, bevor 200 μl Chloroform dazugegeben und mit der Hand geschüttelt wurde. Nach 12 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde erneut 15 min bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert. Die obere Phase wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt, mit 500 μl Isopropanol versetzt und 10 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach 10 min Zentrifugation bei 13000 rpm und 4°C wurde das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen, an der Luft getrocknet und das Pellet in 100 μl DEPC-behandeltem H_2O aufgenommen.

Alternativ wurde die RNA mit dem μMACS mRNA Isolation Kit (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) isoliert. Dazu wurden Ovarien in Grace's Insect Medium (Sigma) präpariert, das Medium vollständig abgenommen und die Ovarien in flüssigem Stickstoff gehalten. Pro Ansatz wird 1 ml Lysis/Binding Puffer mit 0,7 μl Mercapthoethanol versetzt. Mit 100 μl des Puffers wurden die gefrorenen Ovarien mit einer Pistille homogenisiert und dann die restliche 900 μl Puffer dazugegeben. Anschließend wurde das Lysat auf ein LysateClear-Column

gegeben und von da ab nach dem Protokoll des μ MACS mRNA Isolation Kit weiterverarbeitet.

2.2.8 Quantifizierung von DNA und RNA

Die DNA- und RNA-Konzentration wurden spektralphotometrisch gemessen. Für die spektrometrische Bestimmung wurden die DNA- und RNA-Lösungen verdünnt und in einer 1 cm Küvette (UVette 220-1600 nm, Eppendorf) in einem Photometer (BioPhotometer, Eppendorf) bei 260 nm und 280 nm gemessen. Eine OD_{260} von 1 entspricht einer DNA-Konzentration von 50 μ g/ml bzw. einer RNA-Konzentration von 40 μ g/ml. Die Reinheit der DNA und RNA wurden durch die Messung des Quotienten OD_{260}/OD_{280} bestimmt.

2.2.9 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktionen (Mullis and Faloona, 1987; Saiki *et al.*, 1988) wurden im Mastercycler Gradient (Eppendorf) durchgeführt.

Standard-PCR

Für eine Standard-PCR an genomischer DNA, cDNA oder Plasmid-DNA wird das Expand High Fidelity PCR System (Roche) verwendet.

Die Amplifikation erfolgte nach folgendem Grundschemata:

500 ng DNA
 0,2 mM dNTP (10 mM)
 1x Puffer mit $MgCl_2$
 1,75 U Polymerase
 je 15 pmol Oligonucleotid

Standard-PCR-Konditionen:

Initiale Denaturierung:	94°C für 2 min
Zyklus (35x):	
Denaturierung der DNA:	94°C für 15 sec
Hybridisierung der Oligonucleotide:	55°C für 30 sec (je nach Oligonucleotid)
Extension:	68°C für 3 min (je nach Produktlänge)
Finaler Verlängerungsschritt der Polymerase :	68°C für 8 min

Standard-PCR von genomischer DNA für PLP, RFLP und SNPProbenansatz:

- 2 µl genomische DNA oder 100 ng genomische DNA
- 2 µl eines jeden Oligonucleotids (5 pmol/µl)
- 12 µl Ready-Mix (REDTAQ PCR Reactionmix with MgCl₂, Sigma)
- 9 µl H₂O

PCR-Konditionen:

Initiale Denaturierung:	94°C für 5 min
Zyklus (35x):	
Denaturierung der DNA:	94°C für 30 sec
Hybridisierung der Oligonucleotide:	62°C für 30 sec
Extension:	72°C für 1 min
Finaler Verlängerungsschritt der Polymerase:	72°C für 8 min für RFLP und SNP 72°C für 7 min für PLP

2.2.10 Gel-Elektrophorese

DNA-Fragmente wurden mittels Gel-Elektrophorese entsprechend ihrer Größe aufgetrennt. Die Gele setzten sich zusammen aus 1% bzw. 2,5% Agarose in 1X TAE. Nach Aufkochen in der Mikrowelle und anschließendem Abkühlen auf ca. 60°C wurde Ethidiumbromid (Fluka, Steinheim) zu einer Endkonzentration von 0,5 µg/ml dazugegeben. Die Lösung wurde dann in eine Gelkammer (Mupid-21, Eurogentec, Köln) mit entsprechend großem Kamm gegossen. Nach Polymerisation der Agarose wurde der Kamm entfernt, das Gel in die Gelkammer überführt und mit 1X TAE überschichtet. Die aufzutragenden Proben wurden mit 1/10 Ladepuffer in die Geltaschen pipettiert. Zusätzlich wurde 5 µl eines Größenmarkers (SmartLadder, Eurogentec) aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 50-100 V. Die DNA wurde auf einem Transilluminator bei 366 nm Anregung sichtbar gemacht und photographiert.

2.2.11 DNA Sequenzierung

Die DNA wurde mittels des Big Dye termination Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Darmstadt) sequenziert, einer auf PCR basierenden Modifikation des originalen Sanger Protokolls (Sanger *et al.*, 1977).

10 µl Reaktionsgemisch:

1,5 µl Big Dye Puffer

0,5 µl Big Dye v.3.1

1,5 µl Oligonucleotid (10 mM)

DNA (~250 ng Plasmid-DNA, ~10 ng PCR-Produkt [<1000 bp],

~40 ng PCR-Produkt [>1000 ng])

und mit H₂O aufgefüllt.

Programm:

Initiale Denaturierung: 96°C für 1 min

Zyklus (90x):

Denaturierung der DNA: 94°C für 30 sec

Hybridisierung des Oligonucleotides: 50°C für 15 sec

Extension: 60°C für 4 min

Die fluoreszent-markierten DNA-Fragmente wurden dann mit 10 µl H₂O verdünnt und mit dem ABI Prism 377 DNA Sequencer (Applied Biosystems) separiert und analysiert.

2.2.12 RT-PCR Analyse von *osk* und *grk* mRNA

RNA von FRT42B/CyO, 32.17 und 11.229 Fliegen wurde - wie unter 2.2.7 - mit dem µMACS mRNA Isolation Kit isoliert und cDNA von *osk* bzw. *grk* mit dem SuperScript III Reverse Transkriptase Kit (Invitrogen) hergestellt. An 1 µl cDNA wurde dann eine Standard-PCR (s. 2.2.9) mit den jeweiligen Oligonucleotiden durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden, wie zuvor unter 2.2.10 beschrieben, auf einem 1% Agarosegel getrennt.

2.2.13 Identifizierung von Polymorphismen

Zunächst wurden genomische DNA-Regionen von FRT42B, FRT42B/CyO, „cpxsp“, „cpxsp“/CyO bzw. rekombinanten Fliegen mittels PCR (s. 2.2.9) amplifiziert. Hierzu wurden die unter 2.1.5 aufgeführten Oligonucleotide verwendet.

PLP

Die PCR-Produkte wurden, wie zuvor unter 2.2.10 beschrieben, auf einem 2,5% Agarosegel getrennt, mittels eines Transilluminators sichtbar gemacht und photographiert.

RFLP

Zur Identifizierung von RFLP wurden die erhaltenen PCR-Produkte mit den entsprechenden Enzymen verdaut und anschließend auf einem 2,5% Agarosegel elektrophoretisch getrennt. Bei den Enzymen handelte es sich um Restriktionsendonucleasen vom Typ II (NEB; Invitrogen; Roche). Der Verdau von PCR-Fragmenten wurde nach den Angaben des Herstellers für das jeweilige Enzym durchgeführt. Standardmäßig wurde für eine 20 µl Reaktion 5-10 µl PCR-Produkt, 1/10 10X Puffer, 5-10 Units Enzym eingesetzt und die Reaktion mit der entsprechenden Menge H₂O auf 20 µl aufgefüllt. Jeweils 20 µl Restriktionsverdau der RFLP wurde gelelektrophoretisch (s. 2.2.10) getrennt.

SNP

Nach der PCR-Reaktion (s. 2.2.9) wurden die PCR-Produkte mit dem GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham) aufgereinigt und wie unter 2.2.11 sequenziert. Die Identifizierung der SNP erfolgte durch Vergleich der Sequenzen mittels SeqMan (Lasergene Package, DNA-Star).

2.2.14 Klonierung von *thoc5*

RNA von *w*-Fliegen wird mittels Trizol extrahiert (s. 2.2.7) und cDNA mit Hilfe des SuperScript III Reverse Transkriptase Kit (Invitrogen) hergestellt. Aus der cDNA wurde *thoc5* mit den Oligonucleotid-Kombinationen *thoc5L* und *thoc5R* bzw. *thoc5LBgIII* und *thoc5RSpel* durch PCR (s.2.2.9) amplifiziert, mit dem GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham) aufgereinigt, in den pCRII-TOPO Vektor kloniert und transformiert (TOPO TA

Cloning Kit, Invitrogen). Nach 1 h Inkubation der Transformation bei 37°C wurden die *Escherichia coli* Zellen auf X-Gal- und Ampicillin-haltigen LB-Agar-Platten (1:5000 X-Gal und 1:1000 Ampicillin) ausplattiert. Die Aufzucht der Transformanten erfolgte über Nacht bei 37°C.

Ferner wurden folgende *thoc5*-Konstrukte hergestellt: pUASP2::*thoc5*, pUASP2::HA-*thoc5* und tubGFP-*thoc5*. Dazu wurde *thoc5* mit BglIII und SpeI aus dem zuvor hergestellten pCRII-TOPO-BglIII-*thoc5*-SpeI geschnitten. Die Ligation von *thoc5* in die zuvor mit BamHI und XbaI geschnittenen pUASP2- und pUASP2::HA-Vektoren bzw. in den mit BglIII und SpeI geschnittenen tubGFP-Vektor erfolgte mittels T4-Ligase (Roche) über Nacht bei 16°C. Zur Transformation der Plasmide wurde je ein Aliquot (40 µl) elektrokompeter Zellen (DH5-alpha aus *E. coli*) mit 2 µl der Ligation versetzt und in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (ECU102, PeqLab, Erlangen) überführt. Die Zellen wurden in einem Elektroporator (EasyjectPrima, Equibio, Ashford, England) bei 1800 V und einer Kapazität von 25 µF mit einer Pulslänge von etwa 4 msec elektroporiert. Anschließend wurden sie in 900 µl SOC-Medium 1 h bei 37°C inkubiert. Danach wurden 100 µl Zellen, 1:10 und 1:100 in SOC-Medium verdünnt und auf Ampicillin-haltigen LB-Agar-Platten (100 µl Ampicillin [50 mg/ml] / 1 l LB-Agar) ausplattiert. Die Aufzucht der Bakterien erfolgte über Nacht bei 37°C.

2.2.15 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus bakteriellen Zellen erfolgte über alkalische Lyse mit Hilfe des QIAGEN Plasmid Mini Kit (QIAGEN, Hilden) nach Hersteller-Protokoll. Zur Gewinnung größerer Mengen an Plasmid-DNA wurde das QIAGEN Plasmid Midi Kit verwendet. Nach der Isolierung und Reinigung wurde die Plasmid-DNA in 50 µl H₂O aufgenommen und die Konzentration mittels Spektralphotometrie bestimmt (s. 2.2.8)

2.2.16 Herstellung von RNA-Sonden

Es wurden RNA-Sonden von *bcd*, *grk*, *osk* und *thoc5* hergestellt. Zunächst wurden die jeweiligen Plasmide (s. 2.1.6) in einem 20 µl Restriktionsverdau (10 mg Plasmid, 1/10 10X Puffer, 10 Units Enzym [*bcd*=EcoRI; *grk*=SalI; *osk*=HindIII, *thoc5*=HindIII]) 1 h bei 37°C geschnitten. Mittels dieser linearisierten Plasmiden wurden RNA-Sonden wie folgt präpariert.

Reaktionsgemisch für Digoxigenin-Sonden:

1/5 5X RNA-Polymerase-Puffer (Roche)

Digoxigenin NTP Mix (Roche)

40 Units RNase Inhibitor (Roche)

1 µg linearisiertes Plasmid

80 Units Polymerase (*bcd*=T3; *grk*=T7; *osk*=T7; *thoc5*=T7) (Roche)

Das Reaktionsgemisch wurde mit DEPC-behandeltem H₂O auf 20 µl aufgefüllt und 2 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Lösung 10 min mit RNase-freier DNase I (Roche) behandelt. Die Hälfte der RNA wurde mit 190 µl H₂O (DEPC), 5 µl tRNA (20 µg/ml) und 45 µl LiCl vermischt und bei -20°C gelagert. Die restlichen 10 µl der RNA wurden hydrolysiert mit 40 µl H₂O und 50 µl 2X Carbonat-Puffer und 40 min bei -70°C inkubiert. Danach wurde die Hydrolysierung mit 100 µl Stopplösung, 5 µl tRNA (20 µg/ml) und 45 µl LiCl beendet. Die beiden RNA-Sonden wurden dann mit 500 µl 100% Ethanol 10 min bei -20°C präzipitiert und anschließend 10 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde 2x mit 500 µl 70% Ethanol gewaschen und 10 min bei 14000 rpm zentrifugiert und die RNA-Sonde in 50 µl Hybridisierungslösung aufgenommen.

2.2.17 Fixierung von Ovarien

Ovarien wurden in PBST präpariert und für die *in situ* Hybridisierung 25 min und für die Antikörperfärbung 10 min auf dem Schüttler in 4% Formaldehyd in PBST fixiert. Bei der Fixierung von Mikrotubuli wurde 10% Formaldehyd in PBST verwendet. Die Ovarien wurden direkt weiter verwendet oder in Methanol bei -20°C gelagert.

2.2.18 *In situ* Hybridisierung von Ovarien

Durch *in situ* Hybridisierung (Tautz und Pfeifle, 1989) konnte spezifische mRNA vor Ort (*in situ*) in der Zelle nachgewiesen werden. Nach Hybridisierung der mRNA mit einer ihr komplementären, Digoxigenin-markierten RNA-Sonde konnte diese RNA nachgewiesen werden und so deren gewebs- oder zelltypspezifische Expression sowie deren zeitlicher Verlauf verfolgt werden.

In Methanol gelagerte Ovarien wurden in Methanol/PBST (1:1) rehydriert und mit PBST gewaschen. Darauf folgte eine 20 min Fixierung mit 4% Formaldehyd, bevor 3x mit PBST

gespült und 2x jeweils 5 min mit PBST auf dem Rad gewaschen wurde. Die Behandlung mit Proteinase-K (50 µg/ml Proteinase-K in PBST) erfolgte für exakt 5 min. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Glycin (2 mg/ml Glycin in PBST) 2 min lang neutralisiert. Nach 4x Waschen mit PBST wurden die Ovarien erneut mit 4% Formaldehyd 20 min auf dem Rad fixiert. Das Formaldehyd wurde 3x ausgespült und die Ovarien noch 3x jeweils 5 min in PBST auf dem Rad gewaschen. Dann wurden die Ovarien in die Hybridisierungslösung überführt. Dies erfolgte durch 10 min Inkubation in 50%-iger Hybridisierungslösung (Hybridisierungslösung/PBST; 1:1) und anschließend in 100%-iger Hybridisierungslösung für 10 min. Dann wurden die Ovarien in 100%-iger Hybridisierungslösung/DNA 1 h bei 55°C prähybridisiert. Nach Abnahme des Überstandes wurde 1 µl RNA-Sonde in 50 µl Hybridisierungslösung/DNA pro Ansatz zugegeben und über Nacht bei 55°C inkubiert.

Am nächsten Tag wurde der Sondenmix abgenommen und 3x gespült und 4x jeweils 30 min mit 55°C vorgewärmter Hybridisierungslösung gewaschen. Die Rehydratisierung erfolgte durch jeweils 10 min Waschen mit 4:1 Hybridisierungslösung/PBST, mit 3:2 Hybridisierungslösung/PBST, mit 2:3 Hybridisierungslösung/PBST bei 55°C und mit 1:4 Hybridisierungslösung/PBST bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die unspezifischen Antikörperbindestellen bei Raumtemperatur 2x jeweils 20 min mit 1%-iger BSA-Lösung in PBST auf dem Rad abgesättigt.

Nach 1x Waschen der Ovarien mit PBST wurde der polyklonale Antikörper - anti-Digoxigenin gekoppelt an alkalischer Phosphatase (Dianova) - in einer Verdünnung von 1:5000 dazugegeben. Es wurden 500 µl anti-Digoxigenin pro Ansatz über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde 3x mit PBST gespült, dann 3x jeweils 15 min mit PBST auf dem Rad gewaschen. Anschließend wurden die Ovarien 3x jeweils 5 min mit RNA-AP Puffer inkubiert. Während des letzten Inkubationsschrittes wurde die Färbelösung vorbereitet, die pro Ansatz aus 500 µl RNA-AP Puffer, 2,2 µl NBT und 1,7 µl X-Phosphat besteht. Die Ovarien wurden in der Färbelösung in Glasschälchen überführt. Da die Färbelösungen lichtempfindlich sind, wurde die Reaktion im Dunkeln durchgeführt und in gewissen Abständen unter dem Binokular kontrolliert. Die Reaktion wurde durch 4x Verdünnen mit PBST beendet, wobei die Ovarien in Eppendorfgefäße zurück überführt wurden. Nach der Färbung wurden die Ovarien für die Einbettung vorbereitet. Die Ovarien wurden durch jeweils 5 min Waschen mit 50%, 70% und 100% Ethanol in PBST schrittweise dehydriert. Die Ovarien konnten zu diesem Zeitpunkt über einen längeren Zeitraum bei -20°C gelagert werden. Anschließend wurden sie 2x jeweils 5 min in 100% trockenem Ethanol und 1x jeweils 5 min in 100% trockenem Aceton gewaschen. Die Ovarien wurden dann in einem 1:1 Gemisch aus 100% trockenem Aceton und Araldit in ein Glasschälchen überführt. Unterm

Abzug wurde das Aceton 2 h lang abgedampft und dann die Ovarien in einen frischen Tropfen Araldit auf einen Objektträger übertragen. Die einzelnen Eikammern wurden mit dünnen Nadeln separiert und mit einem Deckglas abgedeckt. Zur Herstellung von Dauerpräparaten wurden die Objektträger über Nacht bei 60°C gelagert.

2.2.19 Fluoreszente *in situ* Hybridisierung von Ovarien

Alternativ zur *in situ* Hybridisierung in 2.2.18 wurde die *in situ* Hybridisierung wie folgt durchgeführt. Nach der Fixierung (s. 2.2.17) wurden die Ovarien 3x jeweils 10 min mit PBST auf dem Schüttler gewaschen und dann in Hybridisierungslösung überführt. Dies erfolgte durch 5 min Inkubation in 50%-iger Hybridisierungslösung (Hybridisierungslösung/PBST; 1:1) und anschließend 5 min in 100%-iger Hybridisierungslösung auf dem Schüttler. Dann wurden die Ovarien in 100%-iger Hybridisierungslösung/DNA 1 h bei 55°C prähybridisiert. Nach Abnahme des Überstandes wurde 1:50 in Hybridisierungslösung verdünnte RNA-Sonde (50 µl pro Ansatz) zugegeben und über Nacht bei 55°C inkubiert. Nach Abnahme des Sondenmix am nächsten Tag wurde 20 min mit 55°C vorgewärmter Hybridisierungslösung gewaschen. Die Rehydratisierung erfolgte durch 1x Waschen mit 50%-iger Hybridisierungslösung bei 55°C, bevor 5x jeweils 20 min Waschen bei 55°C mit PBST folgte. Anschließend wurde der Antikörper anti-Dig-HRP in einer Verdünnung von 1:50 dazugegeben. Es wurden 250 µl Antikörperlösung pro Ansatz 1 h bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurden die Ovarien 3x jeweils 10 min mit PBST auf dem Schüttler gewaschen. Während der letzten Waschung wurde die Färbelösung vorbereitet, die pro Ansatz aus 200 µl Amplifikationspuffer und 4 µl Cy3-Färbelösung (TSA Cy3 Kit, PerkinElmer, Überlingen) bestand. Die Färbung fand 30 min im Dunkeln auf dem Schüttler statt. Anschließend wurde 2x mit PBST gewaschen, das gesamte PBST abgenommen und zwei Tropfen Einbettungsmedium (Vectashield Mounting Medium, Vector Laboratories, Burlingame, USA) je nach Bedarf mit oder ohne DAPI (4, 6-Diamino-2-phenylindol Dihydrochlorid) dazugegeben. Nach mindestens 2 h Inkubation bei 4°C wurden die Ovarien im Einbettungsmedium auf einen Objektträger überführt, die einzelnen Eikammern mit dünnen Nadeln separiert und mit einem Deckglas abgedeckt. Aufbewahrung der Präparate erfolgte bei 4°C im Dunkeln.

2.2.20 Antikörperfärbung von Ovarien

Nach dem Fixieren (s. 2.2.17) wurden die Ovarien 4x in PBST gewaschen und 1 h in BBT1 inkubiert. Alle Inkubationen erfolgten auf dem Schüttler. Anschließend wurden die Ovarien

über Nacht bei Raumtemperatur in BBT2 verdünntem primären Antikörper (s. 2.1.3) inkubiert. Am nächsten Tag wurde 4x mit PBST gewaschen und dann die unspezifischen Antikörperbindestellen 1 h in 10% Ziegenserum, verdünnt in PBST, abgesättigt, bevor eine 3 h Inkubation mit dem sekundären Antikörper (s. 2.1.3) erfolgte. Nach 2x Spülen wurden die Ovarien - wie unter 2.2.18 beschrieben - eingebettet und gelagert.

2.2.21 Western Blot Analyse

Für den Proteinextrakt wurden Ovarien von 10-15 Fliegen in PBST präpariert. Nach Abnahme des Überstands wurden die Ovarien kurz in flüssigem Stickstoff gefroren und dann 15 µl 1X SDS-Probe-Puffer (95°C) pro Ovarienpaar dazugegeben. Die Ovarien wurden 3 min sonifiziert, gevortext, 3 min bei 95°C inkubiert und erneut gevortext. Nach 1x Wiederholung wurde der Extrakt bei 13000 rpm 1 min zentrifugiert, der Überstand aliquotiert und entweder direkt verwendet oder bei -20°C gelagert. Die Proteine des Ovarienextrakts wurden dann zusammen mit einem Größenmarker (SeeBluePlus2 Pre-Stained Standard, Invitrogen) auf einem 15% Anderson-Gel elektrophoretisch getrennt. Anschließend wurde das Trenngel entfernt und ein Stück Immobilon-P Membran (Millipore) passend zum Gel zurechtgeschnitten. Die Membran wurde 5 sec in Methanol geschwenkt. Gel und Membran wurden kurz in H₂O gewaschen und dann 10 min im Transfer-Puffer inkubiert. Die Proteine wurden über Nacht im Kühlraum bei 4°C bei ca. 7 V/cm auf die Membran transferiert. Dazu wurde der Western Blot in einer mit Transfer-Puffer gefüllten Schale in der folgenden Reihenfolge von unten nach oben aufgebaut: Gitter, nasses Tuch, 2x nasses Whatman-Papier, Gel, Membran, 2x nasses Whatman-Papier, nasses Tuch, Gitter. Am nächsten Tag wurde die Membran kurz in H₂O gewaschen und die Proteine 10 min in Ponceau S Lösung (Sigma) angefärbt. Die Membran wurde durch mehrmaliges Waschen mit H₂O entfärbt, der Größenmarker mit Kuli markiert und die Membran - nass in Saran gewickelt - photokopiert. Dann wurde die Membran für 1,5 h in 5% PBS-gepuffertem Milchpulver (Bio-Magermilchpulver, Heirler, Radolfzell) abgesättigt. Nach 5x Waschen der Membran mit PBST wurde der primäre Antikörper in PBST verdünntem 5% Milchpulver dazugegeben und entweder 2 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach 3x kurzem Waschen mit PBST wurde 1x 15 min und 2x jeweils 5 min mit PBST gewaschen. Die 1 h Inkubation mit dem sekundären Antikörper erfolgte in 5% PBST-gepuffertem Milchpulver. Danach wurde erneut 3x kurz, 1x 10 min und 2x jeweils 5 min mit PBST gewaschen. Die Membran wurde zwischen Whatman-Papier getrocknet und 1 min mit dem ECL Kit (Pierce, Bonn) behandelt. Nach erneutem Trocknen wird die Membran in Saran gewickelt und in einer Kladde auf Kodak X-Omat AR Film 15 sec bis 5 min exponiert. Anschließend wurden die Filme im AGFA Curix60 entwickelt.

Um die Membran erneut zu verwenden, wurde diese 30 min bei 50°C mit Strip-Lösung behandelt. Nach intensivem Waschen wurde die Membran in 5% PBST-gepuffertem Milchpulver abgesättigt. Die weitere Behandlung erfolgte, wie zuvor beschrieben, wobei die Inkubationszeiten des primären und sekundären Antikörpers auf 45 min bzw. 30 min verkürzt wurde.

Bei einer Western Blot Analyse gegen Osk Protein wurde anstelle von PBS und PBST, TBS und TTBS verwendet.

2.2.22 Co-Immunopräzipitation

Für die Immunopräzipitation wurden Ovarien von 10 Weibchen in Graces Insect Medium präpariert. Alle folgenden Schritte wurden auf Eis oder im Kühlaum bei 4°C ausgeführt. Die Puffer wurden frisch hergestellt. Die Ovarien wurden 2x jeweils in 1:1 PBS/Extraktions-Puffer gewaschen. Der Überstand wurde komplett entfernt und 5 µl Extraktions-Puffer dazugegeben. Mit einer Pistille wurden die Ovarien manuell homogenisiert und 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Die Interphase wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß transferiert. Vom Input wurde 1 µl als Kontrolle entnommen. Der Rest wurde mit dem Antikörper-Mix (2 µl anti-Mago aus Kaninchen, 2 µl IP-Puffer und 2 µl PBS) 2 h auf dem Rad inkubiert. In der Zwischenzeit wurde 55 µl Protein A-Agarose (Roche) mit 1 ml Wasch-Puffer versetzt und für 5 sec bei 2500 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde erneut in 1ml Wasch-Puffer aufgenommen und 5 sec bei 2500 rpm zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurde die gewaschene Protein A-Agarose mit derselben Menge an IP-Puffer versetzt. 50 µl hiervon wurden zum Antikörper-Ovarien-Extrakt pipettiert und weitere 2 h auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde die Immunopräzipitation 5 sec bei 2500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde zur Kontrolle aufbewahrt (IP-Supernatant). Dann wurde 4x mit Wasch-Puffer gewaschen. Auch hier wurde der erste Überstand als spätere Kontrolle (1. Waschung) aufbewahrt. Zu dem Immunopräzipitat und den zuvor entnommenen Kontrollen wurde SDS-Proben-Puffer pipettiert und die Proben bei 95°C 5 min aufgekocht. Die Proben wurden dann - wie unter 2.2.21 beschrieben - auf ein Andersen Gel aufgetragen und weiterbearbeitet.

2.2.23 Herstellung eines Peptid-Antikörpers gegen Thoc5

Die Synthese der Peptide, die Immunisierung der New Zealand White Kaninchen und die Immunoaffinitäts-Aufreinigung des Antikörpers wurde bei der Firma Sigma Genosys (Suffolk,

England) in Auftrag gegeben. Aus der Aminosäuresequenz von Thoc5 wurden zwei Bereiche ausgewählt, für die jeweils ein Peptid hergestellt wurde. AKSKGQSTDEARIA aus dem N-terminalen Bereich von Thoc5, das über ein Cystein an das Carrier-Protein KHL (keyhole limpet haemocyanin) am C-Terminus konjugiert wurde. Aus dem C-terminalen Bereich von Thoc5 wurde die Sequenz AFAKRSRSPYKYI verwendet. Dieses Peptid wurde an KLH über ein Cystein N-terminal konjugiert. Beide Bereiche bilden laut Sigma Genosys β -turns. Zwei Kaninchen wurden mit beiden Peptiden immunisiert.

Immun-Protokoll:

Tag 0	Prä-Immun-Serum Kollektion Immunisierung (200 μ g)
Tag 14	Immunisierung (100 μ g)
Tag 28	Immunisierung (100 μ g)
Tag 42	Immunisierung (100 μ g)
Tag 49	1. Testblutung (5 ml)
Tag 56	Immunisierung (100 μ g)
Tag 63	2. Testblutung (5 ml)
Tag 70	Immunisierung (100 μ g)
Tag 77	3. Testblutung (5 ml)
Tag 84	Immunisierung (100 μ g)
Tag 91	4. Testblutung (5 ml) Endblutung (90 ml) Affinitätsaufreinigung

Mit dem Prä-Immun-Serum, den vier Testblutungen und der Affinitätsaufreinigung beider Kaninchen wurden die Antiseren auf ihre Spezifität gegen Thoc5 sowohl mittels Antikörperfärbungen (1:50, 1:100) an Ovarien aus w^+ -Fliegen als auch mittels Western Blots (1:250) analysiert. Die Western Blot Analyse wurde mit Ovarienextrakten von w^+ -, GFP-Thoc5- und HA-Thoc5-Fliegen durchgeführt. Sowohl für die Antikörperfärbung als auch für die Western Blot Analyse konnte keine Spezifität der Antiseren nachgewiesen werden.

3. ERGEBNISSE

In unserer Arbeitsgruppe wurde ein GFP-Stau-Screen durchgeführt, mit dem Ziel neue Gene zu identifizieren, die die Ausbildung der AP und DV Achsen in *Drosophila* kontrollieren. Hierbei wurden 65 Linien mit mutantern Phänotyp gefunden. Durch Kreuzung der mutanten Linien untereinander konnten bislang sieben letale Komplementationsgruppen identifiziert werden. Im Mittelpunkt der Arbeit steht die phänotypische und molekulare Analyse der letalen Komplementationsgruppe 32.17/11.229. Zudem wurde mit der Analyse der Komplementationsgruppe 7.460/7.134 begonnen. Als Voraussetzung für die molekularen Analysen wurde zunächst eine molekulare Kartierungskarte für Chromosom 2R generiert.

3.1 Generierung einer molekularen Kartierungskarte für Chromosom 2R

Die bei dem in der Einleitung beschriebenen GFP-Stau-Screen verwendete FLP/FRT-Technik grenzt die Mutationen auf den rechten Arm des zweiten Chromosoms (2R) ein (Januschke, 2001). Eine relativ neue Methode zur Kartierung von Mutationen bei *Drosophila* ist die Kartierung mittels molekularer Marker (Berger *et al.*, 2001; Hoskins *et al.*, 2001; Martin *et al.*, 2001). Die nahezu vollständige Sequenzierung des *Drosophila* Genoms im Jahr 2000 macht es möglich, direkt auf die molekulare Karte zurückzugreifen (Adams *et al.*, 2000; Rubin *et al.*, 2000) und molekulare Marker zu identifizieren. Um diese Technik hier anwenden zu können, wurde nach Sequenz-Polymorphismen in nicht kodierenden Bereichen zwischen dem im GFP-Stau-Screen verwendeten FRT42B Chromosom und dem zur meiotischen Kartierung genutzten Marker-Chromosom al dp^{ovi} b pr cn vg c a px bw mi sp („cpxsp“) gesucht. Polymorphismen zwischen zwei verschiedenen 2R Chromosomen, die gleichmäßig über das Chromosom 2R verteilt sind, wurden bereits von Berger *et al.* (2001) beschrieben.

Um diese Polymorphismen in der vorliegenden Arbeit verwenden zu können, wurde zunächst untersucht, ob die dort gefundenen PLP und RFLP auch zwischen den hier verwendeten Chromosomen FRT42B und „cpxsp“ auftreten. Dazu wurden PCR-Produkte von homozygoter genomischer DNA der beiden Stämme mit den entsprechenden Oligonucleotiden amplifiziert. Die PCR-Produkte zur Detektierung von RFLP wurden zuvor mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut. Zusätzlich wurde untersucht, wie sich die Polymorphismen auf dem Balancer-Chromosom CyO zu den beiden Chromosomen verhalten. Die zu identifizierenden Mutanten sind homozygot letal und müssen daher als Stamm balanciert über CyO gehalten werden. Auch die zur späteren Kartierung erzeugten

rekombinanten Chromosomen werden durch CyO balanciert. Um sicherzustellen, dass die Anwesenheit des CyO-Balancers die Detektion der Polymorphismen nicht verhindert, wurden alle gefundenen PLP und RFLP auch an DNA von FRT42B/CyO und „cpxsp“/CyO Fliegen getestet. Insgesamt wurden 45 molekulare Marker getestet. Davon konnten 16 Marker, d.h. 5 PLP und 11 RFLP, nicht verwendet werden, da sich keine PCR-Produkte amplifizieren ließen bzw. diese mehr als ein PCR-Produkt aufwies. Von den 14 getesteten PLP sind 7 positiv und von den 25 getesteten RFLP 9 positiv. Die verwendbaren PLP und RFLP und deren Sequenzen sind in Tab. 1 aufgeführt. Demnach sind nur ca. 40% der von Berger *et al.* (2001) für Chromosom 2R beschriebenen PLP und RFLP auch polymorph für das FRT42B Chromosom und das „cpxsp“ Chromosom.

Für die Identifizierung weiterer Polymorphismen wurden PCR-Produkte der negativen RFLP und weitere amplifizierte Gen-Loci sequenziert und deren Sequenzen verglichen. In 29 von 37 sequenzierten PCR-Produkten konnte mindestens jeweils ein Polymorphismus zwischen den beiden Chromosomen festgestellt werden (Tab. 1). Bei 82% dieser Sequenz-Polymorphismen handelt es sich um SNP. Bei den verbleibenden 18% besteht der Sequenz-Unterschied hingegen aus Deletionen bzw. Insertionen (putativen PLP) oder es wurden mehrere Basenpaare ausgetauscht. In 69% der Fälle führt der Polymorphismus zur Entstehung oder zum Wegfall einer Restriktionsschnittstelle, also einem putativen RFLP (s. Tab. 1: Spalte 6).

Ausgehend von den 37 sequenzierten PCR-Produkten von insgesamt ca. 29 kb liegt die durchschnittliche Anzahl der Polymorphismen zwischen den beiden Chromosomen FRT42B und „cpxsp“ bei ca. 6 Polymorphismen pro 1 kb. Die hier identifizierte Frequenz von Polymorphismen zwischen zwei unterschiedlichen Chromosomen deckt sich mit den Ergebnissen von anderen Arbeitsgruppen (Berger *et al.*, 2001; Hoskins *et al.*, 2001; Martin *et al.*, 2001).

Insgesamt wurden 43 verwendbare molekulare Marker mit Polymorphismen zwischen den Chromosomen FRT42B und „cpxsp“ zur Kartierung von Mutationen auf dem Chromosom 2R identifiziert (Tab. 1). Die Lokalisation der molekularen Marker auf dem Chromosom 2R ist in Abb. 5 nochmals illustriert.

Tab. 1. : Kartierungs-Marker für Chromosom 2R und deren Sequenz-Polymorphismen.

Alle identifizierten Polymorphismen zwischen dem FRT42B und dem „cpxsp“ Chromosom sind in der Tabelle aufgeführt. Die Tabelle zeigt den Namen des Markers (1. Spalte), die Anzahl der Polymorphismen pro Marker (2. Spalte) und die Lage des Markers auf der cytologischen Karte nach flybase R5.4 (3. Spalte). In Spalte 4 sind die bp Positionen der Polymorphismen auf Chromosom 2R (flybase R5.4) angegeben. In Spalte 5 ist die Sequenz um den Polymorphismus aufgeführt. In der Klammer steht die Sequenz des FRT42B Chromosoms links vom Schrägstrich und die Sequenz des „cpxsp“ Chromosoms rechts vom Schrägstrich. Die blau unterlegten Sequenzen sind getestete PLPs. Wenn der Polymorphismus eine Restriktionsschnittstelle verursacht (detektiert mittels NEBcutter V2.0), sind die putativ schneidenden Enzyme in Spalte 6 aufgeführt. Die rot unterlegten Enzyme wurden bzgl. Verwendbarkeit getestet. Die in Spalte 5 rot markierten Basen zeigen, welches der beiden Chromosomen von dem Enzym geschnitten wird. Spalte 7 beschreibt die Sequenz des Balancer-Chromosoms CyO. n.d. bedeutet keine Daten.

Marker	Nummer	Cytologische Region	bp Position auf 2R	Polymorphismus Sequenz (FRT42B / "cpxsp")	Putative Restriktions-schnittstellen	CyO Muster
2R008	1	44C4	4220513-4220514	GGGTGACGA(AAGGGGGGAAAAG/.....)GGGAAGGGG	-	FRT42B
2R012	1	44E4	4662127-4662128	TTACCAGGGGG(C/T/T)GJGGGGGGTG	CviKI-1,BstXI, BseY5	"cpxsp"
	2	44E4	4662139	GGGGGGTG(C/A)TCATGGAGGTG	Sau3AI,BclI,HphI, BsiHKA1,Bsp1286I	"cpxsp"
2R016	1	45D1	5253499	AAGCGCATTGC(TC/CT)TAACGCTGCTGAA	-	"cpxsp"
2R019	1	46B3	5682538	AAAAGCTAAACGCTT(C/G)GAGACCTTTCCC	TaqI,Hpy188III	FRT42B
	2	46B3	5682587	CTGCGGCTTGGCA(G/T)CCAAATTGCCAAC	Btscl,SfaNI, ApeKI,Fnu4HI	FRT42B
2R020	1	46C6	5824495	CTACAACAAC(A/G)ATTTTCCACATTC	Tsp509I	"cpxsp"
	2	46C6	5824540	TTTTCCAAAAAAG(A/G)CGCCGCCCAAAA	HaeII,HhaI,SfoI, NlaIV,HinP1I,NarI BanI,KasI	"cpxsp"
	3	46C6	5824552	CGCCGCCAAAAC(C/G)AAATCCACAGACA	-	"cpxsp"
	4	46C6	5824709	CTCACAAATCCG(C/T)ATAAACATGGAAAC	Acil,FatI	"cpxsp"
2R023	1	47A2	6229379	CCATCGTTGGCAG(C/T)TGGCCATAAGTTTTGGCCAA	PvuII	"cpxsp"
2R033	1	47F15	7368817	AAACACTTT(G/A)AGAAAAGCTCT	MseI	n.d.
	2	47F15	7368874	TAAACGAG(C/T)GCACCTTAAAG	ApaLI,HhaI,Hpy8I, HpyCH4V,BmeI1580I, Bsp1286I,BsiHKA1	n.d.
	3	47F15	7368970-7368980	CCT{.....}TGAAGAGAACT)AAAGT	MboII	n.d.
	4	47F15	7369001-7369002	AAAGGATAGG(AT/T)CAGCTCA	Sau3AI,AIwI, Sau96I,Avall RsaI,BfaI,SetI, BccI,MslI,BstXI, BtsCI	n.d.
	5	47F15	7369046-7369056	CCATAG(ATGGTACTAGGT/.....)GGJATGGGT	-	n.d.
	6	47F15	7369068-7369078	GGTACAAG(A/G)AACAAACC	-	n.d.
	7	47F15	7369079	AACAACCCCT(T/A)TGAAATGAGTT	-	n.d.
	8	47F15	7369216	GTTTGAAGAC(T/G)CATTTTCCTGC	PleI,HinfI	n.d.

Marker	Nummer	Cytologische Region	bp Position auf 2R	Polymorphismus Sequenz (FRT42B / "cpvsp")	Putative Restriktions-schnittstellen	CyO Muster
2R036	1	48C4	7721984-	ATTAATGTTTATGGTAGGTCAC/...A..T...ATAGAGCACTC	Tsp45I	FRT42B
2R048	1	49B12	8563611	GAGGTCAT(A/G)TTTCGATAAT	NlaIII	n.d.
	2	49B12	8563731	CGCGCAG(A/T)TTTTCTGA	-	n.d.
	3	49B12	8563830	ACAAAAAC(G/T)GAACTTTA	-	n.d.
	4	49B12	8563915	GGCCGTA(T/A)GCCATTCCAC	-	n.d.
	5	49B12	8564333	GATTA AAAA(A/T)ATCCAGCAAC	SspI,Tsp509I,ApoI	n.d.
	6	49B12	8564416	TTGCACGTG(C/G)CCAAATCCC	MluNI	FRT42B
	7	49B12	8564427	AAATCCCT(G/A)TTATAAATTTGT	-	n.d.
	8	49B12	8564595	TAAGAACAAC(A/G)CCGTAAAAATAA	HpyCH4III	n.d.
2R054	1	50A9	9348978- 9348982	ATTTGAACATAA(TATTG/-)TATATACGTTTT	SspI	FRT42B
2R061	1	50E4	10110881	GAGATCCG(C/T)GGACGATCT	AcII,MspA1I,BstUI, SacII,Hpy8I	n.d.
	2	50E4	10110888	TCCACTCT(G/A)CACGACTC	HpyCH4V	n.d.
	3	50E4	10110650	CACAATTAGC(A/G)ATCTTATG	Sau3AI	n.d.
2R064	1	51B6	10511904	ATTTTATCTT(A/G)CAGGTTTATC	BfuAI,HpyCH4V	n.d.
	2	51B6	10511920-	TATCTACAA(CCAATAAC/-TGT-→)TATC	-	n.d.
	3	51B6	10511927	ATAACAAC(G/T)GAAATATA	-	n.d.
	4	51B6	10511948	AATAAATGA(C/T)ACTGAAAT	-	n.d.
	5	51B6	10511999	TGAATTCAA(G/A)ACTAAAACT	Scal,TatI	n.d.
	6	51B6	10512026	ATATTTCTA(A/T)ATGGGGTTG	-	n.d.
	7	51B6	10512048	GCATAAATGTAT(G/A)AGTAC	-	n.d.
	8	51B6	10512054	AGTAC(G/T)ATTTTAAA	Scal,TatI	n.d.
	9	51B6	10512063	AITTTAAA(T/A)AGA	-	n.d.
	10	51B6	10512163 10512164	CGACATCTG(CT/GC)GTACTAA	TatI	n.d.
	1	51B6	10512172	GTACTAA(AA/TG)CGGAAGCT	Ácil	n.d.
	2	51B6	10512173	CGGAAGCTTTA(C/G)GAA	-	n.d.
	3	51B6	10512185 10512189	GAA(A/G)TTTAGTACGAA	Tsp509I,ApoI	n.d.
	4	51B6	10512209	GTGGCAGC(G/A)CCGTTGTGCTT	HlnP1I,HaeII, HpyCH4III,MslII,AleI	n.d.
	5	51B6	1512316	ACATAAAG(A/G)AGGCATTCCAA	-	n.d.
	6	51B6	10512510	CGCCAGCCGT(A/G)TGAGCAACAA	-	n.d.

Marker	Nummer	Cytologische Region	Position auf 2R	Polymorphismus Sequenz (FRT42B / "cpxsp")	Putative Restriktions-schnittstellen	CyO Muster
2R119	1	57C1	16998316	ACGCAATCC(T/A)TGTTGAGT	NlaIII	n.d.
	2	57C1	16998369	CTGAGGGGA(T/A)GCTAAACTG	AclI,CviKI-1,SetI	n.d.
	3	57C1	16998379			
	4	57C1	16998380	ACTGTTT(G..TCA)TGCGTGTG	NlaIII,MslI	n.d.
	5	57C1	16998409	AATACTGAG(T/C)AACCCGCTCAT	MaeIII	n.d.
	6	57C1	16998489-	TGTGCC(-/G)AGTTGAGTGGCT	Bsp1286I,Brme1580I	n.d.
	7	57C1	16998490	GTGGCTGCA(A/G)CATGTCATGA	PstI,PciI,AluI	n.d.
	8	57C1	16998506	CATGTCATGA(G/A)GATAA	MnlI	n.d.
2R124	1	57C1	16998516	GATAA(C/A)CCAAGAGATATT		n.d.
	2	57C1	16998522			
	3	57C1	17684969-	GCAACACTTCGGT(-.....AGCGGG)TTATTGTTTT	FauI,NheI,BrmtI, Bfal,Cac8I,Acil	FRT42B
	4	58A1	17684970	CCTCGGAAC(T/C)CGTGTAGCT	BssSI,NlaIV	n.d.
	5	59B4	18787727	TTTTAATT(C/T)GTTCCGGATAT		n.d.
	6	59B4	18787792	TCGGAAT(T/G)TTGAGGTCT	Tsp509I,Apol	n.d.
	7	59B4	18787928	ACAGACCC(A/G)AAGTTGGTATC		n.d.
	8	59B4	18787967	TTTCATAATT(A/G)ATAGAAAAC	MseI,Asel	n.d.
2R130	1	59B4	18788015	TTTGCTTT(C/T)CTTCAGTTGCA		n.d.
	2	59B4	18788073	TTTACTGC(G/A)AACCGAAGAT	HpyCH4V	n.d.
	3	59B4	18788177	CCGCCAATG(A/G)AATTGATTAA		n.d.
	4	59B4	18788215			
	5	59B4	18788320-	AAAGCA(-....TTTAGCATTGAGCACCAC)TTTAGC	Bsp1286I,BsiHKAI	n.d.
	6	59B4	18788321			
	7	59B4	18788368-	AATGAACCA(-..ACTTGGCAC)ACATGTTT	TspDTI	n.d.
	8	59B4	18788369			
2R131	1	59B4	16563863-	TCAAACAG(-....TACAAGAAAACAG)CACTCG	RsaI,HpyCH4III	n.d.
	2	59B4	16563864			
	3	59B4	18788548	CATACAGCAGT(C/G)GCCAGATCTGAGT	HaeIII,MscI,CviKI-1, BtsI,TspRI,EaeI	n.d.
	4	59B4	18788622	ATCCACACA(T/C)TACCCATACGCCG		n.d.
	5	59B4	18788649	GGTGGGGGAT(T/C)CAAGAGATCGCA	Hpy188III	n.d.
	6	59B8	18844575	ACTTTTGGAT(T/C)TCAAAACATTTGA	Sau3AI,AluI	n.d.
	7	59B8	18844592	ATTTGACCC(T/A/T)TGCTGTAGAT		n.d.
	8	59B8	18844605			
	1	59B8	18844626	TGTAGATTA(TTTAGAGGGTATTGCGAAAGGC/-...TTTGTAAAAAC	MnlI,CviKI-1	n.d.
	2	59B8	18844646	AAACTAGTTGTT(C/A)CTTA	MaeIII	n.d.
	3	59B8	18844651			
	4	59B8	18844654	CTTA(AAGT/-)ACGAAAATATGTT	RsaI	n.d.
	5	59B8	18844698	AAATATTATT(C/A)CTTTTTAGTA		n.d.
	6	59B8	18844698			

Marker	Nummer	Cytologische Region	Position auf 2R	bp	Polymorphismus Sequenz (FRT42B / "cpxsp")	Putative Restriktions-schnittstellen	Cy0 Muster
2R132	1	59C4	18988645		TAGCTGT(G/A)TCGAAATTCAG	-	n.d.
	2	59C4	18988964		CAAGATT(C/T)CGGGCCCTTT	TfiI, HinfI, MspI, StyD4I, NciI	n.d.
	3	59C4	18988978		CCTTAG(T/C)TCTTCAGC	AluI, CviK1-1	n.d.
	4	59C4	18989356		ATGTACC(G/A)ACCAAATAA	-	n.d.
	5	59C4	18989376		CTGTTCCG(T/C)GAAGTATGGC	NruI, BstUI	n.d.
	6	59C4	18989397-		CTTGATT(CCTTC/...T-)ACAATCGA	TfiI, HinfI, HpyAV	n.d.
	7	59C4	18989400		ATGTTAC(A/C)CCCAACAAG	-	n.d.
2R133	1	59D3	19132967		CGGTTCATATTCCA(T/C)GTCA	NlaIII, HpyCH4IV, BmgBI, SetI	n.d.
	2	59D3	19132972		GTCA(C/A)AAGGGATTTCCT	-	n.d.
	3	59D3	19133011-		CTGACACAGG(L/T)GTCCAAAAT	SetI	n.d.
	4	59D3	19133012		GTTTTAATG(C/T)CAGCTCTATT	Cac8I	n.d.
	5	59D3	19133599-		TTTGGCC(...../CAGTCGAA)AAGTCGAAAAG	BsrI, CviK1-1, EaeI, Sau96I	n.d.
2R136	1	59E2	19133600		CAGCCCC(C/A)AAAAAGGA	-	n.d.
	2	59E2	19380128		AAGCACTC(G/A)AAAAGCCC	TaqI	n.d.
	3	59E2	19380635		TTTTTATT(C/T)AATTGCCC	MfeI/MseI	n.d.
	4	59E2	19380940		GCTTTAAA(C/T)TCACATTAA	Tsp509I, ApsI	n.d.
2R138	1	59E3	19434372+		AGGCAATAGCTA(A/C)C(G/A)AATTGCGAATTG	-	n.d.
2R141	1	59F4	19434374		TGCAGGCGGC(C/A)AAGCACAGTCGCG	EaeI	FRT42B
2R142	1	60A2	19713963		TCTATAGCTT(A/T)AGCTCCTGC	SmlI, AflII, MseI	"cpxsp"
2R143	1	60A12	19823033		TTACCCAATGG(T/A)TTTGGCAGTTTGGGA	-	n.d.
	2	60A12	19823165-		AGACCAAG(.../AGCTA)ACACAAAGA	AluI, CviK1-1, SetI	n.d.
	3	60A12	19823541		ACATACATACGTT(G/A)CATAT	SnaBI, RsaI	n.d.
	4	60A12	19823645- 19823650		GATGTGGTT(GTGGAT/.../GTGGATGT	BtsCI	n.d.
	5	60A12	19823843 -19823844		GGTCCCTTTGG(.../AACACTCC)TGGGGGGA	Bsll, StyD4, BsaJI, SrfI	n.d.

Marker	Nummer	Cytologische Region	Position auf 2R	Polymorphismus Sequenz (FRT42B / "cpxsp")	Putative Restriktions-schnittstellen	CyO Muster
2R143A	1	60A12	19829686	ATGGGTGAATAGGT(T/G)TGGCATGCAAA	-	n.d.
	2	60A12	19829698	TGGCATGCAAA(T/A)AGCAT	-	n.d.
	3	60A12	19829704	AGCAT(G/A)ATTACTCGTTGCA	NlaIII, Tsp509I	n.d.
	4	60A12	19829729	ATATGGATAC(G/A)AATAATAAAT	-	CyO C
	5	60A12	19829763	ACAAAATAAATA(A/T)AAATTTGCAAAAT	ApoI	FRT42B
2R143.12	6	60A12	19829833	TTCAAACATG(T/G)(T/A)TCTACACGCCCG	PciI, AflIII, NspI	FRT42B
	7	60A12	19829835	TCTATGTAAGCCCTG(T/C)AGAGACGGCTGCTTATG	Cac8I, HpyCH4V, PstI, MwoI	FRT42B
	8	60A12	19829871	GGGTGTTTCTGGA(T/A)TTCGCTATTCTAC	Tsp509I, EcoRI, ApoI	"cpxsp"
	1	60A14	19829915	TAACCTATT(G/T)GTT	-	FRT42B
	2	60A14	19845066	GTT(T/G)GAATTTAGTGTT	-	FRT42B
	3	60A14	19845070	TAGTGT(T/C/T)AAGCTTAT	MseI	FRT42B
	4	60A14	19845084	ACATGA(AATAIGTTGCTCT/.....C)TTTT	TspDI	FRT42B
2R143.13	5	60A14	19845113	TTTT(G/A)AAGTCAATAAT	MseI, DraI	FRT42B
	6	60A14	19845119	TGGAGT(G/T)CCTTATGCG	-	FRT42B
	7	60A14	19845174	AATGTTT(G/A)TACCTCAA	Ac65I, BamI, CviQI, NlaIV, RsaI, KpnI	FRT42B
	8	60A14	19845216	CATCGAATC(C/G)CACAGGAGG	BsiI	FRT42B
	9	60A14	19845263	GGCGTTTGA(C/A)GAGAAACTGT	-	FRT42B
	10	60A14	19845280	GGGGCATAACACATA(C/T)ATCTGCTGCAGGTAAA	-	FRT42B
	1	60A14	19845389	GCATATCAA(GGGTGGCAAA/.....)TTTCAGCAGTGGCAGGCT	ApoI	"cpxsp"
	2	60A14	19864484	TTTATACACTTTGATT(G/A)AGAAGATTTGTACACAT	MseI	FRT42B
	3	60A14	19854493	ACAATGATTTACCAAA(T/G)AGATCGGTGCTGGACTCGA	-	FRT42B
	4	60A14	19854734	GGAAACTAAATCCAGC(G/T)ACTTTCTGTGGCTCCTCC	CviK1-1, AluI, SseI	FRT42B
2R143.13	5	60A14	19854940	ATATCTTTTTT(-CC/TTCA)AAATCTT	-	FRT42B
	6	60A14	19855018	AAATCTT(A/T)GGATGATACCTCA	DdeI	FRT42B
	7	60A14	19855019	TCCAAAGAGTTCTTCT(-/A)CCGCG	HphI	FRT42B
	8	60A14	19855021	CCGCG(T/A)ATCAAACCATG	TfiI, HinfI	FRT42B
	6	60A14	19855029			
	7	60A14	19855066			
	8	60A14	19855071			

Marker	Nummer	Cytologische Region	Position auf 2R	Polymorphismus Sequenz (FRT42B / "cpxsp")	Putative Restriktions-schnittstellen	CyO Muster
2R143.15	1	60A16	19866402	CACACACACCAAA(C/T)ACACACACACCCACACCGG	-	FRT42B
2R143.2	1	60B2	19900915	ATCAGCTGAT(T/C)CCCCGATTGG	TfiI, HinfI, AclI, Sau3AI	FRT42B
	2	60B2	19900926	CCCCGATTG(C/T)TCCCTCGAAC	-	"cpxsp"
			19900985-			
			19900999			
	3	60B2	5	CAGTGAACCCACA(...../GTGGAACCCACA)AGAT	HpyCH4III, TspRI	FRT42B
	4	60B2	19901020	CCACTTCGGG(C/T)CAGAGGGTGGCTTT	HinP1I, HhaI, Hyp188I	FRT42B
	5	60B2	19901108	AAGTCACTAGT(A/G)TCATCATCTTGA	-	FRT42B
			19901157			
	6	60B2	19901159	ATTGCACTTTTA(T/G)T(C/T)GTCACTAGCTGGT	MaeIII	FRT42B
	7	60B2	19901174	ACTAGCTGGT(C/A)ACCAGTT	HphI, SetI, Hpy8I	"cpxsp"
	8	60B2	19901201	AGT(A/T)GGAAAAAACCATTTGAC	MseI, HpaI, HincII	"cpxsp"
	9	60B2	19901209	GGAAAAA(T/A)CCATTGACTAAGT	-	"cpxsp"
	10	60B2	19901261	AGCTTTTGCT(C/T)ACACAAATGTGT	-	FRT42B
	11	60B2	19901584	CGAAAAACTA(C/T)GAACACTAG	-	FRT42B
					Bsp1286I, Bme1580I, BstUI, AclI, Fmu4HI, TspI	
	12	60B2	19901600	TAGTCTACG(G/C)GGCACTCTCG	TspI	FRT42B
					StyD4I, Psp6I, BstNI, ScrFI, MwoI, Hyp188I	FRT42B
2R143.3	1	60B2	19901667	CCGCGGGCCAG(G/T)CCGATTCAA	Sau3AI	"cpxsp"
	2	60B6	19942254	CTCCATCCAGAAATGCC(G/A)ATCACAAA	-	"cpxsp"
	3	60B6	19942263	ATCACAAA(T/A)ATCCAAAGCAGCCTGCCAAAAGAGT	-	"cpxsp"
	4	60B6	19942328	TATCCTCGAATCGTGA(A/G)TCTTACCCTTTATTTTC	PleI, TfiI	"cpxsp"
	5	60B6	19942371	GACCTATAAATCCTCGA(C/A)AATTC	ApoI	"cpxsp"
	6	60B6	19942377	AATTC(G/A)TTACTGACTTCGCCACATTTTC	MaeIII	"cpxsp"
	7	60B6	19942450	CTAATTCGAAAATAT(T/A)TGATGTCCATCCTT	SspI	"cpxsp"
	8	60B6	19942476	TCCATCCTTTAATTAATAC(C/G)GAG	-	FRT42B
			19942480	GAG(T/G)GATGACCGCAAGTTCTGAT	BtsCI, FokI	FRT42B
	9	60B6	19942500	CAGGCAAGTTCTGAT(T/G)CAAAATCGCAG	SfaNI, TfiI, HinfI, HpyCH4V	FRT42B

Marker	Nummer	Cytologische Region	bp Position auf 2R	Polymorphismus Sequenz (FRT42B / "cpvsp")	Putative Restriktions-schnittstellen	CyO Muster
2R143.3	10	60B6	19942507	CAAATCG(CAGAA/-AGCG)GTCTGTTAGATT	TaqI	FRT42B
	11	60B6	19942510	CAAAGATCCGAG(T/G)GAATCGGTTCTGG	MnlI	"cpvsp"
	12	60B6	19942622	CCTTTGAAAGTGTAT(T/C)CAACTATATAGATGC	BciVI	FRT42B
2R144	1	60B11	20004739	CGCATTATCCT(T/G)CGAAGCCTGCAA	BstBI	"cpvsp"
2R145	1	60B13	20032984	ATTAGTCTCCA(C/T)ATCTGAGTGC	MslI	n.d.
	2	60B13	20032998	GAGTGTCCAG(C/A)GGAGATCGT	MnlI, Hpy188I, AclI, MspA11	n.d.
	3	60B13	20033009	GGAGATCGT(C/G)GTGGTCTGACC	Hpy99I	n.d.
	4	60B13	20033166	TGACAAATTGCA(-/T)TTTTGTCCGCT	-	n.d.
	5	60B13	20033361	ATTGGGAGAGCG(A/C)GCGCCAAACTAAAC	BssHII, BstUI	n.d.
	6	60B13	20033426	GCCGTCCGAC(A/G)ATTCACCCGATCCCCG	Tsp509I, TfiI,	n.d.
	7	60B13	20033683	ACAAAAACA(A/G)CGCGGGAGGA	Hpy99I, HinfI	n.d.
	8	60B13	20033751	TACGCATACGCC(G/A)GTGGGTTTAAAT	NlaIII	n.d.
2R147	1	60C7	20279721-20279722	AAATATATATATATA(ATAT/....)TTTATATAAAATATAT	SspI	FRT42B

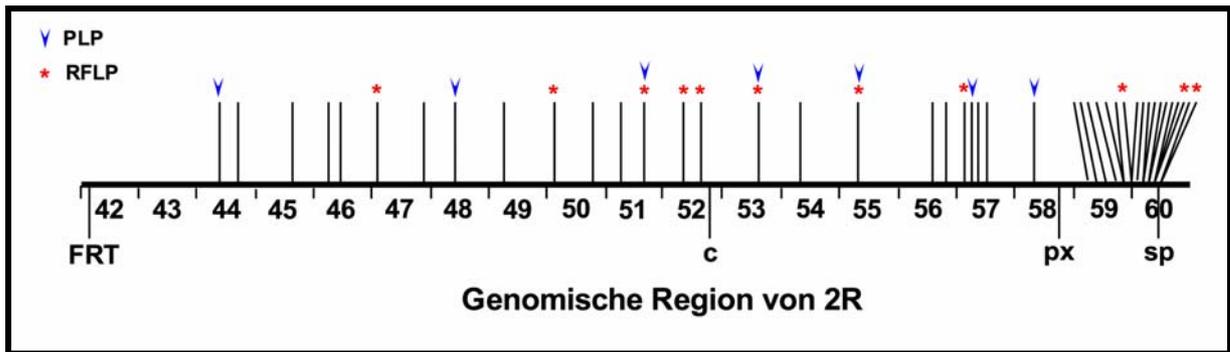


Abb. 5: Polymorphismus-Karte für Chromosom 2R.

Schematische Darstellung des rechten Arms des zweiten Chromosoms mit den sichtbaren Markern FRT, c, px und sp sowie den molekularen Markern (nach oben gerichtete Striche). * markiert die Existenz eines RFLP, V die Existenz eines PLP.

3.2 Phänotypische Analyse der letalen Komplementationsgruppe

32.17/11.229

Die letale Komplementationsgruppe 32.17/11.229 besteht aus den beiden Allelen 32.17 und 11.229, die beide homozygot und trans-heterozygot nicht lebensfähig sind. Im Folgenden wird die Rolle von 32.17/11.229 bei der Ausbildung der AP und DV Achsen speziell in der Keimbahn untersucht. Zur Generierung von homozygot mutanten Keimbahnklonen wurde das FLP/FRT/DFS-System verwendet (Chou *et al.* 1993; Xu und Rubin, 1993; Chou und Perrimon, 1996).

3.2.1 Störung der AP Oocytenpolarität

Die Etablierung der AP Achse des *Drosophila* Embryos erfolgt während der Oogenese durch die Polarisation des Cytoskeletts und der damit verbundenen spezifischen Lokalisation von *osk* und *bcd* mRNA am posterioren bzw. anterioren Pol der Oocyte (Riechmann und Ephrussi, 2001; Huynh und St Johnston, 2004).

Im GFP-Stau-Screen wurde zur Identifikation von mutanten Linien mit AP-Phänotyp die Lokalisation des GFP-Stau Transgen in der Oocyte als Marker verwendet. Hierbei handelt es sich um ein Fusionskonstrukt der beiden Proteine GFP und Stau, das speziell in der Keimbahn exprimiert wird (Schuldt *et al.*, 1998). Das voll funktionsfähige transgene GFP-Stau ist ab Stadium 2 in der Oocyte nachweisbar und co-lokalisiert mit *osk* mRNA ab Stadium 9 am posterioren Pol (Abb. 6: A, B) (Schuldt *et al.*, 1998).

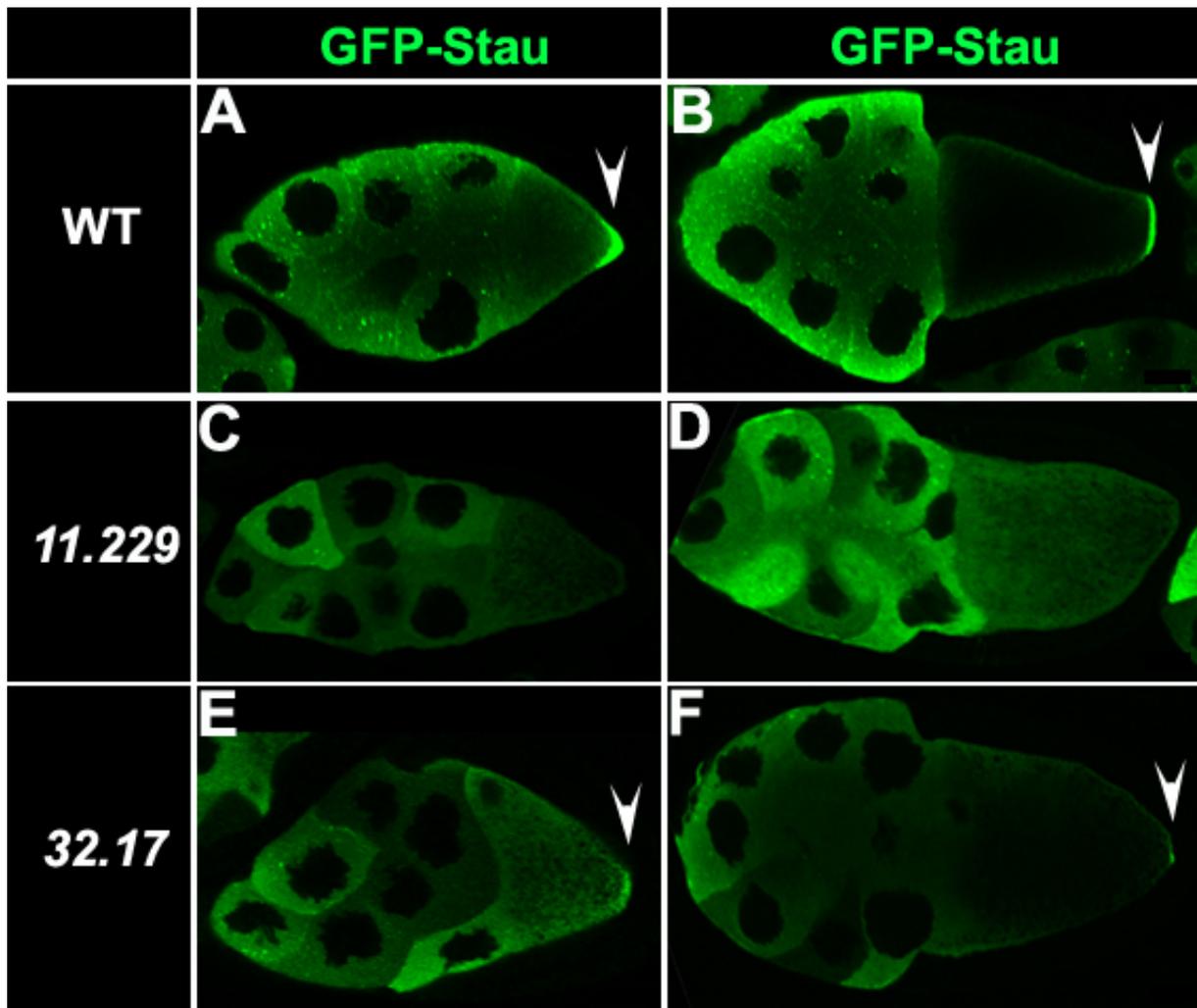


Abb. 6: Misslokalisierung von GFP-Stau in Keimbahnklonen von 11.229 und 32.17.

Konfokalmikroskopische Aufnahme von Eikammern im Stadium 9 (A, C, E) und 10 (B, D, F). In dieser und in den folgenden Abb. sind die Eikammern jeweils, sofern nicht anders angegeben, mit dem posterioren Pol nach rechts orientiert. GFP-Stau wurde mittels anti-GFP (grün) Antikörper sichtbar gemacht. (A, B) In wildtypischen Eikammern lokalisiert GFP-Stau am posterioren Pol der Oocyte (Pfeil). Im Nährzellcytoplasma bildet das GFP-Stau kleine Partikel. (C-F) In Keimbahnklonen von 11.229 und 32.17 ist GFP-Stau diffus (E, F) in der Oocyte verteilt bzw. lokalisiert nur in geringen Mengen am posterioren Pol (C, D). Die GFP-Stau Partikelbildung in den Nährzellen ist stark reduziert.

In Keimbahnklonen der Allele 32.17 und 11.229 akkumuliert GFP-Stau während den frühen Stadien der Oogenese normal in der Oocyte. Ab Stadium 9 lässt sich jedoch in 92% der 32.17 und in 100% der 11.229 Eikammern keine wildtypische posteriore GFP-Stau Lokalisation detektieren. Für beide Allele zeigt sich GFP-Stau diffus verteilt in der Oocyte von Eikammern der Stadien 9 und 10 (Abb. 6: C, D) oder lokalisiert zudem in geringen, aber nicht in wildtypischen Mengen am posterioren Pol (Abb. 6: E, F). In Tab. 2 sind die genauen prozentualen Verteilungen der Phänotypen von 32.17 und 11.229 aufgeführt.

In wildtypischen Eikammern bildet GFP-Stau im Cytoplasma der Nährzellen definierte kleine Aggregate (Abb. 6: A, B). Diese Aggregatbildung ist in Keimbahnklonen beider Allele drastisch reduziert (Abb. 6: C-F).

Tab. 2: Phänotypen der GFP-Stau Lokalisierung im WT und in Keimbahnklonen von 32.17 und 11.229.

Genotyp	Phänotyp			
	Posteriores GFP-Stau Signal wie im WT	Posteriores GFP-Stau Signal unterschiedlich zum WT	Kein posteriores GFP-Stau Signal	Anzahl der untersuchten Eikammern
WT st9	100%	0%	0%	25
WT st10	100%	0%	0%	33
32.17 st9	5%	40%	55%	42
32.17 st10	11%	56%	33%	55
11.229 st9	0%	14%	86%	29
11.229 st10	0%	30%	70%	44

Zudem konnte gezeigt werden, dass die Mutation einen Einfluss auf die Lokalisation der *osk* mRNA hat. Ab Stadium 1 akkumuliert *osk* mRNA in der Oocyte. Dagegen erfolgt die spezifische Lokalisation der *osk* mRNA am posterioren Pol im Stadium 9 (Abb. 7: A, B), wo sie während der gesamten Oogenese positioniert bleibt (Ephrussi *et al.*, 1991; Kim-Ha *et al.*, 1991). Keimbahnklone von 32.17 und 11.229 zeigen mutante *osk*-Phänotypen (Tab. 3). Zwar akkumuliert *osk* mRNA in den frühen Stadien in der Oocyte, lokalisiert aber ab Stadium 9 nicht wie im WT am posterioren Pol. So zeigt sich eine diffuse Verteilung der *osk* mRNA in der Oocyte für 32.17 in 45% und für 11.229 in 55% der Fälle (Abb. 7: C, E). In 46% bzw. 43% der Keimbahnklone von 32.17 bzw. 11.229 erreichen geringe Mengen der *osk* mRNA den posterioren Pol, während der Großteil unspezifisch in der Oocyte verteilt bleibt (Abb. 7: D, F). Auffällig ist, dass sich der Anteil der Oocyten, in denen die *osk* mRNA in geringen Mengen den posterioren Pol erreicht, für beide Allele im Stadium 10 deutlich höher ist als im Stadium 9 (Tab. 3).

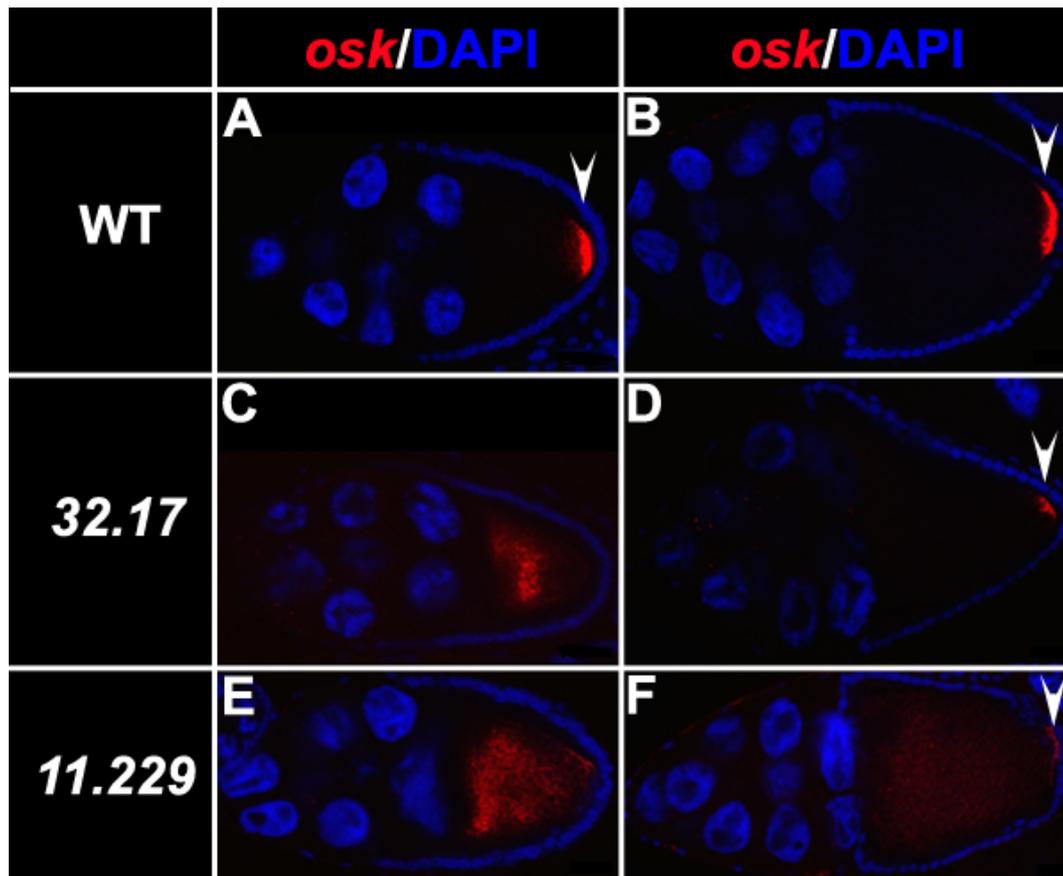


Abb. 7: Misslokalisierung der *osk* mRNA in Keimbahnklonen von 32.17 und 11.229.

Konfokalmikroskopische Aufnahmen von *osk* mRNA (rot) *in situ* Hybridisierungen von Eikammern im Stadium 9 (A, C, E) und 10 (B, D, F). Die DNA wurde mittels DAPI (blau) sichtbar gemacht. (A, B) In wildtypischen Eikammern lokalisiert *osk* mRNA im Stadium 9 und 10 spezifisch am posterioren Pol (Pfeile). (C-F) In Keimbahnklonen von 32.17 und 11.229 lokalisiert die *osk* mRNA nicht am posterioren Pol. Die *osk* RNA ist diffus in der Oocyte verteilt (C, E) und lässt sich nur in geringen Mengen zusätzlich am posterioren Pol (Pfeile) detektieren (D, F).

Tab. 3: Phänotypen der *osk* mRNA Lokalisierung im WT und in Keimbahnklonen von 32.17 und 11.229.

Genotyp	Phänotyp			Anzahl der untersuchten Eikammern
	Posteriore Lokalisation von <i>osk</i> mRNA wie im WT	Posteriore Lokalisation von <i>osk</i> mRNA unterschiedlich zum WT	Keine posteriore Lokalisation von <i>osk</i> mRNA	
WT st9+st10	100%	0%	0%	60
WT st9	100%	0%	0%	30
WT st10	100%	0%	0%	30
32.17 st9+st10	10%	45%	45%	82
32.17 st9	6%	15%	79%	34
32.17 st10	12%	67%	21%	48
11.229 st9+st10	2%	43%	55%	47
11.229 st9	0%	11%	89%	19
11.229 st10	4%	64%	32%	28

Die posteriore Lokalisation der *osk* mRNA und des GFP-Stau Proteins im Stadium 9 sind abhängig von der vorherigen Polarisierung des Mikrotubuli-Cytoskeletts im Stadium 7. Daher wurde untersucht, ob die oben beschriebenen Misslokalisationen von GFP-Stau und *osk* mRNA in 32.17 und 11.229 Keimbahnklonen durch ein defektes Mikrotubuli-Cytoskelett zustande kommen.

Mit Hilfe des anti-TyrTubulin Antikörpers wurde das Mikrotubuli-Cytoskelett sichtbar gemacht. Es waren keine offensichtlichen Defekte des Mikrotubuli-Cytoskeletts zu erkennen (Abb. 8: A-C). In Keimbahnklonen und im WT bilden die Mikrotubuli einen Gradienten von anterior nach posterior, wobei der posteriore Pol frei von Mikrotubuli erscheint.

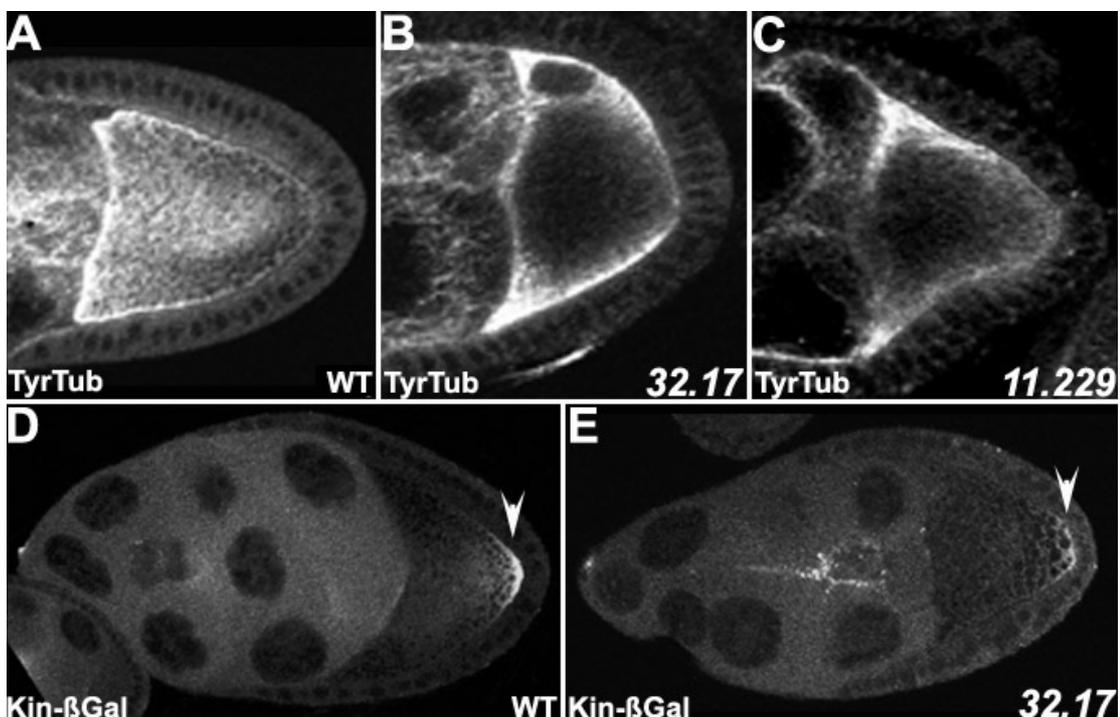


Abb. 8: Die Polarität des Mikrotubuli-Cytoskeletts in Keimbahnklonen von 32.17 und 11.229. Konfokalmikroskopische Aufnahme von Eikammern im Stadium 9. (A-C) Das Mikrotubuli-Cytoskelett wurde mittels anti-TyrTubulin (weiß) Antikörper sichtbar gemacht. Das Mikrotubuli-Cytoskelett in wildtypischen Eikammern (A) unterscheidet sich nicht im Vergleich zu Eikammern aus Keimbahnklonen für 32.17 (B) oder 11.229 (C). (D, E) Kin-βGal wurde mittels anti-βGal (weiß) Antikörper sichtbar gemacht. Im WT (D) und in 32.17 Keimbahnklonen (E) lokalisiert Kin-βGal am posterioren Pol (Pfeile) der Oocyten.

Ein Marker für die Plus-Enden des Mikrotubuli-Cytoskeletts ist das Fusionsprotein aus dem plus-end gerichteten Motorprotein Kinesin I und β-Galaktosidase (Kin-βGal) (Clark *et al.*, 1994). Kin-βGal lokalisiert im Stadium 9 am posterioren Pol der Oocyte (Abb. 8: D) - unabhängig von *osk*. In Keimbahnklonen von 32.17 lokalisiert Kin-βGal - genauso wie im WT - am posterioren Pol im Stadium 9 (Abb. 8: E).

Offensichtlich hat die Mutation in 32.17 und 11.229 keinen Einfluss auf die Polarisierung des Mikrotubuli-Cytoskeletts. Die Misslokalisierung von *osk* mRNA und GFP-Stau in den mutanten Keimbahnklonen ist demnach unabhängig von der funktionalen Ausrichtung des Mikrotubuli-Cytoskeletts.

Mit seiner Lokalisation ab Stadium 9 wird die *osk* mRNA exklusiv am posterioren Pol translatiert (Abb. 9: A) (Ephrussi *et al.*, 1991; Kim-Ha *et al.*, 1991; Ephrussi und Lehmann, 1992). Die Restriktion der Translation von *osk* am posterioren Pol ist bedingt durch den korrekten Transport der *osk* mRNA und die gleichzeitige Repression der Translation (Wilhelm und Smibert, 2005). Die *osk* mRNA kodiert für zwei Isoformen, Osk^{Long} und Osk^{Short}, die von zwei alternativen, sich im Leseraster befindenden Startcodons abgelesen werden. Osk^{Long} wird sowohl für die Verankerung der *osk* mRNA als auch von Osk^{Short} am posterioren Pol der Oocyte benötigt (Markussen, *et al.*, 1995; Breitwieser, *et al.*, 1996). Osk^{Short} hingegen ist für die Bildung der Polzellen und des Abdomens zuständig (Markussen, *et al.*, 1995; Breitwieser, *et al.*, 1996; Vanzo und Ephrussi, 2002).

Es wurde untersucht, ob die Mutation - zusätzlich zu ihrer Rolle beim *osk* mRNA Transport - auch eine Rolle bei der Translation von *osk* spielt. Dafür wurde eine doppelte Antikörperfärbung für Osk und GFP-Stau durchgeführt. Da GFP-Stau während der gesamten Oogenese mit der *osk* mRNA co-lokalisiert, wird es hier als Marker für *osk* mRNA verwendet (Schuldt *et al.*, 1998). In Keimbahnklonen für 32.17 und für 11.229 konnte kein ektopisch translatiertes Osk Protein nachgewiesen werden (Abb. 9). Für beide Allele ist kein Osk Protein in der Oocyte detektierbar, wenn GFP-Stau nicht posterior lokalisiert wird (Abb. 9: G-I, M-O). In den Fällen, in denen geringe Mengen von GFP-Stau posterior lokalisiert sind, ist auch Osk Protein, ebenfalls nur in geringen Mengen, dort zu identifizieren (Abb. 9: D-F, J-L). Dieses Ergebnis konnte durch Western Blot Analyse von Osk Protein bestätigt werden (Abb. 10). Im WT wird - wie erwartet - Osk^{Short} stark exprimiert und Osk^{Long} in nur geringfügigen Mengen (Abb. 10). In den Mutanten dagegen ist die Expression sowohl von Osk^{Short} als auch Osk^{Long} stark reduziert bis nahezu nicht nachweisbar (Abb. 10). In den mutanten Keimbahnklonen wird die Translation der nicht lokalisierten bzw. misslokalisierten *osk* mRNA wie im WT unterdrückt. Die Mutation beeinflusst folglich nicht die Repression der Translation.

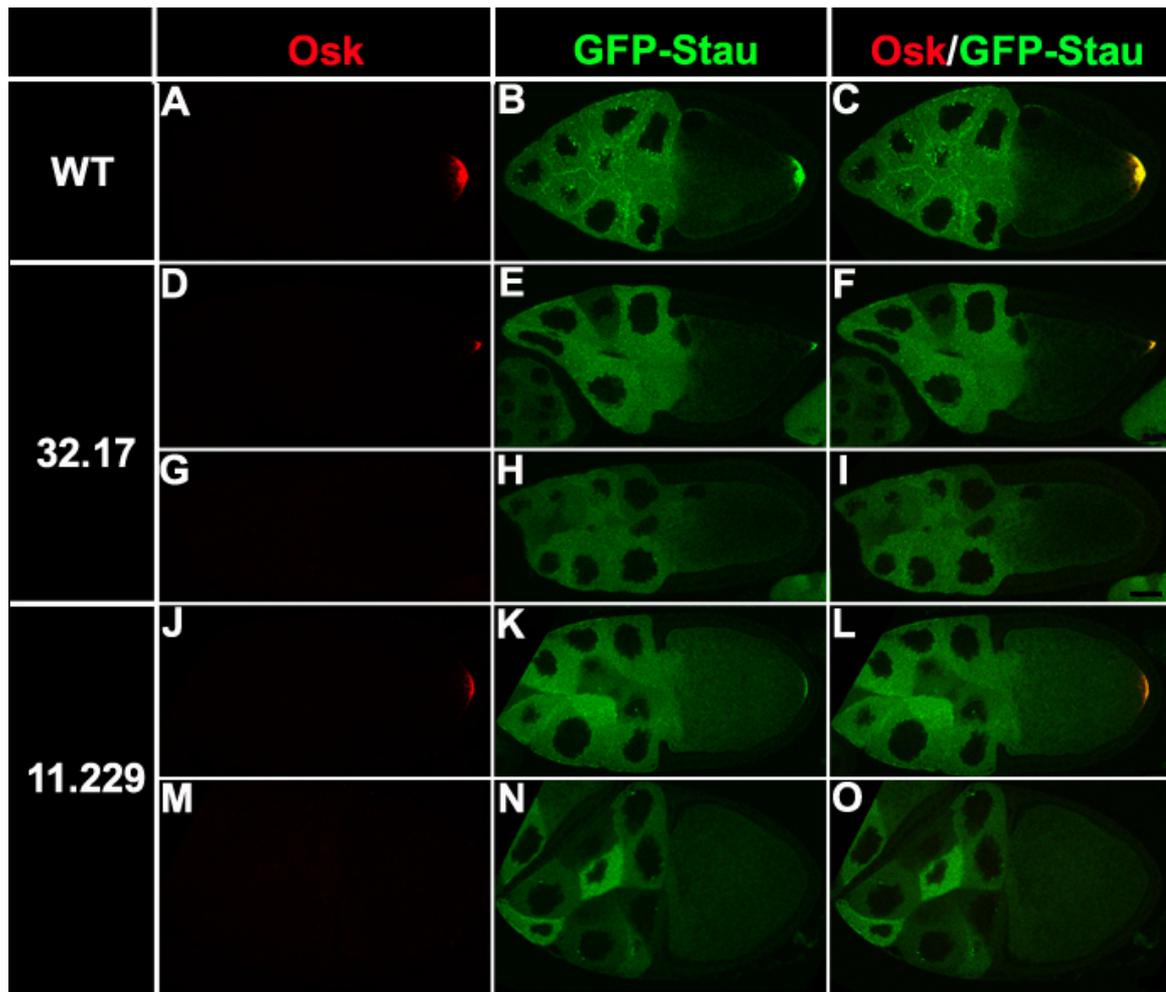


Abb. 9: Keine ektopische Translation von *osk* mRNA in 32.17 und 11.229 Keimbahnklonen.

Konfokalmikroskopische Aufnahmen von Eikammern im Stadium 10. Osk wurde mittels anti-Osk (rot) Antikörper und GFP-Stau mittels anti-GFP (grün) Antikörper sichtbar gemacht. (A-C) In wildtypische Eikammer wird Osk am posterioren Pol translatiert und co-lokalisiert dort mit GFP-Stau. (D-O) In Keimbahnklonen von 32.17 und 11.229 wird Osk nicht ektopisch translatiert. Wenn GFP-Stau diffus in der Oocyte verteilt ist, wird die *osk* mRNA nicht translatiert (G-I, M-O). Erreichen geringe Mengen an GFP-Stau den posterioren Pol, ist auch Osk dort zu detektieren (D-F, J-L).

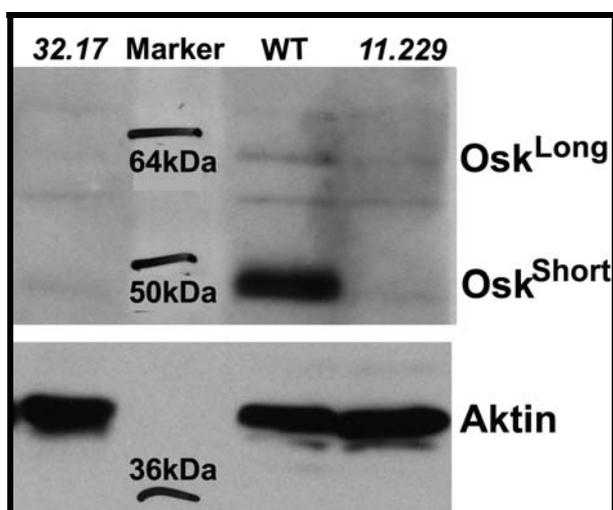


Abb. 10: Repression von Osk Protein in Keimbahnklonen von 32.17 und 11.229.

Western Blot gegen Osk und Aktin an Ovarienextrakten von wildtypischen Fliegen und 32.17 bzw. 11.229 Keimbahnklonen. In den Ovarienextrakten der mutanten Keimbahnklone (Bahn 1, 4) sind beide Osk Isoformen im Vergleich zum WT (Bahn 3) stark reduziert.

Die mRNA der anterioren Determinante *bcd* akkumuliert in den Stadien 5-6 in der Oocyte. Sie lokalisiert ab Stadium 8 zunächst als Ring am anterioren Pol und ist danach am gesamten anterioren Kortex der Oocyte zu detektieren (Abb. 11: A) (St Johnston *et al*, 1989). Die *bcd* Lokalisation in Keimbahnklonen der Allele 32.17 und 11.229 unterscheiden sich nicht im Vergleich zum WT (Abb. 11: A, B).

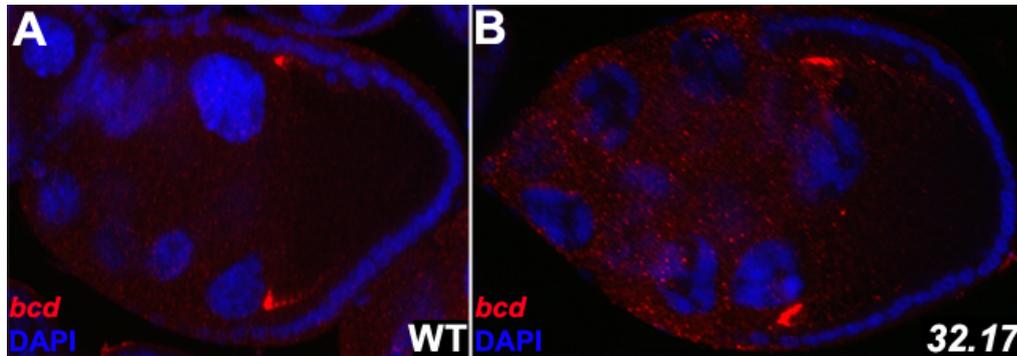


Abb. 11: Wildtypische Lokalisation der *bcd* mRNA in Keimbahnklonen von 32.17. Konfokalmikroskopische Aufnahmen von *bcd* mRNA (rot) *in situ* Hybridisierungen. Die DNA wurde mittels DAPI (blau) visualisiert. (A) Wildtypische Eikammer im Stadium 9. (B) Eikammer von 32.17 Keimbahnklonen im Stadium 9. Es ist kein Unterschied zwischen WT und Keimbahnklonen von 32.17 detektierbar.

3.2.2 Störung der DV Oocytenpolarität

Die Polarität der Oocyte lässt sich aus der Morphologie der Eihülle ablesen. Charakteristisch für die Morphologie des wildtypischen Eies von *Drosophila* sind die beiden dorsalen Anhänge, die anterior gelegene Mikropyle und die posteriore Aeropyle. Die Fliegen mit homozygot mutanter Keimbahn für 32.17 oder 11.229 legen deutlich weniger Eier als wildtypische Fliegen. Bei beiden Allelen weisen die abgelegten Eier einen ventralisierten Phänotyp auf (Abb. 12). Bei 32.17 äußert sich die Ventralisierung in 74% der Fälle in nur einem dorsalen Anhang (Abb. 12: B) bzw. in rudimentären Resten (23%) von dorsalen Anhängen (Abb. 12: C). Ein geringer Prozentsatz von 3% sind kleine sog. „cup-shaped“ Eier (Abb. 12: D). Die „cup-shaped“ Eier bilden bei 11.229 mit 74% die am stärksten vertretene Gruppe (Abb. 12: G). Sie weisen alle Reste von dorsalen Anhängen auf. Ein geringer Anteil der Eier (13%) zeigt nur einen dorsalen Anhang (Abb. 12: E) und in weiteren 13% der Fälle sind keine dorsalen Anhänge (Abb. 12: F) zu identifizieren. Die Bildung der dorsalen Anhänge und der DV Achse des Embryos wird durch das zweite Grk Signal initiiert. Die Ventralisierung der Eier deutet auf einen Defekt im zweiten Grk Signal und somit auf eine Rolle der Mutation bei der DV Achsenbildung hin. Die abgelegten Eier sind nicht befruchtet. Es entwickelt sich kein Embryo.

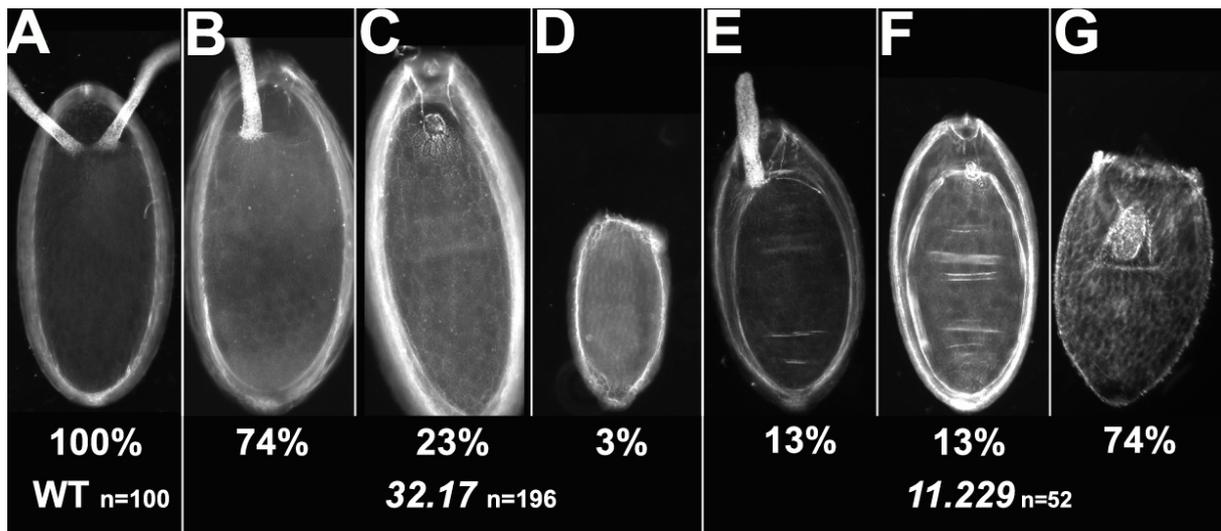


Abb. 12: Ventralisierte Eier von 32.17 und 11.229 Keimbahnklonen.

Mikroskopische Dunkelfeld-Aufnahmen von Eiern in dorsaler Ansicht, anterior ist oben. (A) Wildtypisches Ei. (B-D) Die abgelegten Eier von Müttern mit Keimbahnklonen des Allels 32.17 zeigen unterschiedliche Grade an ventralisierten Eiern: (B) Eier mit nur einem dorsalen Anhang, (C) Eier mit rudimentären Resten von dorsalen Anhängen und (D) „cup-shaped“ Eier. (E-G) Die abgelegten Eier von Müttern mit Keimbahnklonen des Allels 11.229 sind ebenfalls ventralisiert: (E) nur ein dorsaler Anhang, (F) kein dorsaler Anhang und (G) „cup-shaped“ Eier mit rudimentären Resten von dorsalen Anhängen.

Um zu überprüfen, ob die Ventralisierung der Eihüllen durch eine Misslokalisierung des Oocytenkerns hervorgerufen wird, wurde die Position des Oocytenkerns in Keimbahnklonen der beiden Allele mittels Antikörperfärbung des nucleären Lamins und mittels Phalloidin Markierung des Aktin Cytoskeletts untersucht. In den Stadien 6-7 der Oogenese wandert der Oocytenkern vom posterioren Pol zum anterioren Pol der Oocyte und definiert dort mit dem zweiten Grk Signal die dorsale Seite der Oocyte und des späteren Embryos. In keiner der untersuchten Keimbahnklone von 32.17 und 11.229 wurde eine Misslokalisierung des Oocytenkerns detektiert. In allen Fällen wird der Kern wie im WT zur anterior-dorsalen Seite der Oocyte transportiert (Abb. 13: A, B). Die Phalloidin Markierung lässt darüberhinaus keine Defekte im Aktin-Cytoskelett der Oocyte erkennen.

Im späten Stadium 10 beginnt das Nährzell-Dumping, d. h. die Entleerung des Cytoplasmas der Nährzellen in die Oocyte. Für beide Allele ist teilweise eine Invagination der Nährzellen in die Oocyte zu beobachten (Abb. 13: B). Diese korreliert mit den in beiden Allelen gefundenen „cup-shaped“ Eiern (vgl. auch Abb. 12: D, G).

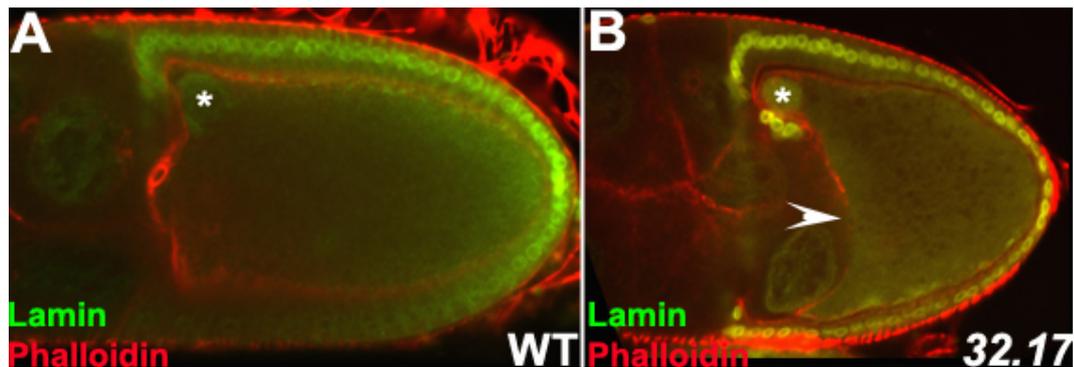


Abb. 13: Lokalisation des Oocytenkerns.

Konfokalmikroskopische Aufnahme von Eikammern im Stadium 10. Aktin wurde mittels Phalloidin (rot) und die Zellkerne mittels anti-Lamin (grün) Antikörper sichtbar gemacht. (A) In wildtypischen Eikammern wandert der Oocytenkern (*) zum anterioren Pol der Oocyte und definiert dort die dorsale Seite. (B) In Eikammern von mutanten Keimbahnklonen wandert der Oocytenkern (*) wie im WT zur anterior-dorsalen Seite. Zudem ist die Invagination der Nährzellen in die Oocyte zu erkennen (Pfeil).

Die präzise Lokalisation von *grk* mRNA und Protein in der anterior-dorsalen Region der Oocyte ab Stadium 8-9 ist entscheidend für die DV Achsenbildung. In den frühen Stadien (1-7) der Oogenese ist die *grk* mRNA in der gesamten Oocyte nachweisbar, wobei der Großteil des Transkripts am posterioren Pol lokalisiert ist. Im Stadium 8 akkumuliert die *grk* mRNA transient am anterioren Pol der Oocyte. Danach lokalisiert die *grk* mRNA - zusammen mit dem Oocytenkern - am anterior-dorsalem Pol der Oocyte (Abb. 14: A, B) (Neumann-Silberberg und Schüpbach, 1993). Die Allele 32.17 und 11.229 zeigen keinen Einfluss auf die Lokalisation des *grk* Transkripts. In allen untersuchten Keimbahnklonen lokalisiert die *grk* mRNA am anterior-dorsalen Pol der Oocyte (Abb. 14: C, D). Auffällig ist jedoch, dass die Menge der lokalisierten *grk* mRNA im Vergleich zum WT deutlich geringer ist. Dies konnte sowohl mit fluoreszenter als auch mit nicht-fluoreszenter *in situ* Hybridisierung beobachtet werden (Abb. 14). Die geringere Menge an *grk* mRNA korreliert mit den beobachteten ventralisierten Ei-Phänotypen (vgl. auch Abb. 12).

Ferner wurde mittels Antikörperfärbung untersucht, ob die Mutation die Lokalisation des Grk Proteins bzw. die Translation von *grk* beeinflusst. In Keimbahnklonen der Allele 32.17 und 11.229 ist Grk Protein nachweisbar und lokalisiert am anterior-dorsalen Pol der Oocyte (Abb. 15: B, C). Jedoch scheint auch hier, wie bei der *grk* mRNA, die Menge des Proteins im Vergleich zum WT (Abb. 15: A) reduziert. Die Reduktion des Grk Proteins korreliert mit den beobachteten ventralisierten Eiformen und den reduzierten RNA Mengen (vgl. Abb. 12). In 8% der Keimbahnklone von 11.229 war kein Grk Protein zu detektieren. Dies entspricht in etwa den 13% der abgelegten Eier von Müttern mit 11.229 Keimbahnklonen, die keine dorsalen Anhänge aufweisen.

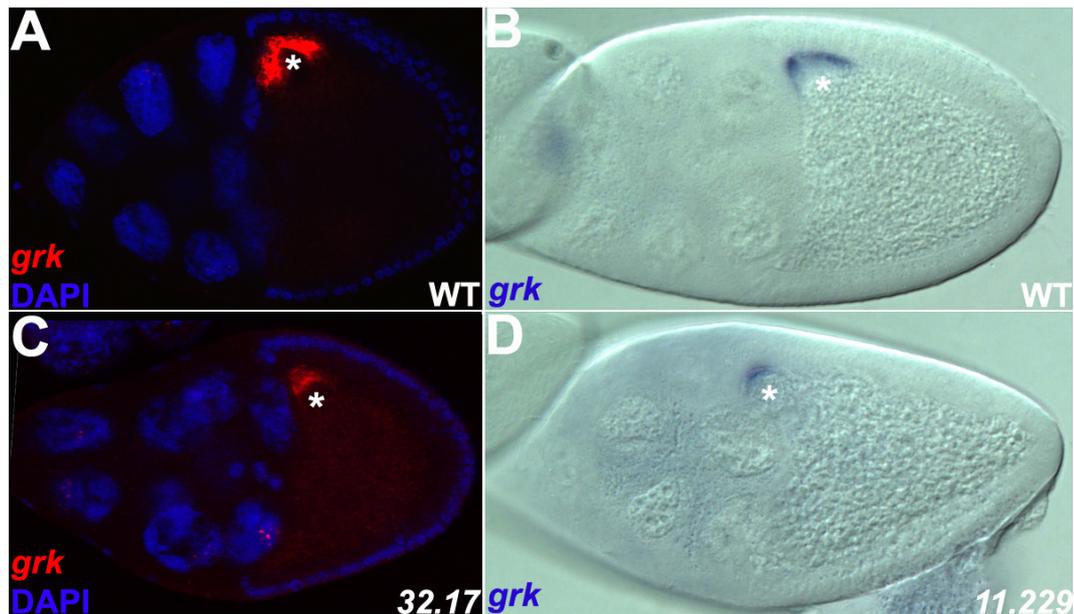


Abb. 14: Lokalisation der *grk* mRNA in Keimbahnklonen von 32.17 und 11.229.

(A, C) Konfokalmikroskopische Aufnahmen von *grk* mRNA (rot) *in situ* Hybridisierungen. DNA wurde mit DAPI (blau) visualisiert. (B, D) Lichtmikroskopische Aufnahmen von *grk* mRNA (blau) *in situ* Hybridisierungen. (A, B) In wildtypischen Eikammern lokalisiert die *grk* mRNA am anterior-dorsal Kortex gemeinsam mit dem Oocytenkern (*). (C, D) In Eikammern von 32.17 und 11.229 Keimbahnklonen ist die *grk* mRNA wie im WT anterior-dorsal am Oocytenkern lokalisiert, nur die Menge an RNA scheint reduziert.

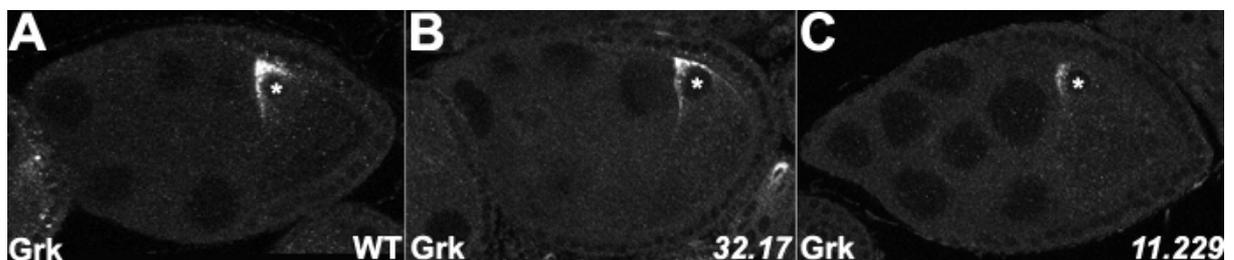


Abb. 15: Lokalisation von Grk Protein in Keimbahnklonen von 32.17 und 11.229.

Konfokalmikroskopische Aufnahmen von Eikammern im Stadium 9. Grk wurde mittels anti-1D12 (weiß) Antikörper sichtbar gemacht. (A) In WT Eikammer lokalisiert Grk am anterior-dorsalem Kortex. (B, C) In Eikammern von 32.17 und 11.229 Keimbahnklonen lokalisiert Grk wie im WT am anterior-dorsalem Kortex, nur die Menge an Grk scheint geringer.

3.3 Identifizierung von *thoc5* durch Kartierung von 32.17/11.229

Um das mutante Gen der Allele 32.17 und 11.229 zu kartieren, wurde eine Kombination aus traditioneller meiotischer Grobkartierung einer letalen Komplementationsgruppe mittels sichtbaren Markern und einer Feinkartierung mittels molekularen Markern gewählt (Martin *et al.*, 2001). Das Kreuzungsschema für die meiotische Kartierung und für die Generierung von Rekombinantenstämmen für die Kartierung mittels Sequenzpolymorphismen ist in Abb. 16 dargestellt.

Zunächst wurden Männchen des einen mutanten Allels 11.229 mit Weibchen des rezessiven Markerstamms „cpxsp“ gepaart (Abb. 16: Kreuzung 1). Diese Kreuzung generiert Weibchen, in denen meiotische Rekombination zwischen den beiden Chromosomen FRT42B und „cpxsp“ erfolgen kann. Die Weibchen wurden dann in großen Mengen mit Männchen gekreuzt, deren Chromosomen dieselben rezessiven Marker wie „cpxsp“ sowie einen zusätzlichen dominanten Marker (Bl) aufweisen (Abb. 16: Kreuzung 2). Durch den dominanten Marker kann dieses Chromosom in den Nachkommen leicht verfolgt werden. Männliche Nachkommen, die sowohl das rekombinante Chromosom als auch das dominante Markerchromosom trugen, wurden selektiert und auf Rekombinationsereignisse mittels der sichtbaren Marker untersucht. Das FRT42B Chromosom trägt an der cytologischen Position 42B das sichtbare mini-white Gen, das hier als zusätzlicher vierter sichtbarer Marker (FRT) verwendet wird. Es kann folglich in 3 Intervallen (FRT-c-px-sp) nach spezifischen Rekombinationen auf dem Chromosom 2R selektiert werden. In Einzelkreuzungen wurden Rekombinanten eines jeden Intervalls mit Weibchen des zweiten unabhängigen Allels 32.17 gepaart (Abb. 16: Kreuzung 3). Wenn keine transheterozygoten Nachkommen auftreten, trägt das rekombinante Chromosom die Mutation. Diese Komplementationsanalyse von ca. 20 Rekombinanten eines jeden Intervalls grenzt die Mutation zwischen den beiden sichtbaren Markern px und sp auf ca. 1,6 Mb ein.

Für die Feinkartierung mit molekularen Markern wurde nach weiteren Männchen gesucht, in denen eine Rekombination zwischen px und sp erfolgt war. Diese Männchen wurden zur Komplementationsanalyse wiederum mit Weibchen des zweiten Allels gepaart (Abb. 16: Kreuzung 4). Aus den Geschwistern dieser Einzelkreuzung, die das rekombinante Chromosom über dem Balancerchromosom CyO trugen, wurden stabile Stämme etabliert. Insgesamt wurden 99 Stämme mit rekombinanten Chromosomen zwischen den Markern px und sp etabliert. Es wurden 45 rekombinante Chromosomen mit Mutation detektiert, 42 Chromosomen mit dem Genotyp $-cpx+$ und 3 Chromosomen mit dem Genotyp $FRT++sp$. Von den 55 identifizierten Stämmen ohne Mutation hatten 3 rekombinante Chromosomen den Genotyp $-cpx+$ und 51 rekombinante Chromosomen den Genotyp $FRT++sp$. Da es sich bei den beiden rekombinanten Chromosomen $FRT++sp$ und $-cpx+$ um reziproke Chromosomen handelt, ist davon auszugehen, dass das mutante Gen näher bei sp liegt.

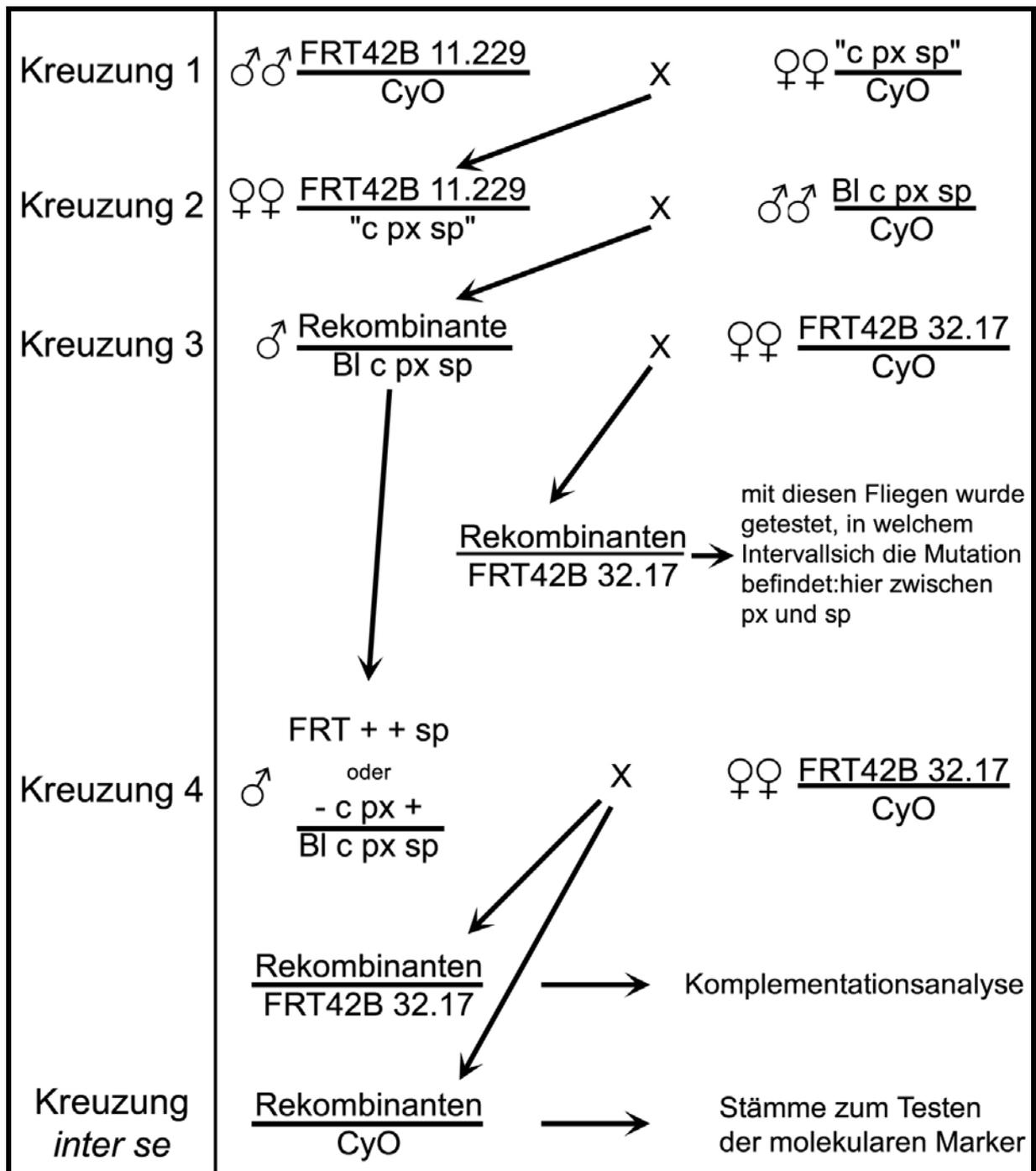


Abb. 16: Kreuzungsschema zur Kartierung der letalen Komplementationsgruppe 32.17/11.229. Zunächst werden Weibchen generiert, die heterozygot für das mutante Allel 11.229 und das rezessive „cpxsp“ Marker-Chromosom sind (Kreuzung 1), damit es zu Rekombinationsereignissen zwischen den beiden Chromosomen kommen kann. Diese Weibchen werden dann mit Männchen gepaart, in denen das Markerchromosom zusätzlich den dominanten Marker Bl trägt (Kreuzung 2). Die männlichen Nachkommen werden auf rekombinante Chromosomen hin selektiert und in Einzelkreuzungen gegen Weibchen mit dem zweiten Allel 32.17 gekreuzt (Kreuzung 3). Durch diese Komplementationskreuzung wird untersucht, ob das rekombinante Chromosom die Mutation noch trägt und zwischen welchen Markern sich die Mutation befindet, hier zwischen px und sp. Durch weitere Kreuzungen werden dann spezifisch Fliegen mit rekombinanten Chromosomen im Intervall zwischen px und sp generiert (Kreuzung 4) und der Komplementationsanalyse unterzogen. Für die molekulare Kartierung werden aus den Geschwistern stabile Stämme mit rekombinanten Chromosomen über CyO hergestellt.

Genomische DNA von diesen 99 Stämmen wurde präpariert und zur Feinkartierung mittels der in Kapitel 3.1 (Tab. 1) identifizierten Sequenz-Polymorphismen genotypisiert. Die Ergebnisse der molekularen Feinkartierung sind in Abb. 17 zusammengefasst. Zunächst wurde getestet, wo sich die Mutation bezüglich der beiden RFLP 2R141 und 2R144 befindet. In 10 $-cpx+$ Chromosomen mit Mutation und in den 3 $FRT++sp$ Chromosomen mit Mutation ist die Rekombination zwischen den Markern 2R141 und 2R144 erfolgt. Der Marker 2R141 dieser $-cpx+$ Chromosomen verhält sich wie das „ $cpxsp$ “ Chromosom, wohingegen der Marker 2R144 mit dem $FRT42B$ Chromosom übereinstimmt. Bei den 3 $FRT++sp$ Chromosomen ist das Ergebnis für die beiden Marker gegenteilig. Demnach liegt die Mutation zwischen den beiden RFLP 2R141 und 2R144. Die Analyse der rekombinanten Chromosomen ohne Mutation kam zu demselben Ergebnis.

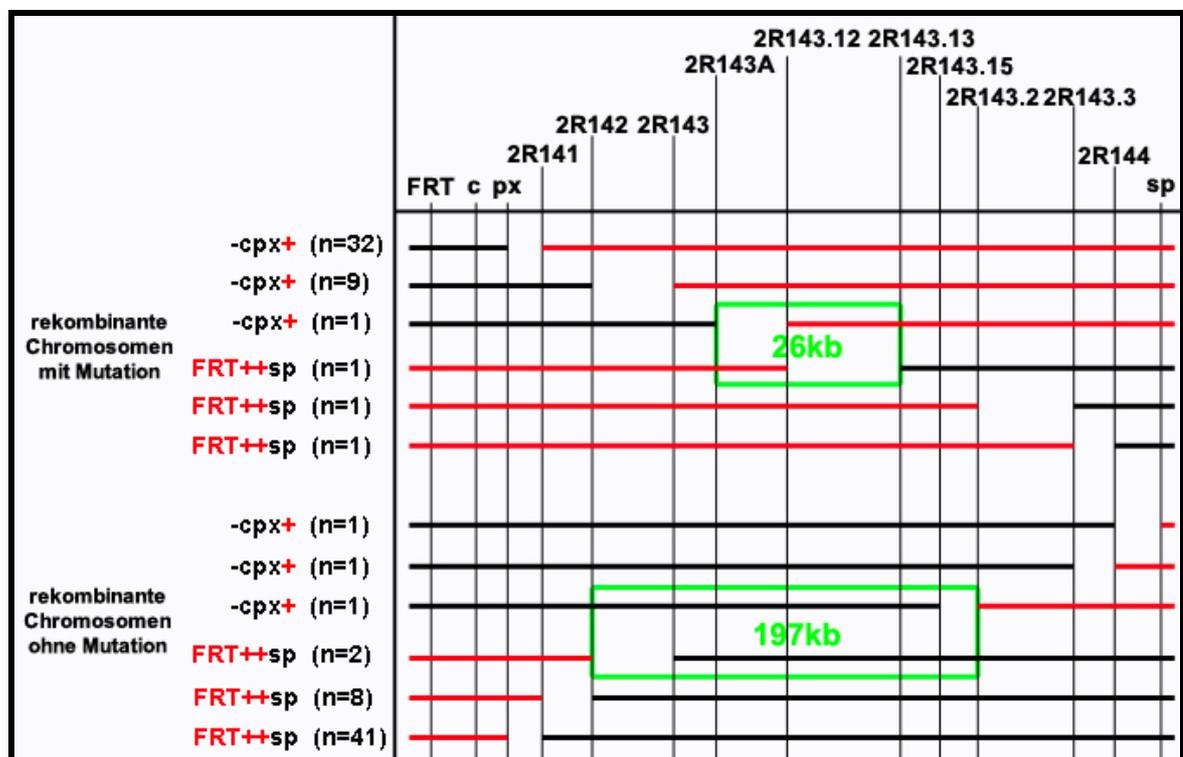


Abb. 17: Molekulare Kartierung von 32.17/11.229.

Schematische Darstellung der mittels molekularer Marker untersuchten rekombinanten Chromosomen zur Kartierung der Komplementationsgruppe 32.17/11.229. Die Teile der rekombinanten Chromosomen, die vom $FRT42B$ Chromosom abstammen, sind rot markiert, die des „ $cpxsp$ “ Markerchromosoms schwarz. Die grünen Kästen zeigen die kartierte Region der Mutation durch die Analyse der rekombinanten Chromosomen mit Mutation und ohne Mutation. n= die Anzahl der untersuchten Chromosomen.

Für die weitere Eingrenzung der Mutation durch SNP hat sich die Zahl der informativen rekombinanten Chromosomen auf 13 Chromosomen mit Mutation und 12 Chromosomen ohne Mutation reduziert. Diese 25 Chromosomen wurden dann mit bereits vorhandenen und neu detektierten SNP zwischen den Markern 2R141 und 2R144 genotypisch untersucht und

die Mutation so weiter eingegrenzt (Abb. 17). Die Mutation liegt in einem Bereich von ca. 26 kb zwischen den molekularen Markern 2R143A und 2R143.13.

In dem kartierten Bereich befinden sich 11 Gene (Abb. 18). Ein letales Allel für *G-salpa60A* war von flybase erhältlich. Durch Komplementationskreuzung der mutanten *G-salpa60A* Linie mit den beiden Allelen 32.17 und 11.229 konnte ausgeschlossen werden, dass es sich bei *G-salpa60A* um das gesuchte Gen handelt. Von den verbleibenden 10 Genen erschienen vier Gene auf Grund ihrer von flybase deduzierbaren Funktion als putative Kandidaten für die Mutation in den Allelen 32.17 und 11.229. So haben das *CG2970* Gen und das *alpha-catenin-related* Gen eine Rolle in der Organisation des Cytoskeletts, *fzr2* beeinflusst den Zellzyklus und *thoc5* ist beim Transport von mRNA aus dem Zellkern beteiligt. Die Sequenzanalyse dieser vier Genloci ergab für beide Allele eine Mutation in der kodierenden Region des Gens *thoc5*. Bei dem Allel 32.17 wird Guanin an Position 19842744 bp auf dem Chromosom 2R (flybase R5.4) durch Adenin ausgetauscht, und bei dem Allel 11.229 Cytosin durch Thymin an Position 19843499 bp.

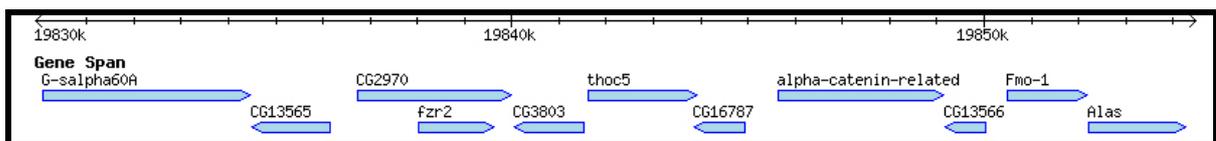


Abb. 18: Kartierte genomische Region der möglichen Gene für 32.17/11.229 (modifiziert nach flybase).

Mit Rettungsexperimenten konnte bestätigt werden, dass es sich bei 32.17 und 11.229 um zwei mutante Allele des Gens *thoc5* handelt. Konkret wurde hierfür ein UASP2::*thoc5* Transgen unter der Kontrolle eines tubGal4 Treibers in transheterozygote Embryonen (32.17/11.229) gebracht. Diese normalerweise letalen Transheterozygoten waren nun lebensfähig und fertil.

Dagegen führt das Transgen in homozygoten Embryonen nicht zur Rettung. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass - außer der Mutation in *thoc5* - noch weitere letale Mutationen durch EMS im Genom der Fliegen 32.17 und 11.229 induziert wurden. Tatsächlich wurde die verwendete EMS Dosis beim GFP-Stau-Screen so gewählt, dass es zu mindestens einer letalen Mutation pro Chromosomenarm kommen sollte.

3.4 Molekulare Charakterisierung von *thoc5*

Das Gen *thoc5* besitzt sechs Exons und kodiert für ein Protein mit 616 Aminosäuren von ca. 70,9 kDa (Abb. 19). Auf Proteinebene lässt sich eine „coiled-coil“-Domäne in Exon 2 nachweisen (<http://www.ensembl.org/index.html>). Bei dem Allel *thoc5*^{32.17} führt die Mutation zu einem Basenpaaraustausch von Guanin nach Adenin im dritten Exon. Diese Transition verwandelt die Aminosäure Tryptophan an Position 315 in ein Stopcodon. Beim zweiten Allel *thoc5*^{11.229} wird Cytosin durch Thymin ersetzt. Auch hier führt der Austausch der Aminosäure Glutamin an Position 530 im fünften Exon zu einem Stopcodon. Es handelt sich bei beiden Allelen wahrscheinlich nicht um Nullallele, da beide noch trunkierte Proteine kodieren könnten. Für Thoc5 lassen sich homologe Proteine (~30% Identität) u. a. in *Caenorhabditis elegans*, Fisch, Maus und Mensch, nicht jedoch in *S. cerevisiae* finden.

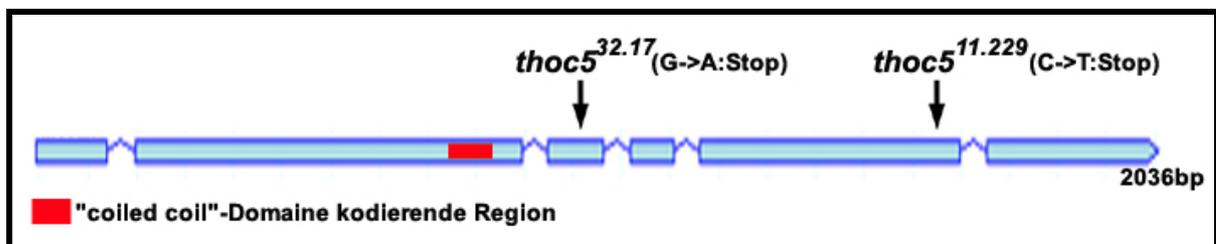


Abb. 19: *thoc5* Genstruktur.

In *Drosophila* S2 Schneiderzellen ist Thoc5 als Teil des THO-Komplexes identifiziert worden (Rehwinkel *et al.*, 2004). Dieser THO-Komplex reguliert die Expression von <20% des Transkriptoms und den mRNA Transport von <12% des Transkriptoms aus dem Zellkern ins Cytoplasma. Der THO-Komplex besteht aus 5 Proteinen, nämlich Tho2, Hpr1, Thoc5, Thoc6 und Thoc7. Für die beiden Hauptkomponenten Tho2 und Hpr1 lassen sich homologe Proteine in *S. cerevisiae* finden. In *S. cerevisiae* besteht der THO-Komplex aus 4 Proteinen: Tho2p, Hpr1p, Mft1p und Thp2p (Chavez *et al.*, 2000). Die Ausschaltung eines dieser Gene in *S. cerevisiae* führt zu Temperatur-Sensitivität, transkriptionsabhängiger Hyperrekombination, Schwächung der transkriptionalen Elongation und unter Hitzeschockbedingungen zu Akkumulierung von polyadenylierter RNA im Zellkern (Piruat *et al.*, 1998; Schneiter *et al.*, 1999; Chavez *et al.*, 2000; West *et al.*, 2000; Jimeno *et al.*, 2002; Libri *et al.*, 2002; Strässer *et al.*, 2002; Rondon *et al.*, 2003)

In *S. cerevisiae* interagiert der THO-Komplex sowohl mit dem Transkriptionsapparat als auch mit der mRNA Export Maschinerie. (Chang *et al.*, 1999; West *et al.*, 2000; Fan *et al.*, 2001; Jimeno *et al.*, 2002; Libri *et al.*, 2002; Strässer *et al.*, 2002; Zenklusen *et al.*, 2002). Chromatin-Immunopräzipitations-Experimente haben gezeigt, dass Hpr1p und Tho2p schon

bei der Transkription an die naszierende RNA rekrutiert werden. Dort rekrutiert Hpr1p die mRNA Export Faktoren Yra1p und Sub2p. Yra1p wirkt als Adaptor zwischen mRNA und dem heterodimeren mRNA Export-Rezeptor Mex67p-Mtr2p. Der THO-Komplex ist folglich an der korrekten Bildung von mRNP Komplexen und deren Export aus dem Zellkern in *S. cerevisiae* beteiligt.

3.4.1 Expression von *thoc5* mRNA

Die mRNA von *thoc5* lässt sich mittels *in situ* Hybridisierung in der Keimbahn nachweisen. Spätestens ab Stadium 4 wird *thoc5* von den Nährzellen exprimiert und ist während der gesamten Oogenese im Cytoplasma nachweisbar (Abb. 20). Es ist keine spezifische Lokalisierung der mRNA zu erkennen.

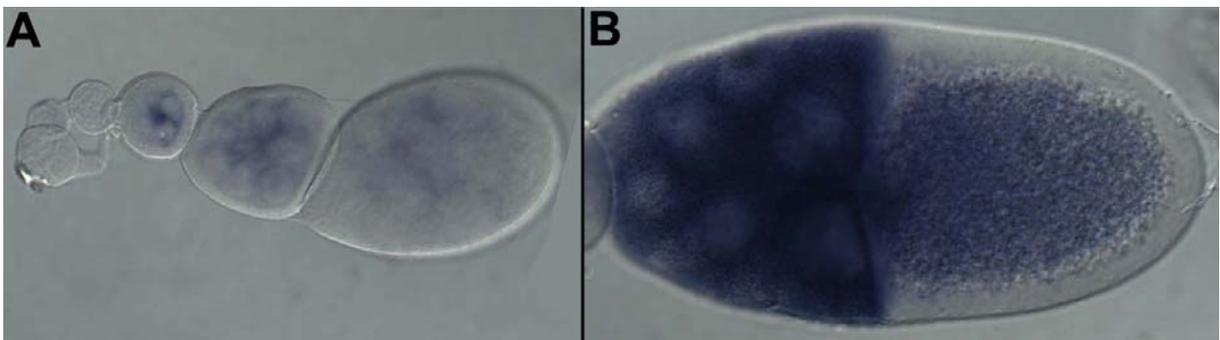


Abb. 20: Expression von *thoc5* mRNA in der Keimbahn.

Lichtmikroskopische Aufnahmen von *thoc5* (blau) *in situ* Hybridisierung in WT Eikammern. Die mRNA von *thoc5* wird sowohl im frühen (A) als auch im späten Stadium (B) der Oogenese in der Keimbahn exprimiert.

3.4.2 Lokalisation von Thoc5 Protein

Um die Lokalisation des Thoc5 Proteins zu untersuchen, wurde ein Peptid-Antikörper generiert (s. 2.2.2.3). Für diesen Antikörper konnte jedoch weder durch Western Blot Analyse noch durch Antikörperfärbungen an Eikammern eine Spezifität für Thoc5 nachgewiesen werden. Auch die Verwendung des kommerziell erhältlichen Peptid-Antikörpers für das Thoc5 Maus Homolog FMIP ergab mit beiden Methoden kein Ergebnis.

Um trotzdem die zelluläre Lokalisation des Thoc5 Proteins in der Keimbahn zu untersuchen, wurde ein GFP-Thoc5 Fusionprotein unter der Kontrolle des maternalen Tubulin-Promotors hergestellt. In diesem Zusammenhang ist es wichtig zu erwähnen, dass die Expression von GFP-Thoc5 in *thoc5*^{32.17} Keimbahnklonen zur Rettung des mutanten Phänotyps führt, was auf eine volle Funktionsfähigkeit des GFP-Thoc5 Transgens in der Keimbahn schließen lässt.

Nach Antikörperfärbung gegen GFP zeigte sich eine dominante gleichmäßige Lokalisation von GFP-Thoc5 im Kernplasma des Oocytenkerns als auch in den Zellkernen der Nährzellen (Abb. 21). GFP-Thoc5 wird nicht in den Nucleoli detektiert.

Zudem akkumuliert GFP-Thoc5 in den Nährzellkernen an mehreren Stellen punktförmig (Abb. 21: B). Auffällig ist hier, dass die Aggregate sich scheinbar immer in direkter Nachbarschaft zu den Nucleoli befinden. In geringen Mengen kann GFP-Thoc5 auch im Cytoplasma der Nährzellen und der Oocyte detektiert werden. Hier weist es keine spezifische Lokalisation auf.

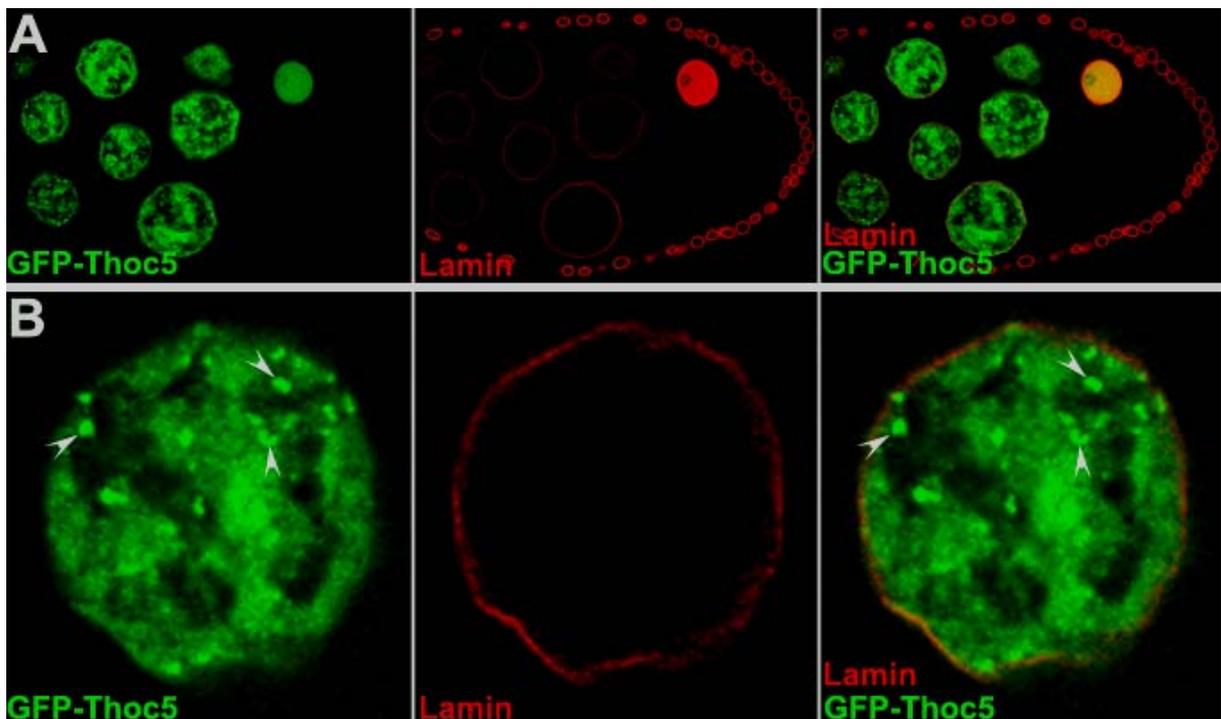


Abb. 21: GFP-Thoc5 Lokalisation in den Zellkernen der Keimbahn.

Konfokalmikroskopische Aufnahmen von einer Eikammer und eines Nährzellkerns. GFP-Thoc5 wurde mittels anti-GFP (grün) Antikörper und die Kernmembran mittels anti-Lamin (rot) Antikörper sichtbar gemacht. (A) Die Eikammer im Stadium 9 zeigt die dominante Lokalisation von GFP-Thoc5 in den Zellkernen der Nährzellen sowie des Oocytenkerns. (B) In Vergrößerungen von Nährzellkernen lassen sich zudem punktförmige Aggregate (Pfeile) von GFP-Thoc5 erkennen. Diese scheinen immer in unmittelbarer Nähe zu den Nucleoli.

Ein identisches Thoc5 Lokalisationsmuster wurde auch erzielt, wenn ein mit HA-markiertes Transgen (UASP2::HA-*thoc5*) unter der Kontrolle eines tubGal4 oder nosGal4 Treibers exprimiert wurde (Abb. 22). Dieses Fusionskonstrukt ist voll funktionsfähig. Unter der Kontrolle des tubGal4 Treibers sind transheterozygote Embryonen für 32.17/11.229 mit UASP2::HA-*thoc5* lebensfähig und die entstehenden Fliegen fertil (vgl. 3.2.9).

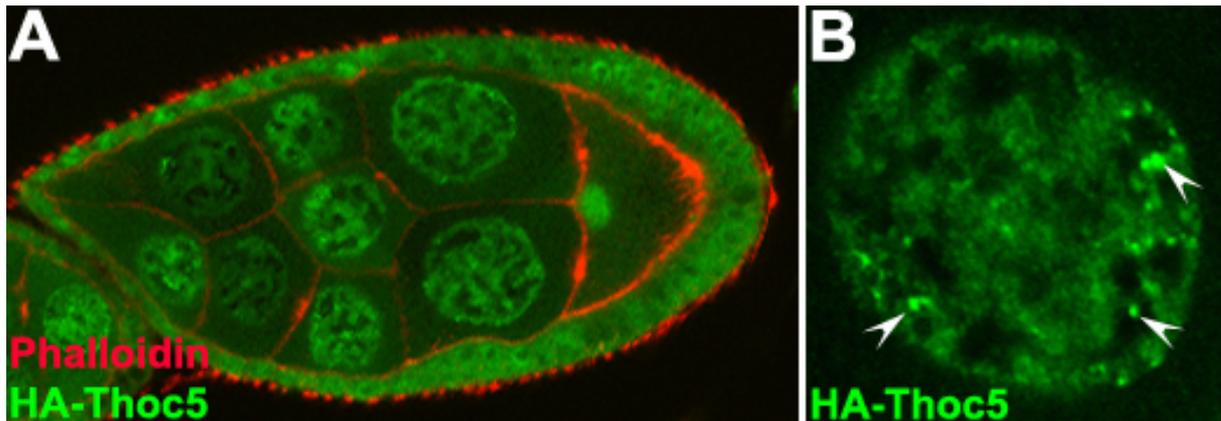


Abb. 22: Lokalisierung von HA-Thoc5 in Zellkernen.

Konfokalmikroskopische Aufnahmen einer Eikammer und eines Nährzellkerns. HA-Thoc5 wurde mittels anti-HA (grün) Antikörper und F-Aktin mittels Phalloidin (rot) sichtbar gemacht. Das UASP2::HA-Thoc5 Transgen wird mit Hilfe des tubGal4 Treibers exprimiert. (A) Die Eikammer im Stadium 9 zeigt die dominante Lokalisation des HA-Thoc5 in den Zellkernen der Follikelzellen, der Nährzellen sowie des Oocytenkerns. (B) In den Nährzellkernen ist HA-Thoc5 im Kernplasma verteilt und bildet Aggregate (Pfeile) in unmittelbarer Nähe zu den Nucleoli.

3.4.3 Co-Lokalisation von Thoc5 mit Tho2 und Hpr1

Thoc5 bildet gemeinsam mit vier weiteren Komponenten, nämlich Tho2, Hpr1, Thoc6 und Thoc7, einen konservierten Komplex, den so genannten THO-Komplex (Rehwinkel *et al.*, 2004). Daher wurde untersucht, ob dieser Komplex auch in der Oogenese von *Drosophila* gebildet wird. Die Lokalisation der beiden Hauptkomponenten Tho2 und Hpr1 während der Oogenese wurde mittels Antikörperfärbung untersucht. Beide Proteine sind in allen Stadien der Oogenese nachweisbar (Abb. 23). Wie GFP-Thoc5 zeigen sowohl Tho2 als auch Hpr1 eine starke Lokalisation in den Zellkernen der Keimbahn. Auch eine punktförmige Akkumulierung in den Nährzellkernen ist zu beobachten (Abb. 23: F). Zudem sind Hpr1 und Tho2 im Cytoplasma der Oocyte und der Nährzellen zu detektieren (Abb. 23: A, C). Co-Färbung von GFP-Thoc5 und Tho2 bzw. Hpr1 zeigen, dass die beiden Proteine in den Zellkernen der Keimbahn co-lokalisieren (Abb. 23: D). Dies ist deutlich in den Nährzellkernen zu erkennen (Abb. 23: G). Auf Grund der Co-Lokalisation kann davon ausgegangen werden, dass die mit GFP und HA markierten Thoc5 Transgene die Lokalisation des endogenen Thoc5 Proteins wiedergeben. Der THO-Komplex bildet sich folglich auch während der Oogenese in *Drosophila*.

Ferner wird Tho2 und Hpr1 auch in den zygotischen Follikelzellen exprimiert (Abb. 23). Wie in der Keimbahn lokalisieren die Proteine verstärkt in den Zellkernen, sind aber auch im Cytoplasma nachweisbar (Abb. 23: A, B, D). Dies lässt auf eine weitere mögliche Rolle des THO-Komplexes auch in den Follikelzellen schließen.

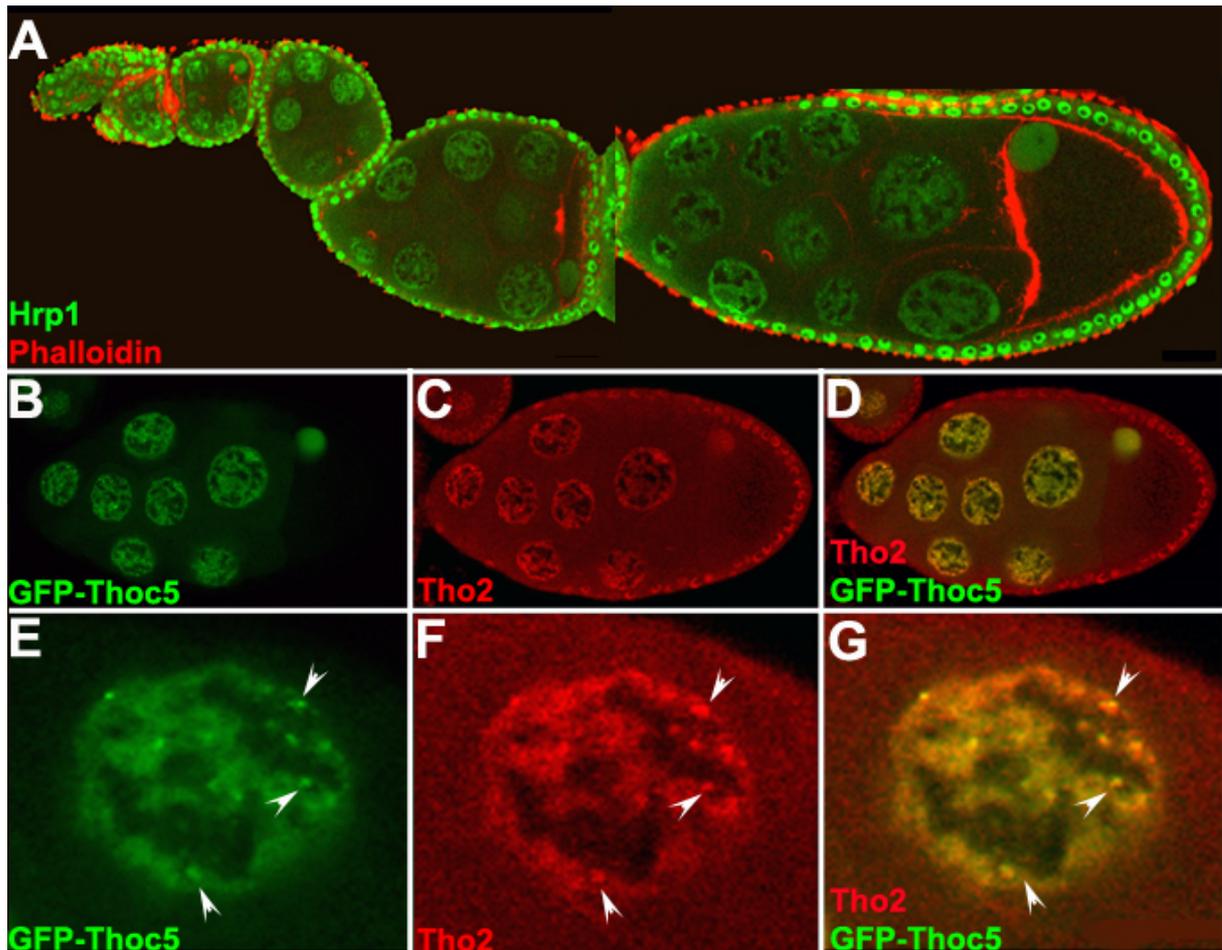


Abb. 23: Co-Lokalisierung von GFP-Thoc5 mit Tho2 und Hpr1.

(A) Konfokalmikroskopische Aufnahmen von Eikammern unterschiedlicher Entwicklungsstadien. Hpr1 wurde mittels anti-Hpr1 (grün) Antikörper und F-Aktin mittels Phalloidin (rot) sichtbar gemacht. Hpr1 lokalisiert während der gesamten Oogenese in den Zellkernen der Keimbahn und des Follikel epithels. (B-G) Konfokalmikroskopische Aufnahmen einer Eikammer und eines Nährzellkerns. GFP-Thoc5 wurde mittels anti-GFP (grün) Antikörper und Tho2 mittels anti-Tho2 (rot) Antikörper sichtbar gemacht. Das GFP-Thoc5 Transgen steht unter der Kontrolle des maternalen Tubulin Promotors. (B-D) GFP-Thoc5 co-lokalisiert mit Tho2 in den Zellkernen der Keimbahn. (E-G) In Vergrößerungen von den Nährzellkernen ist eine Co-Lokalisation von GFP-Thoc5 und Tho2 auch in den Aggregaten (Pfeile) nahe der Nucleoli zu erkennen.

3.4.4 Co-Lokalisation des THO-Komplexes mit Mago und Y14 in den Zellkernen der Nährzellen

Wie oben in den Kapiteln 3.2.1 und 3.2.4.1 beschrieben, führt der Verlust von *thoc5* zur Misslokalisierung der *osk* mRNA und dem assoziierten GFP-Stau Protein. Der Transport und die Restriktion der Translation von *osk* mRNA am posterioren Pol der Oocyte erfordert verschiedene in trans agierende Proteine, die gemeinsam mit der *osk* mRNA zu mRNP assemblieren. Die Bildung der mRNP erfolgt in den Nährzellkernen, wo auch die *osk* mRNA synthetisiert wird. Auf dem Weg von den Nährzellkernen zum posterioren Pol verändert sich die Zusammensetzung der *osk* mRNA Transportmaschinerie dynamisch, indem spezifische

Proteine an die mRNP rekrutiert werden, aber die mRNP auch wieder verlassen. Die beiden nucleären Shuttle-Proteine Mago und Y14 sind Teil dieser mRNP. Mago und Y14 bilden Heterodimere und sind wie Thoc5 vornehmlich in den Zellkernen der Keimbahn lokalisiert. Zudem lokalisiert das Heterodimer Mago/Y14 mit der *osk* mRNA transient im Stadium 9 am posterioren Pol (Newmark *et al.*, 1997; Hachet und Ephrussi, 2001; Mohr *et al.*, 2001).

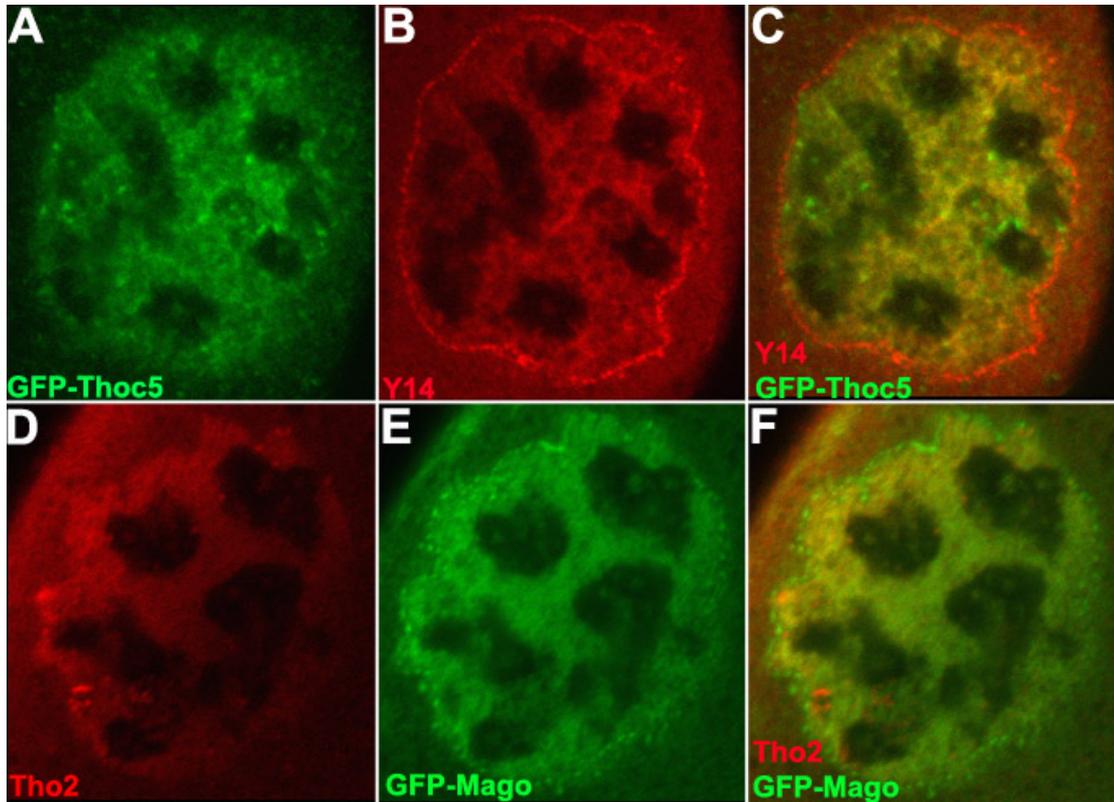


Abb. 24: Partielle Co-Lokalisation des THO-Komplex mit Mago und Y14.

(A-C) Konfokalmikroskopische Aufnahmen eines Nährzellkerns. GFP-Thoc5 wurde mittels anti-GFP (grün) Antikörper und Y14 mittels anti-Y14 (rot) Antikörper sichtbar gemacht. GFP-Thoc5 und Y14 co-lokalisieren im Kernplasma der Nährzellkerne. GFP-Thoc5 bildet zudem Aggregate im Zellkerninneren, während Y14 zusätzlich punktförmig an der Kernhülle der Nährzellkerne zu detektieren ist. (D-F) Konfokalmikroskopische Aufnahmen eines Nährzellkerns. Tho2 wurde mittels anti-Tho2 (rot) Antikörper und GFP-Mago mittels anti-GFP (grün) sichtbar gemacht. Tho2 und GFP-Mago zeigen eine deutliche Co-Lokalisation im Kernplasma der Nährzellen, nicht jedoch in den Tho2 Aggregaten an den Nucleoli bzw. den GFP-Mago Aggregaten an der Kernperipherie.

Um zu testen, ob Thoc5 bzw. der THO-Komplex ein Teil dieser *osk* mRNA Transport-Maschinerie ist, wurde nach einer Interaktion zwischen Thoc5 bzw. dem THO-Komplex und Mago/Y14 gesucht. Antikörperfärbungen sowohl von Mago als auch von Y14 zeigen eine Co-Lokalisation mit den Komponenten des THO-Komplexes im Kernplasma der Nährzellkerne und des Oocytenkerns (Abb. 24). Es sind jedoch auch deutlich Bereiche zu erkennen, in denen Mago/Y14 nicht mit dem THO-Komplex co-lokalisiert. Hierbei handelt es sich um die punktförmigen Aggregate des THO-Komplexes im Inneren der Nährzellkerne, sowie der Akkumulation von Mago und Y14 an der Peripherie der Nährzellkerne (Abb. 24).

Eine direkte Interaktion von Mago mit GFP-Thoc5 konnte mittels Co-Immunopräzipitation gezeigt werden (Abb. 25). Wenn Ovarienextrakte von Fliegen, die das Transgene GFP-Thoc5 spezifisch in der Keimbahn exprimieren, mit Mago Antikörper inkubiert wurden, ließen sich sowohl GFP-Thoc5 als auch Y14 präzipitieren. Die direkte Interaktion von GFP-Thoc5 mit Mago und die Co-Lokalisation der Proteine in den Nährzellkernen unterstützt die These, dass Thoc5 Teil der *osk* mRNA Transportmaschinerie ist. Da Thoc5 nicht wie Mago/Y14 zusammen mit der *osk* mRNA am posterioren Pol lokalisiert und Thoc5 hauptsächlich in den Zellkernen zu finden ist, ist davon auszugehen, dass Thoc5 Teil früher intra-nucleärer mRNP ist. Thoc5 bzw. der THO-Komplex zeigen partikuläre Elemente im Inneren des Zellkerns in der Nähe der Nucleoli, wogegen Mago/Y14 deutlich an der Kernhülle der Zellkerne zu erkennen ist.

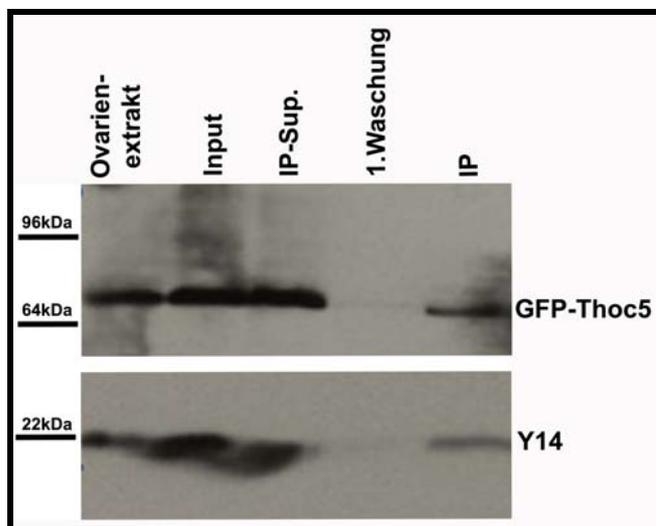


Abb. 25: Co-Immunopräzipitation von GFP-Thoc5 und Y14 mit Mago.

In Ovarienextrakten von Fliegen, die das transgene *mtub::GFP-Thoc5* Konstrukt exprimieren, lassen sich GFP-Thoc5 und Y14 mit Mago präzipitieren.

Input: 13000 rpm Überstand von Ovarienextrakten; IP-Sup.: Überstand nach Immunopräzipitation; 1. Waschung: Überstand der Immunopräzipitation nach 1. Waschung; IP: Immunopräzipitat nach 4. Waschung.

3.4.5 Einfluss von *thoc5* auf die Lokalisation von Y14 und Btz

Ausgehend von der Annahme, dass Thoc5 Teil früher mRNP ist, wurde untersucht, ob *thoc5* Einfluss auf die Lokalisation von vermeintlich später rekrutierten mRNP Proteinen hat. Dazu wurde die Lokalisation von Y14 in *thoc5* mutanten Keimbahnklonen untersucht. In *thoc5*^{32.17} Keimbahnklonen lokalisiert Y14 nicht am posterioren Pol der Oocyte. Y14 Protein lokalisiert zwar immer noch in den Nährzellkernen, zeigt aber nicht mehr sein charakteristisches punktförmiges Muster an der Peripherie der Kerne (Abb. 26: A, B).

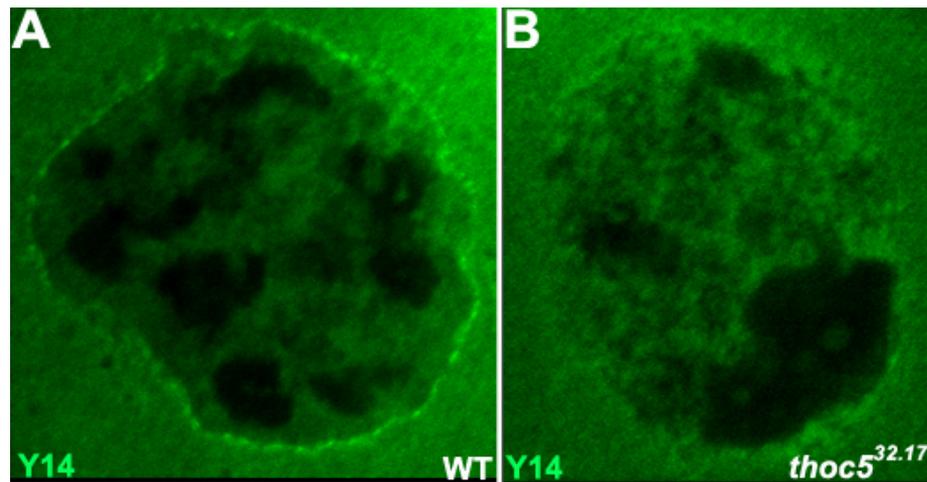


Abb. 26: Lokalisation von Y14 in Nährzellkernen von *thoc5* Keimbahnklonen.

Konfokalmikroskopische Aufnahmen von Nährzellkernen. Y14 wurde mittels anti-Y14 (grün) Antikörper sichtbar gemacht. (A) Im WT lokalisiert Y14 im Kernplasma und speziell an der Kernhülle des Nährzellkerns. (B) In *thoc5* Keimbahnklonen ist Y14 wie im WT im Kernplasma eines Nährzellkerns zu detektieren, aber keine Lokalisation von Y14 an der Kernhülle.

Btz ist ein weiteres Protein der *osk* mRNA Transport-Maschinerie, das aber vermutlich erst im Cytoplasma der Nährzellen zum mRNP-Komplex rekrutiert wird (van Eden *et al.*, 2001; Palacios *et al.*, 2004). Btz akkumuliert an der Peripherie der Nährzellkerne (Abb. 27: A) und co-lokalisiert ebenfalls transient im Stadium 9 mit der *osk* mRNA am posterioren Pol. In *thoc5* mutanten Keimbahnklonen ist nur noch eine geringfügige Lokalisation von Btz an der Kernhülle der Nährzellkerne im Vergleich zum WT zu beobachten (Abb. 27). Eine Lokalisation von Btz am posterioren Pol ist nicht zu erkennen.

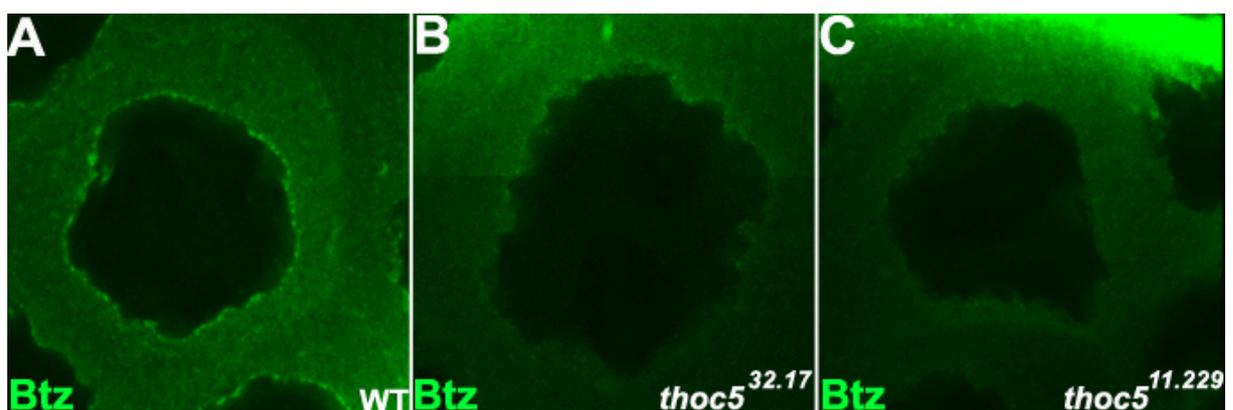


Abb. 27: Reduzierte Lokalisation von Btz an der Kernhülle der Nährzellkerne in *thoc5* Keimbahnklonen.

Konfokalmikroskopische Aufnahmen von Nährzellkernen. Btz wurde mittels anti-Btz (grün) Antikörper sichtbar gemacht. (A) Im WT lokalisiert Btz an der Kernhülle eines Nährzellkerns und im Cytoplasma. (B, C) Btz lokalisiert im Cytoplasma, zeigt aber eine stark reduzierte Lokalisation an der Kernhülle der Nährzellkerne in Keimbahnklonen von *thoc5*^{32.17} und *thoc5*^{11.229}.

Thoc5 beeinflusst demnach die Lokalisation von mindestens vier Komponenten der *osk* mRNA Transport-Maschinerie, nämlich Y14, Btz und GFP-Stau sowie der *osk* mRNA selbst. Vermutlich ist Thoc5 an der Bildung des korrekt gepackten *osk* mRNP beteiligt.

3.4.6 Keine Beteiligung von *thoc5* am Spleißen von *osk* mRNA und *grk* mRNA

Das humane *thoc5* Homolog *fSAP-74* (functional spliceosome-associated protein-74) wurde bei der proteomischen Analyse des humanen Spleißosoms entdeckt (Zhou *et al.*, 2002). Die humanen Homologe von Mago und Y14 sind Komponenten des Exon-Exon-Junction-Komplexes (EJC), der an gespleißte RNA bindet (Kataoku *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2001; Le Hir *et al.*, 2001). Zudem konnte gezeigt werden, dass die Lokalisation der *osk* mRNA vom korrekten Spleißen des ersten Introns abhängt (Hachet und Ephrussi, 2004). Daher wurde untersucht, ob die Misslokalisierung von *osk* in *thoc5* Mutanten durch einen Defekt im Spleißen der mRNA entsteht.

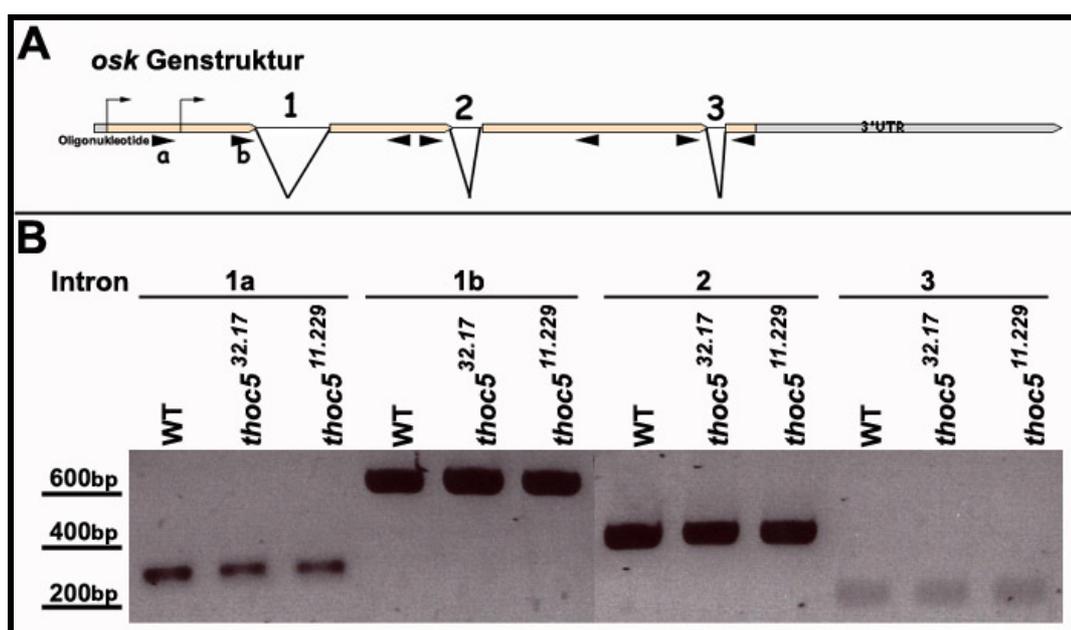


Abb. 28: Keine Beeinflussung des Spleißens von *osk* mRNA in *thoc5* Keimbahnklonen.

(A) Die schematische Darstellung der *osk* Genstruktur zeigt die Lage der drei Introns und der Oligonucleotidpaare für die RT-PCR Analyse. (B) Die RT-PCR Analyse der *osk* mRNA in wildtypischen und mutanten Ovarien weist keinen Unterschied im Spleiß-Verhalten auf.

Das *osk* Transkript verfügt über zwei, sich im Leseraster befindenden Startkodons und kodiert für zwei Osk Proteine, die sich in der Länge des ersten Exons unterscheiden. Das *osk* Transkript weist drei Introns auf. Oligonucleotidpaare von beiden Seiten der drei Introns wurden generiert und das Spleiß-Muster der *osk* mRNA mittels RT-PCR überprüft (Abb. 28). Für jedes Oligonucleotidpaar wurde im WT und in *thoc5* Mutanten eine einzelne PCR-Bande

von derselben Größe detektiert (Abb. 28). Folglich wird *thoc5* nicht für das Spleißen von *osk* mRNA benötigt.

Die *grk* mRNA enthält verschiedene Lokalisationssignale, die für ihren korrekten Transport und ihre Lokalisation notwendig sind (Thio *et al.*, 2000; Van de Bor *et al.*, 2005). Daher wurde untersucht, ob sich der DV-Phänotyp von *thoc5* und die verminderte Menge an *grk* mRNA dadurch erklären lassen, dass *grk* nicht korrekt gespleißt wurde. Auch hier wurde mittels RT-PCR an poly(A) RNA aus Ovarienextrakten von wildtypischen und *thoc5* Keimbahnklonen das Spleiß-Muster von *grk* überprüft (Abb. 29). Das Spleiß-Muster zeigt in *thoc5* Keimbahnklonen keinen Unterschied zum WT. Folglich beeinflusst *thoc5* auch nicht das Spleißen der *grk* mRNA.

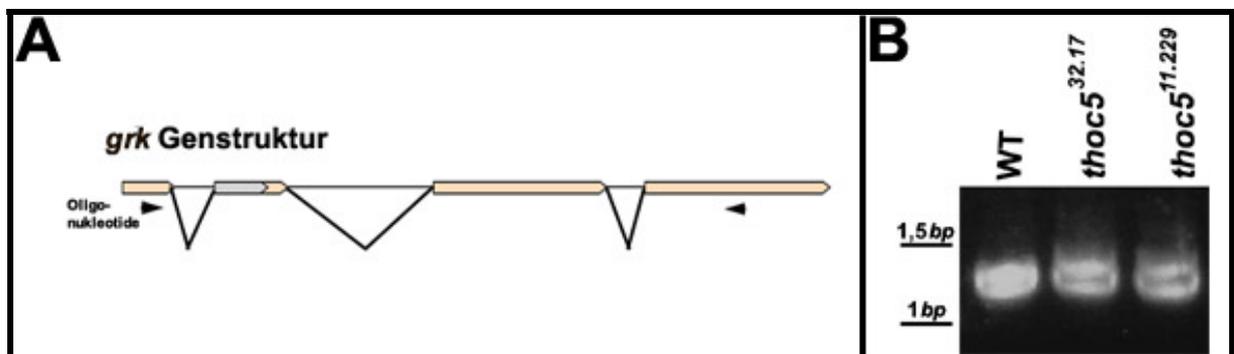


Abb. 29: Korrektes Spleißen der *grk* mRNA in *thoc5* Keimbahnklonen.

(A) Die schematische Darstellung der *grk* Genstruktur zeigt die Lage der 3 Introns und des Oligonucleotidpaares für die RT-PCR Analyse. (B) In wildtypischen und mutanten Ovarien weist die RT-PCR Analyse der *grk* mRNA keinen Unterschied im Spleiß-Verhalten auf.

3.5 Phänotypische Analyse der letalen Komplementationsgruppe 7.460/7.134

Im folgenden Abschnitt wird die phänotypische Analyse und Kartierung der letalen Komplementationsgruppe 7.460/7.134 aus dem GFP-Stau Screens beschrieben. Die Komplementationsgruppe 7.460/7.134 besteht aus den beiden Allelen 7.460 und 7.134. Beide Linien sind sowohl homozygot als auch trans-heterozygot nicht lebensfähig.

3.5.1 Störung der AP Oocytenpolarität

Um Störungen der AP Achsenbildung zu detektieren, wurde zunächst die Lokalisation des transgenen GFP-Stau Fusionsproteins in 7.460 und 7.134 Keimbahnklonen eruiert. Im WT lokalisiert das voll funktionsfähige GFP-Stau ab Stadium 9 spezifisch am posterioren Pol und

bleibt dort während der gesamten Oogenese (Schuldt *et al.*, 1998). In den Nährzellen ist das GFP-Stau im gesamten Cytoplasma verteilt, ein signifikanter Anteil des GFP-Stau akkumuliert dort in kleinen Partikeln (Abb. 30: A, B). Dagegen ist in 7.460 und in 7.134 Oocyten das GFP-Stau in der gesamten Oocyte gleichmäßig verteilt (Abb. 30: C, D). Zudem ist das GFP-Stau in Form von diffus verteilten Partikeln in der gesamten Oocyte nachweisbar. Die Partikelbildung ist im WT nur in den Nährzellen zu beobachten. In den Mutanten scheint die Anzahl der Partikel in den Nährzellen jedoch reduziert. In Keimbahnklonen für 7.460 weisen 78% der Oocyten (n=110) eine GFP-Stau Misslokalisierung auf. Die Frequenz des GFP-Stau-Phänotyps für das Allel 7.134 hingegen variiert stark. So wurden sowohl 0% (n=20) als auch 50% (n=29) wildtypische GFP-Stau Lokalisation detektiert.

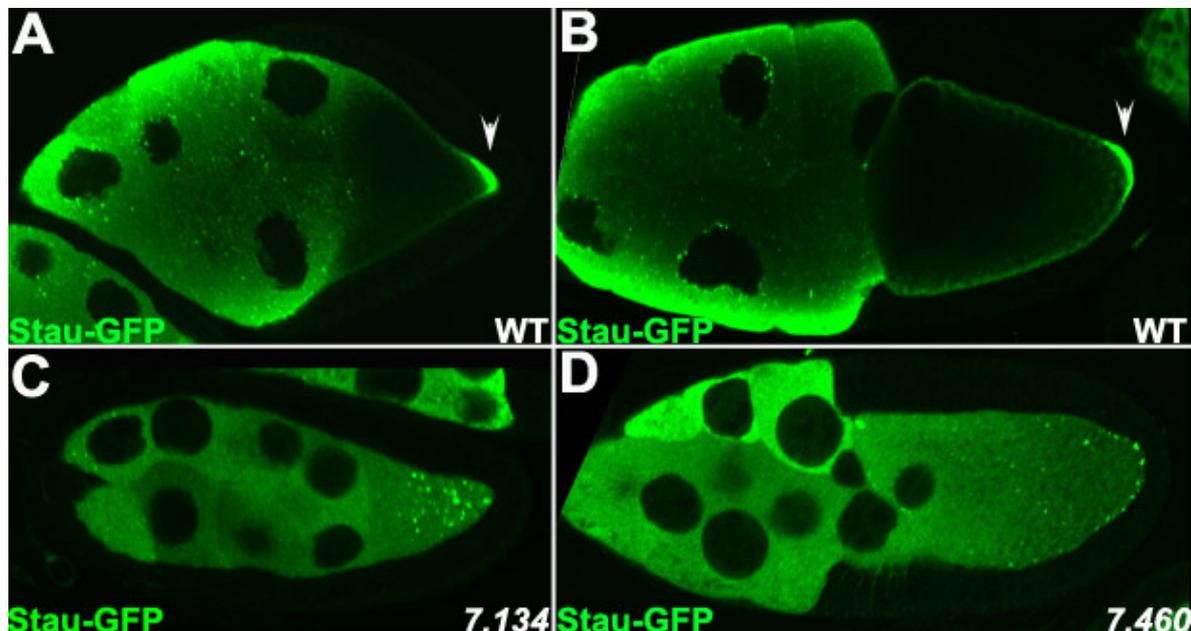


Abb. 30: Misslokalisierung von GFP-Stau in Keimbahnklonen von 7.460 und 7.134.

Konfokalmikroskopische Aufnahme von Eikammern im Stadium 9 (A, C) und 10 (B, D). GFP-Stau wurde mittels anti-GFP (grün) sichtbar gemacht. (A, B) In wildtypischen Eikammern lokalisiert GFP-Stau am posterioren Pol der Oocyte (Pfeile). Im Nährzellcytoplasma bildet das GFP-Stau Partikel. (C, D) In Keimbahnklonen von 7.460 und 7.134 ist GFP-Stau diffus in der Oocyte verteilt, wobei eine Aggregation zu Partikeln zu beobachten ist. Dagegen ist die GFP-Stau Partikelbildung in den Nährzellen reduziert.

Das Stau Protein wird für die Lokalisation und Translation der *osk* mRNA benötigt (Ephrussi *et al.*, 1991; Kim-Ha *et al.*, 1991; St Johnston *et al.*, 1991; Rongo *et al.*, 1995; Micklem *et al.*, 2000). Sowohl Stau als auch GFP-Stau co-lokalisieren im WT mit der *osk* mRNA während der gesamten Oogenese und spezifisch am posterioren Pol ab Stadium 9. In 7.460 und 7.134 Keimbahnklonen lässt sich ein ähnlicher Phänotyp - wie zuvor für GFP-Stau - nachweisen. Anstatt der wildtypischen posterioren Lokalisation (Abb. 31: A, B, E, F) verteilt sich die *osk* mRNA in den 7.460 und 7.134 Keimbahnklonen in Form von Partikeln in der

gesamten Oocyte (Abb. 31: C, D, G, H). Einige dieser *osk*-Partikel sind auch am posterioren Kortex nachweisbar. Die Partikel werden sowohl mit fluoreszenter als auch mit nicht fluoreszenter *in situ*-Hybridisierung detektiert (vgl. Abb. 31). In geringen Mengen befinden sich die *osk*-Partikel auch in den Nährzellen. Dieser *osk*-Phänotyp ist zu 78,5% in Keimbahnklonen des Allels 7.460 (n=139) zu beobachten. Dieses Ergebnis korreliert mit denen zuvor detektierten GFP-Stau Misslokalisationen (78%). Die Keimbahnklone des Allels 7.134 (n=52) zeigen zu 100% den mutanten *osk*-Phänotyp. Dagegen variieren die GFP-Stau Misslokalisationen zwischen 50% und 100%.

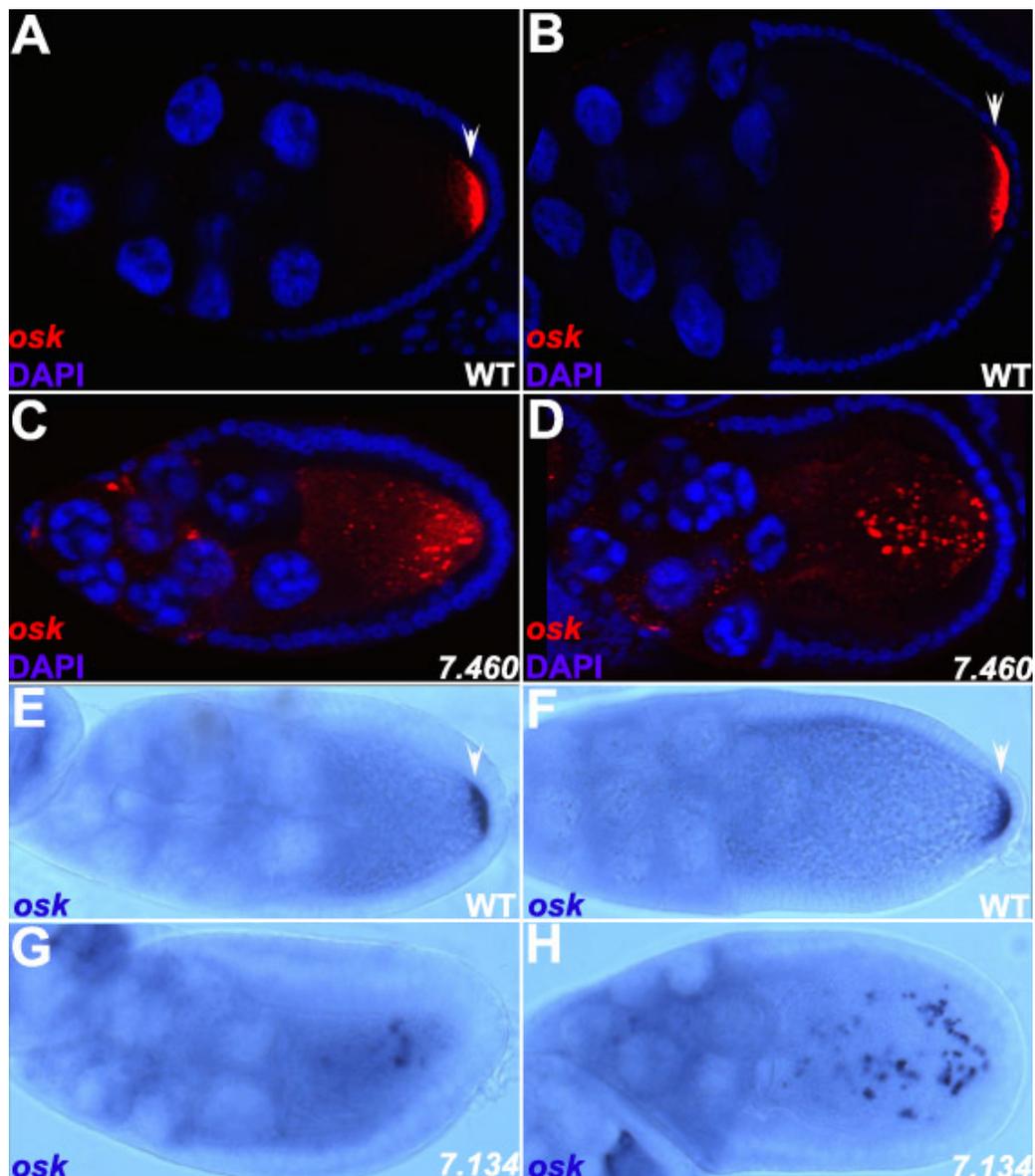


Abb. 31: Misslokalisierung der *osk* mRNA in Keimbahnklonen von 7.460 und 7.134.

(A-D) Konfokalmikroskopische Aufnahmen von *osk* mRNA (rot) *in situ* Hybridisierungen in Eikammern im Stadium 9 (A, C) und Stadium 10 (B, D). DNA wurde mit DAPI (blau) visualisiert. (E-H) Lichtmikroskopische Aufnahmen von *osk* mRNA (blau) *in situ* Hybridisierungen in Eikammern im Stadium 9 (E, G) und 10 (F, H). (A, B, E, F) Im WT lokalisiert die *osk* mRNA am posterioren Pol (Pfeile) der Oocyte. Dagegen bildet die *osk* mRNA in Keimbahnklonen von 7.460 (C, D) und von 7.134 (G, H) Partikel, die überall in der Oocyte verteilt sind.

Da die posteriore Lokalisation von *osk* mRNA und GFP-Stau von Mikrotubuli abhängt, wurde das Mikrotubuli-Cytoskelett mittels Antikörperfärbung gegen tyrosiniertes Tubulin in den beiden Allelen untersucht. In beiden Keimbahnklonen konnte kein Unterschied zum WT detektiert werden (Abb. 32). Es bildete sich ein anterior-posteriorer Gradient von Mikrotubuli. Die Misslokalisierung der *osk* mRNA und des GFP-Stau wird demnach durch einen Prozess verursacht, der nach der Polarisation des Mikrotubuli-Cytoskeletts erfolgt. Dabei könnte es sich um Defekte beim Transport oder der Verankerung der *osk* mRNA und des GFP-Stau handeln.

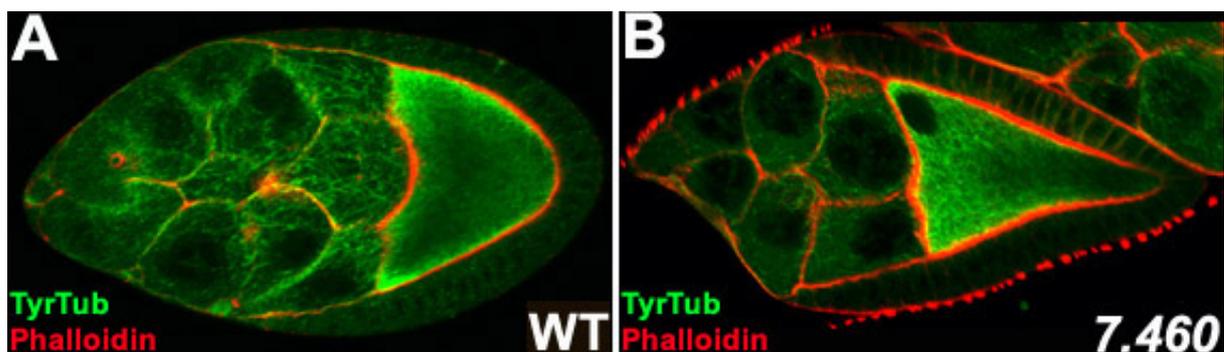


Abb. 32: Die Polarität des Mikrotubuli-Cytoskeletts im WT und in Keimbahnklonen von 32.17. Konfokalmikroskopische Aufnahmen von Eikammern im Stadium 9. Mikrotubuli wurden mit anti-TyrTub (grün) Antikörper und F-Aktin mit Phalloidin (rot) sichtbar gemacht. Das Mikrotubuli-Cytoskelett in wildtypischen Eikammern (A) unterscheidet sich nicht im Vergleich zu Eikammern aus Keimbahnklonen für 7.460 (B).

Für die Ausbildung der AP Achse ist es essentiell, dass das *Osk* Protein am posterioren Pol der Oocyte lokalisiert wird. Dies wird sowohl durch die Lokalisation der *osk* mRNA am posterioren Pol als auch durch die Repression der *osk* mRNA Translation innerhalb der Oocyte garantiert (Wilhelm und Smibert, 2005). Daher wurde untersucht, ob die Mutation einen Einfluss auf die Translation der *osk* mRNA hat. Für das Gen *osk* sind zwei *Osk* Protein-Isoformen bekannt. In Western Blots konnte keines der beiden *Osk* Isoformen in Ovarienextrakten von Keimbahnklonen der Allele 7.460 und 7.134 detektiert werden (Abb. 33). Dagegen ist das *Osk* Protein durch Antikörperfärbung in einigen 7.134 und 7.460 Oocyten in den Stadien 9 und 10 in geringen Mengen nachweisbar (Abb. 34: D, G). Hierbei ist das *Osk* Protein immer am posterioren Pol der Oocyte lokalisiert. Die Translationskontrolle wird folglich durch die Mutation nicht beeinträchtigt. Co-Färbungen mit GFP-Stau zeigen zudem, dass das *Osk* Protein mit den GFP-Stau Partikeln assoziiert ist, die sich in unmittelbarer Nähe oder direkt am posterioren Kortex befinden, aber nie mit den Partikeln, die sich innerhalb der Oocyte befinden. Dies weist auf eine Rolle der Mutation sowohl beim Transport als auch bei der Verankerung der *osk* mRNA hin.

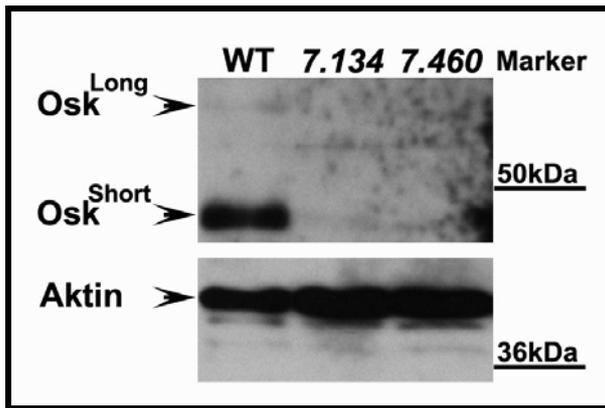


Abb. 33: Repression von Osk Protein in Keimbahnklonen von 7.460 und 7.134.

Western Blot gegen Osk und Aktin an Ovarienextrakten von wildtypischen Fliegen und 7.134 bzw. 7.460 Keimbahnklonen. In den Ovarienextrakten der mutanten Keimbahnklone (Bahn 2, 3) lassen sich beide Osk Isoformen im Vergleich zum WT (Bahn 1) nicht nachweisen.

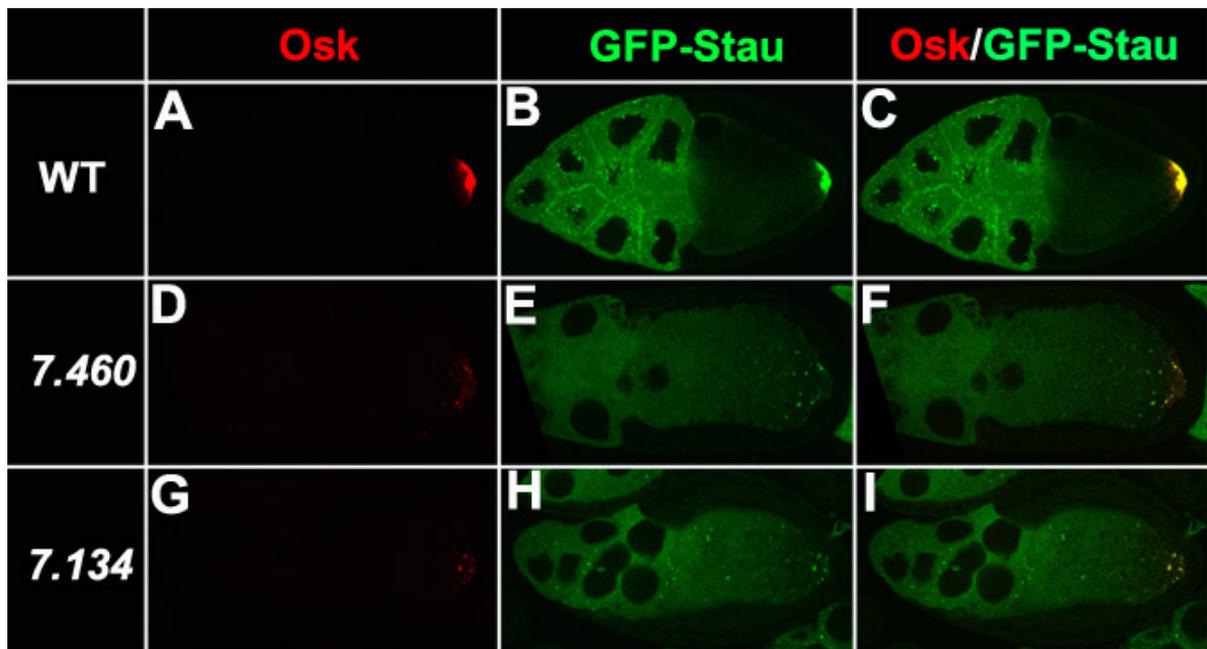


Abb. 34: Keine ektopische Translation von *osk* mRNA in 7.460 und 7.134 Keimbahnklonen.

Konfokalmikroskopische Aufnahmen von Eikammern. Osk wurde mit anti-Osk (rot) Antikörper und GFP-Stau mit anti-GFP (grün) Antikörper sichtbar gemacht. (A-C) In wildtypischen Eikammern im Stadium 10 wird das Osk Protein am posterioren Pol detektiert, wo es mit GFP-Stau co-lokalisiert. (D-I) In Keimbahnklonen von 7.460 und 7.134 ist Osk Protein in geringen - nicht wildtypischen - Mengen am posterioren Pol nachzuweisen. Osk Protein co-lokalisiert mit denen sich am posterioren Pol der Oocyte befindenden GFP-Stau-Partikeln, aber nicht mit den ektopisch in der Oocyte verteilten Partikeln.

Ferner wurde untersucht, wie sich die Mutation auf die Lokalisation der anterioren Determinante *bcd* mRNA auswirkt. Die *bcd* mRNA akkumuliert ab Stadium 5-6 in der Oocyte. Ab Stadium 8 bildet die *bcd* mRNA zunächst einen Ring an der anterioren Grenze der Oocyte, bevor sie am gesamten Kortex des anterioren Pols lokalisiert (St Johnston *et al.*, 1989). In den untersuchten Keimbahnklonen der Allele 7.460 und 7.134 wird die *bcd* mRNA - wie im WT - am anterioren Pol positioniert (Abb. 35).

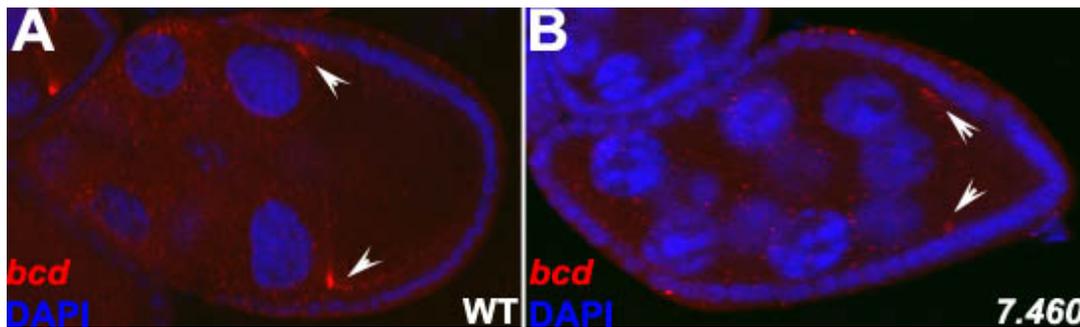


Abb. 35: Wildtypische Lokalisation der *bcd* mRNA in Keimbahnklonen von 7.460

Konfokalmikroskopische Aufnahmen von *bcd* mRNA (rot) *in situ* Hybridisierungen. DNA wurde mit DAPI (blau) visualisiert. (A) Wildtypische Eikammer im Stadium 9, (B) Eikammer von 7.460 Keimbahnklonen im Stadium 9. Es ist kein Unterschied in der *bcd* (Pfeile) Lokalisation zwischen WT und Keimbahnklonen von 7.460 detektierbar.

3.5.2 Störung der DV Oocytenpolarität

Durch die Polarisierung der Oocyte kommt es auch zu Musterbildungsprozessen im Follikelepithel, die sich in der Morphologie der Eihülle widerspiegeln. Aus der Morphologie der Eihülle kann daher auf Defekte in der Polarität der Oocyte geschlossen werden. Weibchen mit mutanter 7.460 und 7.134 Keimbahn legen deutlich weniger Eier als wildtypische Fliegen.

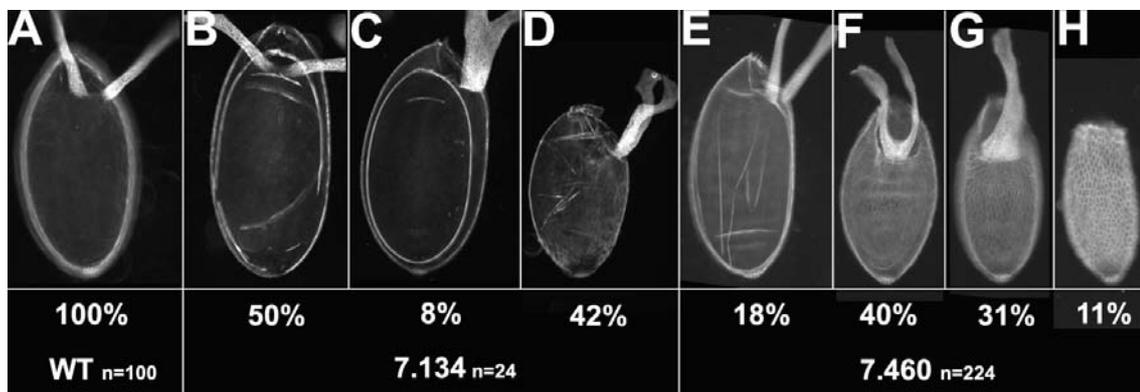


Abb. 36: Ei-Phänotypen von 7.460 und 7.134 Keimbahnklonen.

Mikroskopische Dunkelfeld-Aufnahmen von Eiern in dorsaler Ansicht, anterior ist oben. (A) WT Ei. (B-D) Die Gelege von Müttern mit Keimbahnklonen des Allels 7.134 zeigen wildtypische Eiformen (B), Eier mit fusionierten, dicken dorsalen Anhängen (C) und kleinere Eier mit fusionierten, verbreiterten dorsalen Anhängen (D). (E-G) Weibliche Fliegen mit Keimbahnklonen des Allels 7.460 legen wildtypisch aussehende Eier (E), kleinere Eier mit an der Basis fusionierten dorsalen Anhängen (F) oder komplett fusionierten dorsalen Anhängen, aber auch „cup-shaped“ Eier (H).

Dies ist vor allem für 7.134 der Fall. Für beide Allele sind wildtypisch aussehende Eier mit je zwei dorsalen Anhängen zu detektieren (Abb. 36: A, B, E). In keinem der abgelegten Eier ist jedoch die Entwicklung eines Embryos zu erkennen. Die Eier werden nicht befruchtet. Die meisten abgelegten Eier sind deutlich kleiner als beim WT und weisen Anomalien der

dorsalen Anhängen auf (Abb. 36). Anstelle von zwei filamentösen dorsalen Anhängen wie im WT sind die dorsalen Anhänge der aus Keimbahnklonen entstandenen Eier entweder an der Basis fusioniert oder bilden einen dicken dorsalen Anhang (Abb. 36: C, D, F, G). Für das Allel 7.460 sind zudem „cup-shaped“ Eier zu detektieren (Abb. 36: H). Die genaue prozentuale Verteilung der Ei-Phänotypen ist in Abb. 36 dargestellt.

Die Anomalien der dorsalen Anhänge deuten auf Störungen der DV Achsenbildung in der Oocyte hin. Für beide Prozesse stellt die präzise Lokalisation und Expression der *grk* mRNA bzw. des Grk Proteins den entscheidenden Schritt dar. Die *grk* mRNA ist ab Stadium 1 in der Oocyte nachweisbar. Im Stadium 8 akkumuliert die *grk* mRNA transient am anterioren Pol, bevor sie dann am anterior-dorsalen Kortex der Oocyte positioniert wird (Abb. 37: A) (Neumann-Silberberg und Schüpbach, 1993). In Keimbahnklonen der Allele 7.460 und 7.134 konnte keine Misslokalisierung der *grk* mRNA oder des Grk Proteins in den Stadien 8-10 detektiert werden (Abb. 37).

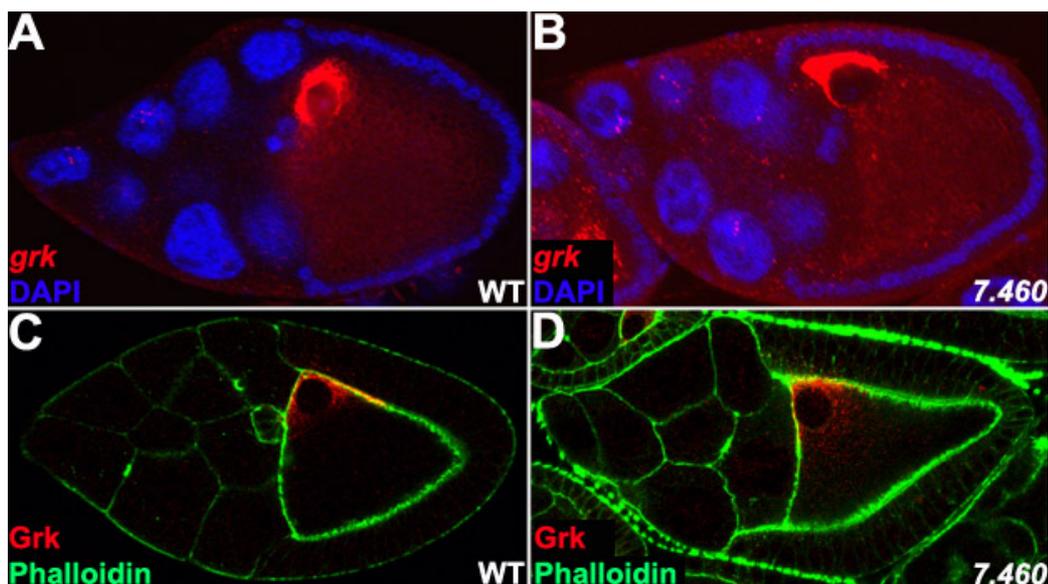


Abb. 37: Lokalisation und Expression von *grk* mRNA und Grk Protein in Keimbahnklonen von 7.460.

(A, B) Konfokalmikroskopische Aufnahmen von *grk* (rot) *in situ* Hybridisierungen einer WT Eikammer (A) und einer Eikammer von 7.460 Keimbahnklonen (B) im Stadium 10. In WT Oocyten und 7.460 Oocyten lokalisiert die *grk* mRNA am anterior-dorsalem Kortex. (C, D) Konfokalmikroskopische Aufnahmen von einer wildtypischen Eikammer (C) und einer Eikammer von 7.460 Keimbahnklonen (D) im Stadium 10. Grk wurde mittels anti-1D12 (rot) Antikörper und F-Aktin mit Phalloidin (grün) sichtbar gemacht. Kein Unterschied in der Grk Expression ist zu beobachten.

Die Wanderung des Oocytenkerns im Stadium 7 vom posterioren zum anterioren Pol legt die dorsale Seite der Oocyte fest (Spradling, 1993; Gonzalez-Reyes *et al.*, 1995; Roth *et al.*, 1995). Im primären GFP-Stau-Screen wurde für das Allel 7.460 eine Misslokalisierung des Oocytenkerns detektiert. Daher wurde die Lokalisation des Oocytenkerns in 7.460 und 7.134

Keimbahnklonen untersucht. Der Oocytenkern und der Oocytenkortex wurden durch Antikörperfärbungen gegen nucleäres Lamin und Phalloidin in den mutanten Eikammern sichtbar gemacht. In den Stadien 7-10A ist keine Misslokalisierung des Oocytenkerns in 7.134 und 7.460 Oocyten festzustellen. Der Oocytenkern wandert immer vom posterioren Pol der Oocyte zum anterioren Pol. Während der Oocytenkern in den 7.134 Oocyten am anterior-dorsalen Kortex der Oocyte verbleibt, zeigt sich für das Allel 7.460 in einigen Oocyten eine Misslokalisierung des Oocytenkerns in den späten Stadien 10B und 11. Hierbei hat sich der Oocytenkern vom anterioren Kortex gelöst und fällt in die Oocyte zurück (Abb. 38: B). Eine genaue Analyse der Misslokalisierung wird erschwert, da es im späten Stadium 10B zur Bildung der impermeablen Vitellinmembran kommt, die die Detektion des Oocytenkerns meist verhindert.

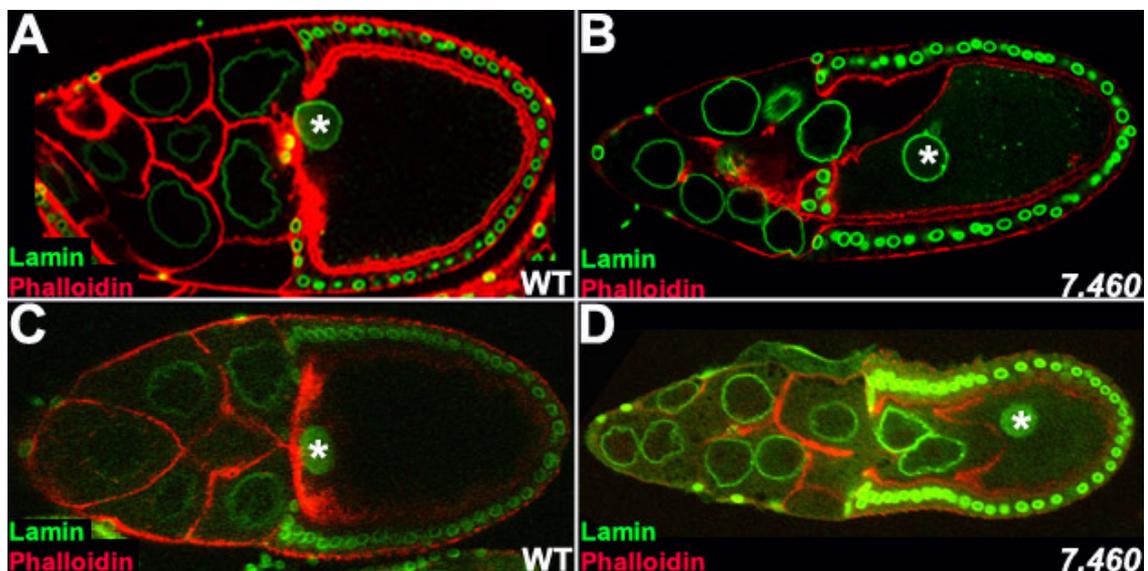


Abb. 38: Misslokalisierung des Oocytenkerns in 7.460 Keimbahnklonen.

Konfokalmikroskopische Aufnahmen von Eikammern im Stadium 10B. F-Aktin wurde mit Phalloidin (rot) und die Kernmembranen mit anti-Lamin (grün) Antikörper sichtbar gemacht. (A, C) In WT Eikammern ist der Oocytenkern (*) am anterioren Kortex der Oocyte lokalisiert und definiert dort die dorsale Seite. (B) Eikammer von mutantern 7.460 Keimbahnklon, in dem der Oocytenkern (*) nicht am anterioren Kortex lokalisiert. (D) Invagination der Nährzellen in die Oocyte in 7.460 Keimbahnklonen.

Ferner lassen sich für beide Allele späte Phänotypen ab Stadium 10B detektieren, die auf eine späte Funktion der Mutation beim Prozess des Nährzell-Dumpings hinweisen. Beim Nährzell-Dumping kommt es ab Stadium 10B zum raschen Entleeren des Nährzell-Cytoplasmas in die Oocyte und zur Degeneration der Nährzellkerne (Spradling, 1993; Guild *et al.*, 1997; Robinson *et al.*, 1997). In 7.134 und 7.460 Keimbahnklonen sind die Plasmamembranen der einzelnen Nährzellen teilweise aufgebrochen und trennen die Nährzellen nicht mehr korrekt voneinander (Abb. 38: B). Ferner zeigt sich für beide Allele häufig eine starke Invagination der Nährzellen in die Oocyte (Abb. 38: D). Diese Phänotypen korrelieren mit den für beide Allele detektierten kleineren Eiern (vgl. Abb. 36).

3.6 Kartierung von 7.460/7.134

Um das mutante Gen der letalen Komplementationsgruppe der Allele 7.460 und 7.134 auf dem Chromosom 2R zu kartieren, wurde zunächst die Mutation zwischen zwei sichtbaren Markern eingegrenzt, wie in Kapitel 3.3 beschrieben. Bei der Komplementationsanalyse der verschiedenen Intervalle wurden dann keine transheterozygoten Fliegen detektiert, wenn die Chromosomen zwischen den Markern FRT und c rekombiniert hatten. Die Mutation wurde folglich zwischen den Markern FRT und c auf ca. 9,5 Mb eingegrenzt.

Für die weitere molekulare Kartierung wurden insgesamt 100 Stämme mit rekombinanten Chromosomen etabliert und der Komplementationsanalyse unterzogen. Von 100 rekombinanten Chromosomen mit dem Genotyp FRTcpxsp tragen 89 die Mutation, 11 rekombinante Chromosomen hingegen nicht. Die DNA von diesen Stämmen wurde präpariert und mit Hilfe der in 3.1 beschriebenen Sequenz-Polymorphismen genotypisiert. Eine Zusammenfassung der Genotypisierung ist in Abb. 39 gezeigt.

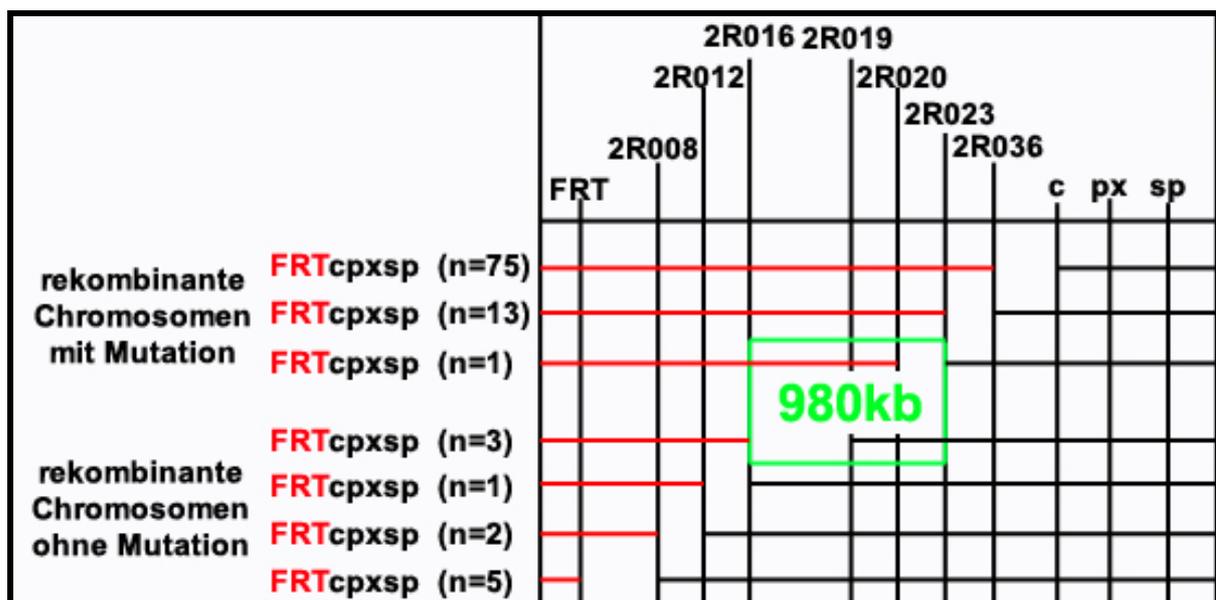


Abb. 39: Molekulare Kartierung von 7.460/7.134.

Schematische Darstellung der mittels molekularer Marker untersuchten rekombinanten Chromosomen zur Kartierung der Komplementationsgruppe 7.460/7.134. Die Teile der rekombinanten Chromosomen, die vom FRT42B Chromosom abstammen, sind rot markiert, die des „cpxsp“ Markerchromosoms schwarz. Der grüne Kasten zeigt die kartierte Region der Mutation durch die Analyse der rekombinanten Chromosomen mit Mutation und ohne Mutation.

Zunächst wurde untersucht, wo sich die Mutation bezüglich der PLP 2R008 und 2R036 befindet. In vierzehn Chromosomen mit Mutation und in sechs Chromosomen ohne Mutation ist die Rekombination zwischen den Markern 2R008 und 2R036 erfolgt. Der Marker 2R008 der rekombinanten Chromosomen mit Mutation stimmt mit dem FRT42B Chromosom

überein, wohingegen der Marker 2R036 sich wie das „cpxsp“ Chromosom verhält. Die Mutation muss folglich proximal von 2R036 liegen. Die rekombinanten Chromosomen ohne Mutation verhalten sich bzgl. dieser Marker wie die rekombinanten Chromosomen mit Mutation. Folglich muss die Mutation distal vom PLP 2R008 lokalisiert sein. Darüberhinaus wurde das in diesem Intervall (2R008-2R036) liegende RFLP an den zwanzig verbleibenden informativen Stämmen getestet. Bei einem der Chromosomen mit Mutation und bei den sechs Chromosomen ohne Mutation erfolgte die Rekombination proximal von 2R023. Der Marker verhält sich in beiden Fällen wie das „cpxsp“ Chromosom. Die Mutation befindet sich demnach zwischen den Markern 2R008 und 2R023. Diese sieben rekombinanten Chromosomen wurden dann mit den in diesem Intervall vorhandenen vier SNP 2R012, 2R016, 2R019, 2R020 charakterisiert. Dies ermöglichte eine Eingrenzung der Mutation auf ca. 980 kb zwischen den Markern 2R016 und 2R023. In dieser Region lagen noch ca. 150 vermutete Gene.

uba 46A	dap 46B	adam 46C	ter94 46D	jra 46E4	14-3-3z 46E6	pfk 46E8	hr46 46F5	syb 46F9	47A1	Defizienz	Komplementationsanalyse
.....	—————	—————	—————	—————	—————	—————	—————	—————	—————	6862	+
.....	—————	—————	—————	—————	—————	—————	—————	—————	—————	6863	+
.....	—————	—————	—————	—————	—————	—————	—————	—————	—————	6864	+
—————	—————	—————	—————	—————	—————	—————	—————	—————	1743	+
—————	—————	—————	—————	—————	—————	—————	—————	1545	+
—————	—————	—————	—————	—————	—————	—————	—————	—————	1719	+
—————	1702	-
—————	—————	—————	—————	—————	—————	—————	5425	+
—————	—————	—————	—————	—————	—————	—————	596	+

Abb. 40: Kartierung von 7.460/7.134 mittels Defizienzen.

Schematische Darstellung der cytogenetischen genomischen Region verschiedener Defizienzen und die Ergebnisse der Komplementationskreuzung der Defizienzen gegen 7.460 und 7.134. Die gestrichelten Linien markieren die Bereiche des Genoms, die von den Defizienzen deletiert werden, die durchgezogenen Linien die Bereiche des Genoms, die nicht deletiert sind. Die freien Flächen zwischen den Linien sind uncharakterisierte Bereiche des Genoms. Für die Komplementationsanalyse bedeutet +, es gab transheterozygote Nachkommen; - bedeutet, es gab keine transheterozygoten Nachkommen.

Als zusätzlicher Nachweis, dass die Mutation zwischen den Markern 2R016 und 2R023 liegt, wurden die beiden Allele gegen Defizienzen gekreuzt, die diesen Bereich deletieren (Abb. 40). Bei der Komplementationsanalyse war nur die Defizienz 1702 positiv (Abb. 40, linke Spalte). Die Bruchpunkte der Defizienzen wurden von uns mittels Komplementationsanalyse letaler Gene aus dieser Region charakterisiert. Die Mutation ließ sich so bereits auf nur ca. 210 kb und nur 31 Gene einschränken. Dies entspricht ca. 1/5 der bis dahin durch molekulare Marker erzielten kartierten Region. Die mittels Defizienzen kartierte Region liegt

zwischen den Markern 2R020 und 2R023. Für diese Region stand zur molekularen Kartierung nur noch ein rekombinantes Chromosom zur Verfügung. Zudem erwies sich die Region als nicht sehr polymorph. Dies bedeutet, dass für die Marker 2R021 und 2R022 keine Polymorphismen zwischen den beiden Chromosomen FRT42B und „cpxsp“ gefunden wurden.

Aus diesem Grund wurde beschlossen, die Lokalisation der Mutation durch neu generierte Defizienzen zu ermitteln. Dafür wurde die von Parks *et al.* (2004) generierte Exelixis Deletion Serie verwendet. In dieser Arbeit wurden Stämme erzeugt, die je eine FRT-Stellen an präzise charakterisierten Stellen überall im Genom haben. Durch die FLP/FRT Technik wird die effiziente trans-Rekombination zwischen zwei FRT-Stellen ermöglicht und erlaubt so die Herstellung genau definierter molekularer Deletionen im Genom. Für die Kartierung der Komplementationsgruppe 7.460/7.134 wurden sieben überlappende Defizienzen erzeugt. Die generierten Defizienzen und ihre Bruchpunkte sind in Abb. 41: A dargestellt. Diese Defizienzen wurden dann mit den beiden Linien der Allelen 7.460 und 7.134 zur Komplementationsanalyse gepaart. Die Kreuzungen mit den Defizienzen EX1891-3029, EX3191-4167 und EX3191-2270 ergaben keine transheterozygoten Fliegen (vgl. Abb. 41). Folglich sollte die Mutation in dem überlappenden Bereich der Defizienzen EX3191-439 und EX1891-3029 liegen. Diese Region ist ca. 20 kb groß und enthält fünf Gene (Abb. 41: B).

Das Gen mRpL42 (mitochondrial ribosomal protein L42) konnte als möglicher Kandidat für die Mutation durch Komplementationsanalyse des letalen Stammes mRpL42 mit den beiden Allelen ausgeschlossen werden. In der identifizierten Region befinden sich noch vier Gene, für die es keine bekannten mutanten Allele oder Phänotypen während der Oogenese gibt. Das Gen CG2292 kodiert für ein Protein mit Hydrolyseaktivität, das vermutlich eine Rolle beim Nucleotid-Metabolismus spielt. Bei Cdc2rk handelt es sich laut flybase um eine Serin-Threonin-Kinase, deren Funktion bei der Mitose und Regulation des Zellzyklus vermutet wird. Über die molekulare Funktion der Gene CG12920 und CG1371 ist bisher nichts bekannt. Das Gen *eiger* (*egr*), dessen kodierende Region durch die Deletion zwar nicht betroffen ist, wurde auch in Erwägung gezogen, da die cis-regulatorische Region des Gens betroffen sein könnte. Für das Gen *egr* sind zwei Nullallele bekannt, bei denen das Startkodon deletiert ist. Im Gegensatz zu den Allelen 7.134 und 7.460 sind diese beiden *egr* Nullallele homozygot lebensfähig. Dies macht es unwahrscheinlich, dass es sich bei *egr* um das gesuchte mutante Gen handelt.

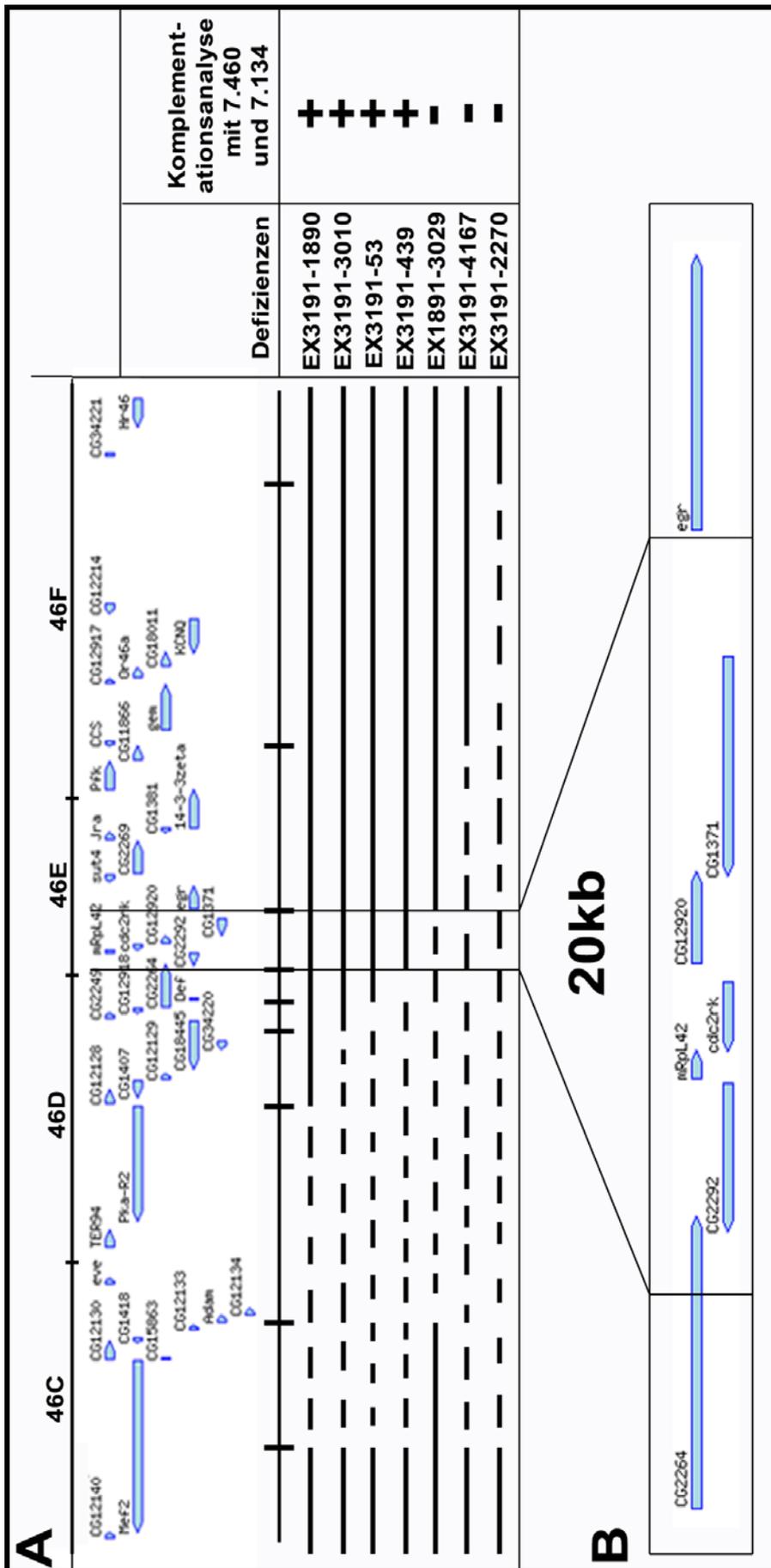


Abb. 41: Eingrenzung der Mutation von 7.460/7.134 durch molekular definierte Defizienzen.

(A) Schematische Darstellung der cytogenetischen Region der für die Kartierung von 7.460/7.134 generierten Defizienzen und die Ergebnisse der Komplementationsanalyse der Defizienten-Stämme mit den Allelen 7.460 und 7.134. Die gestrichelten Linien markieren die Bereiche des Genoms, die von den Defizienzen deletiert werden; die durchgezogenen Linien die Bereiche des Genoms, die nicht deletiert sind. + bedeutet, es gab transheterozygote Nachkommen, - bedeutet, es gab keine transheterozygote Nachkommen. (B) Darstellung der kartierten cytogenetischen Region der möglichen Gene für 7.460/7.134. (modifiziert nach fybase).

Um zu identifizieren, bei welchem der Gene es sich um das gesuchte mutante Gen handelt, wurde zunächst die kodierende Region der fünf Gene für beide mutanten Allele sequenziert. Als dies kein Ergebnis gab, wurde die gesamte genomische Region analysiert. Diese Sequenzanalyse ergab für 7.134 einen Basenpaaraustausch von Cytosin zu Thymin an Position 5963714 bp (nach flybase R5.4) in dem nicht kodierenden Bereich zwischen den Genen *CG1371* und *egr*, 649 bp vom Startkodon des *CG1371* und 2245 bp vom Startkodon des *egr* entfernt. Da *egr* - wie oben beschrieben - ausgeschlossen wurde, könnte es sich bei *CG1371* um das gesuchte Gen handeln. Der Basenaustausch könnte in der cis-regulatorischen Region des Gens liegen.

Für die einwandfreie Identifizierung des mutanten Gens sind jedoch weitere Untersuchungen erforderlich. Vor allem sollten Rettungskonstrukte für die Gene der Region generiert werden.

4. Diskussion

4.1 Molekulare Genkartierung für Chromosom 2R

Für die Kartierung von EMS mutierten Genen aus Screens steht für *Drosophila* eine Reihe von Techniken zur Verfügung. Zu den traditionellen Standard-Techniken gehören hier das Kartieren einer Mutation zwischen zwei sichtbaren Markern mittels meiotischer Rekombination sowie das Kartieren mittels Defizienzen. Da die genetischen Marker jedoch weit auseinander liegen und die Defizienzen nicht das ganze Genom abdecken und auch sehr groß sind, d. h. oft hunderte von Genen umfassen, ist damit nur eine grobe Lokalisation des mutierten Gens zu erreichen. Zudem sind die exakten Positionen der sichtbaren genetischen Marker und die Bruchstellen der deletierten Bereiche oft nur aus cytologischen und genetischen Daten bekannt, was eine Verknüpfung der genetischen mit der molekularen Karte erschwert.

Durch die Entschlüsselung des *Drosophila* Genoms konnten sich in den letzten Jahren direktere Methoden entwickeln, die diese Probleme umgehen. Hierbei hat sich die Kartierung mittels molekularer Marker bewährt (Berger *et al.*, 2001; Hoskins *et al.*, 2001; Martin *et al.*, 2001). Voraussetzung für effizientes Kartieren ist eine genügend hohe Dichte an Polymorphismen zwischen zwei Chromosomen. Je weiter zwei Chromosomen genetisch voneinander entfernt sind, desto mehr Polymorphismen sollten auftreten.

In der hier vorliegenden Arbeit wurde eine molekulare Kartierungskarte für den zweiten Arm des rechten Chromosoms für die beiden Chromosomen FRT42B und „cpxsp“ etabliert. Mit dieser Kartierungskarte gelang es, das mutierte Gen *thoc5* der Komplementationsgruppe 32.17/11.229 auf eine Region von ca. 26 kb einzugrenzen, die nur elf Gene enthielt.

Zwischen den hier verwendeten Chromosomen FRT42B und „cpxsp“ wurden bisher 192 Polymorphismen identifiziert, die in 43 verwendbaren Marker Loci zur Kartierung resultieren. Von den Polymorphismen sind 82% SNP. In 70% führt der Polymorphismus zur Einführung oder zum Wegfall einer Restriktionsschnittstelle, also einem putativen RFLP. Im Durchschnitt konnten hier sechs Polymorphismen pro kb gefunden werden. Diese Zahl erscheint relativ hoch. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Mehrzahl der hier nach Polymorphismen untersuchten genomischen Loci bereits als polymorph zwischen zwei anderen Chromosomen von Berger *et al.* (2001) beschrieben wurde. Dennoch korrelieren

unsere Ergebnisse mit den Frequenzen von Polymorphismen aus anderen Arbeiten, wo die durchschnittliche Frequenz bei 2,1-6,5 Polymorphismen pro kb liegt (Berger *et al.*, 2001; Hoskins *et al.*, 2001; Martin *et al.*, 2001). Hierbei wurden verschiedene WT-, FRT- und Marker-Chromosomen analysiert, so dass mittlerweile eine große Kollektion von Polymorphismen für verschiedene Chromosomen existiert, die mit jedem neu kartierten Gen wächst.

Die Dichte der Sequenz-Polymorphismen ist jedoch nicht gleichmäßig über die Chromosomenarme verteilt. Besonders in der Nähe der Centromere, aber auch der Telomere, nimmt die Frequenz der Polymorphismen ab, was mit der Rekombinationsrate korreliert (Begun und Aquadro, 1992; Berger *et al.*, 2001). Im Euchromatin von *Drosophila* befindet sich im Durchschnitt alle 9 kb ein Gen. Es sollte daher möglich sein, mit der hier etablierten Methode genügend Polymorphismen zwischen den beiden Chromosomen FRT42B und „cpxsp“ zu identifizieren, um eine Mutation bis auf die Region von einem Gen zu lokalisieren.

Die Kartierung mittels molekulare Marker wird auch erfolgreich in anderen Organismen wie *Arabidopsis*, *C. elegans* und Mensch verwendet, denen - wie bei *Drosophila* - spezifische visuelle Marker und Defizienzen fehlen (Cho *et al.*, 1999; Sachidanandam *et al.*, 2001; Wicks *et al.*, 2001). Mittlerweile gibt es verschiedene Datenbanken, in denen SNP verschiedener Organismen abgerufen werden können (www.fruitfly.org/SNP; www.flysnp.imp.ac.at; www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP; http://genome.wustl.edu/genome/celegans/celegans_snp.cgi; <http://www.arabidopsis.org/browse/Cereon/help.jsp>).

Der Vorteil der in der hier vorliegenden Arbeit verwendeten Kartierungsstrategie liegt in der Kombination aus klassischen und molekularen Markern. Das vorherige Eingrenzen der Mutation zwischen zwei sichtbaren Markern reduziert sowohl die Anzahl von benötigten rekombinanten Chromosomen als auch die Anzahl der molekularen Marker, mit denen die rekombinanten Chromosomen genotypisiert werden. Allerdings kann die Eingrenzung einer Mutation zwischen zwei sichtbaren Markern dann nicht erfolgen, wenn die Mutation distal zu dem letzten sichtbaren Marker - hier sp - liegt. In diesem Fall ist es jedoch möglich nach rekombinanten Chromosomen zwischen sp und einem sehr distalen molekularen Marker zu suchen.

Die hier etablierte Methode kann nicht nur zur Kartierung von mutanten Genen einer Komplementationsgruppe verwendet werden, sondern auch für mutante Gene, für die nur ein Allel auftritt. Da die mutanten Chromosomen aus EMS Screens stark mutagenisiert sind,

besteht immer das Risiko, dass es sich um einen synthetischen Phänotyp handelt, also aus der Interaktion verschiedener Mutationen entsteht, oder dass die Letalität und der Phänotyp nicht auf dasselbe Gen zurückzuführen sind. Zur Kartierung eines einzelnen Allels werden - wie hier für eine Komplementationsgruppe beschrieben - zunächst rekombinante Chromosomen zwischen dem FRT42B Chromosom und dem „cpxsp“ Chromosom hergestellt. Dann werden Weibchen mit Keimbahnklonen generiert und die Ovarien dieser Weibchen auf ihren GFP-Stau-Phänotyp hin analysiert. Von den gleichen Weibchen wird die DNA mittels molekularer Marker genotypisiert.

Im Verlaufe meiner Arbeit wurden unabhängig von verschiedenen Gruppen isogene Fliegenstämme generiert, die präzise kartierte, über das ganze Genom verteilte Transposon-Insertionen aufweisen (Parks *et al.* 2004; Ryder *et al.*, 2004; Thibault *et al.*, 2004). Durch seiten-spezifische Rekombination mittels Flipase von den FRT-Stellen in den Transposons können Deletionen im Genom erzeugt werden, die molekular genau definiert sind. Diese sog. Exelixis und DrosDel Kollektionen von Fliegenstämmen machen auch das Kartieren mittels Defizienzen wieder attraktiver. Der Bloomington Defizienzen-Grundstock für das Chromosom 2R besteht aus 52 Linien, die 93% des Chromosom 2R abdecken (<http://flystocks.bio.indiana.edu/Browse/df-dp/dfkit-info.htm>). Hierdurch kann eine Grobkartierung der Mutation erfolgen, die dann durch die Generierung von kleineren Defizienzen mittels der Exelixis und DrosDel Kollektionen verfeinert werden kann. Theoretisch ist es möglich mit den Exelixis und DrosDel Kollektionen mehr als 500 000 präzise Deletionen zu generieren (Ryder *et al.*, 2007).

In der hier vorliegenden Arbeit konnte die Mutation der Komplementationsgruppe 7.460/7.134 durch die Verwendung von Bloomington Defizienzen auf eine Region von 210 kb eingegrenzt werden und durch die Generierung von sieben Exelixis Defizienzen in eine Region von 20 kb mit nur fünf Genen lokalisiert werden.

4.2 Regulation der AP und DV Oocytenpolarität durch *thoc5*

4.2.1 Identifizierung und Charakterisierung von *thoc5*

Mit der zuvor charakterisierten Kartierungsmethode konnte hier *thoc5* als neuer Faktor für die Bildung der AP und DV Polarität in der Oocyte von *Drosophila* identifiziert werden. In den beiden sich nicht komplementierenden Linien 32.17 und 11.229 aus dem GFP-Stau-Screen ist jeweils das Gen *thoc5* mutiert. In beiden Allelen kommt es zu Punktmutationen in der

kodierenden Region für *thoc5*, speziell zur Einführung eines Stopkodons. Die Stopkodons liegen im dritten Exon für 32.17 und im fünften Exon für 11.229 des insgesamt sechs Exons umfassenden *thoc5*, so dass es sich bei den beiden Allelen vermutlich nicht um Nullallele handelt. Der eindeutige Beweis, dass es sich bei *thoc5* um das gesuchte Gen handelt, konnte durch Rettungsexperimente erbracht werden. Durch die Expression eines *thoc5*-Rettungskonstruktes wird die Letalität von 32.17 und 11.229 transheterozygoten Embryonen aufgehoben, und die resultierenden Adulten sind fertil.

Bei Thoc5 handelt es sich um ein nucleäres Protein, wie Analysen von HA-Thoc5 und GFP-Thoc5 Konstrukten in der Keimbahn ergaben. Das Thoc5 Protein befindet sich in allen Zellkernen der Keimbahn, wo es im gesamten Kernplasma verteilt ist, jedoch nicht in den Nucleoli. Thoc5 bildet in den Zellkernen der Nährzellen zudem Aggregate, die sich in unmittelbarer Nähe der Nucleoli befinden. Mittels Datenbank-Analyse konnte auf Proteinebene eine „coiled-coil“-Domäne für Thoc5 im zweiten Exon identifiziert werden, die für mögliche Interaktionen mit anderen Proteinen dienen könnte (<http://www.ensembl.org/index.html>). Allerdings enthält Thoc5 kein eindeutiges NLS-Signal, wie man es bei einem nucleären Protein erwarten würde. Thoc5 weist aber eine hohe Anzahl von basischen Aminosäuren auf, die für NLS-Signale charakteristisch sind.

In höheren Eukaryoten bildet Thoc5 mit vier weiteren Komponenten, d. h. mit Tho2, Hpr1, Thoc6 und Thoc7, den konservierten THO-Komplex. In *S. pombe* gibt es einen THO-Komplex mit entsprechenden homologen Proteinen. Der THO-Komplex von *S. cerevisiae* enthält dagegen keine homologen Proteine für Thoc5, Thoc6 und Thoc7. Funktionale Analoge von Thoc5-7 könnten aber die Proteine Mft1p und Thp2p sein, die gemeinsam mit Hpr1p und Tho2p den THO-Komplex in *S. cerevisiae* bilden. In der hier vorliegenden Arbeit konnte für Tho2 und Hpr1 eine Co-Lokalisation mit GFP- und HA-Thoc5 in den Zellkernen der Keimbahn nachgewiesen werden. In Einklang mit diesen Ergebnissen ist auch die Analyse mit dem Programm Smart, welches ebenfalls eine direkte Interaktion von Thoc5 mit Tho2 und Thoc7 voraussagt (<http://smart.embl-heidelberg.de/>). Daher sollte Thoc5 auch in der Oogenese von *Drosophila* im THO-Komplex vorliegen.

4.2.2 Thoc5 im THO-Komplex als Komponente der *osk* mRNA

In *S. cerevisiae* bindet der THO-Komplex bereits während der Transkription an naszierende mRNA und kontrolliert die Rekrutierung weiterer Proteine zum entstehenden mRNP. In HeLa Zellen dagegen interagiert der humane THO-Komplex ausschließlich mit gespleißter mRNA und nicht mit ungespleißter pre-mRNA (Masuda *et al.*, 2005). Denkbar ist daher, dass Thoc5

bzw. der THO-Komplex in *Drosophila* nicht während der Transkription, sondern erst zur gespleißten mRNA rekrutiert wird. In diesem Zusammenhang ist bemerkenswert, dass die humanen Homologe des THO-Komplexes, darunter auch das Thoc5 Homolog fSAP-79, bei der proteomischen Analyse des humanen Spleißosoms entdeckt wurden (Zhou *et al.*, 2002). Zudem ist bekannt, dass der humane THO-Komplex *in vivo* zusammen mit dem Spleiß-Faktor Sc35 in nucleären Speckles co-lokalisiert (Masuda *et al.*, 2005).

Eine Aggregatbildung von Thoc5, Tho2 und Hpr1 in den Nährzellkernen ist auch in der hier vorliegenden Arbeit beobachtet worden. Diese befinden sich zudem in unmittelbarer Nähe zu den Nucleoli, dem Entstehungsort der Ribosomen. Ferner konnte eine direkte Interaktion mittels Co-Immunopräzipitation von Thoc5 mit Mago, einer Komponente des EJC, gezeigt werden. Zusätzlich zur Co-Immunopräzipitation ließ sich eine teilweise Co-Lokalisation von Mago und Tho2 in den Kernen der Keimbahn beobachten. Darüberhinaus kann eine Thoc5 Co-Lokalisation mit dem Protein Y14, das mit Mago Heterodimere bildet, in bestimmten Bereichen im Kernplasma detektiert werden. Das legt den Schluss nahe, dass neben Mago auch Y14 als Interaktionspartner für Thoc5 fungieren kann. Vermutlich ist der THO-Komplex mit den Komponenten Y14 und Mago des EJC des Spleiß-Apparats assoziiert.

Da Mago und Y14 in dem Stadium 9 gemeinsam mit der *osk* mRNA transient am posterioren Pol der Oocyte co-lokalisieren und gleichzeitig bekannt ist, dass der EJC gespleißte mRNA bindet, wird postuliert, dass Mago und Y14 während der Oogenese von *Drosophila* Teil der *osk* mRNP sind (Micklem *et al.*, 1997; Newmark *et al.*, 1997; Hachet und Ephrussi, 2001; Kataoka *et al.*, 2001; Le Hir *et al.*, 2001; Mohr *et al.*, 2001; van Eden *et al.*, 2001). Die von uns beschriebenen Daten für Thoc5 bzw. den THO-Komplex legen nahe, dass auch der THO-Komplex Teil der *osk* mRNP ist. Im Gegensatz zu Mago und Y14 ist aber Thoc5 genauso wie Hpr1 und Tho2 zu keinem Zeitpunkt mit unseren Nachweismethoden am posterioren Pol der Oocyte zudetektieren. Dies lässt vermuten, dass der nucleäre THO-Komplex nur transient in den Nährzellkernen Teil der *osk* mRNP ist. Im Gegensatz zu den THO-Komponenten bilden Mago und Y14 keine Aggregate im Kernplasma, sondern erst an der Kernhülle - wahrscheinlich an den Kernporen - der Nährzellen von *Drosophila*. Dies könnte darauf hinweisen, dass die Assoziation des THO-Komplexes mit dem *osk* mRNP vor der Assoziation von Mago und Y14 erfolgt.

4.2.3 Einfluss von Thoc5 auf den *osk* mRNP Transport

In den frühen Stadien der Oogenese transportiert der BicD-Egl-Dynein-Komplex die in den Nährzellen exprimierten mRNA, darunter auch die *osk* mRNA, und Proteine aus den

Nährzellen in die Oocyte (Bullock und Ish-Horowicz, 2001). Der Transport erfolgt zu dem in der Oocyte gelegenen MTOC entlang den Mikrotubuli, deren Plus-Enden in die Nährzellen reichen (Theurkauf *et al.*, 1992). In den späteren Stadien der Oogenese - nach der Repolarisierung des Mikrotubuli-Cytoskeletts im Stadium 7 - wird die *osk* mRNA ab Stadium 9 spezifisch am posterioren Pol der Oocyte lokalisiert (Ephrussi *et al.*, 1991; Kim-Ha *et al.*, 1991).

Der Transport der *osk* mRNA von ihrem Synthesort in den Nährzellen zu ihrem Bestimmungsort am posterioren Pol ist ein komplexer Prozess, wobei verschiedene *in trans* agierende Proteine und Transportprozesse involviert sind. Zunächst muss die *osk* mRNA in den Nährzellkernen zu *osk* mRNP verpackt und dann durch die Kernporen ins Cytoplasma der Nährzellen befördert werden. Im Cytoplasma der Nährzellen wird dann vermutlich der BicD-Egl-Dynein-Komplex rekrutiert, der die *osk* mRNP entlang den Mikrotubuli durch die Ringkanäle der Nährzellen in die Oocyte transportiert (Clark *et al.*, 2007). In der Oocyte erfolgt dann der Transport der *osk* mRNP direkt oder indirekt mittels des plus-end gerichteten Motorproteins Kinesin I zum posterioren Pol der Oocyte.

In den letzten Jahren wurde eine Reihe von Genen identifiziert, in deren Mutanten der Transport der *osk* mRNA zum posterioren Pol im Stadium 9 gestört ist und von denen angenommen wird, dass sie Komponenten der *osk* mRNP bzw. Komponenten der *osk* mRNA Transportmaschinerie sind. Zu diesen Proteinen gehören unter anderem die Proteine Hrp48, Mago, Y14, Btz und Stau, die mit der *osk* mRNA im Stadium 9 am posterioren Pol colokalisieren (St Johnston *et al.*, 1991; Micklem *et al.*, 1997; Newmark *et al.*, 1997; Hachet und Ephrussi, 2001; Mohr *et al.*, 2001; van Eden *et al.*, 2001; Huynh *et al.*, 2004; Yano *et al.*, 2004).

Die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit lassen darauf schließen, dass auch Thoc5 am Transport der *osk* mRNP beteiligt ist. Hierfür spricht, dass in *thoc5* mutanten Oocyten der Transport der *osk* mRNP im Stadium 9 perturbiert wird. Die *osk* mRNA wird ab dem Stadium 9 in 92% bzw. 100% nicht - wie im WT - am posterioren Pol der Oocyte lokalisiert, sondern ist diffus in der Oocyte verteilt und nur teilweise am posterioren Pol zu detektieren. Das Protein GFP-Stau, dessen Assoziation mit der *osk* mRNA im WT während der gesamten Oogenese beobachtet werden kann (Schuldt *et al.*, 1998), ist in *thoc5* Mutanten ebenfalls in 90% bzw. 98% der untersuchten Oocyten misslokalisiert.

Die *osk* mRNA und GFP-Stau Misslokalisationsphänotypen von *thoc5* mutanten Oocyten zeigen starke Parallelen zu den Phänotypen, wie sie in Keimbahnklonen für *hrp48* Missense-

Mutationen beschrieben wurden. So sind in *hrp48* mutanten Oocyten *osk* mRNA und GFP-Stau - wie bei *thoc5* Mutanten - diffus in der Oocyte lokalisiert (Huynh *et al.*, 2004). Hrp48 gehört zur Familie der hnRNPA/B Proteine. Es bindet direkt an die *osk* mRNA und reguliert offensichtlich den Transport der *osk* mRNA zum posterioren Pol. Hrp48 ist bereits im Germarium sowohl in den Zellkernen als auch in der Oocyte nachzuweisen und lokalisiert ab Stadium 9 gemeinsam mit der *osk* mRNA am posterioren Pol der Oocyte (Huynh *et al.*, 2004; Yano *et al.*, 2004). Auf Grund der ähnlichen Phänotypen kann geschlossen werden, dass *thoc5* wie *hrp48* eine Rolle beim Transport der *osk* mRNP ausübt. Ferner ist in *thoc5* Mutanten die charakteristische transiente Co-Lokalisation der *osk* mRNP Komponenten Y14 und Btz mit der *osk* mRNA am posterior Pol im Stadium 9 nicht zu erkennen.

Im Gegensatz zu Hrp48, Mago, Y14, Btz und Stau sind Thoc5 - genauso wie Hpr1 und Tho2 - zu keinem Zeitpunkt mit unseren Nachweismethoden am posterioren Pol der Oocyte zu detektieren. Dies deutet darauf hin, dass der THO-Komplex nicht während des gesamten aktiven Transportprozesses mit dem *osk* mRNP assoziiert ist. Die Funktion von *thoc5* bei der Lokalisation der *osk* mRNA könnte schon früh erfolgen. Da Thoc5, Tho2 und Hpr1 hauptsächlich nucleär zu identifizieren sind, gehen wir davon aus, dass die Nährzellkerne auch der Wirkungsort des THO-Komplexes ist. Hinweise auf die Funktion des THO-Komplexes kommen aus *S. cerevisiae* und S2 Schneiderzellen. Ausschaltung eines der Gene des THO-Komplexes in *S. cerevisiae* und S2 Schneiderzellen führt zu multiplen Effekten, u. a. zur Akkumulierung von bestimmten mRNA im Zellkern. Ferner wird eine direkte Interaktion des THO-Komplexes mit Export-Faktoren aus dem Zellkern beobachtet. So kontrolliert Hpr1 in *S. cerevisiae* die effiziente Rekrutierung von Exportfaktoren, wie Yra1p (REF1) und Sub2p (UAP56), an entstehende mRNP. Die Interaktion des THO-Komplexes mit Exportfaktoren ist auch in HeLa Zellen zu finden. Daher wird für den THO-Komplex postuliert, dass er für die korrekte Bildung von mRNP sowie deren Export aus den Zellkernen verantwortlich ist (Jensen *et al.*, 2003; Stutz *et al.*, 2003; Saguez *et al.*, 2005).

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass der THO-Komplex auch in der Oogenese von *Drosophila* an der Bildung korrekter und transportfähiger *osk* mRNP in den Nährzellkernen beteiligt ist. In *thoc5* Mutanten lassen sich zusätzlich zu den Defekten im Transport der *osk* mRNP auch Anomalien der *osk* mRNP Komponenten Y14, Btz und GFP-Stau beobachten. So sind die für Y14 und Btz typischen Partikel an den Kernhüllen der Nährzellen sowie die GFP-Stau Partikel im Cytoplasma der Nährzellen in *thoc5* Mutanten stark reduziert.

4.2.4 Funktion von Thoc5 bei der Ausbildung der AP Oocytenpolarität

Die AP Oocytenpolarität wird durch die Polarisierung des Mikrotubuli-Cytoskeletts im Stadium 7 und der dadurch erfolgenden spezifischen Lokalisation der *osk* mRNA am posterioren Pol und der *bcd* mRNA am anterioren Pol der Oocyte etabliert (van Eden und St Johnston, 1999; Riechmann und Ephrussi, 2001; Steinhauer und Kalderon, 2006). Mikrotubuli Färbungen zeigen, dass die hier untersuchten *thoc5* Allele nicht die Polarisierung des Mikrotubuli-Cytoskeletts kontrollieren, sondern speziell eine Funktion beim Transport der posterioren Determinante *osk* mRNA ab dem Stadium 9 ausüben. Thoc5 ist vermutlich für die korrekte Assemblierung der *osk* mRNA in den Nährzellkernen verantwortlich, jedoch nicht für die spätere Lokalisation der *osk* mRNA zum posterioren Pol. In *thoc5* Mutanten kommt es zur Misslokalisierung der *osk* mRNA im Cytoplasma der Oocyte, d. h., dass die defekte Assemblierung der *osk* mRNA in den Nährzellkernen Auswirkungen auf den späteren Transport der *osk* mRNA in der Oocyte hat. Dagegen scheinen der Transport der *osk* mRNA aus den Nährzellkernen ins Cytoplasma der Nährzellen sowie der Transport aus den Nährzellen in die Oocyte nicht betroffen.

Es gibt prinzipiell unterschiedliche Erklärungsmöglichkeiten, wie das sich ausschließlich in den Kernen befindende Thoc5 Protein den späteren cytoplasmatischen Transport der *osk* mRNA in der Oocyte kontrolliert. Erstens: Thoc5 könnte in den Nährzellkernen die Rekrutierung eines oder mehrerer Faktoren zum *osk* mRNA regulieren, die dann in der Oocyte für die Verknüpfung des *osk* mRNA an das Motorprotein Kinesin I zuständig sind. Für Kinesin I wird angenommen, dass es direkt oder indirekt die *osk* mRNA zum posterioren Pol im Cytoplasma der Oocyte in den Stadien 9 und 10 transportiert (Brendza *et al.*, 2000; Cha *et al.*, 2002; Duncan und Warrior, 2002; Palacios und St Johnston, 2002). Zweitens: Es ist aber auch denkbar, dass der in den Nährzellkernen rekrutierte Faktor die Bindung weiterer Faktoren zum *osk* mRNA in den Nährzellkernen, im Cytoplasma der Nährzellen oder im Cytoplasma der Oocyte reguliert, und diese Faktoren die Verknüpfung zum Motorprotein Kinesin I ermöglichen. Drittens: Auch die gegenteilige Annahme kann nicht ausgeschlossen werden, dass Thoc5 die Assoziation eines Faktors mit dem *osk* mRNA in den Nährzellkernen inhibiert, der die Verknüpfung mit dem Motorprotein Kinesin I verhindern würde.

Die erste Erklärungsmöglichkeit wird durch einige in dieser Arbeit erhobene Befunde und aus Literaturdaten unterstützt. So könnte ein möglicher Faktor das Heterodimer Mago/Y14 sein, welches die *osk* mRNA mit dem Motorprotein Kinesin I in der Oocyte verknüpft. Hierfür spricht, dass in *mago* und *y14* Mutanten die *osk* mRNA am anterioren Pol der Oocyte verbleibt, der Transport der *osk* mRNA also direkt oder indirekt durch Mago und Y14 in der

Oocyte gestört wird (Newmark und Boswell, 1994; Mohr *et al.*, 2001). Mago und Y14 sind zudem Komponenten der *osk* mRNP, die auf Grund ihrer Zugehörigkeit zum EJC vermutlich in den Nährzellkernen an die gespleißte *osk* mRNA binden (Newmark und Boswell, 1994; Hachet und Ephrussi, 2001; Mohr *et al.*, 2001). Dass Thoc5 für die Rekrutierung von Mago und Y14 zur *osk* mRNA in den Nährzellkernen verantwortlich ist, geht aus unseren Ergebnissen hervor, dass Thoc5 mit Mago co-immunopräzipitiert und Thoc5 und Tho2 mit Y14 und Mago in den Nährzellkernen co-lokalisiert (s. Abb. 24 u. 25). Wie unter 4.2.2 dargestellt, erfolgt die Assoziation von Thoc5 zur *osk* mRNA vermutlich vor derjenigen mit Mago und Y14. Ferner bilden sich die typischen Partikel von Y14 an der Kernmembran der Nährzellen in *thoc5* Mutanten nicht (s. Abb. 26). Dies deutet ebenfalls darauf hin, dass die Assoziation von Y14 zur *osk* mRNA durch Thoc5 kontrolliert wird. Unsere Befunde deuten demnach darauf hin, dass Thoc5 die Rekrutierung von Mago/Y14 zum entstehenden *osk* mRNP reguliert. Wenn es sich also bei Mago oder Y14 um die Komponente handelt, die die *osk* mRNP mit dem Motorprotein Kinesin I verknüpft, dann würde das Ausbleiben der Rekrutierung von Mago und Y14 in den *thoc5* Mutanten auch die Misslokalisierung der *osk* mRNA erklären.

Für die zweite Möglichkeit, dass durch die korrekte Assemblierung der *osk* mRNP durch Thoc5 in den Nährzellen die Rekrutierung weiterer Faktoren zum *osk* mRNP aber erst im Cytoplasma der Nährzellen ermöglicht wird, spricht der Misslokalisationsphänotyp von Btz in *thoc5* Mutanten (s. Abb. 27). Btz ist ein cytoplasmatisches Protein, das mit der *osk* mRNA im Stadium 9 am posterioren Pol der Oocyte lokalisiert (van Eden *et al.*, 2001). Auch in *btz* Mutanten verbleibt die *osk* mRNA am anterioren Pol der Oocyte und wird nicht zum posterioren Pol lokalisiert. Daher könnte Btz der entscheidende Faktor für die Verknüpfung der *osk* mRNP mit dem Motorprotein Kinesin I sein. Btz lokalisiert - wie auch Mago und Y14 - als Partikel an der Kernhülle der Nährzellen (van Eden *et al.*, 2001). In *thoc5* Mutanten sind die Btz Partikel an den Nährzellkernen stark reduziert (s. Abb. 27). Dies spricht für eine ineffiziente Rekrutierung von Btz zum *osk* mRNP in *thoc5* Mutanten. Für Btz wurde eine direkte Interaktion mit einer Komponente des EJC gezeigt (Palacios *et al.*, 2004). Daher wird angenommen, dass Btz beim Export der *osk* mRNP aus den Nährzellkernen über den EJC zum *osk* mRNP rekrutiert wird (Palacios *et al.*, 2004). Wie im Absatz zuvor beschrieben, könnte Thoc5 die zwei EJC Komponenten Mago und Y14 zum *osk* mRNP rekrutieren. Dies würde bedeuten, dass durch die ausbleibende Rekrutierung von Mago oder Y14 durch Thoc5 in den *thoc5* Mutanten auch Btz nicht am *osk* mRNP assoziiert. Wenn Btz dann der Faktor ist, der die *osk* mRNP mit dem Motorprotein Kinesin I verknüpft, erklärt dies wiederum die Misslokalisierung der *osk* mRNA in *thoc5* Mutanten.

Stau ist ein weiterer möglicher Faktor, der die *osk* mRNP mit dem Motorprotein Kinesin I verbindet. So verbleibt in *stau* Mutanten die *osk* mRNA - wie übrigens auch bei *mago*, *y14* und *btz* Mutanten - am anterioren Pol der Oocyte (Ephrussi *et al.*, 1991). Da Stau wie Btz erst im Cytoplasma der Nährzellen mit den *osk* mRNP assoziiert, ist es denkbar, dass Thoc5 auch für die Rekrutierung desjenigen Faktors zuständig ist, der die Bindung von Stau am *osk* mRNP im Cytoplasma der Nährzellen reguliert. Das Fernbleiben dieses Faktors würde dann auch die von uns beobachtete starke Reduktion von GFP-Stau Partikeln im Cytoplasma der Nährzellen in *thoc5* Mutanten erklären.

Ob die Bildung von *osk* mRNP in *thoc5* mutanten Keimbahnklonen vollständig unterbunden wird, ist fraglich. Da die Translationkontrolle der *osk* mRNA in den *thoc5* Mutanten - wie im WT - nicht gestört ist, sollte von einer zumindest teilweisen Assemblierung der *osk* mRNP ausgegangen werden (s. Abb. 9). Die Translationskontrolle der *osk* mRNA benötigt die Assoziation verschiedener Proteine mit der *osk* mRNA, die aber meist auf die Lokalisation der *osk* mRNA zum posterioren Pol keinen Einfluss haben (Kim-Ha *et al.*, 1995; Webster *et al.*, 1997; Gunkel *et al.*, 1998; Lie und Macdonald, 1999; Wilhelm und Smibert, 2005). Eine Ausnahme spielt hier das Protein Hrp48, das sowohl für den *osk* mRNP Transport - wie oben bereits erwähnt - als auch für die Repression der Translation der *osk* mRNA verantwortlich ist (Hyunh *et al.*, 2004; Yano *et al.*, 2004). Ferner ist der Transport der *osk* mRNP aus den Nährzellen in die Oocyte nicht beeinträchtigt. Dieser Transport wird durch den Dynein-BicD-Egl-Komplex reguliert (Bullock und Ish-Horowicz, 2001; Clark *et al.*, 2007). Die Bindung der *osk* mRNP an den Transportkomplex im Nährzellcytoplasma ist also möglich.

Thoc5 bzw. der THO-Komplex könnten demnach in der Oogenese direkt oder indirekt für die Rekrutierung nur der Proteine zum *osk* mRNP zuständig sein, die für die Verknüpfung der *osk* mRNP an die Transportmaschinerie im Cytoplasma der Oocyte in den Stadien 9-10 verantwortlich sind. Der gerichtete Transport der *osk* mRNA in den Stadien 9 und 10 ist entscheidend für die weitere Entwicklung, da nur die korrekt lokalisierte *osk* mRNA auch translatiert wird, und das Osk Protein als Anker für die *osk* mRNA und das Osk Protein benötigt wird (Rongo *et al.*, 1995). Erfolgt dieser Prozess nicht, kann auch die *osk* mRNA nicht mehr verankert werden, die ab Stadium 10B vermehrt durch den Prozess des Nährzell-Dumpings in die Oocyte gepumpt wird und durch das gleichzeitig in der Oocyte hervorgerufene „ooplasmic streaming“ am posterioren Pol vorbeiströmt. Die posteriore Lokalisation der *osk* mRNA ist für die Bildung des Polplasmas entscheidend und dieses ist wiederum Voraussetzung für die Bildung der Keimbahn und des Abdomens des Embryos (Ephrussi *et al.*, 1991; Kim-Ha *et al.*, 1991).

4.2.5 Rolle von Thoc5 bei der Ausbildung der DV Oocytenpolarität

Thoc5 hat nicht nur einen Einfluss auf die AP Oocytenpolarität, sondern auch auf die DV Oocytenpolarität. Dies manifestiert sich in den unterschiedlichen Ventralisierungsgraden der abgelegten Eier von Müttern mit mutanten *thoc5* Keimbahnklonen. Im Gegensatz zum WT Ei mit zwei dorsalen Anhängen bilden *thoc5* mutante Eier nur einen dorsalen Anhang, Reste von dorsalen Anhängen oder zum Teil gar keine dorsalen Anhänge. Die Initiation der dorsalen Anhänge erfolgt in den Stadien 9-10 der Oogenese durch die konzentrationsabhängige dorso-ventrale Aktivierung des EGF-Rezeptors in den Follikelzellen durch das aus der Oocyte sekretierte zweite Grk Signal (Roth, 2003). Unterschiedlich stark ventralisierte Ei-Phänotypen von verschiedenen *grk* und *egfr* Allelen verdeutlichen, dass sowohl die Konzentration als auch die Lokalisation des Grk Proteins von entscheidender Bedeutung bei der Aktivierung des EGF-Signaltransduktionsweges sind (Schüpbach, 1987; Neuman-Silberberg und Schüpbach, 1994; Roth und Schüpbach, 1994).

In der hier vorliegenden Arbeit konnte in *thoc5* mutanten Oocyten eine Reduktion der *grk* mRNA und des Grk Proteins am anterior-dorsalen Kortex der Oocyte in den Stadien 9 und 10 detektiert werden. Die von uns in *thoc5* beobachteten ventralisierten Ei-Phänotypen lassen sich folglich durch die verringerte Menge an Grk Protein - bedingt durch die reduzierte Menge an *grk* mRNA - erklären. Thoc5 scheint daher eine Rolle bei der Bildung der DV Oocytenpolarität auf der Ebene der Transkriptionkontrolle der *grk* mRNA oder in der Regulation des *grk* mRNA Transport zu spielen. Hinweise, dass *thoc5* an der Transkription von mRNA beteiligt ist, kommen aus *S. cerevisiae* und S2 Schneiderzellen. Beispielsweise interagieren die Komponenten des THO-Komplexes in *S. cerevisiae* mit der Transkriptionsmaschinerie und beim Verlust einer der THO-Komponenten kommt es zur Ausbildung verschiedener Phänotypen wie transkriptionsbedingte Hyperrekombination, Verhinderung der Elongation der Transkription sowie der Anreicherung von mRNA in den Zellkernen. In S2 Schneiderzellen konnte gezeigt werden, dass der THO-Komplex die Expression von ~20% des gesamten Transkriptom kontrolliert (Rehwinkel *et al.*, 2004). Für *S. cerevisiae* wird postuliert, dass durch die Abwesenheit des THO-Komplexes die mRNA während der Transkription mit der abgelesenen DNA hybridisiert. Diese Hybridisierung verhindert dann die erneute Transkription des Gens durch die RNA-Polymerase (Huertas und Aguilera, 2003). Ein weiteres Modell geht davon aus, dass die nicht korrekt verpackte mRNA degradiert wird (Libri *et al.*, 2002; Zenklusen *et al.*, 2002).

Die Mutationen aus der Klasse der *spindle*-Gene zeigen ähnlich ventralisierte Ei-Phänotypen wie *thoc5* Mutanten (Ghabrial *et al.*, 1998; Aravin *et al.*, 2001; Kennerdell *et al.*, 2002; Abdu *et al.*, 2003; Findley *et al.*, 2003; Staeva-Vieira *et al.*, 2003; Tomari *et al.*, 2004; Cook *et al.*,

2004). Die in dieser Gruppe zusammengefassten Gene weisen verschiedene AP und DV Anomalien während der Oogenese auf. Den *spindle*-Genen werden regulatorische Funktionen in unterschiedlichen biologischen Prozessen während der Oogenese zugeschrieben. Die Gene *spindle-A*, *-B*, *-D* und *okra* werden für die korrekte Ausführung der Meiose benötigt und kodieren für Proteine, die die Reparatur von dsDNA Brüchen kontrollieren (Ghabrial *et al.*, 1998; Abdu *et al.*, 2003; Staeva-Vieira *et al.*, 2003). Interessanterweise wird für Hpr1, das u. a. mit Thoc5 den THO-Komplex bildet, eine direkte Interaktion mit den Proteinen Rad-1, -9 und -17 postuliert, die bei der DNA Reparatur involviert sind (<http://smart.embl-heidelberg.de/>). Für die Gene *spindle-E* und *armitage* werden Funktionen beim RNAi Signalweg postuliert (Aravin *et al.*, 2001; Kennerdell *et al.*, 2002; Findley *et al.*, 2003; Cook *et al.*, 2004; Tomari *et al.*, 2004). Dies könnte bedeuten, dass Thoc5 bzw. der THO-Komplex zusätzlich zu seiner Funktion bei der Ausbildung der Oocytenpolarität schon in früheren Prozessen der Oogenese gebraucht wird. Dass der Phänotyp in *thoc5* Mutanten nicht stark ausgeprägt ist, könnte damit erklärt werden, dass es sich bei Thoc5 nicht um Nullallele handelt bzw. die anderen Komponenten des THO-Komplexes bei diesen Prozessen stärker involviert sind. Dies könnte durch Untersuchungen mit Thoc5 Nullmutanten oder Mutanten in einer der vier anderen Komponenten des THO-Komplexes geklärt werden.

Der ventralisierte Phänotyp in *thoc5* Mutanten könnte aber auch - wie schon für *osk* mRNA gezeigt - durch Defekte im Transport der *grk* mRNA hervorgerufen worden sein. Viele der für mRNA Transport zuständigen Proteine sind sowohl an der Lokalisation von *grk* als auch von *osk* mRNA beteiligt. Auch das oben erwähnte Gen *hrp48* ist sowohl Teil des *osk* mRNA und des *grk* mRNA Transportkomplexes in der Oocyte (Goodrich, *et al.*, 2004; Huynh *et al.*, 2004; Yano *et al.*, 2004; Delanoue *et al.*, 2007). Da die Ergebnisse dieser Arbeit andeuten, dass *hrp48* und *thoc5* gemeinsam am Transport der *osk* mRNA zum posterioren Pol der Oocyte in den Stadien 9-10 beteiligt sind, könnten sie auch eine gemeinsame Funktion beim *grk* mRNA Transport zum anterior-dorsalen Kortex haben. Im Gegensatz zu den ventralisierten Eiern in *thoc5* Mutanten führt die Mutation von *hrp48* zur Dorsalisierung der Eihüllen (Goodrich *et al.*, 2004). Die Dorsalisierung resultiert aus der Misslokalisierung der *grk* mRNA am anterioren Kortex, wodurch das Grk Protein ektopisch am gesamten anterioren Kortex translatiert wird. Die gegensätzlichen Phänotypen deuten auf unabhängige Funktionen der beiden Proteine *thoc5* und *hrp48* bei der DV Oocytenpolarität hin.

Der gerichtete Transport der *grk* mRNA aus den Nährzellen zum anterior-dorsalen Kortex in der Oocyte wird durch das Motorprotein Dynein reguliert (Duncan und Warrior, 2002; Januschke *et al.*, 2002; MacDougall *et al.*, 2003; Clark *et al.*, 2007). Neueste Studien über

den Transportweg der *grk* mRNA haben gezeigt, dass die *grk* mRNA die Dynein-assoziierten Co-Faktoren BicD und Egl in den Nährzellen rekrutiert und dass beide Proteine für den Transport der *grk* mRNA benötigt werden (Clark *et al.*, 2007). BicD und Egl sind schon früh bei der Determinierung der Oocyte beteiligt (Schüpbach und Wieschaus, 1991; Suter und Steward, 1991; Ran *et al.*, 1994; Huynh und St Johnston, 2000). Die ektopische Expression von BicD und Egl in *BicD* und *egl* Nullmutanten ermöglicht die Entwicklung einer Oocyte und den Einblick in spätere Funktionen der beiden Gene. Unter diesen Bedingungen werden ventralisierte Eier mit nur einem dorsalen Anhang bis zum Verlust der dorsalen Anhänge detektiert (Swan und Suter, 1996; Mach und Lehmann, 1997). Für *egl* konnte gezeigt werden, dass die Ventralisierung auf die Reduktion der *grk* mRNA zurückzuführen ist (Mach und Lehmann, 1997). Der *grk*-Phänotyp von *egl* und *BicD* ähnelt folglich stark dem *grk*-Phänotyp, den wir in *thoc5* mutanten Oocyten beobachtet haben. Es ist daher nicht unwahrscheinlich, dass *thoc5* nicht nur eine Rolle beim *osk* mRNA Transport spielt, sondern auch beim *grk* mRNA Transport. Dabei könnte Thoc5 ähnlich wirken, wie es zuvor für den *osk* mRNP Transport von uns postuliert wurde. Thoc5 könnte die Assemblierung der *grk* mRNA mit Proteinen in den Nährzellkernen kontrollieren, die dann Auswirkungen auf den Transport der *grk* mRNA im Cytoplasma der Nährzellen bzw. der Oocyte haben. Diese Faktoren würden dann die Verknüpfung der *grk* mRNP mit dem Motorprotein-Komplex Dynein-BicD-Egl regulieren. Injektionsexperimente haben jedoch gezeigt, dass die *grk* mRNA alle nötigen Faktoren für den Transport zum anterior-dorsalen Kortex im Cytoplasma der Oocyte rekrutieren kann (MacDougall, 2003). Die *grk* mRNA ist demnach nicht - wie die *osk* mRNA - auf die korrekte Verpackung in den Nährzellkernen angewiesen. Das deutet darauf hin, dass der Einfluss des Thoc5 Proteins beim *grk* mRNA Transport ein indirekter ist. Beispielsweise könnte Thoc5 den Transport oder aber die Transkription eines im Cytoplasma für den *grk* Transport benötigten Faktors kontrollieren.

4.3 Regulation der AP und DV Oocytenpolarität durch 7.460/7.134

In der hier vorliegenden Arbeit konnte die letale Komplementationsgruppe 7.460/7.134 als weiterer neuer Faktor für die AP und DV Oocytenpolarität identifiziert werden. Der Einfluss der Mutation in 7.460 und 7.134 manifestiert sich in der Misslokalisierung der posterioren Determinante *osk* und dessen assoziiertem Protein GFP-Stau sowie der Ventralisierung der Eier. Das mutante Gen konnte zwar bislang noch nicht identifiziert, aber auf eine Region von ca. 20 kb auf dem Chromosom 2R sowohl für 7.460 als auch für 7.134 lokalisiert werden.

Die Eingrenzung der Mutation erfolgte mittels Komplementationsanalyse der beiden mutanten Linien gegen klar definierte molekulare Defizienzen, die von uns zuvor generiert wurden. Diese Region enthält fünf putative Kandidatengene, von denen das Gen *mRpL42*

durch Komplementationsanalyse des letalen Stammes 13137 gegen 7.460 und 7.134 ausgeschlossen werden konnte. Für die vier verbleibenden möglichen Gene sind laut flybase keine mutanten Allele bekannt. Ferner ist bisher für keines der vier Gene eine Funktion in der Oocyte untersucht oder beschrieben worden. Daher gehen wir davon aus, dass es sich bei dem mutierten Gen der Komplementationsgruppe 7.134/7.460 um ein neues Gen mit noch unbekannter Funktion in der Oogenese handelt.

Die identifizierte Region ist für beide Allele 7.460 und 7.134 durchsequenziert worden. Die Sequenzanalyse für 7.134 ergab einen Basenpaaraustausch in einem nicht kodierenden Bereich 649 bp vor dem Startkodon des Gens *CG1371*. Für das Allel 7.460 konnte keine Modifizierung der DNA-Sequenz in diesem Bereich ermittelt werden. Bei der mutierten Region könnte es sich um einen Teil der cis-regulatorischen Sequenz von *CG1371* handeln. Ein eindeutiges Ergebnis lässt sich jedoch nur durch Rettungsexperimente mit den vier Kandidatengenen erzielen. Mit entsprechenden Arbeiten wurde bereits begonnen.

Bei den vier verbleibenden möglichen Genen handelt es sich um *CG2292*, *cdc2rk*, *CG12920* und *CG1371*. Für das unbekannte Gen *CG2292* können auf Proteinebene vier Proteindomänen identifiziert werden: ein Signalpeptid am N-Terminus, eine Phosphodiester-Domäne, eine PigN-Domäne (Phosphatidylinositolglycan class N) und eine C-terminal gelegene Transmembran-Domäne (<http://smart.embl-heidelberg.de/>). Die Phosphodiester- und die PigN-Domäne lassen auf eine mögliche Funktion des Gens bei der Modifizierung von Proteinen schließen. Die Proteine mit Phosphodiester-Domäne katalysieren u. a. die Spaltung von Phosphodiestern und Phosphosulfat-Bindungen. Proteine mit PigN-Domäne sind für die Synthese von Glycosylphosphatidylinositol-Ankern zuständig (Hong *et al.*, 1999). Das PigN Protein in *S. cerevisiae* und Mensch liegt im Endoplasmatischen Retikulum vor (Gaynor *et al.*, 1999).

Das Gen *cdc2rk* kodiert wahrscheinlich für eine Serin-Threonin-Kinase. Laut flybase wird für *cdc2rk* eine Funktion bei der Mitose und Regulation des Zellzyklus vermutet. Über die molekulare Funktion des annotierten Gens *CG12920* Gen ist nichts bekannt (<http://flybase.bio.indiana.edu/>). Es kodiert aber offenbar für ein Membranprotein. Denn die Datenbankanalysen zeigen, dass das Protein ein N-terminales Signalpeptid besitzt sowie eine Transmembrandomäne und eine „coiled coil“-Domäne am C-Terminus (<http://smart.embl-heidelberg.de/>). Bei dem annotierten Gen *CG1371* handelt es sich ebenfalls um ein unbekanntes Gen, für das sich am N-Terminus ein Signalpeptid und eine Cna-B-Domäne mit unbekannter Funktion detektieren lassen.

Beide mutanten Allele zeigen einen *osk* mRNA und GFP-Stau-Phänotyp. In 21,5% der mutanten 7.460 Keimbahnklonen und in 0% der mutanten 7.134 Keimbahnklonen lokalisiert die *osk* mRNA - wie im WT - in einem definierten Halbmond am posterioren Pol der Oocyte ab Stadium 9. Dagegen ist in 78,5% der mutanten 7.460 Keimbahnklonen und in 100% der 7.134 mutanten Keimbahnklonen die *osk* mRNA in Partikeln im Cytoplasma der gesamten Oocyte verteilt, wobei auch *osk* mRNA Partikel am posterioren Pol zu detektieren sind. Diese Verteilung korreliert für 7.460 mit dem GFP-Stau-Phänotyp, während im Fall von 7.134 sowohl 0% als auch 50% wildtypische Lokalisation des GFP-Stau beobachtet wurde. Auffällig ist, dass sowohl die *osk* mRNA als auch das GFP-Stau in Form von Partikeln in der Oocyte vorliegen. Da die Polarität des Mikrotubuli-Cytoskeletts in den Mutanten nicht beeinflusst wird, ist davon auszugehen, dass die Misslokalisierung von *osk* mRNA und GFP-Stau durch Defekte beim Transport und/oder der Verankerung am posterioren Pol verursacht werden.

Die Verankerung der *osk* mRNA am posterioren Pol ist abhängig vom Aktin-Cytoskelett sowie vom Osk Protein selbst. Dies konnte durch Studien an Mutanten für das Gen *Dmoesin* gezeigt werden (Jankovics *et al.*, 2002; Polesello *et al.*, 2002). *Dmoesin* verknüpft das Aktin-Cytoskelett mit der Plasmamembran. In *Dmoesin* mutanten Oocyten löst sich das F-Aktin von der Plasmamembran, und Aggregate von F-Aktin sind dann in der Oocyte zu detektieren. Die Anomalien im Aktin-Cytoskelett führen zum Abfallen der zunächst lokalisierten und translatierten *osk* mRNA und des Osk Proteins vom posterioren Kortex. Ähnliche Phänotypen zeigen Doppelmutanten von *homer*, das für ein F-Aktin bindendes Protein kodiert, und *bifocal*, dessen Protein mit F-Aktin co-lokalisiert (Shiraishi *et al.*, 1999; Helps *et al.*, 2001; Ruan *et al.*, 2002; Babu *et al.*, 2004).

Im Gegensatz hierzu zeigen die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Allele 7.460 und 7.134 keine Anomalien des Aktin-Cytoskeletts in der Oocyte in den Stadien 8-10. Auch der in den Mutanten beschriebene *osk* mRNA Phänotyp unterscheidet sich von *thoc5* Mutanten. Die *osk* mRNA ist in 7.134 mutanten Keimbahnklonen zu keinem Zeitpunkt und in 7.460 mutanten Keimbahnklonen zu 78,5% nicht - wie im WT - am posterioren Pol lokalisiert. Die *osk* mRNA verbleibt überwiegend diffus in der Oocyte verteilt, auch wenn geringe Mengen von *osk* mRNA am posterioren Pol zu detektieren sind. Dies deutet darauf hin, dass die *osk* mRNA nicht effizient zum posterioren Pol transportiert wird. Auch ist mittels Western Blot Analyse kein Osk Protein nachzuweisen, was ebenfalls darauf hinweist, dass die *osk* mRNA nicht richtig transportiert wird, da nur korrekt lokalisierte *osk* mRNA auch translatiert wird.

Die geringen Mengen an Osk Protein, die mittels Antikörper am posterioren Pol detektiert werden können, co-lokalisieren nur mit den GFP-Stau Partikeln, die auch am posterioren Pol detektiert werden, nicht jedoch mit denen, die mittig oder mehr anterior lokalisiert sind. Da die *osk* mRNA und das GFP-Stau im WT während der gesamten Oogenese co-lokalisieren, kann GFP-Stau als Marker für die *osk* mRNA benutzt werden (Schuldt *et al.*, 1998). Die geringe Lokalisation von GFP-Stau und Osk Protein am posterioren Pol lassen vermuten, dass *osk* mRNA verankert und translatiert wird, wenn sie den posterioren Pol erreicht. Der gestörte Prozess ist also der Transport der *osk* mRNA. Da sowohl die *osk* mRNA als auch das GFP-Stau in der Oocyte nachweisbar sind, ist nicht der Transport aus den Nährzellen in die Oocyte in den Mutanten gestört, sondern nur der Transport der *osk* mRNA in der Oocyte zum posterioren Pol. Welche Rolle das mutierte Gen der Komplementationsgruppe 7.460/7.134 dabei übernimmt, kann erst nach der Identifizierung des Gens weiter untersucht werden.

Ferner konnte für die beiden Allele 7.460 und 7.134 in der hier vorliegenden Arbeit auch Störungen der DV Oocytenpolarität gezeigt werden. In beiden Allelen drückt sich dies in Eihüllen mit fusionierten dorsalen Anhängen aus. Beide Allele zeigen keine vollständige Penetranz, da auch wildtypisch aussehende Eihüllen detektiert werden. Wie bereits unter 4.2.3 erwähnt, erfordert die Ausbildung der dorsalen Anhänge die präzise Lokalisierung und Translation der *grk* mRNA in den Stadien 9-10 in der Oocyte, um den EGF-Signaltransduktionsweg in den Follikelzellen zu aktivieren. Für beide Allele konnten keine Veränderungen der *grk* mRNA oder des Grk Proteins im Vergleich zum WT in den Stadien 9-10 identifiziert werden. Jedoch manifestieren sich schon geringe Störungen der Lokalisation oder Translation der *grk* mRNA in Anomalien der dorsalen Anhänge. Solche Störungen konnten mit unseren Nachweismethoden vielleicht nicht detektiert werden.

Die aufgebrochenen Zellmembranen in den Nährzellen, die Invaginationen der Nährzellen in die Oocyte sowie die im Vergleich zum WT kleineren Eier weisen auf Defekte beim Nährzell-Dumping hin. In der Literatur beschriebene Dumping-Phänotypen zeigen ähnliche Ei-Phänotypen wie für 7.460 und 7.134 (Gutzeit, 1986; Cooley *et al.*, 1992; Cant *et al.*, 1994). Die beobachteten Misslokalisationen des Oocytenkerns in 7.460 mutanten Oocyten in den späten Stadien der Oocyte korrelieren mit dem Zeitpunkt der beobachteten Nährzell-Dumping Defekte. Wir gehen daher davon aus, dass die teilweisen Misslokalisationen des Oocytenkerns durch die Defekte im Nährzell-Dumping hervorgerufen werden.

5. Literaturverzeichnis

- Abdu, U., Gonzalez-Reyes, A., Ghabrial, A. and Schupbach, T.** (2003). The *Drosophila* spn-D gene encodes a RAD51C-like protein that is required exclusively during meiosis. *Genetics* **165**, 197-204.
- Adams, M. D., Celniker, S. E., Holt, R. A., Evans, C. A., Gocayne, J. D., Amanatides, P. G., Scherer, S. E., Li, P. W., Hoskins, R. A., Galle, R. F. et al.** (2000). The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* **287**, 2185-95.
- Anderson, K.** (1995). One signal, two body axes. *Science* **269**, 489-90.
- Aravin, A. A., Naumova, N. M., Tulin, A. V., Vagin, V. V., Rozovsky, Y. M. and Gvozdev, V. A.** (2001). Double-stranded RNA-mediated silencing of genomic tandem repeats and transposable elements in the *D. melanogaster* germline. *Curr Biol* **11**, 1017-27.
- Ashburner, M.** (1989). *Drosophila*. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Babu, K., Cai, Y., Bahri, S., Yang, X. and Chia, W.** (2004). Roles of Bifocal, Homer, and F-actin in anchoring Oskar to the posterior cortex of *Drosophila* oocytes. *Genes Dev* **18**, 138-43.
- Begun, D. J. and Aquadro, C. F.** (1992). Levels of naturally occurring DNA polymorphism correlate with recombination rates in *D. melanogaster*. *Nature* **356**, 519-20.
- Berger, J., Suzuki, T., Senti, K. A., Stubbs, J., Schaffner, G. and Dickson, B. J.** (2001). Genetic mapping with SNP markers in *Drosophila*. *Nat Genet* **29**, 475-81.
- Bilen, J. and Bonini, N. M.** (2005). *Drosophila* as a model for human neurodegenerative disease. *Annu Rev Genet* **39**, 153-71.
- Bohrmann, J. and Biber, K.** (1994). Cytoskeleton-dependent transport of cytoplasmic particles in previtellogenic to mid-vitellogenic ovarian follicles of *Drosophila*: time-lapse analysis using video-enhanced contrast microscopy. *J Cell Sci* **107 (Pt 4)**, 849-58.
- Bolivar, J., Huynh, J. R., Lopez-Schier, H., Gonzalez, C., St Johnston, D. and Gonzalez-Reyes, A.** (2001). Centrosome migration into the *Drosophila* oocyte is independent of BicD and egl, and of the organisation of the microtubule cytoskeleton. *Development* **128**, 1889-97.
- Brand, A. H. and Perrimon, N.** (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* **118**, 401-15.
- Breitwieser, W., Markussen, F. H., Horstmann, H. and Ephrussi, A.** (1996). Oskar protein interaction with Vasa represents an essential step in polar granule assembly. *Genes Dev* **10**, 2179-88.
- Brendza, R. P., Serbus, L. R., Duffy, J. B. and Saxton, W. M.** (2000). A function for kinesin I in the posterior transport of oskar mRNA and Stauf protein. *Science* **289**, 2120-2.
- Buchenau, P., Saumweber, H. and Arndt-Jovin, D. J.** (1997). The dynamic nuclear redistribution of an hnRNP K-homologous protein during *Drosophila* embryo development and heat shock. Flexibility of transcription sites in vivo. *J Cell Biol* **137**, 291-303.

- Bullock, S. L. and Ish-Horowicz, D.** (2001). Conserved signals and machinery for RNA transport in *Drosophila* oogenesis and embryogenesis. *Nature* **414**, 611-6.
- Cant, K., Knowles, B. A., Mooseker, M. S. and Cooley, L.** (1994). *Drosophila* singed, a fascin homolog, is required for actin bundle formation during oogenesis and bristle extension. *J Cell Biol* **125**, 369-80.
- Cha, B. J., Koppetsch, B. S. and Theurkauf, W. E.** (2001). In vivo analysis of *Drosophila* bicoid mRNA localization reveals a novel microtubule-dependent axis specification pathway. *Cell* **106**, 35-46.
- Cha, B. J., Serbus, L. R., Koppetsch, B. S. and Theurkauf, W. E.** (2002). Kinesin I-dependent cortical exclusion restricts pole plasm to the oocyte posterior. *Nat Cell Biol* **4**, 592-8.
- Chang, M., French-Cornay, D., Fan, H. Y., Klein, H., Denis, C. L. and Jaehning, J. A.** (1999). A complex containing RNA polymerase II, Paf1p, Cdc73p, Hpr1p, and Ccr4p plays a role in protein kinase C signaling. *Mol Cell Biol* **19**, 1056-67.
- Chavez, S., Beilharz, T., Rondon, A. G., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Svejstrup, J. Q., Lithgow, T. and Aguilera, A.** (2000). A protein complex containing Tho2, Hpr1, Mft1 and a novel protein, Thp2, connects transcription elongation with mitotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J* **19**, 5824-34.
- Cho, R. J., Mindrinos, M., Richards, D. R., Sapolsky, R. J., Anderson, M., Drenkard, E., Dewdney, J., Reuber, T. L., Stammers, M., Federspiel, N. et al.** (1999). Genome-wide mapping with biallelic markers in *Arabidopsis thaliana*. *Nat Genet* **23**, 203-7.
- Chou, T. B., Noll, E. and Perrimon, N.** (1993). Autosomal P[ovoD1] dominant female-sterile insertions in *Drosophila* and their use in generating germ-line chimeras. *Development* **119**, 1359-69.
- Chou, T. B. and Perrimon, N.** (1996). The autosomal FLP-DFS technique for generating germline mosaics in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **144**, 1673-9.
- Clark, A., Meignin, C. and Davis, I.** (2007). A Dynein-dependent shortcut rapidly delivers axis determination transcripts into the *Drosophila* oocyte. *Development* **134**, 1955-65.
- Clark, I., Giniger, E., Ruohola-Baker, H., Jan, L. Y. and Jan, Y. N.** (1994). Transient posterior localization of a kinesin fusion protein reflects anteroposterior polarity of the *Drosophila* oocyte. *Curr Biol* **4**, 289-300.
- Cook, H. A., Koppetsch, B. S., Wu, J. and Theurkauf, W. E.** (2004). The *Drosophila* SDE3 homolog armitage is required for oskar mRNA silencing and embryonic axis specification. *Cell* **116**, 817-29.
- Cooley, L., Verheyen, E. and Ayers, K.** (1992). chickadee encodes a profilin required for intercellular cytoplasm transport during *Drosophila* oogenesis. *Cell* **69**, 173-84.
- de Cuevas, M., Lee, J. K. and Spradling, A. C.** (1996). alpha-spectrin is required for germline cell division and differentiation in the *Drosophila* ovary. *Development* **122**, 3959-68.
- de Cuevas, M. and Spradling, A. C.** (1998). Morphogenesis of the *Drosophila* fusome and its implications for oocyte specification. *Development* **125**, 2781-9.

- Delanoue, R., Herpers, B., Soetaert, J., Davis, I. and Rabouille, C.** (2007). Drosophila Squid/hnRNP helps Dynein switch from a gurken mRNA transport motor to an ultrastructural static anchor in sponge bodies. *Dev Cell* **13**, 523-38.
- Deng, W. and Lin, H.** (1997). Spectrosomes and fusomes anchor mitotic spindles during asymmetric germ cell divisions and facilitate the formation of a polarized microtubule array for oocyte specification in Drosophila. *Dev Biol* **189**, 79-94.
- Deng, W. M. and Ruohola-Baker, H.** (2000). Laminin A is required for follicle cell-oocyte signaling that leads to establishment of the anterior-posterior axis in Drosophila. *Curr Biol* **10**, 683-6.
- Doerflinger, H., Benton, R., Torres, I. L., Zwart, M. F. and St Johnston, D.** (2006). Drosophila anterior-posterior polarity requires actin-dependent PAR-1 recruitment to the oocyte posterior. *Curr Biol* **16**, 1090-5.
- Driever, W.** (1993). Maternal control of anterior development in the *Drosophila* embryo. In *The Development of Drosophila melanogaster*, vol. 1 (ed. M. Bate and A. Martinez-Arias). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Duncan, J. E. and Warrior, R.** (2002). The cytoplasmic dynein and kinesin motors have interdependent roles in patterning the Drosophila oocyte. *Curr Biol* **12**, 1982-91.
- Ephrussi, A., Dickinson, L. K. and Lehmann, R.** (1991). Oskar organizes the germ plasm and directs localization of the posterior determinant nanos. *Cell* **66**, 37-50.
- Ephrussi, A. and Lehmann, R.** (1992). Induction of germ cell formation by oskar. *Nature* **358**, 387-92.
- Fan, H. Y., Merker, R. J. and Klein, H. L.** (2001). High-copy-number expression of Sub2p, a member of the RNA helicase superfamily, suppresses hpr1-mediated genomic instability. *Mol Cell Biol* **21**, 5459-70.
- Findley, S. D., Tamanaha, M., Clegg, N. J. and Ruohola-Baker, H.** (2003). Maelstrom, a Drosophila spindle-class gene, encodes a protein that colocalizes with Vasa and RDE1/AGO1 homolog, Aubergine, in nuage. *Development* **130**, 859-71.
- Fischer, J. A., Giniger, E., Maniatis, T. and Ptashne, M.** (1988). GAL4 activates transcription in Drosophila. *Nature* **332**, 853-6.
- Fortini, M. E., Skupski, M. P., Boguski, M. S. and Hariharan, I. K.** (2000). A survey of human disease gene counterparts in the Drosophila genome. *J Cell Biol* **150**, F23-30.
- Frydman, H. M. and Spradling, A. C.** (2001). The receptor-like tyrosine phosphatase lar is required for epithelial planar polarity and for axis determination within drosophila ovarian follicles. *Development* **128**, 3209-20.
- Gaynor, E. C., Mondesert, G., Grimme, S. J., Reed, S. I., Orlean, P. and Emr, S. D.** (1999). MCD4 encodes a conserved endoplasmic reticulum membrane protein essential for glycosylphosphatidylinositol anchor synthesis in yeast. *Mol Biol Cell* **10**, 627-48.
- Gervais, L., Januschke, J., Roth, S., Guichet, A.** (2008). Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase Skittles directing PIP2 mediated activation of Dmoesin sustains microtubule organization and polarized transport during Drosophila oogenesis. Submitted for publication.

- Ghabrial, A., Ray, R. P. and Schupbach, T.** (1998). okra and spindle-B encode components of the RAD52 DNA repair pathway and affect meiosis and patterning in *Drosophila* oogenesis. *Genes Dev* **12**, 2711-23.
- Glotzer, J. B., Saffrich, R., Glotzer, M. and Ephrussi, A.** (1997). Cytoplasmic flows localize injected oskar RNA in *Drosophila* oocytes. *Curr Biol* **7**, 326-37.
- Godt, D. and Tepass, U.** (1998). *Drosophila* oocyte localization is mediated by differential cadherin-based adhesion. *Nature* **395**, 387-91.
- Golic, K. G.** (1991). Site-specific recombination between homologous chromosomes in *Drosophila*. *Science* **252**, 958-61.
- Gonzalez-Reyes, A., Elliott, H. and St Johnston, D.** (1995). Polarization of both major body axes in *Drosophila* by gurken-torpedo signalling. *Nature* **375**, 654-8.
- Gonzalez-Reyes, A. and St Johnston, D.** (1994). Role of oocyte position in establishment of anterior-posterior polarity in *Drosophila*. *Science* **266**, 639-42.
- Gonzalez-Reyes, A. and St Johnston, D.** (1998). The *Drosophila* AP axis is polarised by the cadherin-mediated positioning of the oocyte. *Development* **125**, 3635-44.
- Goodrich, J. S., Clouse, K. N. and Schupbach, T.** (2004). Hrb27C, Sqd and Otu cooperatively regulate gurken RNA localization and mediate nurse cell chromosome dispersion in *Drosophila* oogenesis. *Development* **131**, 1949-58.
- Grieder, N. C., de Cuevas, M. and Spradling, A. C.** (2000). The fusome organizes the microtubule network during oocyte differentiation in *Drosophila*. *Development* **127**, 4253-64.
- Guild, G. M., Connelly, P. S., Shaw, M. K. and Tilney, L. G.** (1997). Actin filament cables in *Drosophila* nurse cells are composed of modules that slide passively past one another during dumping. *J Cell Biol* **138**, 783-97.
- Gunkel, N., Yano, T., Markussen, F. H., Olsen, L. C. and Ephrussi, A.** (1998). Localization-dependent translation requires a functional interaction between the 5' and 3' ends of oskar mRNA. *Genes Dev* **12**, 1652-64.
- Gutzeit, H. O.** (1986). The role of microfilaments in cytoplasmic streaming in *Drosophila* follicles. *J Cell Sci* **80**, 159-69.
- Gutzeit, H. O., Eberhardt, W. and Gratwohl, E.** (1991). Laminin and basement membrane-associated microfilaments in wild-type and mutant *Drosophila* ovarian follicles. *J Cell Sci* **100** (Pt 4), 781-8.
- Hachet, O. and Ephrussi, A.** (2001). *Drosophila* Y14 shuttles to the posterior of the oocyte and is required for oskar mRNA transport. *Curr Biol* **11**, 1666-74.
- Hachet, O. and Ephrussi, A.** (2004). Splicing of oskar RNA in the nucleus is coupled to its cytoplasmic localization. *Nature* **428**, 959-63.
- Helps, N. R., Cohen, P. T., Bahri, S. M., Chia, W. and Babu, K.** (2001). Interaction with protein phosphatase 1 is essential for bifocal function during the morphogenesis of the *Drosophila* compound eye. *Mol Cell Biol* **21**, 2154-64.

- Holley, S. A., Jackson, P. D., Sasai, Y., Lu, B., De Robertis, E. M., Hoffmann, F. M. and Ferguson, E. L.** (1995). A conserved system for dorsal-ventral patterning in insects and vertebrates involving sog and chordin. *Nature* **376**, 249-53.
- Hong, Y., Maeda, Y., Watanabe, R., Ohishi, K., Mishkind, M., Riezman, H. and Kinoshita, T.** (1999). Pig-n, a mammalian homologue of yeast Mcd4p, is involved in transferring phosphoethanolamine to the first mannose of the glycosylphosphatidylinositol. *J Biol Chem* **274**, 35099-106.
- Hoskins, R. A., Phan, A. C., Naeemuddin, M., Mapa, F. A., Ruddy, D. A., Ryan, J. J., Young, L. M., Wells, T., Kopczynski, C. and Ellis, M. C.** (2001). Single nucleotide polymorphism markers for genetic mapping in *Drosophila melanogaster*. *Genome Res* **11**, 1100-13.
- Huertas, P. and Aguilera, A.** (2003). Cotranscriptionally formed DNA:RNA hybrids mediate transcription elongation impairment and transcription-associated recombination. *Mol Cell* **12**, 711-21.
- Huynh, J.** (2002). Oocyte determination and polarisation during *Drosophila* oogenesis. Dissertation, University of Cambridge.
- Huynh, J. R., Munro, T. P., Smith-Litiere, K., Lepesant, J. A. and St Johnston, D.** (2004). The *Drosophila* hnRNPA/B homolog, Hrp48, is specifically required for a distinct step in *osk* mRNA localization. *Dev Cell* **6**, 625-35.
- Huynh, J. R. and St Johnston, D.** (2000). The role of BicD, Egl, Orb and the microtubules in the restriction of meiosis to the *Drosophila* oocyte. *Development* **127**, 2785-94.
- Huynh, J. R. and St Johnston, D.** (2004). The origin of asymmetry: early polarisation of the *Drosophila* germline cyst and oocyte. *Curr Biol* **14**, R438-49.
- Jankovics, F., Sinka, R., Lukacsovich, T. and Erdelyi, M.** (2002). MOESIN crosslinks actin and cell membrane in *Drosophila* oocytes and is required for OSKAR anchoring. *Curr Biol* **12**, 2060-5.
- Januschke, J.** (2001). The asymmetric movement of the oocyte nucleus and the polarization of the cytoskeleton in *Drosophila* oocytes. Diplomarbeit, Universität zu Köln.
- Januschke, J., Gervais, L., Dass, S., Kaltschmidt, J. A., Lopez-Schier, H., St Johnston, D., Brand, A. H., Roth, S. and Guichet, A.** (2002). Polar transport in the *Drosophila* oocyte requires Dynein and Kinesin I cooperation. *Curr Biol* **12**, 1971-81.
- Januschke, J., Gervais, L., Gillet, L., Keryer, G., Bornens, M. and Guichet, A.** (2006). The centrosome-nucleus complex and microtubule organization in the *Drosophila* oocyte. *Development* **133**, 129-39.
- Jensen, T. H., Dower, K., Libri, D. and Rosbash, M.** (2003). Early formation of mRNP: license for export or quality control? *Mol Cell* **11**, 1129-38.
- Jimeno, S., Rondon, A. G., Luna, R. and Aguilera, A.** (2002). The yeast THO complex and mRNA export factors link RNA metabolism with transcription and genome instability. *Embo J* **21**, 3526-35.
- Kataoka, N., Diem, M. D., Kim, V. N., Yong, J. and Dreyfuss, G.** (2001). Magoh, a human homolog of *Drosophila* mago nashi protein, is a component of the splicing-dependent exon-exon junction complex. *Embo J* **20**, 6424-33.

- Kennerdell, J. R., Yamaguchi, S. and Carthew, R. W.** (2002). RNAi is activated during *Drosophila* oocyte maturation in a manner dependent on aubergine and spindle-E. *Genes Dev* **16**, 1884-9.
- Kim, V. N., Yong, J., Kataoka, N., Abel, L., Diem, M. D. and Dreyfuss, G.** (2001). The Y14 protein communicates to the cytoplasm the position of exon-exon junctions. *Embo J* **20**, 2062-8.
- Kim-Ha, J., Kerr, K. and Macdonald, P. M.** (1995). Translational regulation of oskar mRNA by bruno, an ovarian RNA-binding protein, is essential. *Cell* **81**, 403-12.
- Kim-Ha, J., Smith, J. L. and Macdonald, P. M.** (1991). oskar mRNA is localized to the posterior pole of the *Drosophila* oocyte. *Cell* **66**, 23-35.
- King, R. C.** (1970). Ovarian development in *Drosophila melanogaster*: Academic Press, New York.
- Le Hir, H., Gatfield, D., Braun, I. C., Forler, D. and Izaurralde, E.** (2001). The protein Mago provides a link between splicing and mRNA localization. *EMBO Rep* **2**, 1119-24.
- Le Hir, H., Izaurralde, E., Maquat, L. E. and Moore, M. J.** (2000). The spliceosome deposits multiple proteins 20-24 nucleotides upstream of mRNA exon-exon junctions. *Embo J* **19**, 6860-9.
- Libri, D., Dower, K., Boulay, J., Thomsen, R., Rosbash, M. and Jensen, T. H.** (2002). Interactions between mRNA export commitment, 3'-end quality control, and nuclear degradation. *Mol Cell Biol* **22**, 8254-66.
- Lie, Y. S. and Macdonald, P. M.** (1999). Apontic binds the translational repressor Bruno and is implicated in regulation of oskar mRNA translation. *Development* **126**, 1129-38.
- Lin, H., Yue, L. and Spradling, A. C.** (1994). The *Drosophila* fusome, a germline-specific organelle, contains membrane skeletal proteins and functions in cyst formation. *Development* **120**, 947-56.
- Livneh, E., Glazer, L., Segal, D., Schlessinger, J. and Shilo, B. Z.** (1985). The *Drosophila* EGF receptor gene homolog: conservation of both hormone binding and kinase domains. *Cell* **40**, 599-607.
- Logan, C. Y. and Nusse, R.** (2004). The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* **20**, 781-810.
- MacDougall, N., Clark, A., MacDougall, E. and Davis, I.** (2003). *Drosophila* gurken (TGF α) mRNA localizes as particles that move within the oocyte in two dynein-dependent steps. *Dev Cell* **4**, 307-19.
- MacDougall, N., Lad, Y., Wilkie, G. S., Francis-Lang, H., Sullivan, W. and Davis, I.** (2001). Merlin, the *Drosophila* homologue of neurofibromatosis-2, is specifically required in posterior follicle cells for axis formation in the oocyte. *Development* **128**, 665-73.
- Mach, J. M. and Lehmann, R.** (1997). An Egalitarian-BicaudalD complex is essential for oocyte specification and axis determination in *Drosophila*. *Genes Dev* **11**, 423-35.
- Mahowald, A. and Kambyzellis, M.** (1980). Oogenesis. In *The Genetics and Biology of Drosophila* (ed. M. Ashburner and T. Wright), pp. 141-224. London: Academic Press.

- Mangeat, P., Roy, C. and Martin, M.** (1999). ERM proteins in cell adhesion and membrane dynamics. *Trends Cell Biol* **9**, 187-92.
- Margolis, J. and Spradling, A.** (1995). Identification and behavior of epithelial stem cells in the *Drosophila* ovary. *Development* **121**, 3797-807.
- Markussen, F. H., Michon, A. M., Breitwieser, W. and Ephrussi, A.** (1995). Translational control of oskar generates short OSK, the isoform that induces pole plasma assembly. *Development* **121**, 3723-32.
- Martin, S. G., Dobi, K. C. and St Johnston, D.** (2001). A rapid method to map mutations in *Drosophila*. *Genome Biol* **2**, RESEARCH0036.
- Martin, S. G., Leclerc, V., Smith-Litiere, K. and St Johnston, D.** (2003). The identification of novel genes required for *Drosophila* anteroposterior axis formation in a germline clone screen using GFP-Staufen. *Development* **130**, 4201-15.
- Masuda, S., Das, R., Cheng, H., Hurt, E., Dorman, N. and Reed, R.** (2005). Recruitment of the human TREX complex to mRNA during splicing. *Genes Dev* **19**, 1512-7.
- McCartney, B. M. and Fehon, R. G.** (1996). Distinct cellular and subcellular patterns of expression imply distinct functions for the *Drosophila* homologues of moesin and the neurofibromatosis 2 tumor suppressor, merlin. *J Cell Biol* **133**, 843-52.
- Micklem, D. R., Dasgupta, R., Elliott, H., Gergely, F., Davidson, C., Brand, A., Gonzalez-Reyes, A. and St Johnston, D.** (1997). The mago nashi gene is required for the polarisation of the oocyte and the formation of perpendicular axes in *Drosophila*. *Curr Biol* **7**, 468-78.
- Mohr, S. E., Dillon, S. T. and Boswell, R. E.** (2001). The RNA-binding protein Tsunagi interacts with Mago Nashi to establish polarity and localize oskar mRNA during *Drosophila* oogenesis. *Genes Dev* **15**, 2886-99.
- Mullis, K. B. and Faloona, F. A.** (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* **155**, 335-50.
- Neuman-Silberberg, F. S. and Schupbach, T.** (1993). The *Drosophila* dorsoventral patterning gene gurken produces a dorsally localized RNA and encodes a TGF alpha-like protein. *Cell* **75**, 165-74.
- Neuman-Silberberg, F. S. and Schupbach, T.** (1994). Dorsoventral axis formation in *Drosophila* depends on the correct dosage of the gene gurken. *Development* **120**, 2457-63.
- Newmark, P. A. and Boswell, R. E.** (1994). The mago nashi locus encodes an essential product required for germ plasm assembly in *Drosophila*. *Development* **120**, 1303-13.
- Newmark, P. A., Mohr, S. E., Gong, L. and Boswell, R. E.** (1997). mago nashi mediates the posterior follicle cell-to-oocyte signal to organize axis formation in *Drosophila*. *Development* **124**, 3197-207.
- Niccoli, T., Guichet, A., Roth, S., St Johnston, D.** (2008) The *Drosophila* ATF7IP/MCAF-1 homologue, Ebu gogo, regulates the actin cytoskeleton and is required for oocyte polarity. Submitted for publication.
- Nusslein-Volhard, C., Frohnhofer, H. G. and Lehmann, R.** (1987). Determination of anteroposterior polarity in *Drosophila*. *Science* **238**, 1675-81.

- Palacios, I. M., Gatfield, D., St Johnston, D. and Izaurralde, E.** (2004). An eIF4AIII-containing complex required for mRNA localization and nonsense-mediated mRNA decay. *Nature* **427**, 753-7.
- Palacios, I. M. and St Johnston, D.** (2002). Kinesin light chain-independent function of the Kinesin heavy chain in cytoplasmic streaming and posterior localisation in the *Drosophila* oocyte. *Development* **129**, 5473-85.
- Parks, A. L., Cook, K. R., Belvin, M., Dompe, N. A., Fawcett, R., Huppert, K., Tan, L. R., Winter, C. G., Bogart, K. P., Deal, J. E. et al.** (2004). Systematic generation of high-resolution deletion coverage of the *Drosophila melanogaster* genome. *Nat Genet* **36**, 288-92.
- Piruat, J. I. and Aguilera, A.** (1998). A novel yeast gene, THO2, is involved in RNA pol II transcription and provides new evidence for transcriptional elongation-associated recombination. *Embo J* **17**, 4859-72.
- Pokrywka, N. J. and Stephenson, E. C.** (1995). Microtubules are a general component of mRNA localization systems in *Drosophila* oocytes. *Dev Biol* **167**, 363-70.
- Polesello, C., Delon, I., Valenti, P., Ferrer, P. and Payre, F.** (2002). Dmoesin controls actin-based cell shape and polarity during *Drosophila melanogaster* oogenesis. *Nat Cell Biol* **4**, 782-9.
- Poulton, J. S. and Deng, W. M.** (2006). Dystroglycan down-regulation links EGF receptor signaling and anterior-posterior polarity formation in the *Drosophila* oocyte. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 12775-80.
- Poulton, J. S. and Deng, W. M.** (2007). Cell-cell communication and axis specification in the *Drosophila* oocyte. *Dev Biol* **311**, 1-10.
- Price, J. V., Clifford, R. J. and Schupbach, T.** (1989). The maternal ventralizing locus torpedo is allelic to faint little ball, an embryonic lethal, and encodes the *Drosophila* EGF receptor homolog. *Cell* **56**, 1085-92.
- Ran, B., Bopp, R. and Suter, B.** (1994). Null alleles reveal novel requirements for Bic-D during *Drosophila* oogenesis and zygotic development. *Development* **120**, 1233-42.
- Rehwinkel, J., Herold, A., Gari, K., Kocher, T., Rode, M., Ciccarelli, F. L., Wilm, M. and Izaurralde, E.** (2004). Genome-wide analysis of mRNAs regulated by the THO complex in *Drosophila melanogaster*. *Nat Struct Mol Biol* **11**, 558-66.
- Riechmann, V. and Ephrussi, A.** (2001). Axis formation during *Drosophila* oogenesis. *Curr Opin Genet Dev* **11**, 374-83.
- Robinson, D. N., Smith-Leiker, T. A., Sokol, N. S., Hudson, A. M. and Cooley, L.** (1997). Formation of the *Drosophila* ovarian ring canal inner rim depends on cheerio. *Genetics* **145**, 1063-72.
- Rondon, A. G., Garcia-Rubio, M., Gonzalez-Barrera, S. and Aguilera, A.** (2003). Molecular evidence for a positive role of Spt4 in transcription elongation. *Embo J* **22**, 612-20.
- Rongo, C., Gavis, E. R. and Lehmann, R.** (1995). Localization of oskar RNA regulates oskar translation and requires Oskar protein. *Development* **121**, 2737-46.

- Rorth, P., Szabo, K., Bailey, A., Laverly, T., Rehm, J., Rubin, G. M., Weigmann, K., Milan, M., Benes, V., Ansorge, W. et al. (1998). Systematic gain-of-function genetics in *Drosophila*. *Development* **125**, 1049-57.
- Roth, S. (2003). The origin of dorsoventral polarity in *Drosophila*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **358**, 1317-29; discussion 1329.
- Roth, S., Neuman-Silberberg, F. S., Barcelo, G. and Schupbach, T. (1995). *cornichon* and the EGF receptor signaling process are necessary for both anterior-posterior and dorsal-ventral pattern formation in *Drosophila*. *Cell* **81**, 967-78.
- Roth, S. and Schupbach, T. (1994). The relationship between ovarian and embryonic dorsoventral patterning in *Drosophila*. *Development* **120**, 2245-57.
- Ruan, W., Long, H., Vuong, D. H. and Rao, Y. (2002). Bifocal is a downstream target of the Ste20-like serine/threonine kinase *misshapen* in regulating photoreceptor growth cone targeting in *Drosophila*. *Neuron* **36**, 831-42.
- Rubin, G. M., Hong, L., Brokstein, P., Evans-Holm, M., Frise, E., Stapleton, M. and Harvey, D. A. (2000). A *Drosophila* complementary DNA resource. *Science* **287**, 2222-4.
- Rubin, G. M. und Spradling, A. C. (1982). Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors. *Science* **218**, 348-53.
- Ryder, E., Ashburner, M., Bautista-Llacer, R., Drummond, J., Webster, J., Johnson, G., Morley, T., Chan, Y. S., Blows, F., Coulson, D. et al. (2007). The DrosDel deletion collection: a *Drosophila* genomewide chromosomal deficiency resource. *Genetics* **177**, 615-29.
- Ryder, E., Blows, F., Ashburner, M., Bautista-Llacer, R., Coulson, D., Drummond, J., Webster, J., Gubb, D., Gunton, N., Johnson, G. et al. (2004). The DrosDel collection: a set of P-element insertions for generating custom chromosomal aberrations in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **167**, 797-813.
- Sachidanandam, R., Weissman, D., Schmidt, S. C., Kakol, J. M., Stein, L. D., Marth, G., Sherry, S., Mullikin, J. C., Mortimore, B. J., Willey, D. L. et al. (2001). A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature* **409**, 928-33.
- Saguez, C., Olesen, J. R. and Jensen, T. H. (2005). Formation of export-competent mRNP: escaping nuclear destruction. *Curr Opin Cell Biol* **17**, 287-93.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. and Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-91.
- Sang, T. K. and Jackson, G. R. (2005). *Drosophila* models of neurodegenerative disease. *NeuroRx* **2**, 438-46.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 5463-7.
- Schejter, E. D., Segal, D., Glazer, L. and Shilo, B. Z. (1986). Alternative 5' exons and tissue-specific expression of the *Drosophila* EGF receptor homolog transcripts. *Cell* **46**, 1091-101.

- Schneiter, R., Guerra, C. E., Lampl, M., Gogg, G., Kohlwein, S. D. and Klein, H. L.** (1999). The *Saccharomyces cerevisiae* hyperrecombination mutant *hpr1Delta* is synthetically lethal with two conditional alleles of the acetyl coenzyme A carboxylase gene and causes a defect in nuclear export of polyadenylated RNA. *Mol Cell Biol* **19**, 3415-22.
- Schnorrer, F., Bohmann, K. and Nusslein-Volhard, C.** (2000). The molecular motor dynein is involved in targeting swallow and bicoid RNA to the anterior pole of *Drosophila* oocytes. *Nat Cell Biol* **2**, 185-90.
- Schuldt, A. J., Adams, J. H., Davidson, C. M., Micklem, D. R., Haseloff, J., St Johnston, D. and Brand, A. H.** (1998). Miranda mediates asymmetric protein and RNA localization in the developing nervous system. *Genes Dev* **12**, 1847-57.
- Schupbach, T.** (1987). Germ line and soma cooperate during oogenesis to establish the dorsoventral pattern of egg shell and embryo in *Drosophila melanogaster*. *Cell* **49**, 699-707.
- Schupbach, T. and Wieschaus, E.** (1989). Female sterile mutations on the second chromosome of *Drosophila melanogaster*. I. Maternal effect mutations. *Genetics* **121**, 101-17.
- Schupbach, T. and Wieschaus, E.** (1991). Female sterile mutations on the second chromosome of *Drosophila melanogaster*. II. Mutations blocking oogenesis or altering egg morphology. *Genetics* **129**, 1119-36.
- Serbus, L. R., Cha, B. J., Theurkauf, W. E. and Saxton, W. M.** (2005). Dynein and the actin cytoskeleton control kinesin-driven cytoplasmic streaming in *Drosophila* oocytes. *Development* **132**, 3743-52.
- Shilo, B. Z., Schejter, E. D., Segal, D., Ginsberg, D. S. and Glazer, L.** (1986). The *Drosophila* epidermal growth factor receptor homolog: structure, evolution, and possible functions. *Symp Fundam Cancer Res* **39**, 87-97.
- Shiraishi, Y., Mizutani, A., Bito, H., Fujisawa, K., Narumiya, S., Mikoshiba, K. and Furuichi, T.** (1999). Cupidin, an isoform of Homer/Vesl, interacts with the actin cytoskeleton and activated rho family small GTPases and is expressed in developing mouse cerebellar granule cells. *J Neurosci* **19**, 8389-400.
- Shulman, J. M., Benton, R. and St Johnston, D.** (2000). The *Drosophila* homolog of *C. elegans* PAR-1 organizes the oocyte cytoskeleton and directs oskar mRNA localization to the posterior pole. *Cell* **101**, 377-88.
- Snee, M. J., Harrison, D., Yan, N. and Macdonald, P. M.** (2007). A late phase of Oskar accumulation is crucial for posterior patterning of the *Drosophila* embryo, and is blocked by ectopic expression of Bruno. *Differentiation* **75**, 246-55.
- Spradling, A.** (1993). Developmental genetics of oogenesis. In "The Development of *Drosophila melanogaster*": Cold Spring Harbor Lab. Press, NY.
- St Johnston, D.** (1995). The intracellular localization of messenger RNAs. *Cell* **81**, 161-70.
- St Johnston, D.** (2005). Moving messages: the intracellular localization of mRNAs. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 363-75.
- St Johnston, D., Beuchle, D. and Nusslein-Volhard, C.** (1991). Staufen, a gene required to localize maternal RNAs in the *Drosophila* egg. *Cell* **66**, 51-63.

- St Johnston, D., Driever, W., Berleth, T., Richstein, S. and Nusslein-Volhard, C.** (1989). Multiple steps in the localization of bicoid RNA to the anterior pole of the *Drosophila* oocyte. *Development* **107 Suppl**, 13-9.
- Staeva-Vieira, E., Yoo, S. and Lehmann, R.** (2003). An essential role of DmRad51/SpnA in DNA repair and meiotic checkpoint control. *Embo J* **22**, 5863-74.
- Steinhauer, J. and Kalderon, D.** (2006). Microtubule polarity and axis formation in the *Drosophila* oocyte. *Dev Dyn* **235**, 1455-68.
- Storto, P. D. and King, R. C.** (1989). The role of polyfusomes in generating branched chains of cystocytes during *Drosophila* oogenesis. *Dev Genet* **10**, 70-86.
- Strasser, K., Masuda, S., Mason, P., Pfannstiel, J., Oppizzi, M., Rodriguez-Navarro, S., Rondon, A. G., Aguilera, A., Struhl, K., Reed, R. et al.** (2002). TREX is a conserved complex coupling transcription with messenger RNA export. *Nature* **417**, 304-8.
- Stutz, F. and Izaurralde, E.** (2003). The interplay of nuclear mRNP assembly, mRNA surveillance and export. *Trends Cell Biol* **13**, 319-27.
- Suter, B. and Steward, R.** (1991). Requirement for phosphorylation and localization of the Bicaudal-D protein in *Drosophila* oocyte differentiation. *Cell* **67**, 917-26.
- Swan, A. and Suter, B.** (1996). Role of Bicaudal-D in patterning the *Drosophila* egg chamber in mid-oogenesis. *Development* **122**, 3577-86.
- Tautz, D. and Pfeifle, C.** (1989). A non-radioactive in situ hybridization method for the localization of specific RNAs in *Drosophila* embryos reveals translational control of the segmentation gene hunchback. *Chromosoma* **98**, 81-5.
- Tetzlaff, M. T., Jackle, H. and Pankratz, M. J.** (1996). Lack of *Drosophila* cytoskeletal tropomyosin affects head morphogenesis and the accumulation of oskar mRNA required for germ cell formation. *Embo J* **15**, 1247-54.
- Theurkauf, W. E., Smiley, S., Wong, M. L. and Alberts, B. M.** (1992). Reorganization of the cytoskeleton during *Drosophila* oogenesis: implications for axis specification and intercellular transport. *Development* **115**, 923-36.
- Thibault, S. T., Singer, M. A., Miyazaki, W. Y., Milash, B., Dompe, N. A., Singh, C. M., Buchholz, R., Demsky, M., Fawcett, R., Francis-Lang, H. L. et al.** (2004). A complementary transposon tool kit for *Drosophila melanogaster* using P and piggyBac. *Nat Genet* **36**, 283-7.
- Thio, G. L., Ray, R. P., Barcelo, G. and Schupbach, T.** (2000). Localization of gurken RNA in *Drosophila* oogenesis requires elements in the 5' and 3' regions of the transcript. *Dev Biol* **221**, 435-46.
- Tomancak, P., Piano, F., Riechmann, V., Gunsalus, K. C., Kempfues, K. J. and Ephrussi, A.** (2000). A *Drosophila melanogaster* homologue of *Caenorhabditis elegans* par-1 acts at an early step in embryonic-axis formation. *Nat Cell Biol* **2**, 458-60.
- Tomari, Y., Du, T., Haley, B., Schwarz, D. S., Bennett, R., Cook, H. A., Koppetsch, B. S., Theurkauf, W. E. and Zamore, P. D.** (2004). RISC assembly defects in the *Drosophila* RNAi mutant armitage. *Cell* **116**, 831-41.

- Tsukita, S., Oishi, K., Sato, N., Sagara, J., Kawai, A. and Tsukita, S.** (1994). ERM family members as molecular linkers between the cell surface glycoprotein CD44 and actin-based cytoskeletons. *J Cell Biol* **126**, 391-401.
- Turunen, O., Sainio, M., Jaaskelainen, J., Carpen, O. and Vaheri, A.** (1998). Structure-function relationships in the ezrin family and the effect of tumor-associated point mutations in neurofibromatosis 2 protein. *Biochim Biophys Acta* **1387**, 1-16.
- Van De Bor, V., Hartswood, E., Jones, C., Finnegan, D. and Davis, I.** (2005). gurken and the I factor retrotransposon RNAs share common localization signals and machinery. *Dev Cell* **9**, 51-62.
- van Eeden, F. and St Johnston, D.** (1999). The polarisation of the anterior-posterior and dorsal-ventral axes during *Drosophila* oogenesis. *Curr Opin Genet Dev* **9**, 396-404.
- van Eeden, F. J., Palacios, I. M., Petronczki, M., Weston, M. J. and St Johnston, D.** (2001). Barentsz is essential for the posterior localization of oskar mRNA and colocalizes with it to the posterior pole. *J Cell Biol* **154**, 511-23.
- Vanzo, N. F. and Ephrussi, A.** (2002). Oskar anchoring restricts pole plasm formation to the posterior of the *Drosophila* oocyte. *Development* **129**, 3705-14.
- Wadsworth, S. C., Vincent, W. S., 3rd and Bilodeau-Wentworth, D.** (1985). A *Drosophila* genomic sequence with homology to human epidermal growth factor receptor. *Nature* **314**, 178-80.
- Wang, Y. and Riechmann, V.** (2008). Microtubule anchoring by cortical actin bundles prevents streaming of the oocyte cytoplasm. *Mech Dev* **125**, 142-52.
- Webster, P. J., Liang, L., Berg, C. A., Lasko, P. and Macdonald, P. M.** (1997). Translational repressor bruno plays multiple roles in development and is widely conserved. *Genes Dev* **11**, 2510-21.
- Weil, T. T., Forrest, K. M. and Gavis, E. R.** (2006). Localization of bicoid mRNA in late oocytes is maintained by continual active transport. *Dev Cell* **11**, 251-62.
- West, R. W., Jr., Kruger, B., Thomas, S., Ma, J. and Milgrom, E.** (2000). RLR1 (THO2), required for expressing lacZ fusions in yeast, is conserved from yeast to humans and is a suppressor of SIN4. *Gene* **243**, 195-205.
- Wicks, S. R., Yeh, R. T., Gish, W. R., Waterston, R. H. and Plasterk, R. H.** (2001). Rapid gene mapping in *Caenorhabditis elegans* using a high density polymorphism map. *Nat Genet* **28**, 160-4.
- Wilhelm, J. E. and Smibert, C. A.** (2005). Mechanisms of translational regulation in *Drosophila*. *Biol Cell* **97**, 235-52.
- Xu, T. and Rubin, G. M.** (1993). Analysis of genetic mosaics in developing and adult *Drosophila* tissues. *Development* **117**, 1223-37.
- Yano, T., Lopez de Quinto, S., Matsui, Y., Shevchenko, A., Shevchenko, A. and Ephrussi, A.** (2004). Hrp48, a *Drosophila* hnRNPA/B homolog, binds and regulates translation of oskar mRNA. *Dev Cell* **6**, 637-48.
- Zenklusen, D., Vinciguerra, P., Wyss, J. C. and Stutz, F.** (2002). Stable mRNP formation and export require cotranscriptional recruitment of the mRNA export factors Yra1p and Sub2p by Hpr1p. *Mol Cell Biol* **22**, 8241-53.

Zhou, Z., Licklider, L. J., Gygi, S. P. and Reed, R. (2002). Comprehensive proteomic analysis of the human spliceosome. *Nature* **419**, 182-5.

Zimyanin, V., Lowe, N. and St Johnston, D. (2007). An oskar-dependent positive feedback loop maintains the polarity of the *Drosophila* oocyte. *Curr Biol* **17**, 353-9.

6. Zusammenfassung

Die anterior-posteriore und dorso-ventrale Achse von *Drosophila* werden bereits früh in der Oogenese durch die Polarisation des Mikrotubuli-Cytoskeletts und der spezifischen Lokalisation der posterioren Determinante *osk* mRNA, der anterioren Determinante *bcd* mRNA und dem dorso-ventralen Induktor *grk* mRNA in der Oocyte determiniert. In einem dieser Arbeit vorausgegangen Screen zur Identifizierung von neuen Genen für die Regulation der Oocytenpolarität wurden die beiden letalen Komplementationsgruppen 32.17/11.229 und 7.460/7.134 entdeckt, die in der vorliegenden Arbeit genetisch und molekular charakterisiert wurden.

Die Identifizierung der mutanten Gene erfolgte über meiotische Kartierung mit klassischen Markern und molekularen Markern von einer neu etablierten Polymorphismuskarte für das Chromosom 2R sowie Kartierung mittels neu generierter, molekular definierter Defizienzen.

Durch molekulare Identifizierung von Punktmutanten wurde für die Komplementationsgruppe 32.17/11.229 gezeigt, dass sie einem Homologen von *thoc5* entspricht. Dies konnte durch Rettungsexperimente bestätigt werden. In *thoc5* Mutanten ist der Transport der *osk* mRNA zum posterioren Pol in den Stadien 9-10 in der Oocyte gestört und die Reduktion der *grk* mRNA führt zur Ventralisierung der Eikammer. Mit HA-Thoc5 und GFP-Thoc5 Konstrukten wurde gezeigt, dass Thoc5 überwiegend in den Zellkernen vorkommt. Hier konnte Thoc5 als Teil des konservierten THO-Komplexes nachgewiesen werden. Weiterhin stellte sich heraus, dass der THO-Komplex in der Keimbahn mit den beiden Komponenten Mago und Y14 des Exon-Exon-Junction-Komplex interagiert, von denen bekannt ist, dass sie Teil der *osk* mRNP Transportmaschinerie sind. Die hier erzielten Ergebnisse legen nahe, dass Thoc5 die korrekte Assemblierung der *osk* mRNP in den Nährzellkernen kontrolliert, was wiederum Voraussetzung für die korrekte Lokalisation der posterioren Determinante *osk* mRNA zum posterioren Pol im Cytoplasma der Oocyte in den Stadien 9-10 ist.

Der Phänotyp der Komplementationsgruppe 7.460/7.134 manifestiert sich ebenfalls in der Misslokalisierung der *osk* mRNA und in der Ventralisierung der Eier. Dabei ist die Polarisation des Mikrotubuli-Cytoskeletts nicht gestört. Das mutante Gen konnte auf eine Region von 20 kb mit vier Genen unbekannter Funktion bei der Oocytenpolarität eingegrenzt werden. Die endgültige Identifizierung des Gens soll mit Rettungsexperimenten erfolgen.

Die hier vorliegende Arbeit beschreibt zwei neue Komponenten, die für die Regulation der anterior-posterioren und dorso-ventralen Oocytenpolarität in *Drosophila* essentiell sind.

7. Abstract

The anterior-posterior and dorso-ventral axes of *Drosophila* are already defined early during oogenesis by the polarisation of the microtubule cytoskeleton and the localisation of the posterior determinant *osk* mRNA, the anterior determinant *bcd* mRNA and the dorso-ventral inductor *grk* mRNA in the oocyte. A previously performed screen for new mutants regulating oocyte polarity identified two lethal complementation groups 32.17/11.229 and 7.460/7.134. This work deals with the genetic and molecular characterisation of these two complementation groups.

The mutant genes were identified through meiotic mapping with classical markers and molecular markers from a newly established polymorphism map for chromosome 2R as well as mapping using newly generated, molecular defined deficiencies.

The molecular identification of point mutants suggested that the complementation group 32.17/11.229 corresponds to a homolog of *thoc5*. This could be confirmed by rescue experiments. In *thoc5* mutants the transport of the *osk* mRNA to the posterior pole of the oocyte is blocked during stages 9-10 and the reduction of the *grk* mRNA leads to the ventralisation of the egg chamber. Using HA-Thoc5 and GFP-Thoc5 constructs Thoc5 is shown to localise predominantly in nuclei, where Thoc5 is part of the conserved THO-complex. The THO-complex is proven to interact, in the germline, with the components of the exon-exon junction complex Mago and Y14, which are both known constituents of the *osk* mRNPs transport machinery. Our results suggest that Thoc5 controls the assembly of the *osk* mRNPs in the nurse cell nuclei and that this in turn is a pre-condition for the proper localisation of the posterior determinant *osk* mRNA at the posterior pole in the cytoplasm of the oocyte during stages 9-10.

The phenotype of complementation group 7.460/7.134 manifests itself as a mislocalisation of the *osk* mRNA and the ventralisation of the eggs without affecting the polarisation of the oocyte microtubule cytoskeleton. The mutant gene could be confined to a region of 20 kb containing four genes with unknown function in oocyte polarity. The final identification of the gene will be done by rescue experiments.

This study describes two novel components which are essential for regulating anterior-posterior and dorso-ventral oocyte polarity in *Drosophila*.

8. Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. S. Roth möchte ich mich für die Chance, meine Doktorarbeit in seinem Labor anfertigen zu dürfen, bedanken und für die Betreuung während meiner Arbeit.

Frau Prof. Dr. Maria Leptin danke ich für die Übernahme des Koreferats.

Prof. Dr. Martin Hülkamp und Dr. Veit Riechmann danke ich für die Übernahme des Vorsitzes und des Beisitzes bei der Disputation.

Veit Riechmann möchte ich für seine Hilfe und stetige Diskussionsbereitschaft sowie für seine konstruktiven Vorschläge zur Arbeit danken.

Ellen Veit danke ich für ihre technische Hilfe verschiedenster Art und Oliver Karst für seine Hilfe bei der Herstellung transgener Fliegen.

Besonderer Dank gilt auch Sajith Dass, Patrick Kalscheuer, Bhupendra Shrivage, Martin Technau und Ying Wang für ihre ständige Kooperation und Hilfsbereitschaft.

Ferner danke ich allen früheren und jetzigen Mitarbeitern der Arbeitsgruppen Roth und Riechmann für die gute Zusammenarbeit und die harmonische Laboratmosphäre.

9. Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen –, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie – abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen – noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen der Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. Siegfried Roth betreut worden.

Köln, den 06.02.2008

Claudia Wunderlich

10. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Wunderlich
 Vorname: Claudia Maria
 Geburtsdatum: 01.10.74
 Geburtsort: Freiburg i. Br.
 Familienstand: ledig
 Staatsangehörigkeit: deutsch

Straße: Arnoldsstr. 14
 Wohnort: 50679 Köln
 Telefon: 0221- 630 86 86

Schulbildung

1981-1985 Besuch der Weiherhof-Grundschule in Freiburg i. Br.
 1985-1989 Besuch des Droste-Hülshoff-Gymnasium in Freiburg i. Br.
 1989-1994 Besuch des Gymnasium Norf in Neuss
 Aug. – Dez. 1991 Aufenthalt als Austauschschülerin in den USA
 an der Hollis/Brookline Highschool in Hollis, N. H.
 Juni 1994 Abitur am Gymnasium Norf in Neuss

Studium

1994-1997 Studium der Rechtswissenschaften an der
 Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf
 1997-2000 Studium der Biologie an der Heinrich-Heine-Universität
 in Düsseldorf
 Feb. 2000 Vordiplom in Biologie an der Heinrich-Heine-Universität
 in Düsseldorf
 2000-2003 Studium der Biologie an der Universität zu Köln
 Diplomprüfung: Hauptfach Entwicklungsbiologie,
 Nebenfächer Genetik und Biochemie
 2002-2003 Diplomarbeit am Institut für Entwicklungsbiologie,
 Universität Köln, bei Prof. Dr. Siegfried Roth

Promotion

Seit April 2003 Doktorarbeit am Institut für Entwicklungsbiologie,
 Universität zu Köln, bei Prof. Dr. Siegfried Roth
 Titel: Genetische und molekulare Analyse von zwei neuen
 Komponenten der Oocytenpolarität in *Drosophila melanogaster*