

Liane Bolke

Charakterisierung der *Drosophila melanogaster annexin* Gene

- 2007 -

Biologie

Charakterisierung der *Drosophila melanogaster annexin* Gene

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften im Fachbereich Biologie
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von
Liane Bolke
aus Damme

- 2007 -

Dekan:	Prof. Dr. N. Sachser
Erster Gutachter:	Prof. Dr. V. Gerke
Zweiter Gutachter:	Prof. Dr. C. Klämbt

Tag der mündlichen Prüfung:	16.10.2007
Tag der Promotion:	19.10.2007

1	Einleitung	1
1.1	Intrazelluläre Signalweiterleitung.....	1
1.2	Intrazellulärer Membranverkehr	2
1.2.1	Der Prozess der Endozytose.....	3
1.2.2	Der Prozess der Exozytose.....	4
1.3	Ca ²⁺ - und membranbindende Proteine.....	5
1.4	Die Proteinfamilie der Annexine	6
1.4.1	Vorkommen und Evolution der Annexine	6
1.4.2	Charakteristische Strukturmerkmale der Annexine	7
1.4.3	Biochemische Eigenschaften der Annexine	9
1.4.4	Subzelluläre Lokalisation verschiedener Annexine	10
1.5	Annexin Funktionen	11
1.5.1	Funktionen während der Endozytose.....	12
1.5.2	Funktionen während der Exozytose	13
1.5.3	Extrazellulär vorkommende Annexine	14
1.5.4	Die Annexin-Aktin-Interaktion.....	15
1.5.5	Annexin Funktion innerhalb der Zytokinese	17
1.5.6	Funktion in der Regulation der Apoptose	17
1.6	Die <i>Drosophila</i> -Annexine.....	18
1.7	Ziel der Arbeit.....	20
2	Material und Methoden	21
2.1	Material	21
2.1.1	Chemikalien	21
2.1.2	Puffer, Medien und Lösungen	21
2.1.3	Vektoren.....	26
2.1.4	Bakterienstämme	26
2.1.5	Primäre Antikörper	27
2.1.6	Sekundäre Antikörper	28
2.1.7	Verwendete Fliegenstämme.....	28
2.1.7.1	Balancer- und Wildtypstämme	28
2.1.7.2	Mutanten, Defizienzen und P-Element Insertionen	29
2.1.7.3	Gal4 Aktivatorlinien	30
2.1.7.4	UAS Effektorlinien	30
2.1.7.5	Weitere Stämme	32

2.1.7.6	Verwendete cDNA Klone.....	32
2.2	Methoden	33
2.2.1	Genetische Methoden	33
2.2.1.1	Sammeln von Embryonen	33
2.2.1.2	Keimbahntransformation	33
2.2.1.3	Präparation der Embryonen	33
2.2.1.4	Injektion der Embryonen	34
2.2.1.5	Selektion transgener Fliegen.....	34
2.2.1.6	Lokalisation der Insertionen	34
2.2.1.7	Das UAS / Gal4 System	34
2.2.1.8	Generierung einer RNAi / GFP Rekombinante.....	35
2.2.1.9	EMS Mutagenese.....	35
2.2.1.10	Exzisionsmutagenese	35
2.2.2	Histologische Methoden	36
2.2.2.1	Antikörperfärbungen.....	36
2.2.2.1.1	<i>whole mount</i> Antikörperfärbung von <i>Drosophila</i> Embryonen	36
2.2.2.1.2	Antikörperfärbung von L3 Imaginalscheiben.....	37
2.2.2.1.3	Hitzefixierung von Imaginalscheiben.....	37
2.2.2.1.4	Antikörperfärbung an Ovarien	38
2.2.2.1.5	Antikörperfärbung extrazellulärer Proteine I.....	38
2.2.2.1.6	Antikörperfärbung extrazellulärer Proteine II.....	38
2.2.2.1.7	Antikörperfärbungen an pupalen Flügeln	38
2.2.2.1.8	Antikörperfärbung von <i>Drosophila</i> Schneiderzellen	39
2.2.2.2	<i>In situ</i> Hybridisierung.....	40
2.2.2.2.1	Fixierung von Embryonen	40
2.2.2.2.2	Hybridisierung der Embryonen.....	40
2.2.2.2.3	Nachweisreaktion.....	41
2.2.2.2.4	Einbetten der Embryonen	41
2.2.2.3	Acridinorange Färbungen.....	41
2.2.2.4	<i>In vivo</i> Zeitrafferaufnahmen.....	42
2.2.2.5	Dextran Aufnahme Versuche	42
2.2.3	Molekularbiologische Methoden.....	42
2.2.3.1	Herstellung einer Digoxigenin markierten Sonde	42
2.2.3.2	Herstellung elektrokompeter Zellen.....	43

2.2.3.3	Bakterientransformation (Elektrotransformation)	44
2.2.3.4	DNA Restriktionen.....	44
2.2.3.5	Gelelektrophorese	44
2.2.3.6	Elution von DNA-Fragmenten aus einem präparativen Gel	44
2.2.3.7	Fällung von DNA	44
2.2.3.8	Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen.....	45
2.2.3.9	Ligation von DNA Fragmenten	45
2.2.3.10	Mini-Präparation von Plasmid DNA.....	45
2.2.3.11	Midi-Präparation von Plasmid DNA.....	46
2.2.3.12	Standard PCR	46
2.2.3.13	Single Embryo PCR	47
2.2.3.14	Aufreinigung von PCR Produkten	47
2.2.3.15	Sequenzierung.....	47
2.2.3.16	Isolierung genomischer DNA aus Fliegen	48
2.2.3.17	Transfektion von S2/S2R+ Zellen.....	48
2.2.3.18	Klonierung der pMal Konstrukte	49
2.2.3.19	Klonierung der pWiz Konstrukte.....	50
2.2.4	Biochemische Methoden.....	51
2.2.4.1	Gewinnung von embryonalen Proteinextrakten.....	51
2.2.4.2	Gewinnung von S2-Zell Proteinextrakten	51
2.2.4.3	Nachweis extrazellulärer Proteine in S2R+ Zellkultur.....	51
2.2.4.4	Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen.....	52
2.2.4.5	Western-Blot und Immunodetektion von Proteinen	52
2.2.4.6	Expression von Maltose Fusionsproteinen im großen Maßstab.....	52
2.2.4.7	Beschichtung einer Sepharosesäule mit einem Fusionsprotein	53
2.2.4.8	Aufreinigung des Antiserums	53
2.2.5	Sequenzanalysen.....	54
3	Ergebnisse.....	55
3.1	<i>Drosophila</i> -Annexine.....	55
3.1.1	Modularer Aufbau der <i>Drosophila</i> -Annexine	55
3.1.2	Sequenzanalyse der <i>Drosophila</i> -Annexine	56
3.2	Expressionsstudien der <i>Drosophila-annexin</i> Gene	58
3.2.1	Die mRNA Expression der <i>annexine</i>	58
3.2.2	Überexpressionsstudien.....	59

3.2.3	Charakterisierung der Annexin Antiseren.....	63
3.2.4	Die Annexin Antiseren erkennen spezifisch ihr jeweiliges Protein	64
3.2.5	Analyse der zellulären Lokalisation mithilfe von Annexin-GFP-Fusionsproteinen.....	73
3.2.5.1	GFP-Fusionen verschiedener Annexine kolokalisieren mit aktinreichen Strukturen in S2R+ Zellen	75
3.3	Lokalisation von Annexin B11 ^{long}	78
3.3.1	Die Überexpression von Annexin B11 ^{long} führt zur Bildung vesikelähnlicher Strukturen.....	78
3.3.2	Annexin B11 ^{long} lokalisiert an der apikalen Membran polarer Zellen	81
3.3.3	Annexin B11 ^{long} lokalisiert anteilig extrazellulär.....	84
3.3.4	Annexin B11 ^{long} Kolokalisationsstudien	89
3.3.4.1	Nur überexprimiertes Annexin B11 ^{long} -GFP kolokalisiert mit Dextran.....	89
3.3.4.2	Annexin zeigt keine Kolokalisation mit Rab-positiven Strukturen	93
3.3.5	Die Lokalisation von Spectrin wird durch Annexin B11 ^{long} Überexpression nicht beeinflusst	93
3.4	Funktionelle Analyse der <i>Drosophila</i> -Annexine.....	97
3.4.1	Herabregulation der <i>annexin</i> Expression	97
3.4.2	Analyse von <i>off target</i> Kandidaten	97
3.4.3	Charakterisierung der <i>annexin</i> -RNAi Phänotypen.....	100
3.4.3.1	<i>annexin</i> -RNAi führt zu starken Zelldefekten	100
3.4.3.2	Der <i>annexin</i> -RNAi Phänotyp ist auf andere Gewebe übertragbar.....	104
3.4.3.3	Unterschiedliche <i>annexin</i> -RNAi-Konstrukte zeigen variable Effektivität.	106
3.4.3.4	<i>annexin</i> -RNAi führt zu Defekten in der Augenentwicklung.....	107
3.5	Funktionelle Analyse von Annexin B11 ^{long}	113
3.5.1	Der durch <i>annexin b11^{long}</i> -RNAi hervorgerufene Phänotyp entsteht während der larvalen und pupalen Entwicklung von <i>Drosophila</i>	113
3.5.2	<i>annexin b11^{long}</i> -RNAi führt zu vermehrtem Zelltod.....	114
3.5.3	Der <i>annexin b11^{long}</i> -RNAi Phänotyp beruht auf Apoptose.....	117
3.5.4	Die planare Zellpolarität ist im <i>annexin b11^{long}</i> -RNAi Hintergrund nicht beeinträchtigt.....	122
3.5.5	Die Reduktion von <i>annexin b11^{long}</i> in der Zelle ändert nicht die Verteilung von Membranmarkern	123

3.5.6	Spectrine lokalisieren auch im <i>annexin b11^{long}</i> -RNAi Hintergrund wildtypisch.....	127
3.5.7	Die Zellteilung wird durch <i>annexin b11^{long}</i> -RNAi nicht beeinflusst.....	127
3.5.8	Der beschriebene Phänotyp lässt sich nicht über die Dynamin Mutante <i>shibire</i> modifizieren	130
3.6	Mutageneseansätze	131
3.6.1	EMS Mutagenese von <i>annexin b9</i>	131
3.6.2	Komplementationsanalyse	132
3.6.3	Exzisionsmutagenese von <i>annexin b10</i>	135
3.6.4	Exzisionsmutagenese von <i>annexin b9</i>	137
3.7	Redundante Funktionen der Annexine	140
3.7.1	Redundanz in <i>Drosophila</i>	140
4	Diskussion	143
4.1	Die Proteinfamilie der Annexine	143
4.1.1	Die <i>Drosophila</i> -Annexine zeigen die spezifischen Annexin-Eigenschaften	143
4.1.2	Die <i>Drosophila</i> -Annexine werden ubiquitär exprimiert und zeigen eine distinkte Lokalisation in der Zelle	146
4.1.3	Annexin B11 ^{long} ist an der apikalen Membran lokalisiert	148
4.1.4	Ein Anteil des Annexin B11 ^{long} -Proteins wird sekretiert.....	148
4.2	Die Überexpression der <i>Drosophila</i> -Annexine erzeugt keinen offensichtlichen Effekt	150
4.3	Die Mutagenese der <i>Drosophila-annexin</i> Gene	151
4.3.1	Die Mutagenese von <i>annexin b9</i>	151
4.3.2	Die Mutagenese von <i>annexin b10</i>	152
4.3.3	Redundanz innerhalb der Annexin Familie.....	152
4.4	Die Reduktion der Annexin Expression.....	154
4.4.1	Die Spezifität der Expressionsreduktion.....	154
4.4.2	Die Expression der <i>annexin b10</i> dsRNA führt nicht nur zu einer Reduktion der Annexin B10-Expression	154
4.4.3	Annexin B11 ^{long} hat einen regulatorischen Effekt auf Annexin B10.....	155
4.4.4	Die Reduktion der Annexin Expression verursacht starke Zelldefekte ...	156
4.4.5	Die Reduktion der Annexin Expression führt zu Apoptose	157
4.4.5.1	Annexin als Regulator von Apoptose	158

4.4.6	Verschiedenste Zelldefekte können die Induktion der Apoptose einleiten ...	159
4.4.6.1	Die Annexin Expression wird nicht für die Aufrechterhaltung der planaren Zellpolarität benötigt	159
4.4.6.2	Der Verlust der Annexin Expression führt zu keiner Veränderung der Organisation des Spectrin-Zytoskeletts.....	160
4.4.6.3	Der Verlust der Annexin Expression führt zu keiner Veränderung der Organisation des F-Aktin-Zytoskeletts.....	160
4.4.6.4	Es konnte keine Annexin Funktion während der Zytokinese nachgewiesen werden	161
5	Zusammenfassung	162
	Literaturverzeichnis	163
	Abbildungsverzeichnis	175
	Abkürzungsverzeichnis	177
	Anhang	178
	Erklärung.....	199
	Lebenslauf.....	200
	Danksagung	201

1 Einleitung

1.1 Intrazelluläre Signalweiterleitung

Eine Zelle ist darauf angewiesen, auf äußere Umweltreize reagieren zu können. Die intrazelluläre Signalweiterleitung ist folglich sowohl für einzellige als auch für mehrzellige Organismen von essenzieller Bedeutung. Nur durch exakt regulierte Signalmechanismen kann das Verhalten der einzelnen Zellen im Gewebe zum Vorteil des gesamten Organismus aufeinander abgestimmt werden. Um dies zu gewährleisten, muss ein Reiz zunächst erkannt, daraufhin umgewandelt und im Inneren der Zelle weitergeleitet werden. An diesem Prozess ist auf mehreren, nacheinander geschalteten Ebenen von der Reizverarbeitung über den Rezeptor bis hin zur Weiterleitung und Verarbeitung über Effektormoleküle eine Vielzahl von Enzymen, Kanälen und regulatorischen Proteinen beteiligt (Alberts 1995). Eine besondere Bedeutung kommt dabei den sekundären Botenstoffen (*second messenger*) zu. Sie stellen Zwischenstationen innerhalb der Signalweiterleitung dar und können auch ihrerseits verschiedene Signalwege aktivieren. Beispiele hierfür sind zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP), Calciumionen (Ca^{2+}) und Inositoltrisphosphat (Stryer 1996). Um ihre Aufgaben zu erfüllen, ist es notwendig, dass alle Botenstoffe in exakt regulierter Konzentration in die Zelle gelangen bzw. dort generiert werden. Zunächst muss demzufolge z. B. der Spiegel an freiem Ca^{2+} im Zytosol niedrig gehalten werden, während er im extrazellulären Raum und im endoplasmatischen Retikulum (ER) relativ hoch ist. Zu diesem Zweck benötigen alle Zellen Transportsysteme für die Ausschleusung von Ca^{2+} , diese beinhalten vor allem Ca^{2+} -ATPasen, den Ca^{2+} -/ Na^{2+} -Austauscher und Ca^{2+} -bindende Proteine (Stryer 1996). Durch deren Aktivität entsteht sowohl an der Plasmamembran als auch an der ER-Membran ein Konzentrationsgefälle. Wenn ein Signal vorübergehend Ca^{2+} -Kanäle öffnet, strömt Ca^{2+} in das Zytosol ein, dies führt dort zu einer drastischen Erhöhung der relativen Ca^{2+} -Konzentration, wodurch nachgeschaltete, Ca^{2+} -abhängige Proteine in der Zelle aktiviert werden. Durch die niedrig gehaltene Konzentration des freien Ca^{2+} kann schon eine geringe absolute Konzentrationsänderung direkt zur Signaltransduktion genutzt werden. Ein weiterer Vorteil von Ca^{2+} als Botenstoff ist seine Eigenschaft, mehrere Liganden zu binden und trotzdem selektiv zu wirken (Stryer 1996).

1.2 Intrazellulärer Membranverkehr

Zellmembranen sind für das Überleben einer Zelle essenziell. Die Plasmamembran umschließt die Zelle und bildet die Grenze zwischen ihr und ihrer Umgebung. Die Aufnahme von Nährstoffen und jegliche Kommunikation der Zelle zu Nachbarzellen oder der Umgebung müssen über diese Struktur geschehen. Trotz ihrer durchaus auch unterschiedlichen Funktionen haben alle biologischen Membranen eine gemeinsame Grundstruktur aus einer Lipiddoppelschicht, in die Proteine eingelagert sind. Zelluläre Membranen zeigen eine hoch dynamische Organisation (Alberts 1995). So können sich verschiedene Membrandomänen in ihrer Protein- und Lipidzusammensetzung deutlich unterscheiden. Die Membran muss in ihrem Aufbau reguliert und stabilisiert werden, damit sie als Basis für Signalweiterleitung, Zell-Zell Interaktion und Migration dienen kann. Sobald Zellen in Kontakt miteinander treten oder im Zusammenhang eines Gewebes liegen, müssen sie miteinander kommunizieren. Essenzielle Moleküle wie Aminosäuren oder Zucker können die Plasmamembran über integrale Membrantransporter oder Membrankanäle passieren. Makromoleküle können nur über membrangebundene Vesikel in die Zelle gelangen (Alberts 1995). Auf diese Weise wird der Zelle ermöglicht, über die Kontrolle des Internalisierungsprozesses den Eintritt von Molekülen in die Zelle zu regulieren. So können Entwicklung, Immunantwort, interzelluläre Kommunikation und Signaltransduktion vermittelt werden.

An allen biologischen Membranen ist die Spezifität von Fusionsprozessen essenziell, um die Identität der Organellen aufrecht zu erhalten (Zerial and McBride 2001). Es kommt zunächst zu einer Vorsortierung über Rab Proteine (s. u.), nachfolgend sichern spezielle integrale Proteine sowohl an der Vesikelmembran (v-SNAREs) als auch an der Plasmamembran (t-SNAREs) die präzise Fusion zwischen zwei Membranen. Sie binden aneinander und ermöglichen so die benötigte Ausrichtung der Membranen zueinander und die folgende Membranfusion (Jahn, Lang et al. 2003). SNAREs sind auf jeder Organellmembran vorhanden. Dementsprechend ist eine zusätzliche Kontrollinstanz notwendig, um abzusichern, dass ein SNARE-Komplex sich nur zum richtigen Zeitpunkt am richtigen Ort bilden kann (Zerial and McBride 2001). Die Selektivität des Vesikeltransports wird von monomeren GTPasen, den Rab Proteinen und ihren Effektoren kontrolliert (Zerial and McBride 2001). Rab Proteine stellen die größte Familie von monomeren kleinen GTPasen

dar. Im Menschen gibt es bis zu 63 vorhergesagte Mitglieder. Die intrazelluläre Membranorganisation wird so streng reguliert. Die einzelnen Rab Proteine lokalisieren an verschiedenen Kompartimenten, so z. B. Rab5 an Clathrin umhüllten Vesikeln, Rab4 an frühen Endosomen und Rab11 an Recyclingvesikeln (Zerial and McBride 2001).

1.2.1 Der Prozess der Endozytose

Die Endozytose ist die Internalisierung von Plasmamembran umhüllten Vesikeln oder Endosomen in das Zytoplasma (Fischer, Eun et al. 2006). Innerhalb der Endozytose wird zwischen Phagozytose und damit der Aufnahme großer Moleküle und der Pinozytose, also der Aufnahme flüssiger Substanzen differenziert. Die Pinozytose kann wiederum in verschiedene Mechanismen unterteilt werden, dazu zählt die Makropinozytose, die Clathrin vermittelte Endozytose, die Caveolin abhängige Endozytose und die Clathrin- und Caveolin- unabhängige Endozytose (Conner and Schmid 2003). Diese mechanistische Diversität und deren strikte Regulation ermöglichen erst die komplexen physiologischen Vorgänge zwischen Zellen. Endozytierte Moleküle können neben Nährstoffen und anderen Molekülen z. B. auch wiederverwendete Rezeptoren mit ihren gebundenen Liganden oder zur Herabregulation bestimmte Rezeptoren sein (Gruenberg 2001). Nach dem Abschnüren der endozytotischen Vesikel von der Plasmamembran gelangen diese zunächst zu frühen Endosomen innerhalb der Zelle, wodurch eine Veränderung hin zu einem saureren Milieu z. B. eine Konformationsänderung des Rezeptor-Liganden-Komplexes erfolgt, die zur Freisetzung von Liganden führen kann. Hier findet somit eine Sortierung der aufgenommenen Komponenten statt. Während wiederverwendete Rezeptoren anschließend über Recyclingendosomen zurück zur Plasmamembran gebracht werden können, gelangen die Liganden meist mit anderen endosomalen Inhaltsstoffen und zur Degradation bestimmten Rezeptoren über späte Endosomen in lysosomale Kompartimente und werden dort abgebaut (Gruenberg 2001).

Viele Daten sprechen dafür, dass Endozytose nicht nur für die Aufnahme von Nährstoffen genutzt wird, sondern auch eine entscheidende Rolle in der Signalvermittlung innerhalb von Entwicklungsprozessen einnimmt. Beispielhaft sei hier die Kommunikation zwischen Zellen über Konzentrationsgradienten sekretierter Signalmoleküle erwähnt. Diese sogenannten Morphogene werden jeweils in Zellen

eines spezifischen Bereichs des Gewebes produziert und dort sezerniert. Abhängig von der Entfernung zur Signalquelle ergibt sich für jeden Ort im Gewebe ein spezifischer Konzentrationsgradient. Die Zellen erhalten so Informationen über ihre eigene relative Position im Gewebe (Dudu, Pantazis et al. 2004). In *Drosophila* wurde z. B. die Funktionsweise des Morphogens Decapentaplegic (Dpp) genauer analysiert. Ein früheres Modell besagt, dass sich Dpp lediglich durch Diffusion im extrazellulären Raum ausbreitet (Lander, Nie et al. 2002). Neuere Daten machen das Modell der sogenannten Transzytose wahrscheinlicher. Hierbei kommt es laufend zur Endozytose auf einer Seite der Zelle und anschließender Resekretion auf der anderen Seite (Dudu, Pantazis et al. 2004). Experimente mit GFP (grün fluoreszierendes Protein) markiertem Dpp konnten zeigen, dass GFP-Dpp keineswegs nur durch den extrazellulären Raum diffundiert, sondern auch innerhalb von Zellen lokalisiert ist (Entchev, Schwabedissen et al. 2000). Ein weiterer Hinweis auf transzytotische Prozesse ergibt sich aus der Dynamin-Abhängigkeit der Dpp Signalweiterleitung (Gonzalez-Gaitan and Jackle 1999). Dynamin wird für die endozytotische Abschnürung der Vesikel von der Plasmamembran benötigt (Conner and Schmid 2003). Mithilfe der thermosensitiven Dynamin Mutation *shibire* kann Endozytose inhibiert werden. Wird *shibire* als dominant negativ wirkende Mutante im Gewebe exprimiert, wird kein Dpp Gradient mehr ausgebildet (Entchev, Schwabedissen et al. 2000). Dies zeigt deutlich, dass Endozytose auch im Gewebe eine wichtige Rolle innerhalb der Signalweiterleitung spielt.

1.2.2 Der Prozess der Exozytose

Die Sekretion von Proteinen, Polypeptiden und Neurotransmittern erfolgt durch Exozytose. Sekretorische Vesikel schnüren sich vom trans-Golgi-Netzwerk ab und geben ihre Inhaltsstoffe nach Fusion mit der Plasmamembran an ihre Umgebung ab (Morgan 1995).

Damit der Vorgang der regulierten Exozytose ablaufen kann, wird ein stimulusabhängiger Ca^{2+} -Einstrom benötigt. Wie Ca^{2+} diesen Prozess beeinflusst und über welche Mediatoren das Signal weitergeleitet wird, ist nicht genau bekannt. Eine Reihe von Ca^{2+} -bindenden Proteinen sind an den betreffenden Membranen nachweisbar und können dort verschiedenste Aufgaben während des Vorgangs der Exozytose erfüllen (Gerke, Creutz et al. 2005).

Für alle, die Membran betreffenden Vorgänge spielt ihre Organisation eine wichtige Rolle. Veränderungen in der Membranzusammensetzung können zu veränderten Eigenschaften kleinerer Subdomänen führen z. B. während der Formation von Membranausläufern (McMahon and Gallop 2005; van Meer and Vaz 2005). Integrale und peripher assoziierte Membranproteine sind in der Lage, die Dynamik und die Zusammensetzung der Membran zu regulieren. Dies beruht entweder auf direktem oder häufig auch auf indirektem Weg auf einem Zusammenspiel von membranbindenden Proteinen und dem Zytoskelett. Dabei sind zum einen Proteine beteiligt, die bei der Formation von Vesikeln an verschiedenen Organellstrukturen mithelfen, zum anderen Proteine, die als Membranadaptoren und Stabilisatoren wirken. Die Familie der Annexine bildet eine mögliche Komponente in der Regulation von Membranorganisation. Dies ergibt sich aus der Ca^{2+} -abhängigen peripheren Membranbindung (Gerke, Creutz et al. 2005), aber auch aus der möglichen Interaktion mit dem Zytoskelett (Hayes, Rescher et al. 2004).

1.3 Ca^{2+} - und membranbindende Proteine

Ein Bindeglied zwischen den Ca^{2+} -Signal weiterleitenden Prozessen und membranabhängigen Vorgängen bilden Ca^{2+} -bindende Proteine. Auch wenn Ca^{2+} -bindende Proteine diverse Funktionen ausüben können, ist es möglich, sie über die Eigenschaften ihrer Ca^{2+} -Bindestelle in verschiedene Gruppen einzuordnen.

Die Mitglieder der EF-Hand Superfamilie bilden die größte Familie Ca^{2+} -bindender Proteine. Sie tragen als Strukturmerkmal die EF-Hand, ein Helix-Loop-Helix Motiv. Dieses bildet eine Ca^{2+} -Bindestelle und besteht aus einer α -Helix, einer angrenzende Schleife und einer weiteren α -Helix. Dabei sind mit jedem Ca^{2+} -Ion sieben Sauerstoffatome, die von den Carboxyl- und Hydroxylresten der Seitenketten zur Verfügung gestellt werden, koordiniert (Kretsinger 1980). Beispielhaft für ein EF-Hand tragendes Molekül ist Calmodulin, welches in nahezu allen eukaryotischen Zellen als Calciumsensor dient. Wenn der zytoplasmatische Calciumspiegel steigt, wird Calmodulin durch die Bindung von drei oder vier Ca^{2+} -Ionen aktiviert. Es stimuliert daraufhin eine große Anzahl von Enzymen, Pumpen und anderen Zielproteinen, z. B. die calmodulinabhängige Protein Kinase II, die daraufhin in der Lage ist, verschiedene Proteine zu phosphorylieren und dadurch den Energiestoffwechsel, die Ionenpermeabilität sowie die Synthese und Freisetzung von Neurotransmittern entscheidend zu regulieren (Persechini, Moncrief et al. 1989).

Die Familie der Annexine bildet die zweite wichtige Gruppe Ca^{2+} -bindender Proteine. Die Ca^{2+} -Bindestellen der Annexine, die sogenannten Typ II Bindestellen, unterscheiden sich grundlegend von dem zuvor beschriebenen EF-Hand Motiv. Hier werden die Ca^{2+} -Ionen durch die Sauerstoffatome dreier Carbonyl- und zweier Carboxylreste und Wassermoleküle koordiniert (Gerke, Creutz et al. 2005).

1.4 Die Proteinfamilie der Annexine

1.4.1 Vorkommen und Evolution der Annexine

Der Name Annexin leitet sich vom griechischen „annex“ ab, was soviel bedeutet wie „zusammen bringen“ oder „zusammen halten“. Er soll auf die Fähigkeit der Annexine hindeuten, Strukturen wie Membranen zu binden und sie so z. B. in unmittelbare Nähe zueinander zu bringen (Gerke and Moss 2002). Ein Mitglied der Annexin Proteinfamilie muss per Definition zwei generelle Kriterien erfüllen. Funktionell muss es in Ca^{2+} -Abhängigkeit an negativ geladene Phospholipide binden können, des Weiteren muss es strukturell konservierte Elemente, die sogenannten Annexin *repeats* aufweisen (Gerke and Moss 2002). Über 160 Vertreter der Annexin Superfamilie wurden bisher in mehr als 65 Spezies identifiziert (Gerke and Moss 2002). Mitglieder gibt es in fast allen eukaryotischen Organismen, jedoch nicht in Prokaryoten (Moss and Morgan 2004). Meist findet man 1 – 20 *annexin* Gene pro Spezies, wobei selbst der Protist *Giardia lamblia* mindestens sieben aufweist. Nach der vorgegebenen Nomenklatur werden die Annexine der Vertebraten als „A“ Familie bezeichnet. Bisher wurden in dieser Gruppe zwölf Gene mit verschiedenen Isoformen identifiziert, ihre Mitglieder heißen Annexin A1 – A11 und A13. Alle Nichtvertebraten-Vertreter werden in folgende Familien eingeordnet: „B“ (Invertebraten, Annexine ohne humanes Ortholog), „C“ (Pilze und einzellige Eukaryoten), „D“ (Pflanzen) und „E“ (Protisten) (Moss and Morgan 2004).

Während der Evolutionsgeschichte der Annexine kam es immer wieder zu unabhängigen Duplikationen und Veränderungen. So besitzen alle pflanzlichen Annexine keine N-terminale Domäne und ihnen fehlen die Calciumbindestellen im zweiten und dritten Annexin *repeat* (Clark, Thompson et al. 2001). Fast alle Annexine aus Vertebraten zeigen den, für die Proteinfamilie typischen Aufbau aus einem Annexin *core*, der die vier Annexin *repeats* beherbergt und einer N-terminalen

Domäne, die sehr variabel ausfallen kann. Eine Ausnahme bildet Annexin A6. Dieses Protein enthält acht *repeats* und folglich zwei Annexin *core* Domänen. Es entstand wahrscheinlich aus der Fusion von duplizierten *annexin A5* und *annexin A10* Genen in der frühen Evolutionsgeschichte der Vertebraten (Moss and Morgan 2004). Mitglieder der „B“ Familie, zu denen auch die *Drosophila-annexine* gehören, sind ebenfalls aus verschiedenen Duplikationsereignissen hervorgegangen. Insgesamt hat dies zu über 20 Vertretern geführt, deren Homologien untereinander und zu den Annexinen der Vertebraten variieren. Auch innerhalb der Annexine der Insekten zeigt sich das komplexe Muster von Duplikationen und Verlust individueller Annexinvertreter. So enthalten die Genome von Tsetse Fliege und Moskito jeweils vier *annexin* Gene, während das Genom von *Drosophila*, der Honigbiene und der Seidenspinnerraupe nur drei *annexin* Gene beinhaltet (Moss and Morgan 2004).

1.4.2 Charakteristische Strukturmerkmale der Annexine

Die Annexine besitzen eine charakteristische Domänenstruktur. Sie sind aus einer hochkonservierten, als *core* bezeichneten Domäne, welche sich aus vier Untereinheiten, den Annexin *repeats* zusammensetzt, aufgebaut. Jedes *repeat* ist etwa 70 Aminosäuren lang und entwickelt fünf α -Helices (Abb. 1A). Die *repeats* enthalten das charakteristische Typ II Ca^{2+} -Bindemotiv mit der Sequenz „GxGT-(38 Aminosäurereste)-D/E“. Hier findet dementsprechend sowohl die Ca^{2+} - als auch anschließend die Membranbindung des Moleküls statt (Moss and Morgan 2004) (Abb. 1B). Die vier *repeats* bilden zusammen den *core*, indem die fünf Helices jeder Wiederholung insgesamt eine Superhelix bilden. Schon 1990 konnten Huber et al. über Kristallstrukturanalysen die detaillierte Struktur von Annexin A5 beschreiben (Huber, Romisch et al. 1990; Huber, Schneider et al. 1990). So nimmt der Annexin *core* die Struktur einer leicht gebogenen Scheibe mit zwei voneinander unterscheidbaren Seiten an, wobei die konvexe Oberfläche der Membran zugewandt ist. Der Annexin *core* wirkt somit in seiner Gesamtheit als Membran-Binde-Domäne (Moss and Morgan 2004). Die konkave, dem Zytosol zugewandte Seite, bleibt dabei frei für Interaktionen (Gerke, Creutz et al. 2005) (Abb. 1B). Strukturanalysen haben gezeigt, dass alle untersuchten Annexine eine hochkonservierte Sekundär- und Tertiärstruktur ihrer *core* Domäne aufweisen (Liemann and Huber 1997). Dabei wurden die humanen Annexine A3, A6, verkürzte Formen von A1 und A2, aber auch nicht-humane Annexine wie z. B. Annexin 12 aus *Hydra vulgaris* und Annexin 7 aus

Dictyostelium discoideum verglichen. Die Konservierung liegt in allen betrachteten Organismen vor.

Die N-terminale Domäne ist in ihrer Ausprägung in den unterschiedlichen Annexinen deutlich variabler. So kann diese Domäne nur 11-19 Aminosäurereste enthalten (Annexin A3, A4, A5, A6, A10, A12, A13) oder mit über 100 Aminosäureresten deutlich länger ausfallen (Annexin A7, A11) (Gerke and Moss 1997). Kristallstrukturanalysen konnten zeigen, dass sie meist als separate Struktur an der konkaven Seite des Moleküls zu finden ist (Swairjo and Seaton 1994; Liemann and Lewit-Bentley 1995) (Abb. 1). Für Annexin A1 haben Rosengarth et al. beschrieben, dass der N-Terminus zum Teil in den *core* eingelagert wird. Dadurch wird eine der α -Helices aus *repeat* 3, die an der Ca^{2+} -Bindung beteiligt ist, teilweise entwunden. Nach dem vorgeschlagenen Modell stellt diese Konformation ohne Ca^{2+} die inaktive Form des Moleküls dar. Ca^{2+} -Bindung führt zum „Ausklappen“ des N-Terminus, woraufhin auch die α -Helix wieder gewunden wird und das Molekül aktiv vorliegt (Rosengarth and Luecke 2003). Viele zytosolische Proteine können an die N-terminale Domäne von Annexin binden. In einigen Fällen handelt es sich um Mitglieder der EF-Hand tragenden S100 Proteinfamilie (Gerke and Moss 2002). Die in diesem Bereich am besten beschriebenen Komplexe sind Annexin A2-S100A10 und Annexin A1-S100A11 (Rety, Osterloh et al. 2000; Rescher and Gerke 2007). Für beide konnte gezeigt werden, dass der absolut N-terminale Teil des Annexinmoleküls für diese Bindung verantwortlich ist (Gerke, Creutz et al. 2005). Da ein S100 Dimer zwei Annexinmoleküle binden kann, ergibt sich ein symmetrischer Komplex aus je zwei S100 und zwei Annexinmolekülen (Lewit-Bentley, Rety et al. 2000). Neben diesen direkten Interaktionen mit Proteinen finden auch posttranskriptionale Modifikationen des N-terminalen Abschnitts statt, wie die Myristoylierung von Annexin A13 oder Serin-/Threonin- bzw. Tyrosin-Phosphorylierungen von Annexin A1, A2, A4, A6 und A7. Diese können z. B. zu Affinitätsänderungen für die Calcium- oder Phospholipidbindung führen (Hayes, Rescher et al. 2004; Gerke, Creutz et al. 2005).

Eine Vorstellung, wie Annexine Membranbindungen oder Interaktionen vermitteln, ergibt sich aus dem zuvor beschriebenen Beispiel der Annexin-S100 Proteinkomplexe. So ist es möglich, dass über die Dimerisierung und die Annexinbindung nicht nur die Annexinmoleküle in unmittelbare Nähe zueinander

gebracht werden, sondern auch die an die *core* Domäne gebundenen Membranen (Abb. 1C) (Lewit-Bentley, Rety et al. 2000; Sopkova-de Oliveira Santos, Oling et al. 2000). Auf diese Weise wird eine Struktur gebildet und stabilisiert, die die Fusion der Membranen erleichtern kann. Allerdings konnten Wang et al. zeigen, dass die *core* Domäne selbst in isolierter Form Membranaggregation fördern kann (Wang and Creutz 1994). Dies zeigt, dass es neben dem vorher beschriebenen Modell eine weitere Möglichkeit der Annexin-Membran Bindung gibt, bei der die N-terminale Domäne nicht essenziell beteiligt ist.

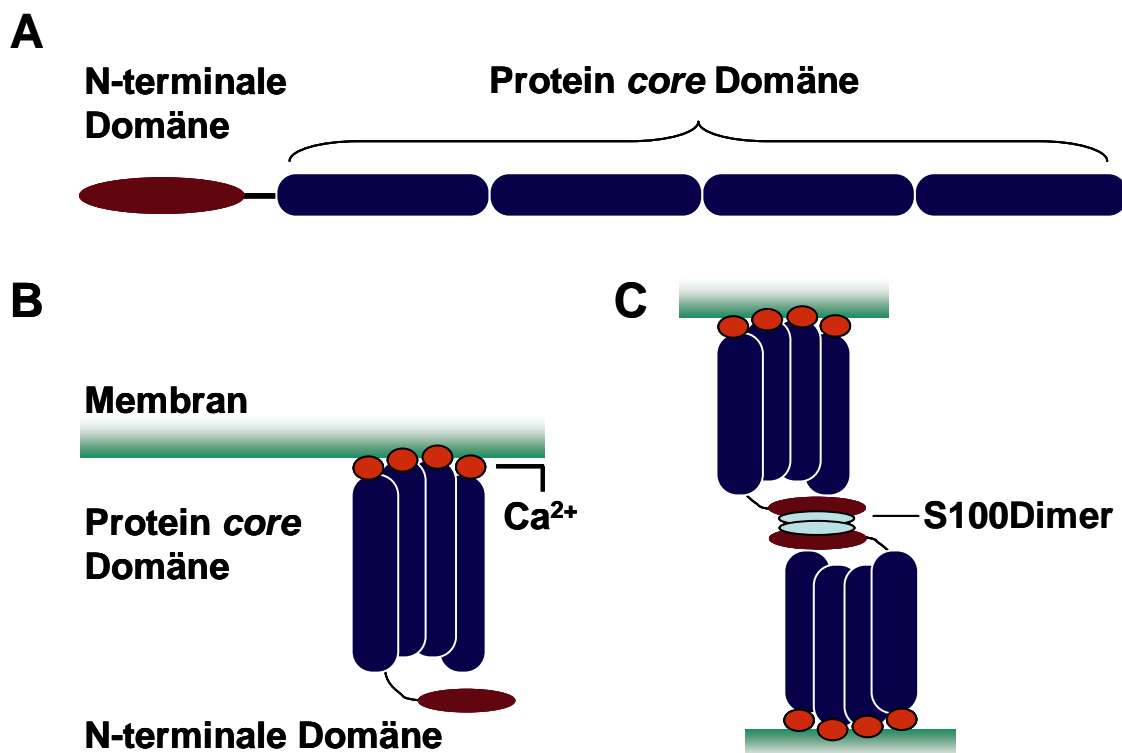


Abb. E1: Schematische Darstellung der Annexin-Domänenstruktur

A Annexine enthalten eine variable N-terminale Domäne (rot) und einen Protein core, der aus vier charakteristischen *repeats* aufgebaut ist (blau). **B** Die Ca²⁺-Bindestellen liegen, wie auch die Membranbindestelle auf der konvexen Seite des Moleküls innerhalb der *repeats*. **C** Eine Annexin-abhängige Bindung zweier Membranen kann z. B. über S100 Proteine vermittelt werden.

1.4.3 Biochemische Eigenschaften der Annexine

In biochemischer Hinsicht handelt es sich bei den Annexinen um eine Familie löslicher, hydrophiler Proteine, die Ca²⁺-abhängig und reversibel an negativ geladene Phospholipide binden können. Diese Bindung kann durch Zugabe von Chelatbildnern aufgehoben werden. Die freie Ca²⁺-Konzentration, die für die Bindung benötigt wird, schwankt dabei sehr stark und variiert von 20 µM (Annexin A5) bis zu weniger als

100 nM (Annexin A2-S100A10) (Gerke, Creutz et al. 2005). Annexine können somit auf ein weites Spektrum an Ca^{2+} -Stimuli reagieren, wobei es meistens ein spezifisches Optimum der Ca^{2+} -Konzentration für jedes Annexin gibt. Die Bindung von Ca^{2+} findet über die sogenannte Typ II Bindestelle statt (s. o.). Im Vergleich zum EF-Hand-Motiv ist die Ca^{2+} -Affinität geringer (Raynal and Pollard 1994). In der Anwesenheit von Phospholipiden erhöht sie sich jedoch um ca. das Hundertfache. Im Gegenzug führt auch die Anwesenheit von Ca^{2+} zu erhöhter Affinität für saure Phospholipide. Präferiert werden im Allgemeinen saure Phospholipide, Phosphatidylserin und Phosphoinositol (Raynal and Pollard 1994). Die Annexin-Phospholipid-Interaktionen können auch deutlich spezifischer ausfallen. So bindet Annexin A2 an Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat, Annexin A5 an Phosphatidylcholin und die Annexine A3, A4, A5 und A6 sind in der Lage, mit Phosphatidylethanolamin zu interagieren (Gerke, Creutz et al. 2005).

In Abwesenheit von Ca^{2+} -Ionen können die meisten Annexine als lösliche Proteine isoliert werden. Jedoch wurde für einige Annexine zusätzlich eine Ca^{2+} -unabhängige Membranbindung nachgewiesen. So zeigten Jost et al., dass Annexin A2 auch in der Anwesenheit von Chelatbildnern mit endosomalen Membranen assoziiert bleibt. Die Assoziation wird allerdings durch bestimmte Deletionen im N-terminalen Teil des Moleküls verhindert (Jost, Zeuschner et al. 1997). Diese Art der Membranbindung scheint somit Ca^{2+} -unabhängig zu sein und über die N-terminale Domäne vermittelt zu werden.

1.4.4 Subzelluläre Lokalisation verschiedener Annexine

Annexine sind grundsätzlich zytosolische Proteine. In Zellkulturexperimenten konnte gezeigt werden, dass die Rekrutierung zu spezifischen Membranen erst nach einem Ca^{2+} -Stimulus erfolgt (Rescher and Gerke 2004).

Innerhalb einer vergleichenden Lokalisationsanalyse für die Annexine A1-A5 in J774 Makrophagen und in isolierten Phagosomen stellte sich heraus, dass alle untersuchten Annexine an der Plasmamembran und an Phagosomen zu finden sind. Die Lokalisation an anderen untersuchten Organellen zeigt ein differenzierteres Bild. So wurden die Annexine A1, A2, A3 und A5 an frühen Endosomen nachgewiesen, während nur Annexin A5 auch an späten Endosomen und Mitochondrien zu finden ist (Diakonova, Gerke et al. 1997). Die Annexine A1 und A2 zeigen überlappende Lokalisation mit F-Aktin Strukturen an der Plasmamembran und in

Membranausläufern (Diakonova, Gerke et al. 1997). Die Bindungsspezifität der einzelnen Annexine für ihre Zielmembranen kann bereits entscheidend durch die *core* Domäne bedingt sein. So lokalisiert der Annexin A1 *core* an Endosomen und der Annexin A4 *core* an der Plasmamembran, im Gegensatz dazu verbleibt der Annexin A2 *core* im Zytosol (Gerke and Moss 2002).

Wie oben beschrieben, ist die *core* Domäne der Annexine hochkonserviert, somit müssen schon kleine Unterschiede innerhalb der Sequenz verantwortlich für die Spezifität der Bindung an unterschiedliche Membranen und folglich die Lokalisation der Annexine sein. Weitere Spezifität vermittelt dabei der N-terminale Anteil, da intakte Annexinproteine im Vergleich zu trunkierten Proteinen, die nur noch den *core* enthalten, teilweise andere Verteilungen innerhalb der Zelle zeigen (Gerke and Moss 2002).

Ein Großteil der Lokalisationsstudien basiert auf *in vitro* Studien oder fixierten Zellpräparaten. Allerdings konnte mithilfe von GFP markiertem Annexin A1 in lebenden HeLa-Zellen gezeigt werden, dass es wiederum an Endosomen lokalisiert (Rescher, Zobiack et al. 2000).

Daneben kommt es jedoch auch zu unerwarteten Verteilungen innerhalb und außerhalb der Zelle. So können verschiedene Annexine auch in den Kern gelangen. Für die Annexine A5 und A6 gilt dies infolge von oxidativem Stress. Sie werden unter diesen Bedingungen in HUVEC-Zellen vom Zytosol in den Kern verlagert (Sacre and Moss 2002). Für Annexin A7 wurde beschrieben, dass es innerhalb der normalen Entwicklung der Maus im Stadium E16 vom Zytosol in den Kern gelangt (Rick, Ramos Garrido et al. 2005). Die Rolle dieser Verlagerung und folglich innerhalb des Kerns konnte noch nicht geklärt werden.

Des Weiteren wurden Annexine auch außerhalb der Zelle beschrieben. Dieser Punkt wird in Abschnitt 1.5.3 wieder aufgegriffen.

1.5 Annexin Funktionen

Obwohl Annexine in ihrer Struktur gut charakterisiert wurden, war ihre Funktion lange nicht genau beschrieben. Durch ihre Eigenschaft, Ca^{2+} -abhängig an biologische Membranen zu binden, eröffnet sich eine Vielzahl biologischer Prozesse als mögliche Wirkungsorte der Annexine. Zunächst basierte die Annahme, dass Annexine eine Funktion in membranabhängigen Prozessen ausführen darauf, dass

sie innerhalb der Zelle mit spezifischen Membranen kolokalisieren (Diakonova, Gerke et al. 1997; Futter and White 2007). Die bekannten Funktionen beziehen sich zumeist auf membranabhängige Prozesse, wie z. B. Exozytose, Endozytose, Membranorganisation und Stabilisierung. Beschrieben wurden jedoch auch Aspekte der Apoptose, Zellteilung, Entzündung und extrazelluläre Vorgänge, an denen Annexine beteiligt sein können.

1.5.1 Funktionen während der Endozytose

Kolokalisationsstudien in Zellkultur konnten zeigen, dass Annexine an endozytotischen Vesikeln zu finden sind (Emans, Gorvel et al. 1993; Futter, Felder et al. 1993; Jackle, Beisiegel et al. 1994; Diakonova, Gerke et al. 1997). Zusätzlich beschrieben Emans et al., dass Annexin A2 mit frühen endosomalen Strukturen isoliert werden kann und somit wahrscheinlich deren Fusion unterstützt (Emans, Gorvel et al. 1993). Dabei steht Annexin A2 sowohl im Zusammenhang mit Clathrin- als auch mit Caveolin- abhängiger Endozytose. Neben einer Kolokalisation mit Clathrin umhüllten Vesikeln (Turpin, Russo-Marie et al. 1998), kann es auch als Bestandteil gereinigter Caveolae isoliert werden (Schnitzer, Liu et al. 1995). Annexin A6 wird für die Abschnürung Clathrin umhüllter Vesikel benötigt. In Versuchen mit isolierten Plasmamembranen kann nach Entfernen von Annexin A6 keine Abschnürung der Vesikel mehr erfolgen. Dieser Defekt kann anschließend durch die Zugabe von Annexin A6 revertiert werden (Lin, Sudhof et al. 1992).

Mittlerweile wurden für die Annexine A1 und A2 Zielsequenzen innerhalb der N-terminalen Domäne identifiziert, die zu einer Rekrutierung zu Endosomen führen (Seemann, Weber et al. 1996; Jost, Zeuschner et al. 1997). So wird die für Annexin A2 beschriebene Ca^{2+} -unabhängige Membranbindung erst aufgehoben, wenn die Aminosäuren 15-24 der N-terminalen Domäne deletiert werden (Jost, Zeuschner et al. 1997).

Annexine sind jedoch nicht nur an diesen frühen Prozessen der Endozytose beteiligt, sondern haben auch Funktionen in späteren Phasen des Vesikelverkehrs. So weist eine Annexin A1 *knock-out* Maus Defekte in der Bildung multivesikulärer Endosomen auf. Diese werden zwar noch gebildet, enthalten aber weniger interne Einschlüsse (Gerke, Creutz et al. 2005). Annexin A2 wird innerhalb des multivesikulären

Transports benötigt. Es spielt hier eine entscheidende Rolle bei der Abschnürung der Vesikel, nicht aber bei der Invagination der Membran (Mayran, Parton et al. 2003). Dementsprechend konnte in Zellkulturexperimenten gezeigt werden, dass Depletion von Annexin A2 mittels RNAi zur Veränderung in der Struktur Rab11-positiver Recyclingendosomen führt (Zobiack, Rescher et al. 2003). Die subzelluläre Lokalisation von Annexin A2 an verschiedenen Membranstrukturen wird dabei durch die Interaktion mit Cholesterin reguliert (Mayran, Parton et al. 2003).

1.5.2 Funktionen während der Exozytose

Die Regulation der Membranfusion während der Exozytose ist bisher nur unzureichend untersucht. Neben anderen Ca^{2+} -bindenden Proteinen wie Synaptotagmin, Munc-Proteinen und Calmodulin (Persechini, Moncrief et al. 1989; Morgan 1995; Chapman 2002) gelten auch die Annexine als Kandidaten für die Unterstützung membranabhängiger Prozesse während der Exozytose. Gerade ihre bivalente Fähigkeit, nicht nur Ca^{2+} , sondern auch Membranen direkt zu binden, macht eine Beteiligung der Annexine an der Exozytose möglich. Den ersten konkreten Hinweis auf eine Verbindung von Exozytose und Annexin lieferten Untersuchungen an Annexin A7. Schon 1978 wurde beschrieben, dass Annexin A7 (Synexin) dafür benötigt wird, Membranen vor ihrer Fusion in unmittelbare Nähe zu bringen, nicht aber für die eigentliche Fusion (Creutz, Pazoles et al. 1978). In einem *Screen*, in dem nach membranbindenden Proteinen sekretorischer Vesikel gesucht wurde, wurde wiederum Annexin A7 als eine Komponente dieser Vesikel identifiziert (Creutz, Zaks et al. 1987).

Auch Annexin A2 wurde auf der Oberfläche von sekretorischen Granula gefunden (Creutz, Moss et al. 1992). Außerdem unterstützt an der Plasmamembran lokalisiertes Annexin A2-S100A10 die Bildung von Mikrodomänen, die zum Andocken der sekretorischen Vesikel benötigt werden (Chasserot-Golaz, Vitale et al. 2005). Annexin A2 RNAi führt in MDCK-Zellen zu einer drastischen Reduktion des Vesikeltransports von Sucrase Isomaltase vom trans-Golgi-Netzwerk zur apikalen Membran polarer Epithelzellen (Jacob, Heine et al. 2004). Gegensätzlich dazu zeigte die Überexpression eines dominant negativ wirkenden Annexin A2 Proteins, das zu unnatürlicher Aggregation von Annexin A2 führt, in PC12-Zellen keinerlei Defekte die Exozytose betreffend (Graham, Gerke et al. 1997). In Endothelzellen ist der Annexin

A2-S100A10 Komplex an der Exozytose von *Weibel Palade Bodies*, nicht aber der Exozytose anderer Vesikel beteiligt (Knop, Aareskjold et al. 2004). Dies lässt auf eine spezielle Funktion von Annexin A2 bzw. den Annexin A2-S100A10 Komplex bei einzelnen Aspekten der Exozytose schließen, nicht aber auf die Beteiligung an generellen Mechanismen.

Eine weitere Komponente der Exozytosemaschinerie bildet Annexin A13. Es wird in Epithelzellen in zwei Isoformen exprimiert. Interessanterweise haben beide Isoformen offensichtlich auch nicht-überlappende Funktionen. Während Annexin A13b an der Bildung von Vesikeln beteiligt ist, die vom Golgiapparat zur apikalen Membran rekrutiert werden, ist Annexin A13a zusätzlich für Vorgänge des basolateralen Transports verantwortlich (Lafont, Lecat et al. 1998; Lecat, Verkade et al. 2000).

1.5.3 Extrazellulär vorkommende Annexine

Annexine sind lösliche, zytosolische Proteine ohne jegliche Signalsequenz, die zur Sekretion der Proteine führen würde. Trotzdem wurden bereits verschiedene extrazellulär vorkommende Annexine, insbesondere Annexin A1, A2 und A5, beschrieben, wobei der genaue Weg ihrer Sekretion nicht bekannt ist. Es wurden bereits verschiedene Möglichkeiten einer Externalisierung vorgeschlagen (Muesch, Hartmann et al. 1990; Perretti, Christian et al. 2000; Faure, Migne et al. 2002; Danielsen, van Deurs et al. 2003), wobei keine dieser Optionen bisher detailliert bewiesen werden konnte.

Annexin A1 ist in der Lage, außerhalb der Zelle entzündungshemmend zu wirken. Die Expression und Sekretion wird dabei durch Glukokortikoide reguliert (Perretti and Flower 2004). Munck et al. zeigten schon 1984, dass Glukokortikoide eine Rolle in der Regulation der Entzündungsreaktion spielen. Sie verhindern eine zu starke Immunreaktion, um den betroffenen Wirt nicht durch die eigene Reaktion zu schädigen (Munck, Guyre et al. 1984).

Humane neutrophile Granulozyten enthalten große Mengen an Annexin A1 (2-4 % der zellulären Proteine), wobei sich der Hauptanteil an Gelatinase Granula befindet und nur ein kleiner Prozentsatz an der Plasmamembran (Oliani, Paul-Clark et al. 2001). Über einen noch nicht genau bekannten Mechanismus wird Annexin A1 aus der Zelle geschleust. Nach der Freisetzung bindet Annexin A1 an die FMLP (f-Met-

Leu-Phe) Rezeptoren FPR (formyl Peptid Rezeptor), FPRL1 (FPR like 1) und FPRL2, die mit dem N-Terminus von Annexin A1 interagieren können (Rescher, Danielczyk et al. 2002). Daraufhin wird die transendotheliale Migration von Leukozyten im Chemoattraktansgradienten verhindert und somit die Entzündungsreaktion geblockt. Die physiologische Relevanz der Annexin A1 vermittelten Prozesse zeigt sich bei Versuchen in Annexin A1 *knock-out* Mäusen. Diese sind zwar vital, der Verlust von Annexin A1 führt jedoch zur erhöhten Extravasation von neutrophilen Granulozyten bei bestimmten Entzündungen (Hannon, Croxtall et al. 2003).

Annexin A1 gilt außerhalb der Zelle außerdem als sogenanntes „*eat me*“ Signal. Diese Signale dienen auf der Oberfläche apoptotischer Zellen für Phagozyten als Marker zur Erkennung und anschließender Aufnahme. Die Exposition von Phosphatidylserin (PS) auf der äußeren Oberfläche der Plasmamembran ist ein charakteristisches Zeichen einer apoptotischen Zelle. Annexin A1 könnte als PS-Ligand agieren und so Zellen für die Phagozytose markieren (Arur, Uche et al. 2003). Arur et al. konnten zeigen, dass Annexin A1 zu PS-reichen Bereichen der Zelloberfläche rekrutiert wird und, dass Annexin A1 siRNA zu Defekten in der Phagozytose apoptotischer Zellen führt (Arur, Uche et al. 2003).

Ein weiteres Beispiel für extrazellulär vorkommende Annexine bietet Annexin A2. Wie Annexin A1 kann auch Annexin A2 offensichtlich voneinander unabhängige Aufgaben innerhalb bzw. außerhalb der Zelle erfüllen. Annexin A2 liegt, soweit bekannt nur im vaskulären Endothel extrazellulär vor (Ling, Jacovina et al. 2004). Auf der Zelloberfläche präsentiertes Annexin A2 dient als Korezeptor für den Plasminogen-Aktivator. Das Präprotein Plasminogen wird durch Aktivator-vermittelte proteolytische Spaltung zum aktiven Plasmin, das wiederum für den Abbau von Fibrin benötigt wird. *Knock-out* Mäuse für Annexin A2 zeigen erwartungsgemäß Ablagerungen von Fibrin im endothelialen Gewebe des vaskulären Systems (Ling, Jacovina et al. 2004).

1.5.4 Die Annexin-Aktin-Interaktion

Das Aktin-Zytoskelett ist ein hoch dynamisches Netzwerk aus polymerisierten Aktinmonomeren, die extrem schnell remodelierbar sind und so verschiedene

zelluläre Vorgänge und die Motilität der Zelle ermöglichen. Auch endo- und exozytotische Prozesse werden durch das Aktin-Zytoskelett reguliert (Ascough 2004). Für Annexin A2 wurde sowohl für die monomere Version als auch im Komplex mit S100A10 gezeigt, dass es mit Aktin und Aktinfilamenten interagiert (Gerke and Weber 1984; Glenney 1987; Hayes, Shao et al. 2006). In polaren Epithelzellen wird der Annexin A2–S100A10-Komplex zu aktinreichen Bereichen an apikalen Zell-Zell-Kontakten rekrutiert. Dort ist er an der Organisation des kortikalen Aktin-Zytoskeletts beteiligt (Benaud, Gentil et al. 2004). Über synthetisch hergestellte Versionen des Annexin A2 Proteins und Deletionsmutanten konnten die Bindestellen genauer definiert werden. So findet die Bindung an F-Aktin an der C-terminalen Sequenz des Proteins statt (Filipenko and Waisman 2001). Das Beispiel von Annexin A4 beweist jedoch, dass die C-terminale Sequenz nicht allein für die Bindung verantwortlich sein kann. Annexin A4 enthält die gleiche Sequenz am C-Terminus wie Annexin A2, ist aber nicht in der Lage, F-Aktin zu binden (Raynal and Pollard 1994).

Da Annexin A2 nicht mit Strukturen wie Mikrovilli oder mit Stressfasern kolokalisiert wird angenommen, dass die Interaktion *in vivo* wahrscheinlich mit dynamischeren, aktinabhängigen Strukturen, die bei der Migration oder der Pinozytose entstehen, erfolgt. Dies wird durch Versuche mit dominant negativ wirkenden Annexin A2–Mutanten bestätigt. Diese verhindern in Zellkulturexperimenten die Formation von funktionsfähigen Pinosomen (Merrifield, Rescher et al. 2001). Annexin A2 lokalisiert in motilen Zellen an aktinreichen Ausläufern, die Depletion von Annexin A2 verhindert die Bildung dieser dynamischen Membranstrukturen (Hayes, Shao et al. 2006).

Auch Annexin A1 und Annexin A4 binden Aktin. Dies geschieht in Ca^{2+} -abhängiger Art und Weise. Annexin A6 zeigt Kolokalisation mit Membranstrukturen und Orten sekretorischer Prozesse (Glenney, Tack et al. 1987; Schlaepfer and Haigler 1987; Kobayashi and Tashima 1990; Hosoya, Kobayashi et al.). Dies deutet ebenfalls darauf hin, dass Annexine einen Zusammenhang zwischen den schon beschriebenen membranabhängigen Prozessen wie Endo- und Exozytose und dem Zytoskelett bilden.

1.5.5 Annexin Funktion innerhalb der Zytokinese

Ein weiterer Vorgang in der Zelle, bei dem Annexinen eine Funktion zugeschrieben wurde, ist die Zytokinese (Tomas, Futter et al. 2004). Annexin A11 translokiert während des Zellzyklus in Richtung des Spindelapparates. Nachdem es sich während der Metaphase an den Spindelpolen finden lässt, ist es in der späten Telophase deutlich im Bereich des *midbodys* lokalisiert. Depletionsexperimente konnten zudem zeigen, dass es nach einem *knock-down* von Annexin A11 in A431- und HeLa-Zellen zu einer fehlerhaften Bildung des *midbodys* kommt. Die Tochterzellen gehen ohne die vollständige Zellteilung in die nachfolgende Interphase ein und sterben, vermutlich durch Apoptose.

Dies kann ebenfalls im Zusammenhang mit membranabhängigen Prozessen interpretiert werden. Wahrscheinlich liegt die Funktion des Annexin A11 darin, Membranen und Zytoskelettbestandteile in unmittelbare Nähe zueinander zu bringen, damit es zu einer korrekten Abschnürung zwischen den Tochterzellen kommen kann (Tomas, Futter et al. 2004).

1.5.6 Funktion in der Regulation der Apoptose

Der programmierte Zelltod (Apoptose) ist für die Entwicklung und Aufrechterhaltung eines vielzelligen Organismus ein lebenswichtiger Mechanismus. Im Gegensatz zur Nekrose wird die Apoptose von der betreffenden Zelle selbst aktiv durchgeführt. Dadurch unterliegt diese Form des Zelltods strenger Kontrolle und es wird gewährleistet, dass die betreffende Zelle ohne Schädigung des Nachbargewebes zugrunde geht.

Neben den schon beschriebenen Rollen von Annexin A1 wird dieses Protein auch im Zusammenhang mit Apoptose regulierenden Prozessen gefunden (Lim and Pervaiz 2007). 1996 zeigten Sakamoto et al. einen proapoptotischen Effekt in H₂O₂ behandelten Thymozytenkulturzellen von Ratten. Diese reagierten nach Zugabe von Annexin A1 mit reduzierter Nekrose, aber erhöhter Apoptose (Sakamoto, Repasky et al. 1996). Übereinstimmend damit kann ein monoklonaler Antikörper gegen Annexin A1 in Thymozytenzellen Nekrose auslösen und Apoptose reduzieren (Solito, de Coupade et al. 2001). Über welchen Mechanismus dies stattfindet, ist nicht bekannt. Dass es einen direkten Zusammenhang zwischen der Regulation von Apoptose und

Annexin A1 gibt, zeigen auch die Experimente von Solito et al.: Zellen gingen nach Transfektion mit Annexin A1 spontan Apoptose ein (Solito, de Coupade et al. 2001). Gleichzeitig war eine erhöhte Caspase 3 Aktivität feststellbar (Solito, de Coupade et al. 2001). Eine für Annexin A1 beschriebene Proteolyse während der Apoptose der Zellen konnte durch einen Caspase 3 Inhibitor ebenso gehemmt werden, wie die Apoptosereaktion selbst (Debret, El Btaouri et al. 2003). Da Annexin A1 jedoch keine Caspase Erkennungssequenz enthält, muss es ein zwischengeschaltetes, noch unbekanntes, proteolytisches Enzym geben, das wiederum von der Caspase 3 aktiviert wird (Perretti and Solito 2004).

1.6 Die *Drosophila*-Annexine

Die Annexine der Insekten besitzen keine direkten Orthologe, sie werden somit in eine eigene Gruppe („B“) eingeordnet. Neben *Drosophiliden* wurden „B“ Annexine auch in *Anopheles gambiae* und *Bombyx mori* beschrieben. Über Sequenzhomologieanalysen wurden in *Anopheles gambiae* vier Kandidatengene identifiziert, wobei sich eines als wahrscheinliches Ortholog von *Drosophila annexin b9* herausstellte. Die anderen drei Gene (*B10A*, *B10B*, *B10C*) scheinen Orthologe des *Drosophila annexin b10* Gens darzustellen und sind wahrscheinlich aus Duplikationsereignissen hervorgegangen. Alle enthalten die typische Annexinstruktur aus vier *repeats* und dem N-terminalen Teil, wobei es sich bei *annexin B10A* durch ein Mutationsereignis wahrscheinlich um ein nicht funktionelles Pseudogen handelt (Kotsyfakis, Vontas et al. 2005). Annexin-Antikörperfärbungen konnten zeigen, dass die *Anopheles* Annexine B9 und B10 in Epithelzellen des Mitteldarms an der Plasmamembran und an Zell-Zell-Kontakten lokalisieren (Kotsyfakis, Vontas et al. 2005). Nachdem im Gewebe auch extrazelluläre Bereiche Annexin-positiv erschienen, konnte in Zellkultur bestätigt werden, dass nach Annexin-Antikörperfärbungen auch ohne Zugabe von Detergenzien ein deutliches Signal an der Zellmembran detektierbar ist. Dies deutet darauf hin, dass Moskito Annexine auch auf der extrazellulären Seite der Plasmamembran eine Rolle spielen (Kotsyfakis, Vontas et al. 2005). Um welche Funktion es sich handelt, wurde noch nicht genauer beschrieben.

Das erste Mal beschrieben Johnston et al. 1990 Annexine in *Drosophila*. Eine Sequenzanalyse ergab, dass die *Drosophila*-Annexine untereinander 46 % Identität

ihrer Aminosäuresequenz zeigen. Im Vergleich zu den Säuger-Annexinen ergibt sich eine Homologie zwischen 40 % und 50 %, wobei die größte Ähnlichkeit zu den Annexinen A6 und A5 besteht und die Geringste zu den Annexinen A1 und A2. Dazu ist anzumerken, dass die Homologie der Bereiche innerhalb der *repeats* deutlich höher ist, als in den Bereichen dazwischen (Johnston, Perin et al. 1990). In biochemischer Hinsicht wurde gezeigt, dass Annexin B10 Ca^{2+} -abhängig an Membranstrukturen bindet. Detailliertere Liposomenbindungsstudien erwiesen, dass Annexin B10 an Phosphatidylserin- enthaltende Liposomen bindet, nicht aber an solche, die Phosphatidylcholin und Phosphatidylethanolamin enthalten (Johnston, Perin et al. 1990).

Sequenzanalysen und cDNA Studien haben herausgestellt, dass in *Drosophila* drei unabhängige *annexin* Gene existieren. Die *Drosophila*-Annexine bilden keine direkten Äquivalente zu den Proteinen aus Vertebraten, sondern sind unabhängige Mitglieder der Annexin Proteinfamilie. Dementsprechend wurden sie gemäß der Nomenklatur als Annexin B9, B10 und B11 bezeichnet (Moss and Morgan 2004). Annexin B11 liegt in der Zelle in zwei unterschiedlichen Isoformen (Anx B11^{short}, Anx B11^{long}) vor. M. Chlystun konnte innerhalb seiner Promotionsarbeit bereits bestätigen, dass die Annexine B9, B10 und B11^{short} als lösliche Proteine exprimierbar sind und in Ca^{2+} -Abhängigkeit an Phospholipide binden können. Diese Bindung ist reversibel und somit durch EGTA auflösbar. AnnexinB11^{long} erwies sich als kaum löslich (Chlystun 2006). Die benötigte Ca^{2+} -Konzentration zur Bindung an Liposomen liegt für die Annexine B9 und B11^{long} bei ca. 5 μM , für die Annexine B10 und B11^{short} bei ca. 20 μM . Neben diesen Bindungseigenschaften konnte für AnnexinB11^{long} gezeigt werden, dass es auch die Aggregation von Membranstrukturen schon ab einer Ca^{2+} -Konzentration von 5 μM fördert. Die anderen *Drosophila*-Annexine scheinen prinzipiell auch in der Lage zu sein, Membranaggregation zu steigern, jedoch erst bei deutlich höherer Ca^{2+} -Konzentration (ab ca. 100 μM) (Chlystun 2006).

Insgesamt konnten einige grundlegende Eigenschaften der Annexine auch für die *Drosophila*-Vertreter bestätigt werden. Welche speziellen Funktionen sie in der Zelle einnehmen, sollte innerhalb dieser Arbeit untersucht werden.

1.7 Ziel der Arbeit

Um die genaue Funktion der Annexine zu verstehen, ist es wichtig, biochemische, molekulare und zellbiologische Aspekte zu betrachten. Die Familie der Annexine umfasst für die Vertebraten zwölf verschiedene *annexin* Gene. Auch wenn im Laufe der Zeit immer mehr Informationen über die Biochemie und die Struktur dieser Annexine erhalten werden konnte, bleibt doch die Frage nach der physiologischen Relevanz einzelner Vertreter. In höheren Organismen mit einer größeren Anzahl von Annexinen ist es unter Anderem aufgrund kompensatorischer Phänomene umso schwerer, die spezifischen Aufgaben innerhalb der Zelle zu verstehen.

Da die *Drosophila annexine b9*, *b10* und *b11* in ihrer Struktur den Vertebratenvertretern sehr ähnlich sind, könnte die detaillierte Beschreibung der Funktion dieser einen wichtigen Beitrag zum Verständnis der gesamten Annexin Proteinfamilie geben. Dies geschieht sowohl über die histologische Analyse mithilfe von GFP-Fusionen und Antikörperfärbungen als auch über genetische Ansätze, die Aufschluss über Effekte nach Expressionsreduktion bzw. Überexpression geben sollen. Des Weiteren bietet sich über den Modellorganismus *Drosophila* eine Vielzahl von genetischen Manipulationsmöglichkeiten *in vivo*.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle Chemikalien von folgenden Firmen in der Qualität pro analysis bezogen:

Baker (Groß-Gerau)	Biomol (Hamburg)	Biozym (Hamburg)
Boehringer (Mannheim)	Fluka (Neu-Ulm)	Jena Bioscience (Jena)
Sigma-Aldrich (Taufkirchen)	Promege (Mannheim)	Stratagene (Heidelberg)
GIBCO/BRL (Eggenstein)	Merck (Darmstadt)	Roth (Karlsruhe)
Pharmacia/LBK (Freiburg)	La Roche (Mannheim)	Serva (Heidelberg)
Invitrogen (Karlsruhe)	Bio Rad (München)	

Lösungen für molekularbiologische Arbeiten wurden mit Reinstwasser angesetzt und autoklaviert oder sterilfiltriert.

2.1.2 Puffer, Medien und Lösungen

Apfelsaftagarplatten	18 g Agar in 500 ml H ₂ O autoklavieren, 150 ml H ₂ O zugeben, aufkochen, 3 ml Eisessig hinzugeben.
BCIP-Lösung	50 mg/ml BCIP in 100 % Dimethylformamid
Coomassie-Färbelösung	0,25 % (w/v) Coomassie R250, 10 % (v/v) Essigsäure
Coomassie-Entfärbelösung	30 % (v/v) Essigsäure, 10 % (v/v) Methanol
DAB	0,3 mg/ml DAB in PBS

DEPC-H₂O	0,1 % (v/v) DEPC in H ₂ O ü. N. lösen und autoklavieren.
<i>Drosophila</i> Standardmedium	8,5 g Agar und 77 g Maismehl aufkochen, (pro Liter Leitungswasser) 18 g Trockenhefe, 10 g Sojamehl, 82 g Malzextrakt und 41 g Rübensirup hinzugeben, auf 60 °C abkühlen lassen, 4,5 ml Propionsäure und 1/5 Esslöffel Nipagin hinzugeben.
Ethidiumbromid	10 mg/ml (Stocklösung), davon 4 µl/100 ml Agarosegel
Gelladepuffer (10 x)	4 M Harnstoff, 50 % Saccharose, 50 mM EDTA, 1 Spatelspitze Xylencyanol, 1 Spatelspitze Bromphenolblau
Heptankleber	Zerkleinertes Klebeband wird in einer Weithalsflasche (500 ml) mit 150 ml Heptan überschichtet. Durch Schütteln (ca. 5 h) den Kleber lösen. Den Überstand für 20 min bei 10.000 rpm zentrifugieren. Den Überstand als Kleber verwenden.
Hybridisierlösung (<i>in situ</i>)	Zugabe von 100 µg/ml denaturierter Lachssperma-DNA zum Hybridisierungspuffer.
Hybridisierungspuffer	50 % Formamid, 5 x SSC, 0,1 % Tween 20
Injektionsansatz	5 µg Vektor-DNA, 1,5 µg Helper-DNA (Laski, Rio et al. 1986), 1 µl Lebensmittelfarbe, 1,5 µl 10 x Injektionspuffer ad 15 µl H ₂ O
Injektionspuffer (10 x)	1 mM Phosphatpuffer (pH 7,4), 50 mM KCl
IPTG	100 mM IPTG in ddH ₂ O, bei -20 °C lagern

LB-Medium	10 g <i>Bacto Trypton</i> , 5 g <i>Bacto Yeast Extract</i> , 10 g NaCl ad 1 l H ₂ O, auf pH 7 einstellen und autoklavieren.
LB-Agarplatten	20 g Agar/l Medium
Lysispuffer	0,1 M Tris pH 9, 0,1 M EDTA, 1 % Natriumlaurylsulfat (SDS)
Milchpulver (10 %)	10 g Milchpulver in 10 % TBS/Tween Lösung lösen.
Moviol	12 g Moviol in 30 g Glycerin (fluoreszenzfrei) 2 h unter intensivem Rühren lösen. Dabei leicht erwärmen. 30 ml ddH ₂ O zugeben und 5 min rühren. 60 ml 0,2 M Tris/HCl pH 8,5 zugeben. 10 min bei 56 °C leicht rühren. 15 min bei 5.000 g zentrifugieren. Den klaren Überstand portionieren und bei -20 °C aufbewahren.
Natriumhypochloritlösung	ca. 12 % aktives Chlor (Aug. Hedinger, Heiligenwiesen) 1:1 mit H ₂ O verdünnen.
NBT-Lösung	75 mg/ml NBT in 70 % Dimethylformamid
NBT-Puffer	100 mM NaCl, 50 mM MgCl ₂ , 100 mM, Tris/HCl (pH 9,5)
PBS	130 mM NaCl, 7 mM Na ₂ HPO ₄ , 3 mM KH ₂ PO ₄ , 2,7 mM KCl (pH 7,6)
PBT	0,3 % Triton X-100 in PBS
Ponceau S Färbelösung	3 % Essigsäure, 0,3 % Ponceau S

P1 (Resuspensionspuffer)	50 mM Tris/HCl, pH 8, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A; nach Zugabe von RNase A bei 2-8 °C lagern.
P2 (Lysepuffer)	200 mM NaOH, 1 % SDS
P3 (Neutralisierungspuffer)	3 M Kaliumacetat, pH 5,5
QBT	750 mM NaCl, 50 mM MOPS, pH 7, 15 % Iso-propanol, 0,15 % Triton X-100
QC	1 mM NaCl, 50 mM MOPS, pH 7, 15 % Iso-propanol
QF	1,25 mM NaCl, 50 mM MOPS, pH 8,5, 15 % Iso-propanol
RNase-Wasser	0,2 µg/ml RNase in sterilem H ₂ O
SB-Medium	35 g Trypton, 20 g Yeast Extract, 5 g NaCl, ad 1 l H ₂ O, pH 7,5 einstellen und autoklavieren.
SDS-PAGE	
SDS (10 %)	10 % Natriumdodecylsulfat in ddH ₂ O
SDS-Probenpuffer (2 x)	0,125 M Tris-Cl, 4 % SDS, 20 % Glycerol, 0,02 % Bromphenolblau, 0,2 M Dithiothreitol, auf pH 6,8 einstellen.
Sammelgelpuffer (4 x)	0,5 M Tris/HCl, pH 6,8
Trenngelpuffer (4 x)	1,5M Tris/HCl, pH 8,8

Sammelgel 4 % (10 ml)	1,33 ml Acrylamid-Lösung, 2,5 ml 4 x Sammelgelpuffer, 0,1 ml 10 % SDS, 6 ml H ₂ O, 100 µl 10 % APS, 10 µl TEMED
Trenngel 10 % (30 ml)	10 ml Acrylamid-Lösung, 7,5 ml 4 x Trenngelpuffer, 0,3 ml 10 % SDS, 12,1 ml H ₂ O, 200 µl 10 % APS, 20 µl TEMED
Elektrodenpuffer	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % SDS, auf pH 8,3 einstellen.
SOC-Medium	2 % <i>Bacto Trypton</i> , 0,5 % <i>Bacto Yeast Extract</i> , 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl ₂ , 10 mM MgSO ₄ , autoklavieren, dann auf 20 mM Glucose einstellen
SQIUB Puffer	10 mM Tris pH 8,2, 1 mM EDTA, 25 mM NaCl, 200 µg/ml Proteinase K
SSC (20 x)	3 M NaCl, 0,3 M Na-Citrat
STET-Puffer	8 % Saccharose, 5 % Triton X-100, 50 mM, EDTA, 50 mM Tris/HCl, pH 8
TBE	50 mM Tris/HCl, pH 8,2, 50 mM Borsäure, 5 mM EDTA
TBS/Tween 20	20 mM Tris/HCl, pH 7,6, 137 mM NaCl, 0,1 % Tween 20
TE	10 mM Tris/HCl, pH 8,2, 1 mM EDTA
Transferpuffer (Western-Blot)	25 mM Tris, 129 mM Glycin, 10 % MetOH, pH 8,2 - 8,4

Tris/HCl	1 M Trisbase, mit HCl auf gewünschten pH-Wert einstellen.
Triton Lösung (10 x)	1 l H ₂ O, 3 ml Triton X-100, 40 g NaCl
X-Gal (40 %)	zur blau-weiß Selektion 400 mg X-Gal in 10 ml DMF lösen, bei -20 °C lagern.

2.1.3 Vektoren

Bezeichnung	Verwendungszweck	Herkunft
pGEM T-Easy	T/A - Klonierung von PCR Produkten	Promega, Mannheim
pUASt	P-Element Transformationsvektor	(Brand and Perrimon 1993)
pMal	MBP Expressionsvektor	New England Biolabs
pWiz	P-Element Transformationsvektor	(Lee and Carthew 2003)

2.1.4 Bakterienstämme

Bezeichnung	Herkunft
XL1 Blue	GIBCO/BRL, Eggenstein
JM 109	Clontech, Heidelberg
BL 21	Clontech, Heidelberg

2.1.5 Primäre Antikörper

Spezifität	Typ	Verdünnung	Referenz/Herkunft
anti-AnxB9	Kaninchen	1:30 (Gewebe) 1:200 (Western-Blot)	diese Arbeit
anti-AnxB10	Kaninchen	1:30 (Gewebe) 1:200 (Western-Blot)	diese Arbeit
anti-AnxB11 _{short}	Kaninchen	1:30 (Gewebe) 1:200 (Western-Blot)	diese Arbeit
anti-AnxB11 _{Ex2}	Kaninchen	1:50 (Gewebe) 1:400 (Western-Blot)	diese Arbeit
anti- α -Spectrin	Maus	1:40	Developmental Studies Hybridoma Bank
anti- β -Spectrin	Kaninchen	1:100	(Hulsmeier, Pielage et al. 2007)
anti- β _H -Spectrin	Kaninchen	1:100	(Williams, MacIver et al. 2004)
anti-Armadillo	Maus	1:50	Developmental Studies Hybridoma Bank
anti-Crumbs	Maus	1:4	Developmental Studies Hybridoma Bank
anti-Discs large	Maus	1:30	Developmental Studies Hybridoma Bank
anti-Flamingo	Maus	1:100	Developmental Studies Hybridoma Bank
anti-Repo	Maus	1:5	Developmental Studies Hybridoma Bank
anti-HRP-Cy5	Ziege	1:200	Dianova
anti-GFP	Kaninchen	1:1000	Molecular Probes
anti-GFP	Maus	1:1000	Molecular Probes
anti-Caspase 3 (Asp175)	Kaninchen	1:50	Cell Signaling Technology
Phalloidin	Amanita	1:100	Molecular Probes

2.1.6 Sekundäre Antikörper

Spezifität	Konjugation	Verdünnung	Quelle
Ziege anti-Kaninchen	HRP	1:7500	Dianova
Ziege anti-Maus	HRP	1:7500	Dianova
Ziege anti-Maus	Alexa488, Alexa568 oder Alexa647	1:500	Molecular Probes
Ziege anti-Kaninchen	Alexa488, Alexa568 oder Alexa647	1:500	Molecular Probes
Ziege anti-DIG	alkalische Phosphatase	1:1500	Roche

2.1.7 Verwendete Fliegenstämme

2.1.7.1 Balancer- und Wildtypstämme

Stamm	Beschreibung	Referenz / Herkunft
<i>w</i> ¹¹¹⁸	<i>white</i> ⁻	(Lindsley 1992)
<i>w ; CyO/Sp; TM2/MKRS</i>	Doppelbalancer 2./3. Chromosom	Klämbt, unveröffentlicht
<i>w ;; TM3 Sb e/ TM6B Hu Tb e</i>	Doppelbalancer 3. Chromosom	Klämbt, unveröffentlicht
<i>w ;; TM3 Sb Ser e P[Gal4- twi.G], P[UAS-2xEGFP]</i>	GFP Balancer 3. Chromosom	Bloomington Stock Center
<i>y w N / FM7C P[Gal4- twi.G], P[UAS-2xEGFP]</i>	GFP Balancer X Chromosom	Bloomington Stock Center
<i>MKRS, sb</i>	Balancer 3. Chromosom	(Lindsley 1992)
<i>TM2 e ubx</i>	Balancer 3. Chromosom	(Lindsley 1992)

2.1.7.2 Mutanten, Defizienzen und P-Element Insertionen

Stamm	Beschreibung Gen Lokalisation/Chromosom	Referenz / Herkunft
<i>vilse1 (rhoGap)</i>	Exzisionsmutante 3.Chr.	(Lundstrom, Gallio et al. 2004)
$\Delta 1abi$	Exzisionsmutante 3.Chr.	R.Stephan unveröffentl.
$y^1 w^{67c23}$ <i>P(EPgy2)EY11748</i>	P-Element X Chr.	Bloomington Stock Center #20693
$w^{1118},$ <i>Df(3R)Exel6272/</i> <i>TM6B, Tb¹</i>	Defizienz 3. Chr.	Bloomington Stock Center #7739
$w^{1118},$ <i>Df(3R)Exel6272/</i> <i>TM6B, Tb¹, $\Delta 1abi$</i>	Testerchromosom für die EMS Mutagenese	diese Arbeit
<i>Df(3R)e-R1, Ki¹/ TM3,</i> <i>Sb¹, Ser¹</i>	Defizienz 3. Chr.	Bloomington Stock Center #3340
<i>P(EP)EP3398</i>	P-Element 3. Chr.	Bloomington Stock Center
<i>P(hsneo)Cortactin^{neo54}</i> <i>e1/TM3, Sb¹, Ser¹</i>	P-Element 3. Chr.	Bloomington Stock Center #10291
$y^1, w^{67c23},$ <i>P16880(Epgy2)</i> <i>EY08209</i>	P-Element 3. Chr.	Bloomington Stock Center #16880
$\Delta anx b10 \#13$	Exzisionsmutante X Chr.	(Sestu 2006)
$\Delta anx b10 \#132$	Exzisionsmutante X Chr.	(Sestu 2006)
$\Delta anx b10 \#65$	Exzisionsmutante X Chr.	(Sestu 2006)

2.1.7.3 Gal4 Aktivatorlinien

Stamm	Expressionsmuster / Promotor	Insertion / Chromosom	Referenz / Herkunft
GMRGal4	<i>glass Multimer Reporter</i>	2.	(Ellis, O'Neill et al. 1993)
<i>enGal4</i>	<i>engrailed</i>	2.	Bloomington Stock Center
<i>scaGal4</i>	<i>scabrous</i>	2.	(Hinz, Giebel et al. 1994)
<i>ptcGal4</i>	<i>patched</i>	2.	Bloomington Stock Center
<i>repoGal4</i>	<i>reversed polarity</i>	3.	(Sepp, Schulte et al. 2001)
<i>daGal4</i>	<i>daughterless</i>	3.	(Wodarz, Hinz et al. 1995)

2.1.7.4 UAS Effektorlinien

Stamm	Gen / Beschreibung	Insertion/ Chr.	Ref. / Herkunft
UAS <i>anx b9 GFP</i> #1	Annexin B9 GFP Fusionsprotein	3.	diese Arbeit
UAS <i>anx b9 GFP</i> #6	Annexin B9 GFP Fusionsprotein	2.	diese Arbeit
UAS <i>anx b10 GFP</i> #12	Annexin B10 GFP Fusionsprotein	3.	diese Arbeit
UAS <i>anx b10 GFP</i> #10	Annexin B10 GFP Fusionsprotein	3.	diese Arbeit
UAS <i>anx b11^{short} GFP</i> #35	Annexin B11 ^{short} GFP Fusionsprotein	3.	diese Arbeit
UAS <i>anx b11^{short} GFP</i> #33	Annexin B11 ^{short} GFP Fusionsprotein	3.	diese Arbeit
UAS <i>anx b11^{long} GFP</i> #20	Annexin B11 ^{long} GFP Fusionsprotein	2./3.	diese Arbeit
UAS <i>anx b11^{long} GFP</i> #24	Annexin B11 ^{long} GFP Fusionsprotein	2.	diese Arbeit

Stamm	Gen / Beschreibung	Insertion/ Chr.	Ref. / Herkunft
UAS <i>anx b9</i> ^{RNAi} #1	<i>annexin b9</i> RNAi	2./3.	diese Arbeit
UAS <i>anx b9</i> ^{RNAi} #2	<i>annexin b9</i> RNAi	2./3.	diese Arbeit
UAS <i>anx b10</i> ^{RNAi} #20	<i>annexin b10</i> RNAi	3.	diese Arbeit
UAS <i>anx b10</i> ^{RNAi} #7	<i>annexin b10</i> RNAi	X.	diese Arbeit
UAS <i>anx b11</i> ^{shortRNAi} #27	<i>annexin b11</i> ^{short} RNAi	3.	diese Arbeit
UAS <i>anx b11</i> ^{shortRNAi} #47	<i>annexin b11</i> ^{short} RNAi	2.	diese Arbeit
UAS <i>anx b11</i> ^{longRNAi} #11	<i>annexin b11</i> ^{long} RNAi	3.	diese Arbeit
UAS <i>anx b11</i> ^{longRNAi} #51	<i>annexin 11</i> ^{long} RNAi	3.	diese Arbeit
<i>annexin b9</i> ^{RNAi} #33.4	<i>annexin b9</i> RNAi	2.	(Williams 2005)
<i>annexin b10</i> ^{RNAi} #300-9	<i>annexin b10</i> RNAi	2.	NIG-Fly, Fly Stocks of National Institute of Genetics, Japan
UAS p35	p35 Apoptose Inhibitor	2.	(Hay, Wolff et al. 1994)
UAS DIAP1	<i>Drosophila</i> inhibitor of apoptosis	3.	bezogen von A. Müller
UAS Dronc ^{DN}	dominant negative <i>Drosophila</i> Nedd2 like caspase	3.	bezogen von A. Müller
UAS myr-mRFP/ TM6B, Tb ¹	myristoyliertes RFP	3.	Bloomington Stock Center #7119

Stamm	Gen / Beschreibung	Insertion/ Chr.	Ref. / Herkunft
UAS CD8 GFP	Transmembrandomäne von CD8	3.	Bloomington Stock Center
UAS Histon2B-mRFP/ TM6B, Tb ¹	Histon-RFP Fusionsprotein	3.	(Langevin, Le Borgne et al. 2005)
UAS-Rab5-GFP/ TM3	Rab5-GFP Fusionsprotein	3.	(Wucherpennig, Wilsch-Brauninger et al. 2003)
UAS-EGFP-C1c/ TM6B, Tb ¹	Clathrin-GFP Fusionsprotein	3.	Bloomington Stock Center #7109
UAS-Rab4-mRFP	Rab4-RFP Fusionsprotein	2.	Bloomington Stock Center #8505
UAS-Rab11-GFP	Rab11-GFP Fusionsprotein	2.	Bloomington Stock Center #8506

2.1.7.5 Weitere Stämme

Stamm	Beschreibung Gen Lokalisation/Chromosom	Referenz / Herkunft
FRT 82B	FRT Chromosom 3. Chr.	Bloomington Stock Center
Δ 2-3 Ki ¹ / TM3	konst. aktive Transposase 3.Chr.	(Robertson, Preston et al. 1988)

2.1.7.6 Verwendete cDNA Klone

LD09947 (*annexin b9*)

LD25605 (*annexin b10*)

GH16395 (*annexin b11^{short}*)

LD19596 (*annexin b11^{long}*)

2.2 Methoden

2.2.1 Genetische Methoden

Alle Fliegenstämme wurden, wenn nicht anders angegeben, auf *Drosophila* Futtermedium in Standardplastikröhrchen bei 18 °C, Raumtemperatur, 25 °C oder 29 °C gehalten. Für Kreuzungen wurden frisch geschlüpfte, jungfräuliche Weibchen (< 10 h nach Verlassen des Pupariums bei 18 °C) und Männchen verschiedener Altersstufen verwendet.

2.2.1.1 Sammeln von Embryonen

Für Einzel-Eiablagen wurden die Fliegen in ein leeres, mit Luftlöchern versehenes Plastikgefäß überführt, das mit einer Apfelsaftagarplatte verschlossen wurde. Diese wurde zuvor mit etwas frisch angerührter Bäckerhefe bestrichen. Die Apfelsaftagarplatte wurde alle 12 h gewechselt.

2.2.1.2 Keimbahntransformation

Zur Keimbahntransformation wurde ein Eppendorf FemtoJet eingesetzt. Für die Injektionen wurden Glaskapillaren (Typ GC100-10) mit einem Nadelziehgerät ausgezogen und vor Gebrauch nachgeschliffen. Vor dem Einsetzen in das Injektionssystem wurde die Kapillare mit 4 µl Injektionsmix befüllt.

2.2.1.3 Präparation der Embryonen

w¹¹¹⁸ Fliegen wurden auf Apfelsaftagarplatten zur Ablage gesetzt. Die Platten wurden ein- bis zweimal pro Stunde gewechselt und die Embryonen direkt zur Injektion verwendet. Zur Dechorionisierung wurden die Embryonen in 50 % Chlorix für 3 min inkubiert, gründlich mit Wasser gewaschen und auf einen Apfelsaftagarblock transferiert. Dort erfolgte die einheitliche Ausrichtung der Embryonen mit einer Präpariernadel. Sie wurden anschließend mit einem mit Heptankleber beschichteten Deckglas aufgenommen und bis zu einem kritischen Punkt getrocknet. Dieser Punkt ist erreicht, wenn die Vitellinmembranen auf leichten Druck mit der Präpariernadel hin Falten werfen. Diese Embryonen wurden dann sofort mit 10 S Öl (Voltalef) überschichtet und für die Injektion verwendet.

2.2.1.4 Injektion der Embryonen

Embryonen und Injektionskanüle wurden an einem Mikroskop in einer Ebene ausgerichtet. Injektionen erfolgten nur in Embryonen, die sich noch im syncytialen Blastoderm Stadium befanden. Die Kanüle wird in den posterioren Pol des Embryos gestochen und durch Betätigung der Injektionstaste des Transjektors wurde eine kleine Menge des Injektionsmixes in den Embryo injiziert. Die erfolgreiche Injektion konnte anhand der roten Farbe des Injektionsmixes nachvollzogen werden. Nach der Injektion wurde das Deckglas in ein Wägeschälchen überführt und mit 3 S Öl (Votalef) überschichtet. Die Embryonen wurden bis zum Schlüpfen bei 18 °C gehalten. Geschlüpfte L1 Larven wurden mit einer Präparationsnadel in ein Fliegenröhrchen mit *Drosophila* Standardmedium überführt.

2.2.1.5 Selektion transgener Fliegen

Die geschlüpfte Fliegen wurden einzeln gegen Doppelbalancer (*w*; *Sp/CyO*; *TM2/MKRS*) gekreuzt. In der F1 Generation konnten die transgenen Tiere anhand der Augenfarbe (*w*⁺) identifiziert werden. Die Stärke der Expression des *w*⁺ Gens hängt vom Insertionsort ab, sodass die Augenfarbe zwischen gelb und rot variieren kann.

2.2.1.6 Lokalisation der Insertionen

Zur Bestimmung des Chromosoms, auf dem die Insertion stattgefunden hat, wurden die Transgene erneut gegen Doppelbalancer gekreuzt. Anhand der Segregation der dominanten Marker und der *w*⁺ Markierung der transgenen Fliegen konnte das Chromosom, das die Insertion des jeweiligen Konstruktes trägt, identifiziert werden.

2.2.1.7 Das UAS / Gal4 System

Innerhalb des UAS/Gal4 Systems wird über synthetische P-Elemente die ektopische Expression von Zielgenen in *Drosophila* ermöglicht. Gal4 ist ein hefespezifischer Transkriptionsfaktor, der unter der Kontrolle eines schwachen Promotors steht. Zur Expression wird ein weiterer Promoter oder Enhancer benötigt. Gal4 bindet spezifisch an die sogenannte UAS (*upstream activating sequence*), wodurch ein *downstream* gelegenes Zielgen aktiviert wird. Die jeweilige Gal4-Linie regelt somit die Orte der Expression; die UAS-Linie trägt das gewünschte Zielgen.

2.2.1.8 Generierung einer RNAi / GFP Rekombinante

Um das *annexin b11^{long}* RNAi tragende Chromosom besser visualisieren zu können, wurde eine GFP Rekombinante generiert. Dazu wurden GMRGal4; *annexin b11^{long}* RNAi Tiere gegen transgene UAS CD8-GFP (3. Chromosom) Tiere gekreuzt. Etwa 30 GMRGal4; *annexinb11^{long}* RNAi / UAS CD8-GFP jungfräuliche Weibchen wurden gegen TM3/TM6 Männchen verkreuzt. Aus der folgenden Generation kann man die Rekombinanten darüber identifizieren, dass sie GFP-Expression aufweisen und gleichzeitig den GMRGal4 verursachten Phänotyp zeigen. Folgend wurde dieses Chromosom ohne die Treiberlinie etabliert.

2.2.1.9 EMS Mutagenese

Drei bis vier Tage alte Männchen eines homozygot isogenisierten Stammes wurden mit einer 25 mM Ethylmethansulfonat (EMS) Lösung nach Standardmethoden behandelt (Ashburner, 1989). Die mutagenisierten Männchen wurden gegen TM3/TM6 jungfräuliche Weibchen verkreuzt. Diese Kreuzung wurde bei 25 °C vier Tage lang jeden Tag auf frisches *Drosophila* Medium überführt. Die Parentalgeneration wurde danach verworfen. Aus der F1 Generation wurden einzelne TM6 oder TM3 balancierte Männchen gegen den Testerstamm *Df(3R)Exel6272/Δabi1* gekreuzt und nicht komplementierende Chromosomen anhand des pupalen Markers Tubby (Tb) oder des adulten Markers Stubble (Sb) identifiziert. Diese wurden anschließend balanciert und weiter getestet (siehe Ergebnisteil).

2.2.1.10 Exzisionsmutagenese

Durch das Einkreuzen einer konstitutiv aktiven Transposase können P-Elemente mobilisiert werden. Bei dieser Reversion kommt es mit variabler Häufigkeit zu unpräziser Exzision und somit zu Deletionen in den, dem P-Element angrenzenden Regionen (Daniels, McCarron et al. 1985). Dazu werden homozygote, jungfräuliche Weibchen des P-Insertionsstammes gegen Männchen, in denen die konstitutiv aktive Transposase ($\Delta 2-3$) exprimiert wird, gekreuzt. In der Folgegeneration werden P/ $\Delta 2-3$ Tiere gegen Doppelbalancer gekreuzt. Hier kommt es zum Exzisionsereignis. Daraufhin wird anhand der Augenfarbe selektioniert. Tiere mit weißen Augen werden gegen das P-Element zurückgekreuzt. Die daraus schlüpfenden $\Delta P/P$ Tiere werden zur Etablierung zunächst gegen Doppelbalancer Jungfrauen verkreuzt. Anschließend

wird über PCR-Analyse festgestellt, ob die genomische Region um das P-Element durch die Exzision verändert wurde. Die etablierten *Jump out* Ereignisse wurden wiederum über PCR auf die Anwesenheit von Exon 1 und Exon 3 des *annexin b9* Gens untersucht.

2.2.2 Histologische Methoden

2.2.2.1 Antikörperfärbungen

2.2.2.1.1 *whole mount* Antikörperfärbung von *Drosophila* Embryonen

Die Fixierung und Färbung von Embryonen aus Einzel-Eiablagen wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

- Embryonen werden mit PBT von der Agarplatte in Multiwell-Plexiglasplatten (MWP) überführt
- Dechorionisierung mit 5 % NaOCl für 5 min
- Waschen mit Leitungswasser (mind. fünfmal)
- Trocknen auf Papierhandtüchern
- Überführen der MWP in Heptan
- Überführen der Embryonen mit dem Heptan aus der MWP in 1,5 ml Reaktionsgefäße
- Zugabe des gleichen Volumens (etwa 500 µl) an Fixans (4 % Formaldehyd/PBS)
- Fixierung der Embryonen für 20 min bei RT auf einem Schüttler
- Abnahme der wässrigen (unteren) Phase und Zugabe von 1 ml Methanol
- Devitellinisierung der Embryonen durch kräftiges Schütteln für ca. 20 sek
- Abnahme der organischen (oberen) Phase, erneute Zugabe von Methanol und kurzes Schütteln
- Abnahme des Methanols und einmaliges Waschen mit 96 % Ethanol
- Waschen der Embryonen dreimal kurz und dreimal 20 min mit PBT auf einem Schüttler bei RT
- Inkubation in 10 % Goatserum (GS)/PBT für 1 h bei RT auf einem Schüttler
- Inkubation des primären AK (Antikörper) in geeigneter Verdünnung in 10 % GS/PBT ü. N. bei 4 °C auf einem Schüttler
- Waschen der Embryonen; dreimal kurz und dreimal 20 min mit PBT auf einem Schüttler bei RT

- Inkubation des sekundären AK in geeigneter Verdünnung in 10 % GS/PBT für 2-3 h bei RT auf einem Schüttler
- Waschen der Embryonen dreimal kurz mit PBT und dreimal 20 min mit PBT auf einem Schüttler bei RT

2.2.2.1.2 Antikörperfärbung von L3 Imaginalscheiben

- Mit zwei Pinzetten wurde am Mundhaken bzw. am hinteren Ende des vorderen Drittels einer L3 Larve angesetzt und die Larve vorsichtig auseinandergezogen. Idealerweise erhält man die Mundhaken samt Augen- bzw. Flügelimaginalscheiben, optischen Loben und ZNS. Die so präparierten Scheiben wurden auf Eis in PBS gesammelt.
- Überführen der Imaginalscheiben in Reaktionsgefäße mit Fixans (4 % Formaldehyd/PBS)
- Fixierung in 4 % Formaldehyd/PBS für 20-30 min bei RT auf einem Schüttler
- Abnahme des Fixans und dreimal kurz mit PBT waschen
- Dreimal für 20 min in PBT auf einem Schüttler waschen

Fortführung des Protokolls siehe Antikörperfärbung an Embryonen (Abschnitt 2.2.2.1.1 ab: Inkubation in 10 % GS/PBT).

Die Präparation der Imaginalscheiben erfolgte nach Beendigung der Färbung. Dazu wurden die Imaginalscheiben mittels Präpariernadeln ausgerichtet und von den übrigen Geweben getrennt. Die präparierten Scheiben wurden zwischen Objektträger und Deckgläschen eingedeckelt und mit Nagellack versiegelt.

2.2.2.1.3 Hitzefixierung von Imaginalscheiben

- 10 ml 1 x Triton Lösung auf Eis aufbewahren
- 1-2 ml 1 x Triton Lösung erhitzen
- Imaginalscheiben in PBS vorsichtig präparieren
- Zugabe der heißen 1 x Triton Lösung zu den Scheiben
- Gefäß verschließen, einmal kräftig schütteln und zügig 10 ml eiskalte 1 x Triton Lösung zugeben
- Mindestens 1 min auf Eis belassen
- Triton Lösung abnehmen und 1 h in Methanol auf einem Schüttler bei RT inkubieren
- Dreimal kurz, dreimal 20 min in PBT waschen

Fortführung des Protokolls siehe Antikörperfärbung an Embryonen (ab: Inkubation in 10 % GS/PBT).

2.2.2.1.4 Antikörperfärbung an Ovarien

Die Ovarien werden mit Pinzetten aus dem Abdomen von 4-5 Tage alten Weibchen präpariert. Die einzelnen Ovarienschläuche werden vorsichtig ausgebreitet, ohne sie von der Basis abzureißen. Alle Ovarien werden in PBS auf Eis gesammelt und anschließend in 4 % Formaldehyd für 30 min fixiert.

Die Fixierung verläuft, wie in Abschnitt 2.2.2.1.2 für Imaginalscheiben beschrieben.

2.2.2.1.5 Antikörperfärbung extrazellulärer Proteine I

- Die Imaginalscheiben, wie beschrieben in *Drosophila* S2 Medium freipräparieren
- Überführen der Imaginalscheiben in eiskalte Antikörperlösung (α -Annexin B11_{Ex2} 1:20 in *Drosophila* S2 Medium, dabei sollte der Antikörper ca. doppelt so hoch eingesetzt werden, wie sonst auf Gewebe angewandt)
- Inkubation auf Eis 2 h
- Dreimal 5 min mit *Drosophila* S2 Medium waschen

Fortführung des Protokolls siehe Antikörperfärbung von L3 Imaginalscheiben (2.2.2.1.2 ab: Überführen der Imaginalscheiben in Reaktionsgefäße mit Fixans (4 % Formaldehyd/PBS))

2.2.2.1.6 Antikörperfärbung extrazellulärer Proteine II

Entspricht dem Protokoll der Antikörperfärbung von L3 Imaginalscheiben (2.2.2.1.2), jedoch ohne jegliche Benutzung von Detergenzien. Alle Waschschritte wurden mit PBS durchgeführt.

2.2.2.1.7 Antikörperfärbungen an pupalen Flügeln

Späte L3 Larven des gesuchten Genotyps wurden aus Röhrchen in Petrischalen, die mit angefeuchtetem *Whatman* Papier ausgelegt waren, überführt.

30 h nach Verpuppung wurden die Puppen auf einen, mit doppelseitigem Klebeband versehenen Objektträger überführt.

- Operkulum mithilfe einer Pinzette entfernen
- Die Puppenhülle mit einer Schere öffnen
- Geöffnete Puppen in PBS sammeln
- Puppen in 4 % Paraformaldehyd (PFA) 2 h bei RT fixieren

- Abnahme des Fixans
- Waschen dreimal kurz mit PBT
- Waschen dreimal 20 min mit PBT
- Puppen in PBS auf einen Objektträger überführen
- Flügel mithilfe einer Schere vom Körper abtrennen und von der Membran befreien
- Flügel in PBS sammeln
- Inkubation in 10 %GS/PBT für 1 h bei RT
- Inkubation mit dem primären Antikörper in geeigneter Verdünnung in 10 % GS/PBT bei 4 °C ü. N.
- Waschen dreimal kurz mit PBT
- Waschen dreimal 20 min mit PBT
- Inkubation mit dem sekundären Antikörper in geeigneter Verdünnung in 10 % GS/PBT für 2 h bei RT
- Waschen dreimal kurz mit PBT
- Waschen dreimal 20 min mit PBT
- PBT abnehmen und Fluoromount zugeben
- Flügel mit Fluoromount auf einen Objektträger überführen und eindeckeln

2.2.2.1.8 Antikörperfärbung von *Drosophila* Schneiderzellen

Paraformaldehyd-Fixierung (in sechs oder zwölf *well* Platten):

- Medium abnehmen, mit 4 % Paraformaldehyd (PFA) für 15 min überschichten
- Zellen dreimal 5 min mit 1 x PBS waschen
- Permeabilisieren der Zellen durch Zugabe von 0,5 % Triton/PBS für 2 min Zellen dreimal mit 1 x PBS waschen
- Zellen direkt verwenden oder zur Lagerung mit 0,02 % NaAc/PBS beschichten

Antikörperfärbung:

- Zellen blocken für 30 min in 3 % Rinderserumalbumin
- Inkubation des primären Antikörpers in Rinderserumalbumin für 2 h
- Zellen viermal für je 5 min mit PBS waschen
- Inkubation des sekundären Antikörpers in Rinderserumalbumin für 1 h

Dauerpräparatherstellung:

- Kurz waschen in PBS

- Kurz waschen in H₂O
- Die Zellen mit dem Deckglas umgekehrt auf einen Objektträger mit Moviol geben

2.2.2.2 *In situ* Hybridisierung

Ab dem Schritt der Hybridisierung bis zum Stoppen der Färbereaktion wird DEPC-PBT/PBS und DEPC-NBT Puffer verwendet.

2.2.2.2.1 Fixierung von Embryonen

Embryonen werden mit PBT von der Agarplatte in Multiwell-Plexiglasplatten (MWP) überführt.

- Dechorionisierung mit 5 % NaOCl für 5 min
- Waschen mit Leitungswasser (mind. fünfmal)
- Trocknen auf Papierhandtüchern
- Zugabe von Heptan in MWP
- Überführen der Embryonen mit dem Heptan aus der MWP in 1,5 ml Reaktionsgefäße
- Zugabe des gleichen Volumens (etwa 500 µl) an Fixans (4 % Formaldehyd/PBS)
- Fixierung der Embryonen für 30 min bei RT auf einem Schüttler
- Abnahme der wässrigen (unteren) Phase und Zugabe von 1 ml Methanol
- Devitellinisierung der Embryonen durch kräftiges Schütteln für ca. 20 sek
- Abnahme der organischen (oberen) Phase, erneute Zugabe von Methanol und kurzes Schütteln
- Abnahme des Methanols und einmaliges Waschen mit 96 % Ethanol

2.2.2.2.2 Hybridisierung der Embryonen

- Waschen der Embryonen zweimal 5 min mit PBT
- Inkubation in 95-100 °C heißem Wasser für 6 min, dabei zwei bis dreimal invertieren
- Inkubation für 15 min auf Eis
- Waschen der Embryonen zweimal kurz in PBT
- Fixierung für 20 min in 5 % Formaldehyd/PBT bei TR auf einem Schüttler (2.Fixierung)
- Waschen dreimal 2 min mit PBT
- Waschen 5 min mit PBT/Hybridisierungspuffer im Verhältnis 1:1

- Waschen 5 min mit Hybridisierungspuffer
- Vorhybridisierung in Hybridisierungslösung bei 60 °C für mind. 80 min
- RNA-Probe in 30 µl Hybridisierungslösung für 2 min bei 90 °C denaturieren, dann direkt auf Eis stellen
- Abnehmen der Hybridisierungslösung von den Embryonen
- Zugabe der denaturierten RNA-Probe, Inkubation bei 60 °C ü. N.
- Waschen für 30 min in Hybridisierungspuffer bei 60 °C
- Waschen für 30 min in Hybridisierungspuffer/PBT bei 60 °C
- Waschen der Embryonen fünfmal 20 min mit PBT bei 60 °C
- Waschen für 10 min in PBT bei RT auf einem Schüttler
- Inkubation mit anti-Digoxigenin AP Antikörper/PBT (1:2000) für 2 h bei RT
- Waschen der Embryonen fünfmal 20 min mit PBT bei 60 °C

2.2.2.2.3 Nachweisreaktion

- Waschen zweimal für 5 min in NBT Puffer auf einem Schüttler bei RT
- Embryonen in 3,5 µl BCIP und 4,5 µl NBT in NBT Puffer inkubieren
- Stoppen der Färbereaktion mit PBT, wenn die gewünschte Intensität erreicht ist
- Waschen der Embryonen dreimal kurz mit PBT
- Waschen der Embryonen dreimal 20 min mit PBT auf einem Schüttler bei RT

2.2.2.2.4 Einbetten der Embryonen

- Entwässern der Embryonen in einer Alkoholreihe (50 %, 70 %, 90 %, 95 %, 100 % EtOH) für je 2 min
- Embryonen werden in einem Tropfen 100 % Ethanol in eine Pipette aufgenommen und zügig in die Mitte eines Kanadabalsam-Methylsalicylat Tropfens auf einem Objektträger platziert und ggf. mit einer Präpariernadel schnell verteilt
- Deckglas auflegen

2.2.2.3 Acridinorange Färbungen

Die Imaginalscheiben wurden freipräpariert und 5 min einer Acridinorange Lösung (2 µM in PBS) ausgesetzt. Die Lösung wird abgenommen und gegen PBS ausgetauscht. Die Scheiben werden sofort in PBS auf einem Objektträger mit einem

Deckgläschen mit Füßchen eingebettet und analysiert. Die Auswertung erfolgte an einem Standard Fluoreszenzmikroskop mit einem FITC oder GFP Filter.

2.2.2.4 *In vivo* Zeitrafferaufnahmen

Die S2R+ Zellen wurden wie beschrieben transfiziert.

- *Imaging* Schalen mit 100-150 µl ConA Lösung mind. 30 min bei RT inkubieren
- ConA abnehmen
- Medium von den transfizierten Zellen abnehmen und 1 ml frisches *Drosophila* Standard Medium (SDM⁺) zugeben.
- Zellen durch Auf- und Abpipettieren vorsichtig vom Untergrund lösen
- 100 µl Zellsuspension in *Imaging* Kammer geben und mit 200 µl SDM auffüllen
- 5 min warten

Die Zellen wurden anschließend an einem inversen, konfokalen *spinning disc* Mikroskop (Ultraview RS, Perkin Elmer) analysiert.

2.2.2.5 Dextran Aufnahme Versuche

Zunächst werden die Imaginalscheiben in Zellkulturmedium (10 % FCS) freipräpariert. Danach werden sie in 100 µl Dextranlösung (0.2 mM Dextran, 10.000 Da MW, Texas Red markiert in Zellkulturmedium + 10 % FCS) überführt und 10 min darin inkubiert. Folgend wird sechsmal 2 min mit eiskaltem Medium gewaschen. Danach werden die Scheiben wie beschrieben fixiert und, wenn benötigt gefärbt.

2.2.3 Molekularbiologische Methoden

2.2.3.1 Herstellung einer Digoxigenin markierten Sonde

In ein eisgekühltes Reaktionsgefäß werden gegeben:

- 1 µg linearisierte Plasmid DNA (mit RNA Polymerasepromotoren)
- 2 µl 10 x DIG RNA Labeling Mix (Roche)
- 2 µl 10 x Transkriptionspuffer (Roche)
- ad 18 µl RNase-freies ddH₂O
- 2 µl RNA Polymerase
- Mischen und kurz abzentrifugieren
- Inkubation für 2 h bei 37 °C

- Zugabe von 2 µl DNase, RNase-frei, zur Entfernung der *template* DNA
- Inkubation für 15 min bei 37 °C
- Abstoppen der Reaktion mit 2 µl 0,2 M EDTA, pH 8
- Zugabe von 2,5 µl 4 M LiCl und 75 µl EtOH (-20 °C)
- Mischen und bei -20 °C für zwei Stunden fällen
- Zentrifugation bei 4 °C für 30 min bei 12.000 g
- Waschen mit 50 µl 70 % EtOH, trocknen und in 100 µl RNase-freiem H₂O aufnehmen
- Einfrieren bis zur Verwendung bei -20 °C

2.2.3.2 Herstellung elektrokompenter Zellen

(*Escherichia coli* XL-1blue oder JM109 oder BL-21)

- Animpfen von zweimal 0,5 l LB Medium mit 10 ml einer frischen ü. N. Kultur
- Inkubation im Schüttler bei 37 °C (3-5 h) bis zu einer OD600 von 0,4 - 0,6
- Lagerung der Kultur 15-20 min auf Eis
- Zentrifugation in einem vorgekühlten Rotor (GSA) bei 4.000 rpm für 15 min bei 4 °C
- Überstand verwerfen und Pellet in 1 l kaltem ddH₂O resuspendieren
- Zentrifugation in einem vorgekühlten Rotor (GSA) bei 4.000 rpm für 15 min bei 4 °C
- Überstand verwerfen und Pellet in 0,5 l kaltem ddH₂O resuspendieren
- Zentrifugation in einem vorgekühlten Rotor (GSA) bei 4.000 rpm für 15 min bei 4 °C
- Überstand verwerfen und Pellet in 20 ml kaltem 10 % Glycerin/ddH₂O resuspendieren
- Zentrifugation in einem vorgekühlten Rotor (GSA) bei 4.000 rpm für 15 min bei 4 °C
- Überstand verwerfen und Pellet in ca. 2 ml kaltem 10 % Glycerin/ddH₂O resuspendieren (entspricht einer Zellkonzentration von ca. 1-3 x 10⁸ Zellen/ml)
- Aliquotieren der Suspension in je 50 µl Einheiten und sofort bei -70 °C lagern

2.2.3.3 Bakterientransformation (Elektrotransformation)

Die Transformationen von DNA in elektrokompetente *Escherichia coli* Stämme wurden mit dem *Gene-Pulser* der Firma BIORAD nach den Empfehlungen des Herstellers durchgeführt.

- Auftauen kompetenter Zellen auf Eis
- Mischen der 50 µl Zellsuspension mit geeigneter DNA Menge
- Überführen in eine gekühlte 0,1 cm Elektroporationsküvette
- Einsetzen der Küvette in *Gene-Pulser* (BIORAD)
- Impuls von 4-5 ms bei einer Feldstärke von 12,5 KV/cm (Einstellungen am Gene Pulser: Kapazität -25 µF, Spannung -1,8 KV)
- Küvette schnell entnehmen und 250 µl vorgewärmtes SOC-Medium zugeben
- Inkubation im Schüttler bei 37 °C für 30 min
- Ausstreichen auf einem geeigneten Selektionsmedium und bei 37 °C ü. N. kultivieren

2.2.3.4 DNA Restriktionen

Die DNA Restriktionen erfolgten gemäß Herstellerangaben (Roche).

2.2.3.5 Gelelektrophorese

Trennung der DNA Fragmente erfolgte bei 100 – 150 V durch Horizontalgelelektrophorese in Agarosegelen (0,8 bis 1,2 % in TBE) mit Ethidiumbromid (Stammlösung: 10 mg/ml H₂O davon 4 µl Ethidiumbromidlösung/ 100 ml Agarosegel). Als relatives Maß für die Größe der DNA Fragmente diente eine 1 kb-Leiter (Bioline, Luckenwalde).

2.2.3.6 Elution von DNA-Fragmenten aus einem präparativen Gel

Die Agarosegelelektrophorese wurde bei niedriger Spannung durchgeführt. Die Elution erfolgte mit einem Kit der Firma Qiagen (Gel Extraction KitTM). Die Arbeiten wurden entsprechend dem Protokoll des Herstellers durchgeführt.

2.2.3.7 Fällung von DNA

Der Lösung werden 1/10 Vol 3 M Ammoniumacetat und 2,5 Vol eiskaltes EtOH abs. zugegeben. Die Inkubation erfolgt für mindestens 5 min auf Eis. Anschließend wird in

einer Tischzentrifuge bei 13.000 rpm 15 min zentrifugiert. Das Pellet wird mit 70 % EtOH gewaschen, anschließend getrocknet und in H₂O dest. aufgenommen.

2.2.3.8 Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen

Zur Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen wurde ein zweckmäßiges Volumen auf ein Agarosegel aufgetragen. Als Standard diente 1 µg einer 1 kb-Leiter (Bioline, Luckenwalde). Die Konzentration der DNA-Lösung wurde durch einen Vergleich der relativen Fluoreszenzintensitäten unter UV-Licht bestimmt. Alternativ erfolgte die Konzentrationsbestimmung mithilfe eines Photometers (Eppendorf).

2.2.3.9 Ligation von DNA Fragmenten

Zur Ligation wurden der Vektor und das zu klonierende Fragment in einem molaren Verhältnis von 1:1 bis 1:4 eingesetzt. Bei einer Restriktion des Vektors mit nur einem Enzym muss dieser vor der Ligation zur Verhinderung einer Vektorreligation mit SAP (1 µg/µl Shrimps alkalische Phosphatase, Roche) für 15-20 min dephosphoryliert werden. Bei einer Doppelrestriktion konnte darauf verzichtet werden.

Ligationsansatz:	100 ng	Vektor DNA
	1-4 fache	molare Menge des DNA-Fragments
	2 µl	10 x Ligationspuffer (Promega)
	1 µl	T4 DNA Ligase (Promega)
	ad 20 µl H ₂ O	

Inkubation 1 h bei 22 °C oder ü. N. bei 16 °C

2.2.3.10 Mini-Präparation von Plasmid DNA

- Animpfen von 2 ml LB-Medium (mit Antibiotikum zur Selektion) mit Einzelkolonien
- Inkubation ü. N. bei 37 °C im Schüttler
- Überführen von ca. 1,5 ml Bakterienkultur in ein Reaktionsgefäß, den Rest kühl lagern
- Zentrifugation in einer Tischzentrifuge 30 sek bei 8.500 rpm und den Überstand abnehmen
- Zugabe von 250 µl Puffer P1 und durch Vortexen das Pellet lösen
- Zugabe von 250 µl Puffer P2, 5 min bei Raumtemperatur inkubieren
- Zugabe von 250 µl Puffer P3, 10 min auf Eis inkubieren

- Zentrifugieren für 12 min bei 13.000 rpm
- Überstand zu 400 µl Isopropanol in ein neues Reaktionsgefäß dekantieren und 1 min invertieren
- Fällung in einer Tischzentrifuge für 20 min bei 13.000 rpm
- Pellet mit 70 % EtOH waschen
- Pellet trocknen und in 20-100 µl RNase- H₂O resuspendieren

2.2.3.11 Midi-Präparation von Plasmid DNA

- 400 ml ü. N. Bakterienkultur 20 min bei 5.000 rpm und 4 °C zentrifugieren (Rotor JA10 Beckmann)
- Resuspension des Pellet mit 10 ml Puffer P1 auf Eis
- Zugabe von 10 ml Puffer P2, 4-6 x invertieren, 5-10 min bei RT inkubieren
- Zugabe von 10 ml Puffer P3, 4-6 x invertieren, 15-20 min auf Eis inkubieren
- Zentrifugation bei 4 °C 30 min mit 13.000 rpm (JA 25.5 Beckmann)
- Erneute Zentrifugation des Überstandes bei 4 °C 10-15 min bei 13.000 rpm
- QIA Midi-Säule mit 5 ml Puffer QBT equilibrieren, Überstand auf Säule geben
- 2 x mit je 10 ml Puffer QC waschen
- Elution mit 12 ml Puffer QF, DNA-Fällung durch Zugabe von 10 ml Isopropanol
- Zentrifugation bei 4 °C 30 min mit 8.500 rpm (JA13.1 Beckmann) und Überstand verwerfen
- Pellet mit 4 ml 70 % EtOH waschen, Zentrifugation bei 4 °C 10 min, 8.500 rpm
- Pellet bei 65 °C 5-10 min trocken
- Resuspension in 200-250 µl ddH₂O

2.2.3.12 Standard PCR

Für Standard Amplifikationen wurde entweder Plasmid DNA oder genomische DNA eingesetzt. Für die Amplifikation wurde folgender Reaktionsansatz (50 µl) angesetzt:

<i>template</i> DNA	ca. 0,1 mg/ml	1 µl
10 x Puffer	1 x	5 µl
dNTP	0,2 mM	1 µl
steriles ddH ₂ O	ad 50 µl	32 µl
Primer A (20 µM)	50 pmol bzw. 1 µM	5 µl
Primer B (20 µM)	50 pmol bzw. 1 µM	5 µl
TaqDNA Polymerase	1U	0,2 µl (New England Biolabs)

Das verwendete Temperaturprofil richtete sich nach der Länge des PCR Produktes, den *annealing*-Temperaturen der Primer und nach der Menge der eingesetzten *template* DNA. Die Temperaturprofile wurden entsprechend variiert.

Standard-Temperaturprofil:

Initiale Denaturierung	94 °C	3:00 min
Denaturierung	94 °C	0:30 min
<i>annealing</i> (je nach Primerpaar)	60 °C (variabel)	0:15 min
Extension	72 °C	2:30 min (variabel)
Wiederholung der Schritte 2 - 4		35 x
finale Extension	72 °C	8:00 min
Kühlen	4 °C	nach Bedarf

2.2.3.13 Single Embryo PCR

Die Embryonen werden zunächst auf einer Apfelsaftagarplatte vorsortiert. Ein bis drei Embryonen des korrekten Genotyps werden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Embryonen werden folgend in 40 µl SQUIB (200 µg/ml Proteinase K) zerstoßen. Die Lösung wird 30 min bei 37 °C inkubiert und anschließend die Proteinase 2 min bei 85 °C abgestoppt. Für eine Standard PCR wurde 1 µl dieser Lösung als *template* DNA eingesetzt.

2.2.3.14 Aufreinigung von PCR Produkten

Dem PCR-Produkt werden 5 Vol Puffer zugegeben. Die Lösung wird komplett auf eine QIAquick Säule überführt und 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Anschließend wird mit 750 µl Waschpuffer PE gewaschen. Der Durchfluss wird verworfen und es wird erneut 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. 30 µl des Elutionspuffers EB werden mittig auf die Säule gegeben. Nach 1 min Inkubation wird bei 13.000 rpm 1 min zentrifugiert.

2.2.3.15 Sequenzierung

Die Sequenzierungen erfolgten mit dem Sequenzierungskit *DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit for MegaBACE DNA Analysis Systems* (Amersham, Biosciences). Die Auswertung dieser Sequenzreaktionen wurde mit dem MegaBACE 500 (Molecular Dynamics, Amersham Pharmacia Biotech) durchgeführt. Zur Analyse

der Sequenzdaten wurde das Programm Lasergene DNA STAR Software Package (GATC, Konstanz) verwendet.

2.2.3.16 Isolierung genomischer DNA aus Fliegen

- 40 Fliegen in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführen und bei -20 °C einfrieren
- Fliegen in 300 µl Lysispuffer mit einem Homogenisator homogenisieren
- Zugabe von 500 µl Lysispuffer
- Inkubation für 30 min bei 65 °C unter Invertieren
- 1,5 ml Reaktionsgefäße auf Eis stellen, nach Zugabe von 150 µl 8 M KCl 30 min inkubieren
- Abzentrifugieren 30 min bei 13.000 rpm
- Überstand in ein neues Gefäß überführen und erneut 15 min bei 13.000 rpm zentrifugieren
- Überstand in 700 µl Isopropanol und 75 µl 2 M NaCl überführen (DNA fällen)
- Abzentrifugieren 30 min bei 13.000 rpm
- Pellet kurz trocknen und in 50 µl RNase-H₂O aufnehmen

2.2.3.17 Transfektion von S2/S2R+ Zellen

Die Zellen wurden in einer Dichte von 10⁵ Zellen pro kleines Kulturwell ausgesät und ü. N. bei 37 °C gehalten. Danach wurden die Transfektionsvektoren so zusammengebracht, dass eine DNA-Konzentration von 2 µg pro *well* nicht überschritten wurde (gleiche Mengen je Vektor, ko-transfiziert mit pUAS_t-act-Gal4). Des Weiteren wurde zur verbesserten DNA-Aufnahme das Fugene Reagenz hinzugegeben. Diese Komponenten wurden in *Drosophila* Zellkulturmedium zusammen gegeben, sodass je transfiziertem *well* ein Endvolumen von 500 µl Transfektionsansatz zur Verfügung stand. Nach einer halbstündigen Inkubation bei RT wurden die Transfektionsansätze auf die Zellen gegeben und diese bei 37 °C inkubiert. Nach drei Tagen konnten die transfizierten Zellen für weitere Versuche benutzt werden.

2.2.3.18 Klonierung der pMal Konstrukte

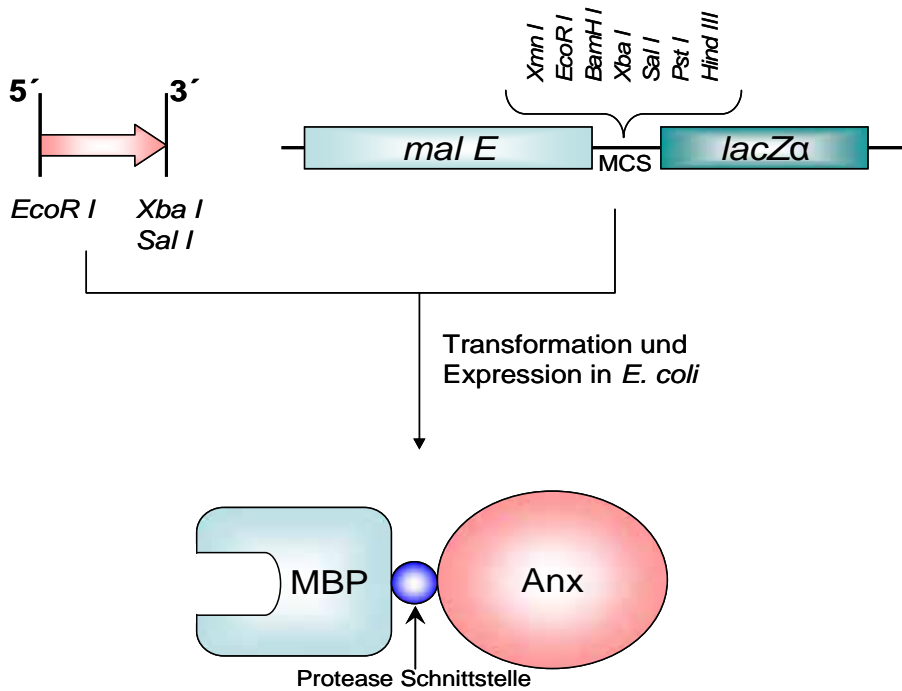


Abb. MM1: Klonierungsstrategie für die Expression von pMal Annexin-Maltosefusionsproteinen

Annexin Volllänge Sequenzen wurden über PCR amplifiziert und anschließend über *EcoRI/XbaI* bzw. *EcoRI/SalI* in den ebenso geöffneten pMal-Vektor gebracht. Die Primersequenzen und Klonierungskarten sind im Anhang dargestellt. Die verwendeten cDNA Klone sind in Abschnitt 2.1.7.6 aufgeführt. Die Expression der Fusionsproteine erfolgte in *E. coli* Zellen wie in Abschnitt 2.2.4.6 beschrieben.

2.2.3.19 Klonierung der pWiz Konstrukte

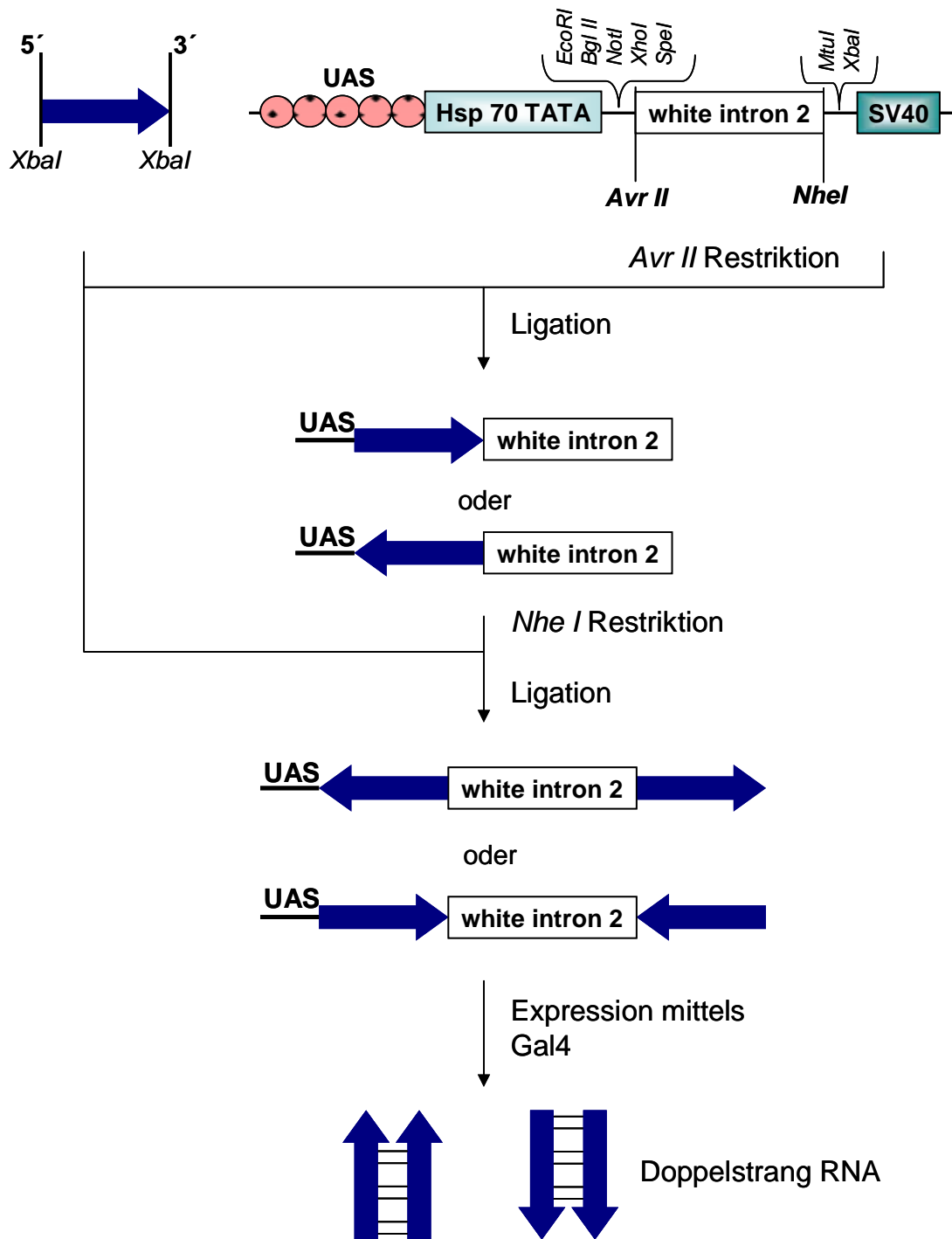


Abb. MM2: Klonierungsstrategie von UAS-RNAi Konstrukten

Ausgewählte PCR Produkte, generiert mit Restriktionsstellen durch *mismatch* Primer, wurden in den Vektor zu beiden Seiten des *white* Introns 2 gegensätzlich orientiert eingebracht. Verwendete Primer, der pWiz-Vektor und die Klonierungskarten sind im Anhang aufgeführt. (Schema modifiziert nach Lee et al., 2002).

2.2.4 Biochemische Methoden

2.2.4.1 Gewinnung von embryonalen Proteinextrakten

Embryonen wurden mit PBT in MWP überführt, in 5 % NaOCl für 4 min dechorionisiert, dann gründlich mit Wasser gewaschen und in Reaktionsgefäße überführt. Jeweils 30 dieser Embryonen wurden auf Eis gesammelt und in 30 µl Lysispuffer homogenisiert. Über einen Bradford Test wurde die Proteinmenge in dem Lysat festgestellt. Dieses wurde mit 2x SDS Probenpuffer versetzt und bei 100 °C für 5 min aufgekocht. Daraufhin wurde das Homogenisat für 15 min bei 13.000 rpm zentrifugiert um Gewebsreste zu entfernen und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Für die nachfolgende elektrophoretische Auftrennung wurden 30 µg Protein eingesetzt.

2.2.4.2 Gewinnung von S2-Zell Proteinextrakten

S2 Zellen wurden mit den entsprechenden Vektoren transfiziert. Nach drei Tagen wurden die Zellen von der Oberfläche abgeschwemmt und bei 900 rpm für 5 min pelletiert. Im Anschluss wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und jeweils wieder bei 900 rpm zentrifugiert. Danach wurden sie mit jeweils 1 ml S2 Lysepuffer für 30 min bei 4 °C inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen bei 14.000 rpm in einer Eppendorf Tischzentrifuge bei 4 °C für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde dann weiter verwendet (S2 Proteinextrakt).

2.2.4.3 Nachweis extrazellulärer Proteine in S2R+ Zellkultur

- S2R+ Zellen wurden mit den entsprechenden Vektoren transfiziert
- Zwei Tage inkubieren
- Medium abnehmen
- Zellen mit 100 µl PBS waschen, PBS abnehmen und als erste Proteinprobe auf Eis aufbewahren
- Zugabe von 100 µl 1 mM EGTA Lösung, EGTA Lösung abnehmen und als zweite Proteinprobe auf Eis aufbewahren
- Zugabe von 100 µl PBT, PBT abnehmen und als dritte Proteinprobe auf Eis aufbewahren
- Jeweils 15 µl der Proteinproben mit 15 µl Probenpuffer versetzen, aufkochen und vollständig auf ein SDS-Gel auftragen.

2.2.4.4 Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen

Die Auftrennung erfolgte unter denaturierenden Bedingungen in diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgelen. Es wurden Gelelektrophorese-Apparaturen der Firma Hoefer verwendet. Für die Gelelektrophorese wurden die SE 20 mini-Zellen mit 0,75 mm dicken Spacern benutzt. Nach dem Polymerisationsstart des Trenngels durch Zugabe von APS und TEMED wurde es bis auf 2/3 der gesamten Höhe der Gekassette gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach ca. 20 min wurde das Isopropanol abgegossen und durch die Sammelgellösung (plus APS und TEMED) ersetzt. Der Probenkamm wurde direkt danach eingesetzt. Die Polymerisation des Gels erfolgte für ca. 30 min. Nach dem Auftrag der Proben erfolgte die Gelelektrophorese bei 10-15 mA für ca. 2 h. Die Molekulargewichtsbestimmung der aufgetrennten Proteine erfolgt durch einen Vergleich mit standardisierten Markerproteinen.

2.2.4.5 Western-Blot und Immunodetektion von Proteinen

Die Proteine auf dem SDS Gel wurden anschließend über Western-Blotting auf eine PVDF-Membran übertragen. Der Proteintransfer von SDS-Polyacrylamidgelen auf eine PVDF-Membran erfolgte in einer Tank-Blot-Einheit der Firma Hoefer gemäß Herstellerangaben. Die PVDF-Membran wurde 1 min in Methanol aktiviert und für 5 min in Transferpuffer vorinkubiert. Der Transfer geschah für 40 min bei einer konstanten Stromstärke von 400 mA. Die Membran wurde 30 min in 10 % Milchpulver geblockt. Die verwendeten Antikörper wurden in geeigneten Konzentrationen in 10 % Milchpulver verdünnt und die Membran wurde in dieser Lösung bei 4 °C ü. N. auf dem Rolltaumler inkubiert. Die Membran wurde fünfmal 15 min in TBS Tween gewaschen und mit einem HRP sekundären Antikörper für 1-2 h bei RT inkubiert. Danach wurde dieser fünfmal 15 min in TBS Tween heruntergewaschen. Das ECL-Western-Blotting-Detektionssystem der Firma Amersham wurde laut Herstellerangaben benutzt, um die Antigene nachzuweisen.

2.2.4.6 Expression von Maltose Fusionsproteinen im großen Maßstab

- 2x 500 ml LB Medium mit 100 µl/ml Ampicillin animpfen
- Im Schüttler bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 inkubieren
- Induktion durch Zugabe von 3 ml einer 0,1 M IPTG Lösung
- In einem vorgekühlten Rotor bei 4 °C und 5.000 rpm für 20 min zentrifugieren

- Pellet in 50 ml Lysepuffer resuspendieren
- Bei -20 °C einfrieren
- Probe in kaltem Wasser langsam auftauen
- Zellaufschluss durch Sonifizieren
- 30 min bei 9.000 rpm und 4 °C zentrifugieren
- Überstand auf die vorbereitete Säule geben (ca. 1 ml Säulenmaterial)
- Waschen mit 5-10 Säulenvolumen Waschpuffer
- Elution mit insgesamt 5 ml Elutionspuffer, dabei Fraktionen von 1 ml auffangen
- Konzentrationsbestimmung über Bradfordlösung

2.2.4.7 Beschichtung einer Sepharosesäule mit einem Fusionsprotein

- In einem 1,5 ml Reaktionsgefäß 0,5 ml NHS-aktivierter Sepharosematrix bei 500 rpm 1 min zentrifugieren
- Überstand abnehmen
- Säule mit 1 mM HCl waschen
- Abzentrifugieren und Überstand erneut abnehmen
- Lösung des Fusionsproteins auf die Säule geben
- Inkubation ü. N. bei 4 °C auf einem Roller
- Abwechselnd dreimal mit Tris Puffer und Acetat Puffer waschen
- Zyklus sechsmal wiederholen
- Mit 10 Volumeneinheiten PBS waschen

2.2.4.8 Aufreinigung des Antiserums

- 2 ml Antikörperserum und 8 ml PBS auf ca. 1 ml beschichtetes Sepharose Säulenmaterial geben
- 3 h bei RT auf einem Roller inkubieren
- Überstand abnehmen und Säule mit 10 Volumeneinheiten PBS waschen
- Überstand abnehmen
- Zugabe von 500 µl 0,1 M Glycin pH 2,5
- 2 min inkubieren
- Bei 700 rpm 1 min zentrifugieren
- Überstand abnehmen und sofort mit 50 µl 1 M Tris pH 8 abpuffern
- Aufgereinigten Antikörper bei 4 °C aufbewahren

2.2.5 Sequenzanalysen

Alle in dieser Arbeit dargestellten Sequenzen und die Auswertung von Homologien wurden mithilfe der Software *CLC Combined Workbench* (Version 3.0.2) der Firma CLCBio (www.clcbio.com) erstellt.

3 Ergebnisse

3.1 *Drosophila*-Annexine

3.1.1 Modularer Aufbau der *Drosophila*-Annexine

Annexine fungieren als Ca^{2+} -abhängige, periphere, membranbindende Proteine. Insbesondere für die Vertebraten-Annexine wurden einige ihrer strukturellen und biochemischen Eigenschaften genauer beschrieben, wobei aber die exakte physiologische Rolle einzelner Annexine durch die Komplexität der Familie sehr schwer zu erfassen ist. Deshalb sollte im Rahmen dieser Arbeit versucht werden, über den Modellorganismus *Drosophila* weitere Erkenntnisse über die spezifischen Funktionen der Annexine zu erlangen. Das *Drosophila* Genom enthält mit nur drei *annexin* Genen, im Vergleich zu zwölf Vertebraten-*annexin* Genen eine leichter zu analysierende Anzahl von Vertretern dieser Proteinfamilie. Beschrieben sind die *Drosophila*-Annexine bisher kaum.

Die *Drosophila-annexin* Gene wurden gemäß der etablierten Nomenklatur *annexin b9*, *b10* und *b11* genannt (Moss and Morgan 2004). *annexin b9* ist auf dem dritten Chromosom bei 93B9 lokalisiert, *annexin b10* und *b11* sind auf dem X-Chromosom bei 19C1 bzw. 14C4 kartiert. Die *annexin b9* und *b11* Gene bilden nach differentiellem Spleißen verschiedene Proteinvarianten, wobei sich für Annexin B9 die daraus entstehenden Proteine nur geringfügig, ihr letztes Exon betreffend, unterscheiden. Beide Gene kodieren für ein jeweils 324 bzw. 320 Aminosäuren (AS) langes Protein mit einem molekularen Gewicht von ca. 36 kDa.

Im Gegensatz dazu ergibt sich für Annexin B11 ein anderes Bild. Wie Abbildung 1 zeigt, wird das zweite Exon nur in einer Isoform genutzt. Das daraus resultierende Protein ist 511 AS lang, im Gegensatz zur kürzeren Variante mit 322 AS. Dementsprechend ergeben sich Proteine mit einem molekularen Gewicht von ca. 36 kDa bzw. 56 kDa. Durch diesen signifikanten Unterschied ist es interessant, ob die längere Annexin B11 Version eine eigene, abweichende Funktion ausübt. Im Folgenden wird bei allen Versuchen zwischen den beiden Varianten unterschieden, indem von Annexin B11^{short} bzw. Annexin B11^{long} die Rede sein wird.

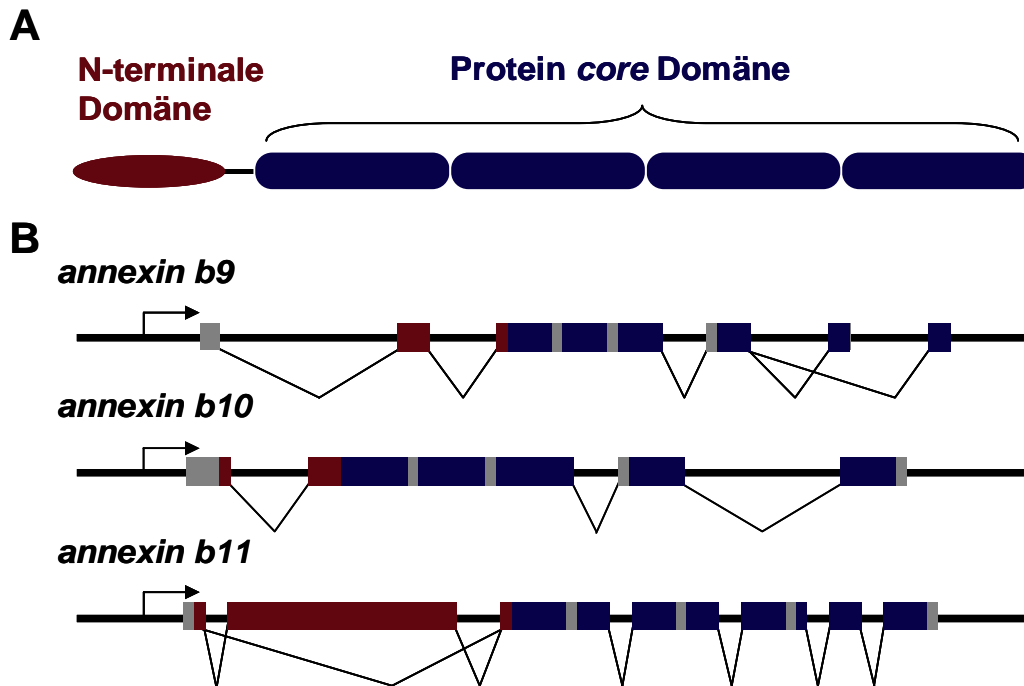


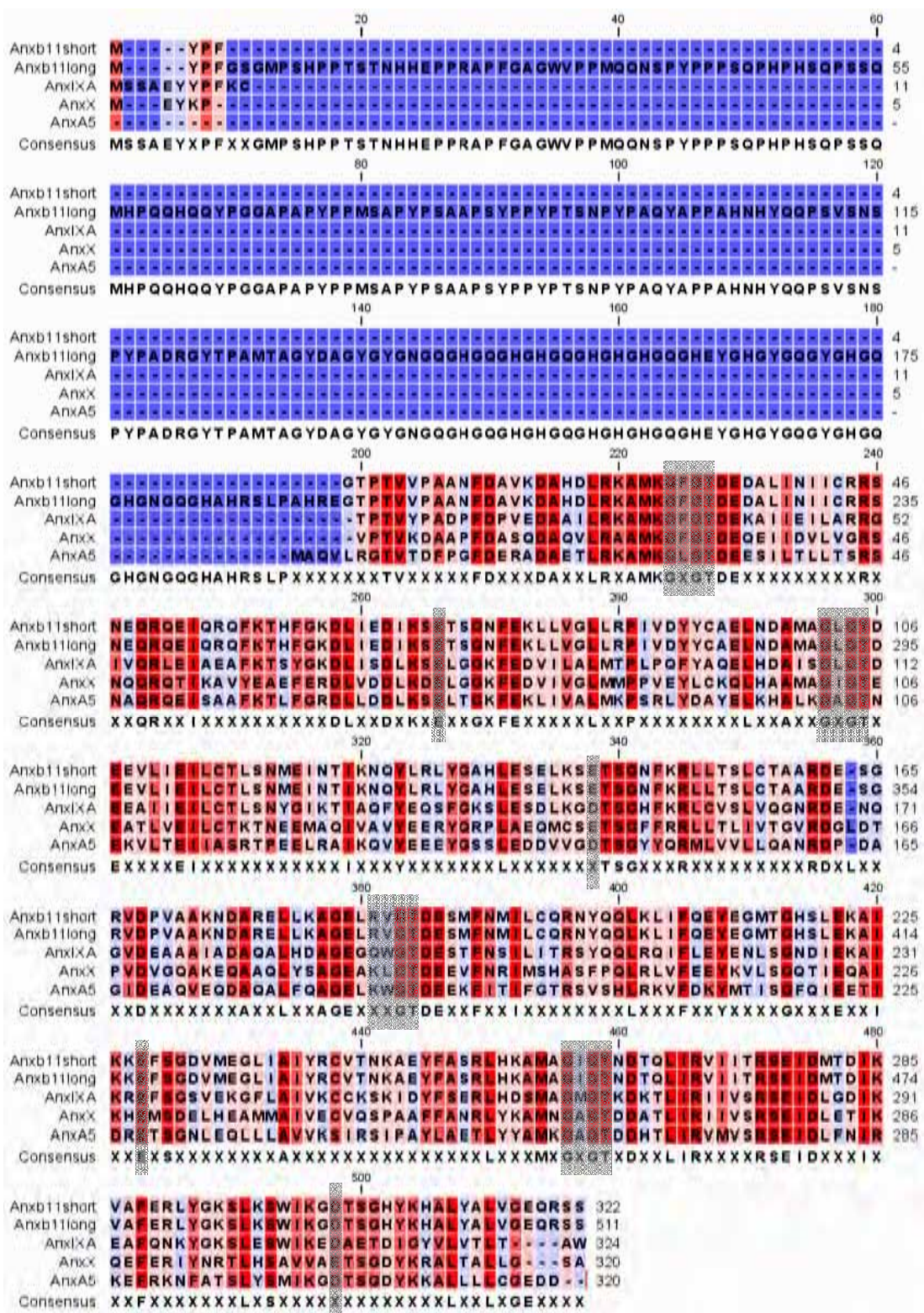
Abb. 1: Schematische Darstellung der Annexinstruktur

A Die charakteristische Domänenstruktur der Annexine setzt sich aus einem N-terminalen Teil (rot) und dem *core* zusammen, dieser wird durch vier konservierte Annexin *repeats* (blau) gebildet. **B** In allen Annexinen lassen sich diese Domänen wiederfinden. *annexin b11* kodiert für zwei Spleißvarianten, das zweite Exon wird dabei in nur einer Isoform genutzt.

3.1.2 Sequenzanalyse der *Drosophila*-Annexine

Alle *Drosophila*-Annexine zeigen die für diese Proteinfamilie charakteristische Domänenstruktur (Abb. 1). So lassen sich in allen Annexinen die sogenannten Annexin *repeats* in vierfacher Ausführung finden, diese bilden zusammen genommen den konservierten Annexin *core*. Außerdem enthalten die *Drosophila*-Annexinproteine einen variablen N-terminalen Anteil.

Vorangegangenen Sequenzanalysen zeigen, dass es keine direkten Homologe zu den Vertebraten-Annexinen gibt. Die Sequenzhomologie liegt zwischen 40 % und 50 %, wobei die Annexine A5 und A6 den *Drosophila*-Annexinen in ihrer Sequenz am ähnlichsten sind (Johnston, Perin et al. 1990). Eine genauere Sequenzanalyse stellt heraus, dass die *Drosophila*-Annexine untereinander eine Sequenzidentität von ca. 46 % aufweisen (Johnston, Perin et al. 1990). Hierbei ist herauszustellen, dass besonders innerhalb der schon beschriebenen *core* Domäne und der Ca^{2+} -Bindestellen hohe Identität auftritt. Des Weiteren ist es möglich, für alle Annexine die Konsensussequenz für vier Ca^{2+} Bindestellen zu identifizieren. Diese sind mit dem Sequenzmotiv GxGT-(38 Aminosäurereste)-D/E beschrieben



Farbcode,
Übereinstimmung in %: 0% 100%

Ca²⁺ Bindestellen:
GxGT-(38AS)-D/E

Abb. 2: Sequenzvergleich der *Drosophila* Annexine mit humanem Annexin A5

Die Aminosäuresequenzen der *Drosophila* Annexine B9, B10, B11^{short} und B11^{long} im Vergleich zum humanen Annexin A5. Die Übereinstimmung der Aminosäuren ist farblich kodiert (blau= keine Übereinstimmung, rot= identische Aminosäuren). Grau unterlegt sind die Ca²⁺ Bindestellen der Proteine.

(Moss and Morgan 2004). Wie aus Abbildung 2 (grau unterlegt) ersichtlich, ergibt sich dies in allen *Drosophila*-Annexinen und dem humanen Annexin A5 für drei der vorhergesagten Ca^{2+} -Bindestellen, eine (die dritte Ca^{2+} -Bindestelle) unterscheidet sich in ihrer Sequenz. Sie enthält keinen konservierten Glycinrest am Anfang der Bindestelle (Abb. 2).

Wie schon in der Einleitung erwähnt, ist die N-terminale Domäne der Ort zahlreicher posttranskriptionaler Modifikationen und Bindestellen für intrazelluläre Proteine. Sie ist in ihrer Ausprägung deutlich variabler als der Annexin *core*. So kann diese Domäne nur aus ca. 20 AS aufgebaut sein (Anx A3, A5) oder mit über 100 AS deutlich länger ausfallen (Anx A7, A11). Die *Drosophila*-Annexine B9, B10 und B11^{short} enthalten mit 23-29 AS nur eine vergleichsweise kurze N-terminale Domäne. Auch im fast 200 AS langen N-terminalen Ende von Annexin B11^{long} wurden keine charakteristischen Sequenzmotive gefunden. Auffallend ist hier lediglich, dass die Sequenz prolin- und glycinreich ist (33 Prolinreste/30 Glycinreste in 186 AS). Außerdem weist die N-terminale Domäne des *Drosophila* Annexin B11^{long}-Proteins ca. 35 % AS-Identität zum N-terminalen Abschnitt des humanen Annexin A11 auf.

3.2 Expressionsstudien der *Drosophila-annexin* Gene

3.2.1 Die mRNA Expression der *annexine*

Eine Analyse der *annexin* Transkripte sollte Aufschluss darüber geben, in welchen Geweben und zu welchem Zeitpunkt Annexine exprimiert und folglich wahrscheinlich benötigt werden. Außerdem kann so ermittelt werden, ob sich die *Drosophila*-Annexine in ihrem Expressionsmuster unterscheiden, was auf unterschiedliche Regulation oder Funktionen hindeuten kann.

Zu diesem Zweck wurden *whole mount* RNA *in situ* Hybridisierungen an Wildtyp Embryonen durchgeführt. Die markierten *antisense* Sonden wurden mithilfe folgender cDNA Klone generiert: LD09947 (*anx b9*), LD25605 (*anx b10*), GH16395 (*anx b11^{short}*) und LD19596 (*anx b11^{long}*). Die über die cDNAs GH16395 und LD19596 generierten Sonden betreffen die beiden Volllänge *annexin b11* Transkripte und lassen das gleiche Expressionsmuster erkennen. Die Analyse der längeren Isoform zeigt kein zusätzliches Signal. Deshalb werden die Ergebnisse hier nicht

einzel dargestellt. Um zwischen den beiden *annexin b11* Spleißvarianten diskriminieren zu können, müsste eine *in situ* Analyse anhand der spezifischen Exonsequenz (Exon 2) durchgeführt werden.

Die Expressionsdaten in den Abbildungen 3-5 zeigen zunächst eine frühe ubiquitäre Expression, die erst ab dem Stadium 8 spezifischer erscheint. Hierbei handelt es sich möglicherweise um eine maternal übertragene Komponente.

Danach unterscheiden sich die *annexin* Gene in ihrem Expressionsmuster. Für *annexin b9* nimmt die starke Expression ab dem Stadium 8 deutlich ab (Abb. 3B). Ab Stadium 8 ist ein Signal im Mesoderm zu erkennen (Abb. 3B, C) und folgend im ZNS (Pfeil Abb. 3C, Stadium 12). In Stadium 14 wird dies noch deutlicher. In der ventralen Aufsicht zeigt sich die *annexin b9*-Expression weiterhin in Zellen des Nervensystems, wobei es sich wahrscheinlich um Gliazellen handelt (Abb. 3D). Dies müsste jedoch mit einer Doppelfärbung verifiziert werden.

Für *annexin b10* ergibt sich ein ähnliches Bild (Abb. 4). Auch hier lässt sich früh in der Entwicklung ubiquitäre *annexin b10*-Expression nachweisen (Abb. 4A). Später wird *annexin b10* wie *annexin b9* im Mesoderm (Abb. 4B, Stadium 10) und in peripheren Gliazellen exprimiert (Pfeil Abb. 4C, D, Stadium 14). Zusätzlich ergibt sich hier auch ein Signal in der Herzanlage (Abb. 4E). Die Analyse der *annexin b11* Genexpression zeigt einen spezifischen Unterschied zu *annexin b9* und *b10* nach Stadium 12 (Abb. 5). *annexin b11* wird früh stark exprimiert (Abb. 5A), im Stadium 10 und 12 ergibt sich das gleiche Expressionsmuster wie für *annexin b9* und *b10* (Abb. 5B, Stadium 10, Abb. 5C, Stadium 12). Später ist besonders die Expression im ZNS hervorzuheben, in der ventralen Aufsicht ist ein Signal in der Mittellinie erkennbar (Abb. 5D, Pfeil). Für alle *annexine* kann folglich gezeigt werden, dass früh in der Embryonalentwicklung ubiquitär exprimierte mRNA nachweisbar ist. Später lässt sich eine Expression im Nervensystem nachweisen, was für eine Aufgabe der Annexine in diesem Gewebe spricht.

3.2.2 Überexpressionsstudien

Zur weiteren Charakterisierung der Annexine wurden Annexin-GFP-Fusionskonstrukte erstellt (Chlystun 2006). Mithilfe dieser Konstrukte ist es möglich, neben der Lokalisationsanalyse auch Überexpressionsstudien unter Anwendung des UAS Gal4 Systems (Brand and Perrimon 1993) durchzuführen.

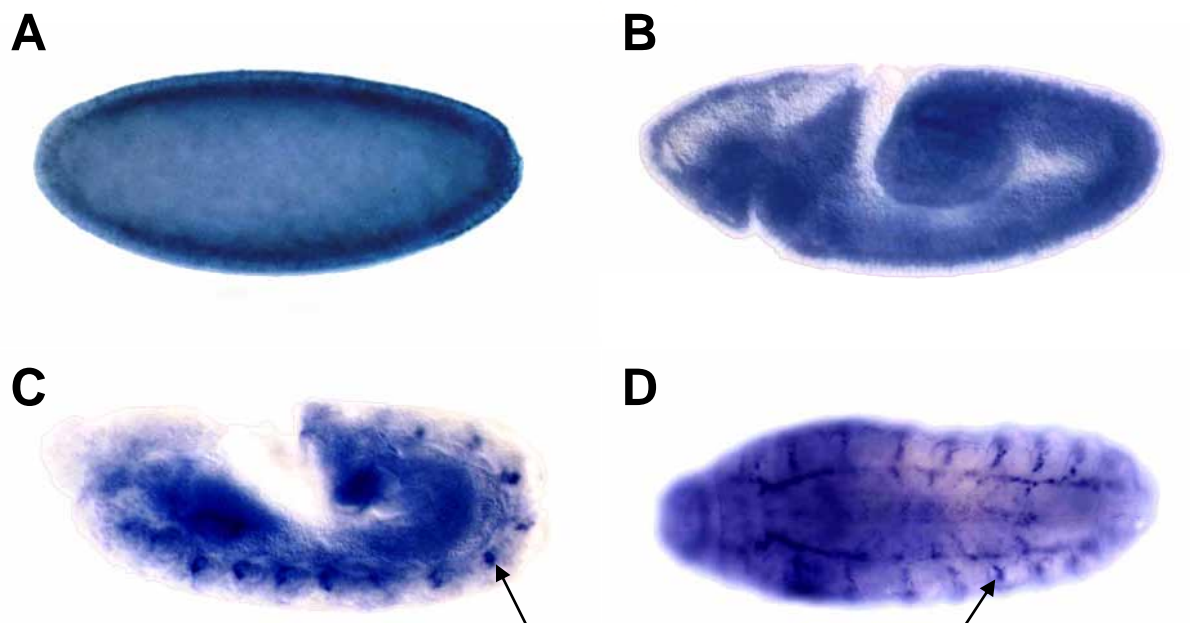


Abb. 3: Die *annexin b9* mRNA ist während der embryonalen Entwicklung von *Drosophila* dauerhaft nachweisbar

A Zelluläres Blastoderm **B** Stadium 8 lateral **C** Stadium 12 lateral **D** Stadium 14 ventral. Anterior ist links.

Das mRNA Expressionsmuster wurde durch *whole mount in situ* Hybridisierung mit einer transkriptspezifischen DIG-markierten *antisense* Sonde von *annexin b9* generiert. Im zellulären Blastoderm ist eine starke maternale Komponente zu erkennen (**A**). In den folgenden Entwicklungsstadien ist die *annexin b9* Expression im Mesoderm (**B**), dem ZNS (Pfeil **C**) und peripheren Gliazellen (Pfeil **D**) nachweisbar.

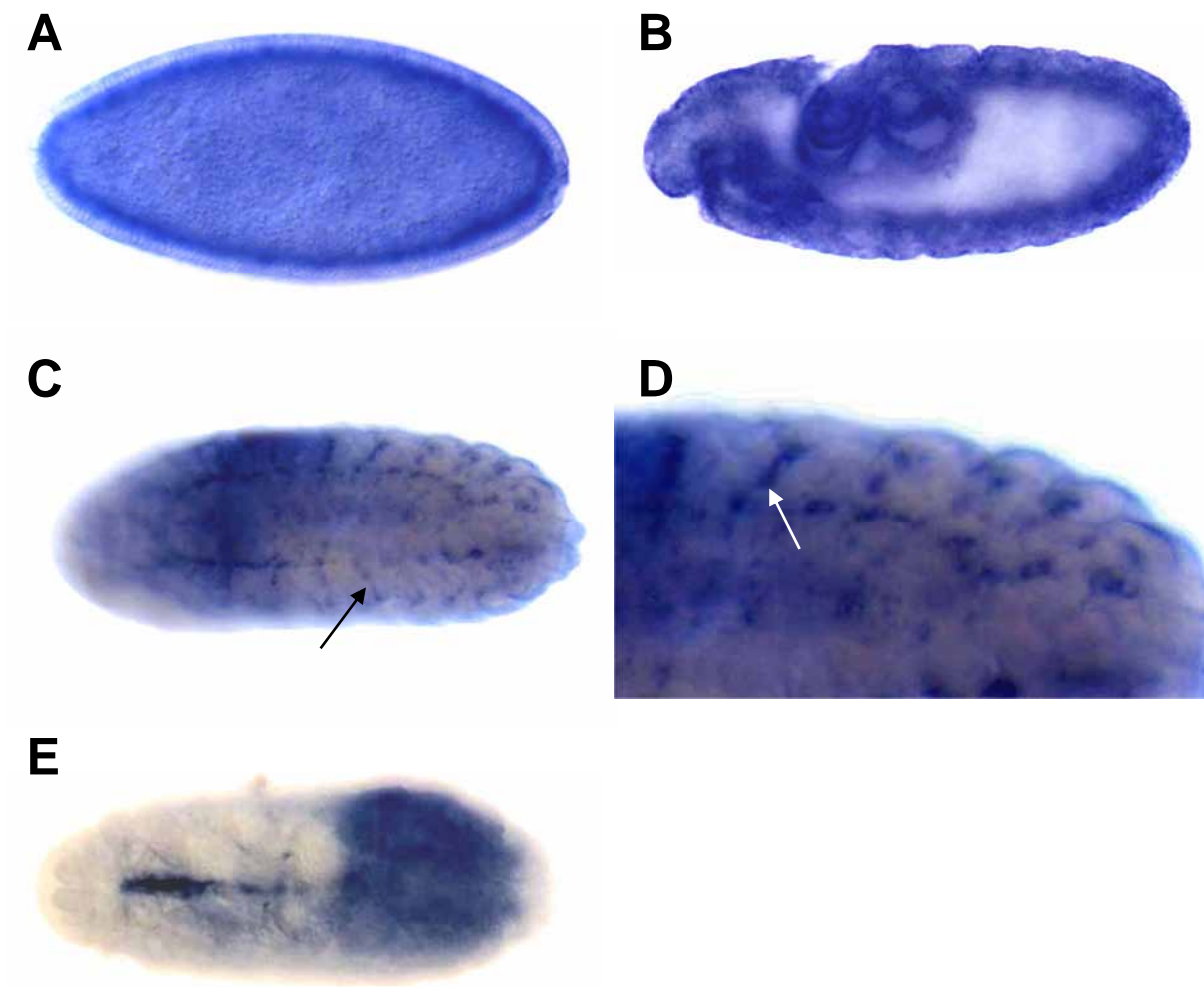


Abb. 4: Die *annexin b10* mRNA ist während der embryonalen Entwicklung von *Drosophila* dauerhaft nachweisbar

A Zelluläres Blastoderm **B** Stadium 10 lateral **C** Stadium 14 ventral **D** Detailansicht aus **C** **E** Stadium 17 ventral. Anterior ist links.

Das mRNA Expressionsmuster wurde durch *whole mount in situ* Hybridisierung mit einer transkriptspezifischen DIG-markierten *antisense* Sonde von *annexin b10* generiert. Im zellulären Blastoderm ist eine starke maternale Komponente von *annexin b10* nachweisbar (**A**). Ab Stadium 10 wird das Transkript im Mesoderm (**B**) und in peripheren Gliazellen exprimiert (Pfeile **C**, detaillierter in **D**). In der späten Entwicklung gibt es eine verstärkte Expression in der Herzanlage (**E**).

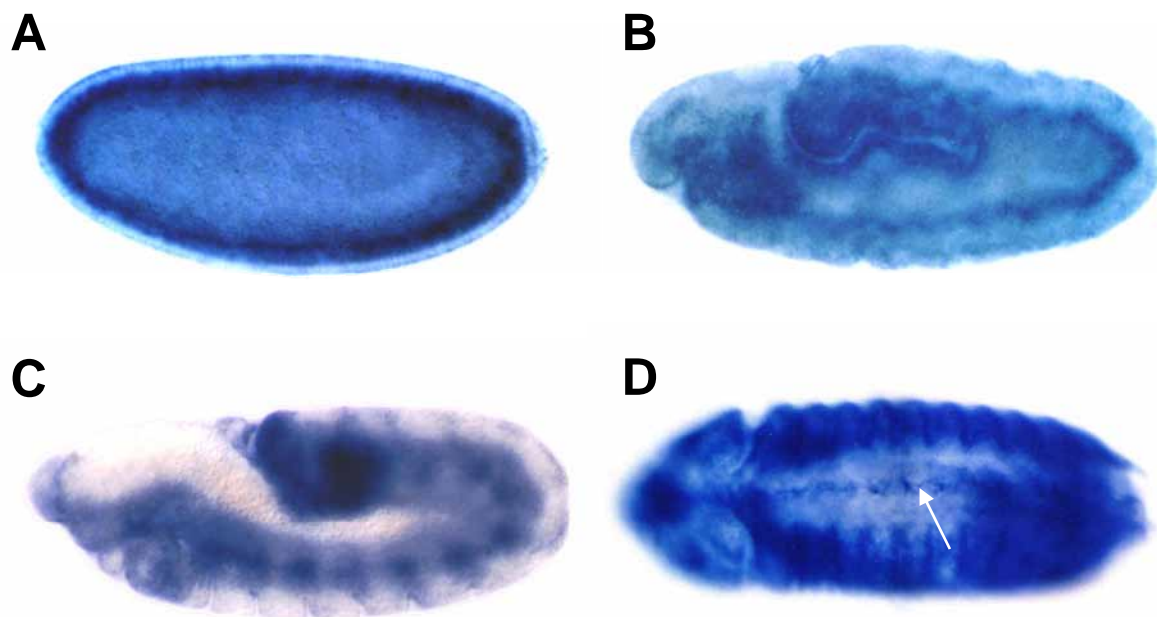


Abb. 5: Die *annexin b11* mRNA ist während der embryonalen Entwicklung von *Drosophila* dauerhaft nachweisbar

A Zelluläres Blastoderm **B** Stadium 10 lateral **C** Stadium 12 lateral **D** Stadium 15 ventral. Anterior ist links.

Das mRNA Expressionsmuster wurde durch *whole mount in situ* Hybridisierung mit einer transkriptspezifischen DIG-markierten *antisense* Sonde von *annexin b11^{short}* generiert. Die *annexin b11* mRNA ist im zellulären Blastoderm nachweisbar (**A**). Expression im Mesoderm beginnt im Stadium 10 (**B**). Ab Stadium 12 lässt sich das Transkript auch im Nervensystem nachweisen (**C**). Mittelinienzellen exprimieren ab Stadium 15 *annexin b11* (Pfeil **D**).

Um den Einfluss einer Annexin Überexpression zu testen, wurden *Drosophila* S2R+ Zellen mit den entsprechenden Konstrukten transfiziert und auf ein GFP-Signal hin untersucht. Dies war für alle Annexin-GFP-Fusionen deutlich zu erkennen (vgl. Abb. 13). Zellen, in denen Annexin überexprimiert vorliegt, weichen phänotypisch nicht von untransfizierten Zellen ab.

Anschließend wurden zusätzlich transgene *Drosophila* Linien für alle Überexpressionskonstrukte generiert. Um den Effekt einer ektopischen Expression verschiedener Annexine in unterschiedlichen Geweben zu analysieren, wurden verschiedene Treiberlinien gegen die transgenen UAS-Annexin-GFP Linien gekreuzt und auf einen mutanten Phänotyp hin untersucht. Um eine starke, ubiquitäre Expression zu erreichen, wurde die Treiberlinie *daGal4* genutzt. Außerdem wurde die Expression in unterschiedlichen Geweben über *scaGal4* (Expression im proneuralen Cluster während der Borstenentwicklung), *GMRGal4* (Expression in allen Zellen der Augenimaginalscheibe posterior der morphogenetischen Furche) und *enGal4* (Expression im Muster des Segmentpolaritätsgens *engrailed*) erzielt. Alle Versuche wurden bei Raumtemperatur, 25 °C und 29 °C durchgeführt. Eine Temperaturerhöhung führt zu vermehrter Expression und dementsprechend möglicherweise zu stärkeren Effekten.

Die Expression der Fusionsproteine lässt sich einfach über das GFP-Signal verfolgen. In allen Fällen war dies deutlich zu erkennen (Daten nicht gezeigt). Weder in der adulten Fliege noch in einem der untersuchten Gewebe zeigt sich ein vom Wildtyp abweichender Phänotyp (Daten nicht gezeigt). Dies gilt für alle untersuchten Annexin-GFP-Konstrukte. Die Überexpression der Annexine führt zu keinem erkennbaren physiologischen oder morphologischen Defekt. Dies ändert sich auch nicht, wenn die Expression durch Temperaturerhöhung oder Einkreuzen weiterer Treiber- oder Konstruktkopien verstärkt wird.

3.2.3 Charakterisierung der Annexin Antiseren

Zur Lokalisationsanalyse der Annexine wurden Antikörper generiert. Hierbei wurde versucht, neben Seren gegen die Annexin B9, B10 und B11^{short} Proteine ebenfalls ein Antiserum gegen das zweite Exon der Annexin B11^{long} (B11_{Ex2} Serum) Spleißvariante zu erzeugen. Da sich die beiden Isoformen in der Nutzung eines verhältnismäßig langen Exons unterscheiden, wäre es denkbar, dass sie unterschiedliche Funktionen erfüllen. Ein spezifisches Antiserum könnte eine

Unterscheidung zwischen den beiden Isoformen ermöglichen. Mithilfe von Expressionskonstrukten wurden die Proteine in Bakterien exprimiert und anschließend zur Antikörpergenerierung genutzt (siehe M&M, M. Chlystun). Die Spezifität der Antikörper wurde jeweils über Western-Blot Analysen, *whole mount* und Gewebefärbungen getestet.

3.2.4 Die Annexin Antiseren erkennen spezifisch ihr jeweiliges Protein

Um die Spezifität der Antikörper zu überprüfen, wurden zunächst Proteinlysate aus wildtypischen Fliegen und aus Tieren, in denen die Annexin-GFP-Fusionsproteine überexprimiert vorlagen, gewonnen. Dabei sollte insbesondere die Spezifität der Antikörper für das jeweilige Annexin bestimmt werden.

Es zeigt sich, dass von den vier getesteten Antiseren drei für Western-Blot Experimente geeignet sind. Durch den gegen Annexin B11^{short} generierten Antikörper (B11_{short}) erhält man in keiner der benutzten Verdünnungen ein Signal (Daten nicht gezeigt). Die endogenen Annexinproteine haben eine vorhergesagte Größe von 36 kDa (Anx B9, B10, B11^{short}) bzw. 56 kDa (Anx B11^{long}). Durch die Fusion mit dem GFP-Protein (26 kDa) ergeben sich Größen von ca. 62 kDa bzw. 82 kDa. Für die Annexine B9 (Abb. 6I), B10 (Abb. 7I) und B11^{long} (Abb. 9I) erkennt der jeweilige Antikörper im Blot ein Protein für alle aufgetragenen Proteinlysate. Hierbei handelt es sich jeweils um die endogenen Annexin-Proteine mit einer Größe von 36 kDa bzw. 56 kDa. Für die Überexpressionen der Annexin-GFP-Fusionen gilt, dass nur der jeweils generierte Antikörper zur Detektion der spezifischen Bande führt. So wird durch das Annexin B9 Antiserum nur die Annexin B9-GFP-Fusion erkannt, nicht aber die GFP-Fusionen mit Annexin B10 oder B11. Entsprechendes gilt auch für die Annexin B10 und B11_{Ex2} Seren (Abb. 6I, Spur 1, Abb. 7I, Spur 3, Abb. 9I, Spur 4). Dass es sich jeweils um das überexprimierte Fusionsprotein handelt, wurde über einen gegen GFP-gerichteten Antikörper bestätigt (Daten nicht gezeigt). Trotz der hohen Sequenzidentität sind die Antikörper in allen drei Fällen ausweichend spezifisch, um zwischen den *Drosophila*-Annexine differenzieren zu können. Durch das Annexin B11_{Ex2} Antiserum wird ein weiteres Protein von ca. 60 kDa erkannt (Abb. 9I, Spur 4). Um welches Protein es sich handelt, ist nicht bekannt.

Um die Spezifität der Antikörper gleichermaßen auch für das *Drosophila* Gewebe zu zeigen, wurden Embryonen gefärbt, in denen unter der Kontrolle des *engrailed* Gal4 Treibers Annexin-GFP überexprimiert wurde (*en*> Annexin-GFP). Dadurch erhält

man Bereiche, in denen das Protein vermehrt exprimiert wird, neben wildtypischen Bereichen mit nur endogenem Protein. Erkennt der Antikörper das jeweilig überexprimierte Protein, sollte das Antikörper Signal in diesem Bereich stärker sein. Um wiederum auch die Spezifität zu überprüfen, wurden alle Antikörper auf *en>* Annexin B9-GFP, *en>* Annexin B10-GFP, *en>* Annexin B11^{short}-GFP und *en>* Annexin B11^{long}-GFP Embryonen getestet. Die Ergebnisse zeigen die Abbildungen 6-9. Für alle Annexin-GFP-Konstrukte ergibt sich ein deutliches GFP-Signal. Eine erhöhte Antikörperbindung findet dabei nur in zwei Fällen statt. In den Abbildungen 7C und 9G ist gezeigt, wie die Überexpressionen zu einem verstärkten Signal führen (rot unterlegt). Dabei handelt es sich um die Auswertung über das Annexin B10 Antiserum nach Annexin B10 Überexpression bzw. das Annexin B11_{Ex2} Antiserum nach Annexin B11^{long} Überexpression. Dies bestätigt, dass die Antikörper B10 und B11_{Ex2} spezifisch nur das entsprechende Annexinprotein erkennen. Außerdem ist ersichtlich, dass in *whole mount* Färbungen von Embryonen nur die genannten Antikörper funktionieren. Für die Antikörper gegen Annexin B9 und B11^{short} kann keinerlei spezifisches Signal detektiert werden (Abb. 6, 8).

Mit den Antikörpern B10 und B11_{Ex2} wurden nun zusätzlich wildtypische Embryonen gefärbt. Hierbei sollte sich zeigen, ob die Annexine zu distinkten Zeitpunkten in bestimmten Geweben exprimiert werden. Beide Annexine werden innerhalb der Entwicklung dauerhaft und ubiquitär exprimiert (Daten nicht gezeigt). In Abbildung 10 sind wildtypische Embryonen des Stadiums 16 (Abb. 10A, Anx B10) bzw. 17 (Abb. 10B, Anx B11_{Ex2}) in der ventralen Aufsicht dargestellt. Beide Annexine werden stark exprimiert. Es ist ein deutliches Signal in der Muskulatur, der Epidermis, dem gesamten ZNS und speziell auch der Mittellinie erkennbar.

Um die Lokalisation auch für weitere Gewebe beschreiben zu können, wurden Imaginalscheiben mit den Antikörpern gefärbt. Hierfür stellt sich für Flügelimaginalscheiben dar, dass nur die gegen Annexin B10 und B11^{long} generierten Antiseren im Gewebe spezifisch binden (Abb. 11, 12, Daten für B9 und B11^{short} nicht gezeigt). In Abbildung 11 (Pfeil in F) lässt sich für Annexin B10 ein punktiertes Signal erkennen, das darauf hindeutet, dass es sich bei den markierten Strukturen eventuell um Vesikel handelt. Dies würde mit vielen beschriebenen Lokalisationen und Funktionen der Vertebraten-Annexine in membranabhängigen Prozessen innerhalb der Zelle einhergehen (siehe Einleitung). Außerdem ist für Annexin B11_{Ex2} sichtbar, dass auch Membranen erkannt werden (Abb. 12D).

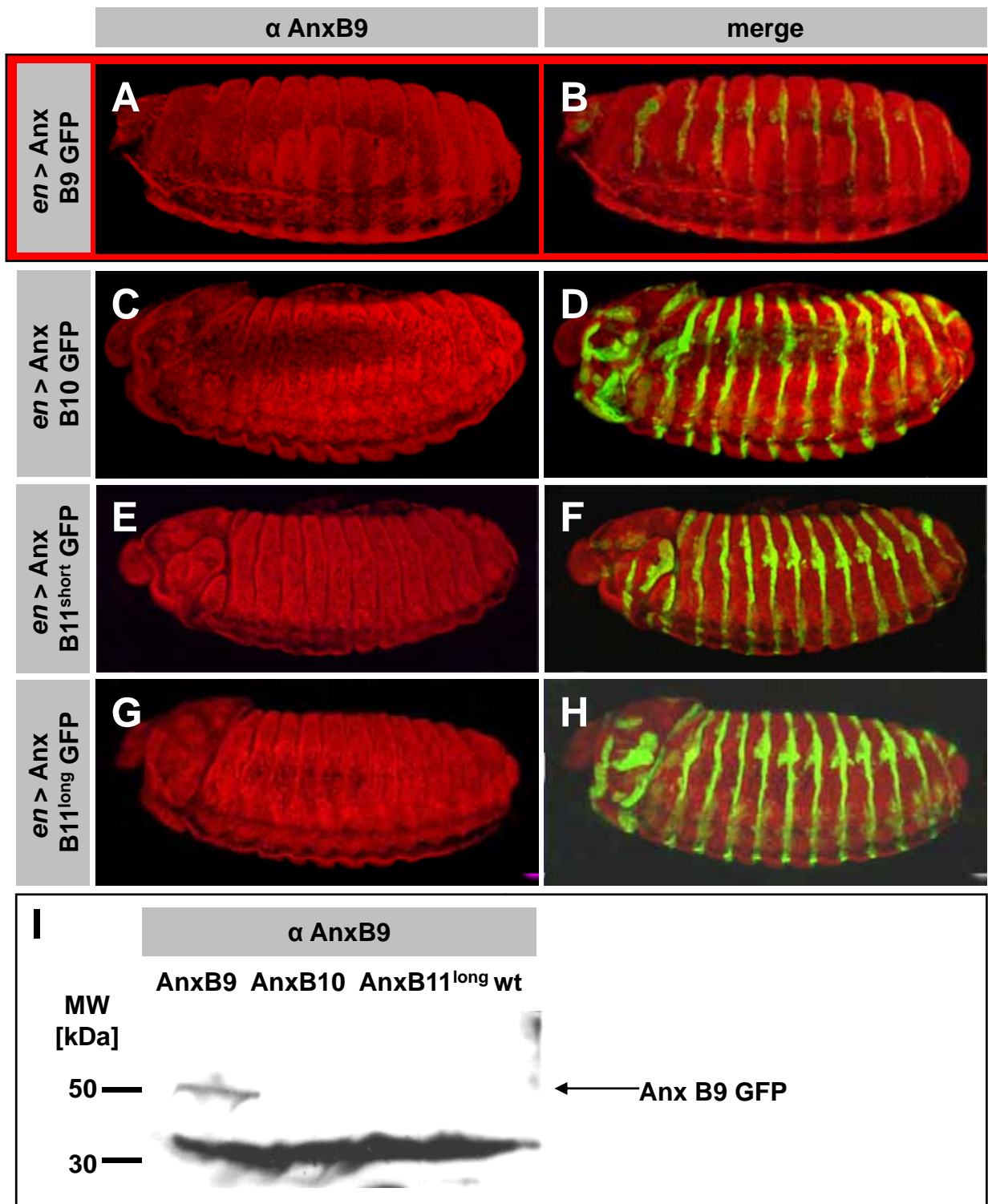


Abb. 6: Über das Annexin B9 Antiserum lässt sich in Western Blot Analysen spezifisch Annexin B9 nachweisen

A-H Test der Antikörperspezifität auf Embryonen. Dargestellt sind Überexpressionen aller Annexine unter der Kontrolle des *engrailed* Gal4 Treibers (**B, D, F, H**) und die Auswertung über das Annexin B9 Antiserum (**A, C, E, G**). Anterior ist links, ventral unten. Die Überexpression des Annexin B9 GFP Fusionsproteins wird nicht durch das Antiserum erkannt (rot unterlegt **A, B**). (**I**) Western Blot Analyse an embryonalen Lysaten der Annexin-GFP-Überexpressionen. Endogenes Annexin B9 (36kDa) wird in allen Lysaten erkannt. Das Serum erkennt außerdem spezifisch die Überexpression von Annexin B9 GFP (62kDa) (**I**, Spur 1).

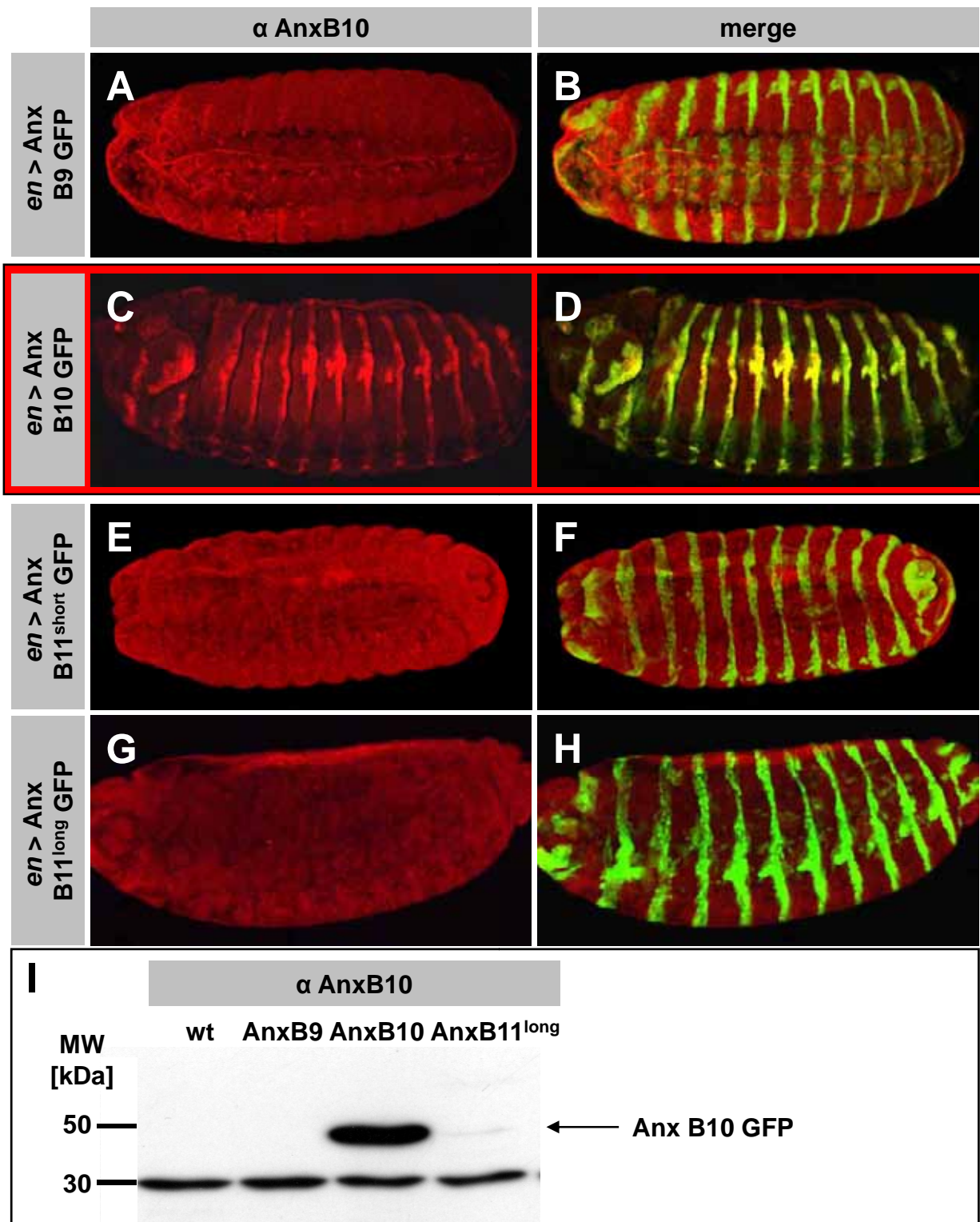


Abb. 7: Über das Annexin B10 Antiserum lässt sich spezifisch Annexin B10 nachweisen

A-H Test der Antikörperspezifität auf Embryonen. Dargestellt sind Überexpressionen aller Annexine unter der Kontrolle des *engrailed* Gal4 Treibers (**B, D, F, H**) und die Auswertung über das Annexin B10 Antiserum (**A, C, E, G**). Anterior ist links, ventral unten. Die Überexpression des Annexin B10 GFP Fusionsproteins wird durch das Antiserum erkannt (rot unterlegt **C, D**). (**I**) Western Blot Analyse an embryonalen Lysaten der Annexin-GFP-Überexpressionen. Endogenes Annexin B10 (36kDa) wird in allen Lysaten erkannt. Das Serum erkennt außerdem spezifisch die Überexpression von Annexin B10 GFP (62kDa) (**I, Spur 1**).

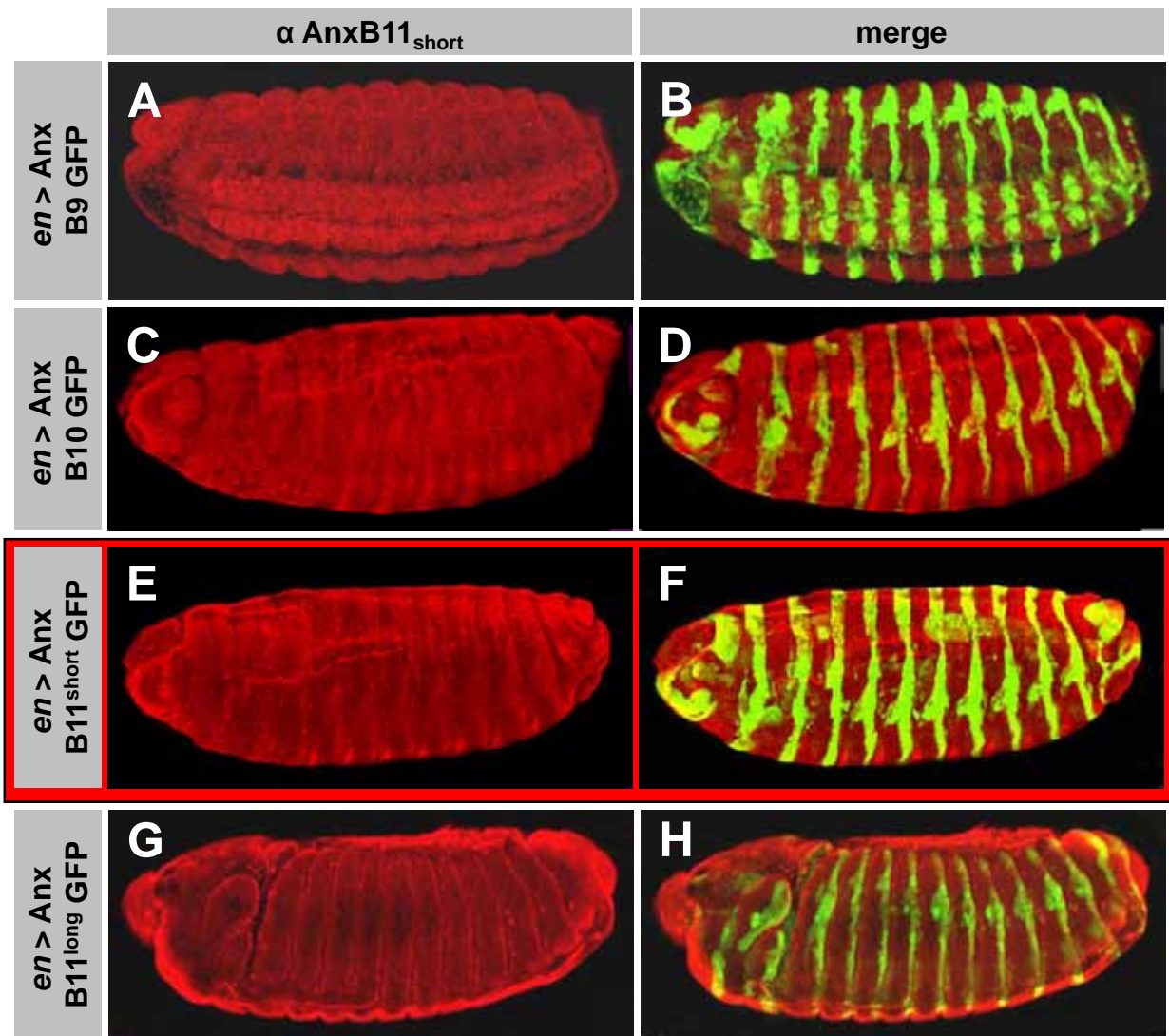


Abb. 8: Test des Annexin B11_{short} Antiserums

A-H Test der Antikörperspezifität auf Embryonen. Dargestellt sind Überexpressionen aller Annexine unter der Kontrolle des *engrailed* Gal4 Treibers (**B, D, F, H**) und die Auswertung über das Annexin B11_{short} Antiserum (**A, C, E, G**). Anterior ist links, ventral unten. Die Überexpression des Annexin B11_{short} GFP Fusionsproteins wird nicht durch das Antiserum erkannt (rot unterlegt **E, F**).

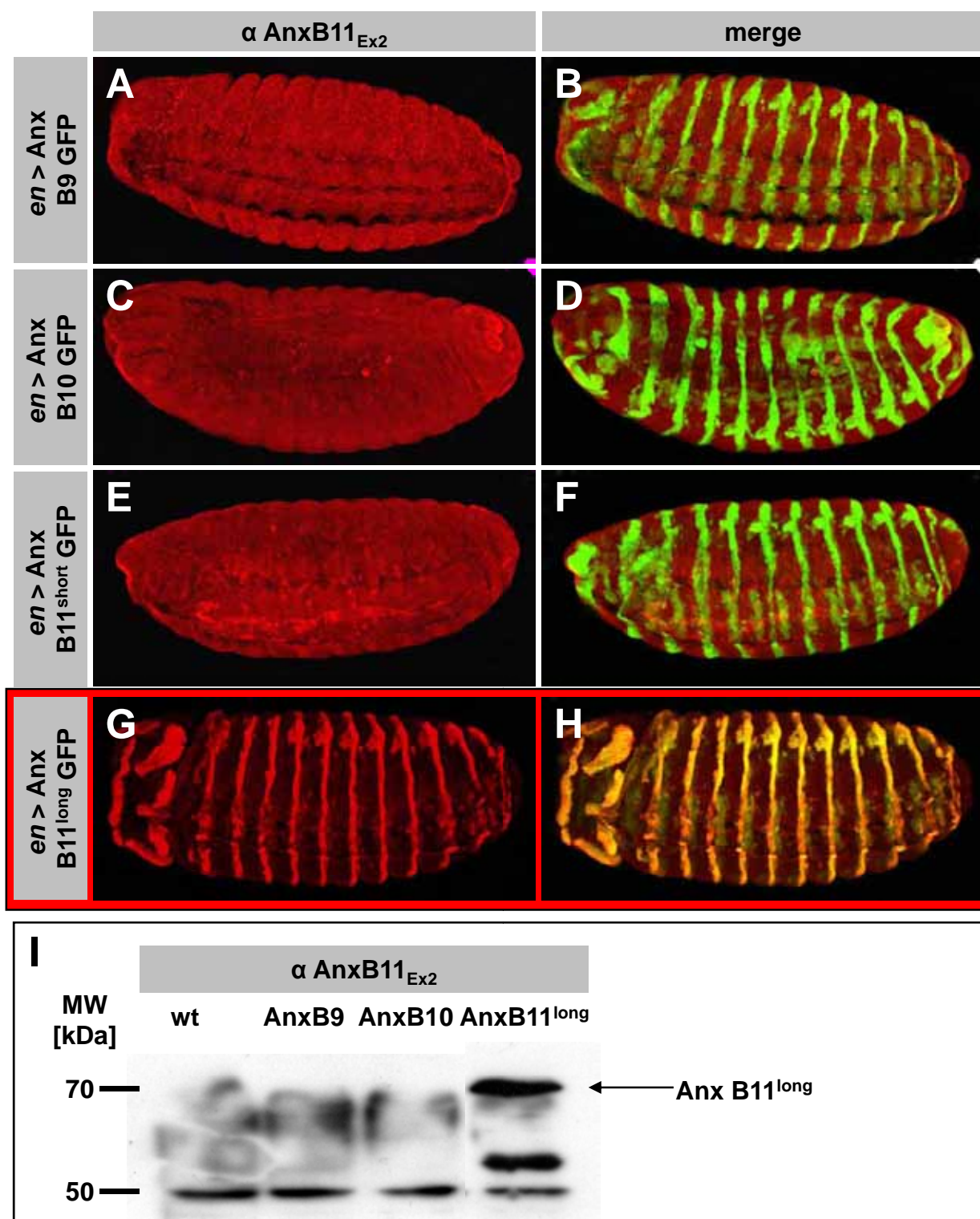


Abb. 9: Über das Annexin B11_{Ex2} Antiserum lässt sich spezifisch Annexin B11^{long} nachweisen

A-H Test der Antikörperspezifität auf Embryonen. Dargestellt sind Überexpressionen aller Annexine unter der Kontrolle des *engrailed* Gal4 Treibers (**B, D, F, H**) und die Auswertung über das Annexin B11_{Ex2} Antiserum (**A, C, E, G**). Anterior ist links, ventral unten. Die Überexpression des Annexin B11^{long} GFP Fusionsproteins wird durch das Antiserum erkannt (rot unterlegt **G, H**). (**I**) Western Blot Analyse an embryonalen Lysaten der Annexin-GFP-Überexpressionen. Endogenes Annexin B11^{long} (56kDa) wird in allen Lysaten erkannt. Das Serum erkennt spezifisch die Überexpression von Annexin B11^{long} GFP (82kDa) (**I**, Spur 1).

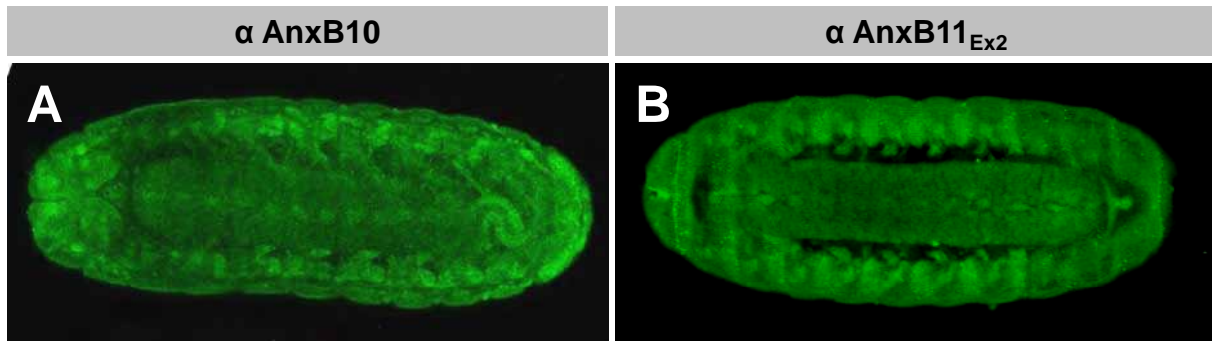


Abb. 10: Die Annexine B10 und B11^{long} werden ubiquitär exprimiert

A-B Test der Antikörper auf wildtypischen Embryonen. Anterior ist links, ventrale Aufsicht. **(A)** Analyse des Annexin B10 Antiserums, **(B)** Analyse des Annexin B11_{Ex2} Antiserums. Beide Annexine werden ubiquitär exprimiert. Deutliche Expression zeigt sich in der Muskulatur, der Epidermis und der Mittellinie.

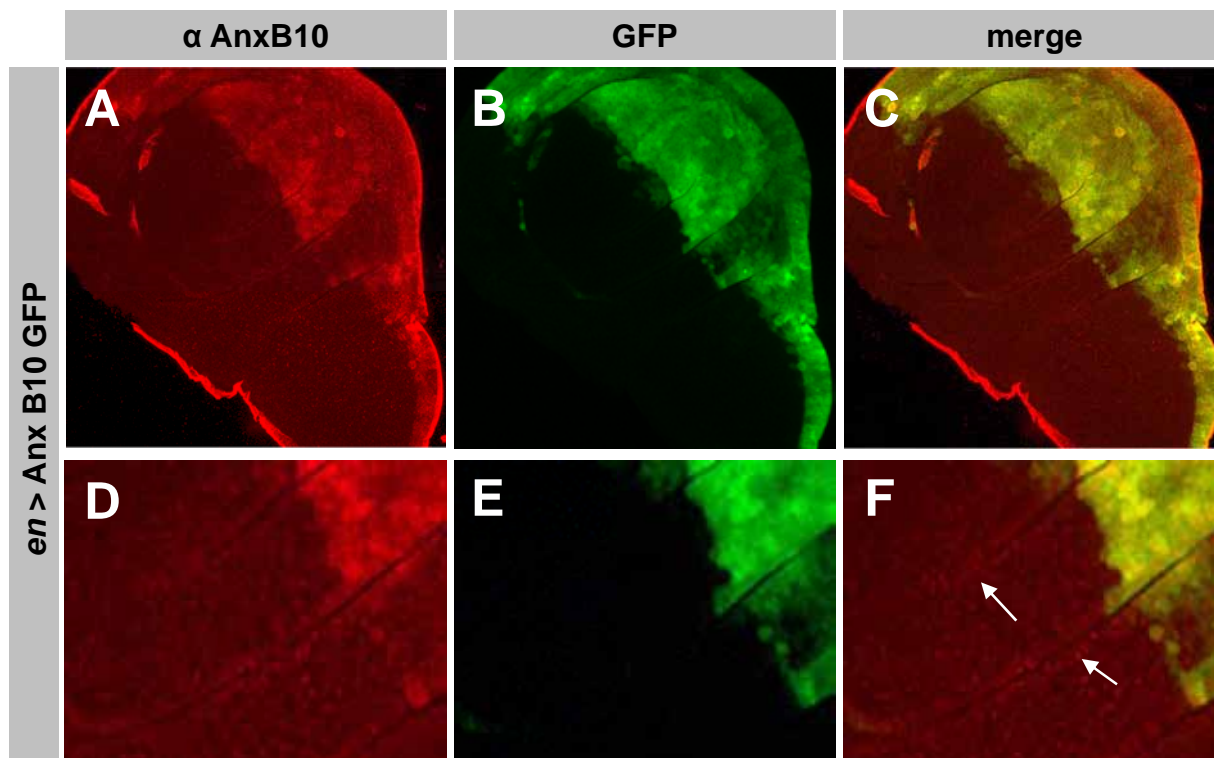


Abb. 11: Mit Hilfe des Annexin B10 Antiserums werden vesikuläre Strukturen erkannt

A-C Die Expression von UAS Annexin B11^{long} GFP in Flügelimaginalscheiben wurde mittels *enGal4* induziert. Überexprimiertes Annexin B10 GFP (**B**) wird spezifisch vom B10 Antiserum erkannt (**A**). **D-E** Detailansicht aus **A-C**. In der Detailansicht wird die Spezifität des Antiserums verdeutlicht (**D, E**). Außerdem sind vesikuläre Strukturen im Bereich der endogenen Annexin B10 Expression zu erkennen (Pfeile **F**).

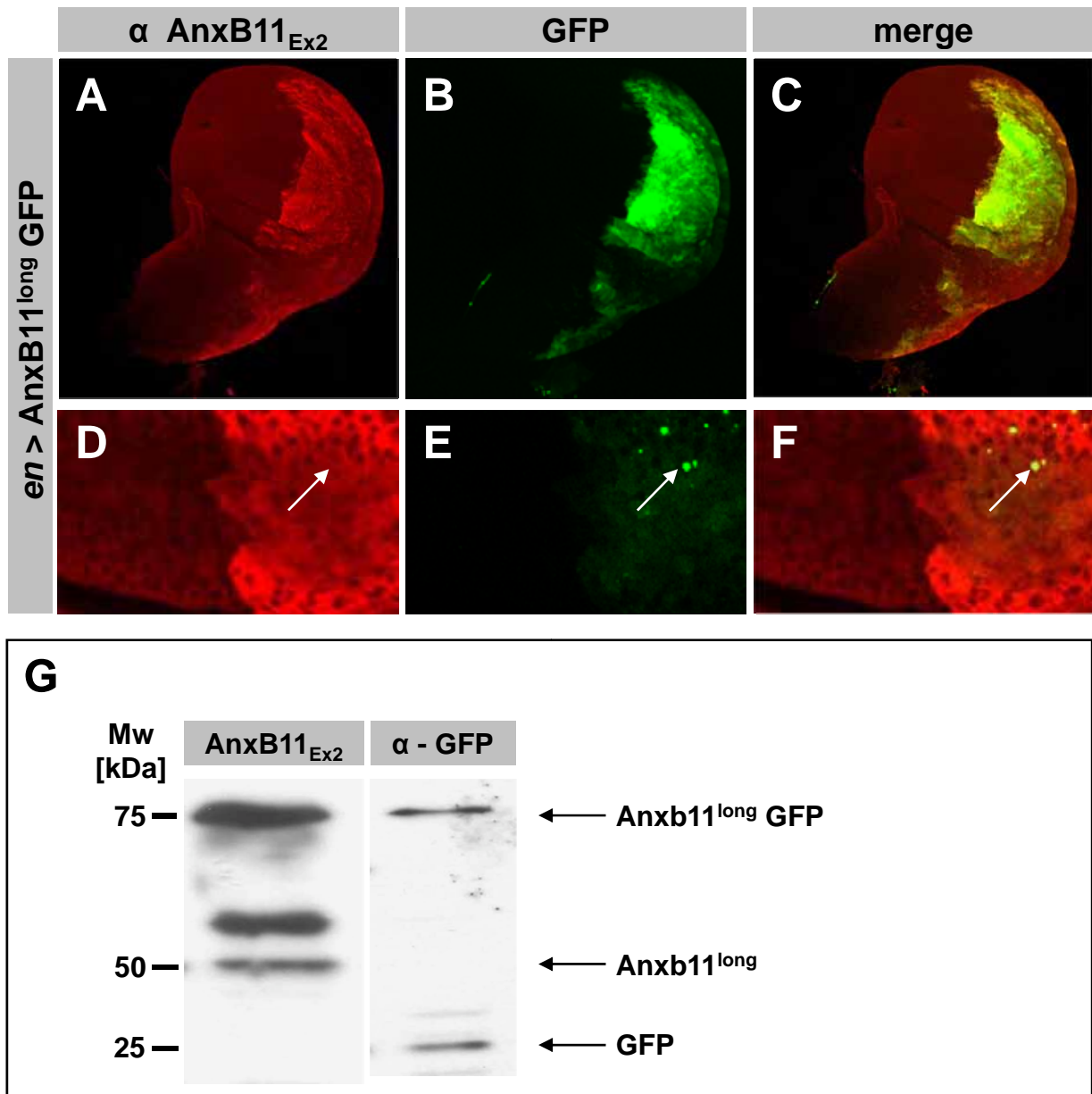


Abb. 12: Das Annexin B11^{long} GFP Fusionsprotein wird intrazellulär gespalten

A-C Die Expression von UAS Annexin B11^{long} GFP in Flügelimaginalscheiben wurde mittels *enGal4* induziert. Anterior ist links. Überexprimiertes Annexin B11^{long} GFP (**B**) wird spezifisch vom B11_{Ex2} Antiserum erkannt (**A**). **D-E** Detailansicht aus **A-C**. Annexin B11^{long} lokalisiert sowohl endogen als auch überexprimiert im Zytoplasma und an der Zellmembran (**D**). In der Detailansicht wird deutlich, dass große, GFP-positive Strukturen nicht vom Annexin B11_{Ex2} Antiserum erkannt werden (Pfeile **D**, **E**, **F**). **G** Western Blot Analyse an embryonalen Lysaten der Annexin B11^{long}-GFP-Überexpression. Mit Hilfe eines α -GFP Antikörpers lassen sich sowohl das Annexin B11^{long} GFP Fusionsprotein (82kDa) als auch abgespaltenes GFP nachweisen (26kDa) (**G** rechts).

3.2.5 Analyse der zellulären Lokalisation mithilfe von Annexin-GFP-Fusionsproteinen

Annexine werden mit unterschiedlichsten Funktionen in der Zelle in Zusammenhang gebracht (Gerke, Creutz et al. 2005). Dabei lokalisieren einige Annexine spezifisch an verschiedenen Kompartimenten in der Zelle. Die distinkte Lokalisation kann einen Hinweis auf die mögliche Rolle innerhalb der Zelle geben. Um die subzelluläre Lokalisation der *Drosophila*-Annexinproteine zu charakterisieren, wurden Annexin-GFP-Fusionskonstrukte generiert (Chlystun 2006). Mithilfe dieser Konstrukte ist es möglich, die subzelluläre Lokalisation der GFP-Fusionsproteine näher zu betrachten. Gerade für die Annexine B9 und B11^{short}, deren Antiseren zu keinem spezifischen Signal führen, gibt dies die Möglichkeit, ihre Zielregion innerhalb der Zelle zu bestimmen.

Abbildung 13 zeigt im Vergleich die Lokalisationsstudien aller vier Annexin-GFP-Fusionsproteine in S2R+ Zellen, der embryonalen Epidermis und larvalen Speicheldrüsen von *Drosophila*. Alle vier Konstrukte führen in den getesteten Geweben zu einer starken Expression von GFP. Da es sich um C-terminale GFP-Fusionen handelt, sollten die Annexinproteine vollständig vorliegen, wenn ein GFP-Signal nachweisbar ist. Grundlegend erkennt man für alle vier Annexine eine ähnliche Lokalisation. In S2R+ Zellen ist ein sehr starkes Signal innerhalb des Zytosols erkennbar (Abb. 13A, D, G, J). Das GFP-Signal erstreckt sich bis an die Plasmamembran und ist speichenförmig angereichert, was besonders für Annexin B10-GFP deutlich wird (Abb. 13D).

Im Gewebeverband zeigt sich, dass die *Drosophila*-Annexine an der Plasmamembran lokalisieren. In allen vier Fällen ist diese sowohl in der Epidermis (Abb. 13B, E, H, K) als auch in Speicheldrüsenzellen (Abb. 13C, F, I, L) klar GFP-markiert. Dies stimmt mit den Antikörperfärbungen gegen das Annexin B11_{Ex2} Serum überein. Für die Epidermis zeigt sich außerdem wiederum eine Markierung des Zytosols, in Speicheldrüsenzellen scheint ein Großteil des exprimierten Fusionsproteins in den Zellkern zu gelangen. Für Annexin B11^{long}-GFP bilden sich durch die Überexpression große GFP-positive Strukturen im Zellkern (Abb. 13L, Pfeil). Welcher Art diese Strukturen sind, wird in Abschnitt 3.3 detaillierter beschrieben.

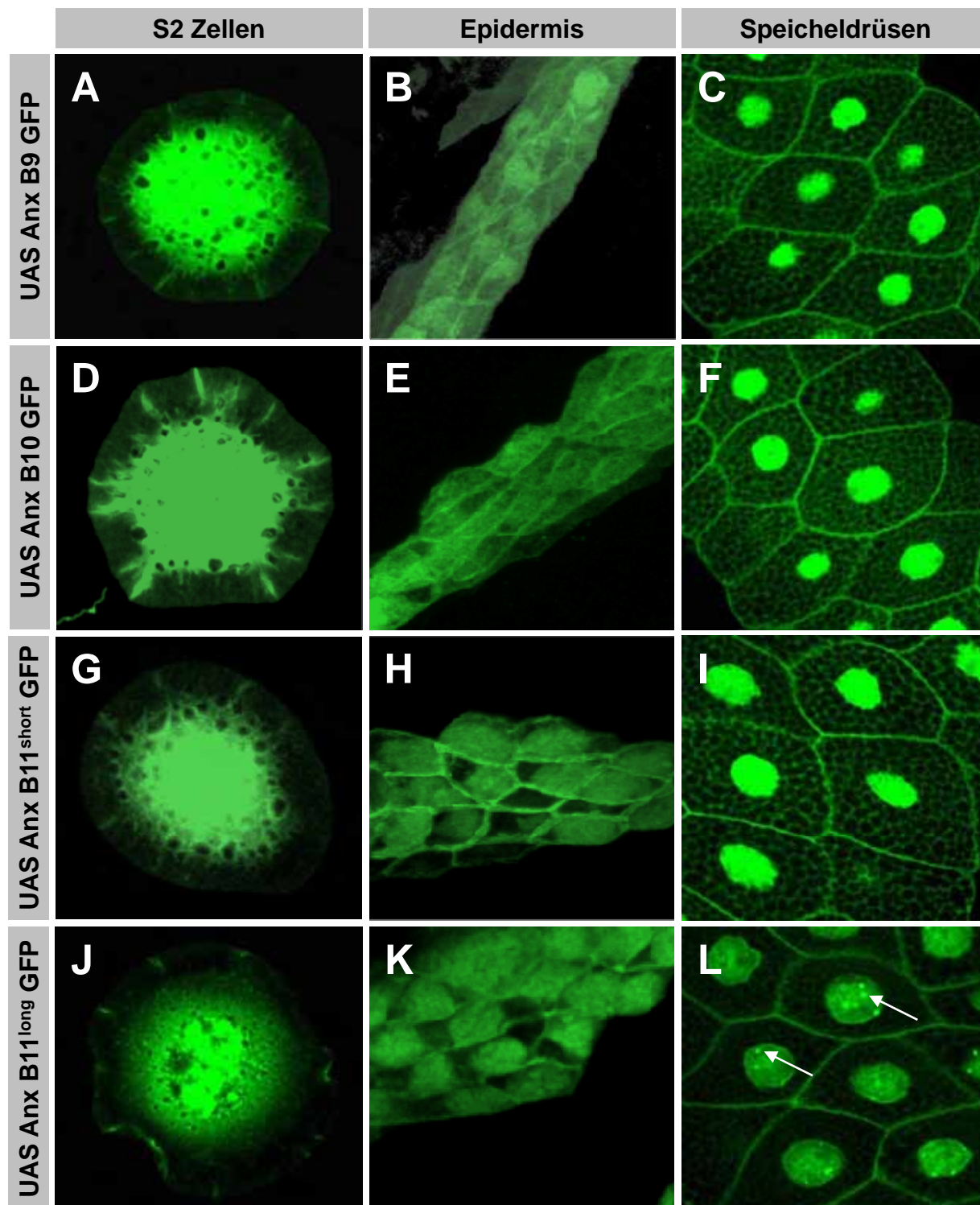


Abb. 13: Lokalisationsstudien in S2R+ Zellen und im Gewebe mit Hilfe der Annexin GFP Konstrukte

A-L Überexpression der Annexin-GFP Fusionsproteine. In S2R+ Zellen sind alle Annexin-GFP-Proteine im Zytosol lokalisiert (**A, D, G, J**). Embryonale Überexpression in der Epidermis unter der Kontrolle des *engrailed* Gal4 Treibers zeigt Annexin-GFP im Zytosol und an der Zellmembran (**B, E, H, K**). In Speicheldrüsenzellen aus L3 Larven befindet sich ein Großteil des Proteins im Zellkern (**C, F, I, L**). Nach Überexpression von Annexin B11^{long} GFP bilden sich GFP-positive Akkumulationen im Kern aus (Pfeile **L**).

Insgesamt lässt sich feststellen, dass die Annexine wie erwartet an Membranstrukturen zu finden sind, aber nicht nur dort. Da sie sich in ihrer Lokalisation in Bezug auf unterschiedliche Gewebe etwas unterschiedlich verhalten, lässt dies die Vermutung zu, dass sie nicht überall die gleiche Funktion erfüllen. Hierbei bleibt zu bedenken, dass es sich um die Lokalisation ektopisch überexprimierter Proteine handelt. Durch die übermäßige Produktion des Proteins kann es auch zu unnatürlichen Verlagerungen innerhalb der Zelle kommen.

3.2.5.1 GFP-Fusionen verschiedener Annexine kolokalisieren mit aktinreichen Strukturen in S2R+ Zellen

Die Annexin-GFP-Fusionsproteine sind in *Drosophila* S2R+ Zellen im Zytosol speichenförmig angereichert. Dieses Bild erinnert an Aktinspeichen innerhalb der Zelle. M. Chlystun konnte zeigen, dass drei der vier untersuchten *Drosophila*-Annexine (Anx B9, Anx B10, Anx B11^{short}) mit F-Aktin präzipitiert werden können (Chlystun 2006). Um dies detaillierter zu untersuchen, wurde in transfizierten S2R+ Zellen mittels Phalloidin F-Aktin markiert und auf Kolokalisation von F-Aktin und Annexinen untersucht. Es ergeben sich in der Zelle Strukturen, die für beide untersuchten Proteine gleichzeitig positiv sind. Dies lässt sich für alle Annexine bestätigen (Pfeile in Abb. 14). Ob diese Kolokalisation jedoch einen funktionellen Hintergrund hat, lässt sich hieraus nicht ersehen.

Um auch diesen Aspekt zu untersuchen, wurden über eine *engrailed* Gal4 Treiberlinie die Annexin-GFP-Fusionsproteine in der Flügelimaginalscheibe exprimiert. Dies führt zu einer spezifischen Überexpression im posterioren Kompartiment neben der endogenen Proteinexpression im anterioren Teil der Scheibe. Hier wurde die F-Aktin-Lokalisation und Struktur detaillierter betrachtet. In allen Scheiben lässt sich die Überexpression von Annexin-GFP verfolgen (Abb. 15A, C, E). Es kommt in keinem der betrachteten Fälle zu einer Anreicherung der Aktinmenge im Bereich der Annexin-GFP-Überexpression im Vergleich zum wildtypischen Bereich (Abb. 15B, D, F).

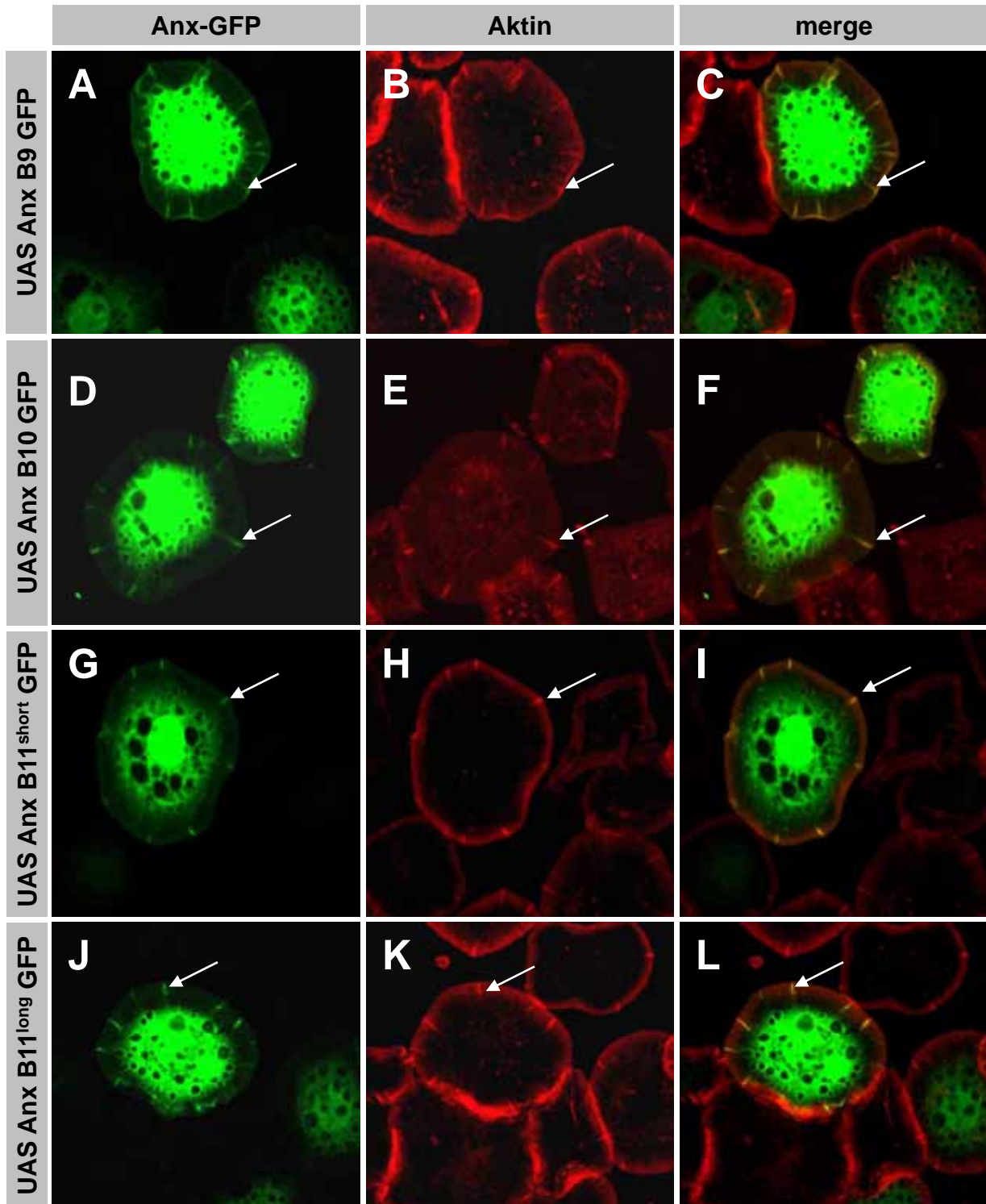


Abb. 14: Kolokalisationsstudien von Annexin GFP und F-Aktin in S2R+ Zellen

A-L Überexpression der Annexin GFP Fusionsproteine in S2R+ Zellen. F-Aktin wurde über eine Phalloidin Färbung markiert. Die Annexin GFP Proteine sind im Zytosol lokalisiert (**A, D, G, J**). Dabei sind sie speichenförmig angereichert und kolokalisieren mit F-Aktin-reichen Strukturen (Pfeile **A, B, D, E, G, H, J, K**). Dies gilt für alle Annexin GFP Proteine gleichermaßen.

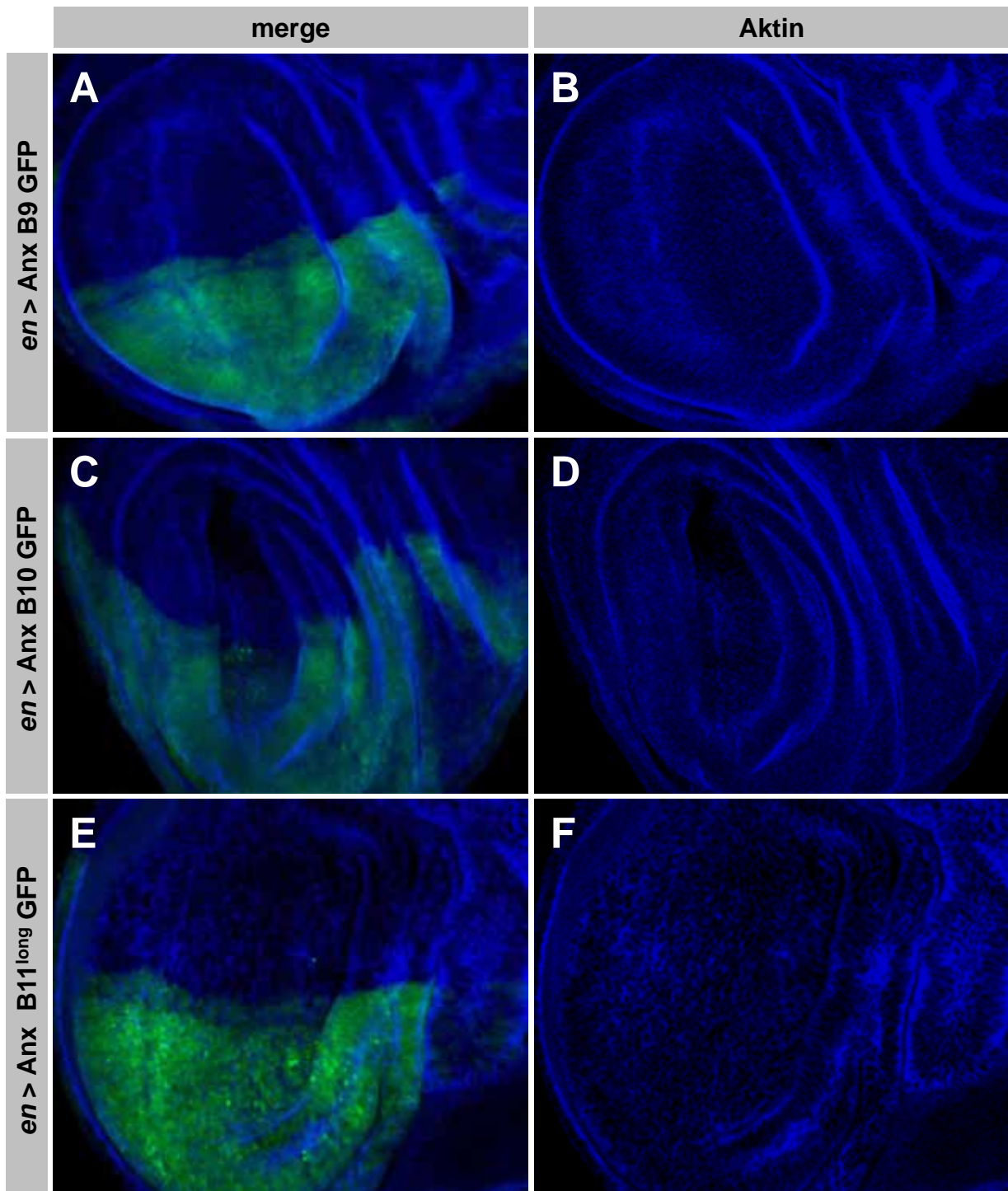


Abb. 15: F-Aktin zeigt keine Akkumulation nach Überexpression von Annexin GFP

A, C, E Die Expression von UAS Annexin B11^{long} GFP in Flügelimaginalscheiben wurde mittels *enGal4* induziert. F-Aktin wurde über eine Phalloidin Färbung markiert. Die Expression von Annexin-GFP im posterioren Anteil der Flügelimaginalscheibe führt zu keinerlei Veränderung der F-Aktin Strukturen innerhalb des Gewebes (**B, D, F**).

3.3 Lokalisation von Annexin B11^{long}

Besonders die Lokalisationsstudien zu Annexin B11^{long} warfen interessante Fragen auf. In der Überexpression zeigen sich nicht genau definierte, vesikelähnliche Strukturen, die vor allem in Bezug auf die erwartete Annexinfunktion in membranabhängigen Prozessen genauer beschrieben werden sollen.

3.3.1 Die Überexpression von Annexin B11^{long} führt zur Bildung vesikelähnlicher Strukturen

Wie schon in Abschnitt 3.2.5 beschrieben, bildet Annexin B11^{long}-GFP nach Überexpression Strukturen unbestimmter Identität aus. In Abbildung 12 wird deutlich, dass größere Strukturen nicht vom Antikörper erkannt werden (Pfeile in D-F). Dies kann darauf zurückzuführen sein, dass durch Aggregation das Antikörper Epitop nicht mehr zugänglich ist, oder es handelt sich um abgespaltenes GFP. Western-Blot Analysen zeigen, dass es tatsächlich in einem gewissen Maße zur Proteolyse des Fusionsproteins kommt. Nach Überexpression von Annexin B11^{long}-GFP kann über einen gegen GFP gerichteten Antikörper sowohl das Fusionsprotein (82 kDa) als auch GFP (26 kDa) nachgewiesen werden (Abb. 12G). Da das Signal für GFP im Vergleich zu dem des Fusionsproteins schwach ist, muss ein Großteil des Fusionsproteins intakt innerhalb der Zelle verbleiben. Es ist nicht bekannt, wann und wo es genau zur Spaltung im Protein kommt.

Annexin B11^{long} ist, wie die anderen *Drosophila*-Annexine an Membranen lokalisiert. Zusätzlich sind vesikelähnliche Strukturen sichtbar (Abb. 12E, 13L). Von diesen ist nicht bekannt, ob sie funktional sind. Diese Strukturen lassen sich in allen bisher betrachteten Geweben und Zellen in unterschiedlicher nicht gewebespezifischer Ausprägung nachweisen. In Abbildung 16A wird deutlich, dass im Gewebeverband Zellen mit Akkumulationen dieser Aggregate neben Zellen liegen können, die fast keine beinhalten. Außerdem ist in der Orthogonalansicht klar zu sehen, dass sich diese Strukturen innerhalb der Zelle befinden (Abb. 16A, B).

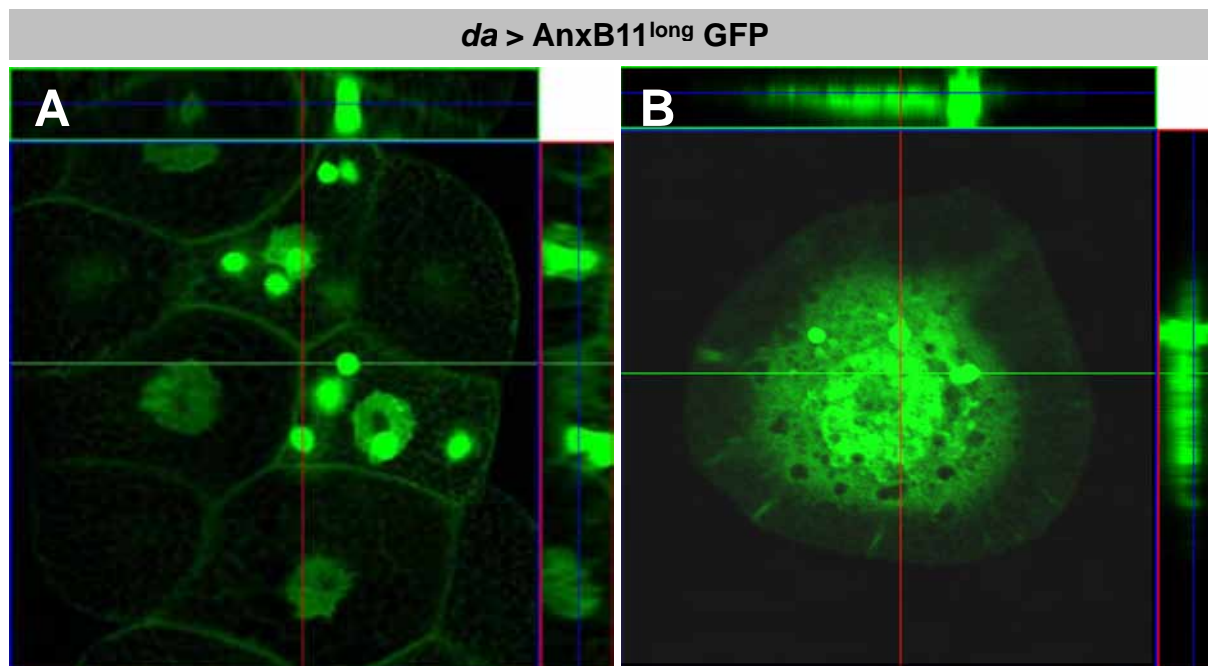


Abb. 16: Überexpression von Annexin B11^{long} führt zu intrazellulärer Aggregatbildung

A-B Überexpression der Annexin-GFP-Fusionsproteine in Speicheldrüsen bzw. S2R+ Zellen. Sowohl in Speicheldrüsenzellen (**A**) als auch in S2R+ Zellen (**B**) bilden sich nach Annexin B11^{long} GFP Überexpression GFP-positive Aggregate aus. Dabei zeigen benachbarte Zellen diese Aggregatbildung in unterschiedlicher Stärke (**A**). Die Orthogonalansicht macht deutlich, dass es sich um intrazelluläre Strukturen handelt (**A, B**).

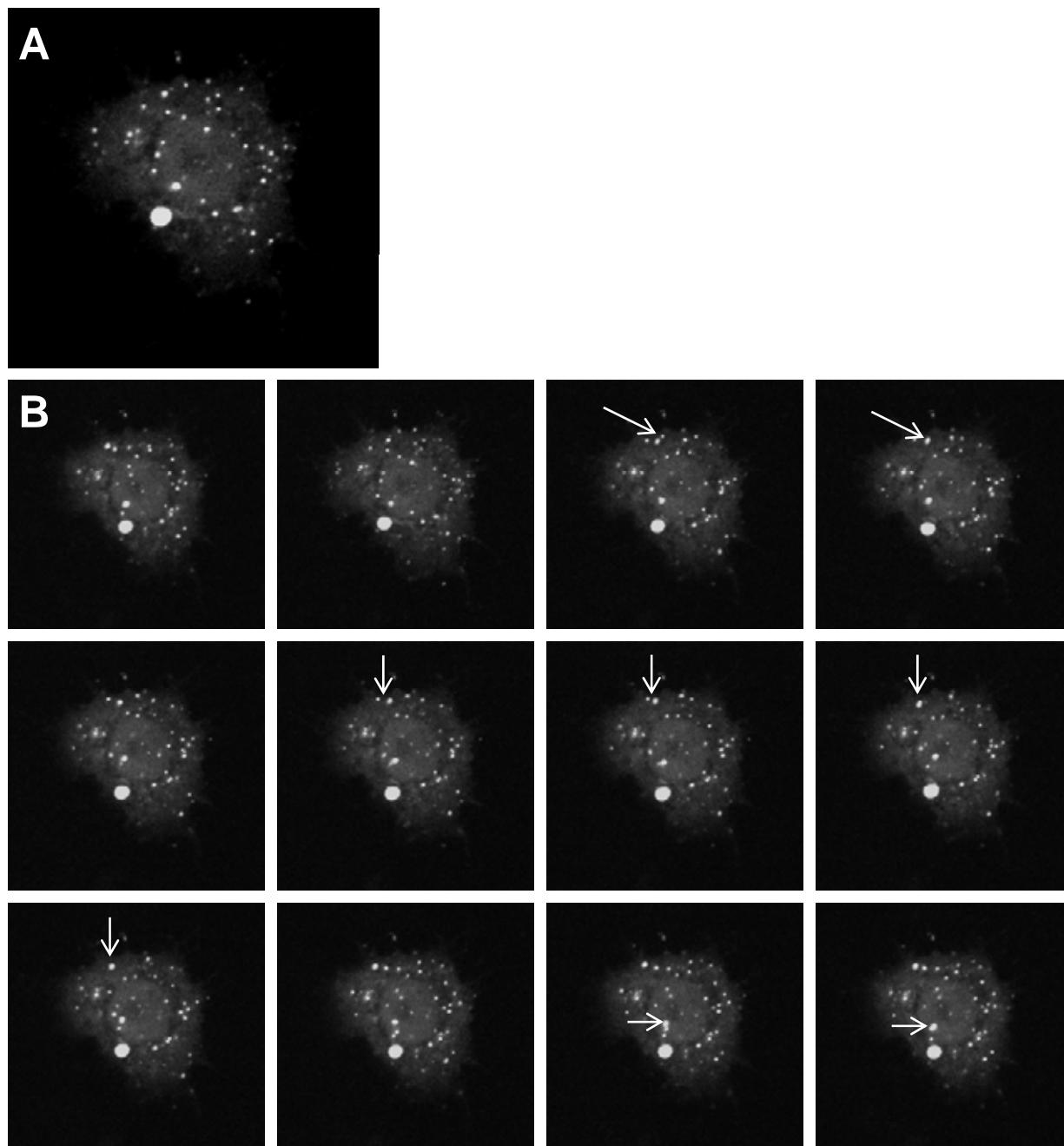


Abb. 17: Annexin B11^{long} GFP-positive Strukturen fusionieren in S2R+ Zellen

A In S2R+ Zellen sind nach Transfektion mit Annexin B11^{long} GFP vesikuläre Strukturen zu erkennen. **B** Konfokale *in vivo* Aufnahme von einer transfizierten S2R+ Zelle. Einzelbilder eines 300 Sekunden langen Films. Es kommt zu Fusionsereignissen GFP-positiver Strukturen innerhalb der Zelle (Pfeile **B**).

Um die Entstehung dieser Strukturen besser zu verstehen, sollten sie *in vivo* in Zellen verfolgt werden. Dazu wurden S2R+ Zellen mit dem entsprechenden Konstrukt transfiziert und anschließend wurde mithilfe eines *spinning disc* Mikroskops das GFP-Signal verfolgt. Ausschnitte des Films sind in Abbildung 17 dargestellt. In S2R+ Zellen ist eine große Anzahl der beschriebenen GFP-positiven Strukturen vorhanden. Sie bewegen sich teilweise sehr schnell innerhalb der Zelle, andere scheinen sie an der gleichen Stelle im Zytosol zu verbleiben. Dabei zeigt sich, dass die Strukturen mit zunehmender Größe weniger mobil erscheinen. Dies deutet eventuell darauf hin, dass es sich zunächst um funktionstragende Vesikel handelt, die erst durch Fusion zu unnatürlich großen Strukturen werden, die eventuell keine Funktion mehr ausüben können. Dass es zu Fusionsereignissen kommt, ist innerhalb des Films zu verfolgen (Abb. 17, Pfeile). Kleinere Strukturen treffen aufeinander und verschmelzen im Folgenden (Abb. 17). Wie lange und ob es sich überhaupt um funktionelle Vesikel handelt, kann hier nicht herausgestellt werden.

3.3.2 Annexin B11^{long} lokalisiert an der apikalen Membran polarer Zellen

Bei der Betrachtung orthogonaler Schnitte von larvalen Flügelimaginalscheiben wird offensichtlich, dass Annexin B11^{long} nicht gleichmäßig an der Membran lokalisiert ist. Es kommt zur deutlichen Akkumulation an der apikalen Membran, was sowohl in der Überexpression von Annexin B11^{long}-GFP (Abb. 18A, Pfeilspitze) als auch endogen in Antikörperfärbungen nachweisbar ist (Abb. 18B). Außerdem scheinen Zell-Zell-Kontakte markiert zu sein (Abb. 18A, Pfeile). Daneben liegt das Protein auch in vesikelförmigen Strukturen innerhalb der Zelle vor.

Flügelimaginalscheiben bilden ein Epithel mit deutlich planarer und apikobasaler Polarität aus. Es sind diverse molekulare Marker bekannt, die unterschiedliche Regionen der Zellmembran spezifisch charakterisieren (Woods, Wu et al. 1997). So lassen sich die subapikale Region (SAR), die *Zonula Adherens* (ZA) mit *septate Junctions* (SJ) und die basolaterale Region unterscheiden (Knust 2000; Muller and Bossinger 2003). Um die Lokalisation von Annexin B11^{long}-GFP in Bezug auf diese Regionen zu untersuchen, wurden *en>* Annexin B11^{long}-GFP Flügelimaginalscheiben mit Crumbs (Crb, markiert die SAR), Armadillo (Arm, markiert die ZA) und Discs large (Dlg, markiert die SJ) Antikörpern gefärbt und anschließend konfokal analysiert. Abb. 19A zeigt erneut die deutlich apikale Lokalisation von Annexin B11^{long}-GFP.

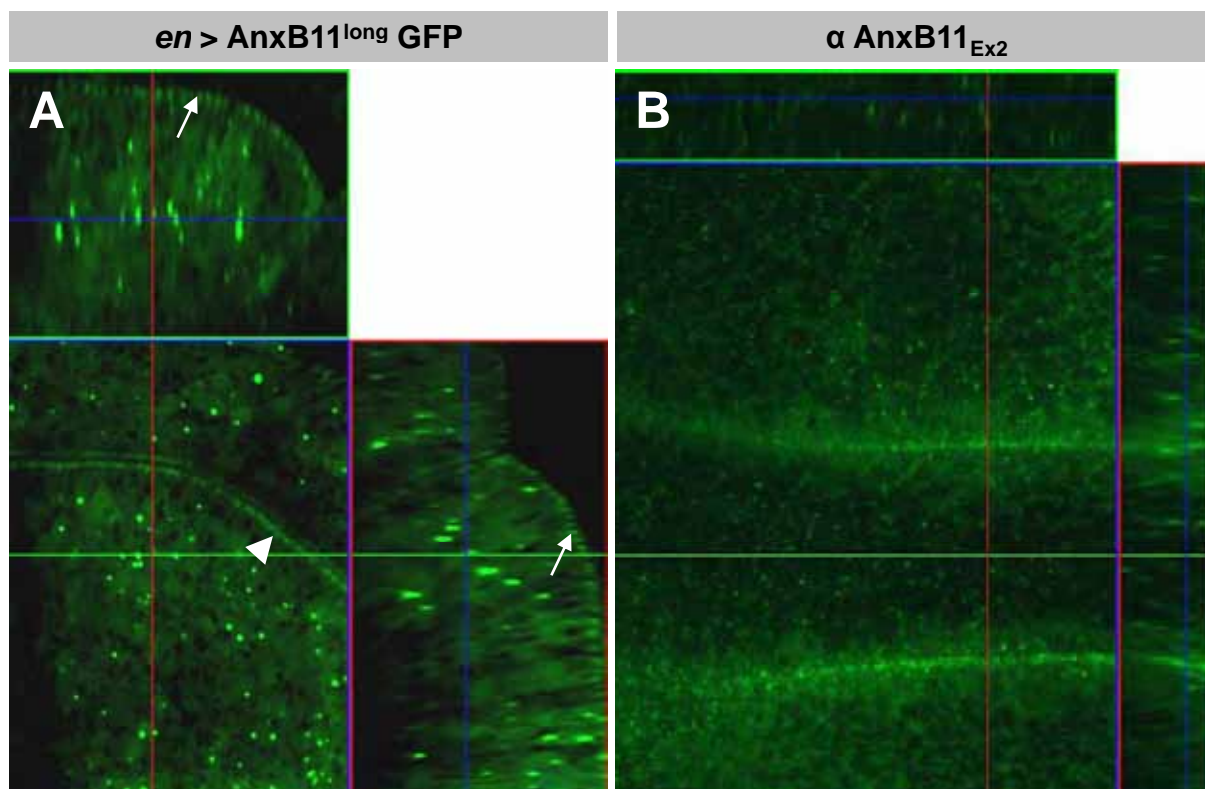


Abb. 18: Annexin B11^{long} lokalisiert an der apikalen Membran polarer Zellen

A Die Expression von UAS Annexin B11^{long} GFP in Flügelimaginalscheiben wurde mittels *enGal4* induziert. Posterior ist rechts. Annexin B11^{long} GFP lokalisiert an der apikalen Membran (Pfeilspitze **A**). In der Orthogonalansicht wird deutlich, dass das Annexin B11^{long} Protein an Zell-Zell-Kontakten akkumuliert vorliegt (Pfeile **A**). **B** wildtypische Flügelimaginalscheibe nach Färbung mit dem Annexin B11_{Ex2} Antiserum. Auch hier ist eine Lokalisation des Proteins an der apikalen Membran nachweisbar.

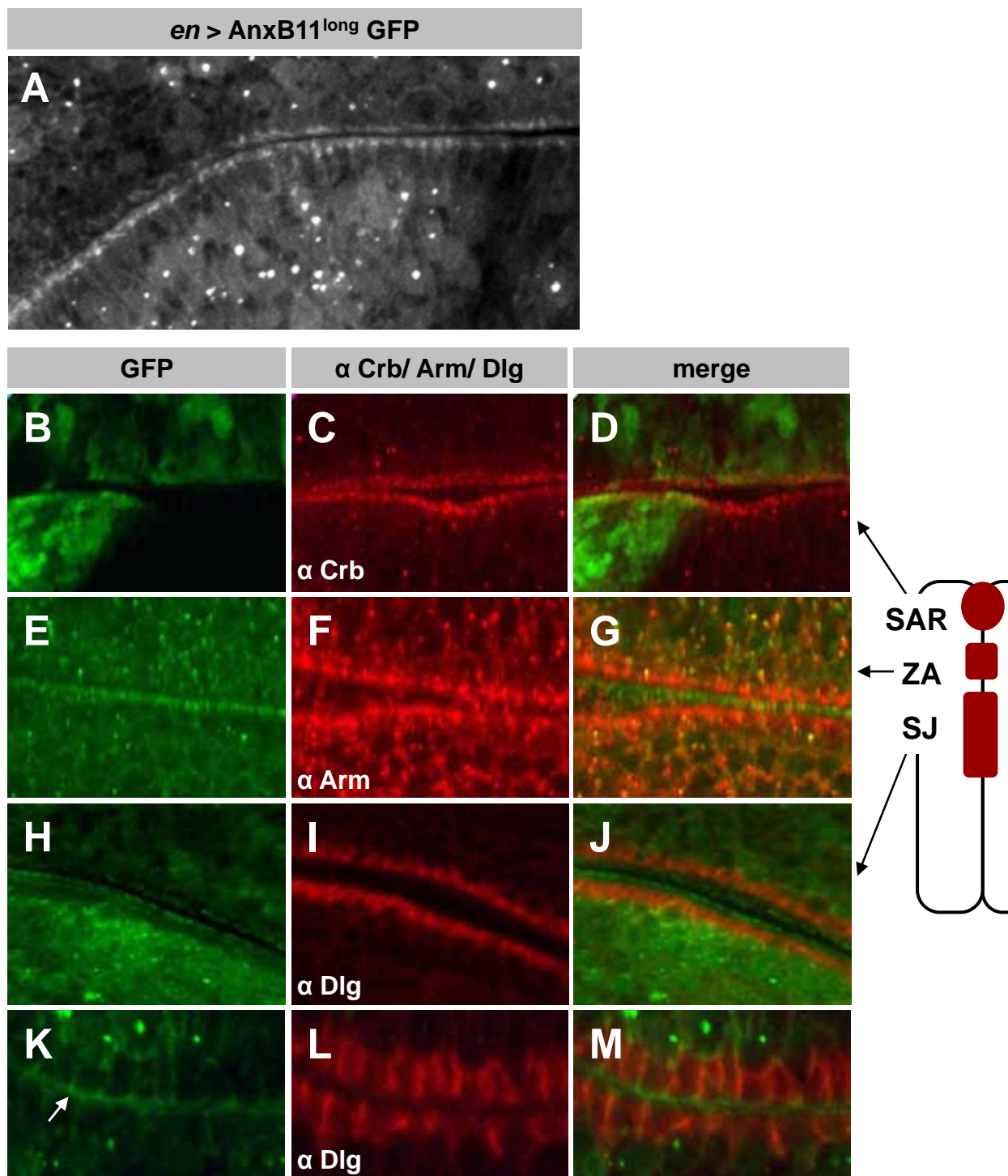


Abb. 19: Das Annexin B11^{long} Protein ist apikaler als Armadillo und Discs large lokalisiert

A-M Die Expression von UAS Annexin B11^{long} GFP in Flügelimaginalscheiben wurde mittels *enGal4* induziert. Annexin B11^{long} GFP markiert die apikale Membran (**A**). Crumbs, Armadillo und Discs large markieren verschiedene Zell-Zell-Kontaktstellen (SAR: Subapikale Region, ZA: Zonula adherens; SJ: septate Junctions). Annexin B11^{long} GFP ist apikaler als Arm (**E-G**) und Discs large (**H-J**) in einer vergleichbaren Region wie Crb lokalisiert (**B-D**). **K-M** Detailansicht aus **H-J** AnnexinB11^{long} GFP markiert die vollständige apikale Membran und akkumuliert an Zell-Zell-Kontakten (Pfeil **K**).

In Bezug auf alle drei verwendeten Marker fällt auf, dass keine direkte Kolo­kalisierung vorliegt (Abb. 19D, G, J). Annexin B11^{long}-GFP lokalisiert vermehrt im apikalen Bereich, etwa in der Region von Crb (Abb. 19B-D), sichtbar apikaler als Arm oder Dlg (Abb. 19 E-M). Die Abbildungen 19K-M machen als Vergrößerung der Dlg Färbung deutlich, dass Annexin B11^{long}-GFP die apikale Membran vollständig markiert und an apikalen Zell-Zell-Kontakten akkumuliert (Abb. 19, Pfeil).

3.3.3 Annexin B11^{long} lokalisiert anteilig extrazellulär

Neben der Annexin B11^{long} Lokalisation im apikalen Bereich der Zelle fällt sowohl bei Überexpressionsexperimenten als auch bei Antikörperfärbungen auf, dass Annexin B11^{long} anteilig auch extrazellulär zu sein scheint. So ergibt sich aus einer Annexin B11^{long} Färbung von Flügelimaginalscheiben, in denen unter der Kontrolle des *enGal4* Treibers Clathrin-GFP im posterioren Kompartiment überexprimiert wurde, dass das Annexinprotein innerhalb des extrazellulären Spalts lokalisiert ist (Abb. 20A-C). Clathrin markiert in diesem Zusammenhang in zwei gegenüberliegenden Zellreihen frühe Endosomen, die sich gerade von der Plasmamembran abschnüren. Diese liegen zu diesem Zeitpunkt noch direkt in Verbindung mit der Plasmamembran vor. Im Gegensatz dazu lokalisiert Annexin B11^{long} deutlich apikaler innerhalb des sich ergebenden Spalts zwischen den zwei Zellreihen. Ein ähnliches Bild ergibt sich aus Überexpressionsstudien und Kofärbungen mit Armadillo (Abb. 20D-F). In einer Analyse der Annexin B11^{long}-Lokalisation über eine Annexin B11_{Ex2}-Antikörperfärbung zeigt sich das gleiche Ergebnis. Wieder scheint ein Teil des Proteins im Extrazellularraum zwischen den Zellen zu lokalisieren (Abb. 20G).

Um herauszufinden, ob es sich hierbei um ein extrazelluläres Signal handelt oder z. B. um die Lokalisation in Mikrovilli, wurden diese genauer betrachtet. Ein Gewebe, in dem es einfacher ist, diese Strukturen aufzulösen, sind die Follikelzellen der Ovarien. Diese bilden besonders im Stadium 10 der Oogenese ausgeprägte Mikrovilli (Abb. 21A) (D'Alterio, Tran et al. 2005). Über die Expression von CD8-GFP in den Follikelzellen lassen sich diese visualisieren. Eine Antikörperfärbung mit Annexin B11_{Ex2} zeigt, dass das Protein nicht in den Mikrovilli detektierbar ist (Abb. 21B-D). Erst nach Überexpression von Annexin B11^{long}-GFP in den Follikelzellen gelangt das Annexin B11^{long}-Protein auch in Mikrovilli (Abb. 21E) und wird dort vom Antikörper erkannt (Abb. 21F, G).

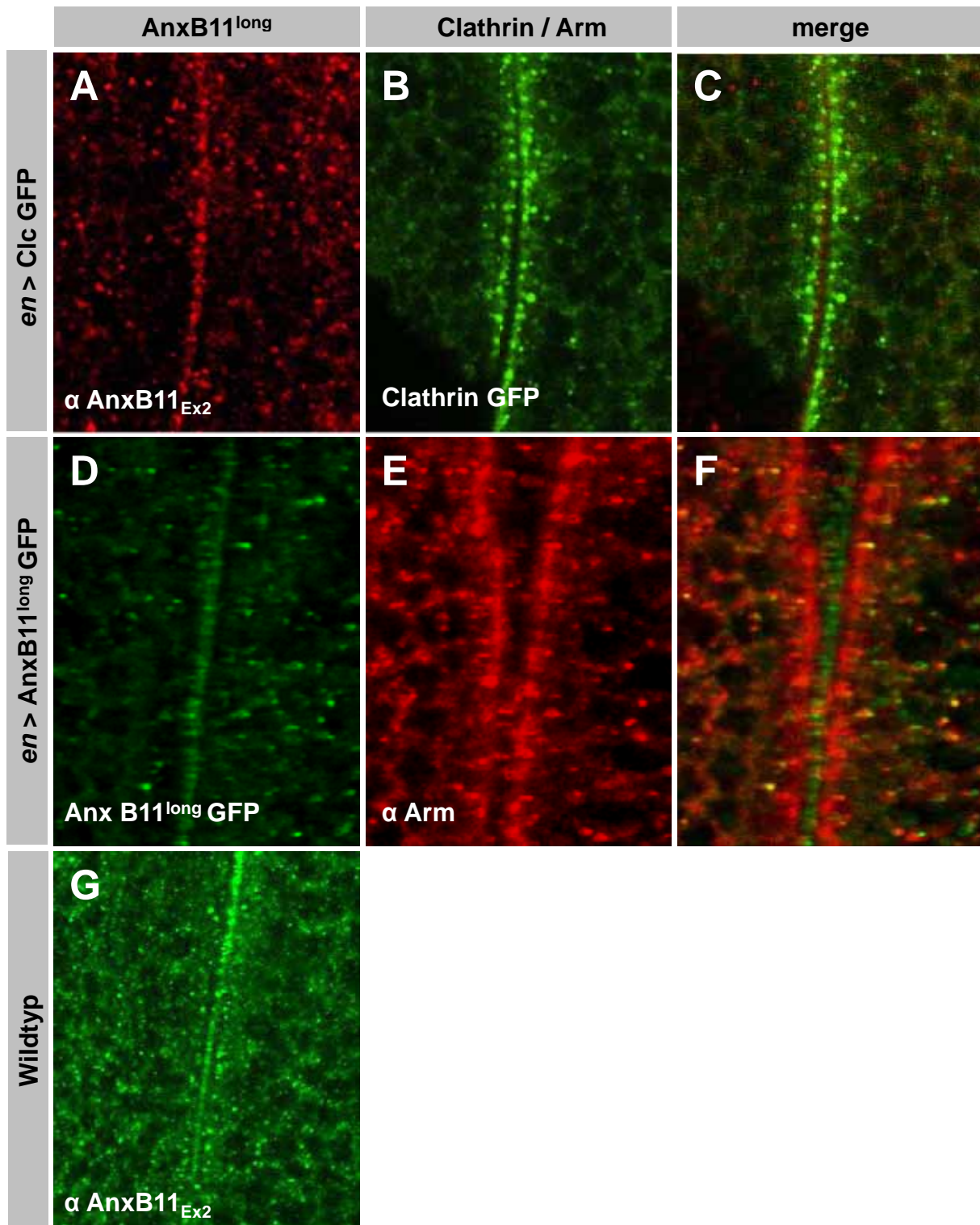


Abb. 20: Das Annexin B11^{long} Protein ist extrazellulär nachweisbar

A-C Die Expression von UAS Clathrin-GFP in Flügelimaginalscheiben wurde mittels *enGal4* induziert. Annexin B11^{long} wird über das Antiserum Annexin B11_{Ex2} nachgewiesen. **D-F** Flügelimaginalscheibe nach *en*> UAS Annexin B11^{long} GFP Expression und anti-Arm Antikörperfärbung. **G** wildtypische Scheibe nach anti-Annexin B11_{Ex2} Antikörperfärbung. Sowohl endogenes (**G**) als auch überexprimiertes (**A, D**) Annexin B11^{long} scheint anteilig extrazellulär vorzuliegen. Erkennbar ist jeweils ein Signal im extrazellulären Spalt (**A, D, G**).

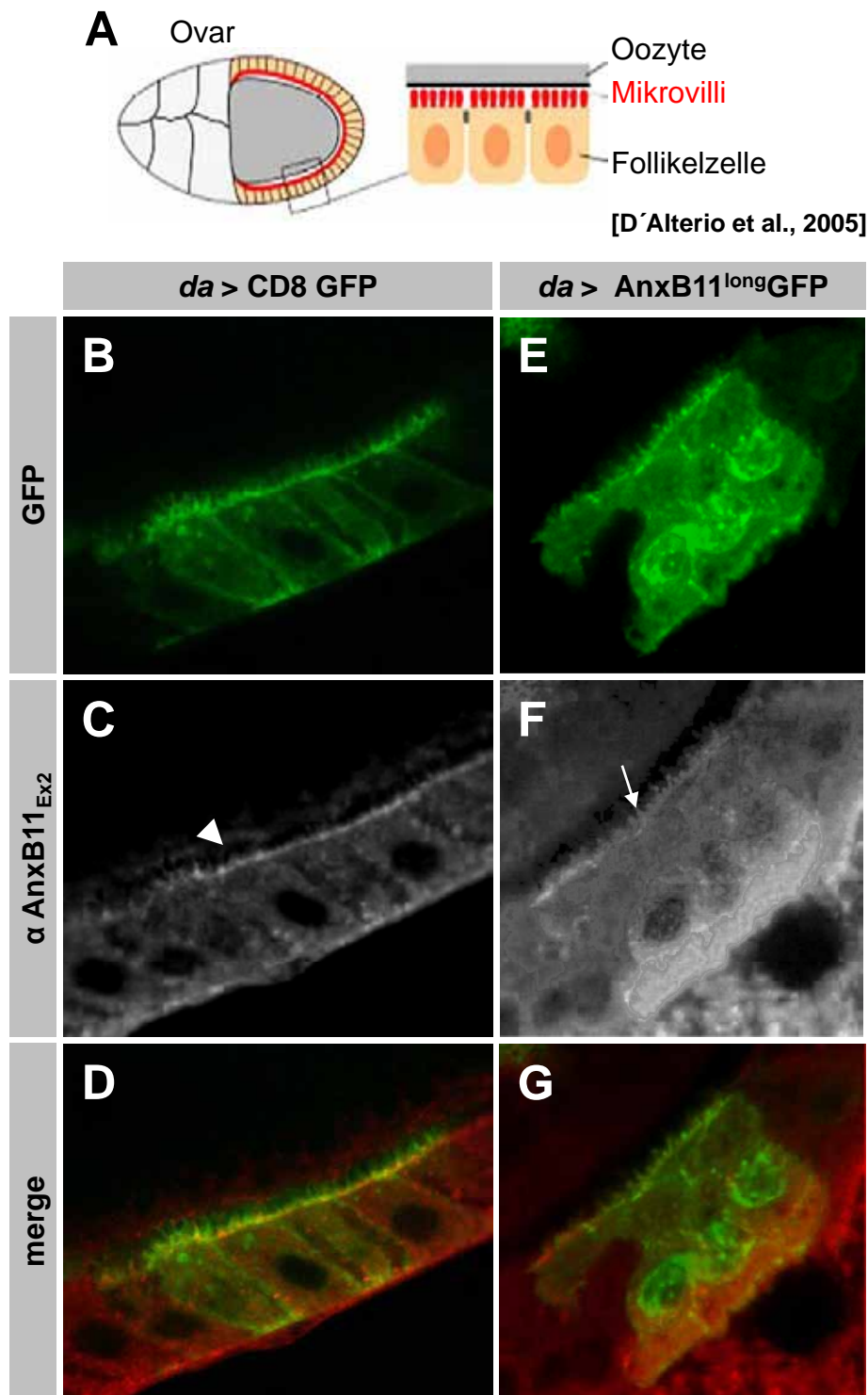


Abb. 21: Endogenes Annexin B11^{long} lässt sich nicht in Microvilli nachweisen

A Schematische Darstellung eines *Drosophila* Ovars im Stadium 10. Follikelzellen bilden in diesem Stadium visuell gut auflösbare Microvilli aus. **B-D** Follikelzellen nach *da*> UAS CD8 GFP Expression. Nach Annexin B11_{Ex2} Antikörperfärbung lässt sich endogenes Annexin B11^{long} nicht in Microvilli nachweisen (Pfeilspitze **C**). **E-G** Follikelzellen nach *da*> UAS Annexin B11^{long} GFP Expression. Erst nach Überexpression gelangt Annexin B11^{long} GFP in Microvilli (Pfeil **F**).

Dies beruht jedoch auf der übermäßig starken Expression innerhalb der gesamten Follikelzelle.

Annexin B11^{long} besitzt wie alle Annexine keinerlei Signalsequenz, um aus der Zelle ausgeschleust zu werden. Dennoch wurde auch schon für andere Annexine gezeigt, dass sie außerhalb der Zelle vorliegen (siehe Einleitung). Um zwischen intrazellulärem und extrazellulärem Annexin zu unterscheiden, wurden Antikörperfärbungen gänzlich ohne Triton oder andere Detergenzien durchgeführt (Abb. 22D-F). Somit sollte kein Antikörper in die Zellen gelangen und jegliches Signal durch extrazelluläres Annexin B11^{long} hervorgerufen sein. Zusätzlich wurden Flügelimaginalscheiben ohne Fixierung mit dem Antikörper bei 4 °C inkubiert, um Endozytose Prozesse zu verhindern (Abb. 22A-C). CD8-GFP dient als Marker für Zellgrenzen. 22A-C zeigt das Ergebnis nach einer einstündigen, direkten Inkubation der Flügelimaginalscheiben mit dem Antikörper bei 4 °C und anschließender Fixierung. Es kommt zu einer Färbung der äußeren Plasmamembran (Abb. 22B). Auch bei Färbungen nach einem tritonfreien Protokoll ergibt sich dieses Bild (Abb. 22D-F). Wiederum ist Annexin B11^{long} außerhalb der Plasmamembran nachweisbar. Um zu zeigen, dass es sich dabei nicht nur um Hintergrundfärbung handelt, wurden Imaginalscheiben gefärbt, in denen unter der Kontrolle des *enGal4* Treibers im posterioren Anteil der Scheibe die Expression von Annexin B11^{long} über RNAi herabreguliert (Abb. 22G-I) bzw. Annexin B11^{long}-GFP überexprimiert wurde (Abb. 22J-L). Dadurch lassen sich diese Bereiche direkt mit dem anterioren Anteil der Scheibe, in dem Annexin B11^{long} unverändert endogen vorliegt, vergleichen.

Der Bereich, in dem durch Expression *der annexin b11^{long}* dsRNA das Protein reduziert vorliegt, wurde hier zusätzlich GFP markiert. Hier nimmt das Antikörpersignal ab (Abb. 22H-I). Im Gegenzug nimmt es nach Überexpression von Annexin B11^{long}-GFP deutlich zu (Abb. 22J-L). Um auszuschließen, dass dies durch einen unspezifischen Effekt hervorgerufen wird, wurde die Überexpression auch mit dem gegen Annexin B10 generierten Antiserum getestet. Hier zeigt sich weder im Bereich der Überexpression noch im wildtypischen Anteil ein Signal (Abb. 22M-O).

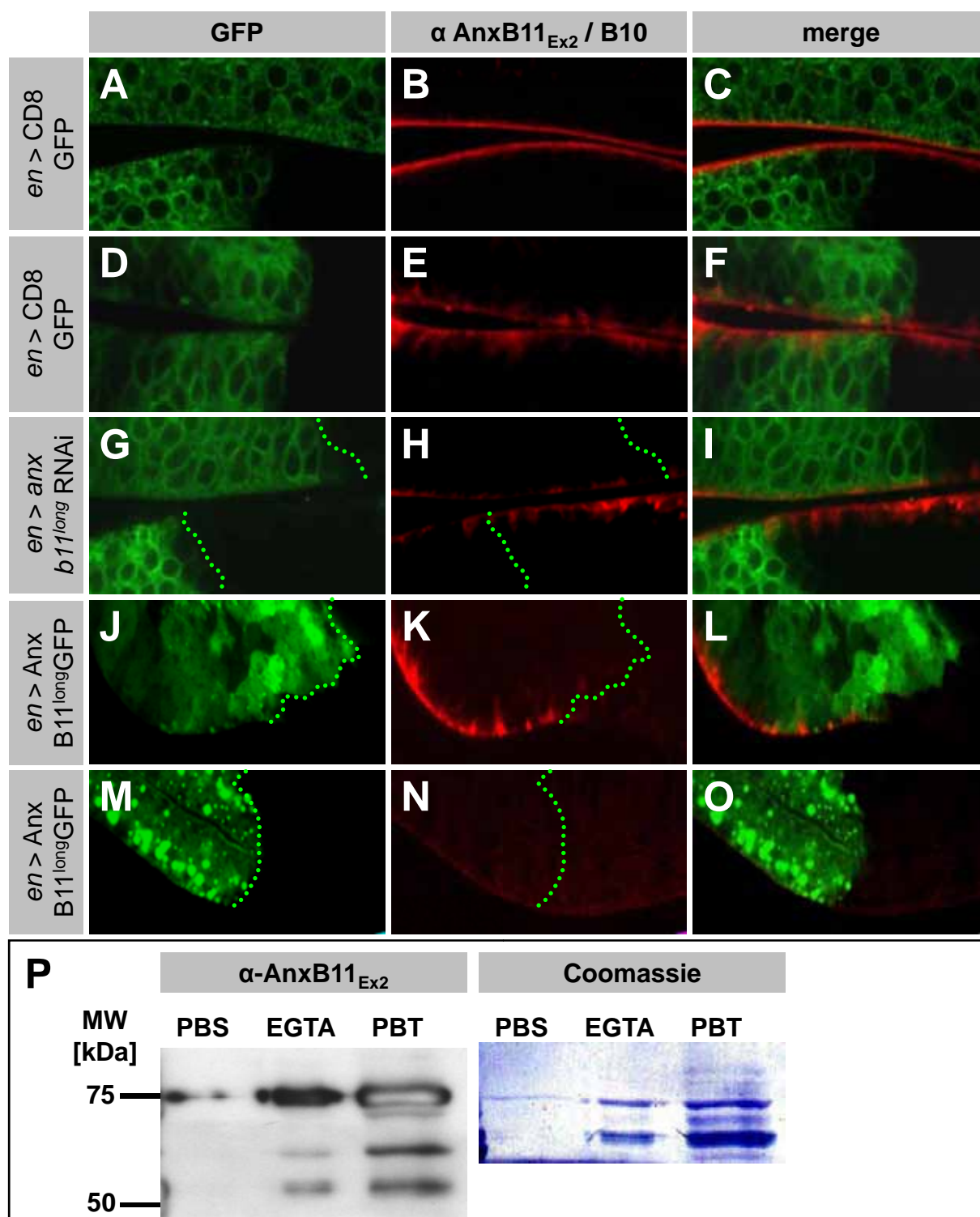


Abb. 22: Annexin B11^{long} lässt sich extrazellulär nachweisen

Posterior ist links. **A-F** Die Expression von UAS Annexin B11^{long} GFP in Flügelimaginalscheiben wurde mittels *enGal4* induziert. Zwei verschiedene Färbemethoden führen zu einem extrazellulären Signal nach Färbung über das Annexin B11_{Ex2} Serum. **G-I** Der Bereich, in dem es zur Reduktion von Annexin B11^{long} unter der Kontrolle von *enGal 4* kommt, ist GFP markiert. Das Annexin B11_{Ex2} Antikörpersignal nimmt in diesem Teil der Scheibe ab. **J-L** Nach Überexpression von Annexin B11^{long} GFP ist auch extrazellulär mehr Annexin B11^{long} im posterioren Teil der Scheibe nachweisbar. **M-O** Färbung mit dem Annexin B10 Antiserum führt zu keinerlei Signal. **P** Auch biochemisch ist Annexin B11^{long} extrazellulär nachweisbar. Es lässt sich durch Waschen mit EGTA von S2R+ Zellen ablösen.

Auch biochemisch kann gezeigt werden, dass ein Teil des Annexin B11^{long}-Proteins aus der Zelle geschleust wird. Transfizierte S2R+ Zellen wurden zwei Tage nach Transfektion mit dem Annexin B11^{long}-GFP-Überexpressionskonstrukt zunächst mit PBS gewaschen, wobei sich kaum Proteine von den Zellen entfernen ließen (Abb. 22P, jew. Spur 1).

Jedoch konnte eine Proteinablösung sichtbar erhöht werden, wenn EGTA im Waschpuffer enthalten war. Nach Western-Blot Analyse erhält man ein deutliches Signal für das endogene Annexin B11^{long}-Protein (56 kDa) und das überexprimierte Fusionsprotein (82 kDa) (Abb. 22P, jew. Spur 2). Wenn die Zellen durch PBT lysiert werden, gelangen auch die intrazellulären Proteine aus der Zelle und es ergeben sich die gleichen Banden (Abb. 22P, jew. Spur 3). Alle Ergebnisse sprechen somit für einen extrazellulär vorhandenen Anteil des Annexin B11^{long}-Proteins. Wie das Protein aus der Zelle gelangt, ist nicht bekannt. Da die größere Menge des Proteins trotzdem innerhalb der Zelle verbleibt, wird in der funktionellen Analyse auf das intrazelluläre Protein eingegangen.

3.3.4 Annexin B11^{long} Kolokalisationsstudien

Eine Reihe verschiedener Vertebraten-Annexine wurde im Zusammenhang mit unterschiedlichen membranabhängigen Prozessen beschrieben (siehe Einleitung). Hierbei nehmen sie distinkte Funktionen und dementsprechend spezifische Lokalisationen innerhalb der Zelle ein. Sowohl das endogen exprimierte Annexin B11^{long}-Protein als auch das GFP-Fusionsprotein kommen in vesikulären Strukturen vor. Um diese Strukturen näher zu bestimmen, wurden verschiedene Ansätze von Lokalisationsstudien genutzt.

3.3.4.1 Nur überexprimiertes Annexin B11^{long}-GFP kolokalisiert mit Dextran

Wie in Abschnitt 3.3.1 für Annexin B11^{long} beschrieben, kommt es durch ektopische Expression des GFP-Fusionsproteins zur Bildung runder, GFP-positiver Strukturen verschiedener Größe innerhalb der Zelle (Abb. 16, 17, 18A). Dies kann durch Färbungen mit dem Annexin B11_{Ex2} Antiserum bestätigt werden (Abb. 18B).

Um zu definieren, ob es sich hier um „echte“ Vesikel handelt, muss zunächst gezeigt werden, dass es membranumhüllte Strukturen sind. Dies kann z. B. über sogenannte „Dextran Aufnahme Versuche“ oder über myristoyliertes mRFP geschehen. RFP hat in diesem Fall lediglich eine Signalsequenz, die zur Membranlokalisierung führt. Es

gelangt zur Plasmamembran und wird daraufhin auch in endozytotische Vesikel integriert. So lässt sich die Bildung dieser und ihr Weg in der Zelle über das RFP-Signal verfolgen. Ist auch Annexin B11^{long} am Aufbau von Vesikeln beteiligt, sollte es zu Koloalisationen kommen. Dazu wurden Annexin B11^{long}-GFP und myristoyliertes mRFP in einem Tier über den *enGal4* Treiber koexprimiert und anschließend konfokal in Flügelimaginalscheiben analysiert (Abb. 23A, B). Es kommt zu deutlicher Überlappung der beiden Signale (Pfeile), wobei es zusätzlich Strukturen gibt, die nur mRFP-positiv sind (Pfeilspitzen). Da mRFP dazu neigt, nach Überexpression Aggregate zu bilden, ist nicht sicher, inwieweit es sich noch um funktionelle Vesikel handelt.

Bei Dextran handelt es sich um ein hochmolekulares Polysaccharid, das aus Bakterien der Gattung *Leuconostoc* gewonnen werden kann. Falls im Extrazellularraum anwesend, wird es bei allen Prozessen der Endozytose mit aufgenommen. Durch die Markierung mit Fluoreszenzfarbstoffen lässt es sich bei dem Eintritt in die Zelle und dem weiteren Transport in der Zelle verfolgen. In „Dextran Aufnahme Versuchen“ kann über Koloalisation gezeigt werden, ob es sich bei der untersuchten Struktur um endozytotische Vesikel handelt. Dazu werden frei präparierte Flügelimaginalscheiben direkt der Dextranlösung ausgesetzt. Es kommt auch nach dem Tod der Larve noch über einen Zeitraum von ca. einer Stunde zu normalen endozytotischen Prozessen. Anschließend werden die Scheiben gewaschen, fixiert und analysiert. Es zeigen sich Strukturen, die sowohl für Dextran als auch für Annexin B11^{long} GFP-positiv sind (Abb. 23C, D, Pfeile). Dies bestätigt die zuvor beschriebenen Ergebnisse, die ergaben, dass es sich bei den Annexin B11^{long}-positiven Strukturen um endozytotische Vesikel handeln könnte.

In wildtypischen Scheiben, in denen lediglich das endogene Annexin B11^{long}-Protein untersucht wurde, war dies nicht möglich (Abb. 24). Es ergeben sich zwar sowohl für Dextran als auch Annexin B11^{long}-positive Strukturen, diese überlappen jedoch nicht.

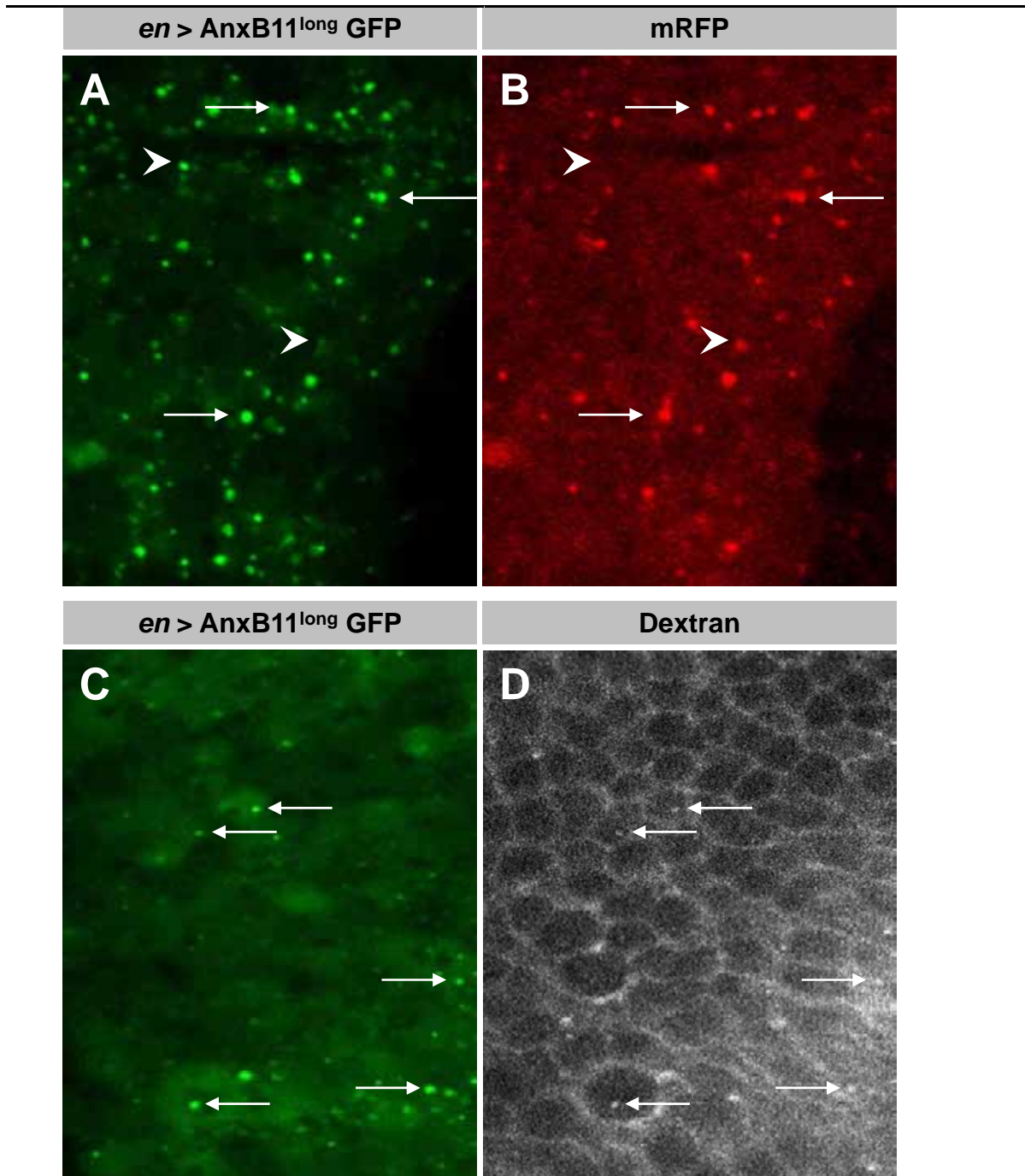


Abb. 23: Annexin B11^{long} GFP zeigt Kolokalisation mit Dextran und mRFP

A-B Flügelimaginalscheibe nach *en*> UAS Annexin B11^{long} GFP, UAS mRFP Koexpression. Annexin B11^{long} GFP und mRFP kolokalisieren (Pfeile **A, B**), einige Strukturen sind jedoch auch nur mRFP positiv (Pfeilspitzen **A, B**). **C-D** Flügelimaginalscheibe nach *en*> UAS Annexin B11^{long} GFP Expression und Dextran-Aufnahme-Versuchen. Annexin B11^{long} GFP und Dextran kolokalisieren (Pfeile **C, D**).

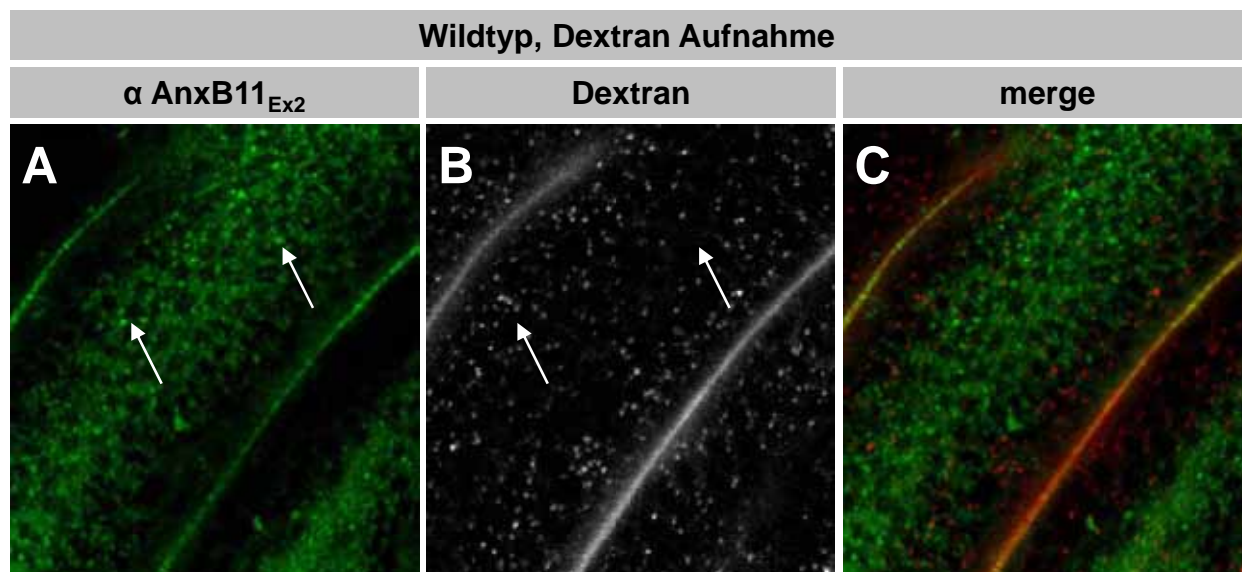


Abb. 24: Die Antikörperfärbung von Annexin B11^{long} zeigt kein überlappendes Signal mit Dextran

A-C wildtypische Flügelimaginalscheibe nach Dextran-Aufnahmen-Versuchen. Annexin B11^{long} wurde über das Annexin B11_{Ex2} Antiserum nachgewiesen. Sowohl Annexin B11^{long} (**A**) als auch Dextran (**B**) sind in vesikulären Strukturen nachweisbar. **C** Die Annexin B11^{long} positiven Strukturen überlappen nicht mit den Dextran positiven (Pfeile **A**, **B**).

3.3.4.2 Annexin zeigt keine Kollokalisierung mit Rab-positiven Strukturen

Aus den vorangegangenen Versuchen kann nicht klar geschlossen werden, ob Annexin B11^{long} in endozytotischen Vesikeln lokalisiert ist. Eine weitere Möglichkeit, dies zu untersuchen, sind Kollokalisationsstudien mit verschiedenen endosomalen Marker wie Rab5, Rab4, Rab11 und Clathrin. Hier kann direkt zwischen den verschiedenen Stadien der endosomalen Kompartimente unterschieden werden. So ist Rab5 an der Fusion früher Endosomen beteiligt, Rab4 lokalisiert an frühen Endosomen und Rab11 an Recycling Endosomen (Zerial and McBride 2001). Für alle Marker existieren transgene Fliegenstämme, die die Überexpression von GFP- bzw. RFP-Fusionen ermöglichen. Nach Expression der Markerproteine in Imaginalscheiben oder Speicheldrüsen wurde Annexin B11^{long} in diesen Strukturen über das Annexin B11_{Ex2}-Serum nachgewiesen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 25 dargestellt. Weder für Clathrin noch für die Rab Proteine konnte eine Kollokalisierung dargestellt werden. Zwar zeigt sich ein Signal in der Umgebung der Plasmamembran, die vesikulären Strukturen überlappen jedoch nicht (Abb. 25). Auch durch dieses Experiment kann die Identität der Annexin B11^{long}-positiven Kompartimente nicht geklärt werden.

3.3.5 Die Lokalisation von Spectrin wird durch Annexin B11^{long} Überexpression nicht beeinflusst

Spectrine sind lang gestreckte Strukturproteine, die Aktinfilamente und weitere Proteine quervernetzen können. Sie bilden Heterodimere aus einer α - und einer β - Untereinheit, die antiparallel binden. Zwei dieser Dimere assoziieren zu einem Heterotetramer (Bennett 1989; Bennett and Baines 2001). Über diese Multimere und ihre Bindungspartner entsteht ein ausgedehntes Netzwerk zwischen Membranen, Aktinfilamenten, Zelladhäsionsmolekülen und intrazellulären Signalmolekülen (Bennett and Baines 2001; Bialkowska, Saido et al. 2005). Für *Drosophila* existiert neben der α - und einer konventionellen β - Untereinheit noch eine schwere β_{heavy} Untereinheit (Thomas, Zarnescu et al. 1998). In epithelialen Zellen lokalisiert das ($\alpha\beta$)- Spectrin Heterotetramer entlang der basolateralen, das ($\alpha\beta_{\text{heavy}}$)- Spectrin Heterotetramer an der apikalen Membran (de Cuevas, Lee et al. 1996; Lee, Brandin et al. 1997).

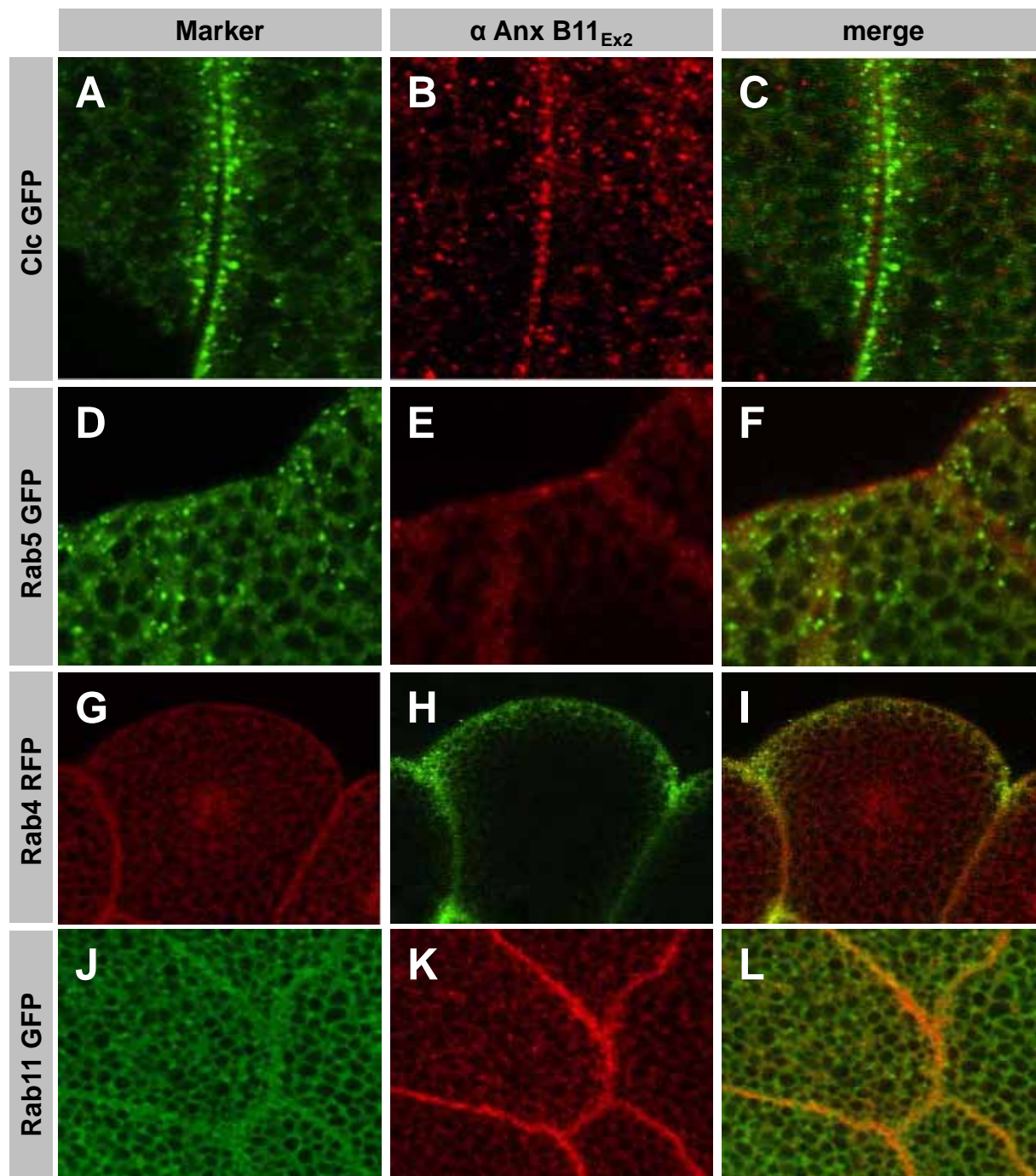


Abb.25: Annexin B11^{long} liegt nicht assoziiert mit Rab positiven Strukturen vor

A-C Die Expression von UAS Clathrin GFP in Flügelimaginalscheiben wurde mittels *enGal4* induziert. **D-F** Die Expression von UAS Rab5 GFP in Speicheldrüsenzellen wurde mittels *daGal4* induziert. **G-I** Die Expression von UAS Rab4 RFP in Speicheldrüsenzellen wurde mittels *daGal4* induziert. **J-L** Die Expression von UAS Rab11 GFP in Speicheldrüsenzellen wurde mittels *daGal4* induziert. Annexin B11^{long} wurde jeweils über das Antiserum Annexin B11_{Ex2} nachgewiesen. Die Vesikelmarker und Annexin B11^{long} lokalisieren in den gleichen Bereichen der Zellen und markieren die Membran. Es kommt jedoch zu keiner Kolokalisation in Bezug auf vesikuläre Strukturen.

Kamal et. al konnten zeigen, dass Annexin A6 für die Clathrin abhängige Endozytose benötigt wird. Außerdem kann es an den N-terminalen Teil von Spectrin binden. Es wird vorgeschlagen, dass Annexin an der Loslösung der Clathrin-umhüllten Vesikel von der Plasmamembran und dem Spectrin-Zytoskelett beteiligt ist (Kamal, Ying et al. 1998). Einen weiteren Hinweis auf die Verbindung des Spectrin basierenden Membranskeletts mit Annexinen ergab eine Dissertation über Spectrine und ihre Rolle in Zellpolarität und Spezifitätsvermittlung an Zell-Zell-Kontakten in *Drosophila* (Williams 2005). Bei der Charakterisierung der Interaktion von Spectrinen und Annexin B9 in diesem Zusammenhang fiel auf, dass Annexin B9 mit Bi-Membranen-Strukturen, die nach Überexpression von β_{heavy} -Spectrin entstehen, kolokalisiert (Williams 2005). Außerdem führt eine Reduktion der Expression von Annexin B9 mittels RNAi zu weniger Bi-Membranen Strukturen. Es scheint also einen direkten Zusammenhang zwischen Spectrin und Annexin B9 in *Drosophila* zu geben.

Über die Überexpressionskonstrukte der Annexine sollte innerhalb dieser Arbeit untersucht werden, ob ektopische Expression verschiedener *Drosophila*-Annexine zu einer Veränderung der Lokalisation von α -Spectrin, β -Spectrin oder β_{heavy} -Spectrin führt. Dazu wurden Flügelimaginalscheiben, in denen Annexin-GFP im posterioren Teil überexprimiert wurde, mit dem Antikörper gegen das jeweilige Spectrin gefärbt und konfokal analysiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 26 dargestellt. Die Spectrine lokalisieren wie zuvor beschrieben an den Membranen der epithelialen Zellen. Es kommt zu keiner sichtbaren Veränderung der Proteinlokalisationen im posterioren Bereich der Annexin-GFP-Überexpression im Vergleich zum wildtypischen Anteil der Scheibe (Abb. 26).

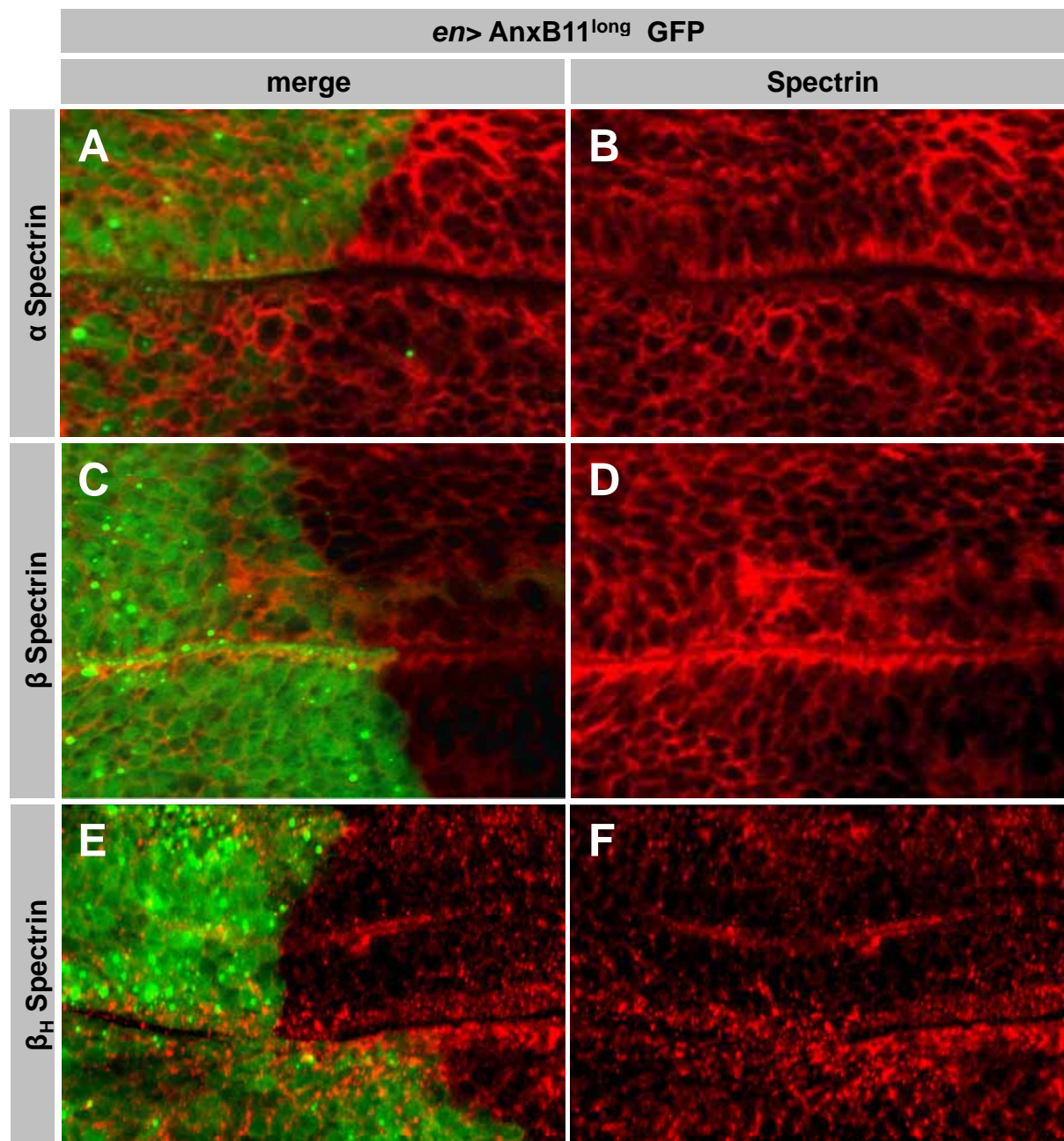


Abb. 26: Die Organisation des Spectrin Zytoskeletts wird durch die Überexpression von Annexin B11^{long} GFP nicht beeinflusst

A-F Die Expression von UAS Annexin B11^{long} GFP in Flügelimaginalscheiben wurde mittels *enGal4* induziert. Zusätzlich Färbung über die α - (**A, B**), β - (**C, D**) bzw. β_H - (**E, F**) Spectrin Antikörper. Posterior ist links. Die Lokalisation und Organisation aller betrachteten Spectrine zeigt keinerlei Veränderung nach Überexpression von Annexin B11^{long} GFP im posterioren Anteil der Scheibe im Vergleich zum wildtypischen anterioren Bereich.

3.4 Funktionelle Analyse der *Drosophila*-Annexine

3.4.1 Herabregulation der *annexin* Expression

Über die RNA-interference Methode ist es möglich, Genexpression auf posttranskriptionaler Ebene gezielt herabzuregulieren (Fire, Xu et al. 1998; Kennerdell and Carthew 1998; Gunsalus and Piano 2005). Zu diesem Zweck wurden UAS Annexin-RNAi-Konstrukte generiert. Der dazu genutzte pWiz Vektor (Lee and Carthew 2003) enthält neben fünf UAS-Sequenzen als *Spacer* das 2. *white* Intron. Für jedes Annexin wurde ein spezifisches Fragment der entsprechenden cDNA amplifiziert und anschließend in entgegen gesetzter Orientierung beidseitig des *white* Introns in den Vektor gebracht. Über das UAS Gal4 System kann anschließend gewebespezifisch der dem *annexin* Gen entsprechende RNA Strang exprimiert werden. Das in der Mitte liegende *white* Intron wird herausgespleißt, sodass sich die komplementären Stränge zu einer doppelsträngigen RNA (dsRNA) zusammenlagern können (Klonierungsstrategien und Karten siehe M&M, Anhang). Diese induziert anschließend die sequenzspezifische Inhibition der Genexpression auf posttranskriptionaler Ebene (Lee and Carthew 2003). Dabei wird die dsRNA mithilfe des Dicer Proteins in 21mere zerschnitten. Die gebildete siRNA wird in den RISC (RNA induced silencing complex) integriert und die komplementäre mRNA wird gezielt abgebaut.

3.4.2 Analyse von *off target* Kandidaten

Bei der oben beschriebenen Reduktion der Expression von Genen über RNAi-Ansätze kann es zu ungewollten *off target* Ereignissen und somit zur Herabregulation auch anderer Gene kommen. Über <http://dscheck.rnai.jp/> ist es möglich, sich aus einem beliebigen Fragment alle 19 Nukleotide langen Fragmente voraussagen und mit dem *Drosophila* Transkriptom vergleichen zu lassen. Daraus ergibt sich die Anzahl der *off target* Kandidaten und der Anteil, zu dem sie wahrscheinlich reduziert werden. Zusätzlich wird verglichen, welche Transkripte betroffen sind, wenn nur 18 oder weniger der 19 Nukleotiden homolog sind. Es wurde dafür jedoch beschrieben, dass nur vollständig identische Fragmente abgebaut werden (Kulkarni, Booker et al. 2006).

Alle für die *Drosophila* RNAi-Konstrukte genutzten Nukleotidsequenzen wurden mithilfe des Programms auf *off target* Kandidaten hin untersucht. Die vollständige Auswertung ist im Anhang aufgeführt. Daraus ergibt sich, dass die Reduktion der *annexin b9*-Expression in einem Verhältnis von ca. 50:1 auch zu einer Reduktion der *annexin b11^{short}*-Expression führen kann. Andere Genexpressionen werden nicht signifikant beeinflusst. Im Gegenzug wird für die Herabregulation von *annexin b11^{short}* in einem Verhältnis von 30:1 auch eine Reduktion der *annexin b9*-Expression vorhergesagt. Für das gewählte Fragment für die Reduktion der *annexin b11^{long}*-Expression im 2. Exon der genomischen Region wurden keine signifikanten *off targets* gefunden.

Für die gewählte *annexin b10* Sequenz ergeben sich vier vorhergesagte Transkripte, die gleichermaßen wahrscheinlich in einem Verhältnis von ca. 13:1 im Vergleich zu *annexin b10* herabreguliert werden. Diese Gene (*CG33491*, *CG33496*, *CG33487*, *CG33498*) wurden deshalb genauer betrachtet. Ihre genetische Lokalisation ist in Abbildung 27 dargestellt.

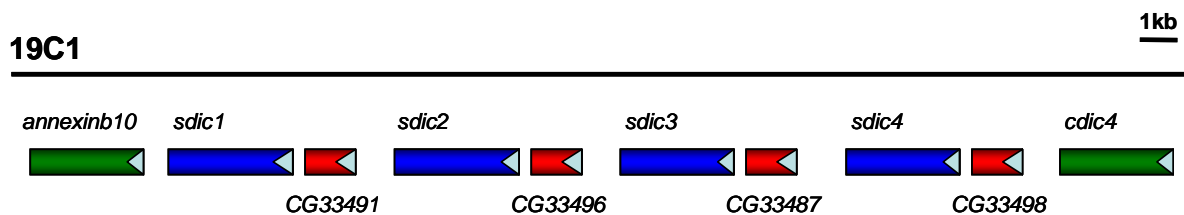


Abb. 27: CG33491, CG33496, CG33487 und CG33498 entstanden wahrscheinlich aus *annexin b10* Duplikationen. Dargestellt sind ca. 40 kb des genomischen Bereichs um 19C1. Details siehe Text (Daten basierend auf Flybase).

Auffallend ist, dass alle vier CGs in der direkten Nachbarschaft zu *annexin b10* lokalisiert sind. Dies spricht dafür, dass es sich um Duplikationsereignisse von *annexin b10* handelt. Auch die Anordnung der *sdic* Gene bestätigt dies. Für *sdic* konnte bereits zuvor gezeigt werden, dass es sich auch hierbei um eine Fusion von Exon 4 des *annexin b10* Gens und *cdic* handelt (Ranz, Ponce et al. 2003).

Eine Sequenzanalyse zeigt, dass die DNA Sequenzen der vier CGs (*CG33491*, *CG33496*, *CG33487*, *CG33498*) mit der C-terminalen Sequenz von *annexin b10* nahezu perfekt übereinstimmen (Abb. 28). Innerhalb der homologen Sequenz wird eine der Ca^{2+} -Bindestellen kodiert. Da keine cDNAs für diese CGs beschrieben sind, ist nicht bekannt, inwieweit es zur Expression kommt. Die *annexin b10* Reduktion über das gewählte RNAi-Fragment könnte durch die Reduktion der vier Genprodukte abgeschwächt werden. *sdic* wurde nicht als *off target* Kandidat vorhergesagt.

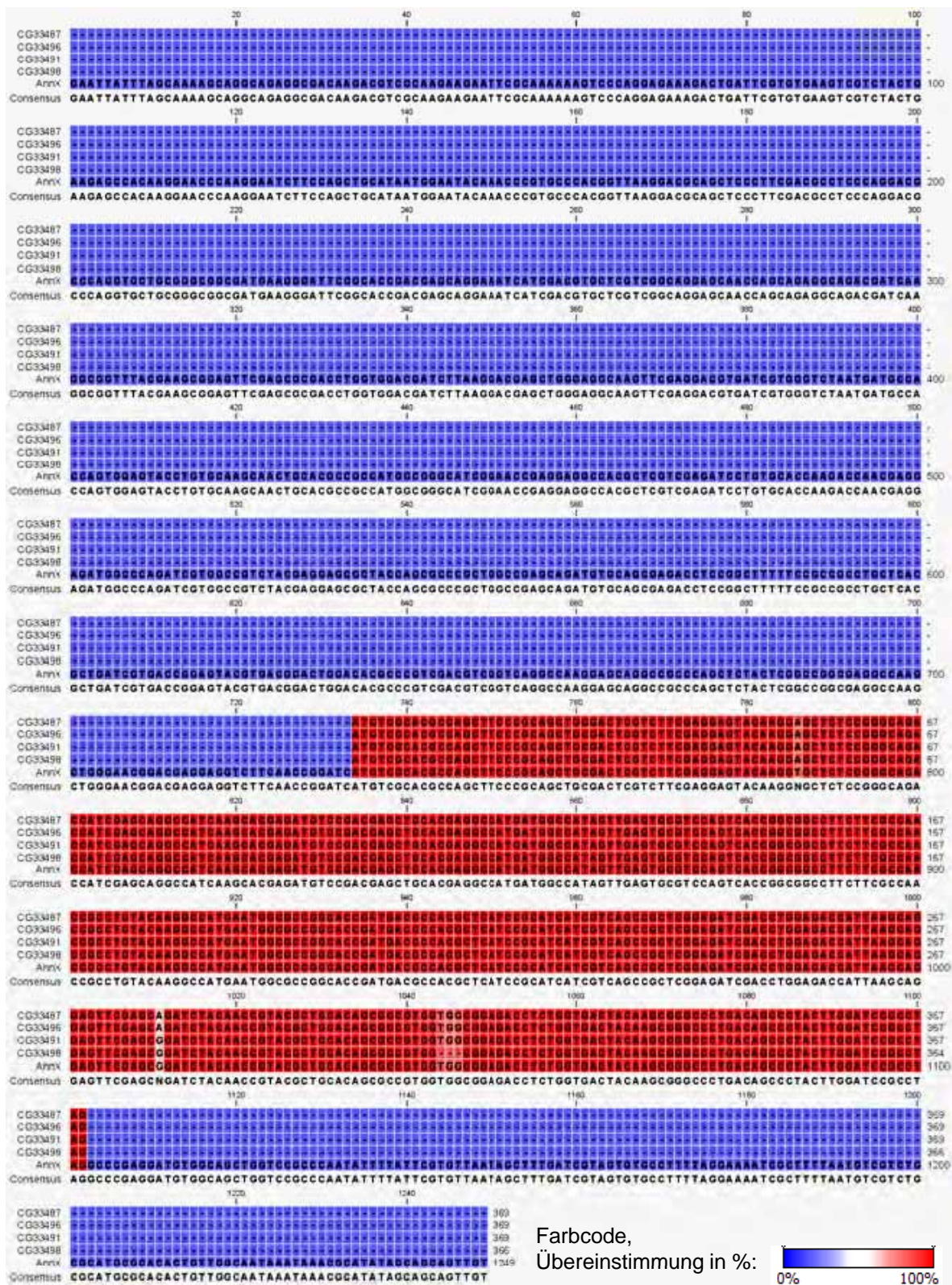


Abb. 28: Sequenzvergleich von *Drosophila annexin b10* mit den CGs CG33491, CG33496, CG33487 und CG33498

Die Basensequenzen der CGs stimmen fast vollständig mit dem C-terminalen Bereich von *annexin b10* überein. Die Übereinstimmung der Basen ist farblich kodiert (blau= keine Übereinstimmung, rot= identische Basen).

3.4.3 Charakterisierung der *annexin*-RNAi Phänotypen

3.4.3.1 *annexin*-RNAi führt zu starken Zelldefekten

Für alle generierten RNAi-Konstrukte wurden jeweils mindestens fünf transgene *Drosophila* Linien etabliert. Diese sollten im Folgenden näher charakterisiert werden. Zunächst wurde mithilfe der Treiberlinien *daGal4*, *GMRGal4* (*glass Multimer Reporter*) und *scaGal4* (*scabrous*) getestet, welche RNAi-Linien sich als funktionsfähig erweisen und ob es Unterschiede in der Stärke der Ausprägung von Phänotypen gibt. Durch Expression im *daGal4* Muster kommt es früh zu ubiquitärer Expression. So lässt sich untersuchen, ob eine frühe, starke Herabregulation des betreffenden Gens zu Letalität oder anderen Defekten führen kann. Die Linien *GMRGal4* und *scaGal4* führen zu einer Expression in der Entwicklung von Augen bzw. thorakalen Borsten.

Es wurde außerdem untersucht, inwieweit sich die Temperatur auf die Stärke der Phänotypen auswirkt. Die in den folgenden Abbildungen gezeigten Situationen spiegeln, wenn nicht anders markiert, eine Haltung bei 25 °C wider.

Das Bild, das sich aus der Expression im *daGal4* Muster ergibt, ist in Tabelle 1 zusammengefasst. Die starke Expression führt im Falle von *annexin b11^{long}*-RNAi zu Letalität. Die Tiere sterben je nach Temperatur und Insertion im ersten oder zweiten larvalen Stadium. Hier zeigt sich zusätzlich zum Phänotyp, dass die Expression über das prinzipiell selbe Konstrukt innerhalb verschiedener transgener Stämme unterschiedliche Effekte hervorrufen kann. Die Linie #51 prägt in allen getesteten Konstrukt-Treiberkonstellationen den stärksten Phänotyp aus. Für die Reduktion der anderen *annexine* unter der Kontrolle von *daGal4* ergibt sich kein abnormaler Phänotyp (Tab. 1).

Tab. 1: Vergleich der RNAi-Effektivität für einige *annexin*-RNAi Konstrukte

<i>da</i> > <i>anxb9</i> -RNAi	vital
<i>da</i> > <i>anxb10</i> -RNAi	vital
<i>da</i> > <i>anxb11^{short}</i> -RNAi	vital
<i>da</i> > <i>anxb11^{long}</i> -RNAi #51	letal L1-L2
<i>da</i> > <i>anxb11^{long}</i> -RNAi #11	letal L2-L3

Nach Expression der *annexin* dsRNA unter der Kontrolle der Treiber GMRGal4 und *scaGal4* wurden vom Wildtyp abweichende Phänotypen erhalten.

Das Auge von *Drosophila* baut sich aus 800 Ommatidien auf, die in einer stereotypen Art und Weise angeordnet sind, auf. Reduktion der *annexin* Expression innerhalb der Augenentwicklung führt zu den in Abbildung 29 dargestellten Phänotypen. Schon die Treiberlinie GMRGal4 weicht in ihrer Erscheinung etwas vom Wildtyp ab wird als Kontrolle aufgeführt. Die Augen sind rauer als im Wildtyp (Abb. 29A, B). *annexin b9* und *b10*-RNAi führen zu schmalere Augen, es wirkt, als seien weniger Zellen vorhanden. Auch ist die Form nicht mehr abgerundet wie im Wildtyp, anterior bilden sich Kerben (Abb. 29C, D, Pfeile). Innerhalb des Auges kommt es zu Unregelmäßigkeiten im Ommatidienmuster, es fehlen Zellen, dafür sind ektopische Borsten zu finden. Die Reduktion von *annexin b9* und *b10* Expression führt zu ähnlichen Phänotypen, wobei die Ausprägung für *annexin b10* stärker ausfällt.

Ein deutlich extremeres Bild ergibt sich für die Herabregulierung der *annexin b11* Spleißvarianten (Abb. 29E, F). In beiden Fällen sind wiederum die Augen schmaler und deformiert. Zusätzlich lassen sich keine einzelnen Ommatidien mehr unterscheiden. Die Oberfläche wirkt glatter als üblich, die Zellen sind nekrotisch. Dies wird besonders für *annexin b11^{long}*-RNAi deutlich. Das Auge wirkt nicht wie ein differenziertes Gewebe und ist sehr klein (Abb. 29F).

Für die Expression im *scaGal4* Muster ergibt sich in Bezug auf die Stärke des Phänotyps ein vergleichbares Bild. Wieder zeigt sich in Tieren, in denen Annexin B11^{long} herabreguliert wurde, der stärkste Effekt. Während im *sca > annexin b9, b10* oder *b11^{short}*-RNAi Hintergrund nur wenige Borsten betroffen sind (Daten nicht gezeigt), ist die Fehlentwicklung in *sca > annexin b11^{long}*-RNAi Tieren stark ausgeprägt (Abb. 30). Im Wildtyp erkennt man das stereotype Muster der Makro- und Mikrochaeten Anordnung auf Kopf und Thorax (Abb. 30A, B). Im Gegensatz dazu fehlen in *sca > annexin b11^{long}*-RNAi Fliegen in großen Bereichen sowohl Makro- als auch Mikrochaeten (Abb. 30D, Pfeil), außerdem sind die Makrochaeten häufig verkürzt und gesplittet (Abb. 30C', D, Pfeilspitze).

Die beschriebenen Phänotypen entstehen wie schon erwähnt aus der Expression bei 25 °C. Eine Temperaturerhöhung kann die gezeigten Phänotypen noch verstärken, wobei sich auch für die Treiberlinien allein besonders bei 29 °C eine stärker werdende Abweichung vom Wildtyp ergibt (Daten nicht gezeigt).

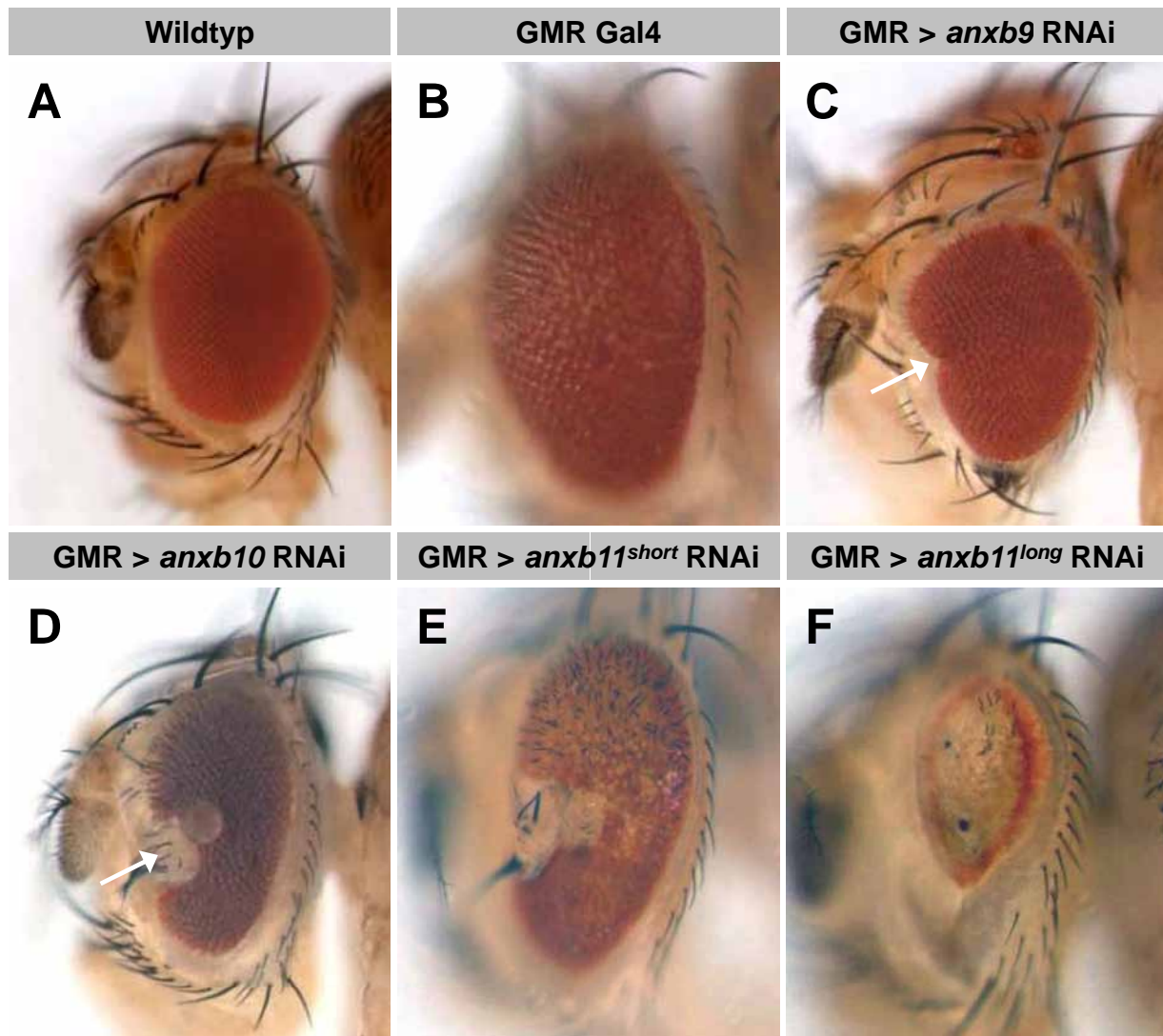


Abb. 29: *annexin* RNAi führt zu schweren Defekten während der Augenentwicklung

Ansicht der Komplexaugen von lateral; dorsal ist oben. **A** Im Wildtyp zeigt sich das stereotype Muster der Ommatidien. **B** Die Treiberlinie GMR Gal4 zeigt bereits Veränderungen der Augenmorphologie. Die regelmäßige Anordnung der Ommatidien ist leicht gestört, die Augen sind etwas rauer. **C-F** Adulte Augenphänotypen nach Reduktion der Annexin Expression. **C-D** Nach Reduktion der Annexin B9 und B10 Expression sind die Augen schmaler. Sie bilden Kerben und ektopische Borsten aus (Pfeile **C, D**). **E-F** Die Reduktion der Annexin B11^{short} und B11^{long} Expression über RNAi führt zu starken Defekten. Die Augen sind verkleinert, viele Zellen sind nekrotisch. Den deutlich stärksten Effekt bewirkt die Reduktion der Annexin B11^{long} Expression (**F**). Hier sind keine einzelnen Ommatidien mehr unterscheidbar.

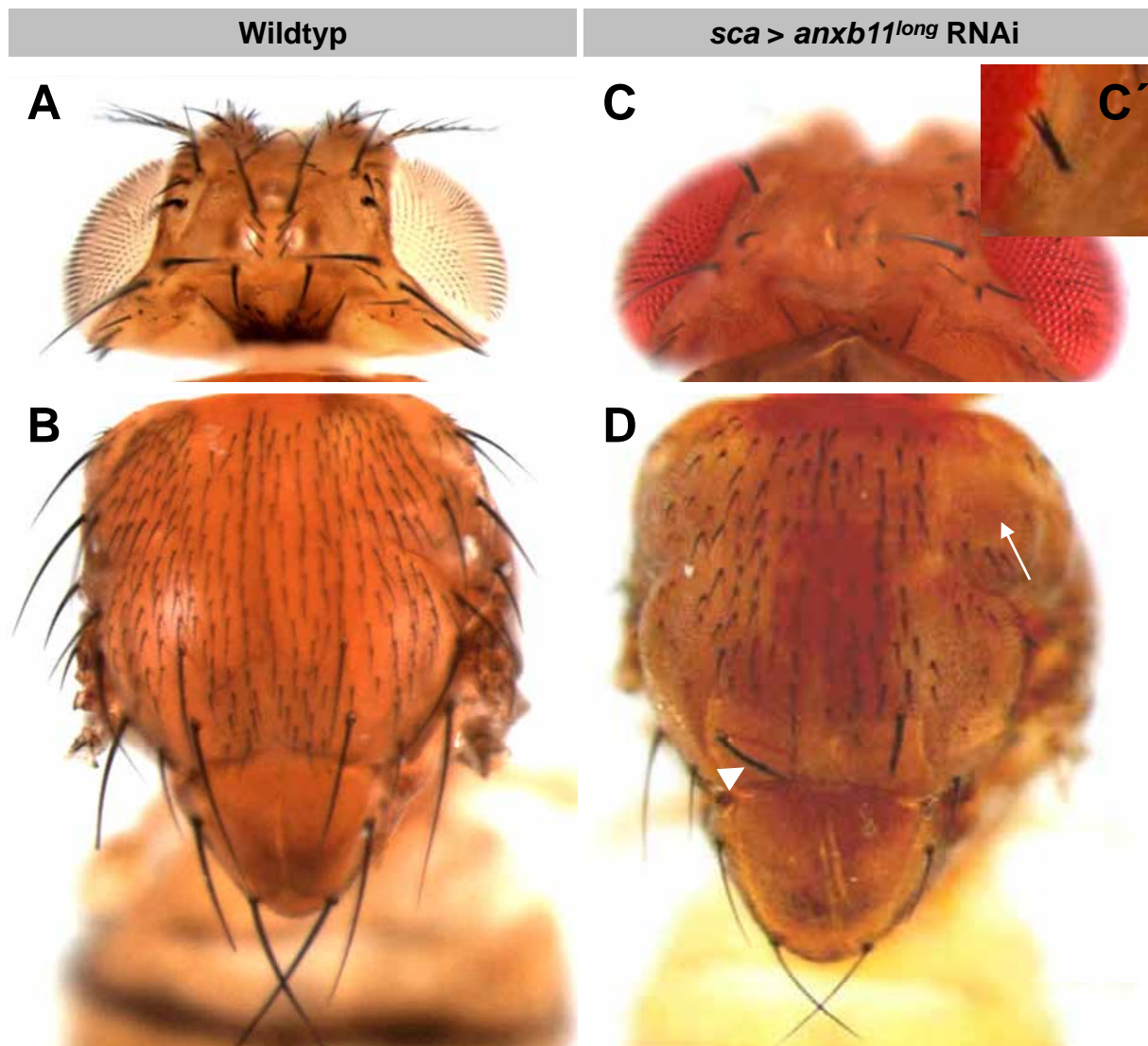


Abb. 30: Reduktion der *annexin b11^{long}* Expression führt zu deutlichen Borstendefekten auf Kopf und Thorax

Dorsale Ansicht von Thorax und Kopf; anterior ist oben. **A-B** Im Wildtyp zeigt sich das stereotype Muster der Mikro- und Makrochaetenanordnung. **C-D** Nach Reduktion der Annexine *B11^{long}* Expression unter der Kontrolle der Treiberlinie *scabrous* Gal4 kommt es zu starken Defekten in der Borstenentwicklung. Auf Kopf und Thorax werden weniger Borsten ausgebildet. Einige Borsten sind gespalten (**C'**). Die Makrochaeten sind schmaler und verkürzt (Pfeilspitze **D**). Es entstehen ganze Bereiche ohne Borstenbildung (Pfeil **D**).

Um zu analysieren, ob es auf diesem Wege möglich ist, die Expression aller Annexine in einem Tier zu reduzieren, wurden verschiedene RNAi-Konstrukte miteinander kombiniert und koexprimiert. Hieraus ergibt sich keine Verstärkung der schon beschriebenen Phänotypen (Daten nicht gezeigt). Dies kann verschiedene Gründe haben, so kann der Transkriptionsfaktor Gal4 in diesem Zusammenhang eventuell als limitierender Faktor wirken und nicht alle RNAs werden in maximaler Stärke exprimiert. Außerdem führt möglicherweise schon die Expression von dsRNA über einzelne RNAi-Konstrukte zur Herabregulation mehrerer Annexine (vgl. Abschnitt 3.4.2). Insgesamt ergibt sich, dass die generierten Konstrukte in fast allen getesteten Geweben einen Phänotyp hervorrufen. Dies stimmt mit dem Ergebnis überein, dass die Annexin Expression nach Annexin Antikörperfärbungen ubiquitär erscheint (Abb. 10). Annexine sind somit in allen betrachteten Geweben vorhanden und werden offensichtlich auch benötigt.

3.4.3.2 Der *annexin*-RNAi Phänotyp ist auf andere Gewebe übertragbar

In den bisher beschriebenen Geweben ist es schwierig, die Funktion der Annexine genauer zu betrachten. Innerhalb der Phänotypen ergibt sich eine gewisse Variabilität, die es erschwert, quantitative Auswertungen zu betreiben. Deshalb wurde getestet, ob *annexin*-RNAi unter der Kontrolle der Treiber *ptcGal4* und *enGal4* zu einem stabileren Phänotyp führt. Beide Treiber führen zur Expression in der Flügelimaginalscheibe der sich entwickelnden Fliege, wobei *enGal4* die Expression von Zielgenen im posterioren Teil der Scheibe verursacht. Die *ptc* Domäne bildet die Grenzregion zwischen anteriorem und posteriorem Kompartiment.

Im adulten Wildtyp liegen zwischen den Längsvenen L3 und L4 18 Zellreihen vor (Abb. 31A). Besonders in *ptc > annexin b11^{long}*-RNAi Tieren ist die Zellzahl innerhalb des gesamten betroffenen Bereichs deutlich reduziert (Abb. 31B, B'). Der Bereich ist fast vollständig deletiert. Die Venen L3 und L4 berühren sich (Abb. 31B'). Die angrenzenden Zellen sehen in ihrer Ausprägung normal aus.

en > annexin b11^{long}-RNAi Tiere zeigen ebenfalls starke Defekte im Flügel. Es kommt im gesamten posterioren Teil des Flügels zur Reduktion von *annexin b11^{long}*. Die Zellzahl ist reduziert, sodass sich der gesamte Flügel in seiner Form nach unten krümmt. Der Zelldefekt zeigt sich besonders deutlich im distalen Bereich der Längsvene L5 und um die posteriore Quervene (Abb. 31C, C').

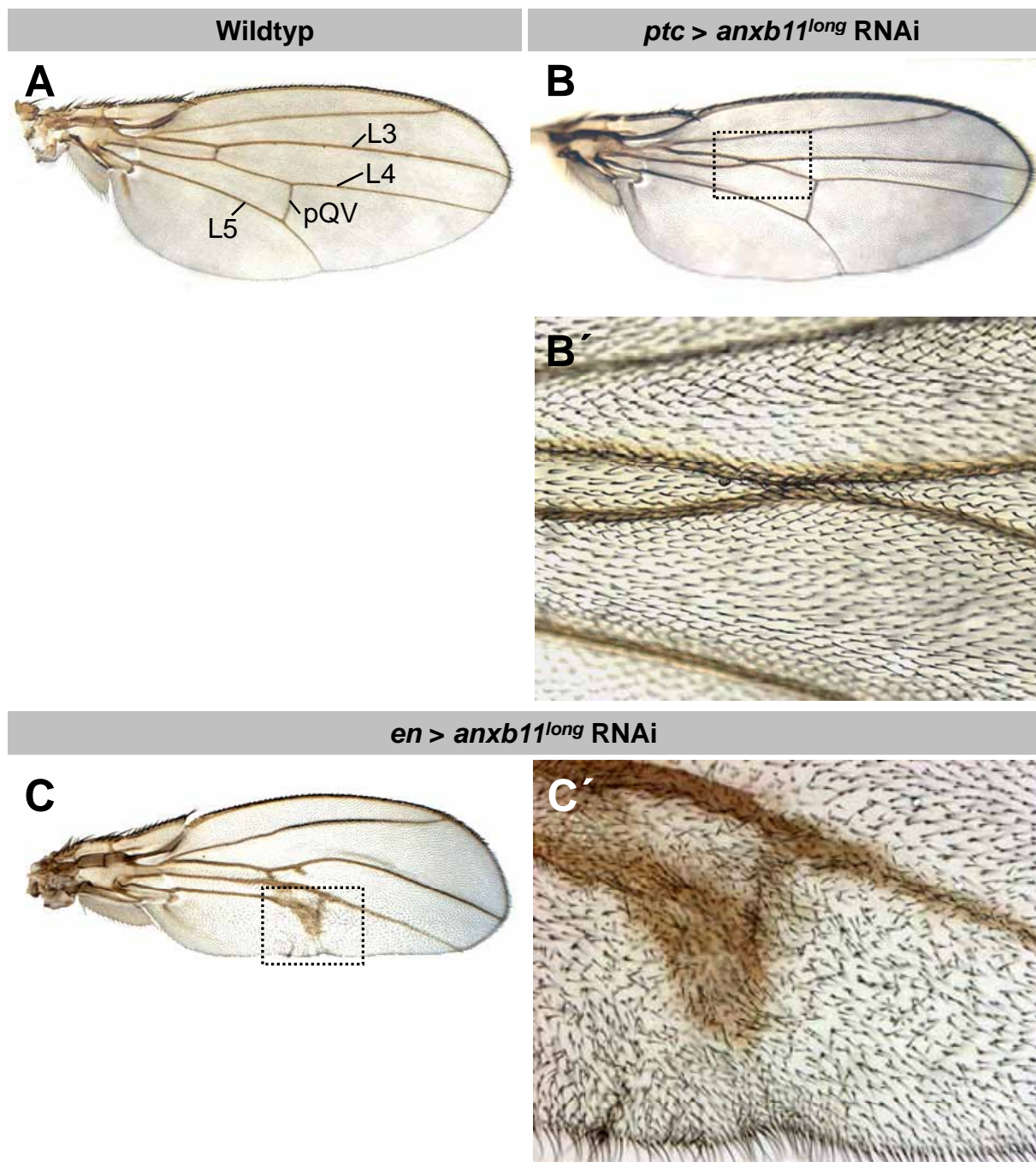


Abb. 31: Die Expression von *annexin b11^{long}* dsRNA verursacht starke Flügelphänotypen

Anterior ist oben. **A** Im Wildtyp zeigt sich das stereotype Muster der Venenanordnung innerhalb des Flügels; L3-Längsvene 3, L4-Längsvene 4, L5-Längsvene 5, pQV- posteriore Quervene **B** Nach Reduktion der Annexine B11^{long} Expression unter der Kontrolle der Treiberlinie *patched* Gal4 kommt es zu starken Defekten in der Flügelentwicklung. Die Längsvenen L3 und L4 berühren sich (Detailansicht **B'**). **C** Nach Reduktion der Annexin B11^{long} Expression im gesamten posterioren Anteil des Flügels ist der Flügel nach unten gekrümmt. Besonders im Bereich um die Längsvene L5 und die posteriore Quervene ist die sonst streng stereotype Anordnung der Haare gestört (Detailansicht **C'**).

Die Venen sind nicht mehr vollständig ausgebildet. Außerdem sind die Flügelhaare nicht in ihrem stereotypen Muster angeordnet. In der wildtypischen Situation bilden die Zellen des Flügels in ihrer distalen Spitze ein Haar aus, dessen Ende zum distalen Teil des Flügels zeigt (vgl. Abb. 31B´). In Abbildung 31C´ ist deutlich zu erkennen, dass die Haare diesem Bild nicht mehr entsprechen.

Dies kann auf verschiedene Defekte während der Entwicklung zurückzuführen sein. So kann es einen Hinweis auf Fehler in der Zellteilung, der Ausprägung von Zellpolarität oder der Aufrechterhaltung des Zellüberlebens geben. Eine Analyse dessen wird im weiteren Verlauf dieser Arbeit präsentiert. Die Reduktion der Expression der anderen *annexin* Gene unter der Kontrolle der Treiber *enGal4* bzw. *ptcGal4* zeigte keinen Effekt.

3.4.3.3 Unterschiedliche *annexin*-RNAi-Konstrukte zeigen variable Effektivität

Alle bisher beschriebenen Phänotypen beziehen sich auf die Proteinreduktion mithilfe der im Zusammenhang dieser Arbeit generierten RNAi-Konstrukte. Im Laufe der Arbeit wurden weitere Konstrukte aus anderen Arbeitsgruppen zugänglich. Da sich auch innerhalb der selbst erzeugten Linien ein Unterschied in der Expressionsstärke zeigt (vgl. Tab. 1 *annexin b11^{long}*-RNAi #11 und #51), ist es interessant zu überprüfen, inwieweit sich die neuen Konstrukte in ihrer Ausprägung von den schon beschriebenen unterscheiden.

Zu diesem Zweck wurden die neuen Linien, im Folgenden *annexin b9*-RNAi #33.4 (Graham Thomas) bzw. *annexin b10*-RNAi #300-9 (NIG-Fly, Fly Stocks of National Institute of Genetics, Japan) genannt, gegen die Treiber *daGal4*, *GMRGal4*, *enGal4* und *repoGal4* (Expression in Gliazellen) gekreuzt und bei 25 °C bzw. 29 °C gehalten, um ein vergleichbares Bild zu den schon dargestellten Ergebnissen zu erhalten. Die Resultate sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Tab. 2: Vergleich der Ausprägung von Phänotypen nach Expression von *annexin* dsRNA mittels unterschiedlicher Konstrukte in Kombination mit verschiedenen Treiberlinien.

Die erhaltenen Phänotypen (Pt) sind in den angegebenen Abbildungen dargestellt. In letalen Fällen ist die hierfür notwendige Temperatur angegeben.

	<i>daGal4</i>	GMRGal4	<i>enGal4</i>	<i>repoGal4</i>
<i>anxb9</i> -RNAi #1	kein Pt	Augenpt s. Abb. 27	kein Pt	kein Pt
<i>anxb9</i> -RNAi #33.4	letal 29 °C	kein Pt	kein Pt	wenige, kein Pt
<i>anxb10</i> -RNAi #7	kein Pt	Augenpt s. Abb. 27D	kein Pt	kein Pt
<i>anxb10</i> -RNAi #300-9	letal 25 °C	kein Pt	kein Pt	letal 29 °C
<i>anxb11^{short}</i> -RNAi #47	kein Pt	Augenpt s. Abb. 27E	kein Pt	kein Pt
<i>anxb11^{long}</i> -RNAi #51	letal 18 °C	Augenpt s. Abb. 27F	Flügelpt s. Abb. 29E	letal 18 °C

Hieraus ist ersichtlich, dass, wie für *annexin b11^{long}*-RNAi gezeigt, es auch für die *annexine b9* und *b10* abhängig von der Insertionslinie unterschiedlich stark zur Reduktion des jeweiligen Genprodukts kommt. Scheinbar führt die Expression über unterschiedliche Konstrukte jedoch auch gewebespezifisch zu Unterschieden, was sich anhand von *annexin b9* zeigt. Hier führt einerseits die Expression im GMRGal4 Muster zu einem Phänotyp (#1), während über das eigentlich stärkere Konstrukt, das mit *daGal4* zur Letalität führt (#33.4), nach Expression unter der Kontrolle des GMRGal4 Treibers keine Defekte im Auge zu erkennen sind.

Es ist unwahrscheinlich, dass diese Effekte auf eine geringe Spezifität des Konstruktes #33.4 zurückzuführen sind, da für entsprechend verwendete Sequenz keine *off target* Gene vorhergesagt wurden.

Bis auf die kürzere Spleißversion von *annexin b11* stehen nun für alle *Drosophila*-Annexine effektive RNAi-Konstrukte zur Verfügung.

3.4.3.4 *annexin*-RNAi führt zu Defekten in der Augenentwicklung

In einem RNAi-Screen mithilfe der Treiberlinie *repoGal4*, die zur Expression in Gliazellen führt, sollten neue Gene, die an der Gliaproliferation und -migration

beteiligt sind, identifiziert werden (I. Schmidt). Dabei wurde festgestellt, dass die Expression von *annexin b11^{long}*-RNAi und *annexin b10 #300-9* unter der Kontrolle des *repoGal4* Treibers zu Letalität führt. Da in *whole mount in situ* Hybridisierungsanalysen zusätzlich gezeigt wurde, dass *annexin b9* und *b10* mRNA im peripheren, *annexin b11* mRNA im zentralen Nervensystem nachweisbar ist (Abb. 3-5), könnte hieraus eventuell ein weiterer Zusammenhang zwischen Expression und Funktion der Annexine gedeutet werden. Um dies genauer zu beschreiben, wurden Augenimaginalscheiben aus Larven, in denen eine Reduktion von *annexin b10* bzw. *annexin b11^{long}*-Expression über die *repoGal4* Treiberlinie induziert worden war, gefärbt und konfokal analysiert.

Wie aus Tabelle 2 ersichtlich, erreichen sowohl *repo > annexin b10*-RNAi als auch *repo > annexin b11^{long}*-RNAi Tiere nicht das adulte Stadium, wobei dies temperaturabhängig ist. Nach Expression von *annexin b10*-RNAi bei 18 °C schlüpfen einige Fliegen, diese weisen keinen erkennbaren Pt auf. Um den mutanten Phänotyp zu beschreiben, wurden die Kreuzungen bei 25 °C bzw. 29 °C gehalten. Nach Reduktion der *annexin b11^{long}*-Expression in Gliazellen erreichen nur wenige Tiere überhaupt das dritte Larvenstadium und dies auch nur bei 18 °C.

Zur besseren Visualisierung von Zellen, in denen *annexin* Expression reduziert wird, wurde ein rekombinantes Chromosom generiert, das sowohl das *annexin b11^{long}*-RNAi #51- als auch ein CD8-GFP-Expressionskonstrukt trägt. Über diese Rekombinante wird in allen Zellen, in denen es zur Reduktion von *annexin b11^{long}* mittels RNAi kommt, gleichzeitig GFP exprimiert. Um sowohl die Gliazellen als auch die Photorezeptorzellen in den betreffenden Scheiben betrachten zu können, wurden die Augenimaginalscheiben mit anti-Repo (markiert Glia nuclei) und anti-HRP (markiert Neurone) gefärbt (Abb. 32-34). In einer wildtypischen Augenimaginalscheibe zeigt sich je nach Alter ein spezifisches Muster von Photorezeptorneuronen und Gliazellen (Abb. 32A, B). In der Entwicklung migrieren die Gliazellen vom optischen Stiel aus in die Augenimaginalscheibe ein. Die Termination dieser Migration erfolgt etwa drei bis vier Zellreihen hinter den sich entwickelnden Photorezeptorzellclustern (Abb. 32D). Annexin B11^{long} wird ubiquitär in der Augenimaginalscheibe exprimiert, vermehrt in Photorezeptorzellen (Abb. 32C). Auf den ersten Blick weicht das Bild, das sich in *repo > annexin b11^{long}*-RNAi Tieren ergibt, nicht stark vom Wildtypischen ab (Abb. 32E-H). Gliazellen, in denen *annexin b11^{long}* herabreguliert wird, sind über CD8-GFP markiert (Abb. 32F). Die Zahl der

Gliazellen ist leicht reduziert (Abb. 32E), die Neurone sind normal verteilt (Abb. 32G). In der Orthogonalansicht wird allerdings deutlich, dass es innerhalb des optischen Stiels zu Defekten während der Entwicklung gekommen ist. Die hier in grün dargestellten Gliazellen umschließen die Neurone nicht vollständig (Abb. 32H, 33). Der Phänotyp stellt sich insgesamt als sehr variabel dar, sodass gleiche Bedingungen zu unterschiedlichen Defekten führen können. In der in Abbildung 33 dargestellten Augenimaginalscheibe handelt es sich um einen typischerweise auftretenden Phänotyp, es fehlt eine große Anzahl an Gliazellen (Abb. 33A), die Vorhandenen sind nicht so stereotyp verteilt, wie es im Wildtyp der Fall ist. Der optische Stiel erscheint verbreitert und wiederum nicht umhüllt (Abb. 33D, Orthogonalansicht).

Die Reduktion der *annexin b10*-Expression unter der Kontrolle des *repoGal4* Treibers hat sich als extrem temperaturabhängig erwiesen. So ist im Fall der bei 25 °C gehaltenen Tiere kaum ein Phänotyp erkennbar (Abb. 34A-C). Anzahl und Lage der Gliazellen in Relation zu den Photorezeptorzellen sind normal. Erst nach Haltung auf 29 °C zeigen sich Defekte. Wie schon für *repo > annexin b11^{long}-RNAi* Tiere beschrieben, ist die Anzahl der Gliazellen reduziert (Abb. 34D). Die Form der Augenimaginalscheibe und des optischen Stiels ist normal (Abb. 34E, F). Insgesamt sind die Defekte auch bei 29 °C milder als für *repo > annexin b11^{long}* gezeigt.

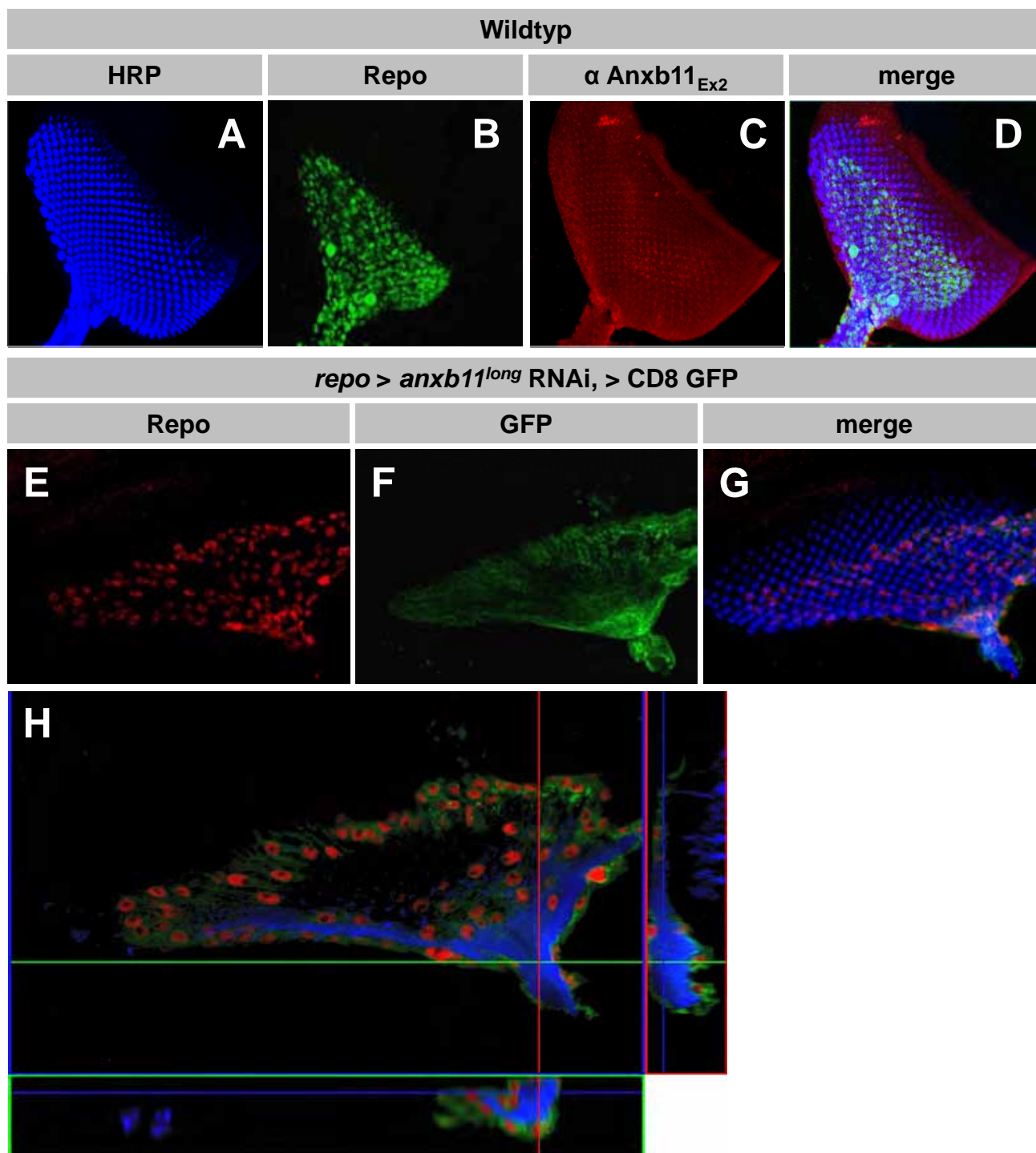


Abb. 32: Die Reduktion der *annexin* Expression verursacht Gliadefekte in der Augenimaginalscheibe

A-H Präparation von Augenimaginalscheiben einer Larve des dritten Larvenstadiums. Anterior ist oben. Konfokale Analyse des neuronalen Musters (anti-HRP blau) und der Glianuclei (anti-Repo). **A-D** Wildtyp. Die Gliazellen (**B**) sind in die Augenimaginalscheibe eingewandert. Die Termination der Migration erfolgt etwa drei bis vier Zellreihen hinter den sich entwickelnden Photorezeptorclustern (**A**). Annexin B11^{long} wird innerhalb der gesamten Scheibe exprimiert (**C**). **E-H** Eine Reduktion der Annexin B11^{long} Expression (GFP Expression, **F**) unter der Kontrolle des *repo*Gal4 Treibers führt zu variablen Defekten. Die hier dargestellte Scheibe spiegelt ein typisches Beispiel eines milden Phänotyps wider. Es sind weniger Glianuclei nachweisbar (**E**). Die Orthogonalansicht verdeutlicht Defekte im Umhüllen der Neurone (blau) durch die Gliazellen (grün) (**H**).

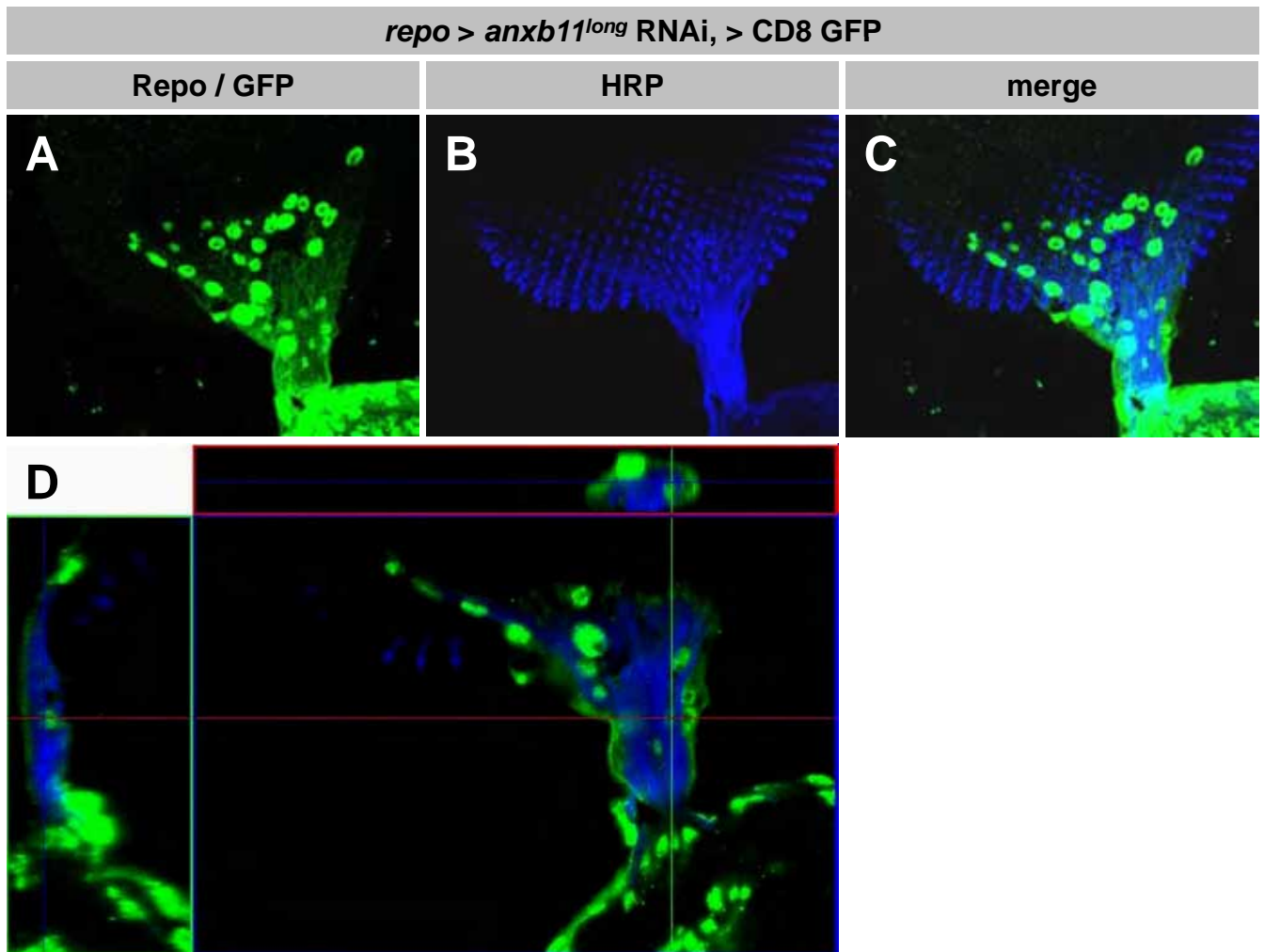


Abb. 33: Die Reduktion der *annexin* Expression verursacht variable Gliadefekte in der Augenimaginalscheibe

A-D Präparation von Augenimaginalscheiben einer Larve des dritten Larvenstadiums. Anterior ist oben. Konfokale Analyse des neuronalen Musters (anti-HRP blau) und der Glianuclei (anti-Repo grün). Eine Reduktion der Annexin B11^{long} Expression (GFP markiert **A**) unter der Kontrolle des *repoGal4* Treibers führt zu variablen Defekten. Die hier dargestellte Scheibe spiegelt ein typisches Beispiel eines stärkeren Phänotyps wider. Es sind deutlich weniger Glianuclei nachweisbar als im Wildtyp (**A**). Die Orthogonalansicht verdeutlicht im Bereich des optischen Stiels Defekte im Umhüllen der Neurone (blau) durch die Gliazellen (grün **D**).

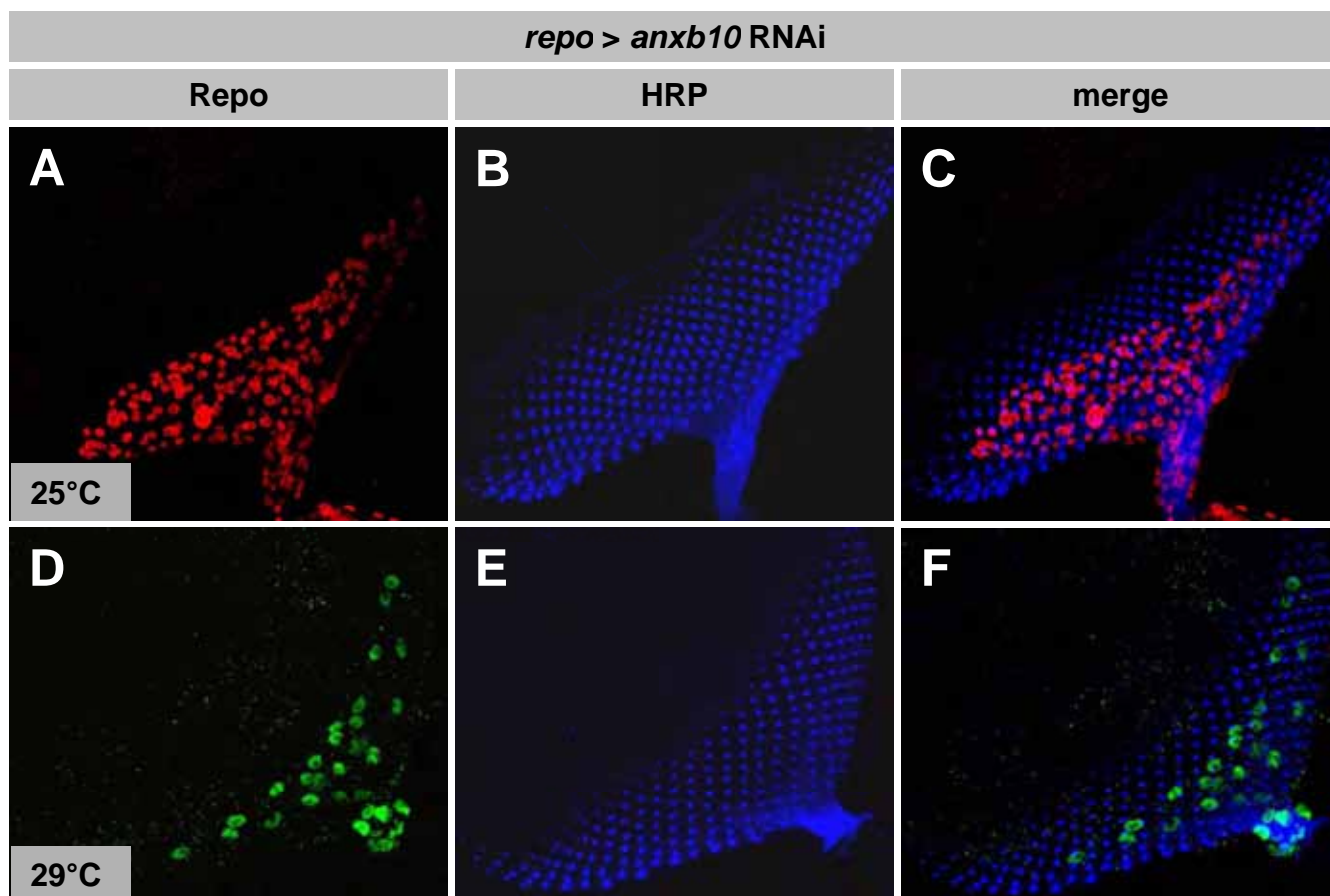


Abb. 34: Der *annexin b10* RNAi Phänotyp ist stark temperaturabhängig

A-F Präparation von Augenimaginalscheiben aus Larven des dritten Larvenstadiums. Anterior ist oben. Konfokale Analyse des neuronalen Musters (anti-HRP blau) und der Glianuclei (anti-Repo rot bzw. grün). Der mutante Phänotyp ist temperaturabhängig. **A-C** Nach Haltung auf 25°C sind sowohl Gliazellen als auch Photorezeptorneurone in wildtypischer Anzahl vorhanden und angeordnet. **D-F** Nach Haltung auf 29°C sind weniger Gliazellen in der Augenimaginalscheibe vorhanden.

3.5 Funktionelle Analyse von Annexin B11^{long}

3.5.1 Der durch *annexin b11^{long}*-RNAi hervorgerufene Phänotyp entsteht während der larvalen und pupalen Entwicklung von *Drosophila*

Um die Entstehung eines Phänotyps besser verstehen zu können, ist es wichtig, den Entstehungszeitraum genau zu definieren. Hieraus ergibt sich, wann ein bestimmtes Protein, in diesem Fall Annexin B11^{long} in der Entwicklung benötigt wird. Hierfür macht man sich eine Erweiterung des UAS Gal4 Systems zunutze, den Gal4 Repressor Gal80^{ts} (McGuire, Mao et al. 2004). Bei restriktiver Temperatur ist der Gal80 Repressor aktiv und unterdrückt die Gal4 vermittelte Transkription des gewünschten Gens, wohingegen ein Wechsel zur permissiven Temperatur den Repressor inaktiviert und die Expression aktiviert wird. Diese Übergänge können innerhalb weniger Stunden geschaltet werden und erlauben so eine räumlich-zeitlich kontrollierte Expression. Zu diesem Zweck wurden Gal80^{ts} transgene Fliegen gegen Tiere der Genotypen *en> annexin b11^{long}-RNAi* bzw. *GMR> annexin b11^{long}-RNAi* gekreuzt. Die Kreuzungen wurden jeweils nach dem Erreichen einer bestimmten Entwicklungsstufe (siehe Tab. 3) von 18 °C auf 29 °C (oder umgekehrt) umgestellt. Anschließend wurden die adulten Fliegen in Hinblick auf den erwarteten Phänotyp analysiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 zusammengefasst:

Tab. 3: Zeitliche Entstehung der *annexin b11^{long}*-RNAi Phänotypen.

Aufgeführt ist die Stärke des Phänotyps nach einem Temperaturwechsel von 18 °C auf 29 °C oder umgekehrt. Bei 18 °C wirkt der Faktor Gal80 als Repressor für Gal4. In den Zeilen 1 und 3 ist beschrieben, zu welchem Zeitpunkt der Entwicklung der Temperaturwechsel erfolgte. Es wurden Phänotypen analysiert, die nach Reduktion der Expression von *annexin b11^{long}* unter der Kontrolle der Treiber *enGal4* oder *GMRGal4* entstehen.

18 °C→29 °C	Embryo	L1 Larve	L2 Larve	L3 Larve	frühe Puppe	späte Puppe
Treiber> <i>anx b11^{long}-RNAi</i>	deutlicher Pt	deutlicher Pt	deutlicher Pt	deutlicher Pt	sehr schwacher Pt	kein Pt
29 °C→18 °C	Embryo	L1 Larve	L2 Larve	L3 Larve	frühe Puppe	späte Puppe
Treiber> <i>anx b11^{long}-RNAi</i>	kein Pt	kein Pt	deutlicher Pt	deutlicher Pt	deutlicher Pt	deutlicher Pt

Wie aus Tabelle 3 ersichtlich, kann man einen deutlichen Effekt in Bezug auf den Temperaturwechsel in bestimmten Entwicklungsstufen erkennen. Bei einem

Temperaturwechsel von 18 °C auf 29 °C wird zunächst funktionsfähiges Gal80 gebildet, das bei 29 °C inaktiviert wird. Je früher der Wechsel vollzogen wird, desto größer wird der Zeitrahmen, in dem die nachgeschalteten Gene über Gal4 aktiviert werden. Wird der Temperaturwechsel innerhalb der Stadien Embryo - L3 Larve vollzogen, bleibt ausreichend Zeit, die Expression der dsRNA zu induzieren. Folglich entsteht der beschriebene Phänotyp. Dies lässt für den umgekehrten Temperaturwechsel bestätigen. Werden Embryonen oder frühe Larven nur kurz bei 29 °C gehalten, dann aber auf 18 °C überführt, reicht die frühe Gal4 Dosis nicht aus, um den Phänotyp zu verursachen. Dies ließ sich gleichermaßen für den GMRGal4 und den *enGal4* Phänotypen zeigen. Die phänokritische Phase beginnt folglich in der larvalen Entwicklung und endet in der späten pupalen Phase. Wurde adulte Fliegen einer Temperaturänderung unterzogen, ergab sich keine von außen sichtbare Veränderung des Phänotyps.

3.5.2 *annexin b11^{long}*-RNAi führt zu vermehrtem Zelltod

Für alle untersuchten Gewebe entstehen, besonders im Hinblick auf die *annexin b11^{long}* Herabregulierung, schwere Zelldefekte innerhalb der Entwicklung. Für *annexin b10* gilt dies ebenfalls nach Reduktion unter der Kontrolle von *repoGal4*. Zellen, in denen *annexin b10* oder *b11^{long}*-Expression über RNAi vermindert wird, scheinen dies nicht zu überleben. Über das rekombinante Chromosom, das die Expressionskonstrukte für *annexin b11^{long}*-RNAi und CD8-GFP trägt, ist es möglich, die betroffenen Zellen direkt zu markieren. In Abbildung 35 ist eine Flügelimaginalscheibe dargestellt, in deren posteriorem Anteil (hier rechts) *annexin b11^{long}*-Expression reduziert wurde. Das GFP-Signal ist deutlich zu erkennen. Die Zellen wirken deformiert und in manchen Fällen scheinen sie zu kollabieren (Abb. 35, Pfeile). Dies kann für den erwarteten Zelltod sprechen.

Um dies direkt zu testen, wurden Acridinorange Färbungen an Flügel- und Augenimaginalscheiben vorgenommen. Bei Acridinorange handelt es sich um einen Fluoreszenzfarbstoff, der sowohl an DNA, als auch an RNA binden kann und folgend grün bzw. orange fluoresziert. In Vitalfärbungen wird er dazu genutzt, nicht intakte Zellen zu markieren. Acridinorange kann die Zellmembran nicht passieren, es kommt somit nur in verletzten, apoptotischen oder nekrotischen Zellen zu einer Färbung.

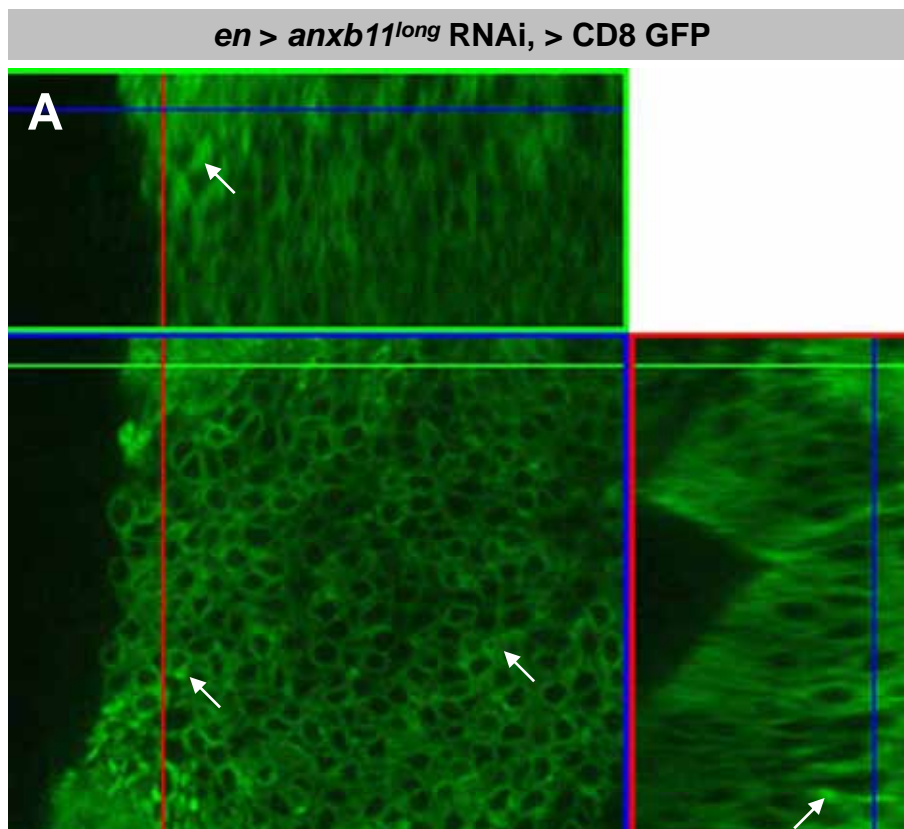


Abb. 35: Die Reduktion der *annexin b11^{long}* Expression führt zur Deformation der Zellen

A Flügelimaginalscheibe nach Koexpression von *annexin b11^{long}* dsRNA und CD8 GFP unter der Kontrolle des Treibers *engrailed* Gal4. Posterior ist rechts. In allen GFP positiven Zellen wurde die Annexin B11^{long} Expression reduziert. In der Aufsicht und der Orthogonalansicht ist eine Deformation der Zellstruktur zu erkennen. GFP positive Akkumulationen sind eventuell durch kollabierte Zellen entstanden (Pfeile **A**).

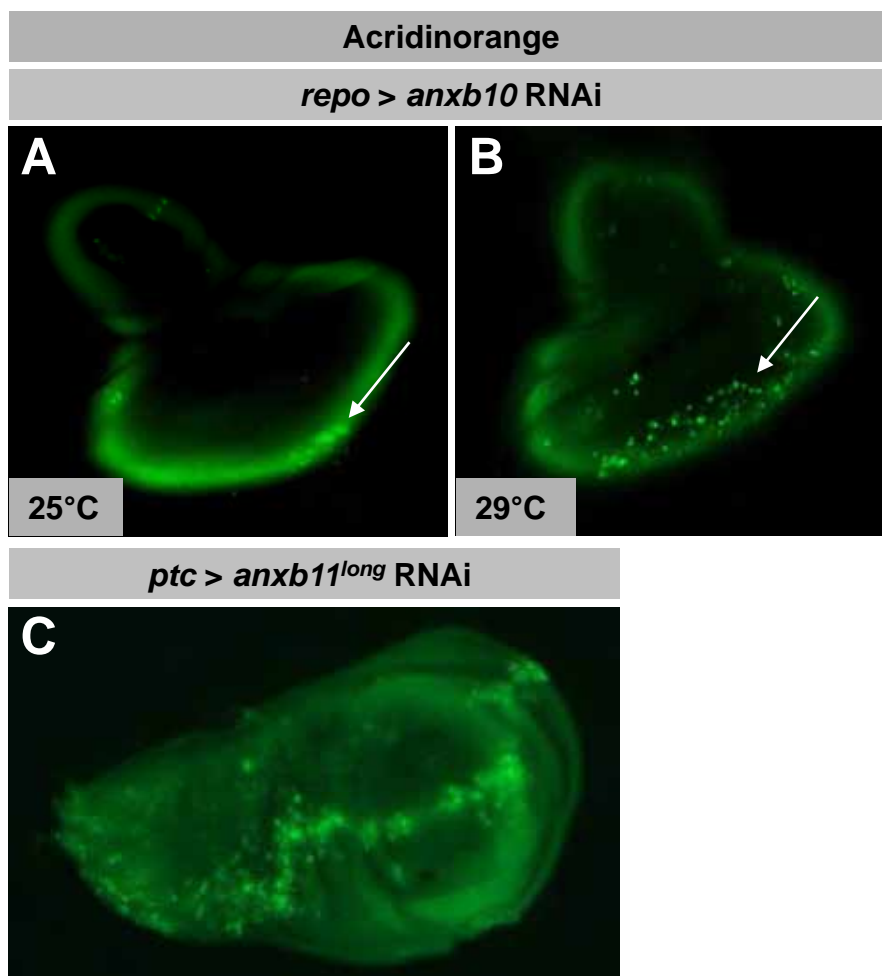


Abb. 36: Die Reduktion der *annexin* Expression führt zum Zelltod in der Imaginalscheibe

A Der *repo*Gal4 Treiber induziert die Expression der *annexin* dsRNA in der Augenimaginalscheibe. Im betreffenden Bereich lässt sich Zelltod nachweisen. Die Intensität des Phänotyps ist temperaturabhängig. Nach Haltung bei 25°C sterben deutlich weniger Zellen als nach Haltung bei 29°C (Pfeile **A**, **B**). **C** Der *ptc*Gal4 Treiber induziert die Expression der *annexin* dsRNA in einem Streifen entlang der antero-posterioren Kompartimentgrenze. Innerhalb dieser Domäne wird Zelltod induziert.

Acridinorange wird deshalb als Zelltod Marker verwendet. Flügelimaginalscheiben aus *ptc> annexin b11^{long}*-RNAi Tieren und Augenimaginalscheiben aus *repo> annexin b11^{long}*-RNAi Tieren wurden über Acridinorange gefärbt. In den Domänen, in denen es unter der Kontrolle des jeweiligen Treibers zur Reduktion der *annexin b11^{long}*-Expression gekommen ist, ergibt sich ein Signal (Abb. 36). Es kann, wie für die Phänotypen gezeigt, in der Stärke variieren (vgl. Abb. 36A, B). Trotzdem zeigt sich ganz deutlich, dass genau in dem Bereich, in dem *annexin b11^{long}* herabreguliert wird, Zelltod eintritt (Abb. 36A-C).

3.5.3 Der *annexin b11^{long}*-RNAi Phänotyp beruht auf Apoptose

Die beschriebenen Defekte der Augen- bzw. Flügelgröße nach Reduktion von *annexin b11^{long}*-Expression in der Entwicklung dieser Gewebe deutet auf einen Defekt in der Proliferation und/oder dem Überleben der Zellen hin. Acridinorange Färbungen konnten bereits zeigen, dass es zum vermehrten Zelltod kommt. Um den Effekt der kontrollierten Apoptose in diesem Zusammenhang beschreiben zu können, wurde dieser sowohl über Caspase 3 Färbungen als auch über Rettungsexperimente genauer betrachtet.

Dazu wurde getestet, ob sich das Absterben der Zellen durch Apoptose Inhibitoren abschwächen lässt und man die Apoptose über den Nachweis von aktivierter Caspase 3 bestätigen kann. In *Drosophila* wird Apoptose über die Interaktion der Proteine DIAP1 (*Drosophila* inhibitor of apoptosis), Dronc (*Drosophila* Nedd2 like caspase) und Drice (*Drosophila* Interleukin-1 β -converting enzyme) gesteuert. Bei Dronc und Drice handelt es sich um Caspasen, wobei Dronc als Initiator Caspase wirkt und durch Spaltung Drice aktiviert (Fraser and Evan 1997; Fraser, McCarthy et al. 1997; Meier, Silke et al. 2000; Hay and Guo 2006). Dronc und Drice wirken also Apoptose fördernd, während DIAP1 als Inhibitor von Drice und folglich inhibierend auf Apoptose wirkt (Abb. 37A) (Hay and Guo 2006). Sowohl durch die ektopische Expression eines dominant negativ wirkenden Dronc Proteins als auch über die Überexpression von DIAP1 sollte die Induktion von Apoptose im Gewebe verringert werden. Gleiches gilt auch für die Expression eines generellen Apoptose Inhibitors, des Baculovirus (*Baculovirus Autographa californica*) p35 Proteins. Hierbei handelt es sich um einen Caspase Inhibitor, für den gezeigt werden konnte, dass er in *Drosophila* in der Lage ist, Apoptose zu verhindern (Hay, Wolff et al. 1994; Asano,

Nevins et al. 1996; Grewal, Li et al. 2005; Hay and Guo 2006; Lannan, Vandergaast et al. 2007).

Ist Annexin B11^{long} an der Regulation von Apoptose beteiligt, sollten die absterbenden Zellen im dsRNA exprimierenden Gewebe durch die Expression eines Apoptoseinhibitors gerettet werden. Hierfür wurden jeweils UAS p35, UAS DIAP1 oder UAS Dronc^{DN} transgene Fliegen gegen GMR> *annexin b11^{long}*-RNAi Tiere gekreuzt und die Augen der adulten Nachkommen analysiert. Es zeigt sich, dass der Phänotyp deutlich abgeschwächt werden kann (Abb. 37). Im Vergleich zum GMR> *annexin b11^{long}*-RNAi Phänotyp (Abb. 37C) ergibt sich nach Koexpression mit einem der Apoptoseinhibitoren eine Verbesserung der Augenstruktur (Abb. 37E-G). Es lassen sich wieder einzelne Ommatidien unterscheiden. Die Überexpression von DIAP1 erzeugt den schwächsten Effekt (Abb. 37F). Der generelle Apoptose Inhibitor p35 führt im Hintergrund der *annexin b11^{long}* dsRNA-Expression zu einer fast vollständigen Rettung zum wildtypischen Bild. Die Augen sind lediglich etwas kleiner und rauer als im Wildtyp (Abb. 37E). Dass es sich dabei nicht um einen unspezifischen Effekt durch das Einkreuzen eines weiteren Expressionskonstruktes handelt, belegt Abbildung 37D. Die Expression von CD8-GFP führt zu keinerlei Rettung.

Da sich der Augenphänotyp als variabel und temperaturabhängig herausstellte, wurde versucht, den stabileren Flügelphänotyp, verursacht durch Expression von *annexin b11^{long}*-dsRNA unter der Kontrolle des *enGal4* Treibers, für die gleichen Rettungsversuche zu nutzen. Wenn Annexin B11^{long} verschiedene Aufgaben erfüllt, ist es vorstellbar, dass zwar z. B. der Apoptose Effekt gerettet werden kann, aber ein anderer Defekt in Polarität, Zellteilung oder Ähnlichem bestehen bleibt. Hierfür wurden wieder jeweils UAS p35, UAS DIAP1 oder UAS Dronc^{DN} transgene Fliegen gegen *en> annexin b11^{long}*-RNAi Tiere gekreuzt. Anschließend wurden die Flügel der adulten Fliegen untersucht. Dabei ergab sich prinzipiell das gleiche Bild, wie es für die Rettung des Augenphänotyps beschrieben wurde. Die Expression aller Konstrukte führt zu einer Rettung des Phänotyps (Abb. 38). Die Flügelform und Struktur sehen deutlich verbessert aus. Erneut zeigt die Koexpression von p35 den stärksten Rettungseffekt (Abb. 38C). In der Vergrößerung wird deutlich, dass nicht nur die Flügelform gerettet werden kann, sondern auch die Orientierung der Haare. Sie entspricht fast vollständig dem Wildtyp. Lediglich der Bereich um die posteriore Quervene zeigt noch leichte Defekte (Abb. 38C').

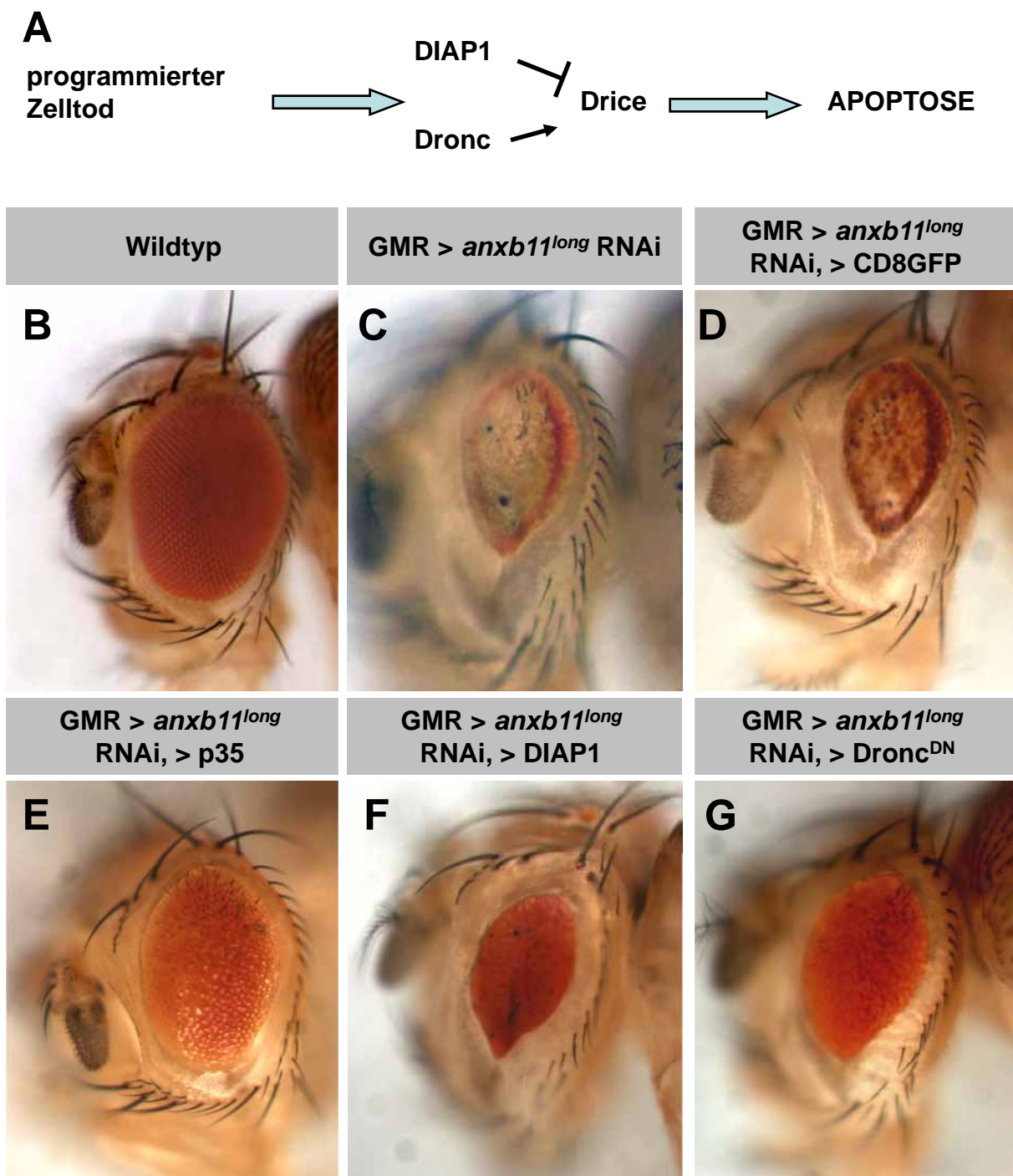


Abb. 37: Der *annexin b11^{long}* RNAi Augenphänotyp lässt sich durch Koexpression von Apoptoseinhibitoren retten

A Schematische Darstellung des zellulären Mechanismus zur Induktion von kontrollierter Apoptose. **B-G** Adulte Augen von lateral; dorsal ist oben. **B** Wildtyp **C** Die Reduktion der Annexin B11^{long} Expression unter der Kontrolle des GMRGal4 Treibers führt zu starken Zelldefekten. Die Zellen sind nekrotisch. **D** Die Koexpression von CD8 GFP hat keinen Effekt, der Phänotyp ist also nicht Gal4 dosisabhängig. **E-G** Nach Koexpression von p35 (**E**), DIAP1 (**F**) oder Dronc^{DN} (**G**) wird der Phänotyps deutlich abgeschwächt. Die Augen sind größer. Es lassen sich wieder einzelne Ommatidien unterscheiden. Die Koexpression von p35 hat dabei den stärksten rettenden Effekt (**E**).

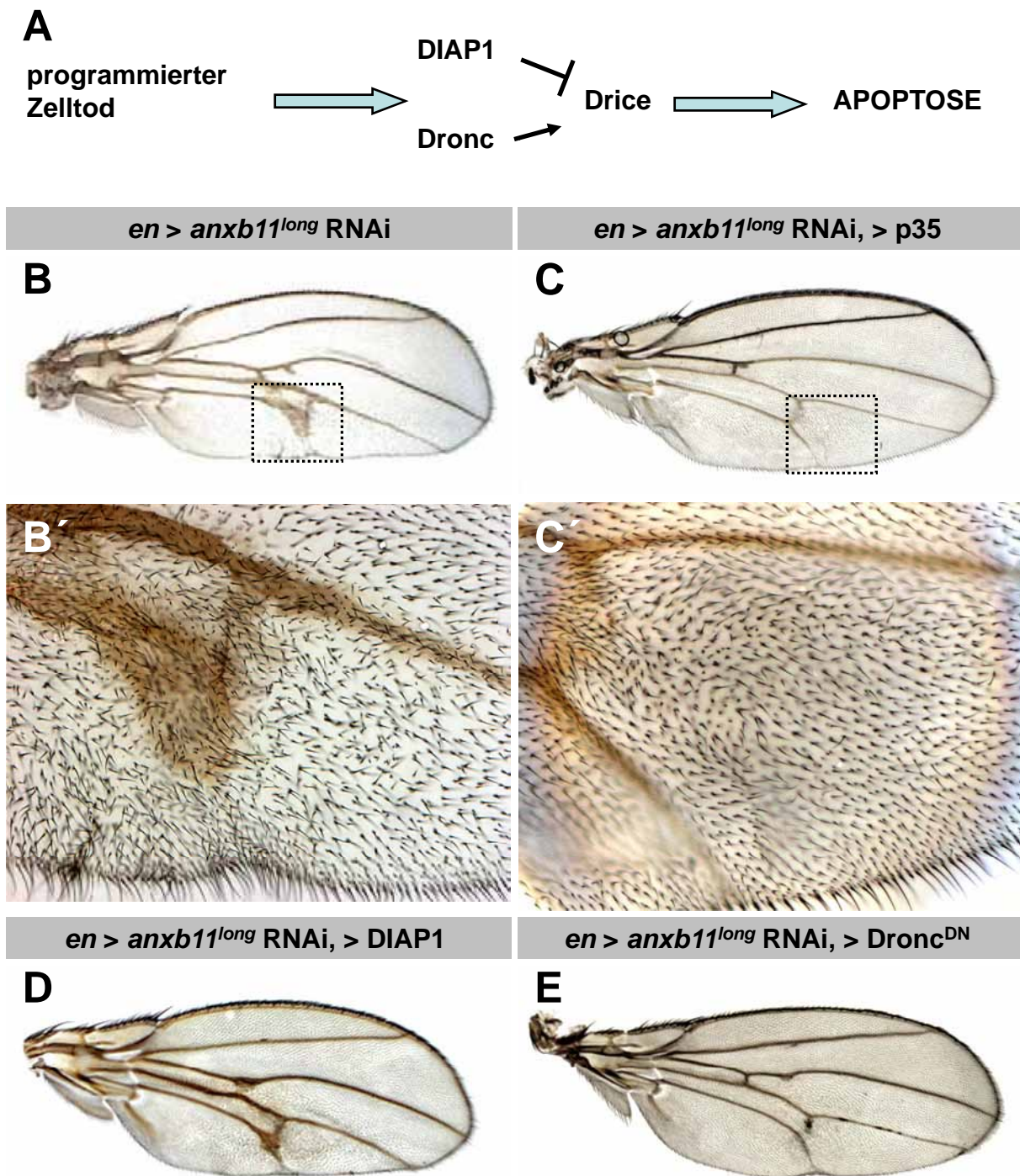


Abb. 38: Der Flügeldefekt beruht ebenfalls auf Apoptose

A Schematische Darstellung des zellulären Mechanismus zur Induktion von kontrollierter Apoptose. **B-E** Adulte Flügel; anterior ist oben. **B** Die Reduktion der Annexin B11^{long} Expression unter der Kontrolle des *enGal4* Treibers führt zu starken Zelldefekten. Es fehlen Zellen, das stereotype Haarmuster ist gestört (**B'**). **C-E** Nach Koexpression von p35 (**C**), DIAP1 (**D**) oder Dronc^{DN} (**E**) zeigt sich eine deutliche Verbesserung des Defekts. Der Flügel ist wieder normal geformt. Die posteriore Quervene wird fast vollständig ausgebildet. Die Koexpression von p35 hat den stärksten rettenden Effekt (**C**). Hier ist die uniforme Ausrichtung der Haare fast vollkommen wieder hergestellt (**C'**).

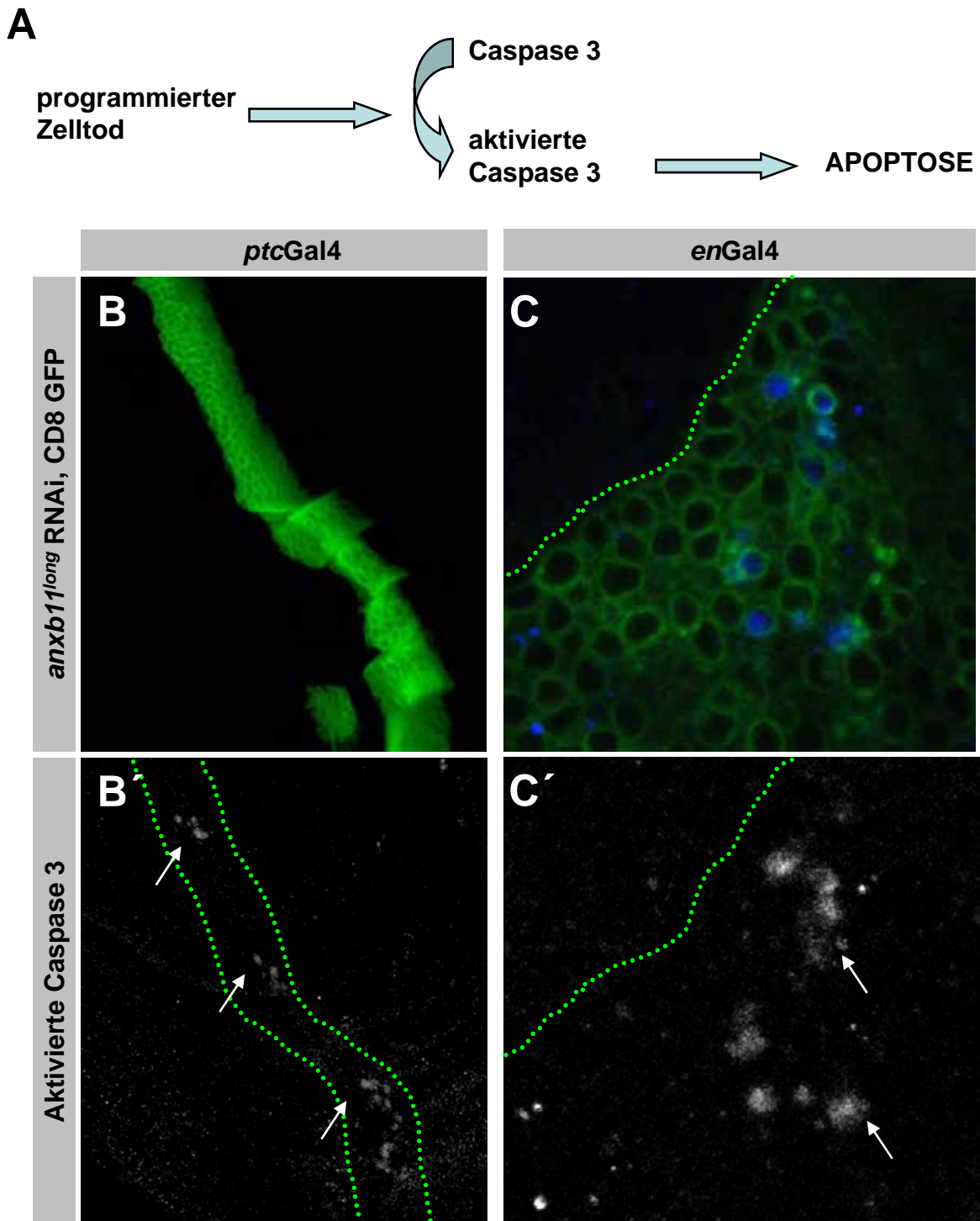


Abb. 39: Als Folge der Expression von *annexin b11^{long}* dsRNA lässt sich aktivierte Caspase 3 nachweisen

A Schematische Darstellung des zellulären Mechanismus zur Induktion von kontrollierter Apoptose durch die proteolytische Spaltung der Caspase 3. **B** Nach Reduktion der Annexin B11^{long} Expression unter der Kontrolle des *ptcGal4* Treibers ergibt sich im betreffenden Bereich (**B** GFP positiv) ein Caspase 3 Signal (Pfeile **B'**). **C** Entsprechendes gilt auch für die Reduktion der Annexin B11^{long} Expression unter der Kontrolle des *enGal4* Treibers (**C**). Die betroffenen Zellen sind Caspase 3 positiv (Pfeile **C'**).

Um diese Ergebnisse durch Färbungen im Gewebe zu bestätigen, wurden Flügelimaginalscheiben aus Larven der Genotypen *ptc > annexin b11^{long}-RNAi* und *en > annexin b11^{long}-RNAi* auf Caspase 3 Signal hin untersucht. Hierbei handelt es sich um die gespaltene und somit aktivierte Form der Caspase 3, die zwingend die Apoptose der Zelle einleitet (Hay and Guo 2006). Die Ergebnisse sind in Abbildung 37 dargestellt. Es zeigt sich, dass genau in den Bereichen, in denen es zur Reduktion der *annexin b11^{long}*-Expression kommt, ein Caspase 3 Signal detektierbar ist (Abb. 39, Pfeile).

Als Hintergrund für die beschriebenen Phänotypen liegt demnach kontrollierte Apoptose vor. Die Ursache dafür kann vielfältig begründet sein, so wird innerhalb der Zelle bedingt durch unterschiedliche Defekte in Zellteilung, Polarität oder Physiologie Apoptose zum Schutz der Nachbarzellen induziert. Worauf dies im vorliegenden Fall beruht, ist nicht bekannt, auf mögliche Faktoren wird in den folgenden Abschnitten eingegangen.

3.5.4 Die planare Zellpolarität ist im *annexin b11^{long}-RNAi* Hintergrund nicht beeinträchtigt

Da Annexine bereits mit epithelialer Zellpolarität in Verbindung gebracht wurden, sollte untersucht werden, ob es im RNAi-Hintergrund zu Fehlverteilungen von Polaritätsmarkern und als Konsequenz zu Apoptose kommt.

Im adulten Flügel manifestiert sich die Formation der planaren Zellpolarität durch das stereotype Muster der Flügelhaare. Alle Haare entstehen im distalen Bereich der Zellen und zeigen von proximal nach distal (Wasserscheid, Thomas et al. 2007). Die Grundlage dieses Musters wird innerhalb der pupalen Entwicklung gelegt. Dafür muss innerhalb der Zelle zunächst eine klare Polarität festgelegt werden, folgend muss diese erkannt und interpretiert werden. Daran beteiligt ist eine Vielzahl von Proteinen. Eines dieser Proteine ist das Transmembranprotein Flamingo. Dieses ist zunächst apikolateral zu finden und konzentriert sich ca. 33 Stunden nach Bildung der Puppe an der distalen Zellmembran (Wasserscheid, Thomas et al. 2007).

Über Flamingofärbungen von *en > annexin b11^{long}-RNAi*, CD8-GFP Tieren lässt sich innerhalb des pupalen Flügels das wildtypische Bild mit dem mutanten vergleichen. Zusätzlich wird die Bildung der Flügelhaare über eine Aktinfärbung verfolgt. Die Aktinstruktur sieht in diesem Entwicklungsstadium (33 Stunden nach Verpuppung) noch normal aus (Abb. 40A-F). Es sind keine offensichtlichen Lücken oder Defekte

im Flügel erkennbar, die Haarorientierung ist vollkommen wildtypisch. Auch die Analyse der Flamingo Lokalisation im Hintergrund der Reduktion der *annexin b11^{long}*-Expression (GFP-positiv) zeigt keine Veränderung im Vergleich zur anterioren Region mit normalem Annexin B11^{long}-Gehalt (Abb. 40G-I). Zu diesem Zeitpunkt ist der Phänotyp die Haare betreffend folglich noch nicht festgelegt. Später sterbende Zellen müssen zu dem chaotischen Bild der Zell- und Haarorientierung im adulten Flügel von *en> annexin b11^{long}*-RNAi Tieren führen.

3.5.5 Die Reduktion von *annexin b11^{long}* in der Zelle ändert nicht die Verteilung von Membranmarkern

Die Lokalisation des Annexin B11^{long}-Proteins zeigte interessante Besonderheiten, so liegt es an der apikalen Zellmembran und an Zell-Zell-Kontakten vor. In Abschnitt 3.3.2 wurde bereits gezeigt, dass die Überexpression von Annexin B11^{long} zu keiner Veränderung der Lokalisation verschiedener Marker führt. Dementsprechend soll dies auch für die Situation nach Reduktion von Annexin B11^{long} untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden Flügelimaginalscheiben aus Larven, in denen unter der Kontrolle der *enGal4* oder *ptcGal4* Treiber die Reduktion der *annexin b11^{long}*-Expression induziert wurde, mit den schon beschriebenen Antikörpern gefärbt. Die betroffenen Zellen sind durch GFP markiert.

Aus Abbildung 41 wird deutlich, dass auch nach Reduktion von *annexin b11^{long}* die Lokalisation der Marker nicht beeinflusst wird. Für Crumbs, Armadillo und Discs large ergibt sich im GFP-markierten, Annexin B11^{long} reduzierten Bereich dasselbe Bild wie im angrenzenden wildtypischen Anteil (Abb. 41A-F).

Das Gleiche gilt auch für eine Phalloidin Färbung. F-Aktin scheint in seiner Lokalisation nicht verändert vorzuliegen, wenn *annexin b11^{long}*-Expression herabreguliert wird (Abb. 42). Dies bestätigt die Ergebnisse aus den Färbungen pupaler Flügel.

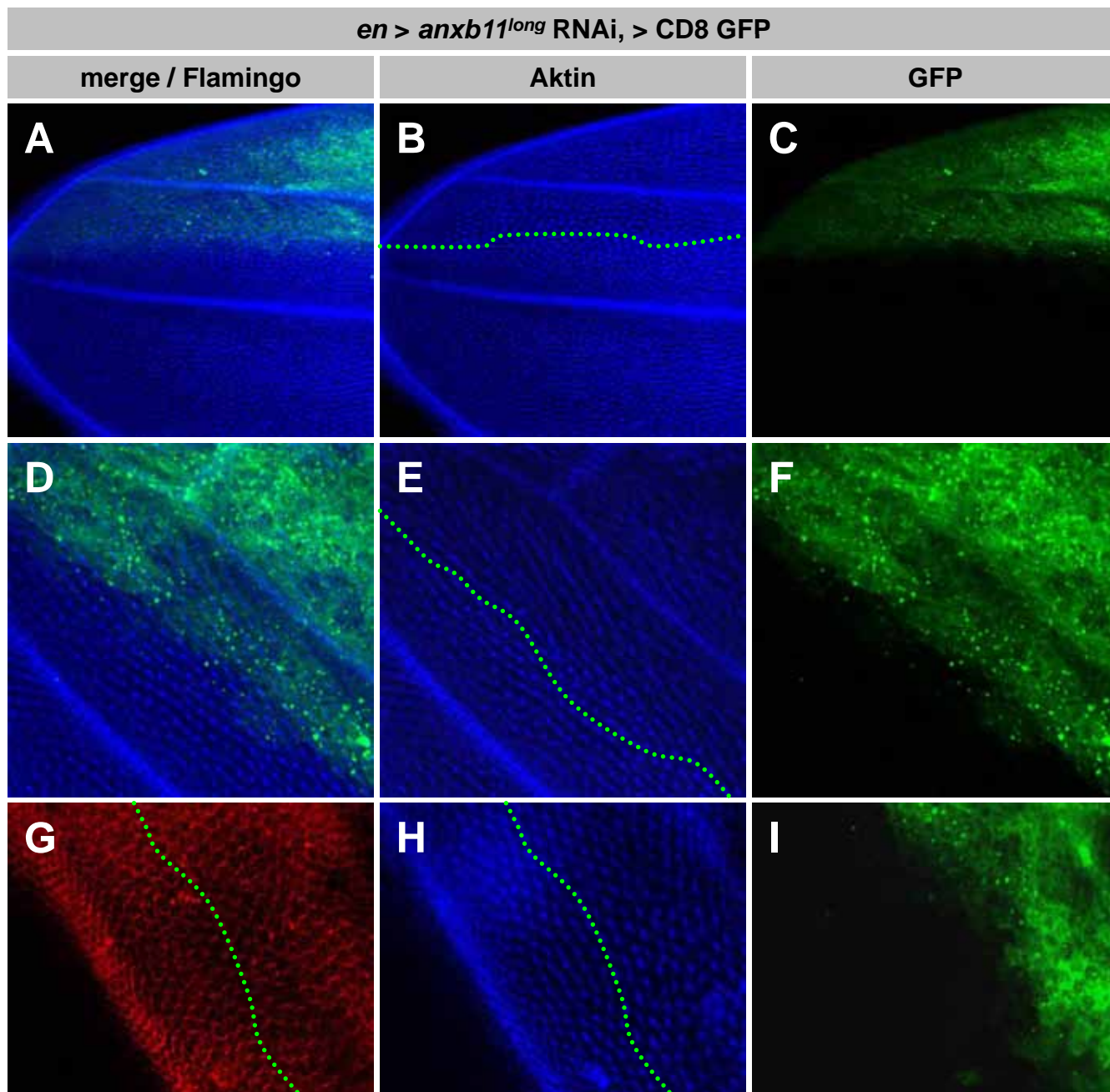


Abb. 40: In pupalen Flügeln zeigt sich nach Reduktion der *annexin b11^{long}* Expression kein Polaritätsdefekt

A-I Präparation pupaler Flügel, 33 Stunden nach Formation der Puppe. Posterior ist oben. Zellen, in denen die Annexin B11^{long} Expression reduziert wurde, sind GFP markiert. F-Aktin Strukturen der Haare wurden über Phalloidin (blau) visualisiert. **A-C** F-Aktin liegt auch im posterioren Anteil des Flügels normal verteilt vor. **D-F** Eine Detailansicht aus **A-C** macht deutlich, dass die planare Zellpolarität und die Organisation des F-Aktins nicht beeinträchtigt werden. In diesem Stadium der Entwicklung liegt noch kein offensichtlicher Phänotyp vor. **G-I** Auch der Marker für planare Zellpolarität Flamingo ist nach Herabregulation der Annexin B11^{long} Expression normal verteilt (**G**).

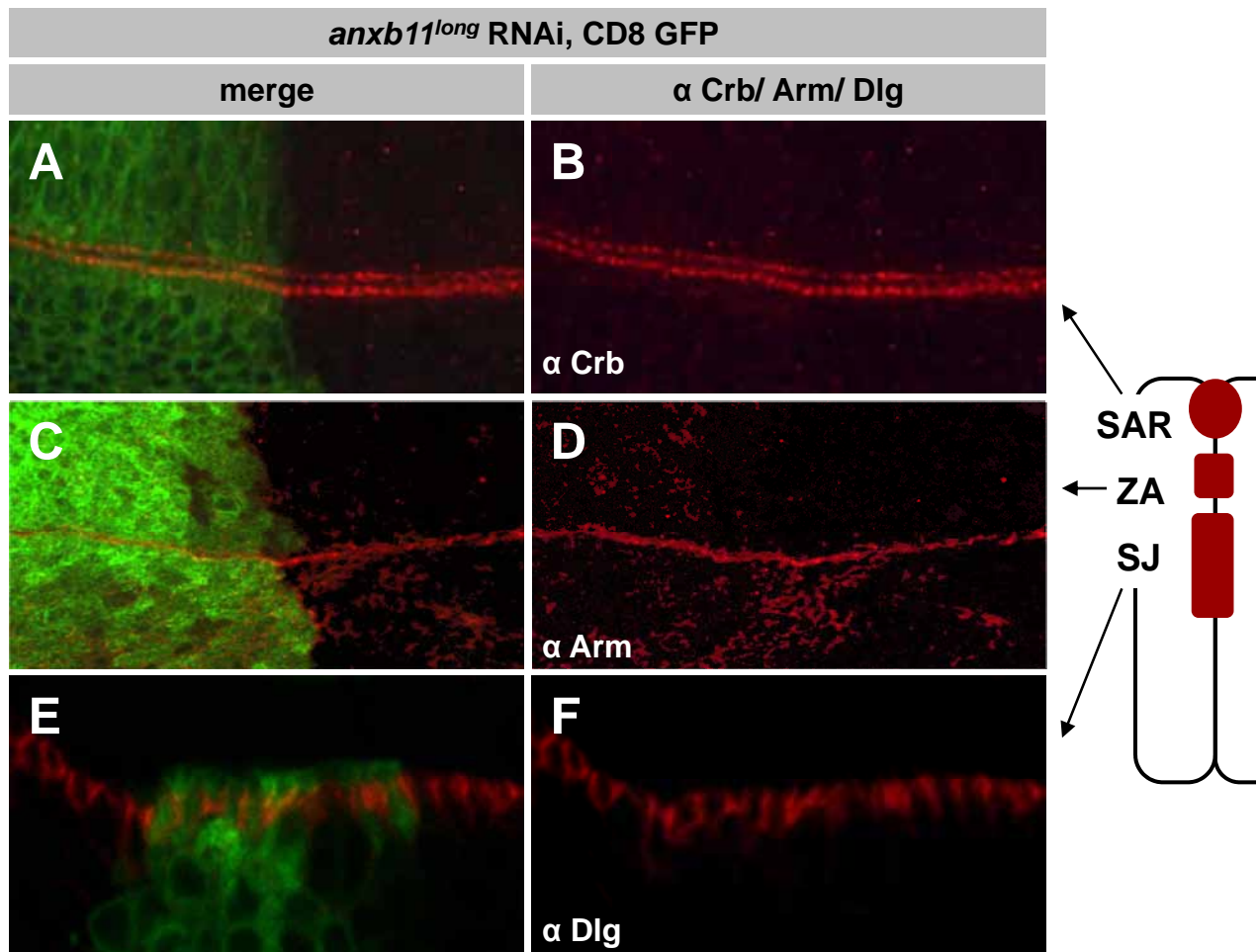


Abb. 41: Die Lokalisation von Polaritätsmarkern wird durch *annexin b11^{long}* RNAi nicht beeinflusst

A-F Die Expression der *annexin b11^{long}* dsRNA in Flügelimaginalscheiben wurde mittels *enGal4* induziert. CD8 GFP wurde koexprimiert. Diese Zellen zeigen keine Fehllokalisierung von Crb (A, B), Armadillo (Arm C, D) oder Discs large (Dlg E, F).

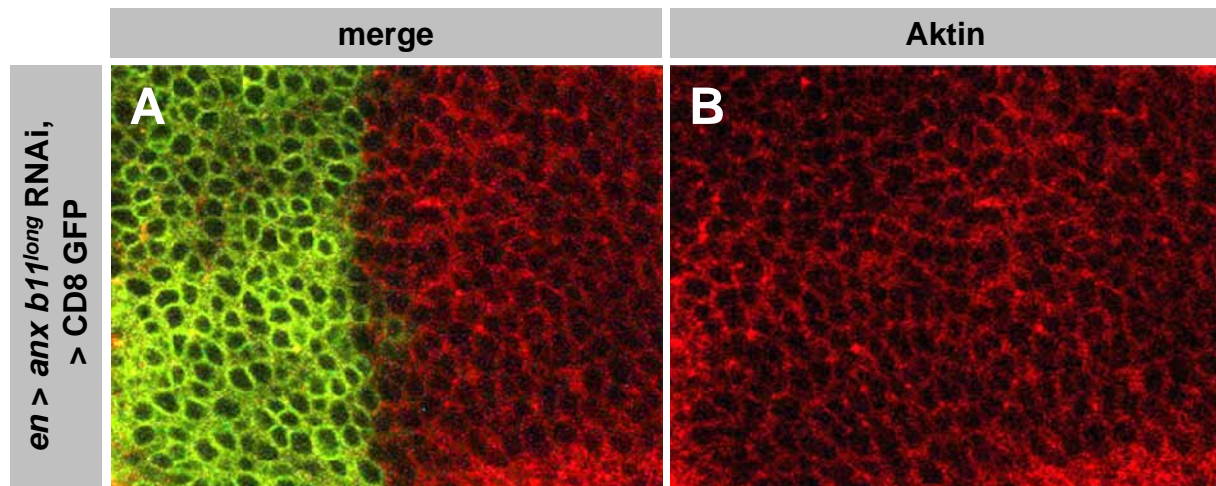


Abb. 42: *annexin b11^{long}* RNAi führt zu keiner Fehlverteilung von F-Aktin

A-B Die Expression der *annexin b11^{long}* dsRNA in Flügelimaginalscheiben wurde mittels *enGal4* induziert. CD8 GFP wurde koexprimiert. F-Aktin wurde über Phalloidin visualisiert. Die Organisation und Verteilung von F-Aktin wird nicht beeinflusst.

3.5.6 Spectrine lokalisieren auch im *annexin b11^{long}*-RNAi Hintergrund wildtypisch

Wie in Abschnitt 3.3.5 beschrieben, deuten die Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen darauf hin, dass es einen Zusammenhang von Annexinen und dem Spectrin-Zytoskelett gibt (Kamal, Ying et al. 1998; Williams 2005). Da gezeigt werden konnte, dass die Reduktion von *annexin b9* in diesem Zusammenhang einen durch β_{heavy} -Spectrin Überexpression verursachten Phänotyp abschwächen kann, sollte auch der *annexin b11^{long}*-RNAi Phänotyp in Bezug auf Spectrine untersucht werden. Es sollte herausgestellt werden, ob es im Hintergrund der Reduktion von *annexin b11^{long}* zu Veränderungen der Proteinlokalisationen von α -Spectrin, β -Spectrin oder β_{heavy} -Spectrin kommt. Nach entsprechenden Antikörperfärbungen von Flügelimaginalscheiben aus *en> annexin b11^{long}*-RNAi Tieren wurden diese konfokal analysiert. In Abbildung 43 ist zu sehen, dass auch Spectrine nach *annexin b11^{long}* Reduktion nicht anders verteilt in der Zelle vorliegen. Mit den Ergebnissen aus Abschnitt 3.3.5 lässt sich somit zeigen, dass die Expressionsstärke von Annexin B11^{long} keinen Einfluss auf die Spectrine ausübt.

3.5.7 Die Zellteilung wird durch *annexin b11^{long}*-RNAi nicht beeinflusst

Annexin A11 wurde im Zusammenhang mit Zellteilungsprozessen beschrieben (Tomas, Futter et al. 2004). Kommt es in diesem Zusammenhang zu Defekten, können sich die Tochterzellen nicht mehr korrekt voneinander trennen und gehen Apoptose ein (siehe Einleitung). Um zu testen, ob das *Drosophila*-Annexin B11^{long}-Protein auch Einfluss auf die Zellteilungsprozesse nimmt, sollten die Kerne der sich teilenden Zellen markiert werden. So lässt sich verfolgen, ob im *annexin b11^{long}*-RNAi Hintergrund mehrkernige Zellen entstehen. Dazu wurde RFP markiertes Histon2B mit *en> annexin b11^{long}*-RNAi, CD8-GFP in Flügelimaginalscheiben koexprimiert. Diese wurden anschließend konfokal analysiert. Hierbei sind Zellen zu erkennen, die starkes GFP-Signal aufweisen. In diesen wurde die *annexin b11^{long}*-Expression reduziert (Abb. 44D, Pfeil). Trotzdem enthalten auch diese Zellen nur einen Kern (Abb. 44E, F). Insgesamt ergeben sich keine mehrkernigen Zellen in der gesamten Scheibe (Abb. 44A-C). RFP-positive Strukturen werden von einer GFP-markierten Membran umgeben (Pfeile in Abb. 44D-F). Es liegt folglich kein Zellteilungsdefekt nach Reduktion der *annexin b11^{long}*-Expression vor.

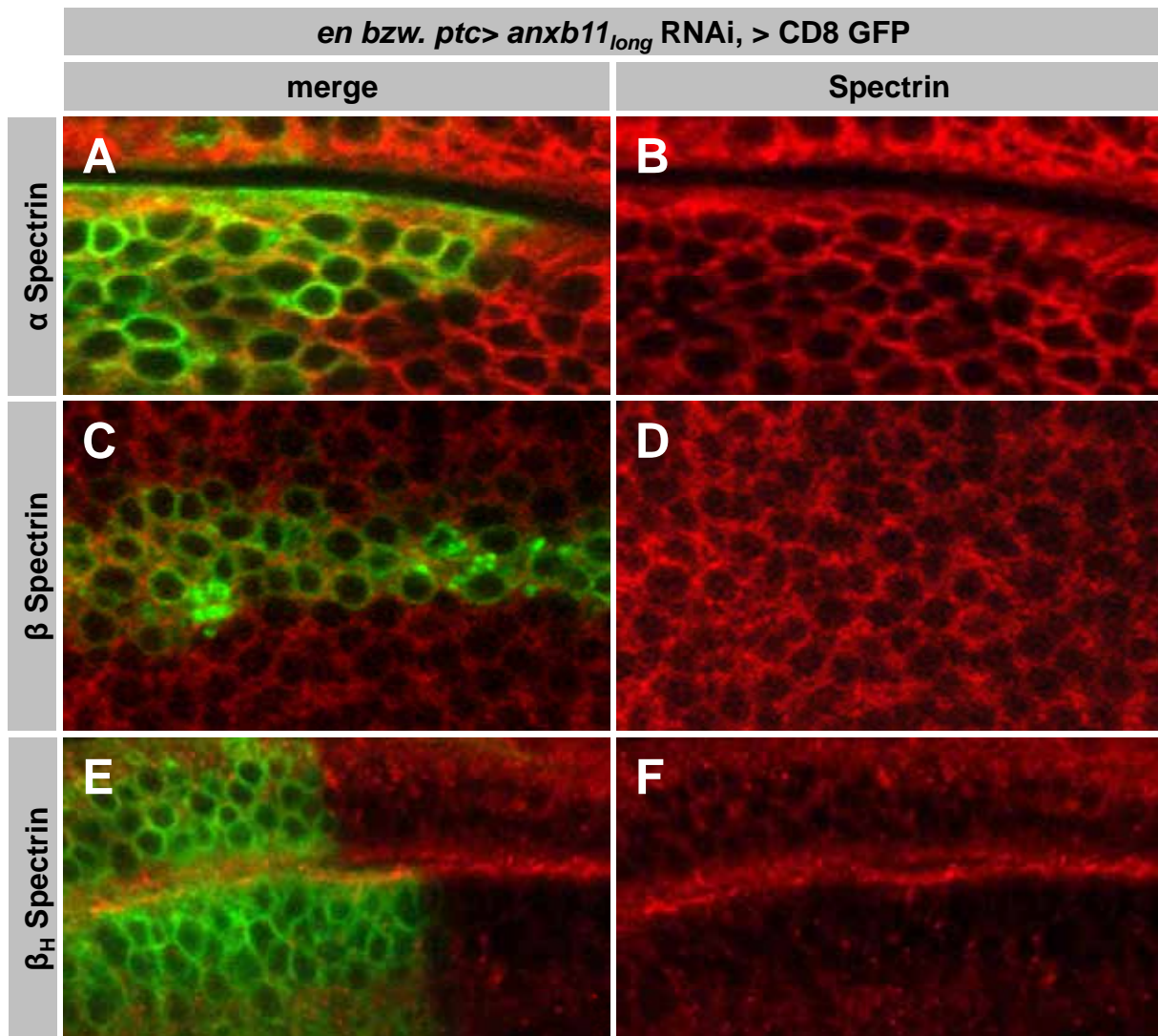


Abb. 43: *annexin b11^{long}* RNAi führt zu keiner Fehlverteilung von Spectrinen in der Zelle

A-F Die Expression der *annexin b11^{long}* dsRNA in Flügelimaginalscheiben wurde mittels *enGal4* (**A, E**) bzw. *ptcGal4* (**C**) induziert. CD8 GFP wurde koexprimiert. Zusätzlich Färbung über die α - (**A, B**), β - (**C, D**), β_H - (**E, F**) Spectrin Antikörper. Die Lokalisation und Organisation aller betrachteten Spectrine zeigt keinerlei Veränderung nach Reduktion der Annexin B11^{long} Expression.

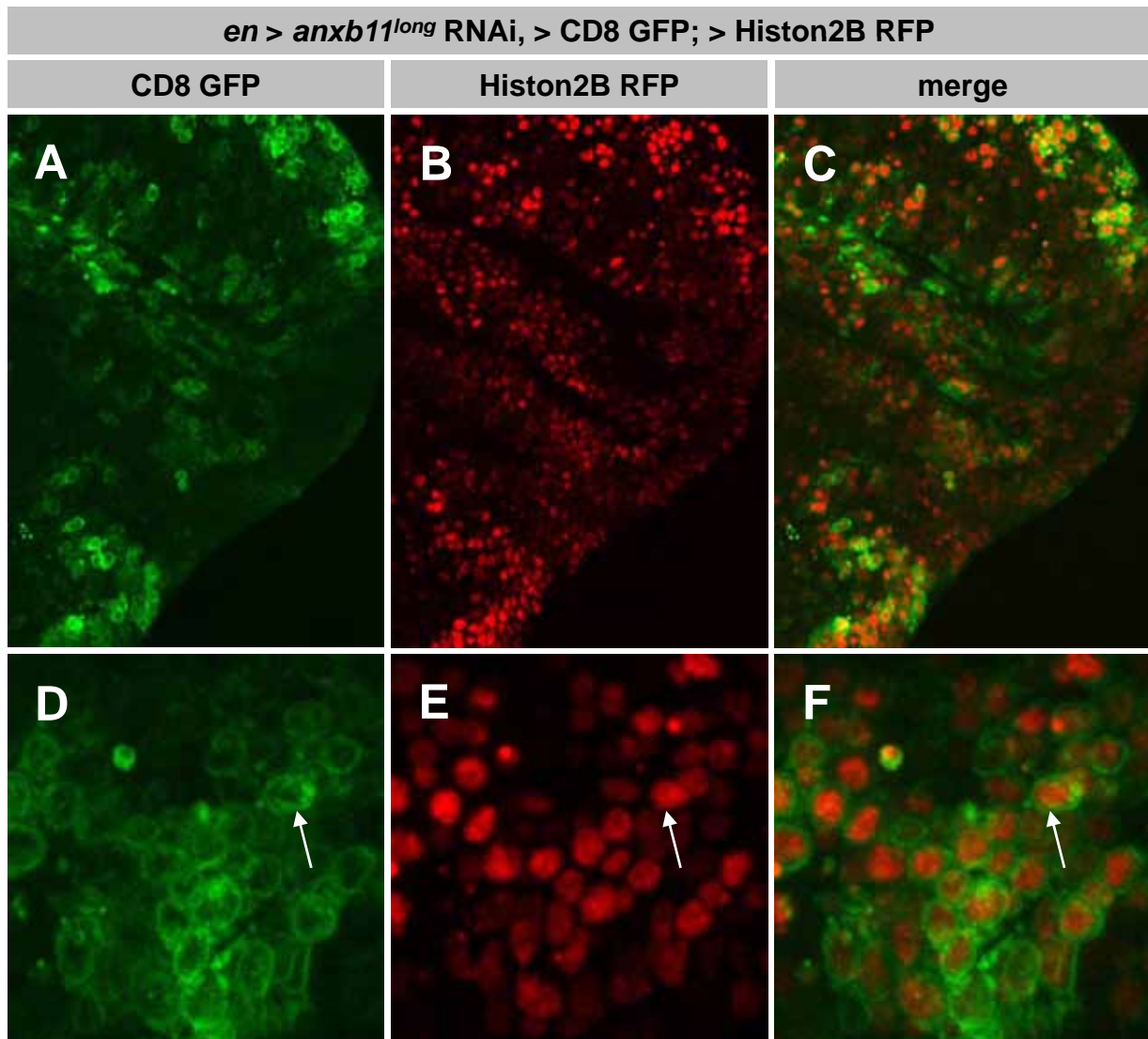


Abb. 44: Die Zellteilung ist nach der Expression von *annexin b11^{long}* dsRNA nicht gestört

A-F Die Expression der *annexin b11^{long}* dsRNA in Flügelimaginalscheiben wurde mittels *enGal4* induziert. CD8 GFP und Histon2B mRFP wurden koexprimiert. **A-C** Es treten keine mehrkernigen Zellen auf. **D-F** In der Detailansicht wird deutlich, dass alle Kerne von einer Membran umgeben werden (Pfeile **D-F**).

3.5.8 Der beschriebene Phänotyp lässt sich nicht über die Dynamin Mutante *shibire* modifizieren

Im Abschnitt 3.3.4 wurde bereits auf Kollokalisationsstudien eingegangen. Daraus ergab sich, dass sich die Annexin B11^{long}-positiven Strukturen nicht als Rab- oder Clathrin-GFP-positiv nachweisen ließen. Um auch auf dem genetischen Wege zu untersuchen, ob es einen Zusammenhang zwischen Endozytose und Annexin B11^{long} gibt, sollte über die temperatursensitive Dynamin Mutante *shibire* eine Rettung bzw. Verstärkung des Augen- (GMRGal4) bzw. Flügel- (*en*Gal4) Phänotyps erreicht werden.

Der benutzte *shibire* Stamm trägt ein Überexpressionskonstrukt, über das es möglich ist, funktionsfähiges Dynamin ektopisch zu exprimieren. Ändert man die permissive Temperatur folgend von 18 °C auf 29 °C, kommt es durch Konformationsänderung im Dynaminmolekül zur Bildung eines dominant negativ wirkenden Proteins. Die Endozytose wird zwar normal initiiert, aber die Abtrennung der bereits durch den Clathrin-Proteinkomplex eingeschnürten Vesikel findet nicht statt. Über *shibire*^{ts} kann Dynamin temperaturabhängig sowohl überexprimiert als auch reprimiert werden (Chen, Obar et al. 1991; Dudu, Pantazis et al. 2004). Um die mögliche Veränderung des durch *annexin b11*^{long}-RNAi verursachten Phänotyps untersuchen zu können, wurden Fliegen, die das UAS *shibire*^{ts} Konstrukt trugen, gegen Fliegen der Genotypen GMR> *annexin b11*^{long}-RNAi bzw. *en*> *annexin b11*^{long}-RNAi gekreuzt. Diese wurden auf 18 °C bzw. 29 °C gehalten und anschließend die Augen bzw. Flügel der adulten Fliegen analysiert. Zusätzlich wurden auf 18 °C bzw. 29 °C gehaltene Kreuzungen während der Entwicklung (L3-Puppe) einer Temperaturänderung unterzogen. Wenn es einen Effekt gibt, kann dieser so zeitlich eingegrenzt werden.

In keinem der beschriebenen Ansätze konnte eine Modifikation des Phänotyps festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). *en*> *annexin b11*^{long}-RNAi, > UAS *shibire*^{ts} Tiere sind auf 29 °C nicht lebensfähig, was durch die Kombination der Treiberlinie mit dem *shibire* Konstrukt bedingt ist. GMR> *annexin b11*^{long}-RNAi, > UAS *shibire*^{ts} Tiere zeigen nach Haltung bei 29 °C einen starken Phänotyp, der aber dem GMR> *annexin b11*^{long}-RNAi Phänotyp entspricht. Bei Haltung der Kreuzungen auf 18 °C konnte keine Abschwächung oder Verstärkung des Phänotyps erreicht werden.

3.6 Mutageneseansätze

Alle bisher beschriebenen phänotypischen Analysen beziehen sich auf Resultate aus RNAi-basierenden Ansätzen. Um die Funktion einzelner Annexine eindeutig zu bestimmen, ist die Charakterisierung „echter“ Mutanten unerlässlich. Deshalb sollte mithilfe verschiedener Methoden versucht werden, Mutanten zu generieren.

3.6.1 EMS Mutagenese von *annexin b9*

Im Zuge einer ersten Exzisionsmutagenese ausgehend von der P-Element-Insertion P(3398) konnten letale *annexin b9* Jump out Ereignisse generiert werden, die die *annexin b9* deletierende Defizienz *Df(3R)e-R1* nicht komplementieren (Bolke 2003). Eine Exzision dieser Region erzeugt einen letalen Effekt. Sequenzanalysen haben jedoch ergeben, dass es lediglich zu einer Veränderung in der Promoterregion von *annexin b9* gekommen ist (Daten nicht gezeigt). Dementsprechend handelt es sich um nicht klar definierte Mutanten, in denen unklar ist, ob die Genexpression von *annexin b9* tatsächlich betroffen ist. Um sicherzustellen, dass die Letalität der Linien auf *annexin b9* beruht, sollten zusätzlich letale Allele, die die kodierende Region des Gens betreffen, generiert werden. Dazu wurde eine EMS-Mutagenese durchgeführt. Das entsprechende Kreuzungsschema ist in Abbildung 45 dargestellt.

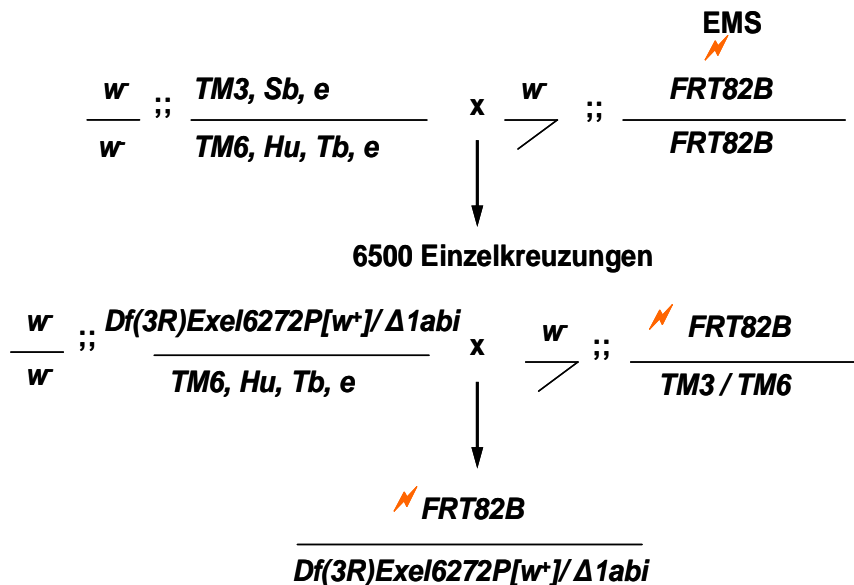


Abb. 45: Kreuzungsschema der EMS-Mutagenese. Details siehe Text.

Als Testerchromosom wurde eine Rekombinante einer, für den Bereich 93B beschriebenen Defizienz *Df(3R)Exel6272* mit der Exzisionsmutante $\Delta 1abi$ (R.

Stephan, unveröffentlicht) eingesetzt. Die ausgewählte Defizienz wurde für den genomischen Bereich 93A7-93B12 beschrieben. Dieser umfasst insgesamt 22 vorhergesagte Gene, darunter *annexin b9*. Der genomische Bereich ist in Abbildung 46 schematisch dargestellt.

Das Gen *abi*, das bei 88A9 kartiert, besitzt keinen Bezug zur Annexin Fragestellung. Deshalb werden innerhalb der Mutagenese isolierte *abi* Allele in dieser Arbeit nicht weiter behandelt.

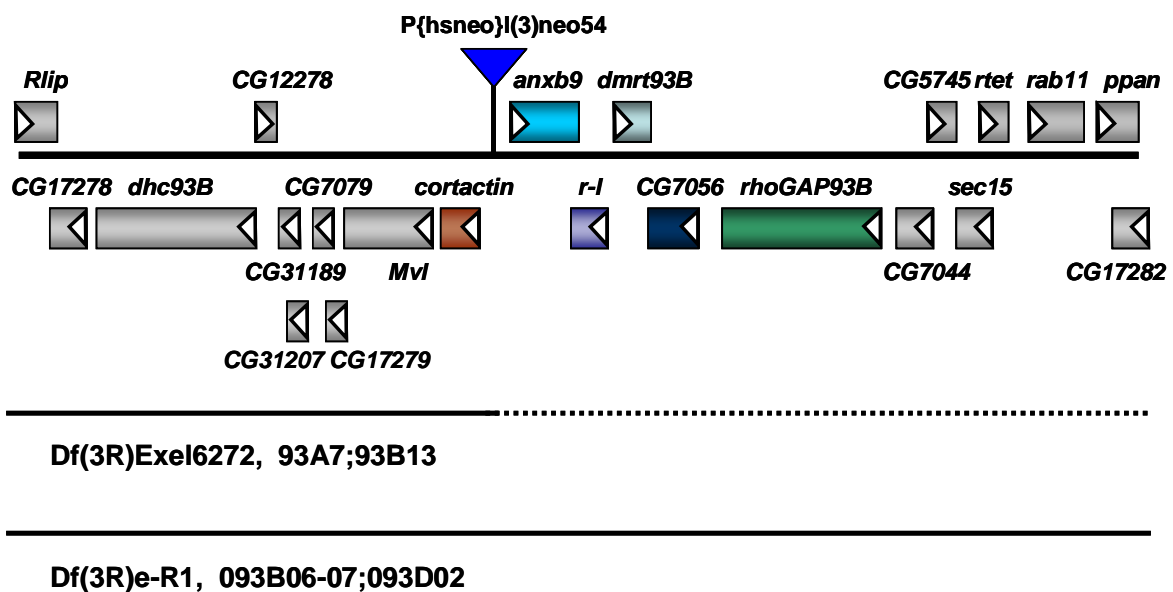


Abb. 46: Der genomische Bereich 93A7- 93B13.

Dargestellt sind alle vorhergesagten Gene in dieser Region. Für die Defizienz *Df(3R)Exel6272* wurde beschrieben, dass sie den dargestellten Bereich vollständig deletiert. Komplementationanalysen konnten zeigen, dass die Defizienz lediglich einen kleineren Anteil deletiert. *annexin b9* ist nicht betroffen.

3.6.2 Komplementationsanalyse

Im Verlauf der Mutagenese wurden ca. 6500 Chromosomen auf Letalität in *trans* zum Testerchromosom hin untersucht. Innerhalb der Analyse konnten 16 mutante Chromosomen erfasst werden. Mit diesen erfolgte eine ausführlichere Komplementationsanalyse. Zunächst wurden die letalen Stämme gegen die Defizienz *Df(3R)Exel6272* allein gekreuzt, um festzustellen, ob sich die Letalität in *trans* zur Defizienz bestätigt. Dies ist für die fünf Stämme #1, #11, #12, #20 und T3

der Fall. In allen anderen Fällen beruht die Letalität auf *abi* oder einem anderen Faktor.

Die fünf letalen Linien wurden untereinander aber auch in Bezug auf die Defizienzen *Df(3R)Exel6272* und *Df(3R)e-R1*, die beide das *annexin b9* Gen deletieren sollen, und bekannte, letale Mutationen im betreffenden Bereich komplementiert. Die Ergebnisse der Komplementationsanalyse sind in Tabelle 4 dargestellt:

Tab. 4: Komplementation der erhaltenen letalen Chromosomen, Defizienzen und letalen Stämme aus dem Bereich 93B7-93B10.

Komplementation, -: keine Komplementation

+:

	#1	#11	#12	#20	T3	<i>Df(3R)</i> <i>Exel6272</i>	<i>Df(3R)</i> <i>e-R1</i>	<i>rhoGap</i>	<i>Pl(3)</i> <i>neo54</i>	$\Delta 1abi$
#1	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+
#11		-	-	-	-	-	+	+	+	+
#12			-	-	-	-	+	+	+	+
#20				-	-	-	-	-	-	-
T3					-	-	+	+	+	+
<i>Df(3R)</i> <i>Exel6272</i>						-	-	+	+	+
<i>Df(3R)</i> <i>e-R1</i>							-	-	-	+
<i>rhoGap</i>								-	+	+
<i>Pl(3)</i> <i>neo54</i>									-	+
$\Delta 1abi$										-

Aus Tabelle 4 ist ersichtlich, dass sich die mutanten Chromosomen nicht alle konform verhalten. Die Linien #11, #12 und T3 bilden eine Gruppe. Sie komplementieren sich nicht und folglich betreffen sie wahrscheinlich den gleichen Locus. Stamm #20 ist in *trans* zu allen getesteten Gegenchromosomen letal. Es handelt sich offensichtlich um eine Defizienz, die Letalität in *trans* zur *abi* Mutante kann nicht erklärt werden. Diese Linie wurde nicht weiter untersucht. #1 komplementiert #11 und #12, aber nicht T3, es könnte sein, dass T3 zwei letale Mutationen im untersuchten Bereich enthält und somit in zwei

Komplementationsgruppen eingeordnet werden kann. Insgesamt komplementieren alle erhaltenen Linien die Defizienz *Df(3R)e-R1*. Da diese als *annexin b9* defizient beschrieben ist, kann keiner der untersuchten Stämme *annexin b9* mutant sein. Dieses Ergebnis ist für die Anzahl der mutagenisierten Chromosomen überraschend. Um die Region vollständig in ihren Komplementationseigenschaften zu beschreiben, wurden alle verfügbaren Linien auf ihr Verhalten zueinander überprüft. Dabei zeigte sich, dass auch die letale P-Insertion *Pl(3) neo54* und das nicht lebensfähige *rhoGap* Allel in *trans* die Defizienz *Df(3R)Exel6272* komplementieren. Dies ergibt deutliche Widersprüchlichkeiten bezüglich der Lokalisation dieser Defizienz. Sie kann nicht den vollständigen angegebenen Bereich betreffen. Die beiden Defizienzen *Df(3R)Exel6272* und *Df(3R)e-R1* sind in *trans* letal, was besagt, dass sie wenigstens anteilig überlappende Bereiche betreffen.

Aus der Komplementationsanalyse ergibt sich somit eine neue Situation für diesen Locus. Es wird deutlich, dass die zum *Screen* benutzte Defizienz nicht ihrer Beschreibung entsprechend aussehen kann (Abb. 46). Wahrscheinlich ist *annexin b9* nicht deletiert. Um dies genauer zu untersuchen, wurde mithilfe verschiedener PCR-Ansätze versucht, *annexin b9* in homozygot *Df(3R)Exel6272* Tieren zu amplifizieren. In Abbildung 47 ist zu sehen, dass dies möglich ist. Es ergibt sich für alle gewählten Primerpaare ein PCR-Produkt. *annexin b9* ist vollständig in der Defizienz *Df(3R)Exel6272* nachweisbar.

Innerhalb der gewählten *Screen*-Bedingungen war es folglich nicht möglich, nach letalen *annexin b9* Ereignissen zu suchen.

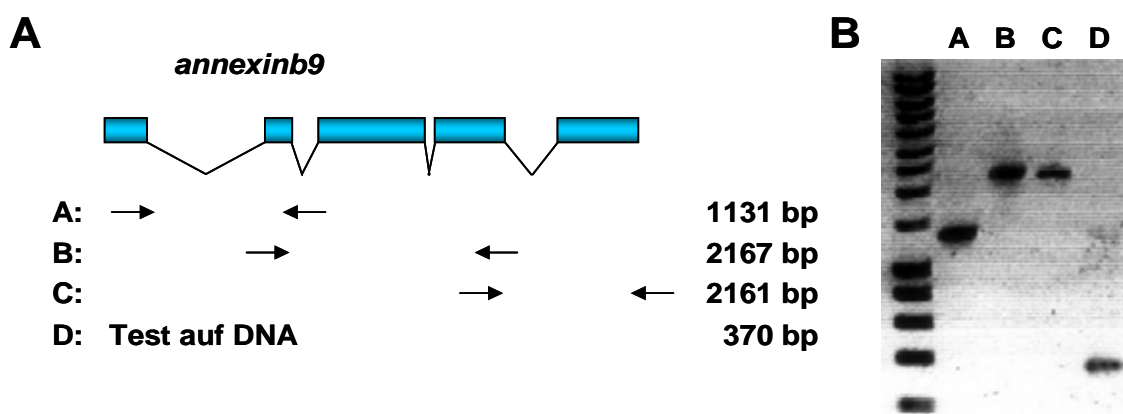


Abb. 47: Nachweis der genomischen Region um *annexin b9* in der Defizienz *Df(3R)Exel6272*.

A Schematische Darstellung der benutzen Primerpaare zum Nachweis der *annexin b9* Exons und erwartete Fragmentgrößen. **B** Nachweis der genomischen Region über PCR. Alle Exone des *annexin b9* Gens lassen sich amplifizieren. Insgesamt wurden 1-3 mutante Embryonen vorselektioniert und die aus ihnen gewonnene DNA für die PCR eingesetzt.

3.6.3 Exzisionsmutagenese von *annexin b10*

Bei dieser Art der Mutagenese macht man sich ein natürlich in *Drosophila* vorkommendes Transposon (P-Element) zunutze. Dieses trägt an jedem Ende so genannte „inverted repeats“, die durch eine bestimmte Endonuklease (Transposase) erkannt werden. Daraufhin wird über eine GTP abhängige Reaktion das P-Element aus dem Insertionsort ausgeschnitten. Durch fehlerhafte Reparatur kann eine Deletion entstehen und dementsprechend eventuell die Mutation angrenzender Gene (Ryder and Russell 2003). Zu diesem Zweck wird ein Stamm, der ein P-Element möglichst nah am oder im zu deletierenden Gen trägt gegen einen Stamm, der die konstitutiv aktive Transposasequelle ($\Delta 2-3$) enthält, verkreuzt.

Ausgehend von der P-Element-Insertion P(EPgy2)EY1, die 183bp *upstream* des *annexin b10* Gens inseriert (Abb. 48A), wurde über Exzision eine Mutante generiert (Sestu 2006). Innerhalb der Diplomarbeit von M. Sestu wurden drei *annexin b10* mutante Linien beschrieben, die hier näher charakterisiert wurden. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die *annexin b10 Jump out* Ereignisse als vitale, fertile Stämme gehalten werden können. In ihnen ist das Annexin B10-Protein nicht mehr nachweisbar (Abb. 48B). Es zeigt sich, dass die Bande, die das endogene Annexin B10-Protein (36 kDa) repräsentiert, im Wildtyp (Abb. 48B, Spur 1) und in der Überexpression (Abb. 48B, Spur 4) deutlich zu sehen ist. In beiden hier untersuchten *annexin b10* Mutanten #13 und #65 ist kein Protein mehr nachweisbar (Abb. 48B, Spuren 3, 4). Mithilfe der in Abbildung 48A schematisch dargestellten Primer wurde auf PCR Ebene versucht, einen Teil der genomischen Region des *annexin b10* Gens (Exon 2) nachzuweisen. Dies ist nicht möglich. Dagegen zeigen sich in allen Positivkontrollen die erwarteten Banden. So lassen sich die Enden des P-Elements im Ausgangsstamm nachweisen, im *Jump out* aber nicht (Abb. 48C).

Es ist folglich beidseitig zu einer ungenauen Exzision gekommen. Das benachbarte Gen *CG9578* lässt sich in allen *annexin b10* Mutanten nachweisen (Daten nicht gezeigt). Wie weit es zum Abbau der genomischen DNA gekommen ist und ob dementsprechend noch weitere Gene *upstream* des *annexin b10* Gens betroffen sind, wurde noch nicht gezeigt.

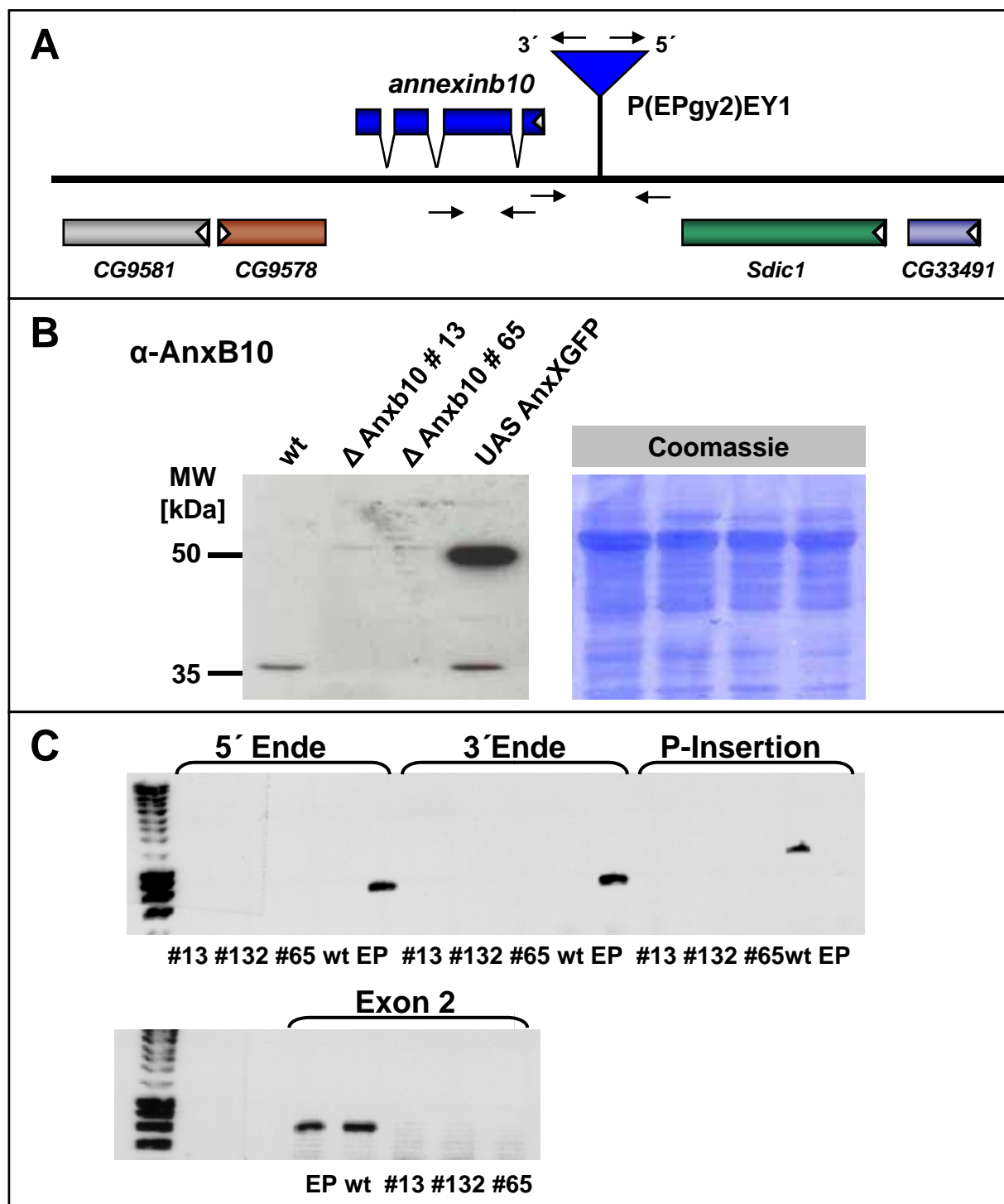


Abb. 48: Die Charakterisierung der *annexin b10* Excisionsmutanten #13, #65

A Schematische Darstellung des *annexin b10* Locus (Daten basierend auf Flybase). Dargestellt sind *annexin b10* und die benachbarten Gene. Die P-Insertion P(EPgy2)EY1 inseriert *upstream* des *annexin b10* Gens. Ausgehend von dieser Insertion wurde die Excision induziert. Die Pfeile in **A** symbolisieren die gewählten Primerpaare für die PCR in **C**. **B** Western Blot Analyse der Excisionsmutanten #13 und #65. Die Proteinlysate wurden aus homozygoten Fliegen gewonnen. Als Kontrolle dienten Lysate aus Wildtyp und Überexpression von Annexin B10 GFP. In den untersuchten Linien ist kein Annexin B10 Protein nachweisbar. **C** Die PCR Analyse zeigt, dass beide Enden des P-Elements und *annexin b10* Exon2 nicht mehr nachweisbar sind.

3.6.4 Exzisionsmutagenese von *annexin b9*

Ausgehend von den vitalen P-Element-Insertionen P(16880) und P(3398) sollten Exzisionsereignisse für *annexin b9* induziert werden. Die Lokalisation der P-Insertionen ist in Abbildung 50A schematisch dargestellt. Sie inserieren *upstream* des *annexin b9* Gens. Die Exzision wurde, wie bereits in Abschnitt 3.6.3 beschrieben, erreicht, indem die Stämme, die eins der beiden P-Elemente tragen, gegen den Transposasequelle- tragenden Stamm $\Delta 2-3$ verkreuzt wurden. Da die P-Elemente über eine *white* Insertion markiert sind, lässt sich ihr Verbleib über die Augenfarbe kontrollieren. Das Kreuzungsschema ist in Abbildung 49 dargestellt.

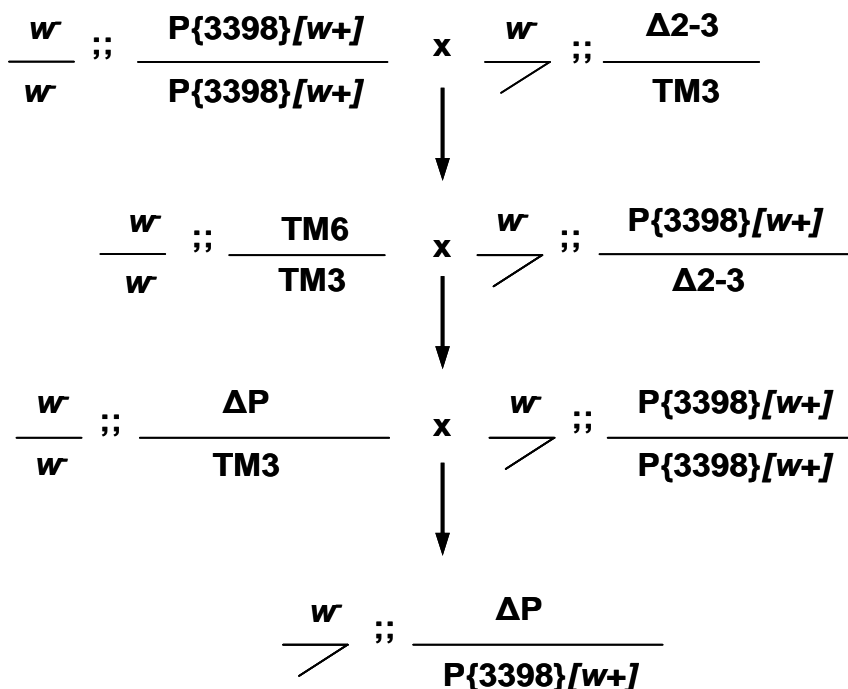


Abb. 49: Kreuzungsschema der Exzisionsmutagenese. Details siehe Text.

Für *annexin b10* konnten bereits zuvor vitale Mutanten isoliert werden (vgl. 3.6.3). Eine Veränderung der Promotorregion *upstream* von *annexin b9* führt dagegen zu Letalität. Dementsprechend sollte untersucht werden, welchen Effekt eine Mutation im kodierenden Bereich des *annexin b9* Gens verursacht. Potentielle *Jump out* Exzisionsmutanten werden zunächst nur über den Verlust des *white*⁺ Markers ausgewählt. So werden sowohl letale als auch vitale Ereignisse erfasst. Unabhängige Ereignisse werden erneut gegen den P-Insertion tragenden Stamm gekreuzt. In der folgenden Generation schlüpfen Tiere, die neben der P-Insertion das

Jump out Ereignis tragen (Abb. 49). Hieraus werden Männchen zunächst gegen TM3/TM6 Balancer Jungfrauen verkreuzt und dieselben Männchen anschließend zur Gewinnung genomischer DNA für die PCR genutzt. In der PCR wird mithilfe von Primern, die benachbart um das P-Element binden (Abb. 50A), nachgewiesen, inwieweit es zu einer ungenauen Exzision gekommen ist. Ist ein größerer angrenzender Teil verloren gegangen, kann womöglich einer der Primer nicht mehr binden, es entsteht infolgedessen kein PCR-Produkt. Dann könnte auch ein Teil des *annexin b9* Gens beeinträchtigt worden sein.

Bei einer Exzision ohne Beschädigungen erwartet man ein PCR-Produkt von 1500 bp. Insgesamt wurden 98 Linien auf diesen genomischen Bereich hin untersucht. Die PCR-Produkte wurden auf Agarosegele aufgetragen, die exemplarisch in Abbildung 50B dargestellt sind.

Als Positivkontrolle für die PCR diente DNA aus wildtypischen Fliegen. Als Negativkontrolle gelten die homozygoten P-Insertionen. Hier sind die P-Elemente noch vollständig vorhanden, der durch die Primer umschlossene Bereich ist daraufhin zu groß für die angewandte PCR (siehe M&M). Deutlich zu sehen ist, dass es Ereignisse gibt, in denen es wahrscheinlich zur genauen Deletion des P-Elements gekommen ist. Es ergibt sich, wie im Wildtyp, ein PCR-Produkt von ca. 1500 bp (Abb. 50B, z. B. Spur 5). Daneben erhält man in einem Großteil der aufgetragenen Proben kein Produkt. Hier muss geprüft werden, ob ausreichend *template* DNA vorhanden war. In Fällen, in denen ein größeres Produkt als im Wildtyp nachweisbar ist, ist wahrscheinlich ein Teil des P-Elements im Genom verblieben (Abb. 50B, z. B. Spuren 2, 3). Dadurch, dass die Insertion lediglich über die Anwesenheit des *white* Gens verfolgt wird, kann nicht sicher davon ausgegangen werden, dass das komplette P-Element deletiert wurde.

Auf den PCR-Ergebnissen basierend wurde entschieden, welche Stämme als Kandidaten gelten und etabliert werden. Über weitere PCR-Analysen sollte spezifiziert werden, ob *annexin b9* noch nachweisbar ist oder ob es sich um eine Mutante handelt. Für fünf der 56 getesteten Stämme konnte gezeigt werden, dass sich zwar Exon 3, aber nicht Exon 1 des *annexin b9* Gens amplifizieren lässt (Daten nicht gezeigt). Hierbei handelt es sich um vitale Stämme, die keinen vom Wildtyp abweichenden Phänotyp zeigen. Diese fünf Linien müssen nun auf die Expression von Annexin B9-Protein untersucht werden.

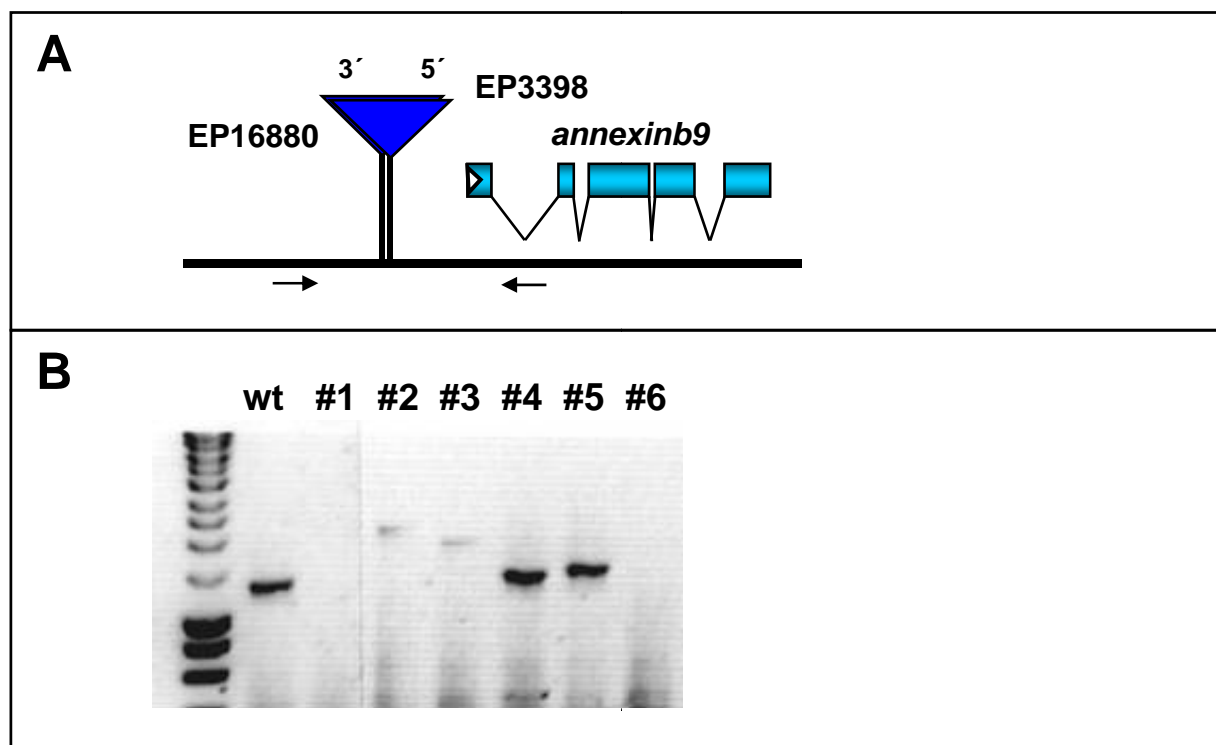


Abb. 50: Die Charakterisierung möglicher *annexin b9* Excisionsmutanten

A Schematische Darstellung des *annexin b9* Locus. Die P-Elemente P(EP 3398) und P(EP 16880) inserieren *upstream* des *annexin b9* Gens. Sie dienen als Ausgangsinsertionen zur Induktion der Excisionsereignisse. Die Pfeile symbolisieren das gewählte Primerpaar für die PCR Analyse. **B** PCR Analyse der „jump out“ Ereignisse. Beispielhaft für alle 98 Linien, sind hier die PCR Ergebnisse für die Stämme #1-#6 und den Wildtyp dargestellt. Ergab sich ein Fragment der wildtypischen Größe oder größer, wurden die Stämme verworfen (**B** z.B. #2, #3, #4, #5). Linien, in denen das P-Element nicht mehr nachweisbar war, wurden weiter untersucht (**B** z.B. #1, #6).

3.7 Redundante Funktionen der Annexine

Die Familie der Annexine beinhaltet in ihrer Gruppe „A“ bisher zwölf verschiedene *annexin* Gene. Auch wenn für viele Annexine bereits eine Funktion beschrieben wurde, ist es schwierig, einzelne Annexine *in vivo* getrennt voneinander zu untersuchen. Es ist nicht genau bekannt, inwieweit sich einzelne Annexine gegenseitig in ihrer Funktion ersetzen können.

3.7.1 Redundanz in *Drosophila*

Da für die *Drosophila*-Annexine noch keine distinkte Funktion gezeigt werden konnte, ist auch die Frage nach der Unabhängigkeit einzelner Annexine zu diesem Zeitpunkt nicht zu beantworten. Die zuvor beschriebenen Ergebnisse zeigen, dass eine *annexin b10* Nullmutante lebensfähig und fertil ist. Ob dies auch für *annexin b9* und *b11* gilt, muss noch untersucht werden. Die ubiquitäre Reduktion von *annexin b10* mittels RNAi führt zu Letalität. Dies ist nur erklärbar, wenn in der *annexin b10* Mutante die anderen Annexine die Funktion von Annexin B10 übernehmen können oder wenn die Expression der *annexin b10* dsRNA nicht spezifisch zur Reduktion von Annexin B10 führt. Um zwischen diesen Möglichkeiten unterscheiden zu können, wurden verschiedene Western-Blot Analysen durchgeführt. So sollte gezeigt werden, ob die Reduktion eines Annexins zur Veränderung im Expressionsgrad anderer Annexine führt.

Dementsprechend wurden aus *da> annexin b10*-RNAi und *da> annexin b11*-RNAi Tieren Proteinlysate gewonnen. Diese wurden anschließend zusammen mit wildtypischen Proteinproben und aus den *annexin b10 Jump out* Mutanten gewonnenen Proteinproben auf ein SDS-Gel aufgetragen und anschließend über Western-Blot Analyse ausgewertet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 51 zusammengefasst. Der Proteingehalt von Annexin B9 in der Zelle wurde analysiert, nachdem *annexin b10* bzw. *b11* herabreguliert wurden. Außerdem sind Lysate der Überexpression von Annexin B10-GFP, den *annexin b10 Jump out* Ereignissen und des Wildtyps aufgetragen (Abb. 51A). Das Annexin B9-Protein mit einer erwarteten Größe von 36 kDa wird in allen Spuren erkannt. Es ist kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Situationen nachweisbar. Das schwächere Signal in Spur 2 (Abb. 51A) erklärt sich durch den geringen Proteingehalt (vgl. Coomassie Färbung,

Abb. 51A). Die Expression von *annexin b9* scheint nicht durch die Reduktion oder Überexpression anderer Annexine beeinflusst zu werden.

Im Gegensatz dazu zeigt sich für die *annexine b10* und *b11^{long}* ein anderes Bild (Abb. 51B, C). Im Western-Blot, dessen Membran mit dem Annexin B10 Antikörper inkubiert wurde, wurden alle *Jump out* Mutanten und die Überexpression von Annexin B11^{long}-GFP verglichen. Zunächst zeigt sich als Negativkontrolle, dass in allen Mutanten kein Protein nachweisbar ist (Abb. 51B, Spuren 8-10). Insgesamt wird nur im Wildtyp und in den Überexpressionen ein Protein der vorhergesagten Größe des endogenen Annexin B10-Proteins von 36 kDa detektiert. Auch für Lysate aus Fliegen des Genotyps *da> annexin b11^{long}-RNAi* ergibt sich kein Signal (Abb. 51B, Spur 5, 6). Dies bedeutet, dass durch die Expression der *annexin b11^{long}* dsRNA über dieses Konstrukt folgend nicht nur *annexin b11*, sondern auch *b10* herabreguliert wird. Für den umgekehrten Fall gilt dies ebenfalls. Abbildung 51C zeigt, dass in *da> annexin b10-RNAi* Tieren auch *annexin b11* reduziert wird (Abb. 51C, Spur 4), wenn auch nicht so drastisch wie im gegenteiligen Fall. In *annexin b10* Mutanten scheint der Expressionsgrad von sowohl *annexin b9* als auch *annexin b11* im Vergleich zum Wildtyp nicht verändert (Abb. 51A, Spur 3, 6; Abb. 51C, Spur 2, 3). Insgesamt zeigen diese Western-Blot Analysen, dass die Expression von *annexin* dsRNA nicht zwingend zur Reduktion nur eines Annexins führen. Dies kann erklären, dass die Reduktion mittels RNAi zu Letalität führen kann, die Einzelmutanten aber vital sind. Zur genaueren Charakterisierung der Expressionsverhältnisse kann sowohl das neu zugängliche *annexin b9-RNAi*-Konstrukt, das scheinbar zu deutlicherer Reduktion führen kann, als auch eine Mehrfachmutantenanalyse beitragen.

In der Annexin B10 Mutante scheinen die übrigen Annexine auch durch normale Expressionsstärke, den Verlust funktionell ausgleichen zu können. Interessant wäre hier zu ermitteln, wie im Hintergrund einer Doppelmutante das jeweils verbleibende Annexin auf Expressionsebene beeinflusst wird.

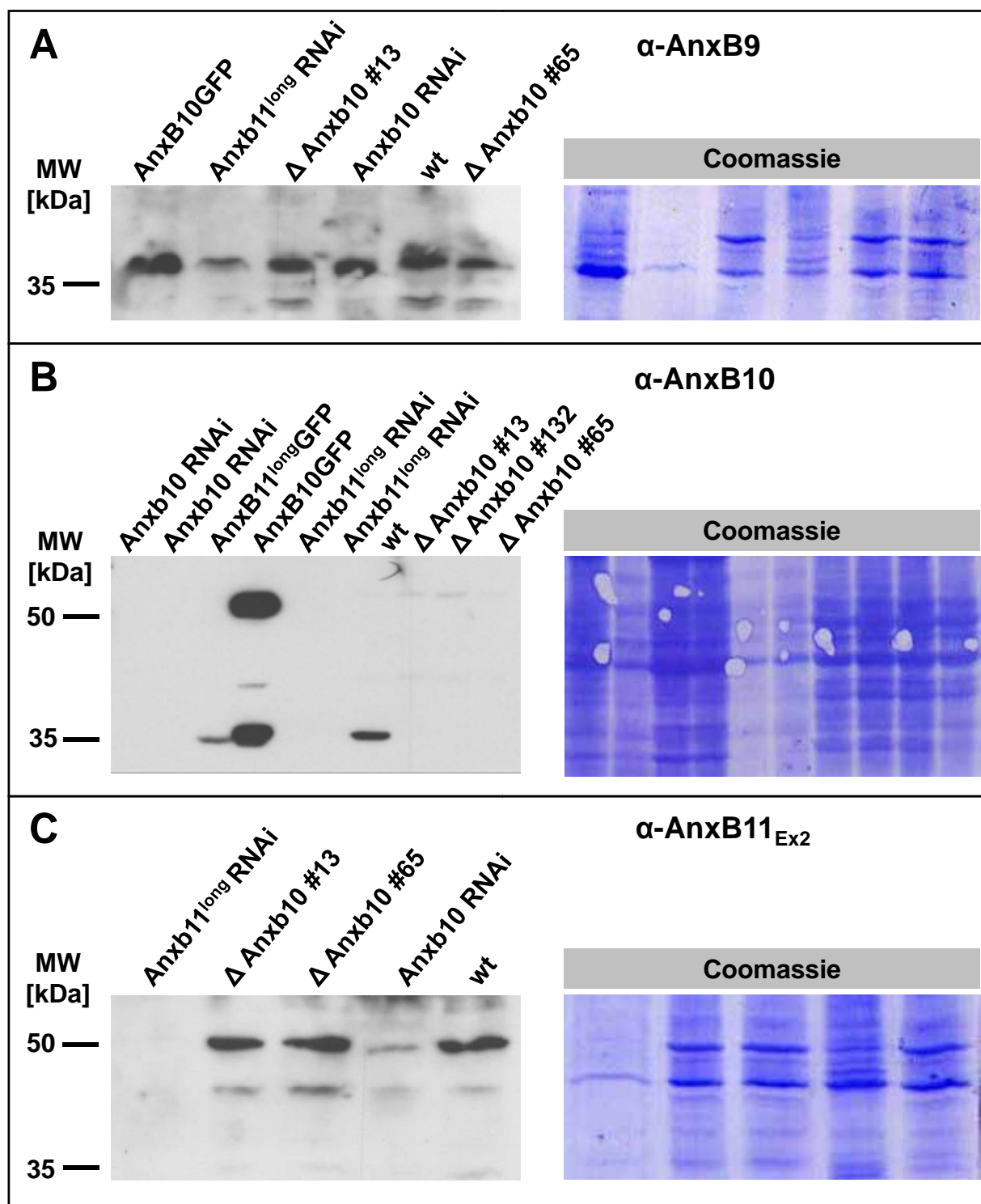


Abb. 51: annexin RNAi wirkt nicht vollkommen spezifisch

A-C Western Blot Analysen an Proteinlysaten aus *Drosophila* Embryonen und Larven. Als Ladekontrolle wurde das Gesamtprotein über Coomassie Färbung nachgewiesen. **A** Auswertung über das Annexin B9 Antiserum. Reduktion oder Überexpression anderer Annexine hat keinen Einfluss auf die Expression von Annexin B9. **B** Auswertung über das Annexin B10 Antiserum. Annexin B10 ist nach Expression von *annexin b10* dsRNA und *annexin b11^{long}* dsRNA nicht mehr nachweisbar. **C** Auswertung über das Annexin B11_{Ex2} Antiserum. Die über RNAi generierte dsRNA von *annexin b10* führt auch zur Reduktion der Annexin B11^{long} Expression. In den *annexin b10* Excisionsmutanten ist der Annexin B11^{long} Proteingehalt wildtypisch.

4 Diskussion

4.1 Die Proteinfamilie der Annexine

Für Vertebraten-Annexine wurde eine Vielzahl von Funktionen innerhalb und außerhalb der Zelle beschrieben. Die *Drosophila*-Annexine teilen mit den Vertebraten-Vertretern grundlegende strukturelle und biochemische Eigenschaften. Durch ihre charakteristische Struktur sollten sie prinzipiell in der Lage sein, den Vertebraten-Annexinen-ähnliche Funktionen auszuüben. Erste biochemische Untersuchungen konnten bestätigen, dass die *Drosophila*-Annexine Ca^{2+} -abhängig an Phospholipide binden können (Chlystun 2006). In dieser Arbeit konnten weitere Erkenntnisse über ihre intra- und extrazelluläre Lokalisation und Hinweise auf ihre Rolle in der Entwicklung von *Drosophila* und die Regulationsmechanismen ihrer Expression erlangt werden.

4.1.1 Die *Drosophila*-Annexine zeigen die spezifischen Annexin-Eigenschaften

Im *Drosophila* Genom werden drei *annexin* Gene kodiert. Es handelt sich um die *annexine b9*, *b10* und *b11*. Das *annexin b11* Gen kodiert zwei verschiedene Spleißvarianten. Die daraus kodierten Isoformen unterscheiden sich in der Nutzung des Exons 2, sodass Proteine mit einer Länge von 322 AS (Anx B11^{short}) bzw. 511 AS (Anx B11^{long}) entstehen. Die Familie der Annexine charakterisiert eine spezifische Domänenstruktur, bestehend aus einem Annexin *core* und einer variablen N-terminalen Domäne. Der hochkonservierte *core* besteht aus sich wiederholenden Einheiten, den Annexin *repeats* (Gerke and Moss 2002). Vergleicht man die Aminosäuresequenzen der *Drosophila*-Annexine B9, B10 B11^{short} und B11^{long} wird deutlich, dass sie eine Sequenzidentität von ca. 45 % aufweisen. Insbesondere die Annexin *repeats* mit den enthaltenen Ca^{2+} -Bindestellen weisen eine hohe Sequenzkonservierung auf. Dies gilt auch im Vergleich zu den Vertebraten-Annexinen. Annexin A5 wurde als der Vertebratenvertreter mit der höchsten Homologie zu den *Drosophila*-Annexinen beschrieben (Johnston, Perin et al. 1990). Sowohl in der Sequenz der *Drosophila*-Annexine, als auch in der des Annexin A5 weicht die dritte Ca^{2+} -Bindestelle von dem beschriebenen Motiv GxGT-

(38 Aminosäurereste)-D/E ab (Moss and Morgan 2004). Sequenzvergleiche bekannter Vertebraten-Annexine ergeben, dass der Aufbau des dritten *repeats* in den meisten Vertretern von der Consensus-Sequenz dahingehend abweicht, dass er mit einem Argininrest oder einem Lysinrest beginnt (Moss and Morgan 2004). Dies stimmt mit den Sequenzen von Annexin B11 bzw. Annexin B10 und A5 überein.

Die N-terminale Domäne kann posttranslational modifiziert werden und vermittelt Proteininteraktionen. Sie variiert innerhalb der Annexinverteiler deutlich in ihrer Ausprägung (Gerke, Creutz et al. 2005). Die *Drosophila*-Annexine B9, B10 und B11^{short} enthalten mit 29 AS (Anx B9) bzw. 23 AS (Anx B10, B11^{short}) einen vergleichsweise kurzen N-terminalen Anteil. Für die 150 Aminosäuren lange N-terminale Domäne von Annexin B11^{long} werden keine spezifischen Domänenstrukturen oder Bindestellen vorhergesagt. Auffallend ist jedoch die prolin- und glycinreiche Sequenz in diesem Abschnitt des Proteins. Auch der 202 AS lange N-terminale Anteil von Annexin A11 weist überdurchschnittlich viele Glycin-, Prolin-, aber auch Tyrosinreste auf (Towle and Treadwell 1992). Vergleicht man die Sequenz der N-terminalen Domäne des *Drosophila*-Annexin B11^{long}-Proteins mit dem Vertebraten-Annexin A11, so ergibt sich eine Sequenzhomologie von 35 %.

Für Annexin A11 konnte gezeigt werden, dass es in Zellkulturzellen embryonaler Zellen im Kern lokalisiert ist (Mizutani, Watanabe et al. 1995; Farnes and Ditzel 2003; Tomas and Moss 2003). Das Annexin A11 Protein enthält keine typische Sequenz, die zum Kernimport führen würde. Über chimere und mutante Proteine, die in Cos7-Zellen exprimiert wurden, konnte der für die Kernlokalisierung verantwortliche Bereich des Proteins auf die N-terminale Domäne eingegrenzt werden. So verblieb ein N-terminal trankiertes Protein im Zytosol (Mizutani, Watanabe et al. 1995). Eine Fusion von β -Galaktosidase und der N-terminalen Sequenz von Annexin A11 führte in Zellkulturexperimenten zur nukleären Lokalisation des Fusionsproteins. Dies zeigt, dass der N-Terminus hinreichend und notwendig für die Lokalisation des Proteins im Zellkern ist (Mizutani, Watanabe et al. 1995).

Auch das Annexin B11^{long}-Protein ist in *Drosophila*-Speicheldrüsenzellen im Kern lokalisiert. Die N-terminale Domäne könnte diese Lokalisation erzielen. Da auch die weiteren untersuchten *Drosophila*-Annexine im Kern zu finden sind, muss die Lokalisation über zusätzliche Mechanismen vermittelt werden.

Für den N-terminalen Anteil von Annexin A11 wurde zusätzlich beschrieben, dass es hier zu einer Bindung an Calyculin (S100A6), ein Protein der S100 Familie, sowie ALG-2 (apoptosis-linked protein) (Tokumitsu, Mizutani et al. 1993; Satoh, Shibata et al. 2002) kommt. Dabei sind wahrscheinlich die Aminosäuren 27-56 für die Calyculinbindung verantwortlich (Tokumitsu, Mizutani et al. 1993). Die genaue Funktion der Interaktionen, sowohl mit Calyculin, als auch mit ALG-2 ist bisher nicht untersucht. Annexin B11^{long} enthält keine homologe Sequenz zu den Aminosäuren 27-56 von Annexin A11 und das *Drosophila* Genom kodiert kein Calyculin oder S100 Proteinhomolog (<http://flybase.net/blast>). Für die *Drosophila* Proteine ALG-2 und ALIX (ALG-2 interacting protein X) konnte gezeigt werden, dass sie in *Drosophila* S2 Zellen mit POSH (Plenty of SH3s) interagieren können (Tsuda, Seong et al. 2006). Eine Überexpression von sowohl ALG-2 als auch ALIX während der Augenentwicklung führt zu rauen Augen. Es wird postuliert, dass ALG-2 und ALIX an der Regulation des JNK (Jun N-terminale Kinase) -Signalwegs beteiligt sind (Tsuda, Seong et al. 2006).

Aus Sequenzanalysen ergibt sich, dass das *annexin A11* Gen der mutmaßliche Vorläufer für mindestens neun humane *annexin* Paraloge darstellt (Bances, Fernandez et al. 2000; Moss and Morgan 2004). Dass ein *annexin*-ähnliches Gen im Mollusken *Aplysia* im Vergleich zu allen Vertebraten-Annexinen die höchste Homologie zu humanem Annexin A11 zeigt, bestätigt die Vermutung, dass es sich um einen sehr früh entstandenen genomischen Bereich handelt (Raju, Nunez-Regueiro et al. 1993). Wahrscheinlich liegt das Alter bei ca. 700-800 Millionen Jahren (Bances, Fernandez et al. 2000).

Insgesamt stellen die Sequenzanalysen heraus, dass alle *Drosophila*-Annexine die strukturellen Eigenschaften eines Annexinvertreters erfüllen. Annexin B11^{long} weist sogar im variablen N-terminalen Proteinbereich 35 % Identität zu Annexin A11 auf, was darauf hin deutet, dass es sich bei diesem *Drosophila*-Annexin, anders als von Moss diskutiert (Moss and Morgan 2004), um ein echtes Ortholog der Vertebraten-Annexine handelt. Dem *annexin A11* Gen entsprechend könnte auch das *Drosophila-annexin b11^{long}* Gen den evolutiven Vorläufer aller *Drosophila*-Annexine darstellen.

Im Gegensatz zum *annexin b11^{long}* Genlokus erweist sich der genomische Bereich um *annexin b10* als sehr dynamisch und dementsprechend jung. Die CGs *CG33941*, *CG33496*, *CG33487* und *CG3349* befinden sich in direkter Nachbarschaft zum *annexin b10* Genlokus. Die Anordnung der vorhergesagten Gene und der zwischen ihnen kartierenden *sdic* Gene (*sdic1-4*) beruht wahrscheinlich auf mehreren Genomduplikationen. Da *sdic* Gene in *Drosophila melanogaster*, aber nicht in anderen *Drosophila* Gattungen auftreten, handelt es sich um einen sehr jungen chromosomalen Bereich (Nurminsky, Nurminskaya et al. 1998). Das Gen *sdic1* selbst entstand aus der Duplikation der Gene *annexin b10* und *cdic* (*cytoplasmic dynein intermediate chain*) und anschließenden Deletionen (Ranz, Ponce et al. 2003; Ponce and Hartl 2006). Wahrscheinlich ist während dieser Ereignisse auch das dem *sdic1* Gen am nächsten gelegene *CG33491* entstanden. Weitere Duplikationen führten zu der Bildung der *sdic1-4* Gene (Ranz, Ponce et al. 2003; Ponce and Hartl 2006) und der CGs *CG33496*, *CG33487* und *CG33498*.

Bisher konnte nur für *sdic1* gezeigt werden, dass es exprimiert wird (Nurminsky, Nurminskaya et al. 1998). Wahrscheinlich handelt es sich bei *sdic2-4* um nicht exprimierte Pseudogene (Ponce and Hartl 2006). In *Drosophila* kommt es in hohem Maße zur Deletion nicht essenziellen Genmaterials (Petrov and Hartl 1997; Petrov, Chao et al. 1998; Petrov and Hartl 1998), was die relativ kleine Genomgröße erklärt.

4.1.2 Die Drosophila-Annexine werden ubiquitär exprimiert und zeigen eine distinkte Lokalisation in der Zelle

In situ Hybridisierungsanalysen und Antikörperfärbungen konnten zeigen, dass Annexin B10 nicht, wie ursprünglich angenommen nur früh in der Entwicklung und adulten Fliegen exprimiert wird (Johnston, Perin et al. 1990), sondern ubiquitär während aller Entwicklungsstadien nachweisbar ist. Die Expression aller Annexine über den gesamten Verlauf der embryonalen Entwicklung lässt sich auf mRNA-Ebene zeigen. Für die Annexine B11^{long} und B10 konnte dies zudem auf Proteinebene bestätigt werden.

Prinzipiell sind Annexine zytosolische Proteine. Sie können sich jedoch je nach Funktion bzw. nach Aktivierung an verschiedenen intrazellulären Membrankompartimenten, der Plasmamembran, aber auch extrazellulär oder im Kern befinden (Diakonova, Gerke et al. 1997; Oliani, Paul-Clark et al. 2001; Gerke and

Moss 2002; Sacre and Moss 2002; Perretti and Flower 2004; Rescher and Gerke 2004; Tomas, Futter et al. 2004). Antikörperfärbungen und die Charakterisierung der Lokalisation der GFP-Fusionsproteine konnten zeigen, dass alle *Drosophila*-Annexine im Gewebe an der Membran, im Zytosol und gewebeabhängig im Kern zu finden sind.

Nach Überexpression von Annexin B11^{long}-GFP lassen sich innerhalb der Zelle vesikuläre Strukturen erkennen. Um zu entscheiden, ob es sich dabei um funktionelle Vesikel handeln könnte, müssen die betreffenden Kompartimente zunächst genau definiert werden. Nach Annexin B11^{long}-GFP Überexpression zeigen sich im Gewebe Kollokationen zwischen GFP-positiven Strukturen und internalisiertem Dextran. Im Gegensatz dazu konnte bei Antikörperfärbungen keine Kollokation von Annexin B11^{long} und Dextran nachgewiesen werden. Dies kann dadurch begründet sein, dass das Annexin-GFP-Fusionsprotein sensitiver nachweisbar ist, als Annexin B11^{long} über das Annexin B11_{Ex2} Antiserum. Zusätzlich belegen *in vivo* Aufnahmen, dass sich die GFP-positiven Kompartimente in der Zelle extrem schnell und scheinbar gerichtet bewegen. Dies ist für reine GFP-Aggregate nicht zu erwarten.

Um verschiedene endozytotische Kompartimente zu unterscheiden, bedient man sich z. B. markierter Rab-Proteine, da diese sehr spezifisch an ihrer Zielmembran lokalisiert sind (Zerial and McBride 2001). In Annexin B11_{Ex2} Antikörperfärbungen zeigten sich keinerlei Kollokationen mit diesen Markern. Demnach liegt Annexin B11^{long} nicht assoziiert mit Clathrin-, Rab5- oder Rab4-positiven, frühen Endosomen oder Rab11-positiven Recyclingendosomen vor. Annexin B11^{long} scheint somit nicht direkt an diesen endozytotischen Prozessen beteiligt zu sein. Dies ist übereinstimmend mit dem Ergebnis, dass sich der durch *annexin b11^{long}*-RNAi verursachte Phänotyp nicht durch die Blockierung von Endozytose mittels der temperatursensitiven Dynamin Mutante *shibire* verändern lässt.

In den Annexinen A1 und A2 konnte mittlerweile jeweils eine N-terminale Sequenz identifiziert werden, die für die Lokalisation an Endosomen benötigt wird. Deletionsmutanten dieses Bereichs der Annexinproteine zeigen eine veränderte Verteilung in der Zelle (Seemann, Weber et al. 1996; Jost, Zeuschner et al. 1997). Die Annexine A1 (50 AS) und A2 (41 AS) enthalten wie die *Drosophila*-Annexine B9

(29 AS), B10 (23 AS) und B11^{short} (23 AS) eine verhältnismäßig kurze N-terminale Domäne. Trotzdem wird für Annexin A1 und A2 über diesen Bereich ihre spezifische Lokalisation definiert (Seemann, Weber et al. 1996; Jost, Zeuschner et al. 1997). Vergleichbare Sequenzmotive lassen sich in den *Drosophila*-Annexinen nicht wiederfinden. Der Vergleich der *Drosophila*-Annexinsequenzen untereinander stellt jedoch heraus, dass innerhalb des N-terminalen Bereichs zehn Aminosäuren vollkommen identisch sind. Wird hier die Lokalisation der Proteine in der Zelle vermittelt, so kann dies die ähnliche Verteilung der *Drosophila*-Annexinproteine in der Zelle erklären.

4.1.3 Annexin B11^{long} ist an der apikalen Membran lokalisiert

Sowohl aus den Überexpressionsstudien, als auch aus den Antikörperfärbungen geht hervor, dass Annexin B11^{long} vornehmlich an der apikalen Membran epithelialer Zellen lokalisiert ist. Eine spezifische Lokalisation in polarisierten Zellen wurde auch für die beiden Isoformen von Annexin A13 beschrieben. Die Annexine A13a und A13b befinden sich dabei in nicht-überlappenden Bereichen; so ist Annexin A13a am basolateralen Transport und Annexin A13b am apikalen Transport von Vesikeln beteiligt und auch an diesen bzw. den jeweiligen Plasmamembrandomänen lokalisiert (Lafont, Lecat et al. 1998; Lecat, Verkade et al. 2000).

Auch für die *Anopheles*-Annexine B9 und B10 wurden Lokalisationsunterschiede beschrieben. Beide Proteine sind an der Plasmamembran und an Zell-Zell-Kontakten lokalisiert, jedoch befindet sich Annexin B9 an der basalen, Annexin B10 an der apikalen Membran (Kotsyfakis, Vontas et al. 2005). Da jedoch eine Kreuzreaktion der Antikörper beschrieben wurde, ist die tatsächliche Unterscheidung der Proteine fraglich. Es handelt sich bei den *Anopheles*-Annexinen B9 und B10 um echte Orthologe der *Drosophila*-Annexine, was einen Hinweis auf distinkte Lokalisation geben könnte. In den in dieser Arbeit untersuchten Geweben waren alle *Drosophila*-Annexine in ähnlichen Bereichen der Zelle zu finden.

4.1.4 Ein Anteil des Annexin B11^{long}-Proteins wird sekretiert

Auffällig ist, dass ein Anteil des Annexin B11^{long}-Proteins auch außerhalb der Zelle zu finden ist. Dies konnte durch Überexpressionen und RNAi-Ansätze, aber auch in biochemischen Ansätzen bestätigt werden. Da sich extrazelluläres Annexin B11^{long}

abhängig von dem genetischen Hintergrund der Zellen nachweisen ließ, kann es sich nicht lediglich um eine unspezifische Reaktion des Antikörpers handeln.

Auch die Vertebraten-Annexine A1 und A2 sind in Teilen extrazellulär lokalisiert (Ling, Jacovina et al. 2004; Perretti and Flower 2004; Perretti and Solito 2004). Keines dieser extrazellulären Annexinproteine besitzt eine Peptidsequenz, die zu bisher beschriebenen Sekretionssignalen homolog ist. Einige alternative Möglichkeiten der Sekretion wurden für Vertebraten-Annexine bereits vorgeschlagen (Muesch, Hartmann et al. 1990; Perretti, Christian et al. 2000; Castro-Caldas, Duarte et al. 2002; Faure, Migne et al. 2002). Die Sekretion von Annexin A1 verläuft nicht über den klassischen Weg, d. h. über das endoplasmatische Retikulum (ER) – Golgi–Netzwerk (Philip, Flower et al. 1998). In Zellkulturexperimenten wurde die Sekretion von Annexin A1 nicht durch Brefeldin A, das den ER-Golgi Vesikelverkehr blockt, verhindert. Für Annexin A2 wird postuliert, dass zytosolisches Annexin A2 durch Konformationsänderung eine lipophile Natur annehmen kann und folglich in die Membran inseriert. Durch Reversion der Konformation soll ein gewisser Anteil des Proteins die Membran auch auf der extrazellulären Seite verlassen können (Faure, Migne et al. 2002). Eine weitere Möglichkeit, für extrazelluläres Vorkommen, kann die Lyse benachbarter Zellen und damit die Freisetzung von Proteinen aus dem Zytosol der Zellen sein. Da aber nur Annexin B11^{long} und nicht Annexin B10 außerhalb der Zelle nachweisbar ist, erscheint dies eher unwahrscheinlich.

Neben den Annexinproteinen lassen sich weitere Proteine im Extrazellularraum nachweisen, die keine Signalsequenz zur Ausschleusung aus der Zelle besitzen (Muesch, Hartmann et al. 1990). Dazu gehören z. B. humanes Interleukin 1 oder Prothymosin. Auch für diesen Fall deutet alles darauf hin, dass der klassische ER-Golgi Sekretionsweg nicht beteiligt ist. Es muss somit eine alternative Möglichkeit der Proteinausschleusung geben (Muesch, Hartmann et al. 1990). Wie diese aussieht, ist nicht bekannt.

Annexin A1 wirkt extrazellulär als sogenanntes „eat me“ Signal (Arur, Uche et al. 2003). Zellen, die solche Signale auf ihrer Oberfläche tragen, werden durch Phagozyten erkannt und entfernt. Annexin A1 wird extrazellulär zu Phosphatidylserin-reichen Bereichen der Zelloberfläche rekrutiert. Annexin A1 siRNA in apoptotischen Zellen führt zu Defekten in der anschließenden Phagozytose dieser

Zellen (Arur, Uche et al. 2003). Die Reduktion von Annexin B11^{long} mittels RNAi führt zur Apoptose. Eventuell dient es auf der Zelloberfläche ebenfalls als Signalprotein. Im Gegensatz zur Annexin A1 Funktion müsste es sich bei Annexin B11^{long} jedoch um ein Schutzsignal gegen proapoptotische Einflüsse handeln.

4.2 Die Überexpression der *Drosophila*-Annexine erzeugt keinen offensichtlichen Effekt

Alle *Drosophila*-Annexin-GFP-Proteine wurden mithilfe verschiedener Treiber im Gewebe exprimiert. Die Expression konnte über das GFP-Signal verfolgt werden. In keinem der untersuchten Fälle kam es zu einer morphologischen Abweichung vom Wildtyp. Die Überexpression führt somit zu keiner offensichtlichen Veränderung während der Entwicklung. Dies kann verschiedene Gründe haben. Durch die Fusion mit GFP kann es zu Veränderungen der Sekundär- und Tertiärstruktur des Annexinproteins kommen, die gebildeten Proteine wären somit in der Zelle eventuell nicht funktional. Da die überexprimierten Proteine jedoch eine spezifische Lokalisation im Gewebe zeigen, erscheint dies unwahrscheinlich. So befinden sich die Proteine anteilig im Zytosol, sind jedoch auch an der Plasmamembran oder in Speicheldrüsenzellen auch im Kern zu finden. Annexin B11^{long}-GFP zeigt außerdem eine Lokalisation an der apikalen Membran epithelialer Zellen. Alle bisher untersuchten C-terminalen Vertebraten-Annexin-GFP-Fusionsproteine zeigen normale Eigenschaften. Trotzdem könnte der GFP-Anteil des *Drosophila*-Annexin B11^{long}-GFP-Fusionsproteins durch sterische Hemmung inhibitorisch auf Komplexbildung oder Bindung von Interaktionspartnern wirken.

Annexine sind nicht nur in der Lage als einzelne Moleküle an die Membranoberfläche zu binden. In elektronenmikroskopischen Analysen konnte gezeigt werden, dass Annexin A5 an Modellmembranen laterale Aggregate bilden kann (Voges, Berendes et al. 1994; Reviakine, Bergsma-Schutter et al. 1998; Oling, Santos et al. 2000). Dabei bilden Annexin A5 Trimere die Grundbausteine des Verbandes. Die Interaktion der membrangebundenen Annexin A5 core Domänen ermöglicht die Aggregation der Annexine, wodurch wahrscheinlich bestimmte Plasmamembranbereiche stabilisiert werden (Gerke, Creutz et al. 2005).

Dass es keinen offensichtlichen Effekt durch Annexin-GFP Überexpression gibt, kann auch in der Regulation der Annexin vermittelten Funktionen begründet sein.

Interagierende oder *downstream* beeinflusste Proteine liegen nur in endogenen Mengen vor. Ein Überschuss an Annexinprotein kann folglich in der Zelle keinen spürbaren Einfluss nehmen.

4.3 Die Mutagenese der *Drosophila-annexin* Gene

4.3.1 Die Mutagenese von *annexin b9*

Zur vollständigen Charakterisierung einer Proteinfunktion ist die Analyse von Mutanten unerlässlich. *Drosophila-annexin* Mutanten sollten über unterschiedliche Versuchsansätze generiert werden.

Durch die *annexin b9* EMS-Mutagenese über die Defizienz *Df(3R)Exel6272* wurden aus 6500 Einzelkreuzungen fünf letale Ereignisse aufgedeckt. Durch die Komplementationsanalyse konnte zunächst gezeigt werden, dass die erhaltenen Linien die Defizienz *Df(3R)e-R1*, die den *annexin b9* Locus deletiert, komplementieren. Die Letalität der Linien beruht folglich nicht auf einer Mutation im *annexin b9* Gen.

Bei der verwendeten Defizienz *Df(3R)Exel6272* soll es sich um eine Deletion mit genau definierten Bruchpunkten handeln (*Exelixis, Drosophila Stock Collection*). Die Ergebnisse der Komplementationsanalyse belegen jedoch, dass die Defizienz *Df(3R)Exel6272* nicht den beschriebenen Bereich deletiert.

Aus einer vorangegangenen Exzisionsmutagenese für *annexin b9* konnten letale Stämme isoliert werden. Da es in diesen Linien lediglich zu einer Veränderung der Promotorregion gekommen war, ist nicht klar, ob die Letalität auf *annexin b9* beruht. Im Gegensatz dazu konnten aus einer weiteren P-Element Mobilisierung fünf vitale Linien etabliert werden, in denen sich das Exon 1 des *annexin b9* Gens nicht mehr nachweisen lässt. Das Startcodon von *annexin b9* befindet sich in Exon 2. Da in allen fünf vitalen Stämmen das Exon 3 des *annexin b9* Gens nachweisbar ist, müssen sie zunächst auf die Anwesenheit des Startcodons hin untersucht werden. Außerdem muss über Western-Blot Analysen gezeigt werden, inwiefern sich in den Promotormutanten und den vitalen Linien die Expression des Annexin B9-Proteins nachweisen lässt.

4.3.2 Die Mutagenese von *annexin b10*

Ein *upstream* des *annexin b10* Gens inseriertes P-Element wurde mithilfe der $\Delta 2-3$ Transposase mobilisiert. Durch diese Exzisionsmutagenese sollte eine Deletion innerhalb des *annexin b10* Locus induziert werden. Bei der PCR-Analyse der *Jump out* Ereignisse stellte sich heraus, dass es in drei untersuchten Fällen zur Deletion des *annexin b10* Gens gekommen war (Sestu 2006). Für die *annexin b10* Mutanten konnten vitale, fertile Linien etabliert werden, in denen weder der genomische Bereich von *annexin b10*, noch das Annexin B10-Protein nachweisbar waren. Für das angrenzende *CG9578* konnte gezeigt werden, dass es durch die Exzision nicht beeinträchtigt wurde. Für die *upstream* des *annexin b10* Locus kartierenden Gene muss dies noch untersucht werden.

Da die *annexin b10* Mutante vital ist, handelt es sich bei *annexin b10* um ein nicht essenzielles Gen. Auch *knock-out* Modelle der Annexine A1, A5 und A6 der Vertebraten belegen, dass es sich bei den *annexinen* um nicht essenzielle Gene handelt. Annexin A1, A5 und A6 *knock-out* Mäuse sind vital und zeigen keinen offensichtlichen Phänotyp in ihrer Physiologie oder ihrem Verhalten (Hawkins, Roes et al. 1999; Brachvogel, Dikschas et al. 2003; FHannon, Croxtall et al. 2003). Physiologisch zeigen Annexin A1 *knock-out* Mäuse jedoch größere Sensitivität gegenüber bakteriellen Infektionen und eine höhere Extravasation neutrophiler Granulozyten (Hannon, Croxtall et al. 2003).

Hinweise auf eine essenzielle Annexin-Funktion ergab die Analyse von Annexin A7. So beschrieben Srivastava et al., dass Annexin A7 *knock-out* Mäuse letal sind. Sie sterben an Tag 10 der Embryonalentwicklung an Hirnblutungen (Srivastava, Atwater et al. 1999). Gegensätzlich dazu zeigten jedoch Herr et al. 2001, dass eine unabhängig generierte Annexin A7 *knock-out* Maus vital ist und keinerlei Defekte aufweist (Herr, Smyth et al. 2001). Begründet wird dieser Widerspruch durch eventuell unterschiedliche genetische Hintergründe (Herr, Smyth et al. 2001).

4.3.3 Redundanz innerhalb der Annexin Familie

Da *annexin b10* Mutanten lebensfähig sind, muss es sich bei Annexin B10 demnach entweder um ein nicht essenzielles Protein handeln oder die Annexin B10 Funktion kann durch die Annexin B9 und B11 Proteinfunktionen ausgeglichen werden.

Auch für die vitalen Annexin A1, A5 und A6 *knock-out* Mäuse wurde vorgeschlagen, dass andere Annexine den Funktionsverlust ausgleichen können (Hawkins, Roes et al. 1999; Brachvogel, Dikschas et al. 2003; Hannon, Croxtall et al. 2003). Um dies zu untersuchen, wurde die Expressionsstärke anderer Maus-Annexine in den *knock-outs* mit der wildtypischen Situation verglichen. Die Analyse ergab für Annexin A5 und A6, dass alle untersuchten Annexine im gleichen Maße exprimiert werden wie im Wildtyp (Hawkins, Roes et al. 1999; Brachvogel, Dikschas et al. 2003). Dies stimmt mit den Ergebnissen dieser Arbeit überein. Auch in *annexin b10* mutanten Fliegen ist der Annexin B9 und B10-Expressionsgrad wildtypisch. Dies zeigt, dass einem Verlust von Annexin B10 keine posttranslationale Regulation der Annexin B9 oder B11 Expression folgt.

Eine Analyse für Annexin A1 *knock-out* Mäuse ergab, dass es zu einer gewebespezifischen Erhöhung der Expression anderer Annexine kommt. So ist im Lungengewebe Annexin A1-negativer Mäuse signifikant mehr Annexin A2, A4, A5 und A6 Protein nachweisbar. In Thymuszellen werden die Annexine A2 und A4 stärker exprimiert. Im Darmgewebe ergaben sich dagegen keinerlei Expressionsveränderungen. Dies kann dadurch begründet sein, dass in einem wildtypischen Hintergrund auch Annexin A1 kaum im Darmgewebe exprimiert wird (FHannon, Croxtall et al. 2003). Diese Daten zeigen, dass es zu einer gewebespezifischen Anpassung der Annexin Expression nach Verlust von Annexin A1 kommt.

Ob es auch innerhalb der *Drosophila*-Annexinfamilie zu gewebespezifischer Regulation der Expressionsstärke kommt, wurde für *Drosophila* Gewebe bisher nicht untersucht.

In *annexin b10* Mutanten konnte keine vermehrte Expression der Annexine B9 und B11^{long} nachgewiesen werden. Eventuell ist der wildtypische Expressionsgrad der Annexine B9 und B11 ausreichend, um die Funktion von B10 zu übernehmen, wie es auch für die Maus Annexine A5 und A6 wahrscheinlich ist (Hawkins, Roes et al. 1999; Brachvogel, Dikschas et al. 2003). Der *annexin b10* Locus hat sich wahrscheinlich erst spät innerhalb der Entwicklungsgeschichte formiert. *annexin b10* ist somit wahrscheinlich das zuletzt entstandene *Drosophila-annexin* Gen. Dementsprechend hat es eventuell keine Funktion, die nicht auch durch die ursprünglichen *annexin* Gene erfüllt werden könnte.

4.4 Die Reduktion der Annexin Expression

4.4.1 Die Spezifität der Expressionsreduktion

Da zu Beginn dieser Arbeit für keines der *annexin* Gene eine Mutante vorhanden war, sollte mithilfe von transgenen *annexin*-RNAi Linien untersucht werden, welche Auswirkung die Herabregulation der Annexin Expression in der Zelle hat.

Die ektopisch exprimierte *annexin* dsRNA wird über das Dicer Protein in 21mere (siRNA) zerschnitten, wobei es sich um einen 19nt langen doppelsträngigen Bereich mit 2nt 3'Überhang handelt (Tomari, Du et al. 2007). Diese RNA wird in den RISC (*RNA induced silencing complex*) integriert. Eine den 19nt komplementäre mRNA wird anschließend gezielt durch Slicer abgebaut (Lee and Carthew 2003). Dieser Abbau ist streng sequenzspezifisch. So wird nur mRNA abgebaut, die in allen 19nt mit der siRNA übereinstimmt (Kulkarni, Booker et al. 2006). Dabei ist denkbar, dass durch Sequenzidentität der siRNA-Fragmente neben der Expression des Zielgens auch die anderer Gene herabreguliert werden. Diese bezeichnet man als sogenannte *off target* Gene. Es ist mittlerweile möglich, die ausgewählten Sequenzen auf vorhergesagte *off target* Ereignisse hin zu untersuchen (<http://dsCheck.RNAi.jp>).

Für die in den RNAi-Konstrukten verwendete *annexin b9* Sequenz ergibt sich als vorhergesagtes mögliches *off target* nur *annexin b11*. Dementsprechend zeigt sich auch *annexin b9* als *off target* für die *annexin b11* Reduktion.

4.4.2 Die Expression der *annexin b10* dsRNA führt nicht nur zu einer Reduktion der Annexin B10-Expression

annexin b10 Mutanten sind vital, die Expression von *annexin b10* dsRNA #300-9 (NIG-Fly, Fly Stocks) führt jedoch zur Letalität. Dies kann möglicherweise dadurch erklärt werden, dass als Folge der Expression der *annexin b10* dsRNA weder Annexin B10 noch Annexin B11^{long} im Gewebe nachweisbar sind. Auch wenn für die benutzte Sequenz keine *off targets* vorhergesagt wurden, so muss es sich doch um, vom Programm nicht erfasste *off target* Effekte handeln. Demgegenüber lassen sich in *annexin b10* Mutanten Annexin B9 und Annexin B11 in einem wildtypischen Expressionsgrad nachweisen. Annexin B10 hat folglich keinen posttranslationalen Effekt auf die Expression der anderen *Drosophila*-Annexine.

Untersucht man die gewählte *annexin b10* Sequenz für die innerhalb dieser Arbeit generierten RNAi-Konstrukte auf *off target* Kandidaten, so ergeben sich vier weitere CGs, deren mRNA zu einem hohen Anteil (jew. 1:13) ebenfalls degradiert werden würde. Ob die benachbart zum *annexin b10* Lokus kartierten CGs *CG33941*, *CG33496*, *CG33487* und *CG33498* exprimiert werden, ist fraglich. Bisher wurden keine cDNAs für die vier CGs beschrieben (Flybase). Ob sie dementsprechend überhaupt zur Bildung von mRNA führen, ist nicht bekannt.

4.4.3 Annexin B11^{long} hat einen regulatorischen Effekt auf Annexin B10

Nach Expression von *annexin b11^{long}* dsRNA ist weder Annexin B11^{long} noch Annexin B10-Protein nachweisbar. Alle betrachteten Phänotypen spiegeln demnach wahrscheinlich den Verlust von sowohl *annexin b11^{long}* als auch *annexin b10* wider.

Für das *annexin b11^{long}*-RNAi-Konstrukt wurde ein genomischer Bereich aus Exon 2 des *annexin b11* Gens gewählt, welches spezifisch nur im Annexin B11^{long}-Protein verwendet wird. Es enthält keinerlei homologe Nukleotidsequenzen zu den anderen *Drosophila-annexin* Genen. Deshalb können in diesem Fall nicht *off target* Ereignisse die Ursache für die reziproke Regulation sein. Das *Drosophila*-Annexin B10-Protein wird möglicherweise über einen weiteren Mechanismus in seiner Expressionsstärke oder Stabilität reguliert.

Für Annexin A1 wurde beispielhaft beschrieben, dass es auch zu posttranskriptionaler Regulation der Annexin-Proteine untereinander kommt. Untersucht man Gewebe aus Annexin A1 *knock-out* Mäusen, so zeigt sich, wie in Abschnitt 4.3.3 diskutiert, dass der Proteinspiegel anderer Annexine durch die Annexin A1 Reduktion verändert wird. Im Gegensatz zum Annexin A1 negativem Lungen- und Thymusgewebe, in denen ein höherer Proteinspiegel anderer Annexine nachweisbar ist, lässt sich im Leber- und Ovariengewebe der Annexin A1 *knock-out* Mäuse weniger Annexin A2 und A4, im Magen- und Nierengewebe weniger Annexin A6 Protein detektieren (FHannon, Croxtall et al. 2003). Über welchen Mechanismus dies reguliert wird, ist bisher nicht bekannt.

Dass Proteine sich gegenseitig auch auf posttranslationaler Ebene regulieren, zeigt für *Drosophila* z. B. die Interaktion der Spectrine untereinander. In β -Spectrin mutanten Klonen in der Augenimaginalscheibe ist weder β -Spectrin noch α -Spectrin nachweisbar. Eine Überexpression von β -Spectrin führt dazu, dass auch α -Spectrin

angereichert vorliegt (Hulsmeier, Pielage et al. 2007). Dies liegt wahrscheinlich daran, dass die Bindung an β -Spectrin für die Stabilisierung des α -Spectrins benötigt wird. Fehlt dieser stabilisierende Effekt, wird α -Spectrin abgebaut.

Annexin A5 ist in der Lage, an Modellmembranen laterale Aggregate zu bilden (Voges, Berendes et al. 1994; Reviakine, Bergsma-Schutter et al. 1998; Oling, Santos et al. 2000). Es wäre denkbar, dass auch die *Drosophila*-Annexine Aggregate ausbilden. Handelt es sich hierbei um Heteromere verschiedener Annexine, würde die Reduktion einer Komponente zur Zerstörung des Komplexes führen. Freie Annexine werden dann eventuell abgebaut.

Sequenzanalysen zeigen, dass der Bereich von *annexin b11^{long}* Exon 2 Homologien zu einigen Transkriptionsfaktoren der *Ascomyceten* aufweist. So ergeben sich 37 % Identität zum R1mA Transkriptionsfaktor aus *Emericella nidulans* bzw. 35 % Identität zum RfeR Transkriptionsfaktor aus *Aspergillus fumigatus*. Annexin B11^{long} lokalisiert besonders in Speicheldrüsenzellen, aber auch in anderen Geweben im Kern. Hier könnte Annexin B11^{long} als Transkriptionsfaktor direkt auf die Expression weiterer Gene, z. B. das *annexin b10* Gen, Einfluss nehmen.

Der gesamte genomische Bereich von *annexin b11* liegt innerhalb eines Introns des *fur 2* Gens. *fur 2* kodiert für die *Drosophila* Convertase Furin 2, die Zielgene durch Spaltung aktiviert (De Bie, Savaria et al. 1995). Der RNAi Mechanismus sollte jedoch nur auf Ebene der mRNA wirken. Ein Einfluss auf die *fur 2* Expression ist deshalb eher unwahrscheinlich.

4.4.4 Die Reduktion der Annexin Expression verursacht starke Zelldefekte

Wird die Expression eines *annexin* Gens innerhalb der Zelle reduziert, führt dies zu starken Zelldefekten. So kommt es nach Expression der *annexin b10* dsRNA bzw. der *annexin b11^{long}* dsRNA in allen betrachteten Geweben zum Zelltod. Wie zuvor beschrieben, kommt es in beiden Fällen zu einer Reduktion von sowohl *annexin b10* als auch *annexin b11^{long}*-Expression. Man betrachtet dementsprechend wahrscheinlich die doppelmutante Situation. Da die *annexin b10* Mutante vital ist, beruhen die hervorgerufenen Defekte jedoch wahrscheinlich auf dem Fehlen von Annexin B11^{long}.

Der Phänotyp entsteht kontinuierlich innerhalb der larvalen und pupalen Entwicklung der Fliege. Über die zeitlich regulierte Expression des Gal4 Repressors Gal80 konnte dies belegt werden. Je früher es zur Reduktion der *annexin b11^{long}*-Expression während der larvalen und pupalen Entwicklung kommt, desto stärker prägt sich der mutante Phänotyp aus.

4.4.5 Die Reduktion der Annexin Expression führt zu Apoptose

Nach Reduktion der *annexin b11^{long}*-Expression mittels RNAi kommt es zur Induktion von Zelltod. Dies konnte deutlich durch die Acridinorange Färbungen gezeigt werden. Die Induktion der regulierten Apoptose dient im Zellverband dazu, verletzte oder infizierte Zellen zu entfernen, um dem gesamten Gewebe nicht zu schaden (Hay and Guo 2006).

Ein weiterer Marker für Apoptose ist die Caspase 3, die für die proteolytische Spaltung von Proteinen verantwortlich ist (Fernandes-Alnemri, Litwack et al. 1994). Sie muss zunächst selber durch Spaltung aktiviert werden (Nicholson, Ali et al. 1995). Der in dieser Arbeit genutzte Antikörper erkennt nur die gespaltene, aktive Form des Enzyms. Aktivierte Caspase 3 ließ sich eindeutig in Bereichen nachweisen, in denen *annexin b11^{long}*-Expression durch RNAi reduziert worden war. Der Verlust der Annexin B11^{long} Funktion löst somit innerhalb der Zelle die Induktion der kontrollierten Apoptose aus.

Zur genetischen Analyse der Ursache für den Zelltod wurde der Effekt verschiedener Apoptoseinhibitoren im Hintergrund der *annexin b11^{long}*-RNAi Fliegen untersucht. Der programmierte Zelltod wird in *Drosophila* über die Caspasen Dronc und Drice und den Drice Inhibitor DIAP1 gesteuert. Sowohl die ektopische Expression von dominant negativ wirkendem Dronc als auch die Überexpression von DIAP1 sollte die Apoptoseinduktion im Gewebe verhindern (Hay and Guo 2006). Gleiches gilt für die Überexpression des Proteins p35. Dieses virale Protein kann in *Drosophila* Apoptose unterdrücken, indem es generell Caspasen inhibiert (Hay, Wolff et al. 1994; Asano, Nevins et al. 1996; Grewal, Li et al. 2005; Hay and Guo 2006; Lannan, Vandergaast et al. 2007).

Die Inhibierung von Apoptose führt in jedem untersuchten Fall zur Rettung des zuvor beschriebenen *annexin b11^{long}*-RNAi Augen- und Flügelphänotyps, d. h. der Induktion des Zelltods im jeweiligen Gewebe. Bei der Analyse der Flügel wird deutlich, dass sich alle beschriebenen Defekte abschwächen lassen. So kommt es

zur Bildung der normalen Zellzahl, auch das stereotype Haarmuster wird wieder eingehalten. Wahrscheinlich sind somit alle Aspekte des durch Expression der *annexin b11^{long}* dsRNA hervorgerufenen Phänotyps durch Induktion der Apoptose erklärbar.

4.4.5.1 Annexin als Regulator von Apoptose

Dadurch, dass es zu einer fast vollständigen Rettung des mutanten Phänotyps nach Koexpression von Apoptoseinhibitoren und der *annexin b11^{long}* dsRNA kommt, könnte Annexin B11^{long} direkt an der Regulation von Apoptose beteiligt sein.

Ein beschriebener essenzieller Inhibitor des Caspase-abhängigen Zelltods ist DIAP1 (Hay and Guo 2006). DIAP1 wirkt in der Zelle als E3 Ubiquitin Ligase und aktiviert durch Ubiquitinierung direkt die Degradation von z. B. Dronc und Rpr (Reaper) (Wilson, Goyal et al. 2002; Chai, Yan et al. 2003; Olson, Holley et al. 2003). Für verschiedene *Drosophila* Gewebe konnte gezeigt werden, dass der Verlust von *diap1* zum Zelltod führt. Dies bestätigten sowohl klonale Analysen im Auge als auch *knock-down* Ansätze in Zellkultur und larvalen Geweben (Igaki, Yamamoto-Goto et al. 2002; Muro, Hay et al. 2002; Yin and Thummel 2004; Leulier, Ribeiro et al. 2006). Genau wie der durch Reduktion der Expression von *annexin b11^{long}* verursachte Defekt, kann auch der durch *diap1* ausgelöste Phänotyp durch die Expression des Apoptoseinhibitors p35 oder durch eine Reduktion von Dronc vollständig unterdrückt werden (Muro, Berry et al. 2006). Es wird postuliert, dass der Verlust von *diap1* nicht nur zur Induktion von Apoptose führt, weil den Zellen die Fähigkeit zur Differenzierung fehlt oder andere zelluläre Prozesse gestört sind, sondern, dass die Regulation der Apoptose selbst gestört wird (Hay and Guo 2006).

Genetische Daten lassen vermuten, dass Annexin B11^{long} wie DIAP1 eine direkte antiapoptotische Funktion ausübt. Für das Ca²⁺- und Phospholipidbindende Protein Annexin B11^{long} ist der Zusammenhang nicht so einfach erklärbar wie für die Ubiquitin Ligase DIAP1. Um zunächst festzulegen, dass es sich wirklich um eine direkte Regulation von Apoptose und nicht um einen Sekundäreffekt handelt, müsste z. B. auch für Annexin B11^{long} Überexpression gezeigt werden, ob ein Dronc- oder Dronc- bedingter Überexpressionsdefekt abgeschwächt werden kann. Außerdem sollten noch weitere bekannte Komponenten der Apoptosekaskade auf ihr Verhalten gegenüber Annexin B11^{long} und *annexin b11^{long}*-RNAi getestet werden.

4.4.6 Verschiedenste Zelldefekte können die Induktion der Apoptose einleiten

4.4.6.1 Die Annexin Expression wird nicht für die Aufrechterhaltung der planaren Zellpolarität benötigt

Die Apoptose kann auch als Sekundäreffekt durch andere Defekte innerhalb der Zelle ausgelöst werden. Die Ursache für die regulierte Apoptose kann dabei grundsätzlich in vielen Aspekten der Regulation der Zelle liegen.

Epithelzellen, wie z. B. die Zellen der Flügelimaginalscheibe, zeigen eine apikobasale und planare Zellpolarität (Wasserscheid, Thomas et al. 2007). Der Verlust von apikobasalen Polaritätsmarkern wie z. B. Crumbs führt zum Zusammenbruch der epithelialen Identität. Es kommt zu vermehrtem Zelltod (Grawe, Wodarz et al. 1996). Annexin B11^{long} ist in Epithelzellen apikal lokalisiert. Eine Reduktion der *annexin b11^{long}*-Expression hatte jedoch keine Veränderung der Lokalisation von Crumbs, Armadillo oder Discs large zur Folge.

Auch Proteine, die an der Festlegung der planaren Zellpolarität beteiligt sind, befinden sich im apikalen Bereich der Zellen. Die planare Zellpolarität manifestiert sich in der regelmäßigen Anordnung der Flügelhaare. Eine Überexpression des Proteins Bazooka führt zu Defekten in der Haarorientierung des adulten Flügels (Wasserscheid, Thomas et al. 2007). Der Phänotyp ähnelt dem Bild nach der Reduktion der Annexin B11^{long}-Expression. Der Bazooka Überexpressionsphänotyp basiert auf der Fehllokalisierung des Proteins Flamingo. Dieses ist normalerweise an der proximalen und distalen apikalen Membran zu finden. Nach ektopischer Bazooka Expression, wird Flamingo an der gesamten apikalen Membran gefunden (Wasserscheid, Thomas et al. 2007). Nach Reduktion der *annexin b11^{long}*-Expression wirken sowohl Flamingo als auch die entstehenden Haare wildtypisch arrangiert. Dies zeigt, dass die Haare zunächst in ihrer korrekten Anordnung und Orientierung gebildet werden. Es muss daher geschlossen werden, dass Annexin B11^{long} wahrscheinlich keine essenzielle Funktion in der Etablierung oder Aufrechterhaltung der apikobasalen oder planaren Zellpolarität erfüllt.

4.4.6.2 Der Verlust der Annexin Expression führt zu keiner Veränderung der Organisation des Spectrin-Zytoskeletts

In vorangegangenen Arbeiten wurde gezeigt, dass die Überexpression der C-terminalen Domäne von β_H -Spectrin (H33) zur Expansion der Plasmamembran und so zur Bildung von Bi-Membranen Strukturen in den Zellen der Speicheldrüse führt (Williams, MacIver et al. 2004). In elektronenmikroskopischen Aufnahmen wird deutlich, dass die Membran aufgefaltet erscheint. Die Herabregulation der Annexin B9-Expression im Hintergrund der β_H -Spectrin Überexpression kann den beschriebenen Bi-Membranen Phänotyp abschwächen (Williams 2005).

Ein hieraus möglicherweise abzuleitender Einfluss der Annexine auf die Spectrin Lokalisation und Organisation wurde sowohl mit Überexpressionsdaten als auch im Hintergrund von *annexin b11^{long}*-RNAi analysiert. In keinem der untersuchten Gewebe und genetischen Hintergründe wurde eine Veränderung der Spectrin Strukturen festgestellt.

Es kann sein, dass die Organisation des Spectrin-Zytoskeletts so reguliert wird, dass eine Überexpression keinen Einfluss hat. Interessant wäre, welcher Phänotyp sich in Speicheldrüsen nach Annexin B9 Reduktion ergibt. Dieser ist jedoch bisher nicht näher beschrieben. Ob auch die Reduktion der anderen Annexine zu einer Abschwächung des für β_H -Spectrin (H33) Überexpression beschriebenen Phänotyps führt, wurde nicht untersucht.

4.4.6.3 Der Verlust der Annexin Expression führt zu keiner Veränderung der Organisation des F-Aktin-Zytoskeletts

Für verschiedene Annexine wurde beschrieben, dass sie mit F-Aktin interagieren können (Hayes, Rescher et al. 2004; Hayes, Shao et al. 2006). Auch die *Drosophila*-Annexine lassen sich *in vitro* zusammen mit F-Aktin präzipitieren (Chlystun 2006). In S2R+ Zellen sind sowohl F-Aktin als auch Annexin-GFP-Fusionsproteine speichenförmig angereichert.

Führt die Expression von Annexin auch *in vivo* zu verstärkter Polymerisation von freiem Aktin, so sollte dies im Gewebe sichtbar sein. Die F-Aktin-Struktur scheint jedoch nach Annexin Überexpression im Vergleich zur wildtypischen Situation nicht verdichtet. Auch nach Reduktion der *annexin b11^{long}*-Expression zeigt die Aktin Organisation keine Veränderungen.

Auf der einen Seite kann es sich bei den *in vitro* Ergebnissen der Aktin-Polymerisation und Präzipitation um Artefakte handeln. Andererseits können *in vivo* weitere intrazelluläre Regulationsmechanismen dazu führen, dass der Effekt auf Aktin so sehr abgeschwächt wird, dass er nicht offensichtlich ist.

4.4.6.4 Es konnte keine Annexin Funktion während der Zytokinese nachgewiesen werden

Annexin A11 lokalisiert zu unterschiedlichen Zeitpunkten des Zellzyklus spezifisch an unterschiedlichen Kompartimenten innerhalb der Zelle. Dabei wird es während der späten Zytokinese für die Bildung des *midbody*s benötigt. Die Tochterzellen werden nicht mehr vollständig voneinander abgeschnürt, die Zellen gehen Apoptose ein (Tomas, Futter et al. 2004).

In Flügelimaginalscheiben wurden nach Expression von *annexin b11^{long}* dsRNA keine mehrkernigen Zellen beobachtet. Eventuell gehen die nicht vollständig getrennten Zellen so schnell Apoptose ein, dass ein mehrkerniger Zustand nicht nachweisbar ist. Zur genaueren Analyse dieses Aspektes sollte die Lokalisation aller Annexine im Verlauf des Zellzyklus untersucht werden.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit sollten die *Drosophila*-Annexine in Bezug auf ihre Homologien, Lokalisation und Funktion näher charakterisiert werden.

Zunächst konnte gezeigt werden, dass alle *Drosophila-annexine* während der gesamten embryonalen Entwicklung exprimiert werden. Innerhalb der Zelle liegen die Annexine, wie erwartet als lösliche Proteine im Zytosol und in Verbindung mit der Plasmamembran vor. Annexin B11^{long} ist dabei vornehmlich im apikalen Bereich der Zelle zu finden. Annexin B11^{long} wird zusätzlich über einen noch nicht definierten Mechanismus in den extrazellulären Raum ausgeschleust.

Die im Zusammenhang mit dieser Arbeit generierten RNAi Linien konnten aufdecken, dass die Herabregulation über die RNAi-Konstrukte nicht streng spezifisch abläuft. Die mutanten Phänotypen entstehen nach Reduktion von sowohl der Annexin B11^{long}, als auch der Annexin B10 Funktion. Die Annexine werden dabei wahrscheinlich über noch nicht definierte posttranskriptionale Mechanismen reguliert und können innerhalb der Zelle redundant wirken. Die Charakterisierung von Doppel- und Trippelmutanten sollte dies bestätigen.

Die Reduktion der *Drosophila-annexin b11^{long}*-Expression mittels RNAi führt zu schweren Zelldefekten, die auf Apoptose beruhen. Es konnte gezeigt werden, dass Annexin B11^{long} keinen offensichtlichen Einfluss auf die Zellpolarität, das Aktin- und Spectrin-Zytoskelett oder die Zytokinese hat. Genetische Daten weisen daraufhin, dass Annexin B11^{long} direkt an der Regulation der Apoptoseinduktion beteiligt ist.

Innerhalb dieser Arbeit wurden die von M.Sestu generierten *annexin b10* Mutanten (Sestu 2006) bestätigt und detaillierter charakterisiert. Bei *annexin b10* handelt es sich demnach um ein nicht essenzielles Gen. Die aus den Exzisionsmutagenesen für *annexin b9* hervorgegangenen Linien müssen weiter in Bezug auf den *annexin b9* Locus und das Annexin B9-Protein untersucht werden.

Literaturverzeichnis

- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J. D. (1995). Molekularbiologie der Zelle, VCH.
- Arur, S., U. E. Uche, et al. (2003). "Annexin I is an endogenous ligand that mediates apoptotic cell engulfment." Dev Cell **4**(4): 587-98.
- Asano, M., J. R. Nevins, et al. (1996). "Ectopic E2F expression induces S phase and apoptosis in Drosophila imaginal discs." Genes Dev **10**(11): 1422-32.
- Ascough, K. R. (2004). "Endocytosis: Actin in the driving seat." Curr Biol **14**(3): R124-6.
- Bances, P., M. R. Fernandez, et al. (2000). "Annexin A11 (ANXA11) gene structure as the progenitor of paralogous annexins and source of orthologous cDNA isoforms." Genomics **69**(1): 95-103.
- Benaud, C., B. J. Gentil, et al. (2004). "AHNAK interaction with the annexin 2/S100A10 complex regulates cell membrane cytoarchitecture." J Cell Biol **164**(1): 133-44.
- Bennett, V. (1989). "The spectrin-actin junction of erythrocyte membrane skeletons." Biochim Biophys Acta **988**(1): 107-21.
- Bennett, V. and A. J. Baines (2001). "Spectrin and ankyrin-based pathways: metazoan inventions for integrating cells into tissues." Physiol Rev **81**(3): 1353-92.
- Bialkowska, K., T. C. Saido, et al. (2005). "SH3 domain of spectrin participates in the activation of Rac in specialized calpain-induced integrin signaling complexes." J Cell Sci **118**(Pt 2): 381-95.
- Bolke, L. (2003). "Untersuchungen zur Funktion des Drosophila Gens schizo." Diplomarbeit, Universität Münster.
- Brachvogel, B., J. Dikschas, et al. (2003). "Annexin A5 is not essential for skeletal development." Mol Cell Biol **23**(8): 2907-13.
- Brand, A. H. and N. Perrimon (1993). "Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes." Development **118**(2): 401-15.
- Castro-Caldas, M., C. B. Duarte, et al. (2002). "Dexamethasone induces the secretion of annexin I in immature lymphoblastic cells by a calcium-dependent mechanism." Mol Cell Biochem **237**(1-2): 31-8.
- Chai, J., N. Yan, et al. (2003). "Molecular mechanism of Reaper-Grim-Hid-mediated suppression of DIAP1-dependent Dronc ubiquitination." Nat Struct Biol **10**(11): 892-8.

-
- Chapman, E. R. (2002). "Synaptotagmin: a Ca(2+) sensor that triggers exocytosis?" Nat Rev Mol Cell Biol **3**(7): 498-508.
- Chasserot-Golaz, S., N. Vitale, et al. (2005). "Annexin 2 promotes the formation of lipid microdomains required for calcium-regulated exocytosis of dense-core vesicles." Mol Biol Cell **16**(3): 1108-19.
- Chen, M. S., R. A. Obar, et al. (1991). "Multiple forms of dynamin are encoded by shibire, a Drosophila gene involved in endocytosis." Nature **351**(6327): 583-6.
- Chlystun, M. (2006). "Molecular and biochemical studies on mouse and Drosophila annexins." Dissertation, Universität Münster.
- Clark, G. B., G. Thompson, Jr., et al. (2001). "Signal transduction mechanisms in plants: an overview." Curr Sci **80**(2): 170-7.
- Conner, S. D. and S. L. Schmid (2003). "Regulated portals of entry into the cell." Nature **422**(6927): 37-44.
- Creutz, C. E., S. Moss, et al. (1992). "Differential recognition of secretory vesicles by annexins. European Molecular Biology Organization Course "Advanced Techniques for Studying Secretion"." Biochem Biophys Res Commun **184**(1): 347-52.
- Creutz, C. E., C. J. Pazoles, et al. (1978). "Identification and purification of an adrenal medullary protein (synexin) that causes calcium-dependent aggregation of isolated chromaffin granules." J Biol Chem **253**(8): 2858-66.
- Creutz, C. E., W. J. Zaks, et al. (1987). "Identification of chromaffin granule-binding proteins. Relationship of the chromobindins to calelectrin, synhibin, and the tyrosine kinase substrates p35 and p36." J Biol Chem **262**(4): 1860-8.
- D'Alterio, C., D. D. Tran, et al. (2005). "Drosophila melanogaster Cad99C, the orthologue of human Usher cadherin PCDH15, regulates the length of microvilli." J Cell Biol **171**(3): 549-58.
- Daniels, S. B., M. McCarron, et al. (1985). "Dysgenesis-induced instability of rosy locus transformation in Drosophila melanogaster: analysis of excision events and the selective recovery of control element deletions." Genetics **109**(1): 95-117.
- Danielsen, E. M., B. van Deurs, et al. (2003). "'Nonclassical' secretion of annexin A2 to the luminal side of the enterocyte brush border membrane." Biochemistry **42**(49): 14670-6.
- De Bie, I., D. Savaria, et al. (1995). "Processing specificity and biosynthesis of the Drosophila melanogaster convertases dfurin1, dfurin1-CRR, dfurin1-X, and dfurin2." J Biol Chem **270**(3): 1020-8.
- de Cuevas, M., J. K. Lee, et al. (1996). "alpha-spectrin is required for germline cell division and differentiation in the Drosophila ovary." Development **122**(12): 3959-68.
-

- Debret, R., H. El Btaouri, et al. (2003). "Annexin A1 processing is associated with caspase-dependent apoptosis in BZR cells." FEBS Lett **546**(2-3): 195-202.
- Diakonova, M., V. Gerke, et al. (1997). "Localization of five annexins in J774 macrophages and on isolated phagosomes." J Cell Sci **110** (Pt 10): 1199-213.
- Dudu, V., P. Pantazis, et al. (2004). "Membrane traffic during embryonic development: epithelial formation, cell fate decisions and differentiation." Curr Opin Cell Biol **16**(4): 407-14.
- Ellis, M. C., E. M. O'Neill, et al. (1993). "Expression of Drosophila glass protein and evidence for negative regulation of its activity in non-neuronal cells by another DNA-binding protein." Development **119**(3): 855-65.
- Emans, N., J. P. Gorvel, et al. (1993). "Annexin II is a major component of fusogenic endosomal vesicles." J Cell Biol **120**(6): 1357-69.
- Entchev, E. V., A. Schwabedissen, et al. (2000). "Gradient formation of the TGF-beta homolog Dpp." Cell **103**(6): 981-91.
- Farnaes, L. and H. J. Ditzel (2003). "Dissecting the cellular functions of annexin XI using recombinant human annexin XI-specific autoantibodies cloned by phage display." J Biol Chem **278**(35): 33120-6.
- Faure, A. V., C. Migne, et al. (2002). "Annexin 2 "secretion" accompanying exocytosis of chromaffin cells: possible mechanisms of annexin release." Exp Cell Res **276**(1): 79-89.
- Fernandes-Alnemri, T., G. Litwack, et al. (1994). "CPP32, a novel human apoptotic protein with homology to Caenorhabditis elegans cell death protein Ced-3 and mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme." J Biol Chem **269**(49): 30761-4.
- FHannon, R., J. D. Croxtall, et al. (2003). "Aberrant inflammation and resistance to glucocorticoids in annexin 1-/- mouse." Faseb J **17**(2): 253-5.
- Filipenko, N. R. and D. M. Waisman (2001). "The C terminus of annexin II mediates binding to F-actin." J Biol Chem **276**(7): 5310-5.
- Fire, A., S. Xu, et al. (1998). "Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans." Nature **391**(6669): 806-11.
- Fischer, J. A., S. H. Eun, et al. (2006). "Endocytosis, endosome trafficking, and the regulation of Drosophila development." Annu Rev Cell Dev Biol **22**: 181-206.
- Fraser, A. G. and G. I. Evan (1997). "Identification of a Drosophila melanogaster ICE/CED-3-related protease, drICE." Embo J **16**(10): 2805-13.
- Fraser, A. G., N. J. McCarthy, et al. (1997). "drICE is an essential caspase required for apoptotic activity in Drosophila cells." Embo J **16**(20): 6192-9.

- Futter, C. E., S. Felder, et al. (1993). "Annexin I is phosphorylated in the multivesicular body during the processing of the epidermal growth factor receptor." J Cell Biol **120**(1): 77-83.
- Futter, C. E. and I. J. White (2007). "Annexins and endocytosis." Traffic **8**(8): 951-8.
- Gerke, V., C. E. Creutz, et al. (2005). "Annexins: linking Ca²⁺ signalling to membrane dynamics." Nat Rev Mol Cell Biol **6**(6): 449-61.
- Gerke, V. and S. E. Moss (1997). "Annexins and membrane dynamics." Biochim Biophys Acta **1357**(2): 129-54.
- Gerke, V. and S. E. Moss (2002). "Annexins: from structure to function." Physiol Rev **82**(2): 331-71.
- Gerke, V. and K. Weber (1984). "Identity of p36K phosphorylated upon Rous sarcoma virus transformation with a protein purified from brush borders; calcium-dependent binding to non-erythroid spectrin and F-actin." Embo J **3**(1): 227-33.
- Glenney, J. R., Jr. (1987). "Calpactins: calcium-regulated membrane-skeletal proteins." Biochem Soc Trans **15**(5): 798-800.
- Glenney, J. R., Jr., B. Tack, et al. (1987). "Calpactins: two distinct Ca⁺⁺-regulated phospholipid- and actin-binding proteins isolated from lung and placenta." J Cell Biol **104**(3): 503-11.
- Gonzalez-Gaitan, M. and H. Jackle (1999). "The range of spalt-activating Dpp signalling is reduced in endocytosis-defective Drosophila wing discs." Mech Dev **87**(1-2): 143-51.
- Graham, M. E., V. Gerke, et al. (1997). "Modification of annexin II expression in PC12 cell lines does not affect Ca(2+)-dependent exocytosis." Mol Biol Cell **8**(3): 431-42.
- Grawe, F., A. Wodarz, et al. (1996). "The Drosophila genes crumbs and stardust are involved in the biogenesis of adherens junctions." Development **122**(3): 951-9.
- Grewal, S. S., L. Li, et al. (2005). "Myc-dependent regulation of ribosomal RNA synthesis during Drosophila development." Nat Cell Biol **7**(3): 295-302.
- Gruenberg, J. (2001). "The endocytic pathway: a mosaic of domains." Nat Rev Mol Cell Biol **2**(10): 721-30.
- Gunsalus, K. C. and F. Piano (2005). "RNAi as a tool to study cell biology: building the genome-phenome bridge." Curr Opin Cell Biol **17**(1): 3-8.
- Hannon, R., J. D. Croxtall, et al. (2003). "Aberrant inflammation and resistance to glucocorticoids in annexin 1^{-/-} mouse." Faseb J **17**(2): 253-5.
- Hawkins, T. E., J. Roes, et al. (1999). "Immunological development and cardiovascular function are normal in annexin VI null mutant mice." Mol Cell Biol **19**(12): 8028-32.

-
- Hay, B. A. and M. Guo (2006). "Caspase-dependent cell death in *Drosophila*." Annu Rev Cell Dev Biol **22**: 623-50.
- Hay, B. A., T. Wolff, et al. (1994). "Expression of baculovirus P35 prevents cell death in *Drosophila*." Development **120**(8): 2121-9.
- Hayes, M. J., U. Rescher, et al. (2004). "Annexin-actin interactions." Traffic **5**(8): 571-6.
- Hayes, M. J., D. Shao, et al. (2006). "Regulation of actin dynamics by annexin 2." Embo J **25**(9): 1816-26.
- Herr, C., N. Smyth, et al. (2001). "Loss of annexin A7 leads to alterations in frequency-induced shortening of isolated murine cardiomyocytes." Mol Cell Biol **21**(13): 4119-28.
- Hinz, U., B. Giebel, et al. (1994). "The basic-helix-loop-helix domain of *Drosophila* lethal of scute protein is sufficient for proneural function and activates neurogenic genes." Cell **76**(1): 77-87.
- Hosoya, H., R. Kobayashi, et al. (1992). "Ca(2+)-regulated actin and phospholipid binding protein (68 kD-protein) from bovine liver: identification as a homologue for annexin VI and intracellular localization." Cell Motil Cytoskeleton **22**(3): 200-10.
- Huber, R., J. Romisch, et al. (1990). "The crystal and molecular structure of human annexin V, an anticoagulant protein that binds to calcium and membranes." Embo J **9**(12): 3867-74.
- Huber, R., M. Schneider, et al. (1990). "The calcium binding sites in human annexin V by crystal structure analysis at 2.0 Å resolution. Implications for membrane binding and calcium channel activity." FEBS Lett **275**(1-2): 15-21.
- Hulsmeier, J., J. Pielage, et al. (2007). "Distinct functions of alpha-Spectrin and beta-Spectrin during axonal pathfinding." Development **134**(4): 713-22.
- Igaki, T., Y. Yamamoto-Goto, et al. (2002). "Down-regulation of DIAP1 triggers a novel *Drosophila* cell death pathway mediated by Dark and DRONC." J Biol Chem **277**(26): 23103-6.
- Jackle, S., U. Beisiegel, et al. (1994). "Annexin VI, a marker protein of hepatocytic endosomes." J Biol Chem **269**(2): 1026-32.
- Jacob, R., M. Heine, et al. (2004). "Annexin II is required for apical transport in polarized epithelial cells." J Biol Chem **279**(5): 3680-4.
- Jahn, R., T. Lang, et al. (2003). "Membrane fusion." Cell **112**(4): 519-33.
- Johnston, P. A., M. S. Perin, et al. (1990). "Two novel annexins from *Drosophila melanogaster*. Cloning, characterization, and differential expression in development." J Biol Chem **265**(19): 11382-8.

- Jost, M., D. Zeuschner, et al. (1997). "Identification and characterization of a novel type of annexin-membrane interaction: Ca²⁺ is not required for the association of annexin II with early endosomes." J Cell Sci **110 (Pt 2)**: 221-8.
- Kamal, A., Y. Ying, et al. (1998). "Annexin VI-mediated loss of spectrin during coated pit budding is coupled to delivery of LDL to lysosomes." J Cell Biol **142(4)**: 937-47.
- Kennerdell, J. R. and R. W. Carthew (1998). "Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that frizzled and frizzled 2 act in the wingless pathway." Cell **95(7)**: 1017-26.
- Knop, M., E. Aareskjold, et al. (2004). "Rab3D and annexin A2 play a role in regulated secretion of vWF, but not tPA, from endothelial cells." Embo J **23(15)**: 2982-92.
- Knust, E. (2000). "Control of epithelial cell shape and polarity." Curr Opin Genet Dev **10(5)**: 471-5.
- Kobayashi, R. and Y. Tashima (1990). "Purification, biological properties and partial sequence analysis of 67-kDa calcimedlin and its 34-kDa fragment from chicken gizzard." Eur J Biochem **188(2)**: 447-53.
- Kotsyfakis, M., J. Vontas, et al. (2005). "The annexin gene family in the malaria mosquito *Anopheles gambiae*." Insect Mol Biol **14(5)**: 555-62.
- Kretsinger, R. H. (1980). "Structure and evolution of calcium-modulated proteins." CRC Crit Rev Biochem **8(2)**: 119-74.
- Kulkarni, M. M., M. Booker, et al. (2006). "Evidence of off-target effects associated with long dsRNAs in *Drosophila melanogaster* cell-based assays." Nat Methods **3(10)**: 833-8.
- Lafont, F., S. Lecat, et al. (1998). "Annexin XIIIb associates with lipid microdomains to function in apical delivery." J Cell Biol **142(6)**: 1413-27.
- Lander, A. D., Q. Nie, et al. (2002). "Do morphogen gradients arise by diffusion?" Dev Cell **2(6)**: 785-96.
- Langevin, J., R. Le Borgne, et al. (2005). "Lethal giant larvae controls the localization of notch-signaling regulators numb, neuralized, and Sanpodo in *Drosophila* sensory-organ precursor cells." Curr Biol **15(10)**: 955-62.
- Lannan, E., R. Vandergaast, et al. (2007). "Baculovirus Caspase Inhibitors P49 and P35 Block Virus-induced Apoptosis Downstream of Effector Caspase DrICE Activation in *Drosophila melanogaster*." J Virol.
- Laski, F. A., D. C. Rio, et al. (1986). "Tissue specificity of *Drosophila* P element transposition is regulated at the level of mRNA splicing." Cell **44(1)**: 7-19.
- Lecat, S., P. Verkade, et al. (2000). "Different properties of two isoforms of annexin XIII in MDCK cells." J Cell Sci **113 (Pt 14)**: 2607-18.

- Lee, J. K., E. Brandin, et al. (1997). "alpha-Spectrin is required for ovarian follicle monolayer integrity in *Drosophila melanogaster*." Development **124**(2): 353-62.
- Lee, Y. S. and R. W. Carthew (2003). "Making a better RNAi vector for *Drosophila*: use of intron spacers." Methods **30**(4): 322-9.
- Leulier, F., P. S. Ribeiro, et al. (2006). "Systematic in vivo RNAi analysis of putative components of the *Drosophila* cell death machinery." Cell Death Differ **13**(10): 1663-74.
- Lewit-Bentley, A., S. Rety, et al. (2000). "S100-annexin complexes: some insights from structural studies." Cell Biol Int **24**(11): 799-802.
- Liemann, S. and R. Huber (1997). "Three-dimensional structure of annexins." Cell Mol Life Sci **53**(6): 516-21.
- Liemann, S. and A. Lewit-Bentley (1995). "Annexins: a novel family of calcium- and membrane-binding proteins in search of a function." Structure **3**(3): 233-7.
- Lim, L. H. and S. Pervaiz (2007). "Annexin 1: the new face of an old molecule." Faseb J **21**(4): 968-75.
- Lin, H. C., T. C. Sudhof, et al. (1992). "Annexin VI is required for budding of clathrin-coated pits." Cell **70**(2): 283-91.
- Lindsley, D. L., Zimm, G.G. (1992). "The Genome of *Drosophila melanogaster*." Academic press.
- Ling, Q., A. T. Jacovina, et al. (2004). "Annexin II regulates fibrin homeostasis and neoangiogenesis in vivo." J Clin Invest **113**(1): 38-48.
- Lundstrom, A., M. Gallio, et al. (2004). "Vilse, a conserved Rac/Cdc42 GAP mediating Robo repulsion in tracheal cells and axons." Genes Dev **18**(17): 2161-71.
- Mayran, N., R. G. Parton, et al. (2003). "Annexin II regulates multivesicular endosome biogenesis in the degradation pathway of animal cells." Embo J **22**(13): 3242-53.
- McGuire, S. E., Z. Mao, et al. (2004). "Spatiotemporal gene expression targeting with the TARGET and gene-switch systems in *Drosophila*." Sci STKE **2004**(220): pl6.
- McMahon, H. T. and J. L. Gallop (2005). "Membrane curvature and mechanisms of dynamic cell membrane remodelling." Nature **438**(7068): 590-6.
- Meier, P., J. Silke, et al. (2000). "The *Drosophila* caspase DRONC is regulated by DIAP1." Embo J **19**(4): 598-611.
- Merrifield, C. J., U. Rescher, et al. (2001). "Annexin 2 has an essential role in actin-based macropinocytic rocketing." Curr Biol **11**(14): 1136-41.

- Mizutani, A., N. Watanabe, et al. (1995). "The long amino-terminal tail domain of annexin XI is necessary for its nuclear localization." Arch Biochem Biophys **318**(1): 157-65.
- Morgan, A. (1995). "Exocytosis." Essays Biochem **30**: 77-95.
- Moss, S. E. and R. O. Morgan (2004). "The annexins." Genome Biol **5**(4): 219.
- Muesch, A., E. Hartmann, et al. (1990). "A novel pathway for secretory proteins?" Trends Biochem Sci **15**(3): 86-8.
- Muller, H. A. and O. Bossinger (2003). "Molecular networks controlling epithelial cell polarity in development." Mech Dev **120**(11): 1231-56.
- Munck, A., P. M. Guyre, et al. (1984). "Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions." Endocr Rev **5**(1): 25-44.
- Muro, I., D. L. Berry, et al. (2006). "The Drosophila caspase Ice is important for many apoptotic cell deaths and for spermatid individualization, a nonapoptotic process." Development **133**(17): 3305-15.
- Muro, I., B. A. Hay, et al. (2002). "The Drosophila DIAP1 protein is required to prevent accumulation of a continuously generated, processed form of the apical caspase DRONC." J Biol Chem **277**(51): 49644-50.
- Nicholson, D. W., A. Ali, et al. (1995). "Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis." Nature **376**(6535): 37-43.
- Nurminsky, D. I., M. V. Nurminskaya, et al. (1998). "Selective sweep of a newly evolved sperm-specific gene in Drosophila." Nature **396**(6711): 572-5.
- Oliani, S. M., M. J. Paul-Clark, et al. (2001). "Neutrophil interaction with inflamed postcapillary venule endothelium alters annexin 1 expression." Am J Pathol **158**(2): 603-15.
- Oling, F., J. S. Santos, et al. (2000). "Structure of membrane-bound annexin A5 trimers: a hybrid cryo-EM - X-ray crystallography study." J Mol Biol **304**(4): 561-73.
- Olson, M. R., C. L. Holley, et al. (2003). "Reaper is regulated by IAP-mediated ubiquitination." J Biol Chem **278**(6): 4028-34.
- Perretti, M., H. Christian, et al. (2000). "Annexin I is stored within gelatinase granules of human neutrophil and mobilized on the cell surface upon adhesion but not phagocytosis." Cell Biol Int **24**(3): 163-74.
- Perretti, M. and R. J. Flower (2004). "Annexin 1 and the biology of the neutrophil." J Leukoc Biol **76**(1): 25-9.
- Perretti, M. and E. Solito (2004). "Annexin 1 and neutrophil apoptosis." Biochem Soc Trans **32**(Pt3): 507-10.

-
- Persechini, A., N. D. Moncrief, et al. (1989). "The EF-hand family of calcium-modulated proteins." Trends Neurosci **12**(11): 462-7.
- Petrov, D. A., Y. C. Chao, et al. (1998). "Pseudogene evolution in *Drosophila* suggests a high rate of DNA loss." Mol Biol Evol **15**(11): 1562-7.
- Petrov, D. A. and D. L. Hartl (1997). "Trash DNA is what gets thrown away: high rate of DNA loss in *Drosophila*." Gene **205**(1-2): 279-89.
- Petrov, D. A. and D. L. Hartl (1998). "High rate of DNA loss in the *Drosophila melanogaster* and *Drosophila virilis* species groups." Mol Biol Evol **15**(3): 293-302.
- Philip, J. G., R. J. Flower, et al. (1998). "Blockade of the classical pathway of protein secretion does not affect the cellular exportation of lipocortin 1." Regul Pept **73**(2): 133-9.
- Ponce, R. and D. L. Hartl (2006). "The evolution of the novel *Sdic* gene cluster in *Drosophila melanogaster*." Gene **376**(2): 174-83.
- Raju, U., M. Nunez-Regueiro, et al. (1993). "Identification of an annexin-like protein and its possible role in the *Aplysia* eye circadian system." J Neurochem **61**(4): 1236-45.
- Ranz, J. M., A. R. Ponce, et al. (2003). "Origin and evolution of a new gene expressed in the *Drosophila* sperm axoneme." Genetica **118**(2-3): 233-44.
- Raynal, P. and H. B. Pollard (1994). "Annexins: the problem of assessing the biological role for a gene family of multifunctional calcium- and phospholipid-binding proteins." Biochim Biophys Acta **1197**(1): 63-93.
- Rescher, U., A. Danielczyk, et al. (2002). "Functional activation of the formyl peptide receptor by a new endogenous ligand in human lung A549 cells." J Immunol **169**(3): 1500-4.
- Rescher, U. and V. Gerke (2004). "Annexins--unique membrane binding proteins with diverse functions." J Cell Sci **117**(Pt 13): 2631-9.
- Rescher, U. and V. Gerke (2007). "S100A10/p11: family, friends and functions." Pflugers Arch.
- Rescher, U., N. Zobiack, et al. (2000). "Intact Ca(2+)-binding sites are required for targeting of annexin 1 to endosomal membranes in living HeLa cells." J Cell Sci **113** (Pt 22): 3931-8.
- Rety, S., D. Osterloh, et al. (2000). "Structural basis of the Ca(2+)-dependent association between S100C (S100A11) and its target, the N-terminal part of annexin I." Structure **8**(2): 175-84.
- Reviakine, I. I., W. Bergsma-Schutter, et al. (1998). "Growth of Protein 2-D Crystals on Supported Planar Lipid Bilayers Imaged in Situ by AFM." J Struct Biol **121**(3): 356-61.

-
- Rick, M., S. I. Ramos Garrido, et al. (2005). "Nuclear localization of Annexin A7 during murine brain development." BMC Neurosci **6**(1): 25.
- Robertson, H. M., C. R. Preston, et al. (1988). "A stable genomic source of P element transposase in *Drosophila melanogaster*." Genetics **118**(3): 461-70.
- Rosengarth, A. and H. Luecke (2003). "A calcium-driven conformational switch of the N-terminal and core domains of annexin A1." J Mol Biol **326**(5): 1317-25.
- Ryder, E. and S. Russell (2003). "Transposable elements as tools for genomics and genetics in *Drosophila*." Brief Funct Genomic Proteomic **2**(1): 57-71.
- Sacre, S. M. and S. E. Moss (2002). "Intracellular localization of endothelial cell annexins is differentially regulated by oxidative stress." Exp Cell Res **274**(2): 254-63.
- Sakamoto, T., W. T. Repasky, et al. (1996). "Modulation of cell death pathways to apoptosis and necrosis of H₂O₂-treated rat thymocytes by lipocortin I." Biochem Biophys Res Commun **220**(3): 643-7.
- Satoh, H., H. Shibata, et al. (2002). "ALG-2 interacts with the amino-terminal domain of annexin XI in a Ca²⁺-dependent manner." Biochem Biophys Res Commun **291**(5): 1166-72.
- Schlaepfer, D. D. and H. T. Haigler (1987). "Characterization of Ca²⁺-dependent phospholipid binding and phosphorylation of lipocortin I." J Biol Chem **262**(14): 6931-7.
- Schnitzer, J. E., J. Liu, et al. (1995). "Endothelial caveolae have the molecular transport machinery for vesicle budding, docking, and fusion including VAMP, NSF, SNAP, annexins, and GTPases." J Biol Chem **270**(24): 14399-404.
- Seemann, J., K. Weber, et al. (1996). "The association of annexin I with early endosomes is regulated by Ca²⁺ and requires an intact N-terminal domain." Mol Biol Cell **7**(9): 1359-74.
- Sepp, K. J., J. Schulte, et al. (2001). "Peripheral glia direct axon guidance across the CNS/PNS transition zone." Dev Biol **238**(1): 47-63.
- Sestu, M. (2006). "Erzeugung und Analyse von Annexin Mutanten in *Drosophila melanogaster*." Diplomarbeit, Universität Münster.
- Solito, E., C. de Coupade, et al. (2001). "Transfection of annexin 1 in monocytic cells produces a high degree of spontaneous and stimulated apoptosis associated with caspase-3 activation." Br J Pharmacol **133**(2): 217-28.
- Sopkova-de Oliveira Santos, J., F. K. Oling, et al. (2000). "S100 protein-annexin interactions: a model of the (Anx2-p11)₂ heterotetramer complex." Biochim Biophys Acta **1498**(2-3): 181-91.
- Srivastava, M., I. Atwater, et al. (1999). "Defects in inositol 1,4,5-trisphosphate receptor expression, Ca²⁺ signaling, and insulin secretion in the anx7(+/-) knockout mouse." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(24): 13783-8.

- Stryer, L. (1996). Biochemie, Spektrum Akademischer Verlag.
- Swairjo, M. A. and B. A. Seaton (1994). "Annexin structure and membrane interactions: a molecular perspective." Annu Rev Biophys Biomol Struct **23**: 193-213.
- Thomas, G. H., D. C. Zarnescu, et al. (1998). "Drosophila betaHeavy-spectrin is essential for development and contributes to specific cell fates in the eye." Development **125**(11): 2125-34.
- Tokumitsu, H., A. Mizutani, et al. (1993). "Calcyclin-binding site located on the NH2-terminal domain of rabbit CAP-50 (annexin XI): functional expression of CAP-50 in Escherichia coli." Arch Biochem Biophys **303**(2): 302-6.
- Tomari, Y., T. Du, et al. (2007). "Sorting of Drosophila Small Silencing RNAs." Cell **130**(2): 299-308.
- Tomas, A., C. Futter, et al. (2004). "Annexin 11 is required for midbody formation and completion of the terminal phase of cytokinesis." J Cell Biol **165**(6): 813-22.
- Tomas, A. and S. E. Moss (2003). "Calcium- and cell cycle-dependent association of annexin 11 with the nuclear envelope." J Biol Chem **278**(22): 20210-6.
- Towle, C. A. and B. V. Treadwell (1992). "Identification of a novel mammalian annexin. cDNA cloning, sequence analysis, and ubiquitous expression of the annexin XI gene." J Biol Chem **267**(8): 5416-23.
- Tsuda, M., K. H. Seong, et al. (2006). "POSH, a scaffold protein for JNK signaling, binds to ALG-2 and ALIX in Drosophila." FEBS Lett **580**(13): 3296-300.
- Turpin, E., F. Russo-Marie, et al. (1998). "In adrenocortical tissue, annexins II and VI are attached to clathrin coated vesicles in a calcium-independent manner." Biochim Biophys Acta **1402**(2): 115-30.
- van Meer, G. and W. L. Vaz (2005). "Membrane curvature sorts lipids. Stabilized lipid rafts in membrane transport." EMBO Rep **6**(5): 418-9.
- Voges, D., R. Berendes, et al. (1994). "Three-dimensional structure of membrane-bound annexin V. A correlative electron microscopy-X-ray crystallography study." J Mol Biol **238**(2): 199-213.
- Wang, W. and C. E. Creutz (1994). "Role of the amino-terminal domain in regulating interactions of annexin I with membranes: effects of amino-terminal truncation and mutagenesis of the phosphorylation sites." Biochemistry **33**(1): 275-82.
- Wasserscheid, I., U. Thomas, et al. (2007). "Isoform-specific interaction of Flamingo/Starry Night with excess Bazooka affects planar cell polarity in the Drosophila wing." Dev Dyn **236**(4): 1064-71.
- Williams, J. A. (2005). "Deciphering the role of beta-heavy-Spectrin and its interaction with Annexin B9 during Drosophila melanogaster development." Dissertation, Pennsylvania State University.

- Williams, J. A., B. MacIver, et al. (2004). "The C-terminal domain of Drosophila (beta) heavy-spectrin exhibits autonomous membrane association and modulates membrane area." J Cell Sci **117**(Pt 5): 771-82.
- Wilson, R., L. Goyal, et al. (2002). "The DIAP1 RING finger mediates ubiquitination of Dronc and is indispensable for regulating apoptosis." Nat Cell Biol **4**(6): 445-50.
- Wodarz, A., U. Hinz, et al. (1995). "Expression of crumbs confers apical character on plasma membrane domains of ectodermal epithelia of Drosophila." Cell **82**(1): 67-76.
- Woods, D. F., J. W. Wu, et al. (1997). "Localization of proteins to the apico-lateral junctions of Drosophila epithelia." Dev Genet **20**(2): 111-8.
- Wucherpfennig, T., M. Wilsch-Brauninger, et al. (2003). "Role of Drosophila Rab5 during endosomal trafficking at the synapse and evoked neurotransmitter release." J Cell Biol **161**(3): 609-24.
- Yin, V. P. and C. S. Thummel (2004). "A balance between the diap1 death inhibitor and reaper and hid death inducers controls steroid-triggered cell death in Drosophila." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(21): 8022-7.
- Zerial, M. and H. McBride (2001). "Rab proteins as membrane organizers." Nat Rev Mol Cell Biol **2**(2): 107-17.
- Zobiack, N., U. Rescher, et al. (2003). "The annexin 2/S100A10 complex controls the distribution of transferrin receptor-containing recycling endosomes." Mol Biol Cell **14**(12): 4896-908.

Abbildungsverzeichnis

- Abb. E1: Schematische Darstellung der Annexin-Domänenstruktur
- Abb. MM1: Klonierungsstrategie für die Expression von pMal Annexin-Maltosefusionsproteinen
- Abb. MM2: Klonierungsstrategie von UAS-RNAi Konstrukten
- Abb. 1: Schematische Darstellung der Annexinstruktur
- Abb. 2: Sequenzvergleich der *Drosophila* Annexine mit humanem Annexin A5
- Abb. 3: Die *annexin b9* mRNA ist während der embryonalen Entwicklung von *Drosophila* dauerhaft nachweisbar
- Abb. 4: Die *annexin b10* mRNA ist während der embryonalen Entwicklung von *Drosophila* dauerhaft nachweisbar
- Abb. 5: Die *annexin b11* mRNA ist während der embryonalen Entwicklung von *Drosophila* dauerhaft nachweisbar
- Abb. 6: Über das Annexin B9-Antiserum lässt sich in Western Blot Analysen spezifisch Annexin B9 nachweisen
- Abb. 7: Über das Annexin B10-Antiserum lässt sich spezifisch Annexin B10 nachweisen
- Abb. 8: Test des Annexin B11_{short}-Antiserums
- Abb. 9: Über das Annexin B11_{Ex2}-Antiserum lässt sich spezifisch Annexin B11^{long} nachweisen
- Abb. 10: Die Annexine B10 und B11^{long} werden ubiquitär exprimiert
- Abb. 11: Mithilfe des Annexin B10-Antiserums werden vesikuläre Strukturen erkannt
- Abb. 12: Das Annexin B11^{long}-GFP-Fusionsprotein wird intrazellulär gespalten
- Abb. 13: Lokalisationsstudien in S2R+ Zellen und im Gewebe mithilfe der Annexin-GFP-Konstrukte
- Abb. 14: Kolokalisationsstudien von Annexin-GFP und F-Aktin in S2R+ Zellen
- Abb. 15: F-Aktin zeigt keine Akkumulation nach Überexpression von Annexin-GFP
- Abb. 16: Überexpression von Annexin B11^{long}-GFP führt zu intrazellulärer Aggregatbildung
- Abb. 17: Annexin B11^{long}-GFP-positive Strukturen fusionieren in S2R+ Zellen
- Abb. 18: Annexin B11^{long} lokalisiert an der apikalen Membran polarer Zellen
- Abb. 19: Das Annexin B11^{long}-Protein ist apikaler als Armadillo und Discs large lokalisiert
- Abb. 20: Das Annexin B11^{long}-Protein ist extrazellulär nachweisbar
- Abb. 21: Endogenes Annexin B11^{long} lässt sich nicht in Microvilli nachweisen
- Abb. 22: Annexin B11^{long} lässt sich extrazellulär nachweisen
- Abb. 23: Annexin B11^{long}-GFP zeigt Kolokalisation mit Dextran und mRFP
- Abb. 24: Die Antikörperfärbung von Annexin B11^{long} zeigt kein überlappendes Signal mit Dextran
- Abb.25: Annexin B11^{long} liegt nicht assoziiert mit Rab-positiven Strukturen vor
- Abb. 26: Die Organisation des Spectrin-Zytoskeletts wird durch die Überexpression von Annexin B11^{long}-GFP nicht beeinflusst
- Abb. 27: CG33941, CG33496, CG33487 und CG33498 entstanden wahrscheinlich aus *annexin b10* Duplikationen
- Abb. 28: Sequenzvergleich von *Drosophila annexin b10* mit den CGs CG33941, CG33496,

-
- CG33487 und CG33498
- Abb. 29: *annexin*-RNAi führt zu schweren Defekten während der Augenentwicklung
- Abb. 30: Reduktion der *annexin b11^{long}*-Expression führt zu deutlichen Borstendefekten auf Kopf und Thorax
- Abb. 31: Die Expression von *annexin b11^{long}* dsRNA verursacht starke Flügelphänotypen
- Abb. 32: Die Reduktion der *annexin b11^{long}*-Expression verursacht Gliadefekte in der Augenimaginalscheibe
- Abb. 33: Die Reduktion der *annexin b11^{long}*-Expression verursacht Gliadefekte in der Augenimaginalscheibe II
- Abb. 34: Der *annexin b10*-RNAi Phänotyp ist stark temperaturabhängig
- Abb. 35: Die Reduktion der *annexin b11^{long}*-Expression führt zur Deformation der Zellen
- Abb. 36: Die Reduktion der *annexin*-Expression führt zum Zelltod in der Imaginalscheibe
- Abb. 37: Der *annexin b11^{long}*-RNAi Augenphänotyp lässt sich durch die Koexpression von Apoptoseinhibitoren retten
- Abb. 38: Der Flügeldefekt beruht ebenfalls auf Apoptose
- Abb. 39: Als Folge der Expression von *annexin b11^{long}* dsRNA lässt sich aktivierte Caspase 3 nachweisen
- Abb. 40: In pupalen Flügeln zeigt sich nach Reduktion der *annexin b11^{long}*-Expression kein Polaritätsdefekt
- Abb. 41: Die Lokalisation von Polaritätsmarkern wird durch *annexin b11^{long}*-RNAi nicht beeinflusst
- Abb. 42: *annexin b11^{long}*-RNAi führt zu keiner Fehlverteilung von F-Aktin
- Abb. 43: *annexin b11^{long}*-RNAi führt zu keiner Fehlverteilung von Spectrinen in der Zelle
- Abb. 44: Die Zellteilung ist nach der Expression von *annexin b11^{long}* dsRNA nicht gestört
- Abb. 45: Kreuzungsschema der EMS Mutagenese
- Abb. 46: Der genomische Bereich 93A7- 93B13
- Abb. 47: Nachweis der genomischen Region um *annexin b9* in der Defizienz *Df(3R)Exel6272*
- Abb. 48: Die Charakterisierung der *annexin b10* Exzisionsmutanten #13, #65
- Abb. 49: Kreuzungsschema der Exzisionsmutagenese
- Abb. 50: Die Charakterisierung möglicher *annexin b9* Exzisionsmutanten
- Abb. 51: *annexin*-RNAi wirkt nicht vollkommen spezifisch

Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
Ak	Antikörper
Anx	Annexin
AS	Aminosäure
Bp	Basenpaare
BCIP	5-Brom-4-Chloro-3-Indolylphosphat
Ca ²⁺	Calciumion
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
DAB	Diaminobenzidin
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
Df	Defizienz
DIG	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylenglycoltetraacetat
EMS	Ethylmethylsulfonat
ER	endoplasmatisches Retikulum
EtOH	Ethanol
FCS	Fetal Calf Serum
GFP	Green Fluorescent Protein
GS	Goat Serum (Ziegenserum)
h	Stunde(n)
HRP	Meerrettichperoxidase
kb	kilo Basen
KDa	kilo Dalton
M	molar
min	Minuten
NaOCl	Natriumhypochlorid
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
PCR	Polymerasekettenreaktion
PS	Phosphatidylserin
PNS	Peripheres Nervensystem
RFP	Red Fluorescent Protein
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease A
rpm	Umdrehungen / Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
sek	Sekunden
UAS	<i>upstream activating sequence</i>
ü.N.	über Nacht
ZNS	Zentrales Nervensystem

Anhang

Verwendete Oligonukleotide

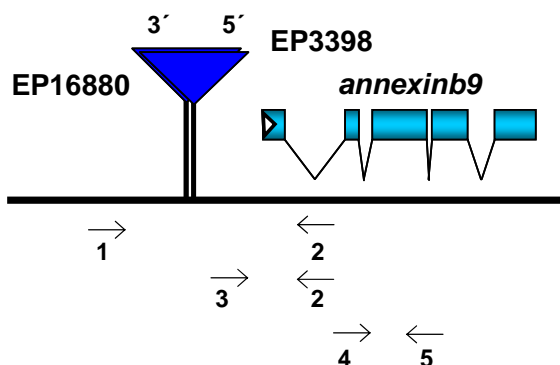
pWiz Klonierung

Anx b11 Ex 2A for.	TGGTGCTCTAGACCGCAAACCTTCGA
Anx b11 Ex 2A rev.	TTGATCGTATCTAGATCTCCATGTTGG
Anx b11 Ex 2B for.	TTTATAGGGTTCTAGAGAATGCCATCG
Anx b11 Ex 2B rev.	ATGCGCGTGCCCTCTAGACCATTC
Anx IX Ex 3 for.	CGAGAAGGCCATCATCTAGATCCTG
Anx IX Ex 3 rev.	TCGTTGCCCGATCTAGATTCTCGTAT
Anx X Ex 2 for.	ACCAGCAGAGGTCTAGACGATCAAG
Anx X Ex 2 rev.	GCTCGATGGTCTAGACCCGGAGAG

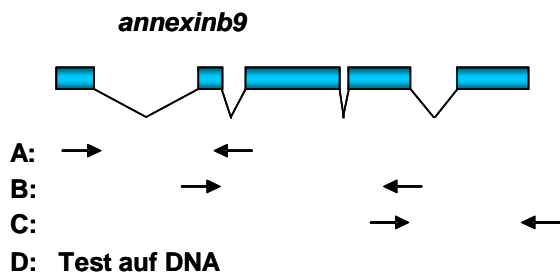
pMal Klonierung

EcoRI for neu IX Sall rev 09947	CAACAAACCGAATTCAAATGAGTTC TTTACCGTCGACTTTTACAGTGCATT
Anx X for EcoRI neu Xbal rev 25605	CAAGGAACCCAAGGAATTCTTCAG CAGACGACATCTAGAAAGCGATTT
EcoRI for 16395 19596 rev Sall com	ATCCACAGAATTCTCCATAGATACCTC ATTGATTGTCGACGTCGGATTTGGTT

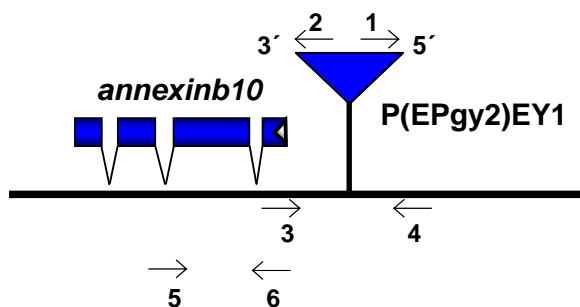
annexin b9 Nachweis (*Jump Outs*)



(1) Annexin Exon 1	AAACAGCTATGGTATTTATTACATC
(2) lower 2 cort anx	AATGGGAAAGCAAGAAAGGAACAGAAA
(3) cort anx upper	AAGAGACCAACAAACGGGAAACTAAC
(4) Annexin IX Ex 3 for	CGAGAAGGCCATCATCTAGATCCTG
(5) Annexin IX Ex 3 rev	TCGTTGCCCGATCTAGATTCTCGTAT

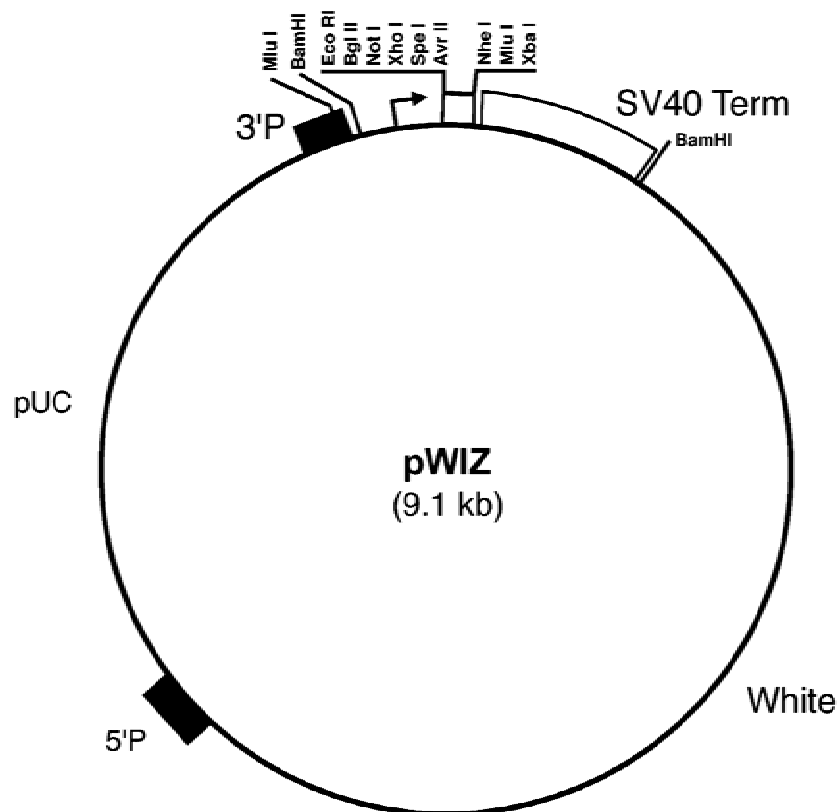
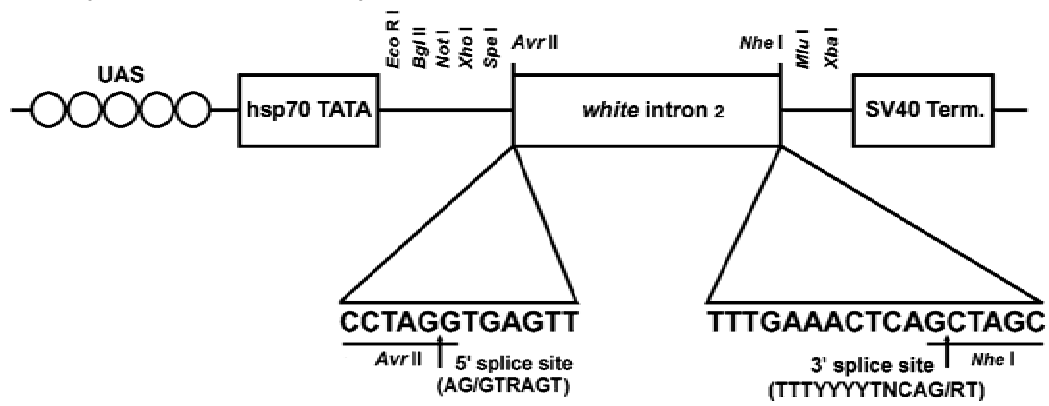
annexin b9 Nachweis (Df(3R)Exel6272)

A:	Upstream 10291	CCAACAAACGGGAAACTAACTG
	Seq1 rev	ATGGGAAAGCAAGAAAGGAACAGA
B:	Seq3 for	CACCGGTCGGCAAGGAAAACATAA
	Seq3 rev	CGCCGGATGTATCGCCCTAAAA
C:	Seq4 for	TGCGTGTGCTTGCCAGAACT
	Seq4 rev	AXGXXXGGTGTGAAGATAGACGA
D:	Anx b11 Ex 2A for.	TGGTGCTCTAGACCGCAAACCTTCGA
	Anx b11 Ex 2A rev.	TTGATCGTATCTAGATCTCCATGTTGG

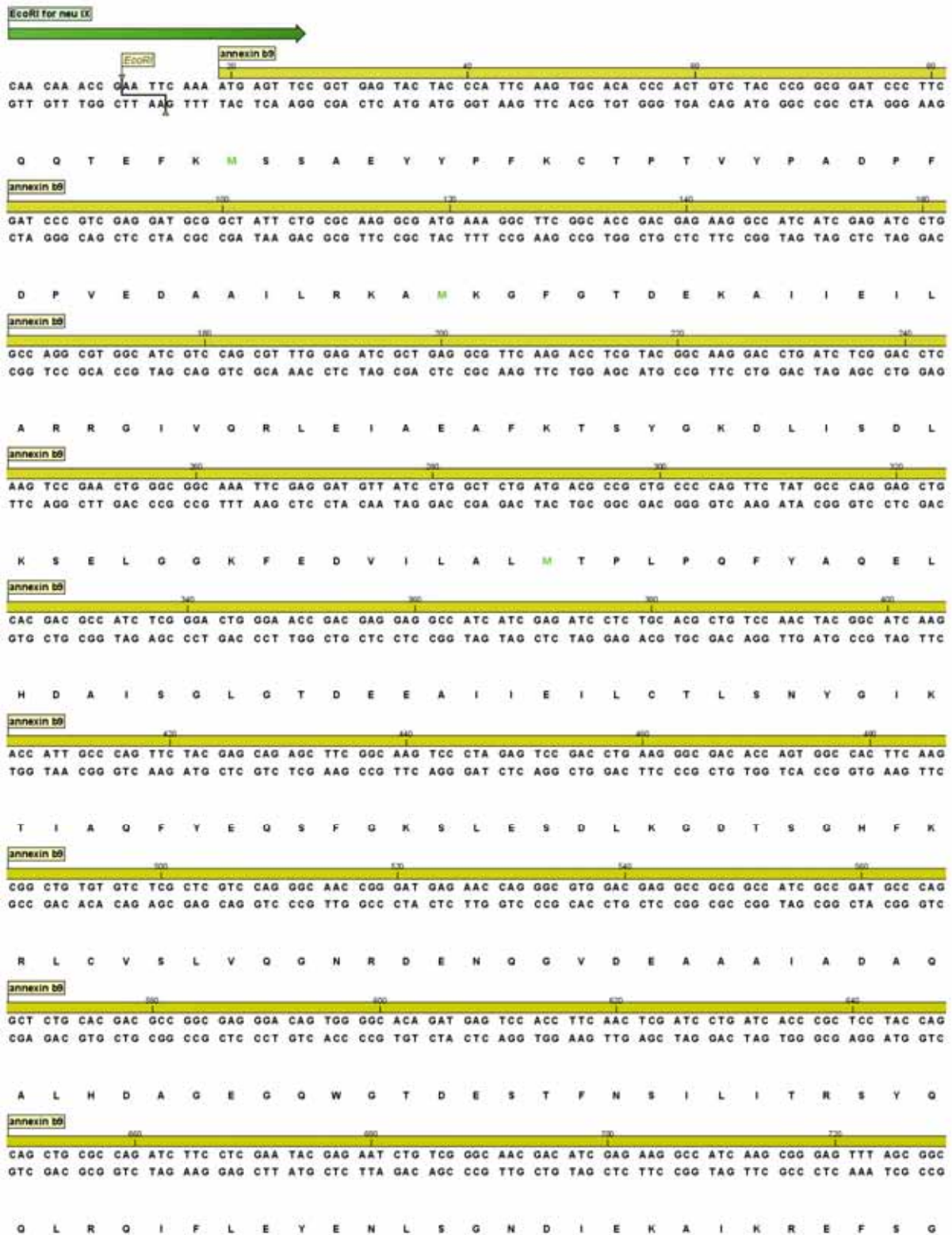
annexin b10 Nachweis

(1)	Pry4	CAATCATATCGCTGTCTACTCA
(2)	205	CGACGGTACCACCTTATGTT
(3)	AnnX Primer 5-l	GAGCTGCGTCCTTAACCGT
(4)	AnnX Primer 3-r	TGCCGAATGAATCAGTTGAT
(5)	Anx X Ex 2 for.	ACCAGCAGAGGTCTAGACGATCAAG
(6)	Anx X Ex 2 rev.	GCTCGATGGTCTAGACCCGGAGAG

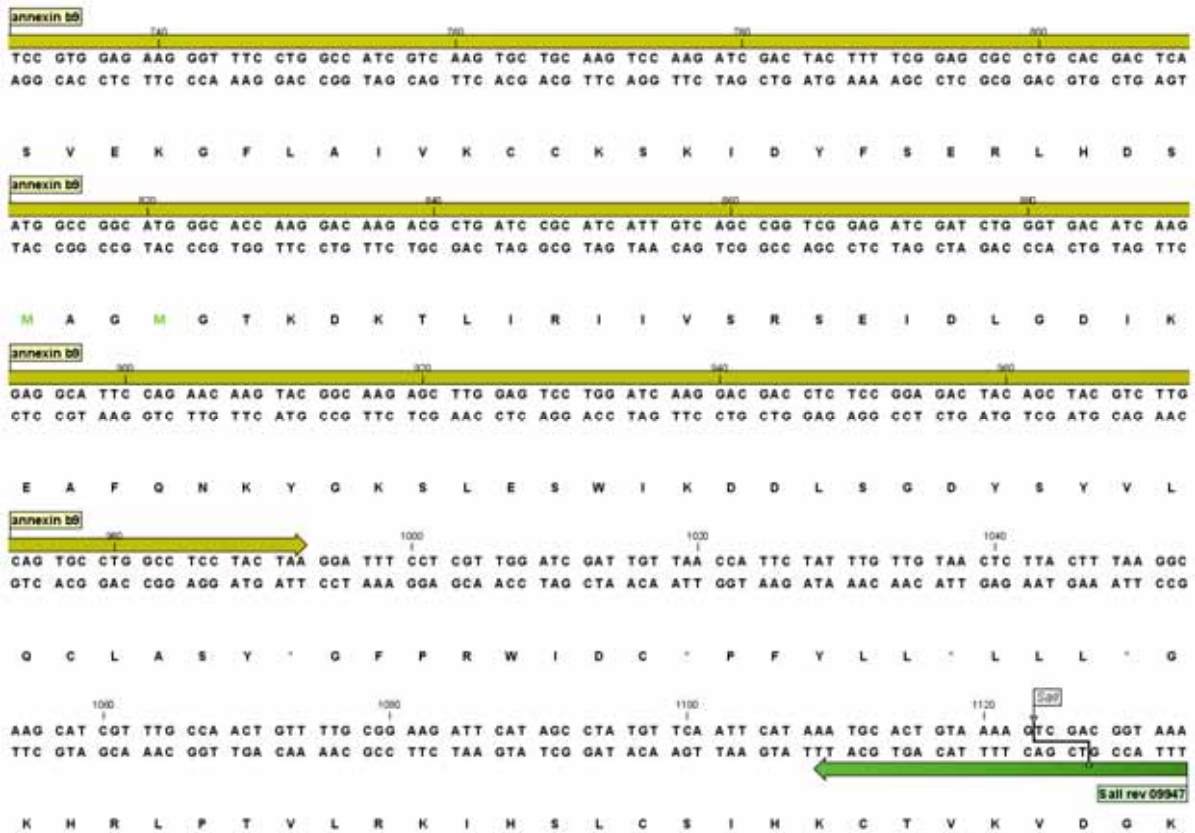
pWIZ Vektorkarte aus Lee, Y.S. and Carthew, R.W. 2003. Making a better RNAi vector for *Drosophila*: Use of intron spacers. *Methods* 30: 322–329



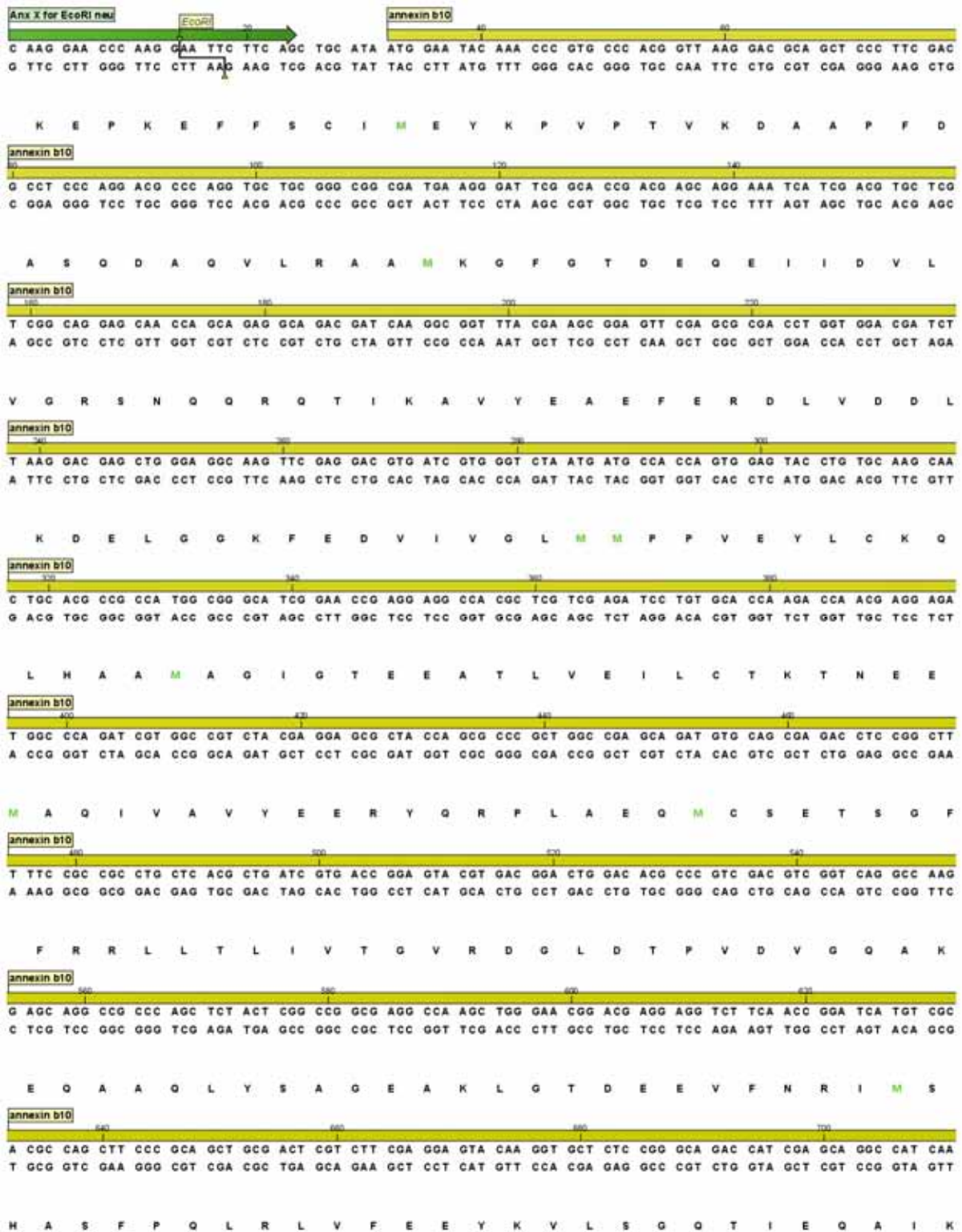
annexin b9 wurde anhand der cDNA Sequenz (LD09947) amplifiziert und über die *EcoRI*/*Sall* Schnittstellen in den pMal Vektor kloniert.



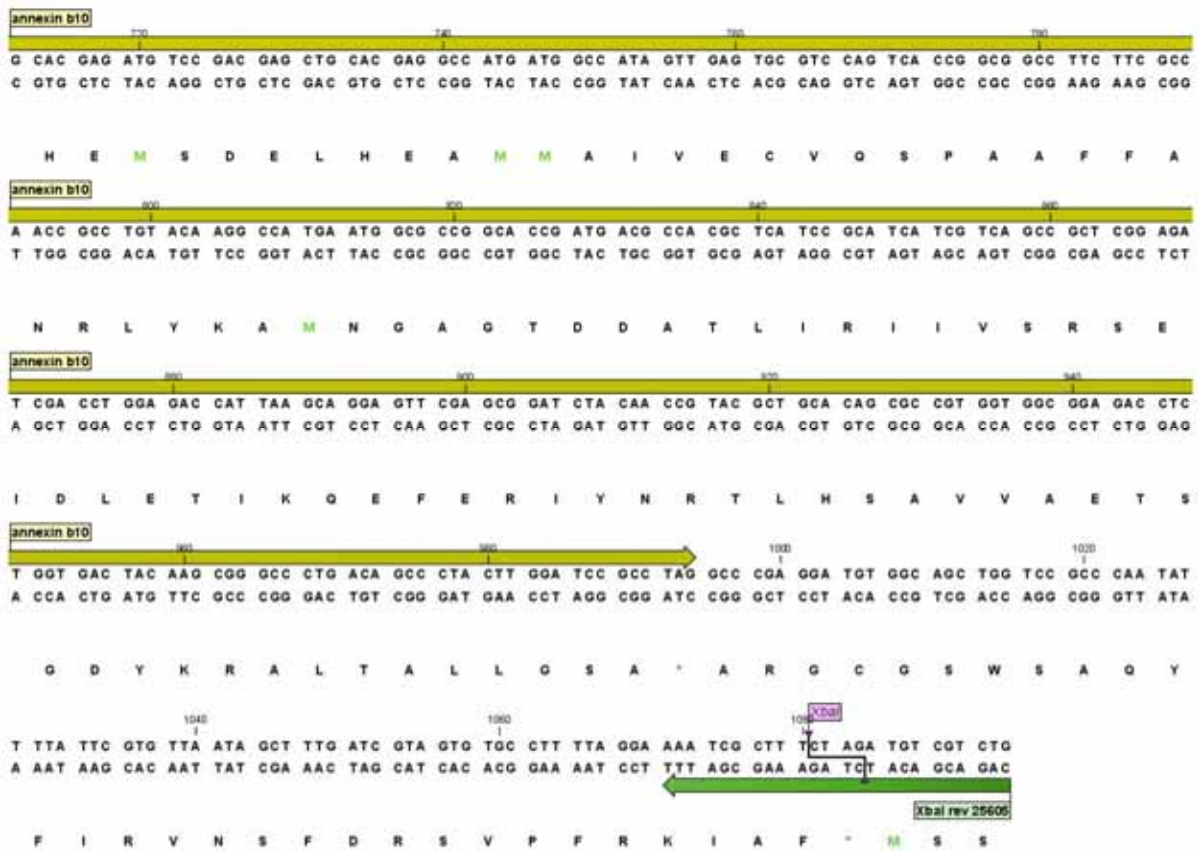
annexin b9 wurde anhand der cDNA Sequenz (LD09947) amplifiziert und über die *EcoRI*/*Sall* Schnittstellen in den pMal Vektor kloniert (Fortsetzung).



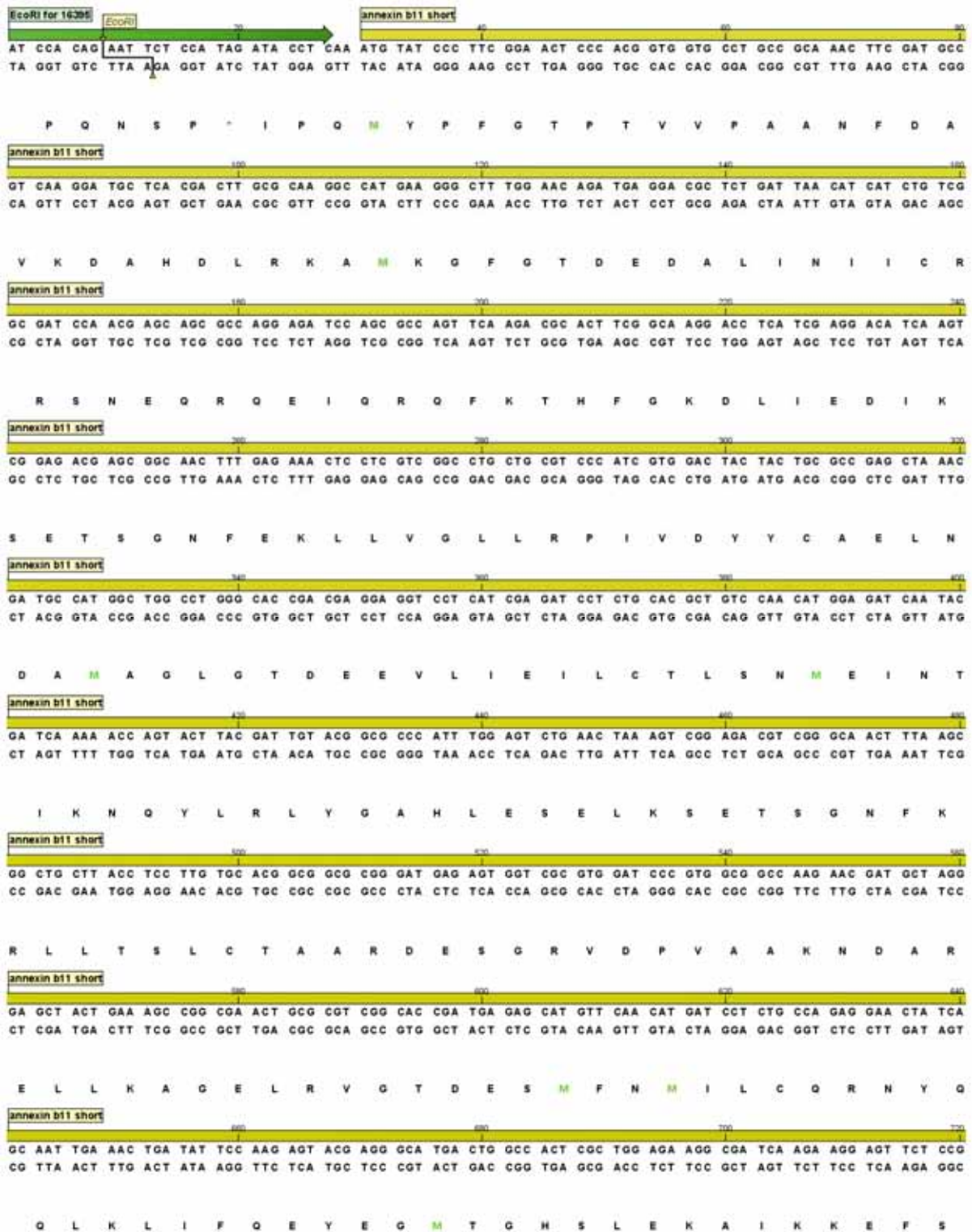
annexin b10 wurde anhand der cDNA Sequenz (LD25605) amplifiziert und über die *EcoRI*/*XbaI* Schnittstellen in den pMal Vektor kloniert.



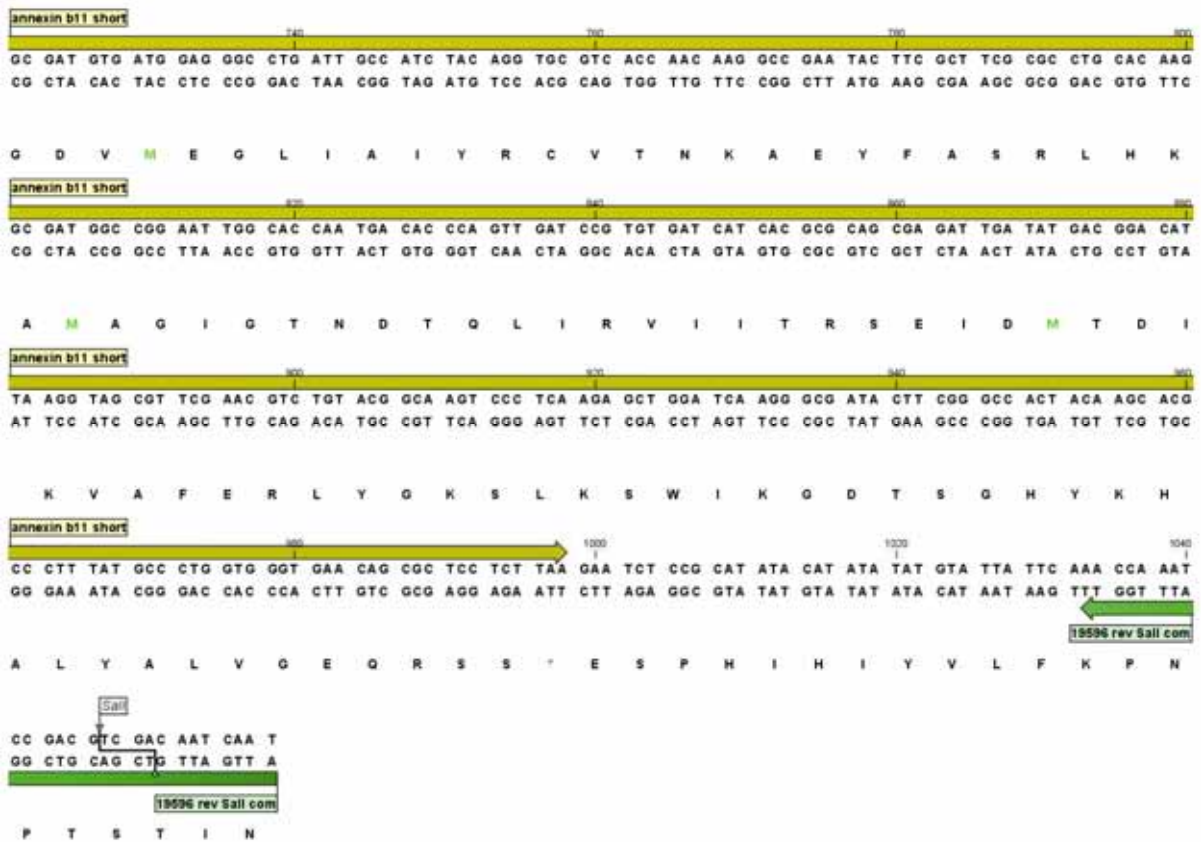
annexin b10 wurde anhand der cDNA Sequenz (LD25605) amplifiziert und über die *EcoRI*/*XbaI* Schnittstellen in den pMal Vektor kloniert (Fortsetzung).



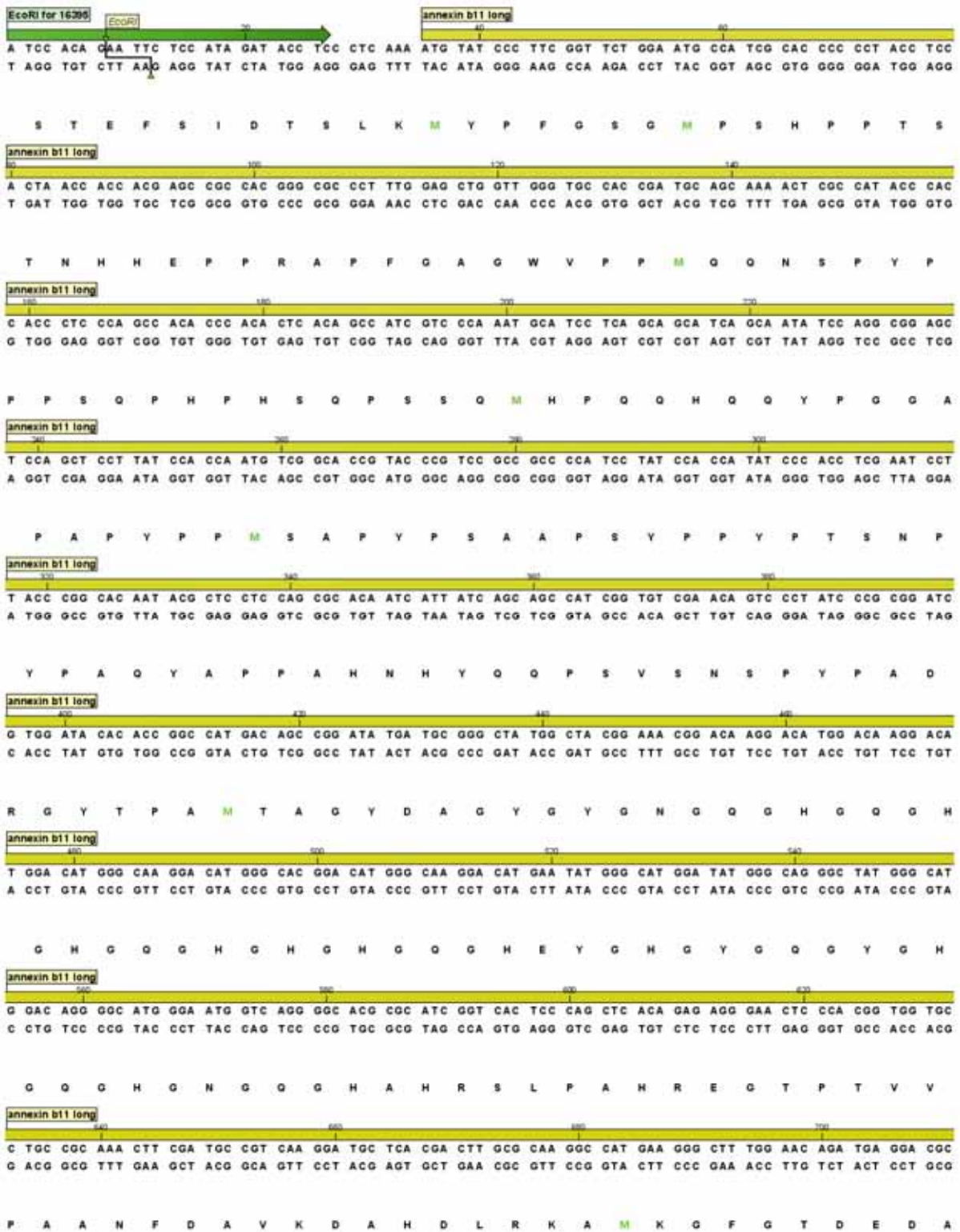
annexin b1^{short} wurde anhand der cDNA Sequenz (GH16395) amplifiziert und über die *EcoRI*/*Sall* Schnittstellen in den pMal Vektor kloniert.



annexin b1^{short} wurde anhand der cDNA Sequenz (GH16395) amplifiziert und über die *EcoRI*/*Sall* Schnittstellen in den pMal Vektor kloniert (Fortsetzung).



annexin b1^{long} wurde anhand der cDNA Sequenz (LD19596) amplifiziert und über die *EcoRI*/*Sall* Schnittstellen in den pMal Vektor kloniert.



annexin b1^{long} wurde anhand der cDNA Sequenz (LD19596) amplifiziert und über die *EcoRI*/*Sall* Schnittstellen in den pMal Vektor kloniert (Fortsetzung).

annexin b11 long

T CTG ATT AAC ATC ATC TGT CGG CGA TCC AAC GAG CAG CGC CAG GAG ATC CAG CGC CAG TTC AAG ACG CAC TTC GGC AAG
A GAC TAA TTG TAG TAG ACA GCC GCT AGG TTG CTC GTC GCG GTC CTC TAG GTC GCG GTC AAG TTC TGC GTG AAG CCG TTC

L I N I I C R R S N E Q R Q E I Q R Q F K T H F G K

annexin b11 long

G ACC TCA TCG AGG ACA TCA AGT CGG AGA CGA GCG GCA ACT TTG AGA AAC TCC TCG TCG GCC TGC TGC GTC CCA TCG TGG
C TGG AGT AGC TCC TGT AGT TCA GCC TCT GCT CCG COT TGA AAC TCT TTG AGG AGC AGC CGG ACG ACG CAG GGT AGC ACC

D L I E D I K S E T S G N F E K L L V G L L R P I V

annexin b11 long

A CTA CTA CTG CGC CGA GCT AAA CGA TCC CAT GGC TGG CCT GGG CAC CGA CGA GGA GGT CCT CAT CGA GAT CCT CTG CAC
T GAT GAT GAC GCG GCT CGA TTT GCT ACG GTA CCG ACC GGA CCC GTG GCT GCT CCT CCA GGA GTA GCT CTA GGA GAC GTG

D Y Y C A E L N D A M A G L G T D E E V L I E I L C T

annexin b11 long

G CTG TCC AAC ATG GAG ATC AAT ACG ATC AAA AAC CAG TAC TTA CGA TTG TAC GGC GCC CAT TTG GAG TCT GAA CTA AAG
C GAC AGG TTG TAC CTC TAG TTA TGC TAG TTT TTG GTC ATG AAT GCT AAC ATG CCG CGG GTA AAC CTC AGA CTT GAT TTC

L S N M E I N T I K N Q Y L R L Y G A H L E S E L K

annexin b11 long

T CGG AGA CGT CGG GCA ACT TTA AGC GGC TGC TTA CCT CCT TGT GCA CGG CGG CGC GGG ATG AGA GTG GTC GCG TGG ATC
A GCC TCT GCA GCC COT TGA AAT TCG CCG ACG AAT GGA GGA ACA COT GCC GCC GCG CCC TAC TCT CAC CAG CCG ACC TAG

S E T S G N F K R L L T S L C T A A R D E S G R V D

annexin b11 long

C CGT GGC GGC CAA GAA CGA TGC TAG GGA GCT ACT GAA AGC CGG CGA ACT GCG CGT CGG CAC CGA TGA GAG CAT GTT CAA
G GCA CCG CCG GTT CTT GCT ACG ATC CCT CGA TGA CTT TCG GCC GCT TGA CGC GCA GCC GTG GCT ACT CTC GTA CAA GTT

F V A A K N D A R E L L K A G E L R V G T D E S M F N

annexin b11 long

C ATG ATC CTC TGC CAG AGG AAC TAT CAG CAA TTG AAA CTG ATA TTC CAA GAG TAC GAG GGC ATG ACT GGC CAC TCG CTG
G TAC TAG GAG ACG GTC TCC TTG ATA GTC GTT AAC TTT GAC TAT AAG GTT CTC ATG CTC CCG TAC TGA CCG GTG AGC GAC

M I L C G R N Y Q Q L K L I F Q E Y E G M T G H S L

annexin b11 long

G AGA AGG CGA TCA AGA AGG AGT TCT CCG GCG ATG TGA TGG AGG GCC TGA TTG CCA TCT ACA GGT GCG TCA CCA ACA AGG
C TCT TCC GCT AGT TCT TCC TCA AGA GGC CCG TAC ACT ACC TCC CGG ACT AAC GGT AGA TGT CCA CGC AGT GGT TGT TCC

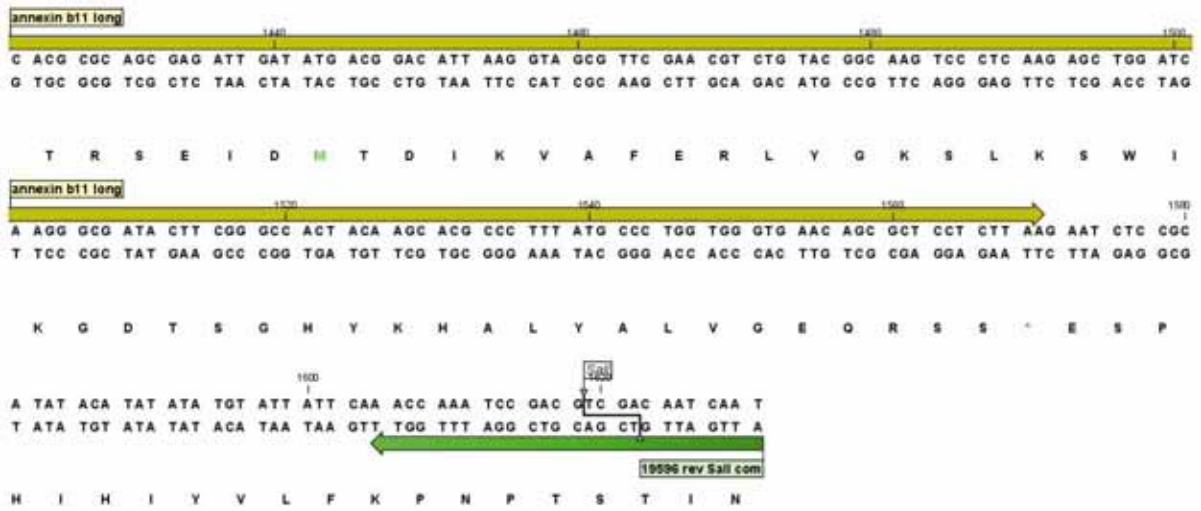
E K A I K K E F S G D V M E G L I A I Y R C V T N K

annexin b11 long

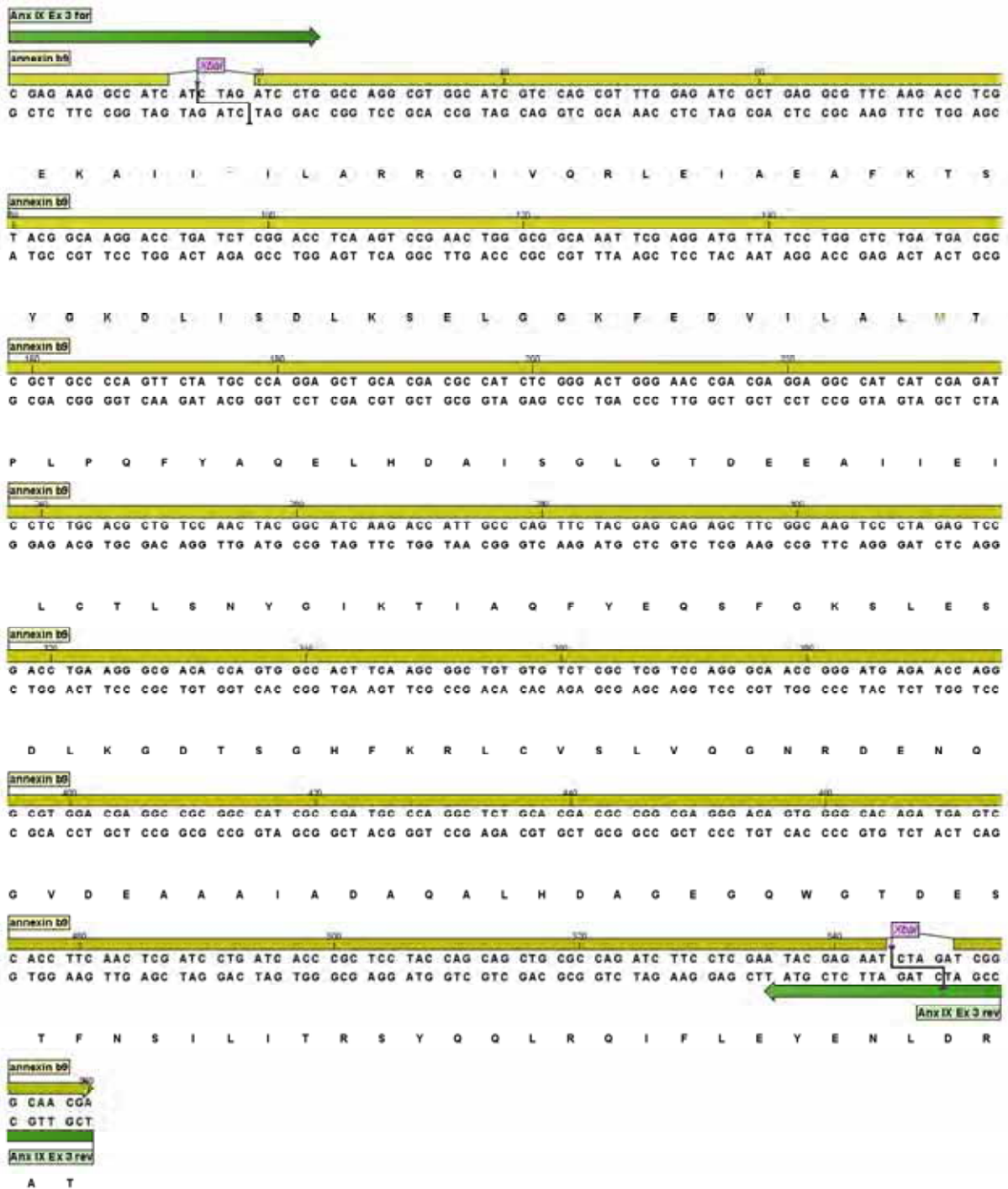
C CGA ATA CTT CGC TTC GCG CCT GCA CAA GGC GAT GGC CGG AAT TGG CAC CAA TGA CAC CCA GTT GAT CCG TGT GAT CAT
G GCT TAT GAA GCG AAG CCG GGA CGT GTT CCG CTA CCG GCC TTA ACC GTG GTT ACT GTG GGT CAA CTA GCC ACA CTA GTA

A E Y F A S R L H K A M A G I G T N D T Q L I R V I I

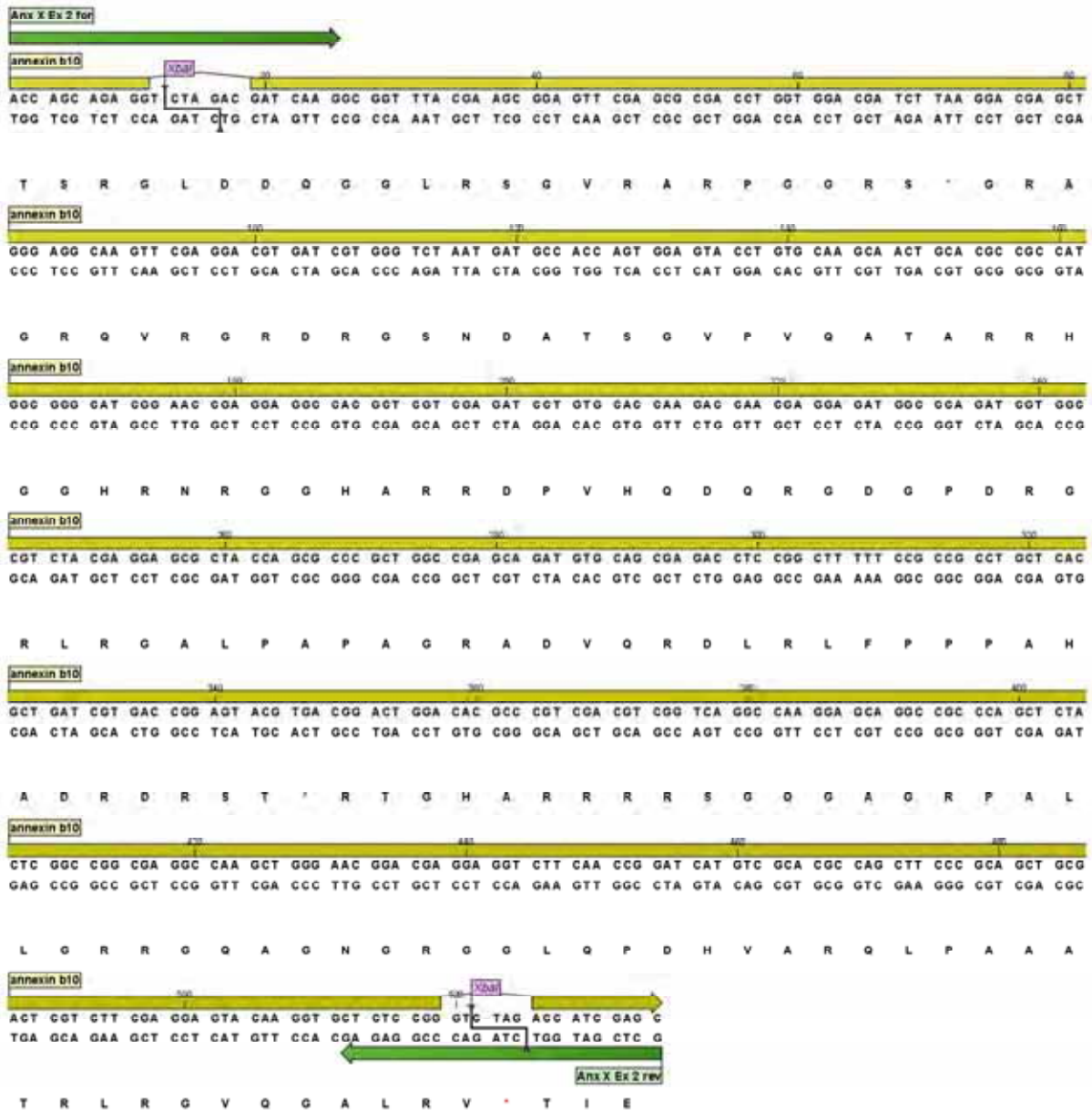
annexin b1^{long} wurde anhand der cDNA Sequenz (LD19596) amplifiziert und über die *EcoRI*/*Sall* Schnittstellen in den pMal Vektor kloniert (Fortsetzung II).



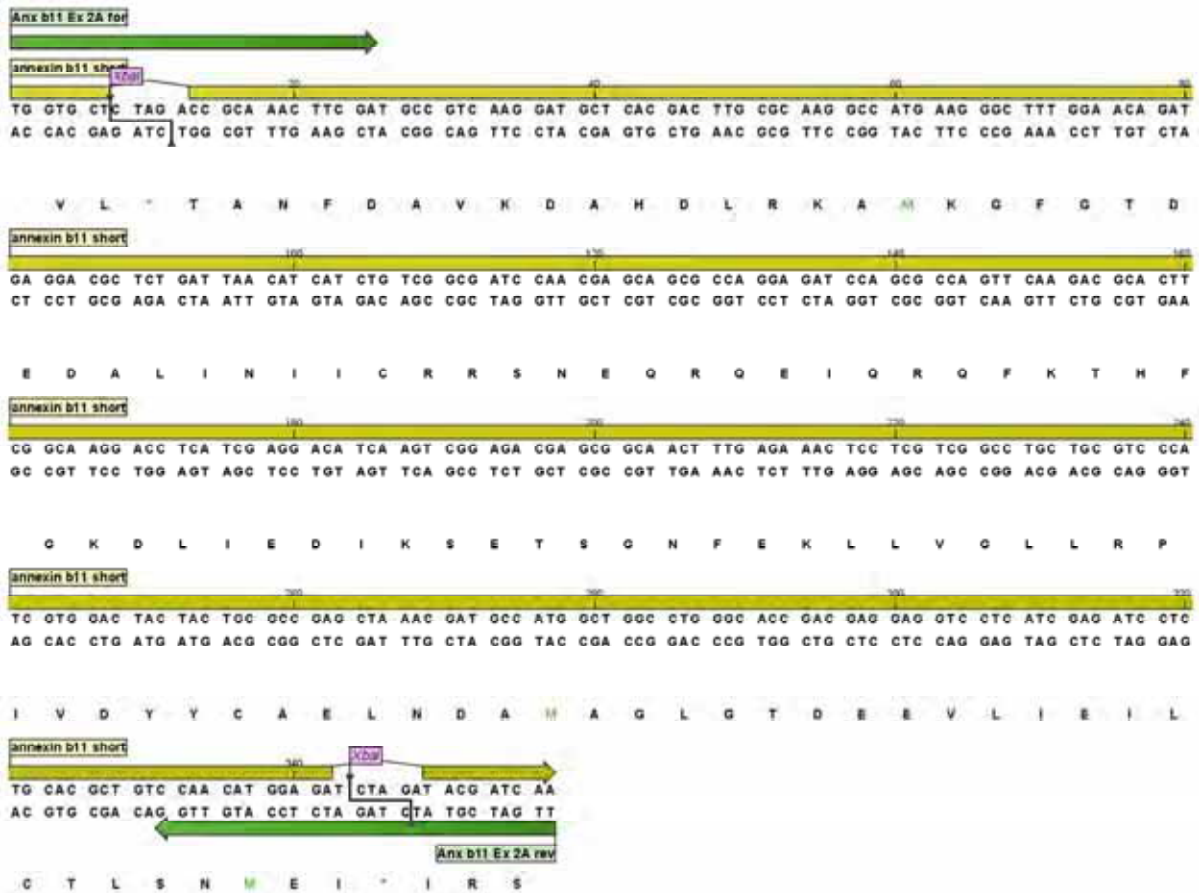
Der aus Exon 3 ausgewählte Bereich des *annexin b9* Gens wurde anhand der cDNA Sequenz (LD09947) amplifiziert (557 bp) und in den pWiz Vektor kloniert.



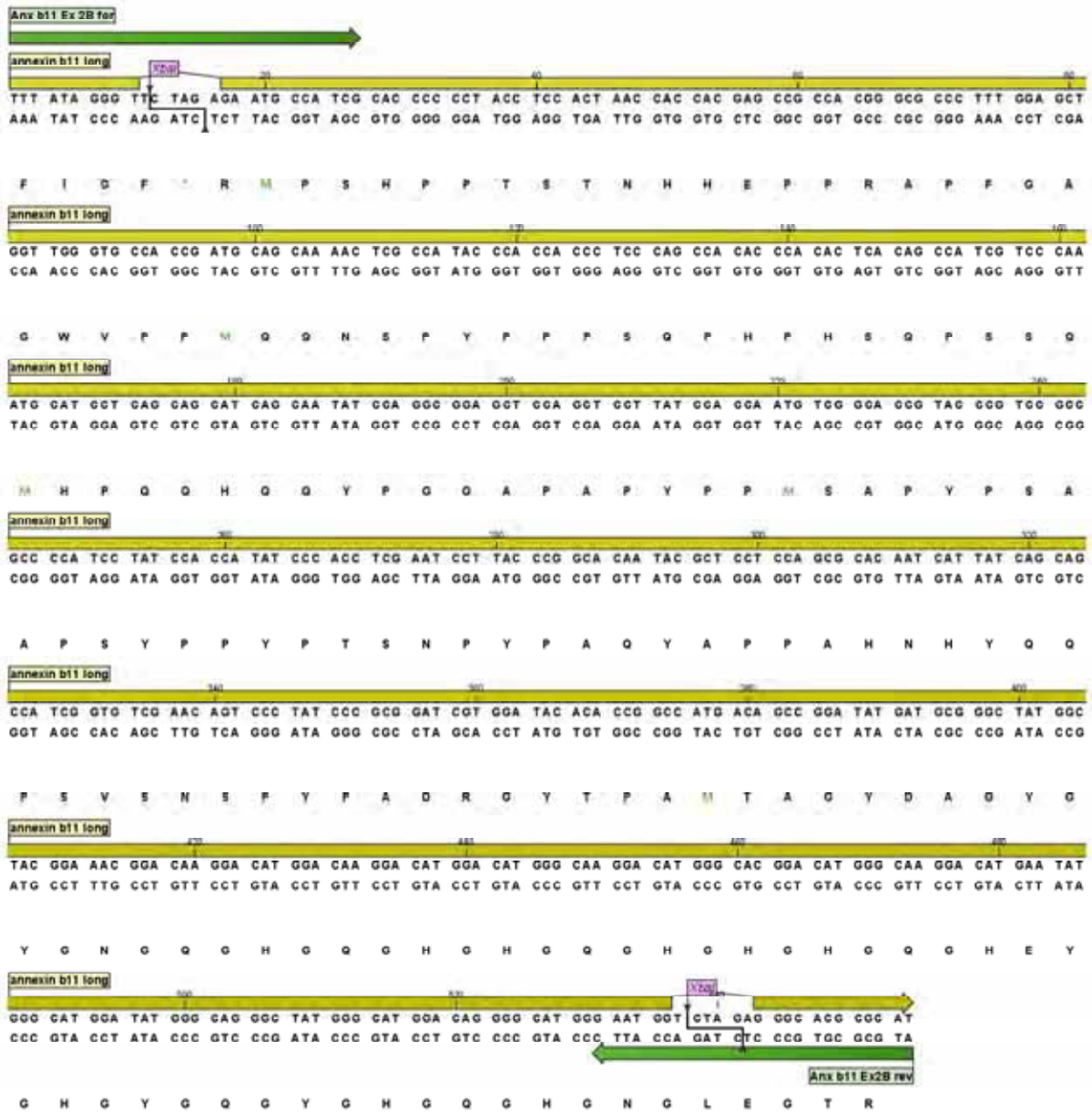
Der aus Exon 2 ausgewählte Bereich des *annexin b10* Gens wurde anhand der cDNA Sequenz (LD25605) amplifiziert (530 bp) und in den pWiz Vektor kloniert.



Der aus Exon 2 ausgewählte Bereich des *annexin b11^{short}* Gens wurde anhand der cDNA Sequenz (GH16395) amplifiziert (351 bp) und in den pWiz Vektor kloniert.



Der aus Exon 2 ausgewählte Bereich des *annexin b11^{long}* Gens wurde anhand der cDNA Sequenz (LD19596) amplifiziert (549 bp) und in den pWiz Vektor kloniert.



Vorhergesagte annexin b9 RNAi off-target Kandidaten (<http://dscheck.RNAi.jp>)[dsRNA Design page](#) / [dsRNA Verification page](#)**off-target candidate sequences** [help]

mis=0	mis=1	mis=2	name of off-target candidate sequence		
542	17	15	gi 45553446 ref NM_206531.1	Drosophila melanogaster	CG5730-PC, isoform C (AnnIX) mRNA, complete cds
542	17	15	gi 19549384 ref NM_057255.2	Drosophila melanogaster	CG5730-PB, isoform B (AnnIX) mRNA, complete cds
542	17	15	gi 45553444 ref NM_206530.1	Drosophila melanogaster	CG5730-PD, isoform D (AnnIX) mRNA, complete cds
542	17	15	gi 24648612 ref NM_057256.3	Drosophila melanogaster	CG5730-PA, isoform A (AnnIX) mRNA, complete cds
11	4	21	gi 24642522 ref NM_167519.1	Drosophila melanogaster	CG9960-PB, isoform B (Anxb11) mRNA, complete cds
11	4	21	gi 24642521 ref NM_078646.2	Drosophila melanogaster	CG9960-PA, isoform A (Anxb11) mRNA, complete cds
1	5	4	gi 24580586 ref NM_134659.2	Drosophila melanogaster	CG11490-PA (CG11490) mRNA, complete cds
0	4	3	gi 24666445 ref NM_168776.1	Drosophila melanogaster	CG14073-PA, isoform A (CG14073) mRNA, complete cds
0	4	3	gi 24666441 ref NM_140803.1	Drosophila melanogaster	CG14073-PB, isoform B (CG14073) mRNA, complete cds
0	3	7	gi 24642173 ref NM_132796.2	Drosophila melanogaster	CG11655-PA (CG11655) mRNA, complete cds
0	3	2	gi 24660737 ref NM_139935.1	Drosophila melanogaster	CG13674-PA (CG13674) mRNA, complete cds
0	2	5	gi 24644891 ref NM_141481.1	Drosophila melanogaster	CG3014-PA (CG3014) mRNA, complete cds
0	2	4	gi 24584988 ref NM_136042.1	Drosophila melanogaster	CG15160-PA (CG15160) mRNA, complete cds
0	2	3	gi 28571645 ref NM_176459.1	Drosophila melanogaster	CG17228-PD, isoform D (pros) mRNA, complete cds
0	2	3	gi 24645913 ref NM_079593.3	Drosophila melanogaster	CG17228-PC, isoform C (pros) mRNA, complete cds
0	2	3	gi 24645917 ref NM_169386.1	Drosophila melanogaster	CG17228-PA, isoform A (pros) mRNA, complete cds
0	2	2	gi 22026940 ref NM_137998.2	Drosophila melanogaster	CG11183-PA (CG11183) mRNA, complete cds
0	2	2	gi 24648589 ref NM_142674.2	Drosophila melanogaster	CG10827-PA (CG10827) mRNA, complete cds
0	1	8	gi 24583240 ref NM_164890.1	Drosophila melanogaster	CG4839-PB, isoform B (CG4839) mRNA, complete cds
0	1	8	gi 24583239 ref NM_135505.2	Drosophila melanogaster	CG4839-PA, isoform A (CG4839) mRNA, complete cds
0	1	7	gi 24643453 ref NM_057267.3	Drosophila melanogaster	CG9579-PA (AnnX) mRNA, complete cds
0	1	5	gi 24762544 ref NM_166658.1	Drosophila melanogaster	CG3209-PB, isoform B (CG3209) mRNA, complete cds
0	1	5	gi 24762542 ref NM_138036.2	Drosophila melanogaster	CG3209-PA, isoform A (CG3209) mRNA, complete cds
0	1	4	gi 24642669 ref NM_132942.2	Drosophila melanogaster	CG4829-PC, isoform C (CG4829) mRNA, complete cds
0	1	4	gi 24654373 ref NM_166220.1	Drosophila melanogaster	CG30458-PA (CG30458) mRNA, complete cds
0	1	4	gi 24656232 ref NM_167965.1	Drosophila melanogaster	CG32296-PA (CG32296) mRNA, complete cds
0	1	4	gi 24582675 ref NM_057638.3	Drosophila melanogaster	CG14472-PA (poe) mRNA, complete cds
0	1	4	gi 24642667 ref NM_167550.1	Drosophila melanogaster	CG4829-PB, isoform B (CG4829) mRNA, complete cds
0	1	4	gi 24642665 ref NM_167549.1	Drosophila melanogaster	CG4829-PA, isoform A (CG4829) mRNA, complete cds
0	1	3	gi 24656101 ref NM_080516.1	Drosophila melanogaster	CG16757-PA (Spn) mRNA, complete cds

Vorhergesagte annexin b10 RNAi off-target Kandidaten (<http://dscheck.RNAi.jp>)[dsRNA Design page](#) / [dsRNA Verification page](#)**off-target candidate sequences** [help]

mis=0	mis=1	mis=2	name of off-target candidate sequence	
513	0	0	gi 24643453 ref NM_057267.3	Drosophila melanogaster CG9579-PA (AnnX) mRNA, complete cds
39	19	0	gi 45556086 ref NM_206795.1	Drosophila melanogaster CG33487-PA (CG33487) mRNA, complete cds
39	19	0	gi 45556078 ref NM_206794.1	Drosophila melanogaster CG33496-PA (CG33496) mRNA, complete cds
39	19	0	gi 56326231 ref NM_206797.2	Drosophila melanogaster CG33498-PA (CG33498) mRNA, complete cds
39	19	0	gi 45556060 ref NM_206792.1	Drosophila melanogaster CG33491-PA (CG33491) mRNA, complete cds
1	3	2	gi 24581204 ref NM_134861.1	Drosophila melanogaster CG2843-PA (CG2843) mRNA, complete cds
0	3	4	gi 28574511 ref NM_176013.1	Drosophila melanogaster CG33114-PA (Gyc32E) mRNA, complete cds
0	3	2	gi 24643189 ref NM_133132.1	Drosophila melanogaster CG14194-PA (CG14194) mRNA, complete cds
0	2	7	gi 24640343 ref NM_132159.1	Drosophila melanogaster CG1677-PA (CG1677) mRNA, complete cds
0	2	3	gi 24643257 ref NM_167653.1	Drosophila melanogaster CG3400-PE, isoform E (Pfrx) mRNA, complete cds
0	2	3	gi 24643259 ref NM_167654.1	Drosophila melanogaster CG3400-PF, isoform F (Pfrx) mRNA, complete cds
0	2	3	gi 24643253 ref NM_167651.1	Drosophila melanogaster CG3400-PA, isoform A (Pfrx) mRNA, complete cds
0	2	3	gi 24643255 ref NM_167652.1	Drosophila melanogaster CG3400-PD, isoform D (Pfrx) mRNA, complete cds
0	2	3	gi 24583872 ref NM_165002.1	Drosophila melanogaster CG31762-PB, isoform B (aret) mRNA, complete cds
0	2	3	gi 24583876 ref NM_165004.1	Drosophila melanogaster CG31762-PA, isoform A (aret) mRNA, complete cds
0	2	3	gi 24643251 ref NM_058104.4	Drosophila melanogaster CG3400-PB, isoform B (Pfrx) mRNA, complete cds
0	2	3	gi 24643263 ref NM_167656.1	Drosophila melanogaster CG3400-PI, isoform I (Pfrx) mRNA, complete cds
0	2	3	gi 24643261 ref NM_167655.1	Drosophila melanogaster CG3400-PH, isoform H (Pfrx) mRNA, complete cds
0	2	3	gi 24583874 ref NM_165003.1	Drosophila melanogaster CG31762-PC, isoform C (aret) mRNA, complete cds
0	2	3	gi 19549351 ref NM_058103.2	Drosophila melanogaster CG3400-PG, isoform G (Pfrx) mRNA, complete cds
0	2	3	gi 24648018 ref NM_169828.1	Drosophila melanogaster CG31229-PA (CG31229) mRNA, complete cds
0	2	2	gi 24648854 ref NM_169985.1	Drosophila melanogaster CG31465-PA (CG31465) mRNA, complete cds
0	1	6	gi 19549384 ref NM_057255.2	Drosophila melanogaster CG5730-PB, isoform B (AnnIX) mRNA, complete cds
0	1	6	gi 45553444 ref NM_206530.1	Drosophila melanogaster CG5730-PD, isoform D (AnnIX) mRNA, complete cds
0	1	6	gi 45553446 ref NM_206531.1	Drosophila melanogaster CG5730-PC, isoform C (AnnIX) mRNA, complete cds
0	1	6	gi 24648612 ref NM_057256.3	Drosophila melanogaster CG5730-PA, isoform A (AnnIX) mRNA, complete cds
0	1	4	gi 24645744 ref NM_141757.1	Drosophila melanogaster CG14685-PB, isoform B (CG14685) mRNA, complete cds
0	1	4	gi 45553330 ref NM_206471.1	Drosophila melanogaster CG14685-PD, isoform D (CG14685) mRNA, complete cds
0	1	4	gi 24645746 ref NM_169358.1	Drosophila melanogaster CG14685-PA, isoform A (CG14685) mRNA, complete cds
0	1	4	gi 24659046 ref NM_137908.2	Drosophila melanogaster CG3085-PA (CG3085) mRNA, complete cds

Vorhergesagte *annexin b10* RNAi off-target Kandidaten (<http://dscheck.RNAi.jp>)
 NIG-Fly, Fly Stocks Stock ID 9579R-2

[dsRNA Design page](#) / [dsRNA Verification page](#)

off-target candidate sequences [help]

mis=0	mis=1	mis=2	name of off-target candidate sequence
385	29	9	gi 24643453 ref NM_057267.3 Drosophila melanogaster CG9579-PA (AnnX) mRNA, complete cds
0	3	2	gi 24643189 ref NM_133132.1 Drosophila melanogaster CG14194-PA (CG14194) mRNA, complete cds
0	2	3	gi 24648018 ref NM_169828.1 Drosophila melanogaster CG31229-PA (CG31229) mRNA, complete cds
0	2	2	gi 24643253 ref NM_167651.1 Drosophila melanogaster CG3400-PA, isoform A (Pfrx) mRNA, complete cds
0	2	2	gi 19549351 ref NM_058103.2 Drosophila melanogaster CG3400-PG, isoform G (Pfrx) mRNA, complete cds
0	2	2	gi 24643255 ref NM_167652.1 Drosophila melanogaster CG3400-PD, isoform D (Pfrx) mRNA, complete cds
0	2	2	gi 24643261 ref NM_167655.1 Drosophila melanogaster CG3400-PH, isoform H (Pfrx) mRNA, complete cds
0	2	2	gi 24643263 ref NM_167656.1 Drosophila melanogaster CG3400-PI, isoform I (Pfrx) mRNA, complete cds
0	2	2	gi 24643259 ref NM_167654.1 Drosophila melanogaster CG3400-PF, isoform F (Pfrx) mRNA, complete cds
0	2	2	gi 24643257 ref NM_167653.1 Drosophila melanogaster CG3400-PE, isoform E (Pfrx) mRNA, complete cds
0	2	2	gi 24643251 ref NM_058104.4 Drosophila melanogaster CG3400-PB, isoform B (Pfrx) mRNA, complete cds
0	1	17	gi 45553446 ref NM_206531.1 Drosophila melanogaster CG5730-PC, isoform C (AnnIX) mRNA, complete cds
0	1	17	gi 45553444 ref NM_206530.1 Drosophila melanogaster CG5730-PD, isoform D (AnnIX) mRNA, complete cds
0	1	17	gi 24648612 ref NM_057256.3 Drosophila melanogaster CG5730-PA, isoform A (AnnIX) mRNA, complete cds
0	1	17	gi 19549384 ref NM_057255.2 Drosophila melanogaster CG5730-PB, isoform B (AnnIX) mRNA, complete cds
0	1	4	gi 45553330 ref NM_206471.1 Drosophila melanogaster CG14685-PD, isoform D (CG14685) mRNA, complete cds
0	1	4	gi 24762406 ref NM_137993.2 Drosophila melanogaster CG4735-PA (shu) mRNA, complete cds
0	1	4	gi 24640343 ref NM_132159.1 Drosophila melanogaster CG1677-PA (CG1677) mRNA, complete cds
0	1	4	gi 24645748 ref NM_169359.1 Drosophila melanogaster CG14685-PC, isoform C (CG14685) mRNA, complete cds
0	1	4	gi 24645746 ref NM_169358.1 Drosophila melanogaster CG14685-PA, isoform A (CG14685) mRNA, complete cds
0	1	4	gi 24645744 ref NM_141757.1 Drosophila melanogaster CG14685-PB, isoform B (CG14685) mRNA, complete cds
0	1	3	gi 24641401 ref NM_167306.1 Drosophila melanogaster CG4147-PA, isoform A (Hsc70-3) mRNA, complete cds
0	1	3	gi 45549152 ref NM_078761.3 Drosophila melanogaster CG7234-PI (Glu-RIIB) mRNA, complete cds
0	1	3	gi 24641405 ref NM_167307.1 Drosophila melanogaster CG4147-PC, isoform C (Hsc70-3) mRNA, complete cds
0	1	3	gi 24641407 ref NM_167308.1 Drosophila melanogaster CG4147-PD, isoform D (Hsc70-3) mRNA, complete cds
0	1	3	gi 24641403 ref NM_078577.2 Drosophila melanogaster CG4147-PB, isoform B (Hsc70-3) mRNA, complete cds
0	1	2	gi 24641661 ref NM_167346.1 Drosophila melanogaster CG4353-PA, isoform A (hep) mRNA, complete cds
0	1	2	gi 24641665 ref NM_078587.2 Drosophila melanogaster CG4353-PC, isoform C (hep) mRNA, complete cds
0	1	2	gi 24651112 ref NM_143459.1 Drosophila melanogaster CG1964-PA (Kul) mRNA, complete cds
0	1	2	gi 28573589 ref NM_166427.2 Drosophila melanogaster CG9415-PB, isoform B (Xbp1) mRNA, complete cds

Vorhergesagte *annexin b11^{short}* RNAi off-target Kandidaten (<http://dscheck.RNAi.jp>)dsRNA Design page / [dsRNA Verification page](#)**off-target candidate sequences** [help]

mis=0	mis=1	mis=2	name of off-target candidate sequence
334	0	0	gi 24642521 ref NM_078646.2 Drosophila melanogaster CG9968-PA, isoform A (Anxb11) mRNA, complete cds
334	0	0	gi 24642522 ref NM_167519.1 Drosophila melanogaster CG9968-PB, isoform B (Anxb11) mRNA, complete cds
11	4	28	gi 45553446 ref NM_206531.1 Drosophila melanogaster CG5730-PC, isoform C (AnnIX) mRNA, complete cds
11	4	28	gi 45553444 ref NM_206530.1 Drosophila melanogaster CG5730-PD, isoform D (AnnIX) mRNA, complete cds
11	4	28	gi 24648612 ref NM_057256.3 Drosophila melanogaster CG5730-PA, isoform A (AnnIX) mRNA, complete cds
11	4	28	gi 19549384 ref NM_057255.2 Drosophila melanogaster CG5730-PB, isoform B (AnnIX) mRNA, complete cds
0	4	8	gi 24658444 ref NM_168123.1 Drosophila melanogaster CG10596-PA, isoform A (Msr-110) mRNA, complete cds
0	4	8	gi 24658438 ref NM_139716.2 Drosophila melanogaster CG10596-PB, isoform B (Msr-110) mRNA, complete cds
0	4	8	gi 24658451 ref NM_168124.1 Drosophila melanogaster CG10596-PC, isoform C (Msr-110) mRNA, complete cds
0	4	2	gi 24642149 ref NM_132791.2 Drosophila melanogaster CG12608-PA (CG12608) mRNA, complete cds
0	2	3	gi 24663231 ref NM_140307.2 Drosophila melanogaster CG10335-PA (Pbgs) mRNA, complete cds
0	2	2	gi 45554604 ref NM_206664.1 Drosophila melanogaster CG10701-PJ, isoform J (Moe) mRNA, complete cds
0	2	2	gi 24640675 ref NM_167170.1 Drosophila melanogaster CG10701-PC, isoform C (Moe) mRNA, complete cds
0	2	2	gi 24640673 ref NM_167169.1 Drosophila melanogaster CG10701-PA, isoform A (Moe) mRNA, complete cds
0	2	2	gi 24640669 ref NM_080343.2 Drosophila melanogaster CG10701-PD, isoform D (Moe) mRNA, complete cds
0	2	2	gi 45554614 ref NM_206665.1 Drosophila melanogaster CG10701-PI, isoform I (Moe) mRNA, complete cds
0	2	2	gi 45554631 ref NM_206667.1 Drosophila melanogaster CG10701-PG, isoform G (Moe) mRNA, complete cds
0	2	2	gi 24640671 ref NM_167168.1 Drosophila melanogaster CG10701-PB, isoform B (Moe) mRNA, complete cds
0	2	2	gi 45554650 ref NM_206669.1 Drosophila melanogaster CG10701-PE, isoform E (Moe) mRNA, complete cds
0	2	2	gi 45554643 ref NM_206668.1 Drosophila melanogaster CG10701-PF, isoform F (Moe) mRNA, complete cds
0	2	2	gi 45554623 ref NM_206666.1 Drosophila melanogaster CG10701-PH, isoform H (Moe) mRNA, complete cds
0	1	5	gi 24661778 ref NM_168356.1 Drosophila melanogaster CG32045-PC, isoform C (fry) mRNA, complete cds
0	1	5	gi 24661782 ref NM_168357.1 Drosophila melanogaster CG32045-PB, isoform B (fry) mRNA, complete cds
0	1	4	gi 24661806 ref NM_168359.1 Drosophila melanogaster CG32045-PA, isoform A (fry) mRNA, complete cds
0	1	3	gi 24581872 ref NM_080185.2 Drosophila melanogaster CG18251-PB, isoform B (Msp-300) mRNA, complete cds
0	1	3	gi 24654058 ref NM_137249.1 Drosophila melanogaster CG18243-PA (Ptp52F) mRNA, complete cds
0	1	3	gi 24584538 ref NM_165144.1 Drosophila melanogaster CG4824-PB, isoform B (BicC) mRNA, complete cds
0	1	3	gi 19549403 ref NM_057517.2 Drosophila melanogaster CG4824-PA, isoform A (BicC) mRNA, complete cds
0	1	3	gi 45552220 ref NM_205911.1 Drosophila melanogaster CG18251-PC, isoform C (Msp-300) mRNA, complete cds
0	1	3	gi 24584540 ref NM_165145.1 Drosophila melanogaster CG4824-PD, isoform D (BicC) mRNA, complete cds

Vorhergesagte *annexin b11^{long}* RNAi off-target Kandidaten (<http://dscheck.RNAi.jp>)dsRNA Design page / [dsRNA Verification page](#)**off-target candidate sequences** [help]

mis =0	mis =1	mis =2	name of off-target candidate	sequence
520	32	112	gi 24642522 ref NM_167519 .1 Drosophila melanogaster	CG9968 -PB, isoform B (Anxb 11) mRNA , complete cds
2	17	61	gi 24642977 ref NM_133046 .1 Drosophila melanogaster	CG5936 -PA (CG 5936) mRNA , complete cds
1	9	16	gi 24639127 ref NM_166894 .1 Drosophila melanogaster	CG11491 -PA , isoform A (br) mRNA , complete cds
0	16	100	gi 24639868 ref NM_131995 .1 Drosophila melanogaster	CG15784 -PA (CG 15784) mRNA , complete cds
0	10	31	gi 24641600 ref NM_167335 .1 Drosophila melanogaster	CG4013 -PC , isoform C (Smr) mRNA , complete cds
0	10	30	gi 24641596 ref NM_080536 .2 Drosophila melanogaster	CG4013 -PA , isoform A (Smr) mRNA , complete cds
0	10	30	gi 24641598 ref NM_167334 .1 Drosophila melanogaster	CG4013 -PB , isoform B (Smr) mRNA , complete cds
0	10	22	gi 24662031 ref NM_168387 .1 Drosophila melanogaster	CG6711 -PA (Taf 2) mRNA , complete cds
0	9	28	gi 45552172 ref NM_205887 .1 Drosophila melanogaster	CG3159 -PB , isoform B (Eaat 2) mRNA , complete cds
0	9	28	gi 19549494 ref NM_058079 .2 Drosophila melanogaster	CG3159 -PA , isoform A (Eaat 2) mRNA , complete cds
0	7	29	gi 24641547 ref NM_132578 .1 Drosophila melanogaster	CG11146 -PA (CG 11146) mRNA , complete cds
0	6	20	gi 28574910 ref NM_176328 .1 Drosophila melanogaster	CG17364 -PB , isoform B (CG 17364) mRNA , complete cds
0	6	20	gi 28574908 ref NM_140417 .2 Drosophila melanogaster	CG17364 -PA , isoform A (CG 17364) mRNA , complete cds
0	5	7	gi 45550546 ref NM_139799 .3 Drosophila melanogaster	CG10107 -PA , isoform A (CG 10107) mRNA , complete cds
0	5	7	gi 45552962 ref NM_206286 .1 Drosophila melanogaster	CG10107 -PC , isoform C (CG 10107) mRNA , complete cds
0	4	38	gi 17530856 ref NM_078532 .1 Drosophila melanogaster	CG1478 -PA (Cp36) mRNA , complete cds
0	4	29	gi 24643082 ref NM_133088 .1 Drosophila melanogaster	CG6632 -PA (CG 6632) mRNA , complete cds
0	4	15	gi 24641853 ref NM_080046 .2 Drosophila melanogaster	CG10986 -PB (g) mRNA , complete cds
0	4	10	gi 19549767 ref NM_134290 .1 Drosophila melanogaster	CG3090 -PB , isoform B (Sox 14) mRNA , complete cds
0	4	10	gi 19549766 ref NM_057546 .2 Drosophila melanogaster	CG3090 -PA , isoform A (Sox 14) mRNA , complete cds
0	3	8	gi 24646491 ref NM_057605 .3 Drosophila melanogaster	CG17907 -PA (Ace) mRNA , complete cds
0	3	4	gi 28573919 ref NM_176121 .1 Drosophila melanogaster	CG33183 -PC , isoform C (Hr 46) mRNA , complete cds
0	3	2	gi 19550037 ref NM_057569 .2 Drosophila melanogaster	CG4491 -PA (noc) mRNA , complete cds
0	3	2	gi 24641540 ref NM_132575 .2 Drosophila melanogaster	CG2560 -PA (CG 2560) mRNA , complete cds
0	3	2	gi 24659085 ref NM_137912 .1 Drosophila melanogaster	CG9876 -PA (CG 9876) mRNA , complete cds
0	2	15	gi 24666197 ref NM_168755 .1 Drosophila melanogaster	CG8127 -PB , isoform B (Eip 75 B) mRNA , complete cds
0	2	8	gi 24641659 ref NM_132622 .1 Drosophila melanogaster	CG18646 -PA (CG 18646) mRNA , complete cds
0	2	8	gi 45552670 ref NM_206138 .1 Drosophila melanogaster	CG15920 -PB , isoform B (CG 15920) mRNA , complete cds
0	2	8	gi 45550440 ref NM_137313 .2 Drosophila melanogaster	CG15920 -PA , isoform A (CG 15920) mRNA , complete cds
0	2	8	gi 24647693 ref NM_142371 .1 Drosophila melanogaster	CG14330 -PA (CG 14330) mRNA , complete cds

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen benutzt habe. Alle Stellen der Arbeit, die dem Wortlaut oder dem Sinn nach anderen Werken entnommen sind, habe ich in jedem Fall unter Angabe der Quelle deutlich als Entlehnung kenntlich gemacht.

Münster, den

Lebenslauf

Liane Gerda Bolke

Geburtsdatum: 05.04.1979
 Geburtstort: Damme (Niedersachsen)
 Eltern: Heinrich Bolke
 Gerda Bolke, geb. Glandorf

Schulbildung:

1985- 1989	Grundschule Osterfeine
1989- 1991	Orientierungsstufe Damme
1991- 1998	Gymnasium Damme
1998	Abitur

Hochschulreife (Abitur): am 24.06.1998 in Damme (Gymnasium Damme)

Studium:

10/ 1998- 11/2003	Biologie-Studium an der WWU Münster
01/ 2003- 11/2003	Diplomarbeit am Institut für Neurobiologie der WWU Münster Arbeitsgruppe Prof. Dr. C. Klämbt

Prüfungen: Diplom im Fach Biologie am 12.01.2004 an der WWU Münster

Promotionsstudiengang: ab 01/ 2004 Promotionsstudiengang an der WWU
Münster im Fachbereich Biologie

Tätigkeiten:

02/2003-07/2003	Beschäftigung als wissenschaftliche Mitarbeiterin im Institut für Neurobiologie der WWU Münster
ab 01/2004	Beschäftigung als wissenschaftliche Mitarbeiterin im Institut für medizinische Biochemie (ZMBE) der WWU Münster

Dissertation: ab 01/2004 am Institut für medizinische
Biochemie (ZMBE) der WWU Münster
Arbeitsgruppe Prof. Dr. V. Gerke

.....

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Betreuung von Prof. Dr. Volker Gerke und Prof. Dr. Christian Klämbt angefertigt. Beiden danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit in diesem Rahmen zu erstellen, für ihre Diskussionsbereitschaft, Ideen und Unterstützung. Insbesondere natürlich auch für Chance gleich zweimal im Jahr nach Rothenberge fahren zu können.

Besonderer Dank gilt Tobi, Marion, Raiko, Karin, Daniel E, Christoph, Robert, Imke, Alex G, Alex M, Alice, Elke, Ingrid und natürlich Gundi für eine wirklich gute Zeit innerhalb und außerhalb des Labors. Einen Dank an Susanne für die Beantwortung aller organisatorischen und lebensnahen Fragen.

Ein Dankeschön an alle Mitglieder der AG Klämbt, AG Hummel und AG Gerke für die schöne Atmosphäre, Hilfe, immer wenn sie benötigt wurde und insgesamt viel Spaß!

Außerhalb der Labors einen großen Dank an Judith und Frank für viel Quatschen, viel Prosecco, viel Nicht-Lästern und unglaublich schlechte Fernsehfilme.

Ich danke meinen Eltern und Geschwistern und allen kleinen Anhängen, dass sie immer da waren und immer mehr werden!

Ich danke Simon für seine Unterstützung, weil er halt der Tollste ist und dafür, dass er mich so gut kennt, dass er genau weiß, wann er so tun muss, als hätte er alles im Griff....