

**Charakterisierung der transienten
Repression von *nanos* in der frühen
Oogenese von *Drosophila
melanogaster***



DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
der Fakultät für Biologie und Vorklinische Medizin der Universität Regensburg

vorgelegt von
Andreas Horn

aus Stuttgart
im Jahr 2021

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am:

24.03.2021

Die Arbeit wurde angeleitet von:

PD Dr. Jan Medenbach

Unterschrift:

Andreas Horn

„Wenn du ein Problem hast, versuche es zu lösen.

Kannst du es nicht lösen, dann mache kein Problem daraus.“

Buddha

Zusammenfassung

Zellhomöostase erfordert ein feines Gleichgewicht zwischen Stammzellerneuerung und Differenzierung. In der weiblichen Keimbahn von *Drosophila melanogaster* befinden sich zwei bis drei Keimbahnstammzellen an der Spitze des Germariums. Signalgebung durch das umliegende Gewebe definiert eine somatische Nische, welche die Differenzierung der Stammzellen verhindert. Nach mitotischer Teilung einer der Stammzellen verfolgen beide Tochterzellen unterschiedliche Zellschicksale: Eine der Zellen verbleibt in der somatischen Nische um somit einen konstanten Bestand an Stammzellen zu gewährleisten, während die andere Tochterzelle insgesamt vier Zellteilungen mit unvollständiger Zytokinese durchläuft, um schließlich eine 16-Zellzyste zu bilden, aus welcher sich schließlich die reife Oozyte entwickelt. Um den Differenzierungsprozess zu initiieren, muss die Produktion des Stammzelloktors Nanos (Nos) transient unterdrückt werden. Hierfür bedarf es des Weibchen-spezifischen Regulationsfaktors Sex-lethal (Sxl) sowie drei weiterer Faktoren, Bag of marbles (Bam), Benign gonial cell neoplasm (BgcN) und Meiotic P26 (Mei-P26), welche an die 3' UTR von *nos* binden und somit seine Expression regulieren. Fehler in dieser Regulation führen zur Ausbildung eines Keimbahntumors und somit zur Sterilität. Trotz der Kenntnis der beteiligten Faktoren sind die molekularen Details der Regulation von *nos* bislang kaum untersucht und bekannt. Diese Arbeit zeigt, dass Bam und BgcN sowohl unabhängig als auch im Zusammenspiel miteinander in der Lage sind, die Expression von Nos durch Abbau seiner mRNA zu unterdrücken. Für beide Proteine werden dabei Bereiche definiert, über welche Interaktionen mit weiteren Proteinen stattfinden können, um somit die RNA Degradation zu vermitteln. Außerdem wurden in Zusammenarbeit mit weiteren Laboren neue Erkenntnisse über die RNA-Bindeaktivität der Mei-P26 NHL Domäne errungen. So konnten sowohl die Anforderungen an die gebundenen RNA Sequenzen als auch entscheidend an der Bindung beteiligte Aminosäuren innerhalb des Proteins identifiziert werden. Zusätzlich konnten über moderne iCLIP Analysen weitere Gene identifiziert werden, welche Mei-P26 abhängig reguliert werden. Die Validierung dieser Zielgene ergab dabei nicht nur den ersten *in vitro* Beweis für eine direkte Beteiligung von Mei-P26 an der Regulation von Nanos, sondern zeigte auch, dass Mei-P26 die Expression von mRNAs sowohl negativ als auch positiv beeinflussen kann, eine Eigenschaft die so für noch kein verwandtes Protein gezeigt werden konnte. Insgesamt konnten somit in dieser Arbeit diverse biochemische Einblicke in die Funktionsweise der, an der Regulation von Nanos beteiligten, Proteine gewonnen werden und dadurch unser Verständnis dieses hochkomplexen Prozesses erweitert werden.

Abstract

Tissue homeostasis requires a fine balance between germ cell maintenance and differentiation. In the female germline of *Drosophila melanogaster* two to three germline stem cells (GSCs) reside at the tip of the germarium. Signaling from the surrounding tissue defines a stem cell niche that prevents differentiation. After mitotic division of a GSC, the two daughter cells adapt different cell fates: one remains a GSC to replenish the pool of stem cells, the other undergoes four synchronous cell divisions with incomplete cytokinesis to generate a cyst of sixteen cells, one of which develops into the oocyte. To initiate this differentiation process, production of the stem cell factor Nanos (Nos) has to be transiently repressed. This requires the female-specific master regulator protein Sex-lethal (Sxl), as well as three other proteins, Bag of marbles (Bam), Benign gonial cell neoplasm (Bgcn) and Meiotic P26 (Mei-P26), which bind and repress the *nos* mRNA. Failure to do so results in the formation of germ line tumors and sterility. Despite knowing the components involved, molecular details of this regulation are still poorly analyzed and understood.

This thesis shows that Bam and Bgcn can both individually and cooperatively prevent Nos expression by degrading its mRNA. For both proteins, areas are defined which may interact with other proteins to allow RNA degradation. Furthermore, collaborative efforts with other laboratories granted advanced insights into the RNA binding properties of the Mei-P26 NHL domain, defining RNA sequence requirements as well as amino acids required for nucleotide binding. In addition to that, state of the art iCLIP analysis was used to identify additional targets of Mei-P26 mediated regulation. Validation of these targets not only for the first time provided *in vitro* evidence for a direct involvement of Mei-P26 in *nos* regulation, but surprisingly also showed that regulation by Mei-P26 can be both negative and positive, a behavior that has never been shown for any related proteins.

In total, this thesis provides numerous biochemical insights into the function of proteins, involved into the transient repression of Nanos in the female germline, thus further expanding our molecular understanding of this highly complex process.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	VII
Abstract.....	IX
1. Einleitung	1
1.1 Frühe <i>Drosophila</i> Oogenese.....	2
1.2 Nanos	6
1.3 Sex lethal.....	9
1.4 Bag of marbles	12
1.5 Benign Gonial Cell Neoplasm	14
1.6 Meiotic P-26.....	17
1.7 Zielsetzung	20
2. Ergebnisse	21
2.1 Die Rolle der Ankyrin Domäne in Bgcn.....	21
2.2 Einfluss der Interaktion von Bam und Bgcn	26
2.3 Mei-P26 und Sxl binden kompetitiv an die <i>nos</i> 3' UTR	31
2.4 Untersuchung der Mei-P26 NHL RNA-Bindedomäne	33
2.5 Mei-P26 reguliert Translation und Ribosomenbiogenese.....	35
2.6 Mei-P26 reguliert Zielgene nicht nur negativ, sondern auch positiv	38
2.7 BBox und NHL Domänen bestimmen die Funktion von Mei-P26	41
3. Diskussion.....	44
4. Material & Methoden	59
4.1 Klonierung	59
4.2 (Zielgerichtete) Mutagenese	63
4.3 <i>Drosophila</i> SL2 Zellkultur.....	64
4.4 Transfektion von <i>Drosophila</i> Zellen.....	64
4.5 Tethering Assay.....	64
4.6 Luciferase Reporter Assay.....	66
4.7 Western Blot	66
4.8 RNA Extraktion	67
4.9 Reverse Transkription.....	67
4.10 Northern Blot.....	68
4.11 qPCR.....	69
4.12 Expression von GST Mei-P26 NHL.....	70
4.13 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA,	70
4.14 iCLIP.....	71
4.15 iCLIP Datenanalyse	72
4.16 <i>in vitro</i> Transkription (IVT).....	73

4.17 RNA-Interferenz (RNAi)	73
5. Abbildungsverzeichnis.....	74
6. Tabellenverzeichnis.....	75
7. Literaturverzeichnis	76
8. Abkürzungsverzeichnis.....	89
9. Publikationen & Konferenzen	94
10. Mitwirkung	95
11. Danksagungen	96
12. Anhang.....	98

1. Einleitung

Die Fähigkeit zur Neubildung und Regeneration von Zellen für die Aufrechterhaltung der Zellhomöostase und zum Wachstum und der Entwicklung von Geweben ist von entscheidender Bedeutung für alle mehrzelligen Organismen. Sie bildet die Grundlage vieler essentieller, biologischer Vorgänge, beginnend bei der Embryonalentwicklung über das Wachstum und die Entwicklung von Organen, die Keimbahnentwicklung, bis hin zu Alterungsprozessen. Auch sind sehr viele medizinisch relevante Themenfelder damit verbunden, wie etwa Wundheilung, neurodegenerative Krankheiten, die Selbstregeneration von internen Geweben und Organen (beispielsweise der Leber), sowie die Entstehung und Entwicklung von Tumorerkrankungen.

Als Grundlage dienen dabei in der Regel Stammzellen, welche die Fähigkeit besitzen sich nach ihrer Teilung zu anderen Zelltypen zu differenzieren. Das Potenzial zur Differenzierung variiert dabei zwischen verschiedenen Arten von Stammzellen. Embryonale Stammzellen beispielsweise sind omnipotent, können sich also prinzipiell in jeden beliebigen, anderen Zelltyp entwickeln. Adulte Stammzellen hingegen besitzen nur noch das Potenzial zur Differenzierung in bestimmte Zelltypen oder sogar nur in einen bestimmten Zelltyp. Ein Beispiel hierfür sind Keimbahnstammzellen, welche sich, geschlechtsabhängig, nur in Spermatozyten oder Oozyten entwickeln können. Stammzellen spielen aber nicht nur in gesundem Gewebe eine gewichtige Rolle, sondern auch bei Tumorerkrankungen. So wurden bei manchen Krebsarten Tumorstammzellen identifiziert, welche die treibende Kraft hinter der Entstehung und insbesondere dem Voranschreiten der Erkrankung darstellen (Review: Wang 2019).

Angesichts all dieser Umstände ist es leicht nachvollziehbar, dass bereits seit längerem ein ungebrochen starkes Forschungsinteresse an Stammzellen und ihrem potenziellen, medizinischen Nutzen besteht. Dementsprechend sind derzeit bereits eine nicht unerhebliche Anzahl an Ansätzen für Stammzelltherapien für eine Vielzahl von Erkrankungen im Gespräch und einige wenige davon werden bereits in der Klinik angewendet. Es bleiben jedoch weiterhin eine Vielzahl an offenen Fragen, nicht nur zur praktischen Anwendung von Stammzellen, sondern auch grundlegende Fragen wie zum Beispiel zu den Mechanismen ihres Selbsterhalts oder der Kontrolle und Regulation der Differenzierung nach ihrer Zellteilung.

Zur Beantwortung dieser und weiterer Fragen ist es entscheidend wichtig geeignete Modelle zu identifizieren, anhand derer eine möglichst einfache jedoch gleichzeitig auch aussagekräftige und vielseitige Untersuchung dieser Fragestellungen möglich ist. Ein solches Modell bietet beispielsweise die Oogenese in *Drosophila melanogaster*.

1.1 Frühe *Drosophila* Oogenese

In weiblichen Fliegen finden sich zwei Ovarien, welche jeweils aus 16-20 sogenannter Ovariolen bestehen. Am anterioren Ende dieser Ovariolen befinden sich die Keimbahnstammzellen in einer, Germarium genannten, Struktur. Innerhalb des Germariums erfolgen auch die ersten Differenzierungs- und Teilungsschritte, bevor die noch unreife Oozyte das Germarium verlässt und entlang der Ovariole in Richtung des posterioren Endes wandert. Hierbei durchläuft die Oozyte insgesamt 14, klar voneinander differenzierte, Entwicklungsstadien, bevor sie schließlich das posteriore Ende der Ovariole als reife Eizelle erreicht. In den Ovariolen wird dabei ein steter, jedoch für jede Ovariole autonomer, Fluss an sich entwickelnden Oozyten erzeugt, welche wie „Perlen an einer Schnur“ die einzelnen Stadien durchlaufen (**Abb. 1**). Der Aufbau der Ovarien in *Drosophila* entspricht dabei, wie bei allen höheren Insekten, einer meroistischen Morphologie, bei welcher die Oozyten mit Nährzellen verbunden sind, welche sie mit mRNAs, Proteinen und anderen zellulären Materialien versorgen (Tworzydło et al. 2010). In Drosophiliden findet sich dabei explizit der polytroph meroistische Phänotyp, bei dem die Oozyte während ihrer Entwicklung durch Ringkanäle in direktem Kontakt zu den Nährzellen steht. Im Gegensatz dazu findet sich in anderen, höheren Insekten auch der telotroph meroistische Phänotyp, bei dem die Verbindung zwischen Oozyte und Nährzellen indirekt über einen Nährkanal besteht (McLaughlin und Bratu 2015).

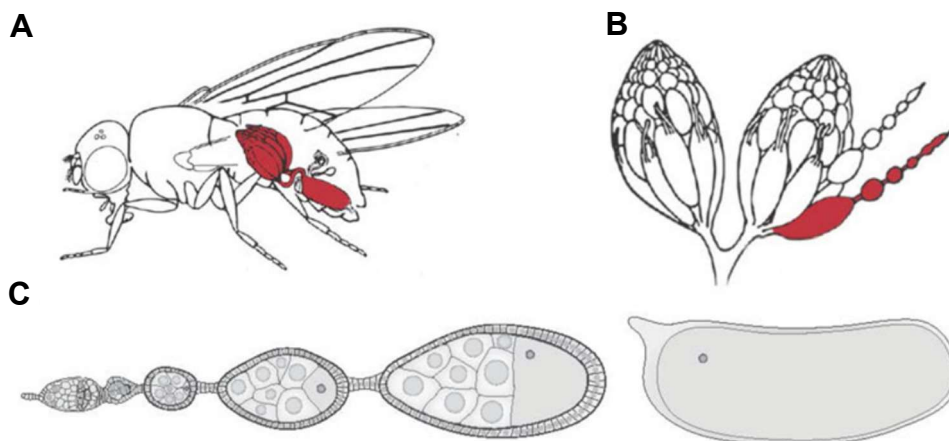


Abb. 1: Schematische Darstellung der weiblichen Keimbahn in *D. melanogaster*. A) Lage der Ovarien (rot) im Abdomen. B) Aufbau der Ovarien mit einer, in Rot hervorgehobenen, Ovariole. C) Entwicklung der Eikammer innerhalb der Ovariole bis zur reifen Eizelle (v.l.n.r., verkürzt). Entnommen aus: (Jambor et al. 2016)

Ausgangspunkt für die Entstehung neuer Oozyten ist das Germarium (**Abb. 2**). Dieses ist über ein terminales Filament sowie *Cap*-Zellen mit dem umgebenden Gewebe verbunden. Das terminale Filament besteht aus acht bis neun, abgeflachten und aneinandergereihten Zellen, welche einerseits die Orientierung der Ovariolenentwicklung festlegen und andererseits das Germarium mit der umgebenden Ovariolenhülle verbinden (Godt und Laski 1995). Die *Cap*-Zellen wiederum bilden die Verbindung zwischen dem terminalen Filament und den Keimbahnstammzellen innerhalb des Germariums, mit welchen sie über Adherens und Gap Junctions verbunden sind (Song et al. 2002). Terminales Filament und *Cap*-Zellen spielen zudem gemeinsam eine wichtige Rolle in der Homöostase der Keimbahnstammzellen. In jedem Germarium finden sich zwei bis drei solcher Stammzellen (Wieschaus und Szabad 1979) in einer als somatische Nische bezeichneten Region, welche ebenfalls zur Homöostase der Stammzellen beiträgt und somit deren ungewollten Verlust und/oder Differenzierung verhindert. Bei einer Stammzellteilung verbleibt eine der Tochterzellen in der somatischen Nische um den Bestand an Keimbahnstammzellen konstant zu halten. Die andere Tochterzelle hingegen wandert in Richtung des posterioren Endes des Germariums und unterläuft erste Differenzierungsschritte. Die, nun als Zystoblast bezeichnete, Zelle vollzieht im Folgenden mehrere, synchrone Zellteilungen mit unvollständiger Zytokinese, bis der Status einer Zyste aus 16 Zellen erreicht wird. Die Zellen innerhalb der Zyste bleiben dabei über das sogenannte Fusom miteinander verbunden. Dessen Membranen sind aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER) abgeleitet und verbinden das zytoplasmatische ER der einzelnen Zellen über ein verzweigtes Netzwerk aus Ringkanälen zu einem, durchgängigen ER (Lin et al. 1994; Snapp et al. 2004). Das Fusom entwickelt sich dabei aus dem Spektrosom, einer sphärischen Struktur, welche bereits in den Keimbahnstammzellen vorliegt und in seinem Aufbau einem Zentrosom ähnelt. Der sich teilende Zystoblast wird während der Zellteilungen von Eskortzellen umgeben, welche ihren Ursprung in Eskortstammzellen innerhalb der somatischen Nische haben und den Zystoblasten bei seiner Entwicklung vor äußeren Einflüssen abschirmen (Decotto und Spradling 2005). Nach Erreichen des 16-Zell Status vollziehen die Zysten weitere Entwicklungsschritte, wobei zunächst die zwei Zellen mit der größten Anzahl an Ringkanälen das Potenzial zur Entwicklung in eine Oozyte ausbilden. Im Weiteren wird die Zyste von Follikelzellen, welche ihren Ursprung in Follikelstammzellen in unmittelbarer Nähe der Zyste haben, umgeben (Margolis und Spradling 1995). Gleichzeitig vollzieht eine der Zellen innerhalb der Zyste die weiteren Entwicklungsschritte, hin zur Oozyte, während die restlichen 15 Zellen sich zu Nährzellen entwickeln, welche die Oozyte während der folgenden Entwicklungsschritte unter anderem mit mRNAs versorgen und so deren Reifung ermöglichen (ausführliches

1. Einleitung

Review der frühen Oogenese: Cuevas et al. 1997). Während dieser letzten Schritte der frühen Oogenese erfolgt zudem die Separierung der Eikammer (Oozyte, Nährzellen und umgebende Follikelzellen) vom Germarium. Dies markiert auch das erste von 14 Entwicklungsstadien der Oozyte bevor diese ihre vollständige Reife erreicht hat. Allerdings lässt sich auch das Germarium in mehrere Bereiche mit unterschiedlichen Entwicklungsstadien der Oozyte einteilen. Hierbei umfasst Region 1 den kompletten Bereich von den Keimbahnstammzellen bis zur 8-Zell Zyste. Region 2a entspricht dem 16-Zell Stadium in dem noch zwei Zellen das Potenzial zur Entwicklung in eine Oozyte haben, während in Region 2b bereits eine Zelle ihre Entwicklung zur Oozyte begonnen hat und die Zyste von Follikelzellen umgeben wird. Region 3 entspricht schließlich der fertigen Eikammer welche sich vom Germarium abtrennt (**Abb. 2**).

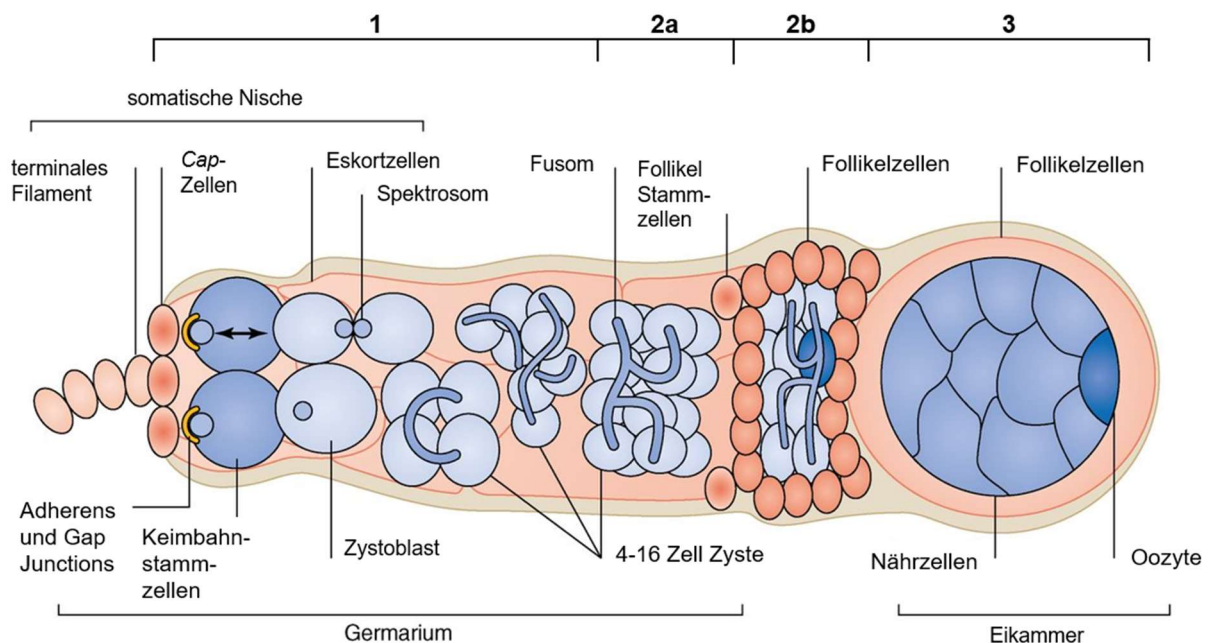


Abb. 2: Schematische Darstellung des Germariums am anterioren Ende der Ovariolen in *D. melanogaster*. Das Germarium ist über das terminale Filament mit dem umgebenden Gewebe verbunden. An seinem anterioren Ende befinden sich zwei bis drei Keimbahnstammzellen, deren Tochterzellen (Zystoblasten) mehrere Zellteilungen mit unvollständiger Zytokinese durchlaufen, bevor im 16-Zell Stadium eine weitere Differenzierung in eine Oozyte und 15 Nährzellen stattfindet. Die noch unreife Eikammer trennt sich schließlich am posterioren Ende des Germariums von diesem ab und durchläuft weitere Entwicklungsstadien entlang der Ovariolen. Das Germarium selbst kann, wie in der Zeichnung dargestellt, in unterschiedliche Regionen (1, 2a, 2b, 3) aufgeteilt werden. Abbildung: Slaidina und Lehmann 2014, modifiziert.

Insgesamt finden sich innerhalb des Germariums somit drei Arten an Stammzellen (Keimbahn-, Eskort- und Follikelstammzellen). Alle drei Stammzellarten sind relativ einfach und klar zu lokalisieren und zu identifizieren und befinden sich jeweils in speziellen Nischen, welche direkten Einfluss auf sie nehmen und essentiell für die Regulation ihrer Aktivität sind. Die Mechanismen auf denen diese Regulation beruht unterscheiden sich jedoch teils deutlich (Review: Kirilly und Xie 2007). Zusammen mit den generell verfügbaren, sehr vielfältigen und etablierten, molekularbiologischen Untersuchungsmethoden in *D. melanogaster* sowie der hohen Verfügbarkeit an mutanten Fliegenstämmen, bietet das Germarium eine ausgezeichnete Plattform für die Untersuchung von Stammzellen, insbesondere in Hinblick auf ihre Homöostase und die Regulation ihrer Differenzierung (Kirilly und Xie 2007). In der vorliegenden Arbeit liegt der Fokus jedoch ausschließlich auf der Regulation der Entwicklung von Tochterzellen der Keimbahnstammzellen, weswegen die anderen Stammzellarten an dieser Stelle nicht weiter beleuchtet werden.

Wie bereits erwähnt, befinden sich die Keimbahnstammzellen in der somatischen Nische am anterioren Ende des Germariums. Die weiteren Zellen innerhalb der Nische sorgen dabei nicht nur dafür, dass die Stammzellen vom umgebenden Gewebe abgeschirmt werden, sondern auch dafür, dass sie ihren Stammzellcharakter beibehalten. Hierfür wird im terminalen Filament und in den *Cap*-Zellen das Protein decapentaplegic (Dpp), ein Homolog von BMP2/4 (bone morphology protein 2/4) aus Vertebraten, produziert, welches zusammen mit glass bottom boat (Gbb), einem anderen BMP-Homolog, über die Adherens und Gap Junctions in die Keimbahnstammzellen gelangt und in diesen über eine Signalkaskade direkt die Expression von Differenzierungsfaktoren unterdrückt (Xie und Spradling 1998; Song et al. 2004). Die Teilung der Keimbahnstammzellen kann auf zwei unterschiedliche Arten erfolgen (Xie und Spradling 2000). Bei der symmetrischen Zellteilung entstehen zwei identische Tochterzellen. Dies geschieht, wenn durch den Verlust einer anderen Stammzelle freier Raum in der somatischen Nische entsteht. In diesem Fall ändert eine benachbarte Keimbahnstammzelle die Ausrichtung ihrer Teilungsachse, welche andernfalls Richtung posterior gerichtet ist. Nach der Zellteilung haben beide Tochterzellen weiterhin über die Adherens und Gap Junctions Kontakt zu den *Cap*-Zellen, erhalten somit weiterhin das Dpp-Signal und behalten ihren Stammzellcharakter bei (Xie und Spradling 2000). Eine solche Teilung tritt jedoch, wie erwähnt, nur im seltenen Fall des Verlusts einer anderen Keimbahnstammzelle auf. Die weitaus häufigere Art der Teilung ist die asymmetrische Zellteilung. Bei dieser Art der Zellteilung unterscheidet sich das Schicksal der Tochterzellen. Im Falle der Keimbahnstammzellen verbleibt eine der Tochterzellen innerhalb der somatischen Nische, erhält weiterhin das Dpp-Signal und behält somit

1. Einleitung

ihren Stammzellcharakter bei. Die andere Tochterzelle bewegt sich jedoch von der somatischen Nische weg und verliert somit das Dpp-Signal, welches nur über kurze Distanzen wirksam ist. Der Verlust des Dpp-Signals führt wiederum zu einer Expression von Differenzierungsfaktoren innerhalb der Zelle, welche die Entwicklung zum Zystoblasten einleiten. Dies bedingt gleichzeitig auch die Repression von Faktoren, welche der Expression der Differenzierungsfaktoren entgegenstehen. Von zentraler Bedeutung ist hierbei das Protein Nanos (Nos), welches eine stark reprimierende Wirkung auf solche Differenzierungsfaktoren ausübt.

1.2 Nanos

Nanos wurde ursprünglich in *D. melanogaster* identifiziert, hochkonservierte Homologe wurden jedoch sowohl in Vertebraten als auch in Invertebraten gefunden. Die Mitglieder dieser Proteinfamilie fungieren alle als RNA Bindeproteine (RBPs) und besitzen an ihrem C-terminalen Ende eine charakteristische Zinkfinger Domäne. Diese ist essentiell für die Funktion des Proteins als Translationsrepressor und besteht aus zwei CCHC Motiven welche jeweils ein Zn^{2+} Ion koordinativ binden (Curtis et al. 1997). Diese Art der Zinkfinger Domäne findet sich nur bei Nanos Proteinen und wird daher auch als Nanos-Typ Zinkfinger bezeichnet. Während in anderen Organismen teils mehrere Homologe von Nanos zu finden sind, besitzt *D. melanogaster* jedoch nur ein einziges, 43 kDa großes Nanos-Protein (Wang und Lehmann 1991), welches in verschiedenen Stadien der Oogenese, der frühen Embryogenese aber auch im Nervensystem und den Fortpflanzungsorganen der Fliege exprimiert wird (Wang et al. 1994; Forbes und Lehmann 1998; Menon et al. 2009; Gilboa und Lehmann 2004).

Neben weiteren Faktoren, wurde *nos* bereits vor über 30 Jahren als ein wichtiger Faktor für die Entstehung verschiedener Segmente in der Embryonalentwicklung von *D. melanogaster* identifiziert (Nüsslein-Volhard et al. 1987). In den folgenden Jahren konnte daraufhin gezeigt werden, dass es verantwortlich für die Repression der *hunchback* (*hb*) mRNA ist (Hülkamp et al. 1989; Irish et al. 1989; Struhl 1989) und diese Funktion als zentraler Teil einer Signalkaskade von insgesamt sieben Proteinen erfüllt (Lehmann und Nüsslein-Volhard 1991). Hierfür bildet Nanos in den frühen Entwicklungsstadien des Embryos an dessen posterioren Pol einen Gradienten, sowohl der mRNA als auch des Proteins (Wang und Lehmann 1991; Wang et al. 1994), und ist somit verantwortlich für eine korrekte Abdominalentwicklung. Diese Art der Entwicklungsregulation findet sich nicht nur in Drosophiliden sondern auch in anderen Diptera (Curtis et al. 1995). In den frühen Studien zur Embryonalentwicklung in Fliegen wurde bereits eine Interaktion von Nanos mit Pumilio (Pum) auf Proteinebene vermutet,

durch welche die *hb* mRNA gebunden und reguliert wird. Diese Interaktion konnte im Weiteren auch so bestätigt werden (Wreden et al. 1997; Sonoda und Wharton 1999) und wurde seither in mehreren Studien weiter untersucht. In diesen konnte unter anderem gezeigt werden, dass Nos und Pum nicht nur *hb* in der Embryogenese regulieren, sondern auch mRNAs an anderen Stellen wie beispielsweise dem Nervensystem oder der Keimbahn (Asaoka-Taguchi et al. 1999; Forbes und Lehmann 1998; Ye et al. 2004).

Nos selbst ist ein unspezifischer RNA-Binder (Curtis et al. 1997), Ziel-RNAs besitzen dennoch sogenannte „Nanos Recognition Elements“ (NRE) in ihrer 3'UTR, welche jedoch nicht von Nanos selbst gebunden werden, sondern von assoziierten Proteinen wie, im Beispiel von *hb*, von Pum (Wharton und Struhl 1991; Murata und Wharton 1995). Über Protein-Protein Interaktion ist Nos allerdings in der Lage, nicht nur die Bindeaffinität von Pum gegenüber Zielsequenzen zu erhöhen, sondern auch seine Bindesepezifität soweit zu ändern, dass zusätzliche Sequenzen erkannt und gebunden werden können, als es ohne Nos der Fall wäre (Weidmann et al. 2016). Wie bereits erwähnt, kann Nos auch mit anderen Proteinen neben Pum interagieren um somit die Translation von Ziel-mRNAs zu unterbinden. Bereits im Fall der Translationsregulation von *hb* konnte beispielsweise gezeigt werden, dass Nos und Pum zusätzlich das TRIM-NHL Protein Brat (Brain Tumor) für die Vermittlung der Translationskontrolle rekrutieren. Ein anderes Beispiel findet sich in der Keimbahn weiblicher Fliegen, in Form der Nanos-bedingten Repression maternaler *Cyclin B* (*cycB*) mRNA. Auch hier kommt es zu einer Interaktion von Nos und Pum, die Repression von *cycB* erfolgt jedoch über die direkte Rekrutierung von Komponenten des CCR4-NOT Komplexes durch eine, in Drosophiliden konservierte, Nanos Effektor Domäne (NED) im N-Terminus von Nos, was zu einer Deadenylierung und somit schließlich zu einem Abbau der *cycB* mRNA führt (Kadyrova et al. 2007; Joly et al. 2013; Bhandari et al. 2014; Raisch et al. 2016).

Nanos spielt auch eine wichtige Rolle in der Keimbahnentwicklung in *D. melanogaster* sowie in der Instandhaltung der Keimbahnstammzellen. Polzellen ohne hinreichende Aktivität an maternalem Nanos sind während der späteren Embryogenese außerstande sich in Keimbahnstammzellen zu entwickeln, da es ihnen nicht möglich ist, in die Gonaden zu migrieren. Zudem konnte gezeigt werden, dass eine gestörte, zygotische Expression von Nanos in der Keimbahn dazu führt, dass große Teile der Ovariolen keine Keimbahnstammzellen enthalten und diese in den anderen Ovariolen schnell verloren gehen (Kobayashi et al. 1996; Forbes und Lehmann 1998). Die zugrunde liegenden Mechanismen sind dabei sehr divers und umfassen die Regulation von Zellzyklus, Apoptose, Transkription und Translation (Deshpande et al. 1999; Sato et al. 2007; Sugimori et al. 2018; Asaoka et al. 2019; Kobayashi et al. 2005).

1. Einleitung

Aufgrund seiner sehr vielfältigen und, insbesondere im Fall von Embryonen, sehr stark lokalisationsabhängigen Funktionen muss aber auch die Expression und Aktivität von Nanos selbst kontrolliert werden können. Die Translationsrepression von nicht lokalisierter *nos* mRNA sowie ihr Abbau wird in Embryos durch das Protein Smaug (Smg) bedingt. Dieses erkennt und bindet eine kurze Haarnadelstruktur (*Smaug recognition element*, SRE) innerhalb eines Bereichs von 90 Nukleotiden nahe dem proximalen Ende der *nos* 3' UTR (Smibert et al. 1996; Dahanukar et al. 1999; Smibert et al. 1999; Crucs et al. 2000). Die Bindung von Smg führt wiederum zur Rekrutierung mehrerer weiterer Komponenten wie Cup, eIF4E, Me31B, Tral und Belle, welche die Translation der *nos* mRNA verhindern (Nelson et al. 2004; Jeske et al. 2011; Götze et al. 2017), oder aber zur Rekrutierung des CCR4-NOT Komplexes, welcher durch Deadenylierung der mRNA zu deren Abbau führt (Semotok et al. 2005; Zaessinger et al. 2006; Jeske et al. 2006). Auch eine Inhibition der Translation mittels miRNA unabhängiger Rekrutierung von Ago1 durch Smg ist dokumentiert (Pinder und Smibert 2013). In der Oozyte wird *nos* hingegen durch das hnRNP F/H Homolog Glorund (Glo) reguliert, welches ebenfalls eine Haarnadelstruktur in der *nos* 3'UTR bindet. Diese liegt leicht *downstream* der von Smg gebundenen Struktur innerhalb der ersten 90 nt der *nos* 3'UTR. Auch die Regulation durch Glo erfolgt durch Inhibition der Translation, allerdings im Gegensatz zur Regulation durch Smg erst nach der Initiierung, jedoch potenziell ebenfalls durch Ausbildung eines Multiprotein-Komplexes (Forrest et al. 2004; Kalifa et al. 2006; Andrews et al. 2011; Kalifa et al. 2009). Schließlich wurde jüngst auch eine translationelle Regulation von *nos* in der späten Oogenese durch Marf1 publiziert (Kawaguchi et al. 2020).

Eine Regulation von Nanos ist jedoch nicht nur notwendig um seine Aktivität auf einen gewissen Bereich zu limitieren, sondern seine Expression muss teilweise auch vollständig unterbunden werden. In der weiblichen Keimbahn von *D. melanogaster* ist dies der Fall bei der Entwicklung der Zystoblasten nach der Keimbahnstammzellteilung. Im Bereich des Zwei- bis Acht-Zellen Stadiums ist es essentiell die Aktivität und Expression von Nanos vollständig zu unterbinden. Dies ist darin begründet, dass Nanos in den Keimbahnstammzellen zur Aufrechterhaltung des Stammzellcharakters und zum Schutz vor Verlust der Stammzellen, mehrere Differenzierungsfaktoren reprimiert (Wang und Lin 2004). In Zystoblasten führt dies jedoch zu einem Phänotyp, bei welchem sich die Zystoblasten zwar weiterhin teilen können, es jedoch zu keiner weiteren Differenzierung kommt. Dies hat die Bildung einer tumorartigen Wucherung im Germarium und eine damit einhergehende Sterilität der Fliege zur Folge. In diesem Fall konnte jedoch bislang kein direkter Zusammenhang der Kontrolle der *nos* Expression mit Smg oder Glo gefunden werden. Stattdessen wurden in mehreren, überwiegend genetischen, Studien bislang vier andere Proteine, Sex-lethal

(Sxl), Bag of marbles (Bam), Benign gonial cell neoplasm (Bgcn) und Meiotic P-26 (Mei-P26), sowie ein kurzer Abschnitt in hinteren Bereich der *nos* 3' UTR als jeweils essentiell für die Kontrolle der *nos* Expression identifiziert (Chau et al. 2012; Li et al. 2009; Page et al. 2000). Über die Art und den Mechanismus wie diese Proteine *nos* regulieren ist bislang relativ wenig bekannt. In der Regel wird jedoch aber auch hier von einer Regulation auf Ebene der Translation ausgegangen. Dementsprechend wenig ist auch über die Rolle der einzelnen Komponenten dieser Regulation bekannt und ob, beziehungsweise wie sie miteinander interagieren. Zwar wurden eine Interaktion von Bam und Bgcn sowie die Bildung eines regulatorischen Komplexes aller Komponenten auf der *nos* 3'UTR postuliert (Li et al. 2009; Li et al. 2013), molekulare und/oder mechanistische Details konnten bislang jedoch kaum aufgeklärt werden.

Ziel dieser Arbeit ist es daher, anhand biochemischer und molekularbiologischer Methoden, weiterreichende Aufschlüsse über die Eigenschaften und möglichen Interaktionen der, im Folgenden zunächst näher vorgestellten, Komponenten der *nos* Regulation in Zystoblasten zu erlangen.

1.3 Sex lethal

Sxl ist der zentrale Regulator für die Geschlechtsbestimmung in *D. melanogaster* und besitzt zwei zentral gelegene RRM-Domänen (**Abb. 3**), mit denen es an Ziel-RNAs binden kann. Die Aktivität von Sxl ist sehr vielseitig und umfasst die Kontrolle von Splicing, Polyadenylierung, RNA Export und Translation.

Die wohl zentralste Rolle von Sxl liegt in der Regulation der geschlechtsspezifischen Entwicklung während der frühen Embryogenese sowie der Dosiskompensation zwischen männlichen und weiblichen Fliegen. Ein X-Chromosom Zählmechanismus sorgt hierbei zunächst dafür, dass ausschließlich in weiblichen Embryonen Sxl produziert wird. Dies führt über eine positive, autoregulatorische Rückkopplungsschleife zu einer weiteren, verstärkten Expression von Sxl (Review: Salz und Erickson 2010). Hierfür bindet das initial gebildete Sxl an zwei U-reiche Bindestellen innerhalb seines eigenen Transkripts, welche das Exon 3 flankieren (Horabin und Schedl 1993a, 1993b). Über diverse Interaktionen mit der Splicing-Maschinerie hat dies zur Folge, dass Exon 3 in weiblichen Fliegen nicht in die reife mRNA inkludiert wird und somit funktionelles Sxl gebildet werden kann. In Männchen findet diese Änderung des Spleißmusters aufgrund des fehlenden Sxl nicht statt und Exon 3 ist somit in der mRNA enthalten. Exon 3 ist jedoch ein sogenanntes „*Poison Exon*“, welches innerhalb seiner Sequenz ein vorzeitiges Stopcodon besitzt, weshalb in Männchen nur ein stark trunkiertes, inaktives

1. Einleitung

Sxl-Peptid produziert wird. Zudem wurde postuliert, dass die Anwesenheit von Exon 3 zu einem beschleunigten Abbau der mRNA durch *Nonsense-mediated mRNA Decay* führt (Ni et al. 2007; Lareau et al. 2007). Die korrekte Regulation des alternativen Spleißens der *sxl* mRNA ist absolut essentiell, da eine fälschliche Expression von Sxl in männlichen Embryonen beziehungsweise eine zu geringe Expression in Weibchen unmittelbar letal sind (Cline 1978). Aus diesem Grund wird in beiden Geschlechtern zusätzlich das nah mit Sxl verwandte Protein Sister-of-Sex-lethal (Ssx) produziert, welches mit Sxl um die Bindung an die *sxl* mRNA konkurriert, jedoch das Spleißmuster nicht beeinflusst. Hierdurch soll verhindert werden, dass versehentlich produzierte, sehr geringe Mengen an Sxl in Männchen zu einer Auslösung der Rückkopplungsschleife und somit zu einer unerwünschten Produktion größerer Mengen an Sxl führen. Erst größere Mengen an Sxl, wie sie in Weibchen produziert werden, sind in der Lage Ssx von der mRNA zu verdrängen und somit ein weibliches Spleißmuster herbeizuführen (Moschall et al. 2019).

Aktives Sxl führt im Weiteren zur Ausbildung weiblicher Charakteristika in Fliegen. Die Mechanismen sowie Interaktionspartner von Sxl hierbei sind sehr vielseitig. Von besonderer Bedeutung sind die jeweilige Regulation von *transformer (tra)* und *male-specific lethal 2 (msl-2)*. Beide Transkripte enthalten in ihrer prä-mRNA Bindestellen für Sxl, welche zu einem alternativen Spleißen gegenüber dem jeweiligen männlichen Äquivalent führen. Im Fall von *tra* führt die Bindung von Sxl dazu, dass, im Gegensatz zu Männchen, eine weiter distal gelegene 3'-Spleißstelle innerhalb von Intron 1 verwendet wird, wodurch das Entstehen eines vorzeitigen Stopcodons verhindert wird und aktives Tra produziert werden kann. Die Expression von Tra führt wiederum über eine weitere Signalkaskade zur Expression der Weibchen-spezifischen Variante des Transkriptionsfaktors doublesex (dsx^F), welcher die Ausbildung weiblicher Morphologie und Verhaltens bedingt (Review: Venables et al. 2012). Das Sxl-vermittelte, alternative Spleißen von *msl-2* führt hingegen zum Einbau eines 133 nt großen Introns in der 5' UTR der reifen mRNA (Bashaw und Baker 1995). Zudem ist Sxl in der Lage, direkt die Translation von *msl-2* in Weibchen zu unterdrücken (Gebauer et al. 1998). Dies ist ebenfalls von entscheidender Wichtigkeit, da Msl-2 eine der zentralen Komponenten des Dosiskompensations-Komplexes ist und für dessen Assemblierung verantwortlich ist. In *D. melanogaster* sorgt dieser Komplex für eine Hypertranskription des X-Chromosoms in Männchen und somit für eine Angleichung der Genexpression an die weiblichen X-Chromosomen. Eine Fehlexpression von Msl-2 in Weibchen wäre dementsprechend letal und wird daher über mehrere Mechanismen reguliert (Kelley et al. 1995). Auch in diesen Mechanismen ist Sxl involviert. So stellt Sxl in Weibchen zusammen mit einem weiteren Protein, How (Held Out Wings), sicher, dass *msl-2* mRNA nicht den Zellkern

verlässt. Beide Proteine können unabhängig voneinander an die mRNA binden, werden aber beide gemeinsam benötigt um effizient einen Export der mRNA aus dem Zellkern zu verhindern (Graindorge et al. 2013). Die Funktion von Sxl ist jedoch nicht nur auf den Zellkern beschränkt, sondern findet auch im Zytoplasma statt. Hier agiert Sxl als Translationsrepressor für eine Vielzahl an Transkripten, unter anderem auch erneut *msl-2* (Bashaw und Baker 1997; Gebauer et al. 1998). Die Erkennung erfolgt über insgesamt sechs Sxl-Bindestellen (A-F) in der 5' (A, B) und 3' UTR (C, D, E, F) der *msl-2* mRNA, wobei die Anwesenheit der Bindestellen B, E und F ausreichend für eine Regulation ist (Bashaw und Baker 1997; Kelley et al. 1997; Gebauer et al. 1998; Gebauer et al. 1999). Die Regulation der Translation erfolgt im Weiteren, abhängig von der Position der verwendeten Bindestellen, auf zwei unterschiedliche Arten. Durch die Bindung der 5' UTR wird ein kurzer uORF aktiviert, welcher verhindert, dass das scannende Ribosom den *msl-2* ORF erkennt und translatiert. Diese Art der Translationskontrolle wird vermutlich auch bei anderen Ziel-mRNAs verwendet. Der genaue Mechanismus dahinter, sowie die mögliche Beteiligung weiterer Faktoren sind jedoch unklar (Medenbach et al. 2011). Bei der Kontrolle über die 3' UTR interagiert Sxl mit einem Ko-Repressor, Upstream of N-Ras (UNR). Dieser ist ebenfalls in der Lage RNA zu binden, allerdings ist diese Bindung im Fall von *msl-2* nur im Zusammenspiel mit Sxl stabil. UNR wiederum interagiert mit dem Poly(A)-Bindepotein (PABP) nachdem dieses bereits eIF4G und eIF4E an die mRNA rekrutiert hat. Durch die Interaktion von Sxl und UNR mit PABP wird die Bindung des Ribosoms verhindert. Der zugrunde liegende Mechanismus ist aber auch hier bislang unbekannt (Grskovic et al. 2003; Abaza et al. 2006; Duncan et al. 2006; Duncan et al. 2009).

Weibliche Keimbahnstammzellen produzieren sehr große Mengen an zytoplasmatischem Sxl, welches bis zum 16-Zell Zystenstadium persistiert. In diesem erfolgt die Expression allerdings nur noch in sehr geringem Maße beziehungsweise wird vollständig eingestellt (Chau et al. 2012). Vorangegangene Studien konnten zeigen, dass Sxl, zusammen mit Bam, den Übergang von Keimbahnstammzellen zu Zystoblasten reguliert, unter anderem durch die Repression der *nos* Expression (Review: Salz 2013). Der Verlust der Aktivität von Bam und/oder Sxl führt zur Bildung von Tumoren, sowie der fälschlichen Expression von Markern, welche normalerweise in der männlichen Keimbahn zu finden sind (Chau et al. 2009, 2012). Die Regulation von *nos* durch Sxl in Zystoblasten ist direkt, unterscheidet sich jedoch nach aktuellem Wissensstand deutlich von den bisher bekannten Regulationsmechanismen. Zwar finden sich auch in der *nos* mRNA insgesamt drei Sxl-Bindestellen (je eine in 5' UTR, Intron und 3' UTR), von diesen ist allerdings nur diejenige in der 3' UTR essentiell für die Regulation von *nos* (Chau et al. 2012). Nähere, biochemische Hintergründe dazu, wie

1. Einleitung

die Bindung der *nos* mRNA und die Interaktion mit Bam die Regulation der *nos* Expression beeinflussen sind bislang nicht bekannt.

1.4 Bag of marbles

Bag of marbles (Bam) wurde bereits vor etwa 30 Jahren als einer der entscheidenden Faktoren für die frühen Stadien der Gametogenese in männlichen und weiblichen Fliegen identifiziert (McKearin und Spradling 1990). Seither wurde seine Rolle und Funktion insbesondere in der Keimbahnentwicklung, aber auch bei anderen Vorgängen extensiv untersucht. Dennoch sind viele Fragen hierzu weiterhin nur teilweise oder nicht beantwortet.

Die Primärstruktur von Bam weist nur sehr geringe Homologien zu anderen Proteinen auf. In *Drosophila* wurde lediglich eine geringe doch signifikante Ähnlichkeit mit dem, ebenfalls in der Keimbahn fungierenden, Protein Otu identifiziert (McKearin und Spradling 1990). In anderen Organismen konnten nur wenige, sehr weit entfernte Orthologe von Bam gefunden werden, darunter das, auch in Menschen vorkommende und hoch konservierte, Protein MEIOC. Orthologe von Bam und MEIOC weisen entfernte Ähnlichkeiten in ihrer Sequenz auf und es besteht die Hypothese, dass sich Bam sehr früh evolutionär aus MEIOC entwickelt hat (Jain et al. 2018). Auch die Sekundärstruktur von Bam weist faktisch keine bekannten Domänenstrukturen auf, lediglich eine PEST-Domäne konnte in unmittelbarer Nähe des C-Terminus identifiziert werden (McKearin und Spradling 1990). Diese Domäne wird im Allgemeinen mit Proteininstabilität in Verbindung gebracht (Rogers et al. 1986), was nahe legt, dass auch Bam über diese Domäne schnell und effizient abgebaut werden kann.

Der weitaus größte Teil der mit Bam assoziierten Vorgänge und Interaktionen steht im direkten Zusammenhang mit der Keimbahnentwicklung in männlichen und weiblichen Fliegen. Es wurde aber auch eine Rolle von Bam in der Hämatopoese berichtet (Tokusumi et al. 2011; Tokusumi et al. 2015; Tokusumi et al. 2018). Auch weitere Prozesse könnten von Bam beeinflusst werden, nachdem eine kürzlich erschienene Studie zum Transkriptom von keimbahnstammzellartigen Zellen mit einer Mutation in *bam* eine Vielzahl von Veränderungen in der Transkription vieler verschiedener Gene feststellen konnte (Tiwari et al. 2019). Weiterführende Studien zur Verifizierung dieser Ergebnisse stehen jedoch noch aus.

Die Rolle von Bam in der Keimbahn ist im Gegensatz hierzu sehr intensiv untersucht und es konnte bereits sehr früh festgestellt werden, dass Bam der Hauptregulator für den Übergang von Keimbahnstammzellen zu differenzierten Tochterzellen ist. Für

diesen Übergang ist seine Expression sowohl notwendig als auch ausreichend und Mutationen in *bam* führen zur Bildung von tumorartigen Zysten in der Keimbahn (McKearin und Spradling 1990; Gönczy et al. 1997). In der weiblichen Keimbahn finden sich dabei zwei Isoformen von Bam, von denen eine im Zytoplasma vorzufinden ist (BamC), die andere jedoch im Spektrosom/Fusom (BamF) lokalisiert ist. Das Expressionsmuster beider Isoformen unterscheidet sich dabei deutlich. So kann BamC in Zystoblasten und, wie Sxl, in Zysten bis zum 8-Zell Stadium (Bereich 2a des Germariums) nachgewiesen werden. In Keimbahnstammzellen und Zysten ab dem 16-Zell Stadium wird es jedoch nicht exprimiert. BamF hingegen ist bereits in Keimbahnstammzellen im Spektrosom nachweisbar und bleibt dies auch in im gesamten Germarium sowie in jungen Eikammern (McKearin und Ohlstein 1995). Interessant hierbei ist, dass in Keimbahnstammzellen kein *bam* Transkript vorzufinden ist, was nahe legt, dass BamF in Vorläufern der Keimbahnstammzellen exprimiert wird und anschließend im Spektrosom verbleibt (McKearin und Spradling 1990). Ein Ausbleiben der Expression von Bam in Keimbahnstammzellen beider Geschlechter ist essentiell da beispielsweise eine ektopische Expression von Bam in diesen Zellen zu deren Verlust durch vorzeitige Differenzierung führt (Ohlstein und McKearin 1997; Schulz et al. 2004). Basierend auf dieser Erkenntnis konnte im Folgenden gezeigt werden, dass *bam* in Weibchen das zentrale Ziel der Repression durch das Piwi und das Dpp/Gbb-Signal in Keimbahnstammzellen ist (Chen und McKearin 2003a; Chen und McKearin 2003b; Song et al. 2004; Szakmary et al. 2005; Kawase et al. 2004). Die Regulation der Expression von *bam* in Stammzellen und ihren Tochterzellen erfolgt dabei über ein kurzes Fragment in der *bam* 5'UTR. Dieses beinhaltet sowohl ein *Enhancer* Element, welches in Zystoblasten zu einer schnellen und starken Expression von Bam führt, als auch ein kurzes *Silencer* Element, welches eben dies in den Stammzellen verhindert. Dieses wird von Mad und Med, Effektoren des Dpp-Signals (Xie und Spradling 1998), gebunden und die Expression von *bam* hierdurch reprimiert (Chen und McKearin 2003b). Diese Art der Regulation führt jedoch nicht zu einem kompletten Verlust an Bam in den Keimbahnstammzellen. Abhängig vom Grad der verbliebenen Menge an Bam erfolgt eine unterschiedlich starke Expression an E-Cadherin in den Zellen und somit auch eine unterschiedlich starke Bindung an die *Cap*-Zellen. Dies führt zu einem gewissen Grad an Konkurrenz zwischen den Keimbahnstammzellen und könnte somit eine Art Qualitätskontrolle unter diesen bedingen (Jin et al. 2008). Gleichzeitig sorgt eine dosisabhängige Interaktion mit eIF4A dafür, dass eine vorzeitige Differenzierung und somit der Verlust der Stammzelle verhindert wird (Shen et al. 2009). Durch den Verlust des Dpp-Signals in Stammzelltöchtern wird die Regulation von *bam* aufgehoben und es kommt zu einer starken Expression von Bam in den Zellen (McKearin und Ohlstein

1. Einleitung

1995). Diese wird zusätzlich durch die Interaktion von Bam mit Twin, dem CCR4-Homolog in Fliegen, unterstützt (Morris et al. 2005; Fu et al. 2015). Durch die Expression von Bam werden wiederum Mechanismen ausgelöst, durch welche es zu einer Differenzierung der Tochterzellen kommt. So interagiert Bam mit Ubiquitin und der Deubiquitinase Otu in einem Komplex um die ubiquitin-abhängige Regulation von Cyclin A zu verhindern, welche andernfalls zu einem Erhalt des Stammzellcharakters führt (Chen et al. 2009; Ji et al. 2017). Auch ist es in der Lage, durch Bindung von Csn4 in Zystoblasten, die Aktivität des COP9-Komplexes von Stammzellselbsterneuerung hin zu Zelldifferenzierung zu ändern (Pan et al. 2014). Des Weiteren wird BamF benötigt, um die korrekte Assoziation der AAA ATPase Ter94 mit dem Fusom zu ermöglichen und somit die Grundlage für die unvollständige Zytokinese und die Ausbildung der Ringkanäle während der Teilungen der Keimzellzyste zu ermöglichen (León und McKearin 1999). Auch in Zystoblasten kommt es zu einer Interaktion von Bam mit eIF4A, jedoch führt diese in diesem Fall nicht zu einer Repression von *bam*, sondern stattdessen interagieren beide Proteine um die Expression von Faktoren zum Erhalt des Stammzellcharakters zu unterdrücken (Shen et al. 2009). Schließlich führt die erwähnte Interaktion von Bam mit Sxl, Bgcn und Mei-P26 zu einer transienten Repression von *nos*, wodurch verhindert wird, dass Letzteres die Expression weiterer Differenzierungsfaktoren unterdrückt (Li et al. 2013).

Trotz der intensiven Forschungsarbeit an Bam und den damit assoziierten Prozessen, ist seine biochemische Rolle und Funktion bislang weitestgehend nicht verstanden. Die Tatsache, dass Bam jedoch eine wichtige Rolle in vielen, teils sehr unterschiedlichen Prozessen spielt, legt die Vermutung nahe, dass es entweder selbst in der Lage ist mehrere verschiedene Funktionen auszuüben, oder jedoch als eine Art „flexibler Adapter“ fungiert, welcher verschiedene Interaktionspartner rekrutieren kann welche schließlich die gewünschte biochemische Funktion erfüllen.

1.5 Benign Gonial Cell Neoplasm

Bgcn wird sowohl in der männlichen als auch in der weiblichen Keimbahn von *D. melanogaster* exprimiert, konnte aber auch außerhalb dieser identifiziert werden (Gateff 1982). Sein Expressionsmuster in Ovarien ist dabei recht komplex und variiert zwischen verschiedenen Entwicklungsstadien (Gateff et al. 1996; Mukai et al. 2006). Erste Sequenzvergleiche zeigten eine teilweise Ähnlichkeit mit Komponenten des Spliceosoms (Gateff et al. 1996), weitere Untersuchungen konnten jedoch eine Verwandtschaft zur Familie der ATP-abhängigen DExH-Box RNA Helikasen feststellen. Im Gegensatz zu diesen, sind die für die ATP-Bindung und Hydrolyse notwendigen

P-loop Motive in Bgcn jedoch mutiert und vermutlich inaktiv. Dennoch wird davon ausgegangen, dass Bgcn in der Lage ist RNA zu binden (Ohlstein et al. 2000). In einer aktuellen, phylogenetischen Studie konnte schließlich gezeigt werden, dass Bgcn ein Ortholog der RNA-Helikase YTHDC2 aus Säugern ist (Jain et al. 2018), wie zuvor anderweitig vermutet (Bailey et al. 2017). Obwohl die Domänenstruktur beider Proteine im mittleren Bereich überwiegend identisch ist, besitzt Bgcn im Gegensatz zu YTHDC2 weder eine N-terminale R3H noch eine C-terminale YTH-Domäne, ist also vermutlich nicht in der Lage wie dieses m⁶A RNA-Modifikationen zu erkennen und zu binden (Hsu et al. 2017). Zudem finden sich in *Drosophiliden* ausschließlich Homologe von Bgcn, wohingegen in anderem Insekten und auch nah mit *Drosophila* verwandten Fliegen stets mindestens ein Homolog von YTHDC2 exprimiert wird (Jain et al. 2018).

Insgesamt zeigt sich die Domänenstruktur von Bgcn deutlich komplexer als im Fall von Sxl oder Bam. Neben den bereits erwähnten, mutierten, P-loop Motiven finden sich zusätzlich eine Ankyrin Repeat Domäne, eine *Helicase-associated domain 2* (HA2) sowie eine OB-Faltung (*Oligonucleotide/Oligosaccharide Binding*) (**Abb. 3**). Während die HA2 und OB-Domäne, ebenso wie die P-loop Motive auf eine Interaktion mit Nucleinsäuren hindeuten, lässt die Anwesenheit der Ankyrin Domäne darauf schließen, dass Bgcn über diese auch in der Lage ist mit anderen Proteinen zu interagieren (Mosavi et al. 2004).

Die Forschung zur Funktion von Bgcn bezieht sich in erster Linie auf seine Rolle in der Keimbahnentwicklung, sowohl in männlichen, als auch in weiblichen Fliegen. In beiden Geschlechtern konnte gezeigt werden, dass eine Mutation von Bgcn zur Entstehung von tumorartigen Zellanhäufungen und somit zur Sterilität führt (Gateff 1982; Mahowald und Wei 1994). Die zugrunde liegenden Mechanismen unterscheiden sich jedoch zwischen den Geschlechtern. In der männlichen Keimbahn interagiert Bgcn mit Bam, um die unkontrollierte Proliferation von Keimbahnzellen Zell-intern zu unterdrücken. Der Verlust bereits einer der beiden Aktivitäten führt, neben der unkontrollierten Zellteilung, auch zu einer Deregulation der Genexpression, da mutierte Zellen sowohl Stammzellmarker als auch Marker von bereits differenzierten Zellen aufweisen (Gönczy et al. 1997). Im Gegensatz zur weiblichen Keimbahn führt die Interaktion von Bam und Bgcn jedoch nicht zu einer Repression von *nanos* sondern stattdessen zu der von *mei-P26*. Zweck dieser Repression ist die Regulation des Übergangs von TA (*Transit Amplifying*)-Zellproliferation hin zur finalen Differenzierung von Spermatozyten (Insko et al. 2012). Bgcn, welches in allen Spermatozyten-Stadien exprimiert wird, interagiert hierfür mit Bam und einem weiteren Protein, Tut (tumorous testis). Gemeinsam binden diese drei Proteine an die *mei-P26* 3' UTR, was zu einer Repression der Translation von *mei-P26*

1. Einleitung

führt. Die Expressionsmuster von Bam und Tut bestimmen hierbei den Zeitraum der Komplexbildung und damit der Repression von *mei-P26* (Chen et al. 2014). Der genaue Mechanismus der *mei-P26* Repression ist jedoch, wie der der *nos* Repression in Ovarien, bislang nicht vollständig verstanden.

Anders als in der Spermatogenese, führt eine Mutation von *bgcn* in der Oogenese nicht zu einer Blockade der Differenzierung. Stattdessen weisen mutante Zellen einen partiellen Verlust ihrer Geschlechtsidentität auf, da in ihnen neben weiblichen auch einige männliche Marker exprimiert werden (Mahowald und Wei 1994). Zwar kommt es auch bei einer Mutation von *bgcn* zur Ausbildung tumorartiger Zysten, diese können jedoch weiterhin durch Follikelzellen vom Germarium separiert werden und entlang der Ovariolen wandern. Hierbei zeigen auch die Follikelzellen eine teils gestörte Genexpression (Gutzeit und Strauß 1989). Das Expressionsmuster von *bgcn* innerhalb des Germariums gleicht weitestgehend dem von *bam* (Ohlstein et al. 2000), es wird jedoch auch in den Keimbahnstammzellen exprimiert. In diesen ist es, anders als *bam*, kein Ziel des Dpp-Signals. Stattdessen erfolgt die Kontrolle seiner Expression über den Tip60 Komplex, welcher neben der Regulation von *bgcn* auch Einfluss auf den Zellzyklus von Keimbahnstammzelltöchtern nimmt und somit deren Differenzierung entscheidend mit beeinflusst (McCarthy et al. 2018). Die Interaktion von Bam und Bgcn in der Oogenese beschränkt sich jedoch nicht auf ihre Beteiligung in der Repression von *nanos* (Li et al. 2009), sondern Bgcn ist auch dafür verantwortlich, dass Bam korrekt im Fusom lokalisiert wird und funktional ist (Lavoie et al. 1999). Schließlich regulieren Bam und Bgcn gemeinsam auch die Expression von E-Cadherin in Keimbahnstammzellen. E-Cadherin ist eine essentielle Komponente für die Vermittlung des Zell-Zell Kontakts zwischen *Cap*-Zellen und Keimbahnstammzellen. Stammzellen mit einer Mutation in *bam* und/oder *bgcn* akkumulieren größere Mengen an E-Cadherin, was zu einer stärkeren Bindung dieser Zellen an die *Cap*-Zellen und somit zu einer Verdrängung wildtypischer Stammzellen führt. Die Regulation der E-Cadherin Expression könnte durch Fluktuationen in der Konzentration an Bam und Bgcn in den Stammzellen zu einer gewissen Konkurrenz zwischen diesen führen. Dies könnte als eine Art Mechanismus zur Qualitätskontrolle der Stammzellen innerhalb der somatischen Nische dienen (Jin et al. 2008).

1.6 Meiotic P-26

Mei-P26 gehört zur Familie der TRIM (*TRIPartite Motif*) Proteine, deren Mitglieder mit einer Vielzahl an verschiedenen Aktivitäten assoziiert werden, darunter Protein-Protein und Protein-RNA Interaktionen (Review: Williams et al. 2019). Charakteristisch und auch namensgebend für diese Proteinfamilie ist das TRIM, welches zumeist in Richtung des N-Terminus der Proteine lokalisiert ist und aus einer RING (*Rather Interesting New Gene*) Zinkfinger-Domäne, einem oder zwei B-Box Typ Zinkfingern, sowie einer Coiled Coil Domäne besteht, die in einer hochkonservierten Reihenfolge und Abstand zueinander stehen (Reddy et al. 1992; Borden 1998; Reymond et al. 2001). Die TRIM Proteine können jedoch anhand weiterer struktureller Merkmale in neun weitere Unterfamilien unterteilt werden, darunter die TRIM-NHL Proteine, zu denen auch Mei-P26 zählt (Glasscock et al. 2005). Mitglieder dieser Unterfamilie eint wiederum die Anwesenheit einer NHL (NCL-1, HT2A, LIN-41) Domäne, benannt nach den ersten Proteinen, in denen diese Domäne nachgewiesen werden konnte (Slack und Ruvkun 1998; Williams et al. 2019). Die NHL Domäne befindet sich meist im C-terminalen Bereich der Proteine und ähnelt strukturell einer WD40 Domäne, bestehend aus einem sechs-blättrigen Propeller mit jeweils vier anti-parallelen β -Faltblättern (Slack und Ruvkun 1998; Stirnimann et al. 2010). Interessanterweise sind es in TRIM-NHL Proteinen nicht die Subdomänen der TRIM-Domäne mit ihren unterschiedlichen Aktivitäten die entscheidend für die Funktion des Proteins sind, sondern die NHL Domäne (Stirnimann et al. 2010; Loedige et al. 2013). Auch unterscheiden sich TRIM-NHL Proteine in ihrer organismischen Funktion von anderen TRIM Proteinen. Diese werden überwiegend mit Prozessen wie Zelldifferenzierung, Autophagie, Apoptose, Karzinogenese und Immunität assoziiert, wohingegen TRIM-NHL Proteine mit Entwicklung, Differenzierung, Proliferation und Tumor Suppression, sowohl im Soma, als auch in der Keimbahn, in Verbindung gebracht werden. Funktionell agieren sie dabei als E3-Ubiquitin Ligasen, Translationsregulatoren und in der Regulation von miRNA Leveln (Hatakeyama 2011, 2017; Tocchini und Ciosk 2015; Williams et al. 2019). Diese Funktionen gehen des Öfteren auch mit einer Interaktion zwischen der NHL Domäne und RNA einher, wobei sich die RNA Binde- und Erkennungseigenschaften der verschiedenen TRIM-NHL Proteine teils deutlich voneinander unterscheiden (Loedige et al. 2015; Kumari et al. 2018).

In einem P-Element Screen wurde *mei-P26* zunächst als Gen identifiziert, dessen Mutation in weiblichen Fliegen polaritätsabhängig zu einer deutlichen Reduktion der Rekombinationsrate während der Meiose führt (Sekelsky et al. 1999; Page et al. 2000). Weitere Studien konnten daraufhin zeigen, dass es jedoch auch in einer Vielzahl anderer Prozesse, innerhalb und außerhalb der Keimbahn, involviert ist. So wurde Mei-P26

1. Einleitung

bereits funktionell mit der Regulation der Zellproliferation durch Kontrolle der dMyc Expression (Neumüller et al. 2008; Ferreira et al. 2014), der Repression von miRNAs durch Interaktion mit Ago-1 im miRISC (Neumüller et al. 2008) und der Regulation der Neuronalentwicklung (Glasscock et al. 2005; Neumüller et al. 2008) assoziiert. Zudem konnte gezeigt werden, dass Mei-P26 über seine NHL Domäne in der Lage ist, RNA sequenzabhängig zu binden (Loedige et al. 2014; Loedige et al. 2015). Von besonders großer Bedeutung ist Mei-P26 allerdings in der Keimbahnentwicklung beider Geschlechter. Bereits im Embryonalstadium erfolgt eine Expression von Mei-P26 im Zytoplasma der Urkeimzellen, welche auch im Larven- und frühen Puppenstadium in diesen persistiert, jedoch in teils unterschiedlicher Intensität zwischen den Geschlechtern. Ein Knockdown von *mei-p26* in diesen Stadien führt zu erheblichen Beeinträchtigungen der Keimbahnentwicklung, welche in Teilen stark den Phänotypen eines *nos* Knockdowns gleichen (Jankovics et al. 2014). Sowohl in männlichen als auch in weiblichen Keimzellen führt eine Mutation von *mei-P26* zur Bildung großer Zysten aus undifferenzierten Zellen, sowie zu einer teils starken Vergrößerung der Nukleoli (Page et al. 2000; Neumüller et al. 2008). Letzteres kann eventuell als eine Konsequenz der stark erhöhten Expression von dMyc betrachtet werden (Neumüller et al. 2008). Wie zuvor bereits bei *Bgcn* erwähnt, ist Mei-P26 in der Spermatogenese von essentieller Bedeutung für den Übergang von TA-Zellen zu differenzierten Spermatozyten. Seine Expression wird hierfür durch translationelle Repression durch einen Komplex aus Bam, *Bgcn* und Tut, welcher an die *mei-P26* 3' UTR bindet, reguliert (Insko et al. 2012; Chen et al. 2014). Bevor es jedoch zur Bildung des trimeren Komplexes kommen kann, muss zunächst die Expression von Bam stimuliert werden, da dieses andernfalls in unzureichenden Mengen in den Zellen vorhanden ist. Dies geschieht durch Mei-P26 selbst, welches zu diesem Zeitpunkt noch exprimiert wird. Ab Erreichen einer gewissen Menge an Bam kommt es zu einer effizienten Komplexbildung und somit zur Repression von *mei-P26* (Insko et al. 2012). Interessanterweise scheint Bam auch eine Rolle im Phänotyp der vergrößerten Nukleoli in *mei-P26* Mutanten zu spielen, da seine Überexpression diesen Phänotyp retten kann (Insko et al. 2012).

In der weiblichen Keimbahn ist Mei-P26 nicht nur in der Repression von *nos* in Zystoblasten involviert. Vielmehr spielt es auch in der Selbsterneuerung der Keimbahnstammzellen eine wichtige Rolle. In diesen verursacht Mei-P26, zusammen mit Nanos, die translationelle Repression von *Brat*, wodurch die Aufrechterhaltung des Dpp-Signals in den Stammzellen gewahrt wird. Gleichzeitig interagiert Mei-P26 aber auch mit dem miRISC um somit die Expression anderer mRNAs zu unterbinden. Die jeweilige biochemische Rolle von Mei-P26 in diesen Interaktionen ist unklar, jedoch scheint zumindest bei der Interaktion mit miRISC die NHL-Domäne eine wichtige Rolle

zu spielen (Li et al. 2012). Ebenfalls unklar ist, wie die Änderung der Funktion von Mei-P26 zwischen Keimbahnstammzellen und Zystoblasten vonstattengeht. Es wird allerdings spekuliert, dass dies mit der Veränderung der Bam Expression zwischen diesen Zellen zusammenhängt (Li et al. 2012; Li et al. 2013).

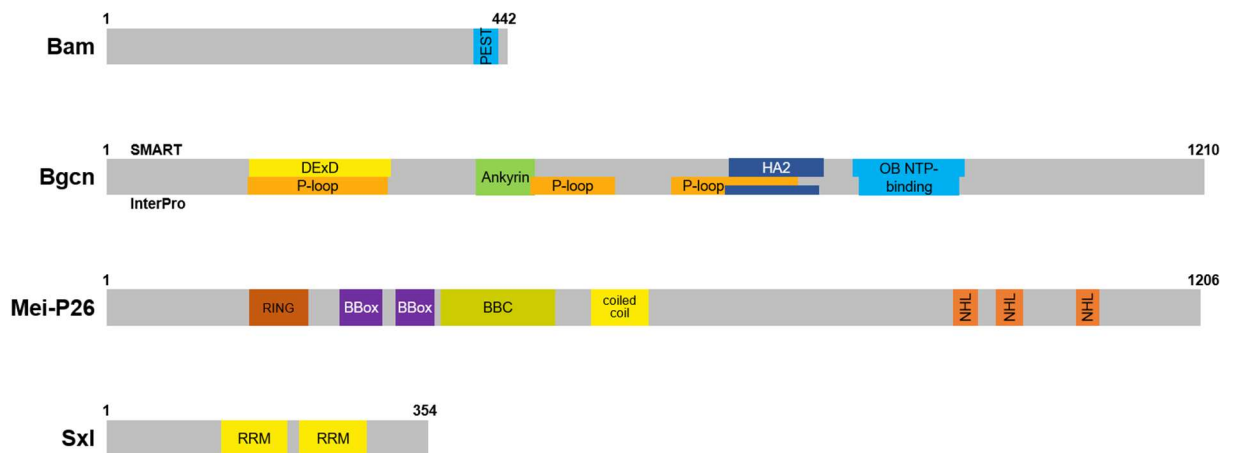


Abb. 3: Schematische Domänenstruktur der, an der Repression von *nanos* in Zystoblasten beteiligten, Proteine Bag of marbles (Bam), Benign Gonial Cell Neoplasm (Bgcn), Meiotic P-26 (Mei-P26) und Sex lethal (Sxl). Im Fall von Bgcn sind sowohl die vorhergesagten Domänen des SMART-Algorithmus, als auch die des InterPro-Algorithmus gezeigt. HA2: *Helicase-associated domain 2*, OB: *Oligonucleotide/Oligosaccharide Binding*, RING: Zinkfinger RING-Typ; BBC: BBox C-terminal; NHL: NCL-1, HT2A, Lin-41; RRM: *RNA recognition motif*.

1.7 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, weiterführende Erkenntnisse über die Funktionsweise und die gegenseitige Wechselwirkung der, an der transienten Repression von *nanos* im Germarium beteiligten, Proteine zu erlangen.

Anhand detaillierter, biochemischer Analysen von Bam und Bgcn *in vitro*, wurde für beide Proteine näher untersucht, wie diese in der Lage sind die Expression von mRNAs zu regulieren. Der Fokus der Arbeit lag dabei auf der Identifikation der verantwortlichen Bereiche innerhalb der Proteine, sowie auf der Untersuchung der Rolle von möglichen Interaktionen beider Proteine miteinander sowie mit anderen Proteinen. Zudem wurden in einem kollaborativen Bestreben mit anderen Laboren die strukturellen und molekularen Grundlagen für die Bindung von RNAs durch Mei-P26 näher untersucht. Zusätzlich wurde mittels aktueller iCLIP Analysen das Spektrum an, von Mei-P26 regulierten Genen erweitert. Ähnlich wie für die Untersuchung von Bam und Bgcn, wurden Bestrebungen unternommen ein besseres Verständnis für die zugrundeliegenden Mechanismen der Genregulation durch Mei-P26 und der daran beteiligten Proteindomänen zu erlangen. Für alle untersuchten Proteine konnten dabei neue Erkenntnisse erlangt werden, welche unser Verständnis für ihre Rolle in der Regulation der Genexpression, die dafür notwendigen Bedingungen und die zugrundeliegenden Funktionsweisen deutlich erweitern.

2. Ergebnisse

Im Zuge dieser Arbeit wurden in erster Linie die Aktivitäten von Bam, Bgcn und Mei-P26 näher untersucht. Aus vorangegangenen Untersuchungen (S. Palusci, Daten nicht gezeigt) war dabei bereits bekannt, dass sowohl Bam als auch Bgcn in Tethering-Experimenten (Behm-Ansmant et al. 2006) in der Lage sind, die Expression eines Luciferase-Reporters zu unterdrücken. Die hierfür verantwortlichen Sequenzbereiche und Interaktionen beider Proteine wurden in dieser Arbeit identifiziert und näher untersucht. Für Mei-P26 und Sxl konnte jedoch keine vergleichbare Aktivität nachgewiesen werden. Allerdings legen bereits publizierte Studien für diese Proteine eine Rolle in der RNA-Bindung nahe, welche im Fall von Sxl auch bereits in der *nos* 3' UTR gezeigt werden konnte (Chau et al. 2012). In Zusammenarbeit mit dem Labor von Sebastian Glatt (Malopolska Centre of Biotechnology, Jagiellonian University Krakow, Polen) wurde daher die RNA Bindeaktivität von Mei-P26 im Allgemeinen und im Hinblick auf die *nos* 3' UTR näher untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen seien im Folgenden näher vorgestellt.

2.1 Die Rolle der Ankyrin Domäne in Bgcn

Zur Identifikation der für die Aktivität von Bgcn verantwortlichen Region innerhalb des Proteins, wurde zunächst die Aktivität von drei verkürzten Bgcn-Varianten in Tethering-Experimenten untersucht (**Abb. 4A**). In der Variante Bgcn Mid wurden sowohl der N- als auch der C-terminale Bereich des Proteins deletiert um auszuschließen, dass diese Bereiche für die Aktivität des Proteins benötigt werden. Die Varianten Bgcn HA2+OB und Bgcn Ank umfassen jeweils die Regionen der entsprechenden Domänen innerhalb des Proteins, wobei im Fall der Ankyrin-Domäne zusätzlich ein kurzer N-terminaler Linker beibehalten wurde, da vermutlich aus Faltungsgründen andernfalls keine Expression innerhalb des Konstrukts nachgewiesen werden konnte. Als Positivkontrolle wurde in diesem und den folgenden Experimenten GW182 (TNRC6 Homolog in *D. melanogaster*) verwendet, da für dieses bereits gezeigt werden konnte, dass es in der Lage ist die Expression eines Reporters in dieser Art Experiment stark zu unterdrücken (Behm-Ansmant et al. 2006). Aufgrund seiner nachweislich nicht vorhandenen Aktivität in dieser Art von Experimenten, wurde Sxl als Negativkontrolle verwendet.

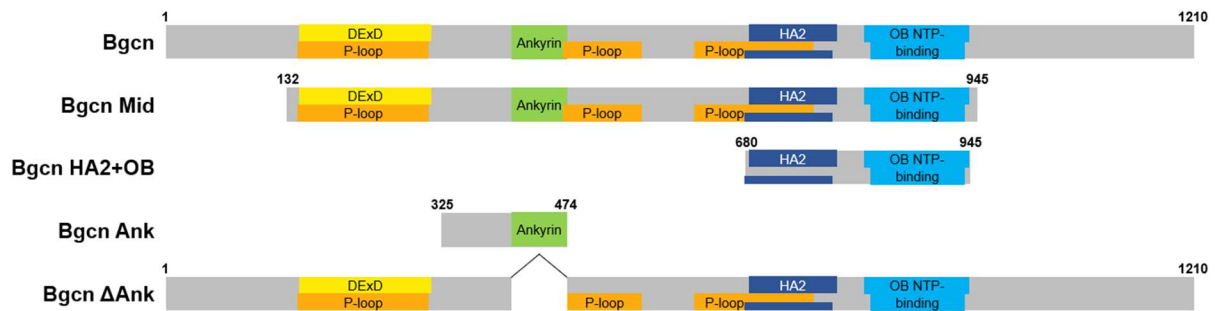
Anhand der erhaltenen Daten (**Abb. 4B**) lässt sich sofort erkennen, dass sowohl das Bgcn Mid als auch das Bgcn Ank Konstrukt in der Lage sind die Expression des Firefly-Luciferase (FLuc) Reporters zu unterdrücken. Interessanterweise ist bei Bgcn HA2+OB das Gegenteil der Fall und es kommt zu einer ca. 75% stärkeren Expression des Reporters. Die Hintergründe hierfür wurden an dieser Stelle nicht weiter untersucht, könnten jedoch mit einer Stabilisierung der mRNA durch Bindung des Proteins

2. Ergebnisse

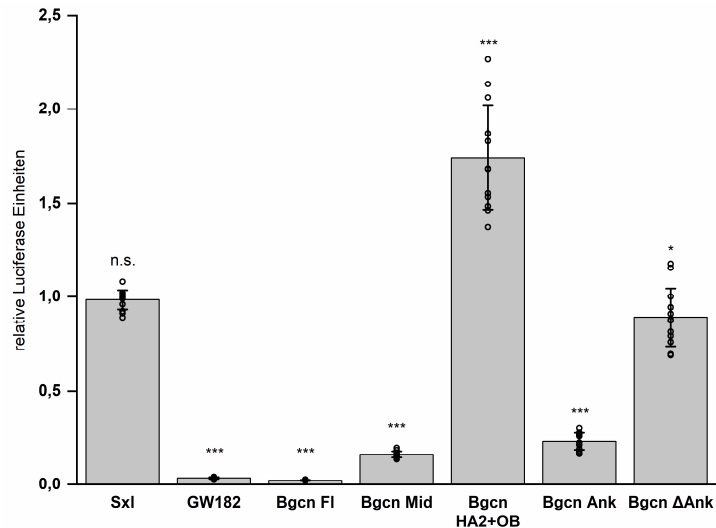
zusammenhängen, da sowohl die HA2 als auch die OB-Faltung Domäne eine potenzielle RNA-Bindeaktivität aufweisen könnten. Da jedoch die Ankyrin-Domäne eine starke und in etwa mit dem Mid Konstrukt vergleichbare Aktivität aufweist, liegt die Vermutung nahe, dass dieser Bereich des Proteins für die Repression des Reporters verantwortlich ist. Um dies weiter zu verifizieren wurde zusätzlich eine weitere Mutante von Bgcn untersucht, in welcher die Ankyrin-Domäne deletiert wurde (Bgcn Δ Ank). Für diese Proteinvariante konnte nahezu keine regulatorische Aktivität nachgewiesen werden, was die Hypothese, dass die Ankyrin Domäne ausreichend und notwendig für die Aktivität von Bgcn ist, weiter untermauert. Um sicherzustellen, dass die erhaltenen Ergebnisse nicht auf eine fehlende, beziehungsweise stark unterschiedliche Expression der getetherten und ungetetherten Proteine zurückzuführen ist, wurde deren Expression über ein zusätzlich eingefügtes HA-Tag in Western Blot Experimenten nachgewiesen (**Abb. 4C**). Dabei konnte gezeigt werden, dass die Expressionslevel der jeweiligen Proteinvarianten sich zwar teils merklich unterscheiden, jedoch keine Unterschiede zwischen der getetherten und ungetetherten Version der Bgcn-Varianten erkennbar sind und ein Einfluss der exprimierten Proteinmenge auf das Ergebnis der Tethering-Experimente somit ausgeschlossen werden kann.

Aufgrund dieser Daten lässt sich jedoch noch keine Aussage darüber treffen auf welche Weise die Expression des FLuc-Reporters durch Bgcn inhibiert wird. Im nächsten Schritt wurden daher die mRNA Expressionslevel der Luciferasen während der Tethering-Experimente mittels Northern Blot untersucht (**Abb. 5**). Hierbei zeigte sich, dass bei den getetherten Proben des Volllänge und des Ankyrin Konstruktes eine deutlich geringere Menge an FLuc mRNA nachgewiesen wurde als es in den jeweiligen, ungetetherten Proben der Fall ist. Dies ist auch der Fall in den Proben mit GW182 für welches bekannt ist, dass es in der Lage ist RNAs abzubauen (Behm-Ansmant et al. 2006). Im Gegensatz zur FLuc mRNA, sind die Expressionslevel der, als Referenz verwendeten, Renilla-Luciferase (RLuc) mRNA unverändert. Es handelt sich also um keinen generellen, unspezifischen Abbau der Luciferase mRNAs in den Zellen. Dies zeigt sich auch beim Blick auf die Δ Ank Proben, in welchen die Level an FLuc mRNA zwischen getetherten und ungetetherten Proben nahezu unverändert sind, auch wenn in diesen Proben stets eine merklich geringere Menge an FLuc mRNA nachgewiesen werden konnte, als es für die anderen Ansätze der Fall war. Zusammengefasst legen diese Ergebnisse somit nahe, dass Bgcn die Expression von Ziel-mRNAs nicht wie zuvor in der Literatur oft angenommen auf Ebene der Translation inhibiert, sondern stattdessen über die Ankyrin Domänen für deren Abbau verantwortlich ist.

A



B



C

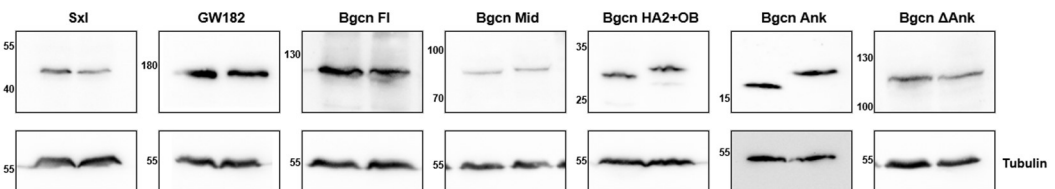


Abb. 4: Identifikation der, für die Aktivität von Bgcn verantwortlichen Proteinregion. A) Schematische Darstellung von Bgcn und den, für die folgenden Experimente verwendeten, Mutanten davon. B) Ergebnisse der Tethering-Experimente mit verschiedenen Varianten von Bgcn sowie Sxl und GW182 als Negativ- bzw. Positivkontrolle. Gezeigt sind der Mittelwert und die Standardabweichung des Quotienten aus der Expression von FLuc und RLuc der getetherten Proben, normalisiert auf das entsprechende Ergebnis der nicht-getetherten Proben. Die Punkte im Bereich der Balken repräsentieren die Ergebnisse der Einzelmessungen (n=9). C) Nachweis der äquivalenten Expression der getetherten und ungetetherten Proteinvarianten mittels Western Blot. Die linke Spur entspricht jeweils dem ungetetherten Protein (HA), die rechte dem getetherten (NHA). Tubulin wurde als Ladekontrolle verwendet.

2. Ergebnisse

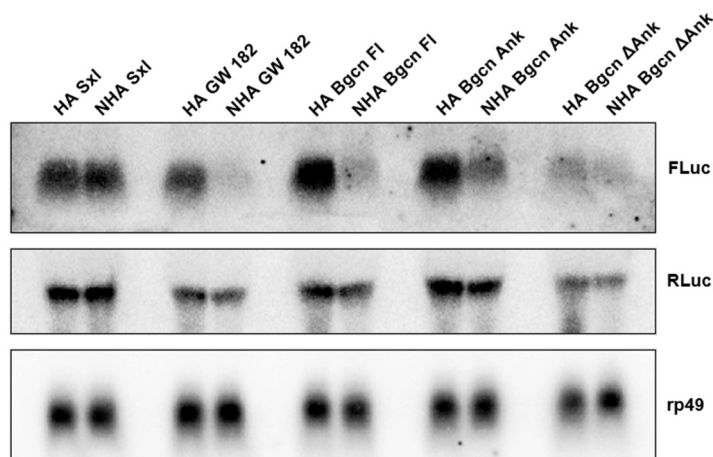


Abb. 5: Northern Blot Analyse der Expressionslevel der FLuc und RLuc mRNAs in den Tethering Experimenten mit ungetetheren (HA) und getetheren (NHA) Bgcn Konstrukten. Der Nachweis der RNAs erfolgte über ^{32}P markierte, *anti-sense* ssRNA-Sonden. *rp49* wurde als Ladekontrolle verwendet. Gezeigt ist ein repräsentativer Blot.

Davon ausgehend, dass Bgcn über seine Ankyrin Domäne den Abbau von Ziel-mRNAs bedingt, stellt sich im Folgenden die Frage, ob dies auf direkte oder indirekte Art und Weise geschieht und ob eventuell weitere Faktoren beteiligt sind.

In Hinblick auf diese Fragestellung ist insbesondere eine Publikation von Kretschmer et al. 2018 sehr interessant. In dieser konnte für YTHDC2, das humane Ortholog von Bgcn, gezeigt werden, dass dieses über seine Ankyrin Domäne in der Lage ist mit der 5'-3'-Exonuklease XRN1 zu interagieren und somit den Abbau von Ziel-mRNAs zu bedingen. Zwar konnten in dieser Studie noch keine genauen, mechanistischen und molekularen Details geklärt werden, dennoch ist es naheliegend zu vermuten, dass ein ähnlicher Mechanismus auch in dem entfernten Ortholog Bgcn konserviert sein könnte. Aus diesem Grund wurde im nächsten Schritt eine mögliche Interaktion zwischen Bgcn und Pacman (Pcm), dem Homolog von XRN1 in *D. melanogaster*, untersucht.

Hierfür wurden S2-Zellen mit einer dsRNA, welche einem kurzen Abschnitt des *pcm* Gens entspricht, behandelt, um somit einen temporären *Knockdown* (KD) von Pcm durch RNAi in den Zellen zu erreichen. Eine angedachte Verifikation und ungefähre Quantifizierung des Pcm-KD mittels Western Blot Analyse über einen spezifischen Pcm-Antikörper (Till et al. 1998) konnte an dieser Stelle aus organisatorischen Gründen (SARS-CoV2 Pandemie) nicht durchgeführt werden. Eine entsprechende Ergänzung der Untersuchung ist zeitnah angestrebt. Insgesamt wurden die Zellen für zwei Wochen

RNAi behandelt, wobei sie nach einer Woche zusätzlich analog wie zuvor, mit Konstrukten für Tethering-Experimente transfiziert wurden. Hierbei wurde jedoch nur ein Einfluss des Pcm *Knockdowns* auf Volllänge Bgcn und die Ankyrin Domäne untersucht um somit festzustellen, ob generell ein Einfluss erkennbar ist und ob dieser über die Ankyrin Domäne vermittelt wird bzw. diese allein ausreichend ist, um eine Interaktion mit Pcm zu ermöglichen. Als zusätzliche Kontrolle wurde zudem Bam getestet, da dieses zwar auch in der Lage ist die Luciferase Expression in Tethering Experimenten zu unterdrücken, es aber bislang kein Indiz für eine mögliche Interaktion mit Pcm gibt. Anhand der Daten des Tethering-Experiments lässt sich jedoch erkennen, dass sowohl Bam, als auch Volllänge Bgcn durch den potenziellen *Knockdown* von Pcm in ihrer Aktivität beeinflusst werden (**Abb. 6**). Während Bam eine etwas geringere Aktivität zeigt als es in einem parallelen Kontrollexperiment mit Zellen ohne Pcm *knockdown* der Fall ist, zeigt Bgcn sogar eine etwas stärkere Aktivität als in der entsprechenden Kontrolle. In beiden Fällen ist der Effekt jedoch als eher geringfügig zu bezeichnen und vermutlich eher auf sekundäre Effekte des *Knockdowns* zurückzuführen als auf einen direkten Einfluss durch Interaktion von Bam oder Bgcn mit Pcm. Die Ankyrin Domäne von Bgcn alleine zeigt keinen signifikanten Unterschied zwischen *Knockdown* und Kontrolle, was ebenfalls darauf hinweisen könnte, dass kein relevanter Zusammenhang zwischen Pcm und der Aktivität von Bgcn besteht. Allerdings kann an dieser Stelle auch nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass die Ankyrin Domäne aufgrund fehlender, flankierender Proteinbereiche nicht in der Lage ist in diesem Versuchsaufbau mit Pcm zu interagieren.

2. Ergebnisse

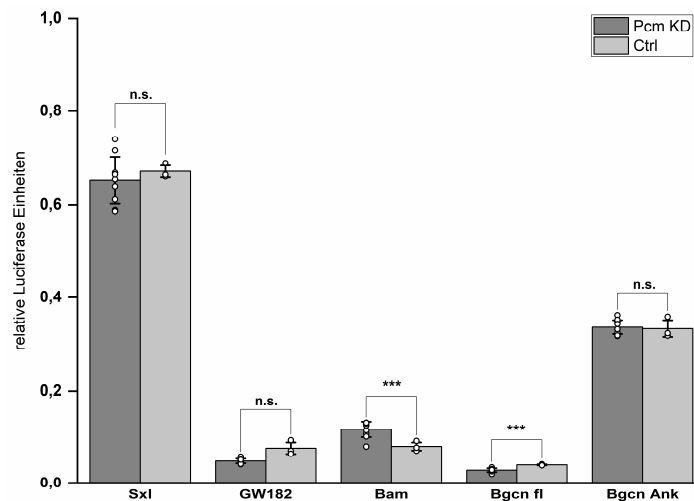


Abb. 6: Ergebnisse der Tethering-Experimente in Zellen mit Pcm *Knockdown* (Pcm KD) und in unbehandelten Zellen (Ctrl) zur Untersuchung des Einflusses von Pcm auf die Aktivität von Bgcn. Gezeigt sind der Mittelwert und die Standardabweichung des Quotienten aus der Expression von FLuc und RLuc der getetherten Proben, normalisiert auf das entsprechende Ergebnis der nicht-getetherten Proben. Die Punkte im Bereich der Balken repräsentieren die Ergebnisse der Einzelmessungen (n=9).

2.2 Einfluss der Interaktion von Bam und Bgcn

Ausgehend von den bisherigen Daten kann keine endgültige Aussage darüber getroffen werden, ob Bgcn alleine oder in Kooperation mit anderen Proteinen für die Repression der Expression von *nos* verantwortlich ist. Allerdings konnte bereits gezeigt werden, dass Bgcn in anderen Prozessen mit Bam interagiert und diese Interaktion auch essentiell für die Erfüllung der biologischen Funktion beider Proteine ist (Gönczy et al. 1997; Lavoie et al. 1999; Jin et al. 2008). Dementsprechend wurde im nächsten Schritt untersucht, ob eine solche Interaktion auch in der Regulation von *nos* von Relevanz ist. Hierfür wurde erneut ein Tethering-Experiment durchgeführt, in dem beide Proteine, Bam und Bgcn, parallel exprimiert wurden, jedoch nur Bam über das Δ N-Peptid an die RNA rekrutiert wurde. Da jedoch beide Proteine unabhängig voneinander bereits eine starke Repression in Tethering-Experimenten zeigen, wurde neben Volllänge Bam (Bam Fl) auch dessen C-terminaler Bereich (Bam C) in diesem Experiment näher untersucht. Dieser zeigte in vorangegangenen Untersuchungen keinerlei regulatorische Aktivität in Experimenten (**Abb. A1**). Es konnte jedoch vorab gezeigt werden, dass dieser Bereich des Proteins mit Bgcn interagieren kann (Li et al. 2009). Zusätzlich wurde auch neben Volllänge Bgcn dessen Δ Ank-Variante getestet, um den Einfluss der Ankyrin Domäne näher evaluieren zu können. Erwartungsgemäß zeigt Volllänge Bam alleine eine starke Repression der Luciferaseaktivität, während Bam C alleine sogar eine verstärkte Aktivität aufweist (**Abb. 7**). Wird jedoch neben Bam auch Volllänge Bgcn in den Zellen

überexprimiert, hat dies zwar keinen nennbaren Einfluss auf die Aktivität von Volllänge Bam, der Ansatz mit Bam C weist nun jedoch eine starke Repression auf, welche in etwa vergleichbar ist mit der des Volllängeproteins. Somit liegt die Vermutung nahe, dass durch Interaktion von Bam C mit Bgcn, Letzteres ebenfalls an die mRNA rekrutiert wird und somit in der Lage ist, deren Expression zu unterdrücken. Weiter gestützt wird diese Vermutung dadurch, dass eine Ko-Expression mit Bgcn Δ Ank zwar weiterhin keinen Effekt auf die Aktivität von Bam FI hat, Bam C hingegen wieder eine starke, aktivierende Aktivität aufweist, welche teils stärker ist als bei der Expression von Bam C alleine. Es scheint also auch im Zusammenspiel mit Bam die Ankyrin-Domäne zu sein, welche für die regulatorische Aktivität von Bgcn verantwortlich ist. Aufgrund ihrer geringen Größe ist es jedoch unwahrscheinlich, dass sie auch für die Interaktion mit Bam verantwortlich ist. Wahrscheinlicher ist eine Interaktion von Bam mit einem anderen Bereich von Bgcn, was auch die weiter gesteigerte, aktivierende Aktivität im Zusammenspiel mit Bam C erklären könnte, da beide Proteine mit der mRNA interagieren und diese somit stabilisieren könnten. An dieser Stelle ist es interessant zu erwähnen, dass im Fall des inversen Experiments, also bei Tethering von Bgcn FI und Δ Ank und Ko-Expression von Bam, kein Unterschied in der Aktivität der Proteine zu erkennen ist (**Abb. A2**). Der Grund hierfür ist nicht vollständig klar, könnte jedoch darin liegen, dass in dieser Konfiguration die Kontaktflächen zwischen Bam und Bgcn durch das Tethering blockiert werden und es somit zu keiner Interaktion zwischen den Proteinen kommt. Auch wurde untersucht, ob die Experimente eventuell durch eine endogene Expression von Bam oder Bgcn beeinflusst wurden. In Ermangelung geeigneter Antikörpern, wurde die Expression der jeweiligen mRNAs mittels qPCR untersucht. Hierbei konnten allerdings in beiden Fällen keine signifikanten Transkriptmengen festgestellt werden. Die endogene Proteinexpression wurde daher als äußerst gering bis nicht vorhanden und daher irrelevant für den Ausgang der Tethering-Experimente eingestuft (Daten nicht gezeigt).

Angesichts der Interaktion von Bgcn und Bam stellt sich im Weiteren die Frage, ob auch ein mechanistischer beziehungsweise ein regulatorischer Zusammenhang zwischen beiden Proteinen besteht. Im Verlauf dieser Arbeit konnten Hinweise dafür gefunden werden, dass ein kurzer Bereich unmittelbar am N-Terminus von Bam für dessen Aktivität verantwortlich ist (**Abb. A1**). Dieses Ergebnis wurde in einer parallel erschienenen Publikation bestätigt und näher untersucht (Sgromo et al. 2018). Dabei zeigte sich, dass ein kurzer, helikaler Bereich zwischen den Aminosäuren 13 und 36 von Bam in der Lage ist, mit CAF40 zu interagieren, welches wiederum durch Interaktion mit Not1 den CCR4-NOT Komplex rekrutieren kann und so zu einer Deadenylierung und einem daraus resultierenden Abbau der mRNA führt.

2. Ergebnisse

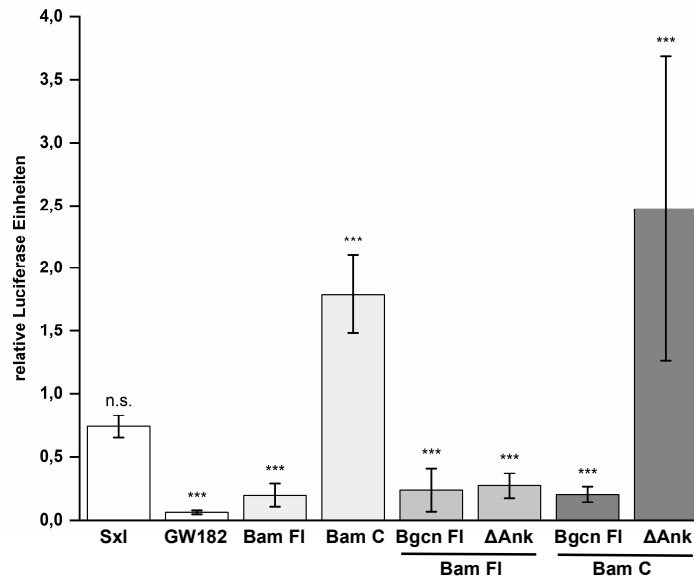


Abb. 7: Untersuchung des funktionellen Zusammenhangs zwischen Bam und Bgcn. Tethering-Experiment mit Volllänge Bam (Bam FI) oder dessen C-Terminus (Bam C). Die Aktivität beider Proteine wurde entweder alleine (hellgrau) oder bei Ko-Expression von ungetetherter Volllänge Bgcn (Bgcn FI) beziehungsweise dessen Ankyrinmutante (Bgcn Δ Ank) untersucht (grau und dunkelgrau). Sxl und GW182 (weiß) wurden als Negativ- beziehungsweise Positivkontrolle verwendet. Gezeigt sind jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung des Quotienten aus der Expression von FLuc und RLuc der getethereten Proben, normalisiert auf das entsprechende Ergebnis der nicht-getethereten Proben (n=9).

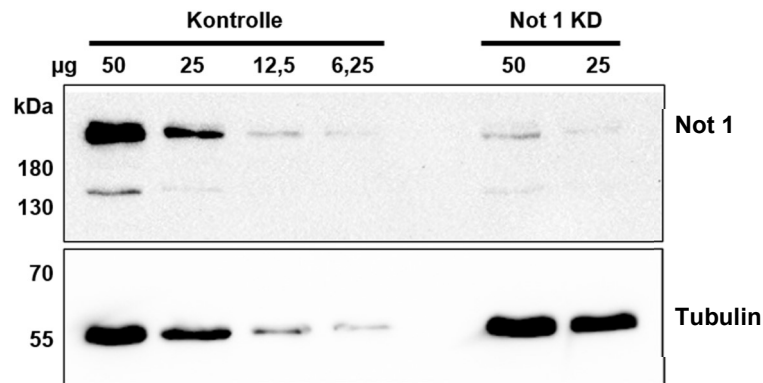
Um zu untersuchen, ob auch die Interaktion von Bgcn und Bam durch eine zusätzliche Interaktion mit dem CCR4-NOT Komplex beeinflusst wird, wurde in S2-Zellen durch RNAi ein transienter *Knockdown* von Not1 durchgeführt. Dessen Erfolg wurde mittels Western Blot kontrolliert und auf eine ca. 75%-ige Reduktion der endogenen Not1 Mengen eingeschätzt (**Abb. 8A**). In diesen *Knockdown* Zellen wurde das vorangegangene Tethering-Experiment mit Bgcn und Bam wiederholt und die Ergebnisse mit denen von, parallel erneut untersuchten, unbehandelten Zellen verglichen. Wie in den von Sgromo et al. publizierten Daten konnte auch hier eine geringere Aktivität von Bam in den Not1 *Knockdown* Zellen festgestellt werden. Allerdings verbleibt weiterhin eine recht starke Restaktivität. Interessanterweise führt die Reduktion der zellulären Not1 Menge auch zu einer stärkeren Luciferaseaktivität in *Knockdown*-Zellen, in welchen Bam C überexprimiert wird. Der Grund hierfür ist nicht direkt nachvollziehbar, da keine Interaktion von Not1 mit dem C-Terminus von Bam zu erwarten ist. Im Fall der Ko-Expression von Volllänge Bam mit Volllänge Bgcn und dessen Ankyrin-Mutante zeigt sich jedoch kein signifikanter Effekt des Not1 *Knockdowns*. Dies ist interessant zu sehen, da die Interaktion von Bam und wildtypischem Bgcn anscheinend dazu führt, dass der Effekt des Not1 *Knockdowns*

kompensiert werden kann. Auffällig ist jedoch, dass derselbe Effekt auch bei Ko-Expression von Volllänge Bam und Bgcn Δ Ank auftritt. Die Kompensation des *Knockdowns* scheint also nicht direkt von der Aktivität von Bgcn abzuhängen, sondern auf einen anderen, nicht näher zu spezifizierenden Effekt zurückzuführen zu sein. Eine Ko-Expression von Bam C mit wildtypischem Bgcn zeigt im Gegensatz dazu eine reduzierte, jedoch weiterhin deutliche Repression der Luciferaseaktivität in *Knockdown*-Zellen. Dies ist überraschend, spricht es doch für einen Einfluss von Not1 auf die Aktivität von Bgcn, welcher bei der Ko-Expression mit Volllänge Bam so nicht zu sehen ist. Schließlich führt die Ko-Expression von Bam C und Bgcn Δ Ank zu keinen signifikant unterschiedlichen Ergebnissen in *Knockdown*- und Kontrollzellen was wiederum in einem leichten Kontrast zu der gesteigerten Luciferaseaktivität in *Knockdown*-Zellen mit alleiniger Bam C Expression steht.

Zusammenfassend lässt sich somit sagen, dass im Verlauf dieser Studie gezeigt werden konnte, dass Bgcn und Bam in der Lage sind, die Expression von mRNAs durch deren Abbau zu unterdrücken. Während die Aktivität von Bgcn, entgegen erster Vermutungen voraussichtlich nicht von der Interaktion mit Pcm abhängig ist, können Bgcn und Bam direkt miteinander interagieren und sich funktionell ergänzen. Zudem ist die Aktivität von Bam zumindest partiell von der Interaktion mit dem CCR4-NOT Komplex abhängig, welcher auch einen Einfluss auf die Interaktion beziehungsweise die Aktivität von Bgcn zu haben scheint, wobei die vorliegenden Daten bislang kein klares Bild dazu ergeben, welcher Gestalt dieser Effekt zu sein scheint.

2. Ergebnisse

A



B

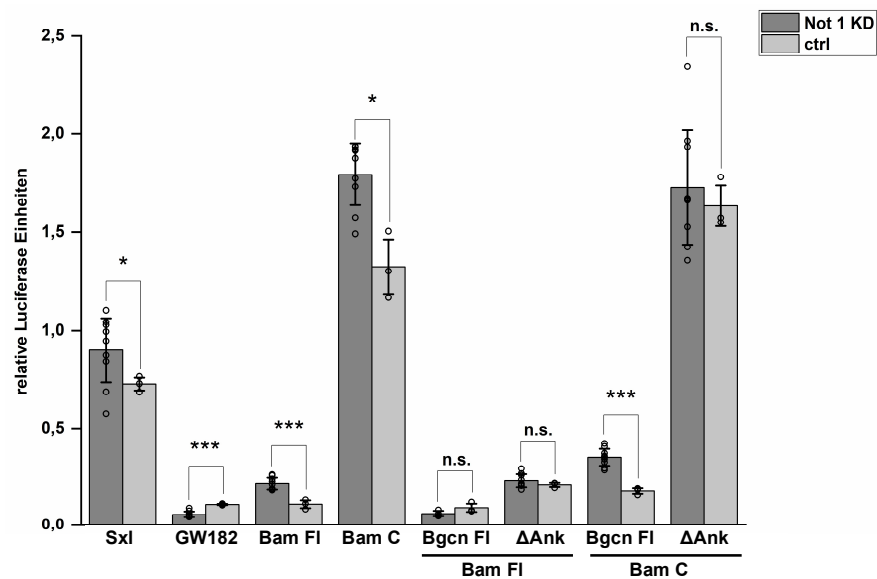


Abb. 8: Einfluss des transienten *Knockdowns* von Not1 auf die Funktion von Bam und seine Interaktion mit Bgcn. A) Western Blot Analyse des Not1 *Knockdowns* durch RNAi. Zur besseren Abschätzung der *Knockdown*-Effizienz wurden verschiedene Proteinmengen eines Zelllysats aus unbehandelten S2-Zellen (Kontrolle) und *Knockdown* Zellen (Not1 KD) aufgetragen. Tubulin wurde als Ladekontrolle verwendet. Gezeigt ist ein repräsentativer Blot. B) Tethering-Experiment mit Volllänge Bam (Bam FI) oder dessen C-Terminus (Bam C) in Not1 *Knockdown* Zellen (Not1 KD, dunkelgrau) und in unbehandelten Zellen (ctrl, hellgrau). Die Aktivität beider Proteine wurde entweder alleine oder bei Ko-Expression von ungetetherter Volllänge Bgcn (Bgcn FI) beziehungsweise dessen Ankyrinmutante (Bgcn ΔAnk) untersucht. Gezeigt sind jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung des Quotienten aus der Expression von FLuc und RLuc der getetherter Proben, normalisiert auf das entsprechende Ergebnis der nicht-getetherter Proben (n=9).

2.3 Mei-P26 und Sxl binden kompetitiv an die *nos* 3' UTR

Neben der Untersuchung der Aktivität von Bam und Bgcn und ihrer Interaktion mit anderen Proteinen, wurde in Zusammenarbeit mit dem Labor von Sebastian Glatt (Malopolska Centre of Biotechnology, Krakau, Polen), auch Mei-P26 hinsichtlich seiner Struktur, RNA-Bindefähigkeit und seiner regulatorischen Aktivität untersucht.

In vorangegangenen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass Mei-P26 über seine NHL Domäne in der Lage ist RNA zu binden. Auch konnten anhand von RNAcompete Experimenten potenzielle RNA-Bindemotive für Mei-P26 identifiziert werden (Loedige et al. 2014; Loedige et al. 2015). Augenfällig hierbei ist, dass es sich dabei unter anderem um Poly(U)-Sequenzen handeln kann wie sie auch von Sxl erkannt und gebunden werden. Wie eingangs erwähnt, ist die Regulation von *nos* auch essentiell von einer Sxl-Bindestelle in seiner 3' UTR abhängig. Es stellt sich somit zunächst die Frage, ob diese Bindestelle auch von Mei-P26 erkannt und gebunden werden kann. Für diese Untersuchung wurde ein *Electromobility Shift Assay* (EMSA) verwendet. Für dieses wurde die Mei-P26 NHL Domäne (Mei-P26 NHL) zunächst, wie zuvor beschrieben (Loedige et al. 2015), mittels Baculoviren exprimiert und gereinigt (**Abb. A3**). Sie, sowie ein funktionell aktives Minimalkonstrukt von Sxl (Sxl-RBD4; Grskovic et al. 2003), wurden mit einem ³²P radioaktiv markiertem RNA-Oligo, welches der Sxl-Bindestelle und ihrer flankierenden Bereiche entspricht, inkubiert und anschließend elektrophoretisch aufgetrennt um festzustellen, ob und ab welcher Proteinkonzentration eine Bindung der RNA auftritt (**Abb. 9**). Erwartungsgemäß sind bereits geringe Mengen an Sxl-RBD4 ausreichend um einen deutlichen *shift* zu verursachen. Höhere Proteinkonzentrationen bedingen sogar einen *super shift*, vermutlich durch Bindung von zwei Sxl-Molekülen an jeweils einen der Poly(U)-Bereiche der RNA. Auch bei Mei-P26 sind sowohl ein *shift* als auch ein *super shift* zu erkennen. Die dafür notwendigen Proteinkonzentrationen liegen jedoch deutlich höher als es bei Sxl-RBD4 der Fall ist. Es konnte somit gezeigt werden, dass beide Proteine prinzipiell in der Lage sind an diesen Bereich der *nos* 3' UTR zu binden, jedoch mit unterschiedlichen Affinitäten. Dadurch stellt sich allerdings gleichzeitig auch die Frage, ob die Bindung der 3' UTR kooperativ oder eher kompetitiv erfolgt. Um dies näher zu beleuchten, wurde untersucht, ob beziehungsweise wie sich die *shifts* verändern, wenn jeweils eine feste Menge eines der beiden Proteine mit unterschiedlichen Konzentrationen des anderen Proteins inkubiert wird (**Abb. 9**). Hierbei zeigt sich, dass es zwischen Sxl und Mei-P26 NHL zu keiner kooperativen Bindung kommt. Stattdessen führt die Anwesenheit von höheren Konzentrationen des zweiten Proteins zu einer Verdrängung des ersten Proteins aus dem Komplex mit der RNA. Dies lässt sich besonders im Fall der Zugabe von Sxl zu einer konstanten Konzentration an Mei-P26 NHL beobachten, da steigende Mengen an Sxl zu einem niedrigeren *shift*

2. Ergebnisse

führen, welcher vom Laufverhalten her nahezu exakt dem von Sxl alleine entspricht. Um abschließend zu überprüfen, ob beide Poly(U)-Bereiche auf der RNA benötigt werden oder ob ein Bereich bereits ausreichend für eine Bindung durch die Proteine ist, wurden die oben beschriebenen Experimente analog mit einer RNA durchgeführt, bei der der zweite Poly(U)-Bereich mutiert wurde (jedes zweite U→C; **Abb. A3**). Auch hier zeigt sich, dass beide Proteine in der Lage sind an die RNA zu binden, und dass auch hier die Bindung kompetitiv stattfindet. Die Bindeaffinität beider Proteine ist jedoch deutlich geringer als bei der wildtypischen RNA. Erwartungsgemäß führt die Verwendung einer RNA bei der beide Poly(U)-Bereiche mutiert sind zu keiner Bindung durch Sxl oder Mei-P26 NHL (Daten nicht gezeigt). Somit ist anzunehmen, dass zwar ein Poly(U)-Bereich auf der *nos* RNA bereits ausreichend für eine Bindung durch Sxl und Mei-P26 ist, effektiv aber beide Poly(U)-Bereiche parallel, jedoch kompetitiv, von beiden Proteinen erkannt und gebunden werden.

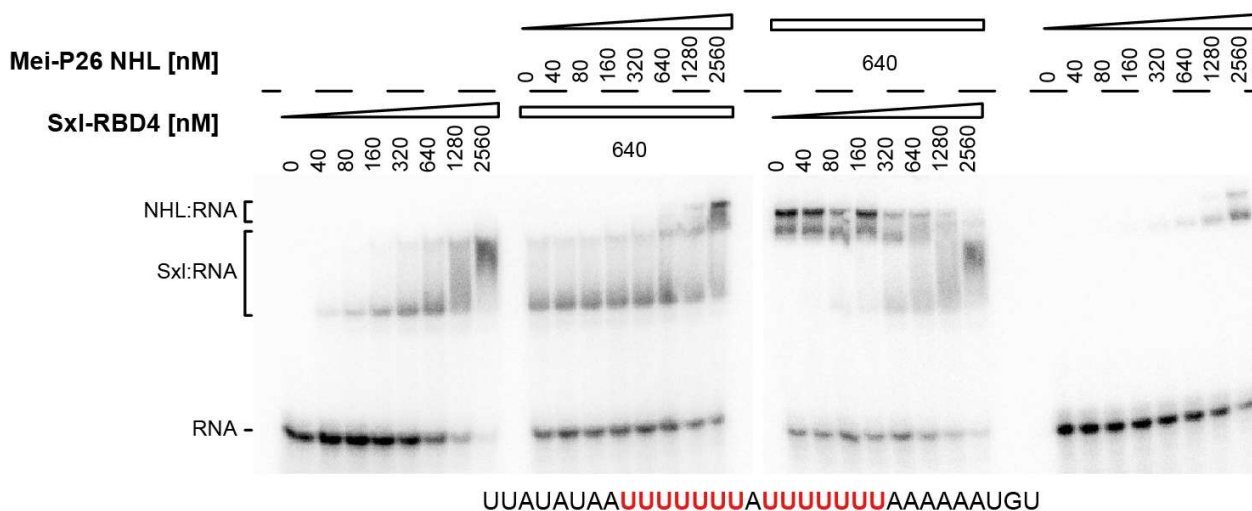


Abb. 9: EMSA zur Analyse der Bindung von Sxl und der Mei-P26 NHL Domäne an die *nos* 3' UTR. Unterschiedliche Proteinmengen wurden mit α -³²P markierter, einem Teil der *nos* 3' UTR entsprechender, RNA (Sequenz: siehe Abbildung; potenzielle Bindestellen sind rot markiert) inkubiert und elektrophoretisch aufgetrennt. Es wurden vier verschiedene Kombinationen an Protein verwendet (v.l.n.r.: steigende Mengen Sxl-RBD4; konstante Menge Sxl-RBD4 und steigende Mengen Mei-P26 NHL; konstante Menge Mei-P26 NHL und steigende Mengen Sxl-RBD4; steigende Menge Mei-P26 NHL). Die Laufhöhen von freier RNA, Sxl:RNA-Komplex und NHL:RNA-Komplex sind in der Abbildung angegeben. Gezeigt ist jeweils ein repräsentatives Experiment.

2.4 Untersuchung der Mei-P26 NHL RNA-Bindedomäne

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Mei-P26 NHL Domäne in der Lage ist an die *nos* 3' UTR zu binden, wurde im nächsten Schritt generell die Bindung von Mei-P26 NHL an RNA näher untersucht. In Zuge der Zusammenarbeit mit Mitgliedern aus dem Labor von Sebastian Glatt, konnte von diesen die Kristallstruktur der Mei-P26 NHL Domäne gelöst werden. Da es sich allerdings hierbei um Daten handelt an deren Erarbeitung ich nicht selbst direkt beteiligt war, soll an dieser Stelle nicht weiter im Detail auf diese eingegangen werden und stattdessen auf unsere gemeinsame Publikation verwiesen werden (Salerno-Kochan et al. 2021). Es sei jedoch angemerkt, dass basierend auf diesen Daten weiterführende Untersuchungen durchgeführt wurden, welche in direktem Zusammenhang zu dieser Arbeit stehen. So konnte beispielsweise kein Ko-Kristall aus NHL Domäne und einer gebundenen RNA erhalten werden. Aus diesem Grund wurden in Zusammenarbeit mit Chandran Nithin (Labor von Janusz Bujnicki, IIMCB, Warschau, Polen) von diesem anhand der Strukturdaten diverse Molekulardynamikberechnungen mit Mei-P26 NHL und der strukturell sehr nah verwandten Brat NHL Domäne sowie den Top Bindesequenzen aus den bereits publizierten RNAcompete Daten von Loedige et al. 2015 durchgeführt (Salerno-Kochan et al. 2021). In diesen Berechnungen konnten nicht nur deutliche Unterschiede in der RNA Erkennung zwischen Mei-P26 NHL und Brat NHL identifiziert werden, es wurde zudem verifiziert, dass die bereits von Loedige et al. identifizierte Sequenz UUUUACA das beste Sequenzmotiv für die Bindung durch Mei-P26 NHL darstellt. Basierend auf dieser Erkenntnis, wurde anhand der Molekulardynamikberechnungen ein Strukturmodell der Bindung von Mei-P26 NHL an diese RNA-Sequenz erstellt. In diesem Modell konnten die Bindeoberfläche des Proteins und eine Reihe der an der Bindung beteiligten Aminosäuren identifiziert werden (**Abb. 10A**). Um den Einfluss dieser Aminosäuren auch experimentell zu untersuchen und zu verifizieren, wurden durch Anna Salerno-Kochen (Labor von S. Glatt) mehrere entsprechende Mei-P26 NHL Mutanten mittels Micro Scale Thermophorese (MST) hinsichtlich ihrer Bindeaffinität an die UUUUACA Sequenz untersucht (**Abb. 10B**). Hierbei zeigten einzelne Punktmutationen bereits eine erheblich geringere Bindeaffinität an die RNA auf, während die Kombination mehrerer Mutationen zu einem vollständigen Verlust der RNA-Bindung führte. Um zu verifizieren, dass diese Ergebnisse nicht nur auf die Sequenz der verwendeten RNA zurückzuführen sind, wurde auch die Bindung der Mei-P26 Varianten an ein 9xU RNA-Oligo untersucht. Auch hier zeigten die einzelnen Punktmutationen eine geringere Bindeaffinität im Vergleich zur wildtypischen Sequenz, der Effekt war jedoch weniger stark ausgeprägt als zuvor. Auch eine Variante mit zwei Punktmutationen (K1172A, R1175A) zeigte eine zwar verringerte, jedoch weiterhin deutliche Bindeaffinität an das RNA-Oligo. Erst nach Mutation von insgesamt drei Aminosäuren (R1150A,

2. Ergebnisse

K1172A, R1175A) sank die Affinität auf ein, in diesem Experiment, nicht mehr nachweisbares Niveau. Die Ergebnisse dieser Experimente mit den Einzelmutanten und der Triple-Mutante wurden von mir über ein EMSA-Experiment mit einem 16xU RNA-Oligo verifiziert (**Abb. 10C**). Somit konnten mehrere Aminosäuren identifiziert werden, welche die Bindung der Mei-P26 NHL Domäne an die Ziel-RNA beeinflussen. Der jeweilige Effekt ist jedoch substratabhängig unterschiedlich stark ausgeprägt. Aufgrund der in allen Experimenten stark reduzierten Bindeaffinität wurde die Triple-Mutante (R1150A, K1172A, R1175A; Mei-P26^{RKR}) in späteren Experimenten als nicht-RNA bindende Negativkontrolle verwendet.

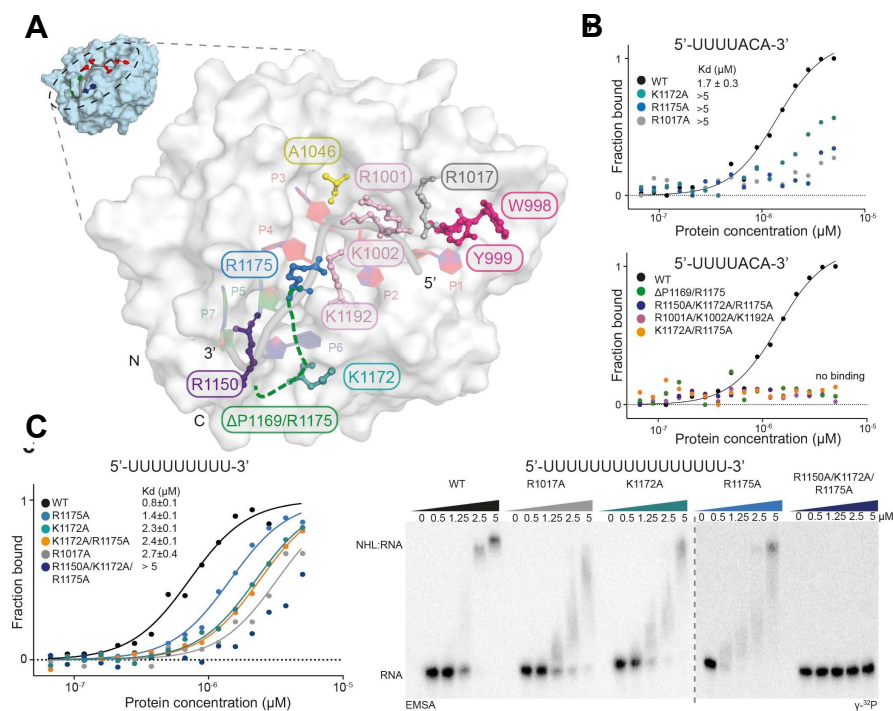


Abb. 10: Untersuchung der, an der RNA-Bindung beteiligten, Aminosäuren innerhalb der Mei-P26 NHL Domäne. A) Model der Mei-P26 NHL Domäne im Komplex mit einer UUUUACA RNA Sequenz, erstellt anhand von Molekulardynamikberechnungen. An der Bindung beteiligte Aminosäuren sind farblich hervorgehoben und entsprechend beschriftet. B) MST-Messung der Interaktion von wildtypischem Mei-P26 NHL und diversen Mutanten davon mit einer UUUUACA RNA Sequenz bei unterschiedlichen Proteinkonzentrationen. C) MST-Messung der Interaktion von wildtypischem Mei-P26 NHL und diversen Mutanten davon mit einer 9x U RNA Sequenz bei unterschiedlichen Proteinkonzentrationen (links). EMSA Experiment mit α -³²P markierter 16x U RNA mit wildtypischem Mei-P26 NHL sowie drei Punktmutanten (R1017A, K1172A, R1175A) und der Triple-Mutante Mei-P26 NHL^{RKR} (R1150A, K1172A, R1175A; rechts). Molekulardynamikberechnung: C. Nithin (IIMCB, Warschau, Polen), MST-Analyse: A. Salerno-Kochan (MCB, Krakau, Polen).

2.5 Mei-P26 reguliert Translation und Ribosomenbiogenese

Neben der strukturellen und mechanistischen Analyse der Bindung der Mei-P26 NHL Domäne an RNAs sollte auch die allgemeine, biologische Funktion von Mei-P26 in Zellen näher analysiert werden. Zu diesem Zweck wurden in S2-Zellen jeweils wildtypisches Mei-P26 und Mei-P26 NHL, sowie die jeweiligen RKR-Mutanten überexprimiert (**Abb. A4A**) und mittels UV-Bestrahlung ein *Crosslink* zwischen Proteinen und daran gebundenen RNAs erzeugt. In Zusammenarbeit mit Oliver Rossbach (Universität Gießen), wurde anhand dieser Zellen ein iCLIP Experiment durchgeführt, wobei die Immunopräzipitation der überexprimierten Proteine über das jeweils angefügte, N-terminale 2x FLAG erfolgte. Als Kontrollexperiment wurden untransfizierte S2-Zellen verwendet. Hierbei zeigte sich bereits ein deutlicher Unterschied in der Menge der gebundenen RNA zwischen den wildtypischen Proteinen und den RKR-Mutanten (**Abb. A4B**).

Die erhaltenen Sequenzierdaten wurden in Zusammenarbeit mit Pritha Ghosh (Labor J. Bujnicki) ausgewertet. Bei dieser Auswertung konnten anhand der Daten von wildtypischem Mei-P26 und Mei-P26 NHL insgesamt 751, beziehungsweise 623 potenzielle Zielgene mit einer jeweils signifikanten Anzahl an *Crosslink cluster* identifiziert werden. Allerdings weisen diese nur eine recht moderate Überlappung von 22% (249 Gene) zueinander auf. Die Verteilung der *Cluster* erfolgt in beiden Fällen gleichermaßen homogen über alle Chromosomen (**Abb. 11, Tab. A1**). Sowohl beim Volllängeprotein, als auch bei der NHL Domäne erfolgt die Bindung des Proteins an die RNA meist über deren 3' UTR (je >50%). Intronische Sequenzen und Sequenzen innerhalb des proteinkodierenden Bereichs (CDS) werden hingegen nur zu ca. 15-25% gebunden, während die 5' UTR für die Bindung von Mei-P26 nahezu ohne Bedeutung ist. Hinsichtlich der dabei erkannten RNA-Motive konnten die Ergebnisse aus dem RNAcompete Experiment von Loedige et al. durch den iCLIP bestätigt werden. Etwa 60% der gebundenen Sequenzen entsprechen entweder dem Mei-P26 Bindemotiv (UUUUACA und naheverwandte Sequenzen) oder U-reichen Sequenzbereichen. In den verbliebenen Fällen konnte jedoch entweder kein solches Motiv im Bereich der Bindung identifiziert werden (ca. 24%) oder die Bindung von Volllängeprotein und der NHL Domäne fand an unterschiedlichen, nicht überlappenden Stellen innerhalb der RNA-Sequenz statt (ca. 16%). Schließlich wurde anhand dieser gemeinsamen Zielgene eine GO-Term Analyse durchgeführt um somit einen Überblick über die biologischen Prozesse zu erhalten, in welche diese Gene involviert sind (Analyse: Jan Medenbach). Insbesondere zwei Prozesse stechen dabei besonders hervor, die Translation und die Ribosomenbiogenese, welche zusammen den größten Teil der betroffenen Prozesse ausmachen (**Abb. 11**).

2. Ergebnisse

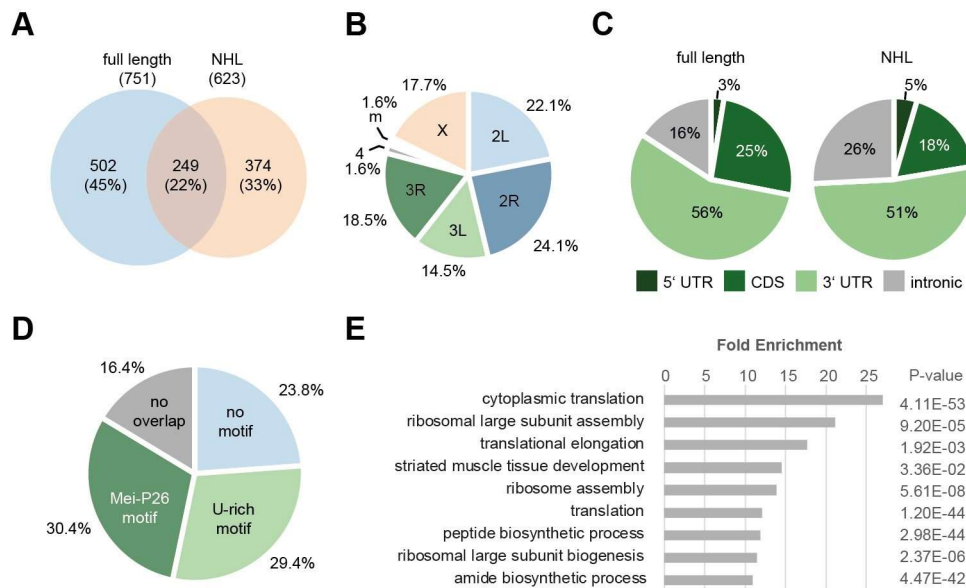


Abb. 11: Zusammenfassung der bioinformatischen Auswertung der iCLIP Daten. A) Vergleich der iCLIP Daten von Volllänge Mei-P26 (blau) und Mei-P26 NHL (orange). Gezeigt ist jeweils die Anzahl an Genen mit einer statistisch relevanten Anreicherung an *Crosslink*-Positionen sowie der prozentuale Anteil der jeweiligen Fraktionen. B) Chromosomaler Ursprung der 249 Gene, welche in beiden Datensätzen identifiziert wurden. C) Prozentuale Verteilung der Positionen innerhalb der Transkripte, in denen die *Crosslinks* identifiziert wurden (links: Volllänge Mei-P26, rechts: Mei-P26 NHL). D) Anwesenheit potenzieller Mei-P26 RNA Motive in der Nähe der *Crosslink* Positionen innerhalb der gemeinsamen Zielgene. (No overlap: *Crosslinks* fanden in unterschiedlichen Bereichen des Genlokus statt). E) GO-Term Analyse der biologischen Prozesse, an welchen die gemeinsamen Zielgene beteiligt sind. Auswertung: P. Ghosh; GO-Terms: J. Medenbach

Um sicherzustellen, dass es sich bei den identifizierten Zielgenen auch tatsächlich um RNAs handelt welche von Mei-P26 erkannt und gebunden werden, wurde anhand einiger identifizierter Gene, welche entweder eine Bindung im Bereich eines Mei-P26 Bindemotivs oder einer U-reichen Sequenz aufweisen, ein EMSA durchgeführt. Hierbei wurden RNA-Oligos verwendet, welche dem entsprechenden Bindemotiv und dessen flankierenden Sequenzbereichen entsprechen. Proteinseitig wurden die wildtypische NHL Domäne, sowie deren RKR-Mutante als Negativkontrolle verwendet. In allen Fällen kann eine Bindung der wildtypischen NHL Domäne, wie anhand von *Hrb27C* und *Col4a1* beispielhaft in **Abb. 12** dargestellt, nachgewiesen werden, während im Fall der RKR-Mutante in keinem Fall eine Bindung der RNA nachweisbar ist.

2. Ergebnisse

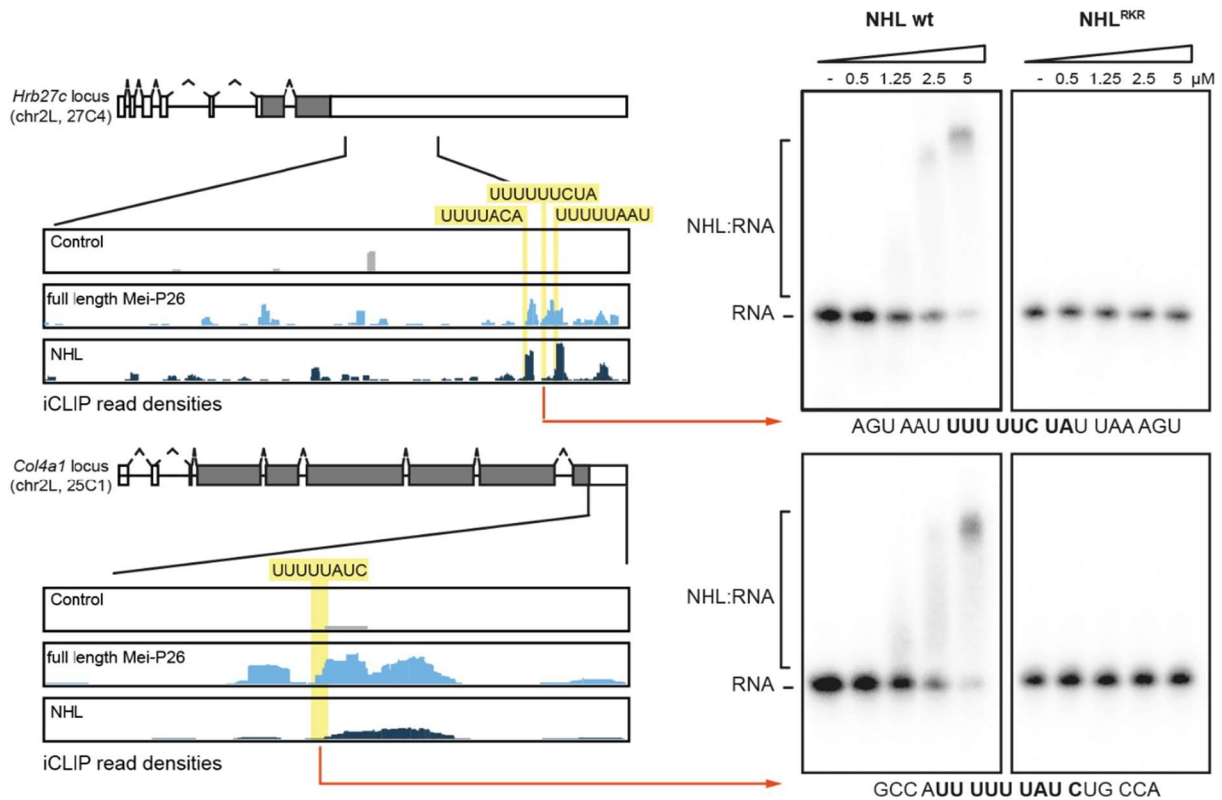


Abb. 12: Validierung von zwei ausgewählten Zielgenen aus dem iCLIP Experiment. Links: schematische Darstellung des Genlokus von *Hrb27c* und *Col4a1*. Introns sind als Striche, Exons als Boxen dargestellt. Die dunkelgrauen Bereiche entsprechen der jeweiligen CDS. Jeweils darunter abgebildet sind die iCLIP *reads* innerhalb eines Bereichs der 3' UTR um potenzielle Mei-P26 Bindestellen (gelb hervorgehoben). Gezeigt sind die Ergebnisse des Kontrollexperiments (grau), sowie der Experimente mit Volllänge Mei-P26 (hellblau) beziehungsweise der Mei-P26 NHL Domäne (dunkelblau). Rechts: EMSA Experimente zur Validierung der Bindung der Mei-P26 NHL Domäne an die Bindemotive (gewähltes Bindemotiv wird durch roten Pfeil markiert; die Sequenz des jeweiligen RNA-Oligos ist unterhalb der EMSAs angegeben). Das Experiment wurde mit unterschiedlichen Konzentrationen an wildtypischer NHL Domäne beziehungsweise der entsprechenden Triple-Mutante (RKR; R1150A, K1172A, R1175A) durchgeführt. Gezeigt ist jeweils ein repräsentatives Experiment.

2.6 Mei-P26 reguliert Zielgene nicht nur negativ, sondern auch positiv

Anhand der bisherigen Erkenntnisse aus dem iCLIP lassen sich jedoch noch keine vollständigen Aussagen über die tatsächliche Rolle von Mei-P26 bei der Regulation von Zielgenen treffen. Aus diesem Grund wurde zunächst in einem Tethering-Experiment die Regulation eines Luciferase-Reporters durch Mei-P26, mit der Regulation durch GW182 und der Regulation durch das, ebenfalls TRIM-NHL Protein, Brat (Plasmid freundlicherweise bereitgestellt von Gunter Meister, Universität Regensburg) verglichen. In diesem Experiment zeigen sowohl GW182 als auch Brat eine stark negative Regulation des Luciferase-Reporters. Im Vergleich dazu, fällt die Regulation durch Mei-P26 deutlich geringer aus (**Abb. 13A**). Ein vergleichbares Ergebnis wurde bereits zuvor bei Untersuchungen von Mei-P26 durch Inga Loedige festgestellt (nicht publiziert; persönliche Kommunikation). Dies erscheint interessant, da im Fall von Brat die Funktion des Proteins abhängig von dessen NHL Domäne ist (Arama et al. 2000; Sonoda und Wharton 2001). Aufgrund der hohen strukturellen Ähnlichkeit dieser Domäne mit der von Mei-P26 NHL erscheint eine ähnliche Funktion somit zunächst naheliegend. Um daher einen unbeabsichtigt negativen Einfluss des Tetherings auf die Aktivität von Mei-P26 ausschließen zu können, wurden im Weiteren Luciferase-Reporter Assays verwendet. In diesen wurde die Regulation des Reporters durch wildtypisches, Volllänge Mei-P26 und dessen RKR-Mutante untersucht. Für die 3' UTR des Reporters wurde dabei zunächst ein Abschnitt der *nos* 3' UTR um die Sxl/Mei-P26 Bindestelle herum verwendet, da es sich hierbei bereits um ein verifiziertes, biologisches Zielgen von Mei-P26 handelt. Als zusätzliche Kontrolle wurde zudem ein mutierter *nos* 3' UTR Abschnitt verwendet, bei welchem jedoch, im Gegensatz zu den oben gezeigten EMSA Experimenten, keine Mutation einzelner Nukleotide vorgenommen wurde, sondern stattdessen beide Poly(U)-Bereiche, sowie kurze flankierende Bereiche der 3' UTR deletiert wurden. Im Gegensatz zum Tethering-Experiment zeigt sich hierbei im Fall des wildtypischen Proteins und der wildtypischen 3' UTR, eine deutliche, negative Regulation des Reporters, welche bei Verwendung der RKR-Mutante erwartungsgemäß verloren geht. Somit kann erstmals gezeigt werden, dass Mei-P26 durch Bindung der *nos* 3' UTR in der Lage ist, die Expression dieser mRNA negativ zu beeinflussen. Die Tatsache, dass im Fall der mutierten 3' UTR die Regulation proteinunabhängig vollständig ausbleibt, lässt zudem vermuten, dass die Regulation nur über die Bindung der Poly(U)-Bereiche innerhalb der 3' UTR möglich ist (**Abb. 13B**).

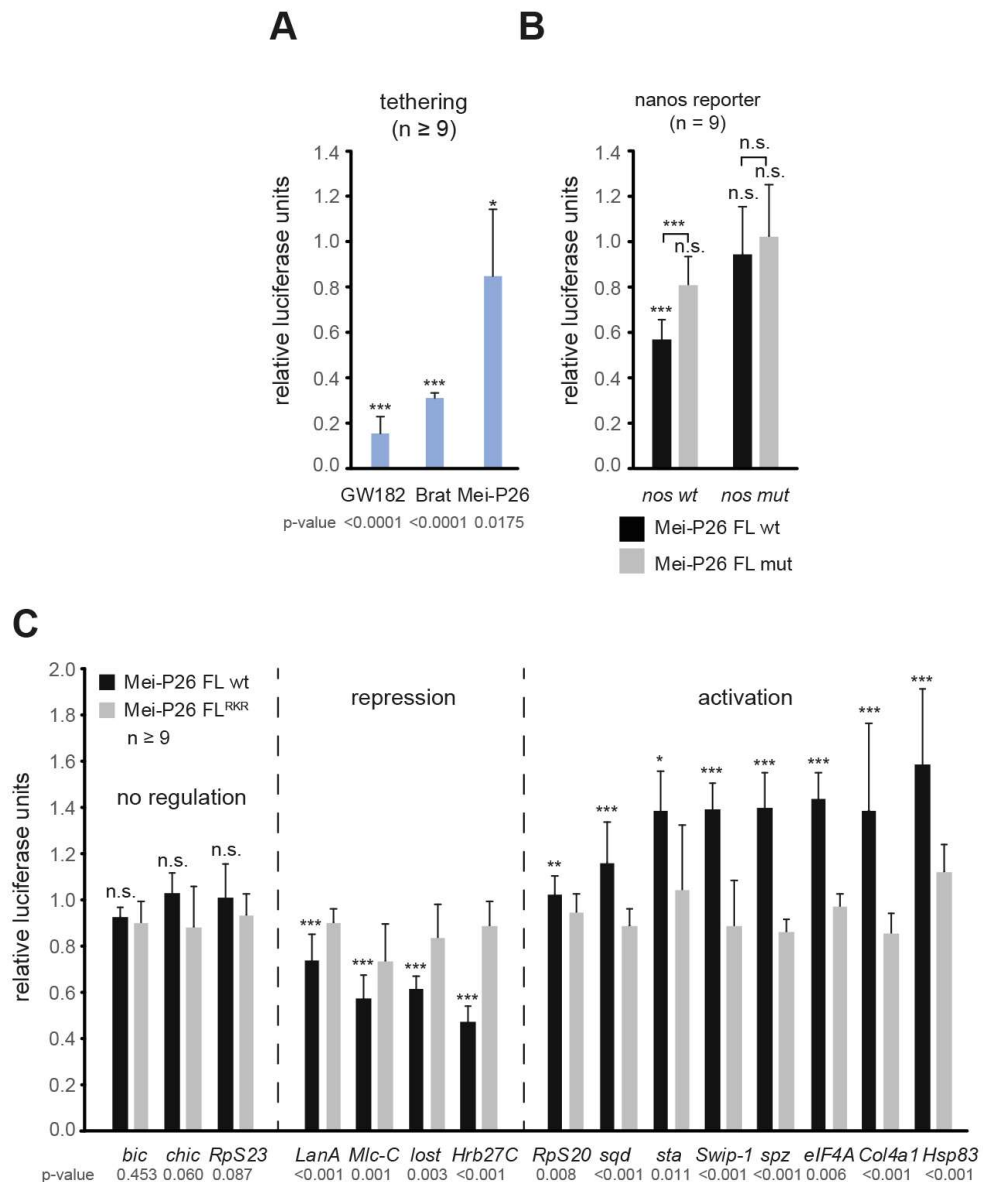


Abb. 13: Funktionelle Untersuchung von Mei-P26. A) Tethering Experiment mit GW182, Brat und wildtypischem Mei-P26. B) Luciferase Reporter-Assay mit einem Abschnitt der *nos* 3' UTR mit wildtypischer (wt) oder mutierter (mut) Bindestelle. C) Luciferase Reporter-Assay mit Abschnitten verschiedener 3' UTRs von möglichen Zielgenen aus dem iCLIP Experiment. Ergebnisabhängig wurden die Proben hinsichtlich ihrer Regulation sortiert (Abtrennung der Kategorien durch gestrichelte Linien markiert). Alle Reporter-Assays wurden jeweils mit wildtypischem Volllänge Mei-P26 (schwarz) und der entsprechenden Mei-P26 RKR-Mutante (grau) durchgeführt. Gezeigt sind in allen Fällen jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung des Quotienten aus der Expression von FLuc und RLuc, normalisiert auf die Ergebnisse des Experiments mit nicht-getetherem Protein beziehungsweise Proben ohne Proteinüberexpression. Für A)+C) ist der jeweilige statistische Wahrscheinlichkeitswert (*p-value*) jeweils unterhalb des Diagramms angegeben.

2. Ergebnisse

Nach erfolgreicher Verifikation von *nos* als Ziel der Regulation durch Mei-P26, wurden weitere potenzielle Zielgene aus dem iCLIP auf ähnliche Weise untersucht. Hierfür wurden insgesamt 15 Gene ausgewählt, bei welchen im Bereich der identifizierten *Crosslink* Positionen entweder das Mei-P26 Bindemotiv UUUUACA (*Col4a1*, *lost*, *Mlc-C*, *RpS20*, *Rps23*), ein schwaches Bindemotiv beziehungsweise ein U-reiches Motiv (*bic*, *eIF4A*, *Hrb27C*, *Hsp83*, *LanA*, *Swip-1*), oder kein entsprechendes Bindemotiv (*chic*, *spz*, *sqd*, *sta*) gefunden wurden. Durch die Wahl dieser drei Kategorien sollte neben der Regulation jedes einzelnen Gens zudem auch verifiziert werden, dass nur Gene mit einem Mei-P26 Bindemotiv, oder davon abgeleiteten Sequenzen, reguliert werden. Die Auswertung der Luciferase-Reporter Assays führte jedoch zu gleich zwei unerwarteten Ergebnissen. So konnte zunächst keine Korrelation zwischen der Anwesenheit eines Mei-P26 Bindemotivs und der Regulation des Gens durch Mei-P26 gefunden werden. Vielmehr zeigen, mit Ausnahme von *chic*, alle Gene ohne erkennbares Bindemotiv eine deutliche Regulation durch Mei-P26. Gleichzeitig findet sich mit *RpS23* aber auch ein Gen mit einem starken Bindemotiv unter den Genen, welche keinerlei Regulation zeigen. Noch unerwarteter war jedoch die Feststellung, dass der größte Teil der regulierten Gene keiner negativen Regulation durch Mei-P26 unterliegt, sondern vielmehr einer positiven Regulation. Diese Art der Regulation durch Mei-P26 wurde bislang noch in keinem Fall dokumentiert und auch in anderen TRIM-NHL Proteinen konnte sie bislang noch nicht nachgewiesen werden. Auch hier zeigt sich keine ersichtliche Präferenz für das Vorhandensein des Mei-P26 Bindemotivs, sondern es finden sich Vertreter aller drei Kategorien unter den regulierten Genen. Die Tatsache, dass die Verwendung der Mei-P26 RKR Triple-Mutante stets zum kompletten Verlust der Regulation führt, spricht dabei dafür, dass diese Ergebnisse nicht in einer unspezifischen Interaktion innerhalb des Versuchsaufbaus begründet sind. Es stellt sich somit die Frage, wie Mei-P26 in der Lage ist, Zielgene auch ohne das identifizierte Bindemotiv in deren 3' UTR zu erkennen, zu binden und schließlich auch auf jeweils unterschiedliche Weise zu regulieren.

2.7 BBox und NHL Domänen bestimmen die Funktion von Mei-P26

Um auch diese Fragestellung zu adressieren, wurden abschließend neben Mei-P26 NHL zwei weitere, verkürzte Proteinvarianten kloniert. In diesen wurde der N-Terminus von Mei-P26, inklusive der RING Domäne (Mei-P26 Δ RING) beziehungsweise der BBox Domänen (Mei-P26 Δ BBox) deletiert, um somit jeweils deren Einfluss auf die regulatorische Aktivität von Mei-P26 untersuchen zu können (**Abb. 14A**). Hierfür wurden Volllänge Mei-P26, sowie die drei verkürzten Varianten (Δ RING, Δ BBox und NHL) in einem Luciferase-Reporter Assay analysiert, in welchem neben *nos* WT und *nos* mut als verifizierten, physiologischen Zielgenen, auch die Regulation von *Hrb27C* und *spz* als jeweils ein Beispiel für ein negativ und ein positiv reguliertes Zielgen betrachtet wurden (**Abb. 14B**). Aufgrund ihrer, in anderen Proteinen nachgewiesenen, Funktion als E3-Ubiquitin Ligase, erscheint es zunächst wahrscheinlich, dass die RING Domäne an der Funktion von Mei-P26 beteiligt sein könnte. Die Daten des Reporter Assays zeigen jedoch keinen klaren Unterschied in der Regulation der Luciferase-Aktivität zwischen Volllänge Mei-P26 und Δ RING. Erst die zusätzliche Deletion der BBox Domänen führt hier zu einer Veränderung, dahingehend, dass der Grad der Regulation deutlich schwächer ausfällt, insbesondere im Fall der positiven Regulation von *spz*, welche durch die Δ BBox Mutation vollständig verloren geht. Schließlich führt jedoch nur die Verwendung von Mei-P26 NHL zu einem vollständigen Verlust der Regulation der Luciferase-Aktivität in allen getesteten Zielgenen. Somit lässt sich festhalten, dass die NHL Domäne zwar in die RNA-Erkennung und -Bindung von Mei-P26 involviert ist, jedoch nicht in dessen regulatorischer Aktivität. Diese scheint im mittleren Bereich des Proteins lokalisiert zu sein, wobei die BBox Domänen zumindest anteilig mit daran beteiligt zu sein scheinen. Die schwache jedoch weiterhin vorhandene Regulation in der Δ BBox Mutante suggeriert jedoch die Beteiligung eines weiteren Bereichs, oberhalb der NHL-Domäne, an der Funktion von Mei-P26.

2. Ergebnisse

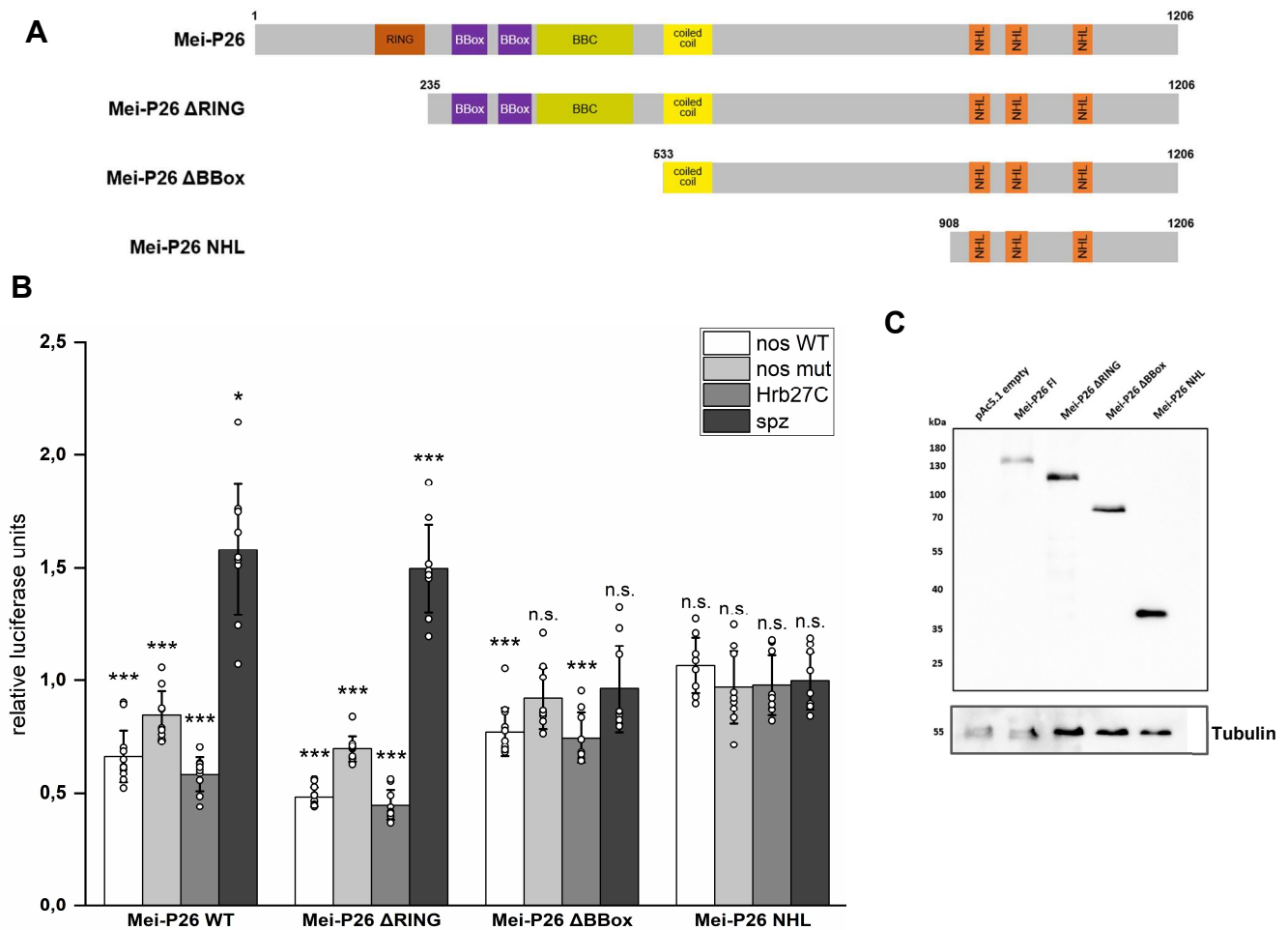


Abb. 14: Einfluss der einzelnen Domänen von Mei-P26 auf dessen regulatorische Funktion. A) Schematische Darstellung der verwendeten Mei-P26 Mutanten. Die angegebenen Zahlen entsprechen den jeweiligen Aminosäuren. B) Luciferase-Assay zur Untersuchung der regulatorischen Funktion der jeweiligen Mei-P26 Varianten bei verschiedenen 3' UTR Sequenzen. Getestet wurden Abschnitte der 3' UTR von wildtypischem *nos* (weiß), der mutierten *nos* 3' UTR (hellgrau), sowie der 3' UTR von *Hrb27C* (dunkelgrau) und *spz* (anthrazit). Gezeigt sind jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung des Quotienten aus der Expression von FLuc und RLuc, normalisiert auf die Ergebnisse des Experiments ohne Proteinüberexpression. Die Punkte im Bereich der Balken entsprechen den Ergebnissen der Einzelmessungen (n=9). C) Western Blot Experiment zur Kontrolle der Expression der jeweiligen Mei-P26 Varianten. Der Nachweis erfolgte über Detektion des jeweiligen FLAG-Tags (pAc5.1 empty: Expressionsvektor ohne *Insert*). Tubulin wurde als Ladekontrolle verwendet.

Zusammenfassend hat die Analyse von Mei-P26 ergeben, dass das Protein über seine C-terminale NHL Domäne in der Lage ist, RNA zu erkennen und zu binden. Als Bindemotiv dient dabei die Sequenz UUUUACA beziehungsweise Poly(U)-Bereiche. Dabei konnte erstmals gezeigt werden, dass eine solche Bindung an den Poly(U)-Bereichen in der 3' UTR von *nanos* stattfindet, jedoch in direkter Konkurrenz mit der Bindung von Sxl an dieselben Positionen in der *nos* 3' UTR steht. Die ausführliche Analyse der iCLIP Daten von Volllänge Mei-P26 und Mei-P26 NHL ergab nicht nur, dass die Bindung und somit auch die Regulation von Zielgenen über deren 3' UTR erfolgt, sondern auch, dass diese Gene überwiegend an der Regulation der Translation und der Ribosomenbiogenese beteiligt sind. Dabei konnten mehrere der identifizierten Gene auch in *vitro* Untersuchungen als Ziele der Regulation durch Mei-P26 verifiziert werden. Unerwarteterweise konnte dabei aber auch gezeigt werden, dass Mei-P26 als erster bekannter Vertreter der TRIM-NHL Proteinfamilie in der Lage ist, Zielgene nicht nur negativ, sondern auch positiv zu regulieren. Eine erste Untersuchung der weiteren Domänen innerhalb von Mei-P26 legte dabei die Vermutung nahe, dass die RNA-Bindung zwar über die NHL Domäne des Proteins erfolgt, die Regulation der Zielgene jedoch vermutlich über die BBox Domänen und einen weiteren, bislang nicht weiter spezifizierten Bereich in der Mitte des Proteins vermittelt wird.

3. Diskussion

Für die Untersuchung der Zellhomöostase, und damit verbunden auch der Homöostase von Stammzellen und ihrer Nachkommen, bietet die frühe weibliche Keimbahnentwicklung in *D. melanogaster* aufgrund der relativ hohen Anzahl solcher Zellen ein ideales Modellsystem. Insbesondere interessant ist hierbei der Übergang von den Keimbahnstammzellen hin zu Zystoblasten und schließlich den reifen Oozyten. In den ersten Schritten dieses Prozesses ist es notwendig, die Expression der mRNA des Stammzellsfaktors *nanos* transient zu unterdrücken. In der Vergangenheit konnten bereits vier Proteine identifiziert werden, welche für diese Regulation von *nos* essentiell sind. Aufgrund der überwiegend genetischen Natur dieser Studien, sind weite Teile der molekularen und mechanistischen Zusammenhänge dieser Regulation jedoch weiterhin ungeklärt. Im Verlauf dieser Arbeit sollte anhand biochemischer und molekularbiologischer Experimente die Regulation der transienten Repression von *nanos* näher untersucht werden. Der Fokus der Forschungsarbeit lag dabei auf der Untersuchung von drei der daran beteiligten Proteine Bam, Bgcn und Mei-P26.

Die Untersuchung von Bam und Bgcn erbrachte, dass beide Proteine jeweils unabhängig voneinander, aber auch im Zusammenspiel miteinander, in der Lage sind die Expression eines Luciferase-Reporters in Tethering-Experimenten zu unterdrücken. Dabei konnte für beide Proteine gleichermaßen gezeigt werden, dass diese Unterdrückung der Expression vermutlich auf einen Abbau der gebundenen mRNAs zurückzuführen ist. Die mechanistischen Hintergründe wie der RNA-Abbau jeweils von den Proteinen erreicht wird, bleiben jedoch weiterhin nur teilweise bis nicht verstanden. In der parallel und unabhängig von dieser Arbeit publizierten Studie von Sgromo et al. 2018, konnten die von mir erarbeiteten Daten zu Bam nicht nur bestätigt, sondern auch hinsichtlich der zugrundeliegenden Funktionsweise erweitert werden. Anhand struktureller und funktioneller Untersuchungen konnte in dieser Studie festgestellt werden, dass Bam über einen kurzen helikalen Bereich an seinem N-Terminus in der Lage ist CAF40 zu rekrutieren, welches wiederum über Interaktion mit Not1 in der Lage ist den CCR4-NOT Komplex zu rekrutieren. Über diesen wird eine Deadenylierung der mRNA und somit deren Abbau erreicht. Auch dieses Ergebnis konnte von mir experimentell bestätigt werden. Allerdings zeigt Bam auch bei einem deutlichen Knockdown von Not1, und somit des CCR4-NOT Komplexes, weiterhin eine deutliche Repression des Luciferase-Reporters. Dies könnte prinzipiell darauf zurückzuführen sein, dass die verbliebene Menge an funktionalem CCR4-NOT weiterhin mit Bam interagiert und somit in der Folge zum Abbau der mRNA führt. Allerdings konnten auch Sgromo und Kollegen in ihrer Studie weiterhin eine Aktivität von Bam nachweisen. Sie verwendeten hierfür jedoch ein Reporterkonstrukt, welches keinen Poly(A)-Schwanz besitzt und folglich resistent gegen

Deadenylierung ist. Dabei zeigte sich, dass die mRNA dieses Reporters tatsächlich nicht abgebaut wurde, sondern auf translationeller Ebene inhibiert wurde. Somit ist anzunehmen, dass Bam nicht ausschließlich über RNA-Abbau, sondern auch über Translationsinhibition in der Lage ist, die Expression von mRNAs zu regulieren. Es stellt sich allerdings somit die Frage, welcher Teil von Bam für die Translationskontrolle verantwortlich ist und wie diese mechanistisch vonstattengeht. Ausgehend von den Ergebnissen des Tethering-Experiments, ist die stärkste Aktivität von Bam in dessen N-Terminus lokalisiert. Allerdings zeigt auch das Konstrukt ohne eben diesen Bereich (Bam MC) eine deutliche, wenn auch in ihrer Stärke merklich schwankende, Aktivität. Diese geht jedoch verloren, sobald der mittlere Abschnitt des Proteins und der C-terminale Bereich einzeln betrachtet werden. Es besteht somit die Möglichkeit, dass im Bereich zwischen diesen beiden Abschnitten des Proteins die Fähigkeit von Bam zur Translationskontrolle lokalisiert ist. Alternativ wäre es auch möglich, dass diese Aktivität nur in einem der beiden Abschnitte lokalisiert ist, jedoch durch die Trennung der beiden Bereiche des Proteins deren Faltung derart beeinflusst wurde, dass dadurch die Fähigkeit zur Translationskontrolle verloren geht. Es ist somit schwierig festzustellen, welcher Bereich des Proteins exakt für diese Aktivität verantwortlich ist, zumal in Strukturvorhersagen von Bam praktisch keine bekannten Motive/Domänenstrukturen identifiziert werden können. Auch kann nicht ausgeschlossen werden, dass ähnlich zum RNA-Abbau, die Fähigkeit zur Translationskontrolle nicht direkt von Bam selbst, sondern vielmehr von einem anderen Protein ausgeht, mit welchem Bam interagieren kann. In dieser Hinsicht wäre es sicherlich interessant weitergehende Interaktionsstudien, beispielsweise über Massenspektroskopie, durchzuführen, um mögliche weitere Interaktionspartner von Bam identifizieren zu können. Erschwerend hierbei ist jedoch, dass es bislang nicht möglich ist Bam löslich und in größeren Mengen aus Zellen zu reinigen. Bereits die Überexpression in S2-Zellen erfolgte augenscheinlich auf einem eher niedrigen Niveau, da alle Bam Konstrukte erst bei Verwendung von vergleichsweise sehr hohen Mengen an Zelllysate nachweisbar waren und auch dort auf einem eher niedrigen Niveau. Dass es sich bei den niedrigen Expressionsleveln um Probleme bei der Transfektionseffizienz handelt ist zwar nicht restlos auszuschließen, erscheint aber tendenziell eher unwahrscheinlich, da andere Proteine, insbesondere Sxl, in demselben Plasmidsystem und bei teils erheblich geringeren Transfektionsmengen, sehr gut exprimiert und nachgewiesen werden können. Möglich wäre somit eine gewisse Toxizität von Bam in den Zellen beziehungsweise ein sehr schneller Abbau des Proteins, beispielsweise vermittelt über die PEST-Domäne an seinem C-Terminus.

Ein weiterer Aspekt bei der Betrachtung von Bam ist seine Interaktion mit Bgcn. Die Tatsache, dass eine Interaktion zwischen diesen beiden Proteinen stattfindet konnte, in

3. Diskussion

anderen Zusammenhängen, bereits vorab gezeigt werden (Lavoie et al. 1999; Li et al. 2009; Kim et al. 2010). In dieser Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass diese beiden Proteine auch bei der Regulation eines Luciferase-Reporters miteinander interagieren können. Dabei scheint es zunächst verwunderlich, dass diese Interaktion nur in eine Richtung (Rekrutierung von Bgcn durch getethertes Bam C) zu funktionieren scheint. Eine mögliche Begründung hierfür könnte jedoch sein, dass im inversen Versuchsaufbau aufgrund des Tetherings die Kontaktflächen zwischen den Proteinen verändert beziehungsweise blockiert werden, so dass keine Interaktion stattfindet. Dennoch ist es interessant zu beobachten, dass die Interaktion mit Bgcn über den C-terminalen Bereich von Bam erfolgt und somit ebenfalls in dem Bereich liegt, welcher für die Fähigkeit zur Translationskontrolle verantwortlich sein könnte. Dass diese Aktivität nicht auf die Interaktion mit Bgcn zurückzuführen ist, ist sehr wahrscheinlich, da Bgcn ebenso wie Bam eine Fähigkeit zum RNA-Abbau aufweist. Aufgrund der Größe von Bgcn und insbesondere des CCR4-NOT Komplexes stellt sich jedoch die Frage, ob beziehungsweise welche weiteren Proteine in der Lage sind, neben diesen mit Bam zu interagieren. Es ist daher anzunehmen, dass diese Prozesse zumindest teilweise nicht parallel zueinander ablaufen und somit auch jeweils unterschiedlich voneinander reguliert werden. Entsprechende Untersuchungen wären dementsprechend sicherlich sehr aufschlussreich für das Verständnis der Regulation von *nos* im Allgemeinen und für die Rolle von Bam darin im Speziellen.

Wie zuvor erwähnt, konnte auch bei der Untersuchung von Bgcn gezeigt werden, dass dieses in der Lage ist den Abbau von mRNAs zu bedingen. Anhand der funktionellen Daten konnte dabei festgestellt werden, dass die vergleichsweise kleine Ankyrin Domäne sowohl notwendig als auch ausreichend für die Vermittlung dieser Aktivität ist. Es erscheint jedoch eher unwahrscheinlich, dass sie diese Funktion selbst ausführt. Tatsächlich handelt es sich bei Ankyrin Domänen um recht häufig vorkommende Motive in einer Vielzahl unterschiedlicher Proteine, welche in erster Linie mit Protein-Protein Interaktionen assoziiert werden (Sedgwick und Smerdon 1999; Mosavi et al. 2004). Somit ist es sehr wahrscheinlich, dass auch die Ankyrin Domänen in Bgcn durch Interaktion mit einem oder mehreren anderen Proteinen den Abbau von RNAs vermitteln. In diesem Zusammenhang weckte insbesondere eine Publikation unsere Aufmerksamkeit, in welcher über eine Interaktion zwischen der Ankyrin-Domäne von YTHDC2 und der 5'-3' Exoribonuklease XRN1 berichtet wurde (Kretschmer et al. 2018). Wie eingangs bereits erwähnt, stellt Bgcn vermutlich ein entfernt verwandtes Ortholog zu YTHDC2 in *D. melanogaster* dar, welches diesem in seiner Domänenstruktur stark ähnelt, jedoch keine YTH- und R3H-Domäne aufweist (Jain et al. 2018). Somit liegt die Vermutung nahe, dass auch Bgcn in der Lage sein könnte mit dem entsprechenden

Homolog von XRN1 in Fliegen, Pacman (Pcm), zu interagieren, um dadurch den Abbau von mRNAs zu bedingen. Dies erscheint besonders interessant im Zusammenspiel mit deren Deadenylierung durch die Bam vermittelte Rekrutierung des CCR4-NOT Komplexes. Denkbar wäre hierbei ein Modell, in welchem der *nos* Regulationskomplex zunächst über Sxl und/oder Mei-P26 an die *nos* 3' UTR bindet. Nach Rekrutierung des CCR4-NOT Komplexes durch Bam, wird die mRNA deadenyliert und somit zum Abbau markiert. Im nächsten Schritt kommt es dann zu einer Rekrutierung von Pcm durch Bgcn wodurch die *nos* mRNA schnell und effizient durch dessen 5'-3' Exoribonuklease Aktivität abgebaut werden kann. Damit der Prozess jedoch so ablaufen kann, muss zusätzlich noch die *Cap*-Struktur der mRNA entfernt werden, bevor diese als Substrat für Pcm dienen kann. Denkbar wäre an dieser Stelle, dass durch eine andere Komponente des Regulationskomplexes das entsprechende Decapping-Enzym DCP1, und damit assoziierte Hilfsproteine rekrutiert werden. Entsprechende Interaktionen zwischen CCR4-NOT und DCP1 wurden bereits in anderen Zusammenhängen nachgewiesen (Braun et al. 2012). Die Auswertung der Tethering-Daten des Pcm-Knockdowns scheint (die Verifikation des Knockdowns vorausgesetzt) dieses Modell allerdings nicht zu bestätigen, da durch den Knockdown keinerlei Effekt auf die Regulation des Reporter-Konstrukts erzielt werden konnte. Auch ist zu bedenken, dass Bgcn über seine Ankyrin Domäne alleine bereits in der Lage ist den Abbau von RNAs zu vermitteln. Zudem werden für dieses Modell auch die anderen Komponenten des Regulationskomplexes benötigt, um die mRNA derart zu modifizieren, dass sie als Substrat für Pcm dienen kann. Aufgrund des männlichen Charakters der Zellen kann jedoch eine endogene Expression von Sxl mit Sicherheit ausgeschlossen werden. Gleichzeitig konnten anhand von qPCR Untersuchungen weder für Bam noch für Bgcn signifikante Mengen an endogener mRNA nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Beide Proteine scheinen also nicht, oder nur in sehr geringen Mengen in den Zellen produziert zu werden. Die Expression von Mei-P26 in den verwendeten S2-Zellen wurde an dieser Stelle nicht untersucht. Allerdings lassen online verfügbare Expressionsdaten (Flybase) aus anderen S2-Zellisolaten darauf schließen, dass auch dieses in eher geringen Mengen in den Zellen vorhanden ist. Das oben beschriebene Modell scheint somit an dieser Stelle also nicht anwendbar. Damit stellt sich weiterhin die Frage mit welchen anderen Faktoren die Ankyrin Domäne interagieren könnte um einen Abbau der RNA zu erreichen. Anhand des Knockdowns von Not1 konnte gezeigt werden, dass auch der CCR4-NOT Komplex augenscheinlich in keinem direkten, funktionellen Zusammenhang zu Bgcn steht. Als einzige bekannte Interaktion von Bgcn mit einem anderen Protein bleibt somit nur die Interaktion mit Bam. Diese erfolgt jedoch über einen anderen Bereich von Bgcn (Y2H Daten von Daniela Strauß; persönliche

3. Diskussion

Kommunikation) und ist in den hier verwendeten Versuchsaufbauten als gegenstandslos zu betrachten. Daher muss davon ausgegangen werden, dass die Ankyrin Domäne von Bgcn in der Lage ist mit einem anderen, bislang unbekanntem, Faktor zu interagieren um somit die Regulation der mRNA Expression durch deren Abbau zu vermitteln.

Neben der Rolle der Ankyrin Domäne stellt sich jedoch zusätzlich die Frage, ob auch andere Bereiche von Bgcn eine Rolle in der Regulation von *nos* spielen. Im Gegensatz zu Bam konnte in den hier durchgeführten funktionellen Analysen kein weiterer Bereich beziehungsweise eine weitere regulatorische Eigenschaft von Bgcn festgestellt werden. Neben der Ähnlichkeit zu YTHDC2, weist Bgcn allerdings auch eine starke, strukturelle Ähnlichkeit zur Familie der DEAD/DExH Box Familie der RNA Helikasen auf (Ohlstein et al. 2000; Bailey et al. 2017). Deren Funktion ist in erster Linie durch die Aktivität ihrer P-loop Motive charakterisiert, welche als NTPasen fungieren und auch in Bgcn zu finden sind. Im Gegensatz zu diesen P-loop Motiven, sind jene in Bgcn allerdings an einigen, funktional wichtigen, Stellen mutiert. Es ist daher davon auszugehen, dass Bgcn keine NTPase Aktivität mehr besitzt. Was jedoch nicht ausgeschlossen werden kann ist, dass Bgcn dennoch weiterhin in der Lage ist über diese Domänen Nukleinsäuren zu binden. Dies könnte wiederum beispielsweise bei der Erkennung von Substraten hilfreich sein. Zusätzlich wäre dabei auch denkbar, dass es zu einer transienten Bindung von Bgcn an die RNA kommt, um somit die Kontaktdauer oder den Abstand zum Substrat zu regulieren und somit dessen effizienten Abbau zu begünstigen.

Auch in diesem Fall wären für die Validierung solcher Überlegungen weiterführende Interaktionsstudien von Bgcn von großem Vorteil. Doch vergleichbar mit Bam, konnte auch im Fall von Bgcn bislang keine Expression und Reinigung von löslichem und funktionalem Protein erreicht werden. Ebenso sind auch hier bereits die Expressionslevel des Proteins in den verwendeten S2-Zellen ausgesprochen gering wodurch eine weitere Analyse des Proteins weiter erschwert wird. Dennoch zeigen bereits die aktuell verfügbaren Daten deutlich, dass sowohl Bam als auch Bgcn eine zentrale Rolle in der Regulation von *nos* einnehmen. Es sollten daher weitere Bestrebungen erfolgen, um weitere Einblicke in die jeweilige Funktionsweise und mögliche Interaktionen von Bam und Bgcn miteinander und mit anderen Proteinen zu erhalten. Denkbar wären hierbei etwa die Identifikation von trunkierten Varianten beider Proteine welche weiterhin funktionell aktiv sind, jedoch löslich exprimiert und gereinigt werden können und anhand derer weiterführende Interaktionsstudien durchgeführt werden können. Aufgrund der absehbar hohen Komplexität und auch Vielfältigkeit der möglichen Mechanismen, wäre an dieser Stelle außerdem zusätzlich die Verwendung von ergänzenden *in vivo* Untersuchungen zu überdenken.

Neben der Betrachtung von Bam und Bgcn, konnten in dieser Arbeit auch deutliche Fortschritte im Verständnis der biochemischen Funktion und der biologischen Bedeutung von Mei-P26 erzielt werden. Zunächst konnte dabei nicht nur die, von Chau et al. 2012 postulierte, Bindung von Sxl an den Poly(U)-Bereich in der 3' UTR von *nos* *in vitro* bestätigt werden, sondern zudem gezeigt werden, dass auch Mei-P26 über seine NHL Domäne in der Lage ist an diese Position zu binden. Der kompetitive Charakter der Bindung dieser beiden Proteine an die *nos* 3' UTR führt jedoch unweigerlich zu der Frage, wie die Bindung dieser Proteine *in vivo* erfolgt. Für die Beantwortung dieser Frage würden die Expressionsdaten beider Proteine in Zystoblasten benötigt, welche allerdings noch an keiner Stelle publiziert wurden. Dementsprechend können an dieser Stelle nur eher spekulative Annahmen getroffen werden. Bei Betrachtung der, in den EMSAs festgestellten, Affinitäten beider Proteine zur RNA fällt dabei auf, dass Sxl bereits bei erheblich geringeren Konzentrationen eine starke Bindung aufweist, während selbst recht hohe Proteinkonzentrationen nur zu einer eher moderaten Bindung von Mei-P26 NHL an den Poly(U)-Bereich führen. Somit steht zu vermuten, dass, sollten die Expressionslevel von Mei-P26 in den Zellen nicht erheblich über denen von Sxl liegen, eine überwiegende Bindung dieser Position der 3' UTR durch Sxl vorliegt. Daraus ergibt sich wiederum die Frage, ob es sich bei der Bindung der Mei-P26 NHL Domäne an die *nos* 3' UTR um ein reines *in vitro* Ereignis handelt, oder ob sie dennoch *in vivo* von Bedeutung ist. Alternativ wäre auch denkbar, dass in der *nos* 3' UTR noch eine weitere Bindestelle für Mei-P26 existiert. Tatsächlich finden sich in der Sequenz der *nos* 3' UTR mehrere Bereiche welche eine hohe Ähnlichkeit, wenn auch keine genaue Übereinstimmung, mit dem von Loedige et al. 2015 und uns identifizierten und verifizierten Mei-P26 Bindemotiv UUUUACA aufweisen. Diese Bereiche befinden sich teils in einem Abstand von mehreren hundert Nukleotiden von der Sxl Bindestelle, weshalb es auch interessant ist zu spekulieren, ob Mei-P26 durch eine mögliche Bindung an eine solche entfernte Position in der Lage ist, zusammen mit Sxl die RNA in diesem Bereich zu verformen, um somit ihre Regulation zu ermöglichen. Denkbar wären hierbei beispielsweise eine Stabilisierung in einer gewissen Position innerhalb des regulatorischen Komplexes, die Ausbildung notwendiger Sekundärstrukturen oder die Öffnung dazwischenliegender Sequenzbereiche. Zur Überprüfung solcher Möglichkeiten muss jedoch zuerst festgestellt werden, ob Mei-P26 tatsächlich in der Lage ist an andere Bereiche der 3' UTR mit ausreichender Affinität zu binden. Denkbar wären an dieser Stelle weitere EMSAs, bei denen zunächst explizit Bereiche untersucht werden deren Sequenz eine hohe Ähnlichkeit zur Mei-P26 Bindesequenz aufweist. Bei der Untersuchung dieser Stellen sollte allerdings bedacht werden, dass diese nicht zwingend die einzige Option für eine Bindung durch Mei-P26 darstellen. Tatsächlich

3. Diskussion

deuten die Daten des iCLIPs und seiner Validierungsexperimente darauf hin, dass eine Bindung von RNAs durch Mei-P26 nicht ausschließlich auf das Bindemotiv und U-reiche Regionen beschränkt ist. Dementsprechend wäre eine zusätzliche Untersuchung der gesamten 3' UTR durch mehrere, sich überlappende RNA-Fragmente sinnvoll, sollte andernfalls keine weitere Bindestelle für Mei-P26 gefunden werden. Abhängig von den Ergebnissen dieser Untersuchungen wären im Anschluss weitere Experimente vorstellbar, in denen die Art und der mögliche Nutzen einer Bindung der RNA an Mei-P26 untersucht werden können.

Das Hauptaugenmerk für die weitere Forschungsarbeit an Mei-P26 sollte allerdings in erster Linie weniger auf der Untersuchung gebundener RNA-Sequenzen, sondern vielmehr auf der Untersuchung von Mei-P26 selber liegen. Anhand der im Zuge unserer Kooperation mit dem Labor von Sebastian Glatt gewonnenen strukturellen Daten der Mei-P26 NHL Domäne, konnten bereits erste Einblicke in die Art der RNA-Bindung durch Mei-P26 und der daran beteiligten Aminosäuren gewonnen werden. So konnten beispielsweise nicht nur die RNAcompete Daten von Loedige et al. 2015 verifiziert werden, sondern anhand von MD Berechnungen auch nachvollzogen werden, wie diese Sequenzen innerhalb der NHL Domäne positioniert und ihre Bindung stabilisiert wird. Dabei zeigte sich, dass trotz der allgemein recht hohen strukturellen Ähnlichkeit von Mei-P26 NHL zu anderen NHL Domänen (Brat, Lin41), doch teils deutliche Unterschiede in der Art der RNA-Bindung bestehen. Im Gegensatz zur NHL Domäne von Lin41, welche kurze Haarnadelstrukturen erkennt und bindet (Kumari et al. 2018), erfolgt die Substraterkennung bei den NHL Domänen von Brat und Mei-P26 über eine kurze, einzelsträngige RNA Sequenz (Loedige et al. 2015). Doch auch die Sequenzen welche von diesen Proteinen gebunden werden unterscheiden sich deutlich voneinander, da Motive die von Brat gebunden werden können, nicht von Mei-P26 gebunden werden (Salerno-Kochan et al. 2021). Somit zeigt sich, dass trotz hoher Konservierung auf Strukturebene, bereits kleine Unterschiede deutlich das Bindeverhalten der NHL Domänen variieren und dabei in einer hohen Variabilität in der Substratspezifität der jeweiligen Proteine resultieren (Loedige et al. 2015; Kumari et al. 2018). Allerdings scheint, zumindest im Fall von Mei-P26 die Sequenz der gebundenen RNA nicht alleine ausschlaggebend für eine Bindung zu sein. So finden sich beispielsweise bei *Hrb27C* mehrere potenzielle Mei-P26 Bindestellen innerhalb der 3' UTR, welche jedoch nicht alle gebunden werden. Es steht somit zu vermuten, dass es noch weitere Faktoren gibt, über welche bestimmt wird, an welcher Stelle der mRNA eine Bindung stattfindet. Zudem ergeben die iCLIP Daten der NHL Domäne auch ein erheblich unklareres Bindemotiv, verglichen zu dem aus den Daten des Volllänge Proteins. Dieser Umstand gibt einen deutlichen Hinweis darauf, dass auch Bereiche außerhalb der NHL Domäne an der

Substraterkennung beteiligt sind und würde vor allem auch erklären, weshalb nur eine recht moderate Schnittmenge zwischen den potenziellen Zielgenen des Volllängeproteins und der NHL Domäne besteht. Weiter untermauert wird diese Annahme durch die Ergebnisse der Validierung und funktionellen Untersuchung einiger potenzieller Zielgene. Basierend auf der Annahme, dass die Bindung von Mei-P26 an mRNAs über die Erkennung des entsprechenden Bindemotivs erfolgt, wurden mehrere Gene ausgewählt welche entweder das exakte Bindemotiv, ein Motiv mit geringen Abweichungen davon, oder kein solches Motiv besitzen. Entgegen der ursprünglichen Annahme, dass es zu einem jeweils unterschiedlichen Grad an Regulation zwischen diesen Gruppen kommt, konnte in diesem Experiment allerdings keine klare Abgrenzung im Regulationsverhalten zwischen den drei Gruppen festgestellt werden. Vielmehr finden sich Vertreter aller Gruppen unter den regulierten wie unter den nicht-regulierten Proben. Auch die jeweilige Stärke der Regulation lässt kein klares Muster erkennen. Somit konnte zwar in den vorangegangenen Untersuchungen deutlich gezeigt werden, dass die NHL Domäne von Mei-P26 bei der RNA Bindung eine klare Präferenz für das Motiv UUUUACA beziehungsweise Poly(U)-Bereiche aufweist, diese Präferenz scheint aber nicht ausreichend zu sein um ausschließlich darüber die korrekten mRNAs zur Regulation zu erkennen und zu binden. Stattdessen ist davon auszugehen, dass auch noch andere Bereiche des Proteins bei diesem Prozess eine wichtige Rolle spielen, indem sie entweder selber mRNAs binden oder aber das Bindeverhalten der NHL Domäne beeinflussen. In diesem Kontext ist zu erwähnen, dass bereits anderweitig darüber spekuliert wurde, ob es auch zu einer Dimerisierung oder sogar einer Oligomerisierung zwischen mehreren TRIM Proteinen, vermittelt durch deren Coiled Coil Domänen, kommen kann, wodurch eine Bindung von weit voneinander entfernten RNA Motiven ermöglicht wird (Koliopoulos et al. 2016; Williams et al. 2019). Dabei ist jedoch anzumerken, dass neben Mei-P26 bislang kein weiteres Protein bekannt ist, welches an der Regulation von *nos* beteiligt ist und über eine Coiled Coil Domäne verfügt. Somit bleibt weiterhin unklar, wie genau es zu einer Erkennung anderer RNA Motive kommt und wie diese dafür gestaltet sein müssen. Für eine weitere Untersuchung dieser Fragestellung wäre es beispielsweise denkbar, weitere Zielgene von Mei-P26 zu verifizieren um anhand der mRNA Sequenzen dieser Gene detaillierte Sequenz- und Sekundärstrukturanalysen durchzuführen, um dadurch eventuelle Ähnlichkeiten beziehungsweise Übereinstimmungen identifizieren zu können. Der Einfluss von weiteren Abschnitten von Mei-P26 auf dessen RNA Bindeaktivität könnte anschließend anhand dieser Informationen sowie unterschiedlich trunkierten Versionen von Mei-P26 erfolgen.

3. Diskussion

Neben der Betrachtung RNA Bindeeigenschaften von Mei-P26 gestaltet sich auch die nähere Analyse seiner Fähigkeit zur Regulation der Expression von mRNAs äußerst interessant. Bislang waren neben *nos* keine weiteren Gene bekannt, deren Expression durch Mei-P26 beeinflusst wird. Anhand der hier vorgestellten iCLIP Daten konnte jedoch eine ganze Reihe an Genen identifiziert werden, welche potenziell einer Regulation durch Mei-P26 unterliegen. Der Großteil der identifizierten Zielgene scheint dabei entweder mit Translation oder der Ribosomenbiogenese assoziiert zu sein. Insbesondere letzterer Punkt ist interessant, da sich bei Durchsicht der iCLIP Daten nahezu alle RpS und RpL Gene wiederfinden lassen. Dabei ist auch hier anzumerken, dass der Großteil dieser Gene entweder nur ein schwaches oder sogar gar kein Mei-P26 Bindemotiv in seiner 3' UTR besitzt. Des Weiteren ist zu erwähnen, dass ribosomale Gene aufgrund ihrer hohen Abundanz eine häufige Kontamination in Sequenzierexperimenten darstellen. Allerdings erscheint dies im vorliegenden Fall als eher unwahrscheinlich, da andere abundante und oft als Kontamination vorliegende RNAs in diesem Experiment kaum nachgewiesen werden konnten. Zudem ergab die funktionelle Analyse von *RpS20* und *RpS23*, dass ribosomale Gene zumindest in einigen wenn auch nicht allen Fällen, von Mei-P26 reguliert werden können. Allgemein ist die Kombination aus Genen der Ribosomenbiogenese und Translations-assoziierten Genen aber auch deshalb interessant, bietet sie doch eine mögliche Erklärung dafür, weshalb in einer vorherigen Studie bei Zellen mit einer *mei-P26* Mutation eine deutliche Vergrößerung des Nukleolus festgestellt werden konnte (Neumüller et al. 2008). Allerdings wäre in diesem Fall anzunehmen, dass die Regulation durch Mei-P26 zu einer Repression der betroffenen Gene führen sollte. Die meisten der hier getesteten Gene, und darunter insbesondere auch das ribosomale Gen *RpS20*, zeigen jedoch eher eine Aktivierung ihrer Expression durch Mei-P26. Zudem wurde in besagter Studie auch eine mögliche Mei-P26 abhängige Regulation von *dmyc* vorgeschlagen, welche in der Folge zu einer veränderten Regulation der Ribosomenbiogenese führt (Neumüller et al. 2008). Es wäre daher sicherlich sinnvoll und auch notwendig, zur Überprüfung dieser Hypothese eine größere Anzahl weiterer ribosomaler Gene zu untersuchen, um somit einen besseren Überblick über den allgemeinen Einfluss der Regulation durch Mei-P26 auf die Expressionsraten dieser Gene zu erhalten. Zudem wäre allgemein auch eine Ergänzung um weiterführende *in vivo* Studien zu überdenken. So zeigen die hier vorgestellten, funktionellen Analysen zwar eine teils sehr deutliche Regulation der jeweiligen Gene, doch ist zu bedenken, dass es sich hierbei um ein artifizielles System handelt, dessen Ergebnisse nicht zwingend auch eine biologische Relevanz bedeuten. Auch ist bei den Daten des iCLIP Experiments zu bedenken, dass es sich hierbei nur um einen Zelltyp handelt, in welchem Mei-P26 (und Varianten davon) stark

überexprimiert werden. Daher ist nicht auszuschließen, dass hier auch Interaktionen von Mei-P26 mit mRNAs gefunden wurden, welche in Fliegen so nicht vorkommen, da beide Komponenten entweder nicht gleichzeitig exprimiert werden oder die Expressionslevel zu gering sind, als dass es zu einer relevanten Interaktion zwischen RNA und Protein kommt. Nichtsdestotrotz ist bereits die Tatsache, dass Mei-P26 nicht nur die Expression von mRNAs unterdrücken, sondern sie auch fördern kann, durchaus überraschend. Eine entsprechende Aktivität wurde bislang bei keinem weiteren Vertreter der TRIM-NHL Proteinfamilie beschrieben. Daraus ergeben sich jedoch auch weitere wichtige Fragen. Allen voran die nach dem zugrundeliegenden Mechanismus für diese unterschiedliche Art der Regulation. Anhand der im Laufe dieser Arbeit erhaltenen Daten, sind bislang keine belastbaren Aussagen hierzu möglich. Denkbar wären allerdings für die negative Regulation beispielsweise eine Inhibition der Translation der gebundenen mRNAs oder, vergleichbar mit der Aktivität von Bam und Bgcn, deren Abbau. Im Fall der positiven Regulation wären dementsprechend eine Steigerung der Translationsrate, beziehungsweise eine Stabilisierung der mRNAs vorstellbar. Analog zu Bam und Bgcn wäre eine Analyse dieser Möglichkeiten über Northern Blots möglich. Allerdings wären auch komplexere Methoden, wie beispielsweise eine Analyse des Translationsprozesses über Dichtegradientenzentrifugation denkbar. Parallel einhergehend mit dieser Untersuchung ist auch eine Identifikation der, für die Aktivität von Mei-P26 verantwortlichen Domänen anzustreben. In den bisherigen Untersuchungen konnte bereits gezeigt werden, dass die NHL Domäne, wenn auch wohl nicht ausschließlich, für die Bindung von RNAs verantwortlich ist. Die funktionellen Daten zeigen aber, dass sie selbst keine regulatorische Eigenschaft auf diese ausübt. Doch welche der anderen Domänen könnte diese Aktivität besitzen? Bei genauerer Betrachtung der weiteren Domänen von Mei-P26 fällt dabei zunächst die RING Domäne ins Auge. In vorherigen Studien konnte bereits mehrfach gezeigt werden, dass TRIM-NHL Proteine über diese Domäne als E3-Ubiquitin Ligasen fungieren können (Review: Williams et al. 2019). Eine solche Aktivität dient in der Regel zur Markierung von Proteinen für deren Abbau. Es konnten jedoch bereits auch Fälle identifiziert werden, in denen Ubiquitinierung direkt mit der Regulation von RNAs in Zusammenhang steht, beispielsweise im Fall der Regulation der MHC-I mRNA durch die E3-Ligase MEX-3C (Cano et al. 2012; Cano et al. 2015; allgemeiner Review: Thapa et al. 2020). Zudem wurde bereits anderweitig spekuliert, ob Mei-P26 in der Lage ist über die E3-Ligase Aktivität der RING Domäne den Abbau von Faktoren für die Regulation von RNAs zu bedingen und somit indirekt die Genexpression zu regulieren (Neumüller et al. 2008). Allerdings konnte anhand der hier vorgestellten Daten gezeigt werden, dass auch eine vollständige Deletion des N-terminalen Bereichs von Mei-P26, inklusive der RING

3. Diskussion

Domäne, keinen feststellbaren Effekt auf dessen regulative Funktion aufweist. Zumindest in diesem Zusammenhang kann somit ein Einfluss der RING Domäne ausgeschlossen werden. Interessant ist allerdings, dass eine N-terminale Deletion bis einschließlich der BBox Domänen die Fähigkeit von Mei-P26 zur Repression der mRNA Expression sehr stark, und die Fähigkeit zur Aktivierung sogar vollständig einschränkt. Funktionell werden BBox Domänen, neben der Bindung von Zn^{2+} , jedoch in der Regel im Kontext der Funktion der RING Domäne gesehen. Dementsprechend unklar ist, ob es sich bei der Veränderung in der Aktivität von Mei-P26 tatsächlich um einen direkten, funktionalen Zusammenhang mit den BBox Domänen handelt, oder ob beispielsweise durch eine veränderte Faltung des Proteins dessen Funktion eingeschränkt ist. Neben den BBox Domänen verbleiben schließlich noch die Coiled Coil Domäne und ein längerer Bereich ohne bekannte Sequenzmotive als letzte Optionen für eine intrinsische Aktivität von Mei-P26. Allerdings lassen auch die bisher bekannten Funktionen von Coiled Coil Domänen eher vermuten, dass dieser Bereich des Proteins keine direkte Funktion in der Regulation von mRNAs aufweist.

Neben einer direkten Aktivität von Mei-P26 besteht aber auch, ähnlich wie bei Bam und Bgcn, die Möglichkeit einer Interaktion mit anderen Proteinen, welche die jeweilige Aktivität mitbringen. In der Tat sind neben den weiteren Komponenten des *nos* Regulationskomplexes auch weitere Proteine bekannt, welche potenziell mit Mei-P26 interagieren können. Abgesehen von Bam, Bgcn und Sxl, handelt es sich hierbei um Ago1 und Wuho (Wh) (Page et al. 2000; Neumüller et al. 2008; Li et al. 2013; Rastegari et al. 2020). Im Fall von Ago1 dient diese Interaktion augenscheinlich einer Regulation gewisser miRNAs, einer Funktion von Mei-P26 welche allgemein im Kontext der RNA Bindung und biologischen Rolle des Proteins sehr interessant ist, aufgrund der thematischen Ausrichtung und der dadurch verwendeten Methoden in dieser Arbeit aber nicht weiter untersucht wurde. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass nach Deletion der NHL Domäne von Mei-P26 die Interaktion mit Ago1 verloren geht, vermutlich also über diese stattfindet. Interessant ist dabei zu erwähnen, dass auch Brat und Wech, die beiden anderen TRIM-NHL Proteine in *D. melanogaster*, mit Ago1 interagieren können, es sich also vermutlich um eine allgemeinere Aktivität dieser Proteinfamilie handelt (Neumüller et al. 2008). Die Interaktion von Wuho und Mei-P26 wurde erst recht zeitnah zu dieser Arbeit entdeckt (Rastegari et al. 2020), entsprechend wenige Details dazu sind aktuell bekannt. Die bislang verfügbaren Daten deuten jedoch darauf hin, dass Wh in der Lage ist mit Mei-P26 zu interagieren und somit die Expression gewisser miRNAs über eine gemeinsame Interaktion mit Komponenten des RISC zu beeinflussen. Auch sind beide Proteine dazu in der Lage mit dMyc zu interagieren. Mit Hinblick auf das zentrale Forschungsthema dieser Arbeit, die Regulation von *nos* in der weiblichen

Keimbahn, ist allerdings äußerst interessant, dass Wh anscheinend auch in diesem Prozess eine entscheidende Rolle zu spielen scheint. So konnte nicht nur auch eine schwache Interaktion von Wh mit Bgcn nachgewiesen werden, sondern in *wh* Mutanten Fliegen auch zusätzlich gezeigt werden, dass hier der Komplex zur Regulation von *nos* nicht länger aktiv ist beziehungsweise nicht mehr gebildet wird. Dabei wurde spekuliert, dass dieser Effekt entweder darauf zurückzuführen ist, dass Wh den Einbau von Mei-P26 in den Komplex und somit dessen Bildung reguliert, oder dass Wh selbst Teil des Komplexes ist und direkt an der Regulation von *nos* beteiligt ist (Rastegari et al. 2020). Entsprechend vielversprechend wäre demnach eine weitergehende, intensive Untersuchung von Wh, könnten dadurch doch entscheidende Informationen gewonnen werden, um die Vorgänge innerhalb des *nos* Regulationskomplexes besser zu verstehen. Alle der bisher identifizierten Interaktionspartner von Mei-P26 scheinen jedoch ausschließlich an der negativen Regulation von mRNAs beteiligt zu sein. Zu diesem Zeitpunkt sind noch keine möglichen Interaktionspartner bekannt, welche an der positiven Regulation beteiligt sein könnten. Entsprechend sinnvoll erscheint demnach die Durchführung intensiver Interaktionsstudien, beispielsweise über Ko-Immunopräzipitation oder Massenspektroskopie. Die Verfügbarkeit mehrerer unterschiedlicher Mutationen von Mei-P26 sollte es dabei gleichzeitig möglich machen, die dabei beteiligten Sequenzbereiche von Mei-P26 zu identifizieren.

Insgesamt konnten also bei der Untersuchung von Mei-P26 in dieser Arbeit neue Erkenntnisse dazu gewonnen werden, wie Mei-P26 in der Lage ist, mRNAs über seine NHL Domäne zu binden und sie in ihrer Expression zu regulieren. Anhand von Bindungsstudien konnte gezeigt werden, dass Mei-P26 und Sxl beide an einen U-reichen Bereich der *nos* 3' UTR binden können, dies aber in einer jeweils exklusiven Art geschieht. Des Weiteren zeigen die hier vorgestellten Daten, dass Mei-P26, ähnlich wie Brat, kurze RNA Sequenzen erkennt und bindet. Auch konnten gewisse Kriterien festgestellt werden, nach denen die Erkennung dieser Sequenzen erfolgt, inklusive der Identifikation eines möglichen, wenn auch augenscheinlich nicht exklusiven, Bindemotivs. Anhand moderner iCLIP Experimente konnte eine Reihe möglicher Zielgene der Bindung und Regulation durch Mei-P26 identifiziert und teilweise auch verifiziert werden. Dabei scheinen es in erster Linie Gene aus den Bereichen Translation und Ribosomenbiogenese zu sein, welche über ihre 3' UTR gebunden und reguliert werden. In der funktionellen Analyse dieser Regulation konnte nicht nur erstmals *in vitro* gezeigt werden, dass Mei-P26 *nos* selbst direkt regulieren kann, sondern es konnte erstaunlicherweise auch gezeigt werden, dass Mei-P26 andere mRNAs nicht nur negativ, sondern auch positiv regulieren kann. Zwar konnte eine Beteiligung der E3-Ligase Aktivität der RING Domäne an der Funktion von Mei-P26 ausgeschlossen

3. Diskussion

werden und vorab auch bereits mehrere mögliche Interaktionspartner für eine negative Regulation von mRNAs identifiziert werden, die Hintergründe und möglichen Interaktionspartner für eine positive Regulation bleiben jedoch vorerst weiter unbekannt. Entsprechend dieser Erkenntnisse ergibt sich folgendes Arbeitsmodell zur Funktion und Interaktionen von Mei-P26 (**Abb. 15**).

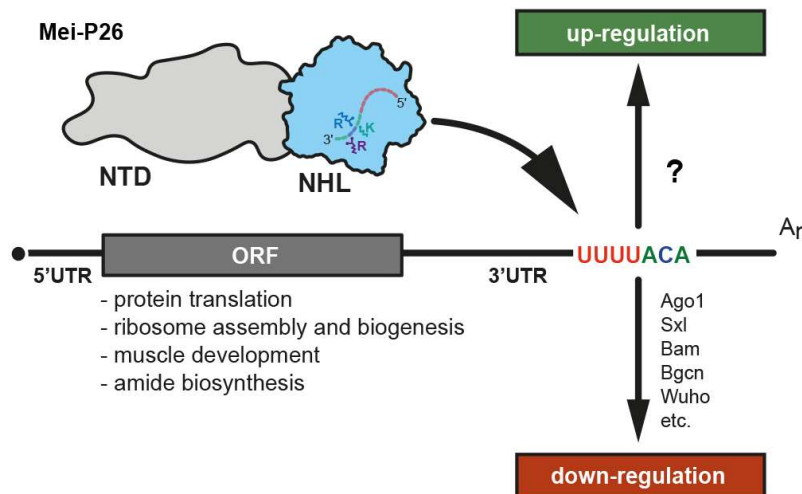


Abb. 15: Arbeitsmodell zur Funktion und zu Interaktionen von Mei-P26 in der Regulation von mRNAs. Insbesondere mRNAs von Genen, welche an Translation oder Ribosomenbiogenese und -assemblierung beteiligt sind, werden über ihre 3' UTR von Mei-P26 gebunden. Die Bindung erfolgt dabei zumindest teilweise über die NHL Domäne von Mei-P26 und über das Erkennungsmotiv UUUUACA beziehungsweise Poly(U)-Bereiche auf der RNA. Mei-P26 ist in der Lage, die Expression gebundener mRNAs entweder positiv oder negativ zu regulieren. Bei der negativen Regulation konnten bereits mehrere mögliche Interaktionspartner identifiziert werden (s. Abb.). Im Fall der positiven Regulation sind eine Beteiligung solcher Partner sowie deren mögliche Identität bislang unbekannt.

Doch wie lassen sich die bisher bekannten Daten auf das Verständnis der Mechanismen für die Regulation von *nos* übertragen? In zwei Studien wurden erste Modelle hierfür vorgestellt (Malik et al. 2017; Malik et al. 2020). Dabei wird davon ausgegangen, dass neben Bam, Bgcn, Mei-P26 und Sxl, auch Brat und Ago1 direkt an der Regulation von *nos* beteiligt sind. Die aktuellste Version dieses Modells basiert auf der Vermutung, dass es nicht nur zur Bildung von einem sondern von zwei, nahezu identischen, Komplexen auf der *nos* 3' UTR kommt. Der Unterschied besteht dabei in der Bindung der 3' UTR. Diese erfolgt entweder durch Ago1 im vorderen Bereich der 3' UTR über die Bindung

von zwei Sequenzen welche komplementär zu miRNAs sind, oder durch Sxl im bekannten Poly(U)-Bereich im hinteren Teil der 3' UTR. In beiden Komplexen erfolgt die Regulation der mRNA schließlich über Rekrutierung von CCR4-NOT durch Bam (Malik et al. 2020). Angesichts der anderweitig publizierten und der hier vorgestellten Daten erscheint dieses Modell jedoch als eher unwahrscheinlich, ergeben sich doch einige Unklarheiten und Widersprüche daraus. Unter anderem wird die regulative Aktivität des Komplexes ausschließlich der Rekrutierung des CCR4-NOT Komplexes durch Bam zugeschrieben. Die hier vorgestellten Daten zeigen jedoch ein solches Regulationspotenzial gleichermaßen auch für Bgcn und Mei-P26. Auch die Art der RNA Bindung scheint fraglich, konnte doch bislang keine direkte Beteiligung von Ago1 an der Regulation von *nos* festgestellt werden. Gleichzeitig führte eine Mutation von *Sxl*, sowie seiner Bindestelle in der 3' UTR, stets zu einem vollständigen Verlust der Regulation von *nos*, was scheinbar einem redundanten Modell der Bindung der *nos* 3' UTR widerspricht. Auch eine direkte Beteiligung von Brat innerhalb des Komplexes konnte so bislang nicht festgestellt werden. Schließlich erscheint auch die sehr hohe Komplexität dieses Modells, gepaart mit seiner ebenfalls sehr hohen Redundanz in sich eher widersprüchlich.

Die Erstellung eines alternativen Modells dafür, wie der Aufbau und die Funktion des Komplexes gestaltet sein könnten, stellt sich jedoch weiterhin als schwierig dar. Ein Modell, wie es zwischenzeitlich in dieser Arbeit überlegt wurde, bei welchem sich der Komplex aus Bam, Bgcn, Mei-P26 und Sxl auf dem Poly(U)-Bereich der 3' UTR formiert und die Regulation über die kombinierte Aktivität der Rekrutierung von CCR4-NOT durch Bam und Pcm durch Bgcn erfolgt, musste aufgrund der augenscheinlich nicht stattfindenden Beteiligung von Pcm verworfen werden. Auch ist die Rolle von Mei-P26 in diesem Modell nicht geklärt. Bereits aus vorherigen Studien ist bekannt, dass neben der zuvor erwähnten, und auch hier bestätigten, Interaktion von Bam und Bgcn, Interaktionen zwischen Bam und Sxl (Chau et al. 2009, 2012), Mei-P26 und Bgcn, sowie zwischen Mei-P26 und Sxl (Li et al. 2013) bestehen. Gleichzeitig zeigen die Daten von Sgromo et al. 2018, in Übereinstimmung mit den Daten dieser Arbeit, eine Rekrutierung des CCR4-NOT Komplexes durch Bam. Die Daten dieser Arbeit ergänzen diese Auflistung um die zusätzliche regulatorische Wirkung von Bgcn und Mei-P26. Auch konnten Hinweise gefunden werden, dass Bam neben der Rekrutierung von CCR4-NOT womöglich noch auf eine andere Art regulatorisch aktiv sein kann. Insgesamt ergibt sich somit aber eine Anzahl von drei Komponenten des Komplexes welche, vermutlich jeweils durch Rekrutierung weiterer Proteine, in der Lage sind die Expression von mRNAs zu regulieren. Diese Zahl erscheint jedoch recht hoch und es ist künftig sehr genau zu prüfen, ob es hierbei zu einer Kooperation von zwei oder sogar aller drei Proteine bei

3. Diskussion

der Rekrutierung weiterer Faktoren kommt. Auch besteht die Möglichkeit, dass hier gezeigte Aktivitäten aufgrund des Proteinexpressionsmusters innerhalb der Zystoblasten in diesen so nicht auftreten können. Die Tatsache, dass neben Sxl wohl auch Mei-P26 in der Lage sein könnte an die *nos* 3' UTR zu binden, wäre hingegen eine mögliche Erklärung dafür, wie die *nos* mRNA spezifisch in den Zellen erkannt und gebunden wird. Zudem wäre es interessant zu überlegen, ob Mei-P26 und Sxl nach Bindung der mRNA gemeinsam als eine Art Grundgerüst für die Assemblierung des restlichen Komplexes dienen können. Insgesamt betrachtet reicht die derzeitige Datenlage, trotz der hier vorgestellten neuen Erkenntnisse allerdings weiterhin nicht aus um ein vollständiges Bild des Aufbaus und der Funktion des *nos* Regulationskomplexes zu erhalten. Nichtsdestotrotz erlauben die Daten dieser Arbeit einen tieferen Einblick in die Funktionsweise zentraler Komponenten dieses Komplexes und bringen unser Verständnis für die Mechanismen für die Regulation von *nanos* in der weiblichen Keimbahn von *D. melanogaster* weiter voran. Es wird interessant sein zu sehen, inwieweit zukünftige Studien zu den bisher bekannten Komponenten des Regulationskomplexes, aber auch zu möglichen neuen Faktoren wie beispielsweise Wuho die bisherigen Erkenntnisse ergänzen und so schließlich ein vollständiges Verständnis dieses sehr komplexen Prozesses ermöglichen.

4. Material & Methoden

4.1 Klonierung

4.1.1 PCR

Pro Reaktion wurden 100 ng Templat-DNA, je 1 µl der Primer (10µM), 1 µl 10 mM dNTPs, 1 µl Phusion Polymerase (laboreigen oder NEB) sowie 10 µl 5x HF-Puffer (NEB) in einem Gesamtvolumen von 50 µl verwendet. Die Reaktion wurde in einem T100™ Thermocycler (Bio-Rad) mit den folgenden Einstellungen durchgeführt:

95°C	5 min		
95°C	30 s	}	25-35x
50-60°C	30 s		
72°C	30-90 s		
72°C	7 min		

(Hinweis: Hybridisierungstemperatur sowie Elongationszeit und Zyklenzahl wurden für jedes Experiment individuell gewählt.)

Das Ergebnis der PCR wurde mittels Agarosegelelektrophorese überprüft und das PCR-Produkt wahlweise über Gelextraktion (QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen; nach Herstellerangabe) oder direkt über ein QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen; nach Herstellerangabe), mit einem finalen Volumen von 30 µl gereinigt.

4.1.2 Restriktionsverdau

Bei Verwendung der Restriktionsenzyme SbfI-HF und NotI-HF (beide NEB), wurde die DNA mit je 15-20 U beider Enzyme in 1x CutSmart Puffer (NEB) für 1-2 h bei 37°C verdaut und die Reaktion für 10 min bei 80°C inaktiviert.

Bei Verwendung der Restriktionsenzyme HpaI und BglII (beide NEB), wurde die DNA zunächst mit 5-10 U HpaI in 1x CutSmart Puffer (NEB) für 1-2 h bei 37°C verdaut. Nach Zugabe von 100 mM NaCl sowie 10-20 U BglII, wurde die DNA erneut für 1-2 h bei 37°C verdaut.

In beiden Fällen erfolgte die Reinigung des gewünschten DNA-Fragments wahlweise über ein QIAquick Gel Extraction Kit oder QIAquick PCR Purification Kit (beide Qiagen, nach Herstellerangabe).

4. Material & Methoden

4.1.3 Ligation und Transformation in *E. coli* TOP10

Pro Ligationsansatz wurden 7 µl verdautes Transgen mit je 1 µl verdaulichem Vektor, T4 DNA-Ligase Puffer und T4 DNA-Ligase (beide NEB) für mindestens 1,5 h bei Raumtemperatur inkubiert und die Reaktion anschließend für 15 min bei 65°C inaktiviert.

Der gesamte Ligationsansatz wurde vorsichtig mit 100 µl chemisch kompetenter *E. coli* TOP10 gemischt und für 20 min auf Eis inkubiert. Nach Hitzeschock bei 42°C für 90 s, wurden die Zellen für weitere 2 min auf Eis inkubiert und auf LB Agarplatten mit 100 µg/ml Amp ausplattiert, welche anschließend über Nacht bei 37°C inkubiert wurden.

4.1.4 Plasmid Präparation

3 ml (Mini) bzw. 100 ml (Midi) LB-Medium mit 100 µg/ml Amp wurden mit transformierten *E. coli* TOP10 angeimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Die Reinigung der Plasmide aus den Zellen erfolgte mit einem QIAprep Spin Miniprep Kit bzw. einem QIAfilter Plasmid Midi Kit (beide Qiagen; nach Herstellerangabe).

4.1.5 Plasmide

Im Folgenden sind die, in dieser Arbeit verwendeten, Expressionsplasmide für Experimente in der *Dmel2* Zellkultur gelistet (**Tab. 1+2**). Die Plasmide wurden freundlicherweise von Dritten zur Verfügung gestellt, beziehungsweise, wie oben beschrieben, selbst kloniert.

Tab. 1: Expressionsplasmide welche in dieser Arbeit verwendet wurden, jedoch bereits vorab im Labor zur Verfügung standen bzw. im Verlauf der Arbeit von anderen Wissenschaftlern kloniert und zur Verfügung gestellt wurden.

Plasmid	Transgen	Kloniert durch
pAc5.1 FLuc 5BoxB	Firefly Luciferase mit 5x B-Box in 3'UTR	I. Loedige
pAc5.1 HA/NHA Bam	Bam Volllänge	J. Medenbach
pAc5.1 HA/NHA Bam N	Bam as 1-106	D. Strauß
pAc5.1 HA/NHA Bam NM	Bam as 1-281	D. Strauß
pAc5.1 HA/NHA Bam M	Bam as 107-281	D. Strauß
pAc5.1 HA/NHA Bam MC	Bam as 107-442	D. Strauß
pAc5.1 HA/NHA Bam C	Bam as 282-442	D. Strauß
pAc5.1 HA/NHA Bgcn	Bgcn Volllänge	D. Strauß
pAc5.1 HA/NHA Bgcn HA2+OB	Bgcn as 680-945	S. Palusci
pAc5.1 HA/NHA Bgcn Sp+Ank	Bgcn as 325-474	S. Palusci
pAc5.1 HA/NHA Brat	Brat Volllänge	I. Loedige
pAc5.1 HA/NHA GW182	GW182 Volllänge	I. Loedige
pAc5.1 HA/NHA Mei-P26	Mei-P26 Volllänge	I. Loedige
pAc5.1 HA/NHA Sxl	Sxl Volllänge	J. Medenbach
pAc5.1 HA/NHA Bgcn Mid	Bgcn as 132-945	S. Palusci
pCHS B_m FLuc EF	<i>msl-2</i> 5' UTR mit mutierter B-site; Firefly Luciferase; <i>msl-2</i> 3' UTR mit wildtypischer E/F-site	J. Medenbach (Medenbach et al. 2011)
pCHS B_m FLuc (EF)_m	<i>msl-2</i> 5' UTR mit mutierter B-site; Firefly Luciferase; <i>msl-2</i> 3' UTR mit mutierter E/F-site	J. Medenbach (Medenbach et al. 2011)
pCHS B_m FLuc nos	<i>msl-2</i> 5' UTR mit mutierter B-site; Firefly Luciferase; wildtypische <i>nanos</i> 3' UTR	M. Jüttner
pCHS B_m RLuc (EF)_m	<i>msl-2</i> 5' UTR mit mutierter B-site; Renilla Luciferase; <i>msl-2</i> 3' UTR mit mutierter E/F-site	J. Medenbach (Medenbach et al. 2011)

4. Material & Methoden

Tab. 2: Liste der im Zuge dieser Arbeit klonierten Expressionsplasmide mit Angabe des enthaltenen Transgens, dessen Ursprung sowie der für die Klonierung verwendeten Restriktionsschnittstellen (RES). Fortgesetzt auf der nächsten Seite.

Plasmid	Transgen	Ursprung	RES
pAc5.1 2F Mei-P26	Mei-P26 Volllänge, Isoform C/E	Sub- klonierung	Sbfl/NotI
pAc5.1 2F Mei-P26 NHL	Mei-P26 NHL-Domäne (as 908-1206)	PCR	Sbfl/NotI
pAc5.1 2F Mei-P26 NHL^{RKR}	Mei-P26 Volllänge; R1150A, K1172A, R1175A	Mutagenese	Sbfl/NotI
pAc5.1 2F Mei-P26^{RKR}	Mei-P26 NHL Domäne; R1150A, K1172A, R1175A	Mutagenese	Sbfl/NotI
pAc5.1 2F Mei-P26 ΔBBox	Mei-P26 (as 235-1206)	PCR	Sbfl/NotI
pAc5.1 2F Mei-P26 ΔRING	Mei-P26 (as 533-1206)	PCR	Sbfl/NotI
pAc5.1 HA/NHA Bam N1	Bam as 1-39	PCR	Sbfl/NotI
pAc5.1 HA/NHA Bam N4	Bam as 40-106	PCR	Sbfl/NotI
pAc5.1 HA/NHA Bgcn ΔAnk	Bgcn mit Deletion der Ankyrin Domänen	Mutagenese	Sbfl/NotI
pAc5.1 HA/NHA Mei-P26^{RKR}	Mei-P26 Volllänge; R1150A, K1172A, R1175A	Sub- klonierung	Sbfl/NotI
pAc5.1 RLuc	Renilla Luciferase Volllänge	PCR	Sbfl/NotI
pCHS B_m FLuc bic	Firefly Luciferase; bic 3'UTR 174-324	PCR	HpaI/BglII
pCHS B_m FLuc chic	Firefly Luciferase; chic 3'UTR 208-414	PCR	HpaI/BglII
pCHS B_m FLuc Col4a1	Firefly Luciferase; Col4a1 3'UTR 163-371	PCR	HpaI/BglII
pCHS B_m FLuc eIF4A	Firefly Luciferase; eIF4A 3'UTR 269-374	PCR	HpaI/BglII
pCHS B_m FLuc Hrb27C	Firefly Luciferase; Hrb27C 3'UTR 1861-2497	PCR	HpaI/BglII
pCHS B_m FLuc Hsp83	Firefly Luciferase; Hsp83 3'UTR 133-361	PCR	HpaI/BglII
pCHS B_m FLuc LanA	Firefly Luciferase; LanA 3'UTR 228-304	PCR	HpaI/BglII
pCHS B_m FLuc lost	Firefly Luciferase; lost 3'UTR 623-927	PCR	HpaI/BglII
pCHS B_m FLuc Mlc-C	Firefly Luciferase; Mlc-C 3'UTR 516-738	PCR	HpaI/BglII
pCHS B_m FLuc nos WT	Firefly Luciferase; nanos 3'UTR 185-876	PCR	HpaI/BglII
pCHS B_m FLuc nos ΔBS+	Firefly Luciferase; nanos 3'UTR 185-876; Δ778-807	Mutagenese	HpaI/BglII

pCHS B_m FLuc RpS20	Firefly Luciferase; RpS20 3'UTR 1-99	PCR	HpaI/BglI I
pCHS B_m FLuc RpS23	Firefly Luciferase; RpS23 3'UTR -5-76	PCR	HpaI/BglIII
pCHS B_m FLuc spz	Firefly Luciferase; spz 3'UTR 212-379	PCR	HpaI/BglIII
pCHS B_m FLuc sqd	Firefly Luciferase; sqd 3'UTR 4284-4455	PCR	HpaI/BglIII
pCHS B_m FLuc sta	Firefly Luciferase; sta 3'UTR 3-84	PCR	HpaI/BglIII
pCHS B_m FLuc swip-1	Firefly Luciferase; swip-1 3'UTR 656-806	PCR	HpaI/BglIII

4.2 (Zielgerichtete) Mutagenese

Mutationen einzelner Nukleotide wurden mittels zielgerichteter Mutagenese eingeführt. Hierfür wurden 2 ng der, zu mutierenden, Plasmid-Templat DNA mit je 0,5 µl der, zueinander komplementären, Primer mit der gewünschten Mutation (je 2,5 µM) in einer PCR-Reaktion (Phusion Polymerase, s.o.) in einem Volumen von 12,5 µl nach dem folgenden Protokoll amplifiziert:

95°C	5 min	} 18x
95°C	50 s	
50-60°C	50 s	
72°C	1 min + 1 min/1 kb Templat-Länge	
72°C	7 min	

Das PCR-Produkt wurde mit 5 U DpnI (NEB) für 1 h bei 37°C verdaut und die Reaktion nach Hitzeinaktivierung in *E. coli* TOP10 transformiert. Zur Vermeidung unerwünschter Mutationen auf dem Plasmid, wurde das mutierte Transgen, wie oben beschrieben, mittels Restriktionsverdau aus dem Vektor ausgeschnitten und erneut in dasselbe Plasmidsystem kloniert.

Für die Modifikation/Deletion größerer DNA-Abschnitte wurde eine 2-Schritt Mutagenese verwendet. Hierbei wurden die Bereiche des Transgens vor und nach der zu mutierenden Region mittels PCR amplifiziert (s.o.). Hierbei wurden die Primer neben der Mutationsstelle so konzipiert, dass sich ihre Sequenzen am 5'-Ende teilweise komplementieren. Die beiden PCR-Produkte wurden anschließend in einer weiteren PCR-Reaktion als Templat verwendet und das mutagene Transgen über die außenliegenden Primer amplifiziert. Die weitere Klonierung erfolgte über Restriktionsverdau und Transformation, wie oben beschrieben. Alle PCR-Produkte wurden mittels QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen; nach Herstellerangabe) gereinigt.

4. Material & Methoden

4.3 *Drosophila* SL2 Zellkultur

D. melanogaster SL2 (Dmel2) Zellen wurden bei 25°C in Express Five™ SFM Medium mit 10x GlutaMAX™ (beide Gibco, Thermo Fisher) kultiviert. Durch regelmäßiges Splitten im Verhältnis 1:5 wurde eine permanente Zelldichte von > 80% gewährleistet.

4.4 Transfektion von *Drosophila* Zellen

Zur Transfektion von Zellen in 6-well Platten, wurden $1,6 \times 10^6$ Zellen/well ausgesät und nach 24 h mit insgesamt 2 µg Plasmid-DNA transfiziert. Im Fall von 96-well Platten wurden 4×10^4 Zellen/well ausgesät und mit 100 ng Plasmid-DNA transfiziert. Die Art und das Mischverhältnis der transfizierten Plasmid-DNA sind den einzelnen Experimenten (s.u.) zu entnehmen.

Die DNA wurde für die Transfektion im Verhältnis 1:3 mit FuGene® HD Transfektionsreagenz (Promega) gemischt und für 20 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde das Transfektionsgemisch tröpfchenweise auf die Zellen gegeben und durch vorsichtiges Schütteln der Platte im Medium verteilt. Die transfizierten Zellen wurden weiter bei 25°C inkubiert und am 2. Tag nach der Transfektion geerntet.

4.5 Tethering Assay

Dmel2 wurden, wie oben beschrieben, im Verhältnis 1:3:6 mit den Vektoren pAc5.1RLuc (1), pAc5.1 FLuc 5BoxB (3) und pAc5.1 mit HA/λNHA getaggetem Transgen von Interesse (6), transfiziert. In einzelnen Fällen wurde zur Angleichung der Expressionslevel der Transgene eine geringere Menge des transgen-codierenden Plasmids verwendet (**Tab. 3**). Die fehlende DNA-Menge wurde hierbei durch zusätzliche Transfektion mit einer entsprechenden Menge an „leerem“ pAc5.1 Plasmid ohne enthaltenes Transgen ausgeglichen. In Fällen in denen zwei Proteine in einer Probe getestet werden sollten, wurde die entsprechende DNA-Menge zwischen den beiden Expressionsplasmide gleichermaßen aufgeteilt.

Tab. 3: Tabellarische Auflistung der Plasmide bei denen zur Angleichung der Expressionslevel geringere Mengen transfiziert wurden. Angegeben sind die verwendeten Mengen pro 6-well bzw. 96-well, sowie die zum Ausgleich verwendete Menge an „leerem“ pAc5.1 Plasmid.

Plasmid	Menge pro 6-well	Ausgleichsmenge pAc5.1 „leer“	Menge pro 96-well	Ausgleichsmenge pAc5.1 „leer“
pAc5.1 NHA Bam N	500 ng	700 ng	-	-
pAc5.1 NHA Bam M	1000 ng	200 ng	-	-
pAc5.1 NHA Bam C	1000 ng	200 ng	-	-
pAc5.1 HA Bam MC	1000 ng	200 ng	-	-
pAc5.1 NHA Bam MC	700 ng	500 ng	-	-
pAc5.1HA Bgcn Sp+Ank	700 ng	500 ng	-	-
pAc5.1 NHA Bgcn Sp+Ank	500 ng	700 ng	-	-
pAc5.1 HA Sxl	20 ng	1180 ng	10 ng	50 ng
pAc5.1 NHA Sxl	20 ng	1180 ng	10 ng	50 ng
pAc5.1 HA GW182	300 ng	900 ng	15 ng	45 ng
pAc5.1 NHA GW182	300 ng	900 ng	15 ng	45 ng

Die geernteten Zellen wurden mit PBS gewaschen und anschließend mit 40 µl 1x Passive Lysis Buffer (Promega) unter Schütteln für 15 min bei 25°C lysiert. Die Bestimmung der Luciferase-Expressionslevel erfolgte durch Messung von 10 µl des Lysats unter Verwendung des Dual Luciferase Reporter Assay System (Promega) auf einem Centro LB 960 Luminometer (Berthold).

Die Berechnung der relativen Luciferase Einheiten (RLU) erfolgte durch Bildung des Quotienten aus Firefly und Renilla Luciferase Aktivitäten. Die Aktivität eines Proteins in diesem Experiment wurde anhand des Verhältnisses der RLU zwischen den getetherten Δ NHA Proben und den nicht getetherten HA Proben ermittelt. Hier dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen von je mindestens drei biologischen Replikaten, jeweils bestehend aus drei technischen Replikaten.

4. Material & Methoden

4.6 Luciferase Reporter Assay

Dmel2 Zellen wurden in 96-well Platten mit je 1,7 ng pCHS B_m RLuc (EF)_m, 23,3 ng pCHS B_m FLuc mit verschiedenen 3'UTRs und 75 ng pAc5.1 mit 2x FLAG getaggetem, wildtypischen Mei-P26 oder der Mei-P26^{RKR} Mutation, transfiziert. pAc5.1 ohne Transgen wurde als Negativkontrolle verwendet. Die RLU wurde analog zum Tethering Assay gemessen. Die Luciferase-Aktivität wurde als prozentuale Änderung der Proben mit Mei-P26 gegenüber der entsprechenden Negativkontrolle angegeben. Hier dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen von je mindestens drei biologischen Replikaten, jeweils bestehend aus drei technischen Replikaten.

4.7 Western Blot

Transfizierte Zellen wurden geerntet und nach Zentrifugation für 2 min bei 400 g, 4°C der Überstand abgenommen. Die Zellen wurden anschließend einmal mit PBS gewaschen, erneut zentrifugiert und anschließend mit 50 µl 1x RIPA (50 mM Tris/Cl pH 8,0, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0,5% Natrium-Desoxycholat, 0,1% SDS) für mindestens 30 min auf Eis lysiert. Der Proteingehalt des geklärten Lysats wurde mittels Lowry Proteinbestimmungsmethode ermittelt (Lowry et al. 1951); DC Protein Assay, Bio-Rad, nach Herstellerangabe).

50 µg Protein wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt (je nach Experiment 8 bzw. 12% Acrylamid). Die Proteine wurden im Anschluss mittels Tank-Blot (Mini-PROTEAN Tetra Cell, Bio-Rad) für 1 h bei 100 V auf eine Nitrozellulose-Membran (Amersham Protran Premium 0.2 µm NC, GE Healthcare Life Science) transferiert. Die Membran wurde nach dem Transfer für 30 min mit 5% Milch TBS-T (10 mM Tris/Cl, 150 mM NaCl, 0,1 % Tween 20, 5 % Milchpulver, pH 7,5) blockiert und über Nacht (4°C, rotierend) mit dem primären Antikörper hybridisiert (α-HA: Anti-HA.11 Epitope Tag Antibody, Klon 16B12, BioLegend; α-Flag: Monoclonal ANTI-FLAG® M2 antibody, Sigma-Aldrich, α-Not 1: Maus monoklonal, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von E. Wahle [Universität Halle, Temme et al. 2010]; jeweils 1:1000 in 5 % Milch TBS-T). Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurde die Membran für 2 h bei Raumtemperatur mit dem sekundären Antikörper (α-Maus: Peroxidase AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG, light chain specific, Jackson ImmunoResearch; 1:10000 in 5 % Milch TBS-T) inkubiert und erneut dreimal gewaschen. Die Detektion erfolgte mittels Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad) bzw. SuperSignal™ West Femto Chemilumineszenz-Substrat (Thermo-Fisher) an einem ChemiDoc Touch Imaging System (Bio-Rad). Für den Nachweis von α-Tubulin als Ladekontrolle wurde die Membran mit PBS gewaschen und anschließend, wie oben beschrieben, mit dem primären Antikörper (Anti-α-Tubulin DM1A, Sigma Aldrich)

hybridisiert und analysiert. In Fällen, in denen eine oder mehrere Proben auf derselben oder ähnlichen Höhe wie Tubulin liefen, wurde die Membran vor der erneuten Hybridisierung zunächst zweimal für 10 min mit 200 mM Tris/Cl pH 2,2, 0,1% SDS, 1 % Tween 20 und dreimal mit TBS-T gewaschen, bevor sie erneut mit 5 % Milch TBS-T blockiert und neu hybridisiert wurde.

4.8 RNA Extraktion

Dmel2 Zellen wurden für 2 min bei 400 g, 4°C zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Die Zellen wurden anschließend einmal mit PBS gewaschen, erneut zentrifugiert und das Pellet mit 1,5 ml TRIzol™ Reagenz (Thermo Fisher) für ca. 2 min bei Raumtemperatur lysiert. Nach Zugabe von 0,5 ml CHCl₃ sowie kurzer aber kräftiger Durchmischung, wurden die Proben für 10 min bei voller Drehzahl und 4°C zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde abgenommen, erneut mit CHCl₃ (gleiche Volumina) gemischt und für 5 min (volle Drehzahl, 4°C) zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde anschließend mit 50 % Isopropanol, 300 mM Natriumacetat sowie 3 µl linearem Acrylamid (5 mg/ml; Invitrogen) für mindestens 2 h bei -20°C inkubiert. Nach Zentrifugation für 30 min (volle Drehzahl, 4°C) wurde der Überstand abgenommen und das Pellet mit 500 µl 70 % Ethanol gewaschen. Die RNA wurde erneut pelletiert (10 min, volle Drehzahl, 4°C), der Überstand entfernt, das Pellet an der Luft getrocknet und mit Nuklease-freiem Wasser resuspendiert.

Zur Entfernung eventuell verbliebener DNA, wurden die Proben im Anschluss mit bis zu 7 U DNaseI (RNase-frei, Thermo Fisher) für 1 h bei 37°C inkubiert. Nach erneuter Präzipitation der RNA (analog wie oben beschrieben jedoch mit einem Probenvolumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (Carl Roth) anstelle von TRIzol) wurde die RNA-Konzentration mittels Nanodrop (Thermo Fisher) ermittelt.

4.9 Reverse Transkription

Reverse Transkription wurde entweder mittels SuperScript II (SSII) oder SuperScript III (SSIII; beide Thermo Fisher), anhand eines proprietären Protokolls (SSII) oder anhand der Herstellerangaben (SSIII) durchgeführt.

SS II: 1 µg RNA wurden mit 2 µl dNTPs (10 mM) und 1 µl oligo(dT)₂₅ Primer (10 µM) in einem Volumen von 25 µl für 5 min bei 65°C denaturiert und sofort für mindestens 1 min auf Eis gekühlt. Nach Zugabe von 8 µl 5x First-Strand Buffer (FSB; Thermo Fisher), 4 µl 0,1 M DTT sowie 2 µl DEPC-H₂O, wurde die Reaktion für 2 min bei 25°C inkubiert und

4. Material & Methoden

1 µl SSII (200 U/µl) zugegeben. Nach erneuter Inkubation bei 25°C für 10 min wurde die Reaktion zunächst für 50 min bei 42°C und abschließend für 15 min bei 70°C inkubiert.

SSIII: 1-5 µg RNA wurden mit 5 µl 10 µM oligo(dT)₂₅ Primer und 1 µl 10 mM dNTPs in einem Volumen von 13 µl für 5 min bei 65°C denaturiert und sofort für mindestens 1 min auf Eis gekühlt. Nach Zugabe von 4 µl 5x FSB (Thermo Fisher), 1 µl 0,1 M DTT, 1 µl RNasin sowie 1 µl SSIII (200 U/µl) wurde die Reaktion zunächst für 5 min bei 25°C und dann für 60 min bei 50°C inkubiert. Abschließend wurde die Reaktion für 15 min bei 70°C inaktiviert.

4.10 Northern Blot

22,5 µg RNA in 10 µl Nuklease-freiem Wasser wurden mit 2x RNA-Ladepuffer für ca. 5 min bei 80°C denaturiert und anschließend sofort auf Eis gekühlt. Nach Zugabe von 2,3 µl EtBr (400 µg/ml) wurden die Proben für 5 h bei 85 V auf einem Agarosegel (1,5 % Agarose, 1x MOPS, 1,8 % Formaldehyd) aufgetrennt. Nach Inkubation in 20x SSC (3 M NaCl, 300 mM Natriumcitrat, pH7,0) für 30 min bei 4°C wurde die RNA mittels Kapillartransfer für 18 h auf eine positiv geladene Nylonmembran (Amersham Hybond-N+, GE Healthcare Life Science) transferiert. RNA und Membran wurden durch UV-Bestrahlung (254 nm, 120 J/cm²; Stratalinker 2400, Stratagene) vernetzt und die Membran für mindestens 30 min bei 50°C in Church Puffer (500 mM Natriumphosphat, 1 mM EDTA, 7% SDS) mit 40 µg/ml Lachssperma DNA (Carl Roth) blockiert.

Für die Herstellung der Sonden zur radioaktiven Markierung der zu untersuchenden RNAs wurden diese zunächst mittels Standard-PCR (Phusion-Polymerase, 30 Zyklen; Primer: **Tab. 4**) teilweise (FLuc, rp49) oder vollständig (RLuc) entweder von einem Plasmid (FLuc, RLuc) oder von Dmel2 cDNA (rp49) amplifiziert. 100 ng der gereinigten dsDNAs wurden in einer zweiten PCR Reaktion (Phusion-Polymerase, 99 Zyklen) ausschließlich mit dem jeweiligen reversen Primer, unter Anwesenheit von je 50 µCi frischem [γ -³²P] dATP und [γ -³²P] dCTP (Hartmann Analytic) weiter amplifiziert. Die markierten Einzelstrang-Sonden wurden mittels Gelfiltration (Illustra MicroSpin G-25 columns; GE Healthcare) gereinigt.

Die Hybridisierung der, auf der Nylonmembran gebundenen, RNA mit einer der Luciferase Sonden sowie der Ladekontrolle rp49 erfolgte über Nacht bei 50°C in Church-Puffer. Nach der Hybridisierung wurde die Membran zunächst einmal mit 2x SSC, 0,1 % SDS gespült und dann für mindestens 15 min bei 50°C darin gewaschen. Anschließend wurde die Membran noch zweimal für mindestens 30 min bei 50°C in 0,5x SSC, 0,1 % SDS gewaschen und ein Phosphorfilm aufgelegt. Die Auswertung erfolgte an einem

Personal Molecular Imager (Bio-Rad). Für den Nachweis der zweiten Luciferase RNA, wurde die erste Luciferase Sonde durch Behandlung der Membran mit kochender 0,1%iger SDS-Lösung entfernt und die Membran, wie oben beschrieben, blockiert, hybridisiert and analysiert.

Tab. 4: Liste der für die Herstellung der Northern Blot Sonden verwendeten Oligonukleotide.

Name	Sequenz
F FLuc NB Sonde	AGGCCCGGCGCCATTCTATC
R FLuc NB Sonde	CTTTCCGCCCTTCTTGGCC
F RLuc NB Sonde	GATCCAGAACAAAGGAAACGGATGATAAC
R RLuc NB Sonde	GAGAACTCGCTCAACGAACGATTTG
F rp49 NB Sonde	GACGCTTCAAGGGACAGTATCTG
R rp49 NB Sonde	AAACGCGGTTCTGCATGAG

4.11 qPCR

Pro Reaktion wurden 2 µl einer Reversen Transkription mit SSII (siehe 4.9) als Templat mit 7,5 µl SsoFast™ EvaGreen® Supermix (Bio-Rad) und jeweils 0,5 µl der genspezifischen Primer (10 µM) in einem Volumen von 15 µl verwendet. Reaktionen mit 2 µl einer *mock* Reversen Transkription (ohne SSII) als Templat dienten als Kontrolle.

Die Messung erfolgte auf einem CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) entsprechend folgendem Programm:

95°C	3 min	
95°C	15 s	} 40x
60°C	30 s	
72°C	30 s	
95°C	10 s	

Im unmittelbaren Anschluss erfolgte die Messung einer Schmelzkurve im Bereich von 65 °C bis 95°C in Schritten von 0,5°C/5 s.

4. Material & Methoden

4.12 Expression von GST Mei-P26 NHL

(nach Loedige et al. 2015)

S. frugiperda Sf21 Zellen (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von T. + N. Treiber, Universität Regensburg) wurden in Sf-900 II SFM Medium (Gibco, Thermo Fisher) bei einer Zelldichte von 1×10^6 Zellen/ml kultiviert und mit Baculoviren, welche die GST getaggte Mei-P26 NHL Domäne produzieren (Bacmid von I. Loedige, Viren bereitgestellt von Daniela Strauß, Universität Regensburg) infiziert. Die Zellen wurden weiter bei der angegebenen Zellzahl kultiviert und 72 h nach Arrest der Zellteilung bei einer Konzentration von 1×10^7 Zellen/ml mit 90% Sf-900 II SFM, 10% DMSO, 10 g/l BSA in flüssigem Stickstoff gelagert.

50 ml Sf-900 II SFM wurden mit 400 μ l dieser Zellen angeimpft und damit 450 ml Sf21 Suspension ($0,9 \times 10^6$ Zellen/ml) infiziert. Die Zellen wurden für 48 h bei 25°C inkubiert und anschließend geerntet (5 min, 300 g, 4°C). Das, mit PBS gewaschene, Zellpellet wurde in 30 ml Lysepuffer (50 mM Tris/Cl pH 8,0, 1 M NaCl, 5% Glycerin, 5 mM DTT, 1 mg/ml Lysozym, 1 mM AEBSF, 5 U/ml Benzonase) resuspendiert und die Zellen durch Ultraschall (5x30 s, 50 %, Output: 7) lysiert. Das geklärte Lysat (40 min, 48000 g, 4°C) wurde an einem ÄKTApurifier HPLC System (GE Healthcare) über eine Protino GST/4B 5 ml Säule (Macherey Nagel) gereinigt. Hierfür erfolgte nach dem Beladen der Säule mit dem rekombinanten Protein zunächst ein Waschschriff mit 50 mM Tris/Cl pH 8,0, 0,5 M NaCl, 5 mM DTT bevor das gebundene Protein mit 50 mM Tris/Cl pH 8,0, 1 M NaCl, 5 mM DTT, 15 mM Glutathion eluiert wurde. Die Eluat-Aliquots mit dem höchsten Proteingehalt (in SDS-PAGE) wurden vereinigt, über Nacht bei 4°C gegen 3l 50 mM Tris/Cl pH 8,0, 0,5 M NaCl, 5 mM DTT dialysiert und nach Zugabe von 5% Glycerin bei -80°C gelagert.

4.13 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

15 pmol RNA/DNA (**Tab. 5**) wurden mit 5 U T4 Polynukleotid Kinase (Thermo Fisher) und 10 μ Ci [γ - 32 P] ATP (Hartmann Analytic) für eine Stunde bei 37°C radioaktiv markiert. Die Reaktion wurde für 10 min bei 75°C inaktiviert und die markierte RNA durch Gelfiltration (Illustra MicroSpin G-25 columns; GE Healthcare). Rekombinantes Wildtyp Mei-P26 NHL wurde in 20 mM HEPES/KOH pH 7,5, 100 mM NaCl, 5 mM DTT, 5% Glycerin, mutiertes Mei-P26 NHL (mit Ausnahme von GST Mei-P26 NHL (s.o.) zur Verfügung gestellt von Anna Salerno-Kochan; MCB, Krakau, Polen) in 20 mM HEPES/KOH pH 7,5, 300 mM NaCl, 5 mM DTT, 5% Glycerin und Sxl RBD4 (bereitgestellt von Rebecca Moschall) in 10 mM Tris/Cl pH 7,4, 50 mM KCl, 1 mM EDTA, 1mM DTT verdünnt. 10 fmol RNA/DNA wurden in 10 mM Tris/Cl pH 7,4, 50 mM KCl,

1mM EDTA, 1 mM DTT, 0,4 mg/ml Hefe tRNA (Invitrogen) verdünnt und bei 4°C mit der angegebenen Menge an rekombinantem Protein gemischt. Nach Inkubation für 30 min bei 4°C erfolgte die Auftrennung der Proben mittels Elektrophorese (6% Polyacrylamid [37,5:1 Acrylamid:bis; Bio-Rad), 5% Glycerin, 44,5 mM Tris, 44,5 mM Borsäure) bei 230 V für 60 min bei 4°C. Die Gele wurden für 2 h bei 80°C getrocknet und auf einem Personal Molecular Imager (Bio-Rad) analysiert.

Tab. 5: Liste der für die EMSA Experimente verwendeten RNA-Oligos. Alle Oligos wurden über die Firma Metabion bezogen.

Name	Sequenz
9xU	UUUUUUUUUU
B-site (16xU)	UUUUUUUUUUUUUUUUUU
Col4a1	GCCAUUUUUUUUAUCUGCCA
Hrb27C	AGUAAUUUUUUUCUAUUAAAGU
LanA	AUCCUUUUUAAAAACACC
lin-41 hairpin	GGAGUCCAACUCC
lost	CCCUUUUUUUUAUACACAA
Mlc-C	GGUCUUUUUACAAAAG
nos mut	UUAUAUAAUUUUUUUAUCUCUCUAAAAAAUGU
nos WT	UUAUAUAAUUUUUUUAUUUUUUUAAAAAAUGU
Seq 3 DNA	TTTTACA

4.14 iCLIP

(In Kooperation mit Oliver Rossbach, Universität Gießen)

Dmel2 Zellen wurden, wie oben beschrieben, mit 15 µg pAc5.1-Plasmid, welches FLAG getaggtes Mei-P26 Volllänge, die Mei-P26 NHL-Domäne oder Mutanten (R1150A/K1172A/R1175A) davon codiert, transfiziert. Nach Inkubation für 48 h bei 25°C wurden die transfizierten Zellen, sowie untransfizierte Zellen (Negativkontrolle) mit PBS gewaschen und mit UV-Licht (120 mJ/cm², 254 nm; Stratalinker 2400, Stratagene) bestrahlt. (Weitere Schritte durchgeführt von OR, Etablierung der Immunopräzipitation durch AH). Die Zellen wurden für 20 min auf Eis mit 50 mM Tris/Cl pH 8,0, 150 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 1% NP-40 lysiert, Zelltrümmer pelletiert (30 min, volle Drehzahl, 4°C) und der Überstand mit 10 U RNase I (Ambion) behandelt. Die Immunopräzipitation erfolgte mit für 2 h bei 4°C mit einem anti-FLAG Antikörper (M2, Sigma Aldrich) oder Kontrollserum auf Dynabeads Protein A (Life Technologies). Nach viermaligem Waschen der Beads mit 50 mM Tris/Cl pH7,4, 1 M NaCl, 0.05% Tween 20 wurde die koimmunopräzipitierte RNA dephosphoryliert and an einen, mittels T4 PNK und [³²P]

4. Material & Methoden

ATP radioaktiv markierten, 5' sowie einen unmarkierten 3'-Linker ligiert. Die Proben wurden über neutrale SDS-PAGE (NuPAGE, Invitrogen) aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Der Nachweis von Protein:RNA Komplexen erfolgte über Autoradiographie. Mei-P26:RNA Komplexe wurden aus der Membran ausgeschnitten und das Protein mit Proteinase K verdaut. Die Vorbereitung der RNA für die Sequenzierung auf einem HiSeq® 2500 (Illumina) erfolgte wie zuvor beschrieben (König et al. 2010; Buchbender et al. 2020).

4.15 iCLIP Datenanalyse

(durchgeführt von P. Ghosh, IIMCB, Warschau, Polen)

Die Auswertung der Daten des iCLIP Experiments erfolgte über die iCount Software Paket und Analysen-Pipeline (Curk et al., 2019). Die Sequenzierungsdaten wurden anhand der Barcodes der einzelnen Replikate (mit einer erlaubten Fehlpaarung) aufgetrennt, PCR Duplikate aussortiert und die Adapter getrimmt. Die reads jedes Replikats wurden anhand des *D. melanogaster* Genom (ENSEMBL release 98) aligniert und einzeln prozessiert. Stellen, an denen es zu einer Vernetzung zwischen RNA und Protein gekommen ist (Peaks) wurden identifiziert und zusammengefasst. Gen Loci die sowohl in Experimenten mit Volllänge Protein sowie mit der NHL Domäne Peaks ergaben, wurden per Hand kuratiert. Fand eine Vernetzung zu mitochondriell kodierten RNAs (insg. 4 Loci) oder bekannten Kontaminationen wie etwa snoRNA/scaRNA/snRNA o.ä. in den Wirtsgenen (17 Loci) statt, wurden diese Loci aus der weiteren Analyse ausgeschlossen. Gleiches galt für Regionen mit niedriger Komplexität wie etwa A-reichen Regionen die einem Poly(A)-Schwanz ähneln, oder Genen die von den transfizierten Plasmiden stammen (Actin5C Promoter oder Mei-P26). In den verbliebenen 214 Genen wurden Peaks als gleichwertig betrachtet, wenn die jeweilige Vernetzung in einem Bereich von <50 nt stattgefunden hat. Innerhalb dieser Loci wurden mögliche Mei-P26 Erkennungsmotive in einem Bereich von 30 nt vor bzw. 20 nt nach der Quervernetzung identifiziert. Entsprechende Motive bestanden dabei entweder aus vollen Übereinstimmungen (UUUUACN, UUUUANA, UUUUNCA oder UUUUUUU; 65 Loci) oder U-reichen Regionen mit mindestens vier aufeinander folgenden U-Resten, gefolgt von drei weiteren Nukleotiden mit mindestens einem weiteren U (63 Loci).

4.16 *in vitro* Transkription (IVT)

Ein kurzes Fragment des Zielgens wurde über Primer, welche an ihrem 5'-Ende jeweils einen T7 RNA Polymerase Promoter besitzen (**Tab. 6**), mittels PCR amplifiziert. 1 µg des gereinigten PCR Produkts wurde mit ~1,25 µg T7 RNA Pol (laboreigen), 1 mM NTPs, 100 µM DTT, 0,75 µl RNasin (laboreigen) und 1x RNAPol Reaction Buffer (NEB), in einem Volumen von 25 µl für 4 h bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 1 U RQ1 DNase (Promega), wurde die Reaktion für weitere 30 min bei 37°C inkubiert, für 5 min bei 95°C erhitzt und langsam im Heizblock auf Raumtemperatur abgekühlt. Die Konzentration der produzierten dsRNA wurde anhand einer 1:10 Verdünnung auf einem Agarosegel bestimmt.

Tab. 6: Liste der für die IVT verwendeten Oligonukleotide.

Name	Sequenz
T7 F Bam 684-703 RNAi (D. Strauß)	CGGCTAATACGACTCACTATAGGGCACC AAAGTAG AGCGCTTCC
T7 R Bam 1018-999 RNAi (D. Strauß)	GGCCTAATACGACTCACTATAGGGTCAACGACTTG TGGCTTTCCG
F SbfI T7 Not1 RNAi	CCGTATCCTGCAGGTAATACGACTCACTATAGGGA ACGCGCAGATGTTTGGACC
R NotI T7 Not1 RNAi	CCGTATGCGGCCGCTAATACGACTCACTATAGGGA GCATGCGGCCTAGGTTTCC
F SbfI T7 Pcm RNAi	CCGTATCCTGCAGGTAATACGACTCACTATAGGGT CGTCAAGGCGATAGTGGTG
R NotI T7 Pcm RNAi	CCGTATGCGGCCGCTAATACGACTCACTATAGGGG CGGAACTCCGTCGAATTGC

4.17 RNA-Interferenz (RNAi)

2x10⁶/well Dmel2 Zellen wurden in einer 6-well Platte ausgesät und unmittelbar mit 10 µg/ml dsRNA (s. IVT) behandelt. Die Zellen wurden für 4 Tage bei 25°C inkubiert, anschließend entweder auf einer 96-well Platte (4x10⁴ Zellen/well) oder einer neuen 6-well Platte (2x10⁶ Zellen/well) ausgesät und erneut mit 10 µg/ml dsRNA behandelt. Nach einem weiteren Tag Inkubation bei 25°C wurden die Zellen der 96-well Platten transfiziert und für Tethering Experimente verwendet, während die Zellen der 6-well Platten für den Nachweis des gewünschten Knock-Outs über Western Blot oder qPCR verwendet wurden.

5. Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1: Schematische Darstellung der weiblichen Keimbahn in *D. melanogaster*. (Jambor et al. 2016)
- Abb. 2: Schematische Darstellung des Germariums. (Slaidina und Lehmann 2014); modifiziert
- Abb. 3: Schemata der vorhergesagten Domänenstruktur von Bam, Bgcn, Mei-P26 und Sxl
- Abb. 4: Ergebnisse der Tethering-Experimente mit Bgcn Konstrukten und deren Expressionsanalyse über Western Blot
- Abb. 5: Luciferase mRNA Expressionsanalyse in Bgcn Tethering-Experimenten
- Abb. 6: Western Blot und Tethering-Assay in Pcm *Knockdown* Zellen
- Abb. 7: Ko-Tethering von Bam und Bgcn
- Abb. 8: Western Blot und Untersuchung des funktionellen Zusammenhangs zwischen Bam und Bgcn in Not 1 *Knockdown* Zellen
- Abb. 9: EMSA Experiment zur kompetitiven Bindung von Sxl und Mei-P26 an die *nos* 3' UTR
- Abb. 10: Untersuchung der RNA-Bindung durch Mei-P26 NHL
- Abb. 11: Bioinformatische Auswertung des iCLIP Experiments
- Abb. 12: Validierung von Zielgenen aus iCLIP
- Abb. 13: Funktionelle Analyse der Mei-P26 NHL Domäne
- Abb. 14: Einfluss der verschiedenen Mei-P26 Domänen auf dessen regulatorische Funktion
- Abb. 15: Arbeitsmodell zur Funktion und Interaktionen von Mei-P26 in der Regulation von mRNAs
-
- Abb. A1: Funktionelle Untersuchung von Bam
- Abb. A2: Ko-Tethering von Bgcn und Bam
- Abb. A3: Kontrollexperimente zur kompetitiven Bindung von Sxl und Mei-P26 an die *nos* 3' UTR
- Abb. A4: Proteinexpressions- und RNA Bindungskontrolle für iCLIP

6. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Vorab verfügbare Expressionsplasmide

Tab. 2: Neu klonierte Expressionsplasmide

Tab. 3: Angepasste Transfektionsmengen von Plasmiden zur Angleichung der Protein-expression

Tab. 4: Oligonukleotide für Northern Blot Sonden

Tab. 5: Für EMSA verwendete RNA.Oligonukleotide

Tab. 6: Oligonukleotide für IVT

Tab. A1: Ergebnisse des iCLIP Experiments

7. Literaturverzeichnis

Abaza, Irina; Coll, Olga; Patalano, Solenn; Gebauer, Fátima (2006): Drosophila UNR is required for translational repression of male-specific lethal 2 mRNA during regulation of X-chromosome dosage compensation. In: *Genes & development* 20 (3), S. 380–389. DOI: 10.1101/gad.371906.

Andrews, Shane; Snowflack, Danielle R.; Clark, Ira E.; Gavis, Elizabeth R. (2011): Multiple mechanisms collaborate to repress nanos translation in the Drosophila ovary and embryo. In: *RNA* 17 (5), S. 967–977. DOI: 10.1261/rna.2478611.

Arama, E.; Dickman, D.; Kimchie, Z.; Shearn, A.; Lev, Z. (2000): Mutations in the beta-propeller domain of the Drosophila brain tumor (brat) protein induce neoplasm in the larval brain. In: *Oncogene* 19 (33), S. 3706–3716. DOI: 10.1038/sj.onc.1203706.

Asaoka, Miho; Hanyu-Nakamura, Kazuko; Nakamura, Akira; Kobayashi, Satoru (2019): Maternal Nanos inhibits Importin- α 2/Pendulin-dependent nuclear import to prevent somatic gene expression in the Drosophila germline. In: *PLoS genetics* 15 (5), e1008090. DOI: 10.1371/journal.pgen.1008090.

Asaoka-Taguchi, M.; Yamada, M.; Nakamura, A.; Hanyu, K.; Kobayashi, S. (1999): Maternal Pumilio acts together with Nanos in germline development in Drosophila embryos. In: *Nature cell biology* 1 (7), S. 431–437. DOI: 10.1038/15666.

Bailey, Alexis S.; Batista, Pedro J.; Gold, Rebecca S.; Chen, Y. Grace; Rooij, Dirk G. de; Chang, Howard Y.; Fuller, Margaret T. (2017): The conserved RNA helicase YTHDC2 regulates the transition from proliferation to differentiation in the germline. In: *eLife* 6. DOI: 10.7554/eLife.26116.

Bashaw, G. J.; Baker, B. S. (1995): The msl-2 dosage compensation gene of Drosophila encodes a putative DNA-binding protein whose expression is sex specifically regulated by Sex-lethal. In: *Development (Cambridge, England)* 121 (10), S. 3245–3258.

Bashaw, Greg J.; Baker, Bruce S. (1997): The Regulation of the Drosophila msl-2 Gene Reveals a Function for Sex-lethal in Translational Control. In: *Cell* 89 (5), S. 789–798. DOI: 10.1016/s0092-8674(00)80262-7.

Behm-Ansmant, Isabelle; Rehwinkel, Jan; Doerks, Tobias; Stark, Alexander; Bork, Peer; Izaurralde, Elisa (2006): mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4:NOT deadenylase and DCP1:DCP2 decapping complexes. In: *Genes & development* 20 (14), S. 1885–1898. DOI: 10.1101/gad.1424106.

Bhandari, Dipankar; Raisch, Tobias; Weichenrieder, Oliver; Jonas, Stefanie; Izaurralde, Elisa (2014): Structural basis for the Nanos-mediated recruitment of the CCR4-NOT complex and translational repression. In: *Genes & development* 28 (8), S. 888–901. DOI: 10.1101/gad.237289.113.

Borden, K. L. (1998): RING fingers and B-boxes: zinc-binding protein-protein interaction domains. In: *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire* 76 (2-3), S. 351–358. DOI: 10.1139/bcb-76-2-3-351.

Braun, Joerg E.; Truffault, Vincent; Boland, Andreas; Huntzinger, Eric; Chang, Chung-Te; Haas, Gabrielle et al. (2012): A direct interaction between DCP1 and XRN1 couples mRNA decapping to 5' exonucleolytic degradation. In: *Nature structural & molecular biology* 19 (12), S. 1324–1331. DOI: 10.1038/nsmb.2413.

- Buchbender, Andreas; Mutter, Holger; Sutandy, F. X. Reymond; Körtel, Nadine; Hänel, Heike; Busch, Anke et al. (2020): Improved library preparation with the new iCLIP2 protocol. In: *Methods (San Diego, Calif.)* 178, S. 33–48. DOI: 10.1016/j.ymeth.2019.10.003.
- Cano, Florencia; Bye, Helen; Duncan, Lidia M.; Buchet-Poyau, Karine; Billaud, Marc; Wills, Mark R.; Lehner, Paul J. (2012): The RNA-binding E3 ubiquitin ligase MEX-3C links ubiquitination with MHC-I mRNA degradation. In: *The EMBO journal* 31 (17), S. 3596–3606. DOI: 10.1038/emboj.2012.218.
- Cano, Florencia; Rapiteanu, Radu; Sebastiaan Winkler, G.; Lehner, Paul J. (2015): A non-proteolytic role for ubiquitin in deadenylation of MHC-I mRNA by the RNA-binding E3-ligase MEX-3C. In: *Nature communications* 6, S. 8670. DOI: 10.1038/ncomms9670.
- Chau, Johnnie; Kulnane, Laura Shapiro; Salz, Helen K. (2009): Sex-lethal facilitates the transition from germline stem cell to committed daughter cell in the Drosophila ovary. In: *Genetics* 182 (1), S. 121–132. DOI: 10.1534/genetics.109.100693.
- Chau, Johnnie; Kulnane, Laura Shapiro; Salz, Helen K. (2012): Sex-lethal enables germline stem cell differentiation by down-regulating Nanos protein levels during Drosophila oogenesis. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (24), S. 9465–9470. DOI: 10.1073/pnas.1120473109.
- Chen, Dahua; McKearin, Dennis (2003a): Dpp signaling silences bam transcription directly to establish asymmetric divisions of germline stem cells. In: *Current biology : CB* 13 (20), S. 1786–1791. DOI: 10.1016/j.cub.2003.09.033.
- Chen, Dahua; McKearin, Dennis M. (2003b): A discrete transcriptional silencer in the bam gene determines asymmetric division of the Drosophila germline stem cell. In: *Development (Cambridge, England)* 130 (6), S. 1159–1170. DOI: 10.1242/dev.00325.
- Chen, Di; Wu, Chan; Zhao, Shaowei; Geng, Qing; Gao, Yu; Li, Xin et al. (2014): Three RNA binding proteins form a complex to promote differentiation of germline stem cell lineage in Drosophila. In: *PLoS genetics* 10 (11), e1004797. DOI: 10.1371/journal.pgen.1004797.
- Chen, Dongsheng; Wang, Qi; Huang, Haidong; Xia, Laixin; Jiang, Xiaoyong; Kan, Lijuan et al. (2009): E2f-mediated degradation of Cyclin A is essential for the maintenance of germline stem cells in Drosophila. In: *Development (Cambridge, England)* 136 (24), S. 4133–4142. DOI: 10.1242/dev.039032.
- Cline, T. W. (1978): Two closely linked mutations in Drosophila melanogaster that are lethal to opposite sexes and interact with daughterless. In: *Genetics* 90 (4), S. 683–698.
- Crucs, S.; Chatterjee, S.; Gavis, E. R. (2000): Overlapping but distinct RNA elements control repression and activation of nanos translation. In: *Molecular cell* 5 (3), S. 457–467. DOI: 10.1016/s1097-2765(00)80440-2.
- Cuevas, M. de; Lilly, M. A.; Spradling, A. C. (1997): Germline cyst formation in Drosophila. In: *Annual review of genetics* 31, S. 405–428. DOI: 10.1146/annurev.genet.31.1.405.
- Curtis, D.; Apfeld, J.; Lehmann, R. (1995): nanos is an evolutionarily conserved organizer of anterior-posterior polarity. In: *Development (Cambridge, England)* 121 (6), S. 1899–1910.
- Curtis, D.; Treiber, D. K.; Tao, F.; Zamore, P. D.; Williamson, J. R.; Lehmann, R. (1997): A CCHC metal-binding domain in Nanos is essential for translational regulation. In: *The EMBO journal* 16 (4), S. 834–843. DOI: 10.1093/emboj/16.4.834.

7. Literaturverzeichnis

Dahanukar, A.; Walker, J. A.; Wharton, R. P. (1999): Smaug, a novel RNA-binding protein that operates a translational switch in *Drosophila*. In: *Molecular cell* 4 (2), S. 209–218. DOI: 10.1016/s1097-2765(00)80368-8.

Decotto, Eva; Spradling, Allan C. (2005): The *Drosophila* ovarian and testis stem cell niches: similar somatic stem cells and signals. In: *Developmental cell* 9 (4), S. 501–510. DOI: 10.1016/j.devcel.2005.08.012.

Deshpande, Girish; Calhoun, Gretchen; Yanowitz, Judith L.; Schedl, Paul D. (1999): Novel Functions of nanos in Downregulating Mitosis and Transcription during the Development of the *Drosophila* Germline. In: *Cell* 99 (3), S. 271–281. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)81658-X.

Duncan, Kent; Grskovic, Marica; Strein, Claudia; Beckmann, Karsten; Niggeweg, Ricarda; Abaza, Irina et al. (2006): Sex-lethal imparts a sex-specific function to UNR by recruiting it to the msl-2 mRNA 3' UTR: translational repression for dosage compensation. In: *Genes & development* 20 (3), S. 368–379. DOI: 10.1101/gad.371406.

Duncan, Kent E.; Strein, Claudia; Hentze, Matthias W. (2009): The SXL-UNR corepressor complex uses a PABP-mediated mechanism to inhibit ribosome recruitment to msl-2 mRNA. In: *Molecular cell* 36 (4), S. 571–582. DOI: 10.1016/j.molcel.2009.09.042.

Ferreira, Ana; Boulan, Laura; Perez, Lidia; Milán, Marco (2014): Mei-P26 mediates tissue-specific responses to the Brat tumor suppressor and the dMyc proto-oncogene in *Drosophila*. In: *Genetics* 198 (1), S. 249–258. DOI: 10.1534/genetics.114.167502.

Forbes, A.; Lehmann, R. (1998): Nanos and Pumilio have critical roles in the development and function of *Drosophila* germline stem cells. In: *Development (Cambridge, England)* 125 (4), S. 679–690.

Forrest, Kevin M.; Clark, Ira E.; Jain, Roshan A.; Gavis, Elizabeth R. (2004): Temporal complexity within a translational control element in the nanos mRNA. In: *Development (Cambridge, England)* 131 (23), S. 5849–5857. DOI: 10.1242/dev.01460.

Fu, Ziwen; Geng, Cuiyun; Wang, Hui; Yang, Zhihao; Weng, Changjiang; Li, Hua et al. (2015): Twin Promotes the Maintenance and Differentiation of Germline Stem Cell Lineage through Modulation of Multiple Pathways. In: *Cell reports* 13 (7), S. 1366–1379. DOI: 10.1016/j.celrep.2015.10.017.

Gateff, E. (1982): Gonial cell neoplasm of genetic origin affecting both sexes of *drosophila melanogaster*. In: *Progress in clinical and biological research* 85 Pt B, S. 621–632.

Gateff, E.; Kurzik-Dumke, U.; Wismar, J.; Löffler, T.; Habtemichael, N.; Konrad, L. et al. (1996): *Drosophila* differentiation genes instrumental in tumor suppression. In: *The International journal of developmental biology* 40 (1), S. 149–156.

Gebauer, F.; Corona, D. F.; Preiss, T.; Becker, P. B.; Hentze, M. W. (1999): Translational control of dosage compensation in *Drosophila* by Sex-lethal: cooperative silencing via the 5' and 3' UTRs of msl-2 mRNA is independent of the poly(A) tail. In: *The EMBO journal* 18 (21), S. 6146–6154. DOI: 10.1093/emboj/18.21.6146.

Gebauer, F.; Merendino, L.; Hentze, M. W.; Valcárcel, J. (1998): The *Drosophila* splicing regulator sex-lethal directly inhibits translation of male-specific-lethal 2 mRNA. In: *RNA* 4 (2), S. 142–150.

- Gilboa, Lilach; Lehmann, Ruth (2004): Repression of primordial germ cell differentiation parallels germ line stem cell maintenance. In: *Current biology : CB* 14 (11), S. 981–986. DOI: 10.1016/j.cub.2004.05.049.
- Glasscock, Edward; Singhanian, Ayush; Tanouye, Mark A. (2005): The mei-P26 gene encodes a RING finger B-box coiled-coil-NHL protein that regulates seizure susceptibility in *Drosophila*. In: *Genetics* 170 (4), S. 1677–1689. DOI: 10.1534/genetics.105.043174.
- Godt, D.; Laski, F. A. (1995): Mechanisms of cell rearrangement and cell recruitment in *Drosophila* ovary morphogenesis and the requirement of bric à brac. In: *Development (Cambridge, England)* 121 (1), S. 173–187.
- Gönczy, P.; Matunis, E.; DiNardo, S. (1997): bag-of-marbles and benign gonial cell neoplasm act in the germline to restrict proliferation during *Drosophila* spermatogenesis. In: *Development (Cambridge, England)* 124 (21), S. 4361–4371.
- Götze, Michael; Dufourt, Jérémy; Ihling, Christian; Rammelt, Christiane; Pierson, Stephanie; Sambrani, Nagraj et al. (2017): Translational repression of the *Drosophila* nanos mRNA involves the RNA helicase Belle and RNA coating by Me31B and Trailer hitch. In: *RNA* 23 (10), S. 1552–1568. DOI: 10.1261/rna.062208.117.
- Graindorge, Antoine; Carré, Clément; Gebauer, Fátima (2013): Sex-lethal promotes nuclear retention of msl2 mRNA via interactions with the STAR protein HOW. In: *Genes & development* 27 (12), S. 1421–1433. DOI: 10.1101/gad.214999.113.
- Grskovic, Marica; Hentze, Matthias W.; Gebauer, Fátima (2003): A co-repressor assembly nucleated by Sex-lethal in the 3'UTR mediates translational control of *Drosophila* msl-2 mRNA. In: *The EMBO journal* 22 (20), S. 5571–5581. DOI: 10.1093/emboj/cdg539.
- Gutzeit, Herwig O.; Strauß, Arthur (1989): Follicle cell development is partly independent of germ-line cell differentiation in *Drosophila* oogenesis. In: *Roux's archives of developmental biology : the official organ of the EDBO* 198 (4), S. 185–190. DOI: 10.1007/BF00375904.
- Hatakeyama, Shigetsugu (2011): TRIM proteins and cancer. In: *Nature reviews. Cancer* 11 (11), S. 792–804. DOI: 10.1038/nrc3139.
- Hatakeyama, Shigetsugu (2017): TRIM Family Proteins: Roles in Autophagy, Immunity, and Carcinogenesis. In: *Trends in biochemical sciences* 42 (4), S. 297–311. DOI: 10.1016/j.tibs.2017.01.002.
- Horabin, J. I.; Schedl, P. (1993a): Regulated splicing of the *Drosophila* sex-lethal male exon involves a blockage mechanism. In: *Molecular and cellular biology* 13 (3), S. 1408–1414. DOI: 10.1128/mcb.13.3.1408.
- Horabin, J. I.; Schedl, P. (1993b): Sex-lethal autoregulation requires multiple cis-acting elements upstream and downstream of the male exon and appears to depend largely on controlling the use of the male exon 5' splice site. In: *Molecular and cellular biology* 13 (12), S. 7734–7746. DOI: 10.1128/mcb.13.12.7734.
- Hsu, Phillip J.; Zhu, Yunfei; Ma, Honghui; Guo, Yueshuai; Shi, Xiaodan; Liu, Yuanyuan et al. (2017): Ythdc2 is an N6-methyladenosine binding protein that regulates mammalian spermatogenesis. In: *Cell research* 27 (9), S. 1115–1127. DOI: 10.1038/cr.2017.99.
- Hülkamp, M.; Schröder, C.; Pfeifle, C.; Jäckle, H.; Tautz, D. (1989): Posterior segmentation of the *Drosophila* embryo in the absence of a maternal posterior organizer gene. In: *Nature* 338 (6217), S. 629–632. DOI: 10.1038/338629a0.

7. Literaturverzeichnis

- Insko, Megan L.; Bailey, Alexis S.; Kim, Jongmin; Olivares, Gonzalo H.; Wapinski, Orly L.; Tam, Cheuk Ho; Fuller, Margaret T. (2012): A self-limiting switch based on translational control regulates the transition from proliferation to differentiation in an adult stem cell lineage. In: *Cell stem cell* 11 (5), S. 689–700. DOI: 10.1016/j.stem.2012.08.012.
- Irish, V.; Lehmann, R.; Akam, M. (1989): The *Drosophila* posterior-group gene *nanos* functions by repressing hunchback activity. In: *Nature* 338 (6217), S. 646–648. DOI: 10.1038/338646a0.
- Jain, Devanshi; Puno, M. Rhyan; Meydan, Cem; Lailier, Nathalie; Mason, Christopher E.; Lima, Christopher D. et al. (2018): *ketu* mutant mice uncover an essential meiotic function for the ancient RNA helicase YTHDC2. In: *eLife* 7. DOI: 10.7554/eLife.30919.
- Jambor, Helena; Mejstrik, Pavel; Tomancak, Pavel (2016): Rapid Ovary Mass-Isolation (ROMi) to Obtain Large Quantities of *Drosophila* Egg Chambers for Fluorescent In Situ Hybridization. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 1478, S. 253–262. DOI: 10.1007/978-1-4939-6371-3_15.
- Jankovics, Ferenc; Henn, László; Bujna, Ágnes; Vilmos, Péter; Spirohn, Kerstin; Boutros, Michael; Erdélyi, Miklós (2014): Functional analysis of the *Drosophila* embryonic germ cell transcriptome by RNA interference. In: *PloS one* 9 (6), e98579. DOI: 10.1371/journal.pone.0098579.
- Jeske, Mandy; Meyer, Sylke; Temme, Claudia; Freudenreich, Dorian; Wahle, Elmar (2006): Rapid ATP-dependent deadenylation of *nanos* mRNA in a cell-free system from *Drosophila* embryos. In: *The Journal of biological chemistry* 281 (35), S. 25124–25133. DOI: 10.1074/jbc.M604802200.
- Jeske, Mandy; Moritz, Bodo; Anders, Alexander; Wahle, Elmar (2011): Smaug assembles an ATP-dependent stable complex repressing *nanos* mRNA translation at multiple levels. In: *The EMBO journal* 30 (1), S. 90–103. DOI: 10.1038/emboj.2010.283.
- Ji, Shanming; Li, Chaoyi; Hu, Lin; Liu, Kehui; Mei, Jie; Luo, Yuewan et al. (2017): Bam-dependent deubiquitinase complex can disrupt germ-line stem cell maintenance by targeting cyclin A. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114 (24), S. 6316–6321. DOI: 10.1073/pnas.1619188114.
- Jin, Zhigang; Kirilly, Daniel; Weng, Changjiang; Kawase, Eihachiro; Song, Xiaoqing; Smith, Sarah et al. (2008): Differentiation-defective stem cells outcompete normal stem cells for niche occupancy in the *Drosophila* ovary. In: *Cell stem cell* 2 (1), S. 39–49. DOI: 10.1016/j.stem.2007.10.021.
- Joly, Willy; Chartier, Aymeric; Rojas-Rios, Patricia; Busseau, Isabelle; Simonelig, Martine (2013): The CCR4 deadenylase acts with *Nanos* and *Pumilio* in the fine-tuning of *Mei-P26* expression to promote germline stem cell self-renewal. In: *Stem cell reports* 1 (5), S. 411–424. DOI: 10.1016/j.stemcr.2013.09.007.
- Kadyrova, Lyudmila Y.; Habara, Yasuaki; Lee, Tammy H.; Wharton, Robin P. (2007): Translational control of maternal *Cyclin B* mRNA by *Nanos* in the *Drosophila* germline. In: *Development (Cambridge, England)* 134 (8), S. 1519–1527. DOI: 10.1242/dev.002212.
- Kalifa, Yossi; Armenti, Stephen T.; Gavis, Elizabeth R. (2009): Glorund interactions in the regulation of *gurken* and *oskar* mRNAs. In: *Developmental biology* 326 (1), S. 68–74. DOI: 10.1016/j.ydbio.2008.10.032.

- Kalifa, Yossi; Huang, Tao; Rosen, Lynne N.; Chatterjee, Seema; Gavis, Elizabeth R. (2006): Glorund, a Drosophila hnRNP F/H homolog, is an ovarian repressor of nanos translation. In: *Developmental cell* 10 (3), S. 291–301. DOI: 10.1016/j.devcel.2006.01.001.
- Kawaguchi, Shinichi; Ueki, Mizuki; Kai, Toshie (2020): Drosophila MARF1 ensures proper oocyte maturation by regulating nanos expression. In: *PloS one* 15 (4), e0231114. DOI: 10.1371/journal.pone.0231114.
- Kawase, Eihachiro; Wong, Marco D.; Ding, Bee C.; Xie, Ting (2004): Gbb/Bmp signaling is essential for maintaining germline stem cells and for repressing bam transcription in the Drosophila testis. In: *Development (Cambridge, England)* 131 (6), S. 1365–1375. DOI: 10.1242/dev.01025.
- Kelley, Richard L.; Solovyeva, Irina; Lyman, Laura M.; Richman, Ron; Solovyev, Victor; Kuroda, Mitzi I. (1995): Expression of Msl-2 causes assembly of dosage compensation regulators on the X chromosomes and female lethality in Drosophila. In: *Cell* 81 (6), S. 867–877. DOI: 10.1016/0092-8674(95)90007-1.
- Kelley, Richard L.; Wang, Jiwu; Bell, Leslie; Kuroda, Mitzi I. (1997): Sex lethal controls dosage compensation in Drosophila by a non-splicing mechanism. In: *Nature* 387 (6629), S. 195–199. DOI: 10.1038/387195a0.
- Kim, Ji Young; Lee, Young Chul; Kim, Changsoo (2010): Direct inhibition of Pumilo activity by Bam and Bgcn in Drosophila germ line stem cell differentiation. In: *The Journal of biological chemistry* 285 (7), S. 4741–4746. DOI: 10.1074/jbc.M109.002014.
- Kirilly, Dániel; Xie, Ting (2007): The Drosophila ovary: an active stem cell community. In: *Cell research* 17 (1), S. 15–25. DOI: 10.1038/sj.cr.7310123.
- Kobayashi, S.; Yamada, M.; Asaoka, M.; Kitamura, T. (1996): Essential role of the posterior morphogen nanos for germline development in Drosophila. In: *Nature* 380 (6576), S. 708–711. DOI: 10.1038/380708a0.
- Kobayashi, Satoru; Sato, Kimihiro; Hayashi, Yoshiki (2005): The role of mitochondrial rRNAs and nanos protein in germline formation in Drosophila embryos. In: *Zoological science* 22 (9), S. 943–954. DOI: 10.2108/zsj.22.943.
- Koliopoulos, Marios G.; Esposito, Diego; Christodoulou, Evangelos; Taylor, Ian A.; Rittinger, Katrin (2016): Functional role of TRIM E3 ligase oligomerization and regulation of catalytic activity. In: *The EMBO journal* 35 (11), S. 1204–1218. DOI: 10.15252/embj.201593741.
- König, Julian; Zarnack, Kathi; Rot, Gregor; Curk, Tomaz; Kayikci, Melis; Zupan, Blaz et al. (2010): iCLIP reveals the function of hnRNP particles in splicing at individual nucleotide resolution. In: *Nature structural & molecular biology* 17 (7), S. 909–915. DOI: 10.1038/nsmb.1838.
- Kretschmer, Jens; Rao, Harita; Hackert, Philipp; Sloan, Katherine E.; Höbartner, Claudia; Bohnsack, Markus T. (2018): The m6A reader protein YTHDC2 interacts with the small ribosomal subunit and the 5'-3' exoribonuclease XRN1. In: *RNA* 24 (10), S. 1339–1350. DOI: 10.1261/rna.064238.117.
- Kumari, Pooja; Aeschmann, Florian; Gaidatzis, Dimos; Keusch, Jeremy J.; Ghosh, Pritha; Neagu, Anca et al. (2018): Evolutionary plasticity of the NHL domain underlies distinct solutions to RNA recognition. In: *Nature communications* 9 (1), S. 1549. DOI: 10.1038/s41467-018-03920-7.

7. Literaturverzeichnis

- Lareau, Liana F.; Inada, Maki; Green, Richard E.; Wengrod, Jordan C.; Brenner, Steven E. (2007): Unproductive splicing of SR genes associated with highly conserved and ultraconserved DNA elements. In: *Nature* 446 (7138), S. 926–929. DOI: 10.1038/nature05676.
- Lavoie, C. A.; Ohlstein, B.; McKearin, D. M. (1999): Localization and function of Bam protein require the benign gonial cell neoplasm gene product. In: *Developmental biology* 212 (2), S. 405–413. DOI: 10.1006/dbio.1999.9346.
- Lehmann, R.; Nüsslein-Volhard, C. (1991): The maternal gene nanos has a central role in posterior pattern formation of the Drosophila embryo. In: *Development (Cambridge, England)* 112 (3), S. 679–691.
- León, A.; McKearin, D. (1999): Identification of TER94, an AAA ATPase protein, as a Bam-dependent component of the Drosophila fusome. In: *Molecular biology of the cell* 10 (11), S. 3825–3834. DOI: 10.1091/mbc.10.11.3825.
- Li, Yun; Maines, Jean Z.; Tastan, Omür Y.; McKearin, Dennis M.; Buszczak, Michael (2012): Mei-P26 regulates the maintenance of ovarian germline stem cells by promoting BMP signaling. In: *Development (Cambridge, England)* 139 (9), S. 1547–1556. DOI: 10.1242/dev.077412.
- Li, Yun; Minor, Nicole T.; Park, Joseph K.; McKearin, Dennis M.; Maines, Jean Z. (2009): Bam and Bgcn antagonize Nanos-dependent germ-line stem cell maintenance. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (23), S. 9304–9309. DOI: 10.1073/pnas.0901452106.
- Li, Yun; Zhang, Qiao; Carreira-Rosario, Arnaldo; Maines, Jean Z.; McKearin, Dennis M.; Buszczak, Michael (2013): Mei-p26 cooperates with Bam, Bgcn and Sxl to promote early germline development in the Drosophila ovary. In: *PloS one* 8 (3), e58301. DOI: 10.1371/journal.pone.0058301.
- Lin, H.; Yue, L.; Spradling, A. C. (1994): The Drosophila fusome, a germline-specific organelle, contains membrane skeletal proteins and functions in cyst formation. In: *Development (Cambridge, England)* 120 (4), S. 947–956.
- Loedige, Inga; Gaidatzis, Dimos; Sack, Ragna; Meister, Gunter; Filipowicz, Witold (2013): The mammalian TRIM-NHL protein TRIM71/LIN-41 is a repressor of mRNA function. In: *Nucleic acids research* 41 (1), S. 518–532. DOI: 10.1093/nar/gks1032.
- Loedige, Inga; Jakob, Leonhard; Treiber, Thomas; Ray, Debashish; Stotz, Mathias; Treiber, Nora et al. (2015): The Crystal Structure of the NHL Domain in Complex with RNA Reveals the Molecular Basis of Drosophila Brain-Tumor-Mediated Gene Regulation. In: *Cell reports* 13 (6), S. 1206–1220. DOI: 10.1016/j.celrep.2015.09.068.
- Loedige, Inga; Stotz, Mathias; Qamar, Saadia; Kramer, Katharina; Hennig, Janosch; Schubert, Thomas et al. (2014): The NHL domain of BRAT is an RNA-binding domain that directly contacts the hunchback mRNA for regulation. In: *Genes & development* 28 (7), S. 749–764. DOI: 10.1101/gad.236513.113.
- Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J. (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent. In: *The Journal of biological chemistry* 193 (1), S. 265–275.
- Mahowald, A. P.; Wei, G. (1994): Sex determination of germ cells in Drosophila. In: *Ciba Foundation symposium* 182, 193-202; discussion 202-9. DOI: 10.1002/9780470514573.ch11.

- Malik, Sumira; Jang, Wijeong; Kim, Changsoo (2017): Protein Interaction Mapping of Translational Regulators Affecting Expression of the Critical Stem Cell Factor Nos. In: *Development & reproduction* 21 (4), S. 449–456. DOI: 10.12717/DR.2017.21.4.449.
- Malik, Sumira; Jang, Wijeong; Kim, Ji Young; Kim, Changsoo (2020): Mechanisms ensuring robust repression of the *Drosophila* female germline stem cell maintenance factor Nanos via posttranscriptional regulation. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 34 (9), S. 11421–11430. DOI: 10.1096/fj.202000656R.
- Margolis, J.; Spradling, A. (1995): Identification and behavior of epithelial stem cells in the *Drosophila* ovary. In: *Development (Cambridge, England)* 121 (11), S. 3797–3807.
- McCarthy, Alicia; Deilulo, Aron; Martin, Elliot Todd; Upadhyay, Maitreyi; Rangan, Prashanth (2018): Tip60 complex promotes expression of a differentiation factor to regulate germline differentiation in female *Drosophila*. In: *Molecular biology of the cell* 29 (24), S. 2933–2945. DOI: 10.1091/mbc.E18-06-0385.
- McKearin, D.; Ohlstein, B. (1995): A role for the *Drosophila* bag-of-marbles protein in the differentiation of cystoblasts from germline stem cells. In: *Development (Cambridge, England)* 121 (9), S. 2937–2947.
- McKearin, D. M.; Spradling, A. C. (1990): bag-of-marbles: a *Drosophila* gene required to initiate both male and female gametogenesis. In: *Genes & development* 4 (12B), S. 2242–2251. DOI: 10.1101/gad.4.12b.2242.
- McLaughlin, John M.; Bratu, Diana P. (2015): *Drosophila melanogaster* Oogenesis: An Overview. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 1328, S. 1–20. DOI: 10.1007/978-1-4939-2851-4_1.
- Medenbach, Jan; Seiler, Markus; Hentze, Matthias W. (2011): Translational control via protein-regulated upstream open reading frames. In: *Cell* 145 (6), S. 902–913. DOI: 10.1016/j.cell.2011.05.005.
- Menon, Kaushiki P.; Andrews, Shane; Murthy, Mala; Gavis, Elizabeth R.; Zinn, Kai (2009): The translational repressors Nanos and Pumilio have divergent effects on presynaptic terminal growth and postsynaptic glutamate receptor subunit composition. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29 (17), S. 5558–5572. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0520-09.2009.
- Morris, Jason Z.; Hong, Amy; Lilly, Mary A.; Lehmann, Ruth (2005): twin, a CCR4 homolog, regulates cyclin poly(A) tail length to permit *Drosophila* oogenesis. In: *Development (Cambridge, England)* 132 (6), S. 1165–1174. DOI: 10.1242/dev.01672.
- Mosavi, Leila K.; Cammett, Tobin J.; Desrosiers, Daniel C.; Peng, Zheng-Yu (2004): The ankyrin repeat as molecular architecture for protein recognition. In: *Protein science : a publication of the Protein Society* 13 (6), S. 1435–1448. DOI: 10.1110/ps.03554604.
- Moschall, Rebecca; Rass, Mathias; Rossbach, Oliver; Lehmann, Gerhard; Kullmann, Lars; Eichner, Norbert et al. (2019): *Drosophila* Sister-of-Sex-lethal reinforces a male-specific gene expression pattern by controlling Sex-lethal alternative splicing. In: *Nucleic acids research* 47 (5), S. 2276–2288. DOI: 10.1093/nar/gky1284.
- Mukai, Masanori; Kitadate, Yu; Arita, Kayo; Shigenobu, Shuji; Kobayashi, Satoru (2006): Expression of meiotic genes in the germline progenitors of *Drosophila* embryos. In: *Gene expression patterns : GEP* 6 (3), S. 256–266. DOI: 10.1016/j.modgep.2005.08.002.

7. Literaturverzeichnis

- Murata, Yoshihiko; Wharton, Robin P. (1995): Binding of pumilio to maternal hunchback mRNA is required for posterior patterning in drosophila embryos. In: *Cell* 80 (5), S. 747–756. DOI: 10.1016/0092-8674(95)90353-4.
- Nelson, Meryl R.; Leidal, Andrew M.; Smibert, Craig A. (2004): Drosophila Cup is an eIF4E-binding protein that functions in Smaug-mediated translational repression. In: *The EMBO journal* 23 (1), S. 150–159. DOI: 10.1038/sj.emboj.7600026.
- Neumüller, Ralph A.; Betschinger, Joerg; Fischer, Anja; Bushati, Natascha; Poernbacher, Ingrid; Mechtler, Karl et al. (2008): Mei-P26 regulates microRNAs and cell growth in the Drosophila ovarian stem cell lineage. In: *Nature* 454 (7201), S. 241–245. DOI: 10.1038/nature07014.
- Ni, Julie Z.; Grate, Leslie; Donohue, John Paul; Preston, Christine; Nobida, Naomi; O'Brien, Georgeann et al. (2007): Ultraconserved elements are associated with homeostatic control of splicing regulators by alternative splicing and nonsense-mediated decay. In: *Genes & development* 21 (6), S. 708–718. DOI: 10.1101/gad.1525507.
- Nüsslein-Volhard, C.; Frohnhöfer, H. G.; Lehmann, R. (1987): Determination of anteroposterior polarity in Drosophila. In: *Science (New York, N.Y.)* 238 (4834), S. 1675–1681. DOI: 10.1126/science.3686007.
- Ohlstein, B.; Lavoie, C. A.; Vef, O.; Gateff, E.; McKearin, D. M. (2000): The Drosophila cystoblast differentiation factor, benign gonial cell neoplasm, is related to DExH-box proteins and interacts genetically with bag-of-marbles. In: *Genetics* 155 (4), S. 1809–1819.
- Ohlstein, B.; McKearin, D. (1997): Ectopic expression of the Drosophila Bam protein eliminates oogenic germline stem cells. In: *Development (Cambridge, England)* 124 (18), S. 3651–3662.
- Page, S. L.; McKim, K. S.; Deneen, B.; van Hook, T. L.; Hawley, R. S. (2000): Genetic studies of mei-P26 reveal a link between the processes that control germ cell proliferation in both sexes and those that control meiotic exchange in Drosophila. In: *Genetics* 155 (4), S. 1757–1772.
- Pan, Lei; Wang, Su; Lu, Tinglin; Weng, Changjiang; Song, Xiaoqing; Park, Joseph K. et al. (2014): Protein competition switches the function of COP9 from self-renewal to differentiation. In: *Nature* 514 (7521), S. 233–236. DOI: 10.1038/nature13562.
- Pinder, Benjamin D.; Smibert, Craig A. (2013): microRNA-independent recruitment of Argonaute 1 to nanos mRNA through the Smaug RNA-binding protein. In: *EMBO reports* 14 (1), S. 80–86. DOI: 10.1038/embor.2012.192.
- Raisch, Tobias; Bhandari, Dipankar; Sabath, Kevin; Helms, Sigrun; Valkov, Eugene; Weichenrieder, Oliver; Izaurralde, Elisa (2016): Distinct modes of recruitment of the CCR4-NOT complex by Drosophila and vertebrate Nanos. In: *The EMBO journal* 35 (9), S. 974–990. DOI: 10.15252/embj.201593634.
- Rastegari, Elham; Kajal, Kreeti; Tan, Boon-Shing; Huang, Fu; Chen, Ruey-Hwa; Hsieh, Tao-Shieh; Hsu, Hwei-Jan (2020): WD40 protein Wuho controls germline homeostasis via TRIM-NHL tumor suppressor Mei-p26 in Drosophila. In: *Development (Cambridge, England)* 147 (2). DOI: 10.1242/dev.182063.
- Reddy, Bramham A.; Etkin, Laurence D.; Freemont, Paul S. (1992): A novel zinc finger coiled-coil domain in a family of nuclear proteins. In: *Trends in biochemical sciences* 17 (9), S. 344–345. DOI: 10.1016/0968-0004(92)90308-V.

- Reymond, A.; Meroni, G.; Fantozzi, A.; Merla, G.; Cairo, S.; Luzi, L. et al. (2001): The tripartite motif family identifies cell compartments. In: *The EMBO journal* 20 (9), S. 2140–2151. DOI: 10.1093/emboj/20.9.2140.
- Rogers, S.; Wells, R.; Rechsteiner, M. (1986): Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. In: *Science (New York, N.Y.)* 234 (4774), S. 364–368. DOI: 10.1126/science.2876518.
- Salz, Helen K. (2013): Sex, stem cells and tumors in the Drosophila ovary. In: *Fly* 7 (1), S. 3–7. DOI: 10.4161/fly.22687.
- Salz, Helen K.; Erickson, James W. (2010): Sex determination in Drosophila: The view from the top. In: *Fly* 4 (1), S. 60–70. DOI: 10.4161/fly.4.1.11277.
- Sato, Kimihiro; Hayashi, Yoshiki; Ninomiya, Yuichi; Shigenobu, Shuji; Arita, Kayo; Mukai, Masanori; Kobayashi, Satoru (2007): Maternal Nanos represses hid/skl-dependent apoptosis to maintain the germ line in Drosophila embryos. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (18), S. 7455–7460. DOI: 10.1073/pnas.0610052104.
- Schulz, Cordula; Kiger, Amy A.; Tazuke, Salli I.; Yamashita, Yukiko M.; Pantalena-Filho, Luiz C.; Jones, D. Leanne et al. (2004): A misexpression screen reveals effects of bag-of-marbles and TGF beta class signaling on the Drosophila male germ-line stem cell lineage. In: *Genetics* 167 (2), S. 707–723. DOI: 10.1534/genetics.103.023184.
- Sedgwick, Steven G.; Smerdon, Stephen J. (1999): The ankyrin repeat: a diversity of interactions on a common structural framework. In: *Trends in biochemical sciences* 24 (8), S. 311–316. DOI: 10.1016/S0968-0004(99)01426-7.
- Sekelsky, J. J.; McKim, K. S.; Messina, L.; French, R. L.; Hurley, W. D.; Arbel, T. et al. (1999): Identification of novel Drosophila meiotic genes recovered in a P-element screen. In: *Genetics* 152 (2), S. 529–542.
- Semotok, Jennifer L.; Cooperstock, Ramona L.; Pinder, Benjamin D.; Vari, Heli K.; Lipshitz, Howard D.; Smibert, Craig A. (2005): Smaug recruits the CCR4/POP2/NOT deadenylase complex to trigger maternal transcript localization in the early Drosophila embryo. In: *Current biology : CB* 15 (4), S. 284–294. DOI: 10.1016/j.cub.2005.01.048.
- Sgromo, Annamaria; Raisch, Tobias; Backhaus, Charlotte; Keskeny, Csilla; Alva, Vikram; Weichenrieder, Oliver; Izaurralde, Elisa (2018): Drosophila Bag-of-marbles directly interacts with the CAF40 subunit of the CCR4-NOT complex to elicit repression of mRNA targets. In: *RNA (New York, N.Y.)* 24 (3), S. 381–395. DOI: 10.1261/rna.064584.117.
- Shen, Run; Weng, Changjiang; Yu, Junjing; Xie, Ting (2009): eIF4A controls germline stem cell self-renewal by directly inhibiting BAM function in the Drosophila ovary. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (28), S. 11623–11628. DOI: 10.1073/pnas.0903325106.
- Slack, Frank J.; Ruvkun, Gary (1998): A novel repeat domain that is often associated with RING finger and B-box motifs. In: *Trends in biochemical sciences* 23 (12), S. 474–475. DOI: 10.1016/s0968-0004(98)01299-7.
- Slaidina, Maija; Lehmann, Ruth (2014): Translational control in germline stem cell development. In: *The Journal of Cell Biology* 207 (1), S. 13–21. DOI: 10.1083/jcb.201407102.

7. Literaturverzeichnis

- Smibert, C. A.; Lie, Y. S.; Shillinglaw, W.; Henzel, W. J.; Macdonald, P. M. (1999): Smaug, a novel and conserved protein, contributes to repression of nanos mRNA translation in vitro. In: *RNA* 5 (12), S. 1535–1547. DOI: 10.1017/s1355838299991392.
- Smibert, C. A.; Wilson, J. E.; Kerr, K.; Macdonald, P. M. (1996): smaug protein represses translation of unlocalized nanos mRNA in the Drosophila embryo. In: *Genes & development* 10 (20), S. 2600–2609. DOI: 10.1101/gad.10.20.2600.
- Snapp, Erik L.; Iida, Takako; Frescas, David; Lippincott-Schwartz, Jennifer; Lilly, Mary A. (2004): The fusome mediates intercellular endoplasmic reticulum connectivity in Drosophila ovarian cysts. In: *Molecular biology of the cell* 15 (10), S. 4512–4521. DOI: 10.1091/mbc.e04-06-0475.
- Song, Xiaoqing; Wong, Marco D.; Kawase, Eiichiro; Xi, Rongwen; Ding, Bee C.; McCarthy, John J.; Xie, Ting (2004): Bmp signals from niche cells directly repress transcription of a differentiation-promoting gene, bag of marbles, in germline stem cells in the Drosophila ovary. In: *Development (Cambridge, England)* 131 (6), S. 1353–1364. DOI: 10.1242/dev.01026.
- Song, Xiaoqing; Zhu, Chun-Hong; Doan, Chuong; Xie, Ting (2002): Germline stem cells anchored by adherens junctions in the Drosophila ovary niches. In: *Science (New York, N.Y.)* 296 (5574), S. 1855–1857. DOI: 10.1126/science.1069871.
- Sonoda, J.; Wharton, R. P. (1999): Recruitment of Nanos to hunchback mRNA by Pumilio. In: *Genes & development* 13 (20), S. 2704–2712. DOI: 10.1101/gad.13.20.2704.
- Sonoda, J.; Wharton, R. P. (2001): Drosophila Brain Tumor is a translational repressor. In: *Genes & development* 15 (6), S. 762–773. DOI: 10.1101/gad.870801.
- Stirnemann, Christian U.; Petsalaki, Evangelia; Russell, Robert B.; Müller, Christoph W. (2010): WD40 proteins propel cellular networks. In: *Trends in biochemical sciences* 35 (10), S. 565–574. DOI: 10.1016/j.tibs.2010.04.003.
- Struhl, G. (1989): Differing strategies for organizing anterior and posterior body pattern in Drosophila embryos. In: *Nature* 338 (6218), S. 741–744. DOI: 10.1038/338741a0.
- Sugimori, Seiko; Kumata, Yuji; Kobayashi, Satoru (2018): Maternal Nanos-Dependent RNA Stabilization in the Primordial Germ Cells of Drosophila Embryos. In: *Development, growth & differentiation* 60 (1), S. 63–75. DOI: 10.1111/dgd.12414.
- Szakmary, Akos; Cox, Daniel N.; Wang, Zhong; Lin, Haifan (2005): Regulatory relationship among piwi, pumilio, and bag-of-marbles in Drosophila germline stem cell self-renewal and differentiation. In: *Current biology : CB* 15 (2), S. 171–178. DOI: 10.1016/j.cub.2005.01.005.
- Temme, Claudia; Zhang, Lianbing; Kremmer, Elisabeth; Ihling, Christian; Chartier, Aymeric; Sinz, Andrea et al. (2010): Subunits of the Drosophila CCR4-NOT complex and their roles in mRNA deadenylation. In: *RNA* 16 (7), S. 1356–1370. DOI: 10.1261/rna.2145110.
- Thapa, Pankaj; Shanmugam, Nilesh; Pokrzywa, Wojciech (2020): Ubiquitin Signaling Regulates RNA Biogenesis, Processing, and Metabolism. In: *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 42 (1), e1900171. DOI: 10.1002/bies.201900171.

- Till, D. D.; Linz, B.; Seago, J. E.; Elgar, S. J.; Marujo, P. E.; Elias, M. L. et al. (1998): Identification and developmental expression of a 5'-3' exoribonuclease from *Drosophila melanogaster*. In: *Mechanisms of development* 79 (1-2), S. 51–55. DOI: 10.1016/s0925-4773(98)00173-7.
- Tiwari, Manu D.; Zeitler, Daniela M.; Meister, Gunter; Wodarz, Andreas (2019): Molecular profiling of stem cell-like female germ line cells in *Drosophila* delineates networks important for stemness and differentiation. In: *Biology open* 8 (11). DOI: 10.1242/bio.046789.
- Tocchini, Cristina; Ciosk, Rafal (2015): TRIM-NHL proteins in development and disease. In: *Seminars in cell & developmental biology* 47-48, S. 52–59. DOI: 10.1016/j.semcd.2015.10.017.
- Tokusumi, Tsuyoshi; Tokusumi, Yumiko; Hopkins, Dawn W.; Schulz, Robert A. (2015): Bag of Marbles controls the size and organization of the *Drosophila* hematopoietic niche through interactions with the Insulin-like growth factor pathway and Retinoblastoma-family protein. In: *Development (Cambridge, England)* 142 (13), S. 2261–2267. DOI: 10.1242/dev.121798.
- Tokusumi, Tsuyoshi; Tokusumi, Yumiko; Hopkins, Dawn W.; Shoue, Douglas A.; Corona, Lauren; Schulz, Robert A. (2011): Germ line differentiation factor Bag of Marbles is a regulator of hematopoietic progenitor maintenance during *Drosophila* hematopoiesis. In: *Development (Cambridge, England)* 138 (18), S. 3879–3884. DOI: 10.1242/dev.069336.
- Tokusumi, Tsuyoshi; Tokusumi, Yumiko; Schulz, Robert A. (2018): The mir-7 and bag of marbles genes regulate Hedgehog pathway signaling in blood cell progenitors in *Drosophila* larval lymph glands. In: *Genesis (New York, N.Y. : 2000)* 56 (5), e23210. DOI: 10.1002/dvg.23210.
- Tworzydło, Waclaw; Biliński, Szczepan M.; Kocárek, Petr; Haas, Fabian (2010): Ovaries and germline cysts and their evolution in Dermaptera (Insecta). In: *Arthropod structure & development* 39 (5), S. 360–368. DOI: 10.1016/j.asd.2010.05.004.
- Venables, Julian P.; Tazi, Jamal; Juge, François (2012): Regulated functional alternative splicing in *Drosophila*. In: *Nucleic acids research* 40 (1), S. 1–10. DOI: 10.1093/nar/gkr648.
- Wang, C.; Dickinson, L. K.; Lehmann, R. (1994): Genetics of nanos localization in *Drosophila*. In: *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 199 (2), S. 103–115. DOI: 10.1002/aja.1001990204.
- Wang, Charlotte; Lehmann, Ruth (1991): Nanos is the localized posterior determinant in *Drosophila*. In: *Cell* 66 (4), S. 637–647. DOI: 10.1016/0092-8674(91)90110-K.
- Wang, Xusheng (2019): Stem cells in tissues, organoids, and cancers. In: *Cellular and Molecular Life Sciences* 76 (20), S. 4043–4070. DOI: 10.1007/s00018-019-03199-x.
- Wang, Zhong; Lin, Haifan (2004): Nanos maintains germline stem cell self-renewal by preventing differentiation. In: *Science (New York, N.Y.)* 303 (5666), S. 2016–2019. DOI: 10.1126/science.1093983.
- Weidmann, Chase A.; Qiu, Chen; Arvola, René M.; Lou, Tzu-Fang; Killingsworth, Jordan; Campbell, Zachary T. et al. (2016): *Drosophila* Nanos acts as a molecular clamp that modulates the RNA-binding and repression activities of Pumilio. In: *eLife* 5. DOI: 10.7554/eLife.17096.

7. Literaturverzeichnis

Wharton, Robin P.; Struhl, Gary (1991): RNA regulatory elements mediate control of *Drosophila* body pattern by the posterior morphogen nanos. In: *Cell* 67 (5), S. 955–967. DOI: 10.1016/0092-8674(91)90368-9.

Wieschaus, Eric; Szabad, Janos (1979): The development and function of the female germ line in *Drosophila melanogaster*: A cell lineage study. In: *Developmental biology* 68 (1), S. 29–46. DOI: 10.1016/0012-1606(79)90241-0.

Williams, Felix Preston; Haubrich, Kevin; Perez-Borrajero, Cecilia; Hennig, Janosch (2019): Emerging RNA-binding roles in the TRIM family of ubiquitin ligases. In: *Biological chemistry* 400 (11), S. 1443–1464. DOI: 10.1515/hsz-2019-0158.

Wreden, C.; Verrotti, A. C.; Schisa, J. A.; Lieberfarb, M. E.; Strickland, S. (1997): Nanos and pumilio establish embryonic polarity in *Drosophila* by promoting posterior deadenylation of hunchback mRNA. In: *Development (Cambridge, England)* 124 (15), S. 3015–3023.

Xie, T.; Spradling, A. C. (2000): A niche maintaining germ line stem cells in the *Drosophila* ovary. In: *Science (New York, N.Y.)* 290 (5490), S. 328–330. DOI: 10.1126/science.290.5490.328.

Xie, Ting; Spradling, Allan C. (1998): decapentaplegic Is Essential for the Maintenance and Division of Germline Stem Cells in the *Drosophila* Ovary. In: *Cell* 94 (2), S. 251–260. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)81424-5.

Ye, Bing; Petritsch, Claudia; Clark, Ira E.; Gavis, Elizabeth R.; Jan, Lily Yeh; Jan, Yuh Nung (2004): Nanos and Pumilio are essential for dendrite morphogenesis in *Drosophila* peripheral neurons. In: *Current biology : CB* 14 (4), S. 314–321. DOI: 10.1016/j.cub.2004.01.052.

Zaessinger, Sophie; Busseau, Isabelle; Simonelig, Martine (2006): Oskar allows nanos mRNA translation in *Drosophila* embryos by preventing its deadenylation by Smaug/CCR4. In: *Development (Cambridge, England)* 133 (22), S. 4573–4583. DOI: 10.1242/dev.02649.

8. Abkürzungsverzeichnis

AEBSF	4-(2-Aminoethyl)benzolsulfonylfluorid
Amp	Ampicillin
Ank	Ankyrin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
as	Aminosäure
Bam	Bag of marbles
Bgcn	Benign Gonial Cell Neoplasm
bic	bicaudal
BMP	engl.: Bone Morphogenetic Protein
bp	Basenpaare
Caf40	CCR4 associated factor 40
CCR4-NOT	engl.: Carbon Catabolite Repression-Negative on TATA-less
cDNA	komplementäre DNA
CDS	engl.: coding sequence
chic	chickadee
Col4A1	Kollagen Typ IV alpha 1
cycB	Cyclin B
dATP	Desoxy-Adenosintriphosphat
dCTP	Desoxy-Cytidintriphosphat
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dpp	decapentaplegic
ds	Doppelstrang
dsx ^F	doublesex (weibliche Variante)
DTT	Dithiothreitol

8. Abkürzungsverzeichnis

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eIF4A	eukaryotischer Translations Initiations Faktor 4A
EMSA	Electrophoretic Mobility Shift Assay
ER	endoplasmatischer Retikulum
EtBr	Ethidiumbromid
FLuc	Firefly Luciferase
FSB	First-Strand Buffer
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
Gbb	glass bottom boat
Glo	Glorund
HA	Hämagglutinin
HA2	engl.: Helicase Associated domain 2
hb	hunchback
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)- ethansulfonsäure
Hrb27C	heterogenes nukleäres Ribonukleoprotein bei 27C
Hsp83	Hitzeschockprotein 83
iCLIP	engl.: individual-nucleotide resolution crosslinking- immunoprecipitation
IVT	<i>in vitro</i> Transkription
KD	engl.: knockdown
LanA	Laminin A
LB	engl.: lysogeny broth
m ⁶ A	N ⁶ -Methyladenosin
Mei-P26	Meiotic-P26
(mi)RISC	engl.: (micro)RNA-Induced Silencing Complex

miRNA	mikro Ribonukleinsäure
Mlc-C	engl.: Myosin light chain cytoplasmic
MOPS	3-(<i>N</i> -Morpholino)propansulfonsäure
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
msl-2	male specific lethal 2
MST	engl.: Micro Scale Thermophoresis
NaCl	Natriumchlorid
NED	Nanos Effektor Domäne
NHL	NCL-1, HT2A, LIN-41
nos	Nanos
NRE	engl.: Nanos Recognition Element
nt	Nukleotide
(d)NTP	(Desoxy) Nukleosidtriphosphat
OB	engl.: Oligonucleotide/Oligosaccharide Binding
PBS	engl.: Phosphate Buffered Saline
pCHS	pCasPeR HeatShock (Expressionsplasmid)
pcm	Pacman
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PNK	Polynukleotidkinase
Pum	Pumilio
qPCR	quantitative Echtzeit-PCR
RBP	RNA-Bindeprotein
RING	engl.: Rather Interesting New Gene
RIPA	engl.: radioimmunoprecipitation assay
RLU	Relative Luciferase Einheit (engl.: relative luciferase unit)
RLuc	Renilla Luciferase

8. Abkürzungsverzeichnis

RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
RpS20/23	ribosomales Protein S20/23
RRM	engl.: RNA recognition motif
RT	Reverse Transkription
scaRNA	engl.: small cajal body-specific RNA
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese
<i>S. frugiperda</i>	<i>Spodoptera frugiperda</i>
Smg	Smaug
snRNA	engl.: small nuclear RNA
snoRNA	engl.: small nucleolar RNA
spz	Spätzle
sqd	squid
SRE	engl.: smaug recognition element
ss	Einzelstrang (engl.: single-strand)
SS	SuperScript (Reverse Transkriptase)
SSC	engl.: saline-sodium citrate buffer
sta	stubarista
swip-1	Swiprosin-1
Sxl	Sex lethal
TA	engl.: Transit Amplifying
TB(E)	TRIS/Borat/(EDTA)
TBS(-T)	engl.: TRIS buffered saline (0,1% Tween 20)
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TRIM	engl.: Tripartite motif

TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
Tut	Tumorous testis
U	Uridin
uORF	engl.: upstream open reading frame
UTR	Untranslatierte Region
Wh	Wuho
WT	Wildtyp
YTHDC2	YTH domain-containing protein 2
Y2H	Hefe-Zwei-Hybrid System (engl.: Yeast-2-Hybrid)

9. Publikationen & Konferenzen

Teile dieser Arbeit zum Thema Mei-P26 beziehen sich auf beziehungsweise sind enthalten in folgender, momentan in Revision befindlicher, Publikation:

Salerno-Kochan, A., **Horn, A.**, Ghosh, P., Nithin, C., Kościelniak, A., Strauß, D., Rossbach, O., Bujnicki, J.M., Gaik, M., Medenbach, J., Glatt, S. (2020). Molecular insights into RNA recognition and gene regulation by the TRIM-NHL protein Mei-P26. **(in Revision)**

Weiterhin wurden Teile dieser Arbeit zu den Themen Bam und Bgcn auf folgender Konferenz im Rahmen eines Posters vorgestellt:

SFB960-Symposium 2017, Regensburg, Deutschland

Postertitel: Characterization of the translational *nanos* repression in early fly oogenesis

Autoren: **Andreas Horn**, Daniela Strauß, Monika Gaik, Simona Palusci, Sebastian Glatt, Jan Medenbach

10. Mitwirkung

Die Forschungsarbeit an Mei-P26 wurde in enger Kooperation mit den Laboren von Prof. Dr. Sebastian Glatt (Malopolska Centre of Biotechnology, Jagiellonian University Krakow, Krakau, Polen), Prof. Dr. Janusz M. Bujnicki (Laboratory of Bioinformatics and Protein Engineering, International Institute of Molecular and Cell Biology, Warschau, Polen) und Dr. Oliver Rossbach (Institut für Biochemie, Universität Gießen) durchgeführt.

Im Zuge dieser Kooperation wurden neben der gemeinsamen Planung der Experimente und dem Austausch von Daten, die für die EMSA Experimente verwendeten, rekombinanten Mei-P26 Volllänge und NHL-Domänen Proteine von Anna Salerno-Kochan (Labor S. Glatt) bereitgestellt.

Die Immunopräzipitation und Vorbereitung der iCLIP Proben für die Sequenzierung erfolgte durch Dr. Oliver Rossbach. Die Sequenzierung der iCLIP Proben wurde an der Genomics Core Facility am EMBL Heidelberg durchgeführt.

Die computergestützte Auswertung der iCLIP Daten erfolgte durch Dr. Pritha Ghosh (Labor J. M. Bujnicki), ergänzt durch teils darauf aufbauende, händische Auswertung der resultierenden Daten durch PD Dr. Jan Medenbach (GO-Term Analyse, Identifikation von Bindestellen) und Andreas Horn (Identifikation von Bindestellen, Auswahl von Kandidaten für Validierung).

Die gezeigten Molekulardynamikberechnungen wurden von Dr. Chandran Nithin (Labor J. M. Bujnicki) durchgeführt. Die gezeigten MST-Analysen wurden von Anna Salerno-Kochan (Labor S. Glatt) durchgeführt.

11. Danksagungen

Zunächst möchte ich mich ganz herzlich bei PD Dr. Jan Medenbach bedanken, dass ich nicht nur meine Doktorarbeit in seinem Labor machen durfte, sondern auch dafür, dass er mich über den ganzen Verlauf dieses oft sehr langwierigen und schwierigen Projekts unterstützt und an mich geglaubt hat.

Weiterhin möchte ich mich bei unseren Kollaborationspartnern, Prof. Dr. Sebastian Glatt, Anna Salerno-Kochan, Dr. Monika Gaik, Anna Kościelniak, Prof. Dr. Janusz M. Bujnicki, Dr. Pritha Ghosh, Dr. Chandran Nithin und Dr. Oliver Rossbach für die intensive und erfolgreiche Zusammenarbeit bei der Arbeit an Mei-P26 bedanken.

Außerdem möchte ich mich bei Prof. Dr. Gunter Meister und Dr. Claus D. Kuhn (Universität Bayreuth) dafür bedanken, dass sie meine Doktorarbeit als Mentoren begleitet haben. Zudem bedanke ich mich bei Prof. Herbert Tschochner, PD Dr. Jan Medenbach, Prof. Gunter Meister, Prof. Klaus Grasser und Prof. Joachim Griesenbeck für ihre Bereitschaft meine Dissertation als Mitglieder des Prüfungskomitees zu begutachten. Auch möchte ich mich bei Gunter Meister dafür bedanken, dass ich während meiner Arbeit auf die Infrastruktur und Ausstattung seines Lehrstuhls zurückgreifen durfte.

Insgesamt möchte ich mich sehr herzlich bei allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der AG Meister und AG Kretz bedanken, die ich im Laufe meiner Promotion kennenlernen durfte. Neben allerlei Rat und Tat mit denen sie mich in meiner Zeit im Labor unterstützt haben, habe ich mich auch immer sehr wohl und willkommen gefühlt. Insbesondere die vielen gemeinsamen Aktionen (Pubquiz(!), Lasertag, Dult und Weihnachtsmarkt, ...) haben immer extrem viel Spaß gemacht und waren ein super Ausgleich zum Laboralltag. Danke Leute!

Auch möchte ich mich bei Dr. Markus Kretz und Norbert Eichner für die vielen interessanten und unterhaltsamen Gespräche in der Mensa bedanken, sowie bei der „1 Uhr Lunch Gruppe“, dass ich mich ihnen anschließen durfte, als dies nicht mehr möglich war.

Mein besonderer Dank geht auch an meine ehemaligen Kollegen Andrea, Andi, Becki, Danni, Dom und Stefan. Danke für die Hilfe im Labor, die vielen fachlichen und weniger fachlichen Gespräche und den ganzen Spaß und Blödsinn innerhalb und außerhalb des Labors!

Ein großes Dankeschön auch an alle Freunde die mich auf meinem bisherigen Weg begleitet haben und mit denen ich nicht nur viele schöne und lustige Momente teilen durfte, sondern die mir auch in schwierigen Zeiten beigestanden und mich unterstützt haben.

Schließlich möchte ich mich auch ganz herzlich bei meiner Familie bedanken, die mich immer unterstützt hat und für mich da ist. Mein größter Dank überhaupt gilt dabei meinen Eltern. Ohne euch wäre ich unmöglich bis hierhin gekommen. Vielen Dank für eure Unterstützung, euer Vertrauen und alles was ihr für mich getan habt

12. Anhang

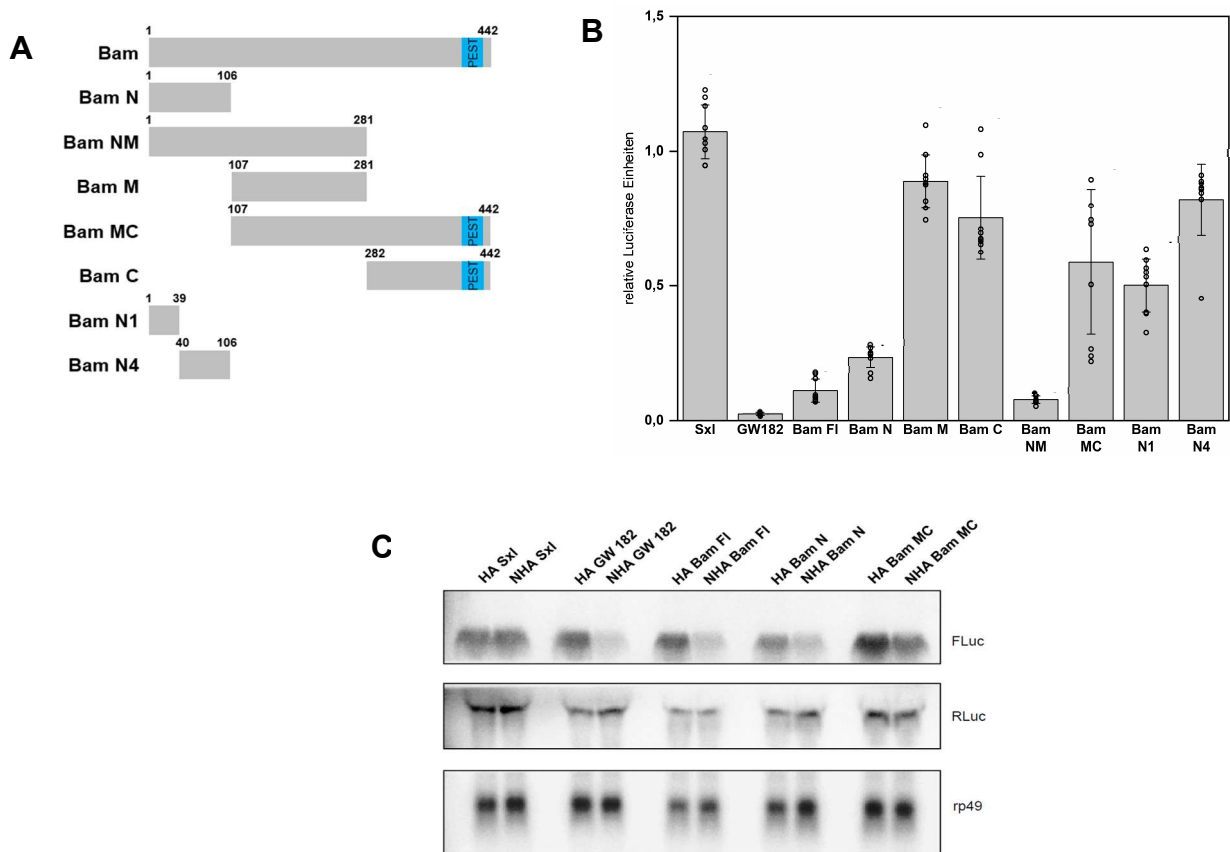


Abb. A1: Untersuchung der regulatorischen Funktion von Bam. A) Schematische Darstellung der für die Untersuchung verwendeten Konstrukte. Die Zahlen entsprechen der jeweiligen Aminosäure. Anhand von Strukturvorhersagen konnte bislang nur eine C-terminale PEST-Domäne (blau) innerhalb des Proteins identifiziert werden. B) Ergebnisse des Tethering-Experiments zur funktionellen Analyse der Bam-Konstrukte aus A). Gezeigt sind jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung des Quotienten aus der Expression von FLuc und RLuc der getetherten Proben, normalisiert auf das entsprechende Ergebnis der nicht-getetherten Proben. Die Punkte im Bereich der Balken repräsentieren die Ergebnisse der Einzelmessungen (n=9). C) Northern Blot Analyse der Expressionslevel der FLuc und RLuc mRNAs in den Tethering Experimenten mit ungetetherten (HA) und getetherten (NHA) Bam Konstrukten. Der Nachweis der RNAs erfolgte über ^{32}P markierte, *anti-sense* ssRNA-Sonden. *rp49* wurde als Ladekontrolle verwendet. Gezeigt ist ein repräsentativer Blot.

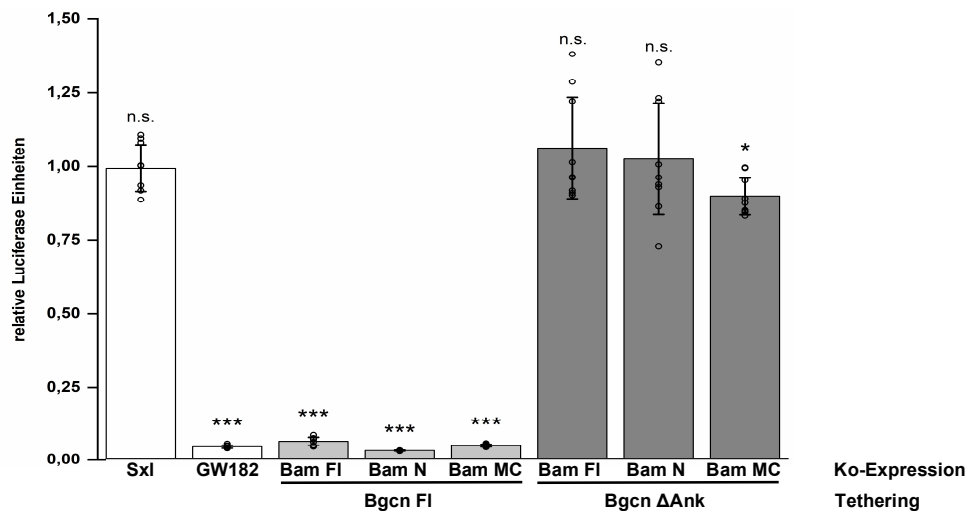


Abb. A2: Tethering-Experiment zur Untersuchung des funktionellen Zusammenhangs zwischen Bam und Bgcn. Die Aktivität von Volllänge Bgcn (Bgcn FI; hellgrau) und dessen Ankyrin-Mutante (Bgcn Δ Ank; dunkelgrau) wurde jeweils bei Ko-Expression von ungetetherter Volllänge Bam (Bam FI) dessen N-Terminus (Bam N) oder seines Mittel- und C-terminalen Bereichs (Bam MC) untersucht. Sxl und GW182 (weiß) wurden jeweils als Negativ- beziehungsweise Positivkontrolle verwendet. Gezeigt sind jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung des Quotienten aus der Expression von FLuc und RLuc der getethernten Proben, normalisiert auf das entsprechende Ergebnis der nicht-getethernten Proben. Die Punkte im Bereich der Balken repräsentieren die Ergebnisse der Einzelmessungen (n=9).

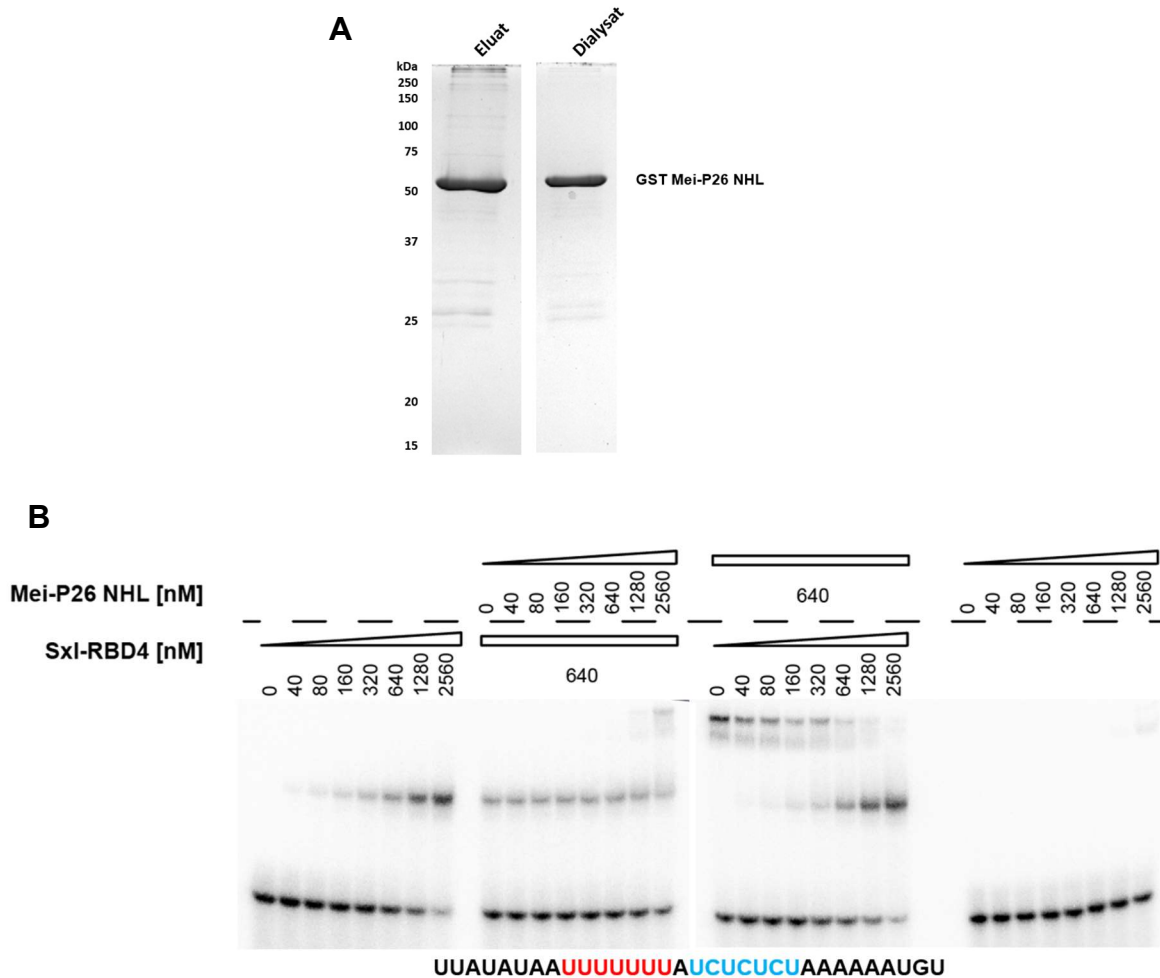


Abb. A3: Kontrollexperimente zur kompetitiven Bindung von Sxl und Meï-P26 NHL an die *nos* 3' UTR. A) SDS PAGE Analyse der Reinigung von GST Meï-P26 NHL aus Sf-21 Zellen. Gezeigt sind eine beispielhafte Fraktion des Eluats, sowie des dialysierten Proteins, welches für die EMSA Experimente verwendet wurde. B) EMSA zur Analyse der Bindung von Sxl und der Meï-P26 NHL Domäne an die *nos* 3' UTR. Unterschiedliche Proteinmengen wurden mit α - 32 P markierter, einem teilweise mutierten Abschnitt der *nos* 3'UTR entsprechender, RNA (Sequenz: siehe Abbildung; die potenzielle Bindestelle ist rot markiert, der mutierte Abschnitt ist in blau dargestellt) inkubiert und elektrophoretisch aufgetrennt. Es wurden vier verschiedene Kombinationen an Protein verwendet (v.l.n.r.: steigende Mengen Sxl-RBD4; konstante Menge Sxl-RBD4 und steigende Mengen Meï-P26 NHL; konstante Menge Meï-P26 NHL und steigende Mengen Sxl-RBD4; steigende Menge Meï-P26 NHL). Gezeigt ist jeweils ein repräsentatives Experiment.

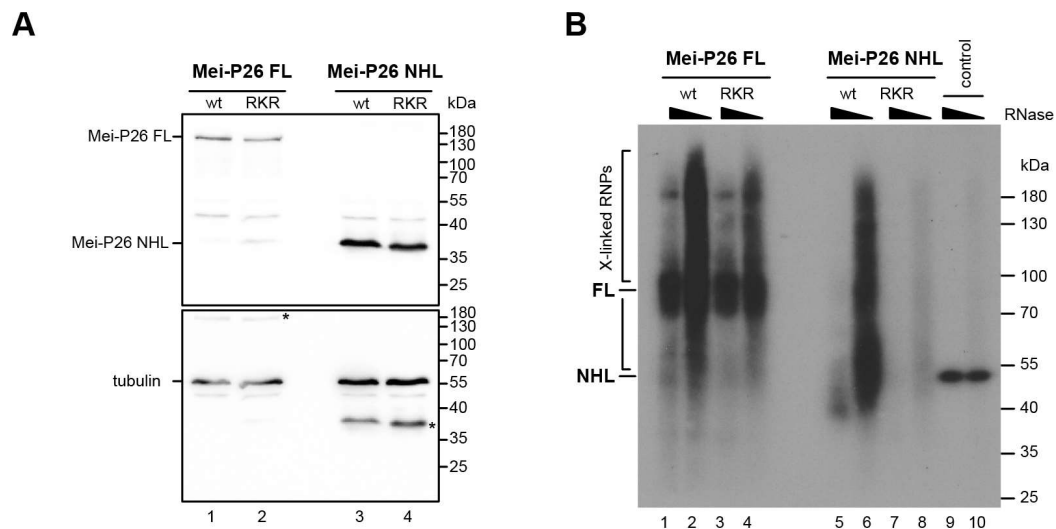


Abb. A4: Kontrollexperimente für iCLIP Experiment. A) Western Blot zur Kontrolle der Expression von Volllänge Mei-P26 und der Mei-P26 NHL Domäne (wt: wildtypisch, RKR: Triple-Mutante R1150A, K1172A, R1175A). Der Nachweis erfolgte über Detektion des jeweiligen FLAG-Tags. Tubulin wurde als Ladekontrolle verwendet. Bei den mit * markierten Spuren handelt es sich um, nach dem Strippen der Membran verbliebenes, FLAG Signal.

Tab. A1: Zusammenfassung der Ergebnisse des iCLIPs mit Volllänge Mei-P26 und dessen NHL Domäne. Angegeben sind jeweils die Anzahl der identifizierten *Crosslink Peaks* sowie der Gene, in welchen diese identifiziert wurden. Des Weiteren ist angegeben, in welchem Bereich der Gene die *Crosslinks Cluster* identifiziert wurden.

	Identifizierte <i>Crosslink peaks</i>	Identifizierte Gene	<i>Crosslink Cluster</i> in			
			5' UTR	CDS	3' UTR	Intron
Mei-P26 FI	1105	751	13	129	284	80
Mei-P26 NHL	1219	623	20	78	227	113