Untersuchungen zur elektrochemischen Regulation der Musterbildung im Ovar von *Drosophila melanogaster*

Von der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der RWTH Aachen University zur Erlangung des akademischen Grades einer Doktorin der Naturwissenschaften genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Susanne Katharina Schotthöfer, M.Sc.

aus

Ludwigshafen am Rhein

Berichter: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Johannes Bohrmann
Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Marc Spehr

Tag der mündlichen Prüfung: 10. März 2021

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Universitätsbibliothek verfügbar.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung **9**

Summary **11**

1 Einleitung **13**

1.1 Bedeutung bioelektrischer Signale für die Entwicklung von Organismen 13

1.1.1 Elektrochemische Regulation von Signalwegen 14

1.1.2 Elektrochemische Regulation des Zytoskeletts 15

1.1.3 Bedeutung bioelektrischer Signale während der embryonalen Achsenbildung 16

1.2 *Drosophila melanogaster* als Modellorganismus 17

1.2.1 Das somatische Follikelepithel des Ovars als Modellsystem . . . 18

1.3 Die Oogenese von *Drosophila melanogaster* 19

1.3.1 Ausbildung der primären Achsen 21

1.3.1.1 Anterior-posteriore Polarität 22

1.3.1.2 Dorsal-ventrale Polarität 22

1.3.1.3 Die Achsenpolaritätsmutante *grk* 24

1.3.2 Organisation und Funktion des Zytoskeletts 24

1.3.2.1 Stadienspezifische bMF-Muster im FE 25

1.3.2.2 Stadienspezifische MT-Muster im FE 26

1.3.2.3 Ausbildung der planaren Zellpolarität (PCP) und deren Bedeutung für die Elongation des Follikels 27

1.4 Bioelektrische Phänomene während der Oogenese 28

1.4.1 Stadienspezifische V_{mem}- und pH_i-Muster 29

1.4.2 Elektrochemische Gradienten 29

1.4.2.1 V_{mem}-Gradienten 29

1.4.2.2 pH_i-Gradienten 30

1.4.3 Stadienspezifische Verteilungs- bzw. Aktivitätsmuster von Ionentransportmechanismen 30

1.4.4 Einfluss bioelektrischer Eigenschaften auf die Organisation des Zytoskeletts im FE 31

1.5 Ionentransportmechanismen 32
1.5.1 Na^+/H^+-Antiporter (NHEs) und Amilorid-sensitive Na^+-Kanäle 32
1.5.2 Vakuoläre H^+-ATPasen (V-ATPasen) 33
1.5.3 Glibenclamid-sensitive ATP-abhängige K^+-Kanäle 34
1.5.4 Spannungsabhängige Typ-L Ca^{2+}-Kanäle 35
1.5.5 $Na^+/K^+/2Cl^-$-Cotransporter 36
1.5.6 Cl^--Kanäle 37
1.5.7 Gap Junctions 37
1.6 Genetisch codierte Sensoren zur Analyse elektrochemischer Eigenschaften 38
1.7 Ziele der Arbeit 40

2 Material und Methoden 41
2.1 *Drosophila melanogaster*-Stämme 41
2.2 Fliegenhaltung 44
2.3 Kreuzungen 45
2.3.1 Balancerchromosomen 46
2.3.2 Kreuzung zur Erzeugung der transheterozygoten *grk*-Fliegen . . 46
2.3.3 Kreuzungen zur Aktivierung des Gal4-UAS-Systems 47
2.4 Präparation der Follikel 49
2.5 Untersuchung bioelektrischer Eigenschaften mit Fluoreszenzfarbstoffen . 49
2.5.1 Fluoreszenz-Färbung mit DiBAC 49
2.5.2 Fluoreszenz-Färbung mit CFDA 51
2.5.2.1 Überprüfung der pH-Sensitivität des Farbstoffs 51
2.6 Untersuchung bioelektrischer Eigenschaften mittels genetisch codierter Sensoren 51
2.6.1 Genetisch codierter V_{mem}-Sensor ArcLight 51
2.6.2 Genetisch codierter pH_i-Sensor pHluorin-Moesin 52
2.6.3 Validierung der verwendeten genetischen Sensoren 52
2.7 Untersuchung des Zytoskeletts 53
2.7.1 Mikrofilament-Färbung mit fluoreszierendem Phalloidin 53
2.7.2 Indirekte Immunfluoreszenz-Färbung der Mikrotubuli 54
2.8 Stadienbestimmung der Follikel und Definition der Achsen 55
2.8.1 Stadienbestimmung und Achsendefinition in *grk*-Follikeln 55
2.9 Quantitative Analysen im FE von WT und *grk* 55
2.9.1 Vergleich von Gradienten der Fluoreszenzintensitäten in WT- und *grk*-Follikeln 55
2.9.2 Vergleich von bMF-Kondensationen in WT- und *grk*-Follikeln . 56

2.10 Fluoreszenzmikroskopie 57
2.10.1 Structured-illumination microscopy (SIM) 57
2.10.2 Weitfeldfluoreszenzmikroskopie (WFM) 58
2.10.3 Differentieller Interferenzkontrast (*Differential Interference Contrast, DIC*) 59
2.10.4 Nachbearbeitung der Aufnahmen 59
2.10.4.1 Falschfarbendarstellung 59
2.11 Inhibitionsexperimente 59
2.11.1 Analyse der Fluoreszenzintensitäten im FE nach Inhibition verschiedener Ionentransportmechanismen 60
2.11.2 Inhibitionsexperimente mit Natriumazid 61
2.11.3 Inhibitionsexperimente mit dem Knoblauch-Wirkstoff Allicin . . 62
2.12 RNAi-Screen von Ionentransportmechanismen im Ovar 63
2.12.1 Validierung der verwendeten Treiberstämme 63
2.12.2 VDRC RNAi-Stämme 63
2.12.3 TRiP RNAi-Stämme 64
2.12.4 Durchführung des Screens 64
2.12.5 Kreuzungen 65
2.12.6 DAPI-Färbung der Zellkerne 65

3 Ergebnisse 67
3.1 Vergleich der bioelektrischen Eigenschaften und des Zytoskeletts im FE des WT und der Mutante *grk* 67
3.1.1 Morphologische Besonderheiten der Mutante *grk* 67
3.1.2 Bioelektrische Unterschiede zwischen dem WT und der Mutante *grk* 68
3.1.2.1 Zusammenfassung: Vergleich der bioelektrischen Eigenschaften im FE des WT und der Mutante *grk* 73
3.1.3 Unterschiede im Zytoskelett von WT und *grk* 74
3.1.3.1 Vergleich der bMF von WT und *grk* 74
3.1.3.2 Vergleich der MT von WT und *grk* 75
3.1.3.3 Zusammenfassung: Vergleich der Eigenschaften des Zytoskeletts des WT und der Mutante *grk* 75
3.1.4 Zusammenfassung der auffälligsten Unterschiede zwischen WT und *grk* 77
3.2 Nachweis von V_{mem}- und pH_i-Änderungen infolge einer Inhibition von Ionentransportmechanismen mit Hilfe genetisch codierter Sensoren . . . 79
3.2.1 V_{mem}-Sensor ArcLight und pH_i-Sensor pHluorin 80

3.2.2 Effekte einer Inhibition aller energieabhängigen Ionentransportmechanismen auf V_{mem} und pH_i im FE 81
3.2.3 Inhibition verschiedener Ionentransportmechanismen im ArcLight- und pHluorin-exprimierenden FE 82
3.2.3.1 Direkter Vergleich der Effekte aller verwendeter Inhibitoren 82
3.2.3.2 Analyse mit dem V_{mem}-Sensor ArcLight 84
3.2.3.3 Analyse mit dem pH_i-Sensor pHluorin 84
3.2.4 Inhibition verschiedener Ionentransportmechanismen im DiBAC- und CFDA-gefärbten FE 87
3.2.4.1 Analyse mit dem V_{mem}-sensitiven Farbstoff DiBAC . . 87
3.2.4.2 Analyse mit dem pH-sensitiven Farbstoff CFDA 87
3.2.5 Vergleich der zum Nachweis von V_{mem}- und pH_i-Änderungen verwendeten Methoden und Auswertungen 91
3.2.6 Auswirkungen von Allicin auf V_{mem} und pH_i im FE 92
3.2.7 Zusammenfassung: Nachweis von V_{mem}- und pH_i-Änderungen infolge einer Inhibition von Ionentransportmechanismen 93
3.3 Knockdown-Screen zur Identifizierung in der Oogenese relevanter Ionentransportmechanismen 94
3.3.1 Validierung der verwendeten Treiberstämme 95
3.3.2 Ergebnisse des RNAi-Screens 95
3.3.2.1 Morphologische Analyse der Ovarien nach Gal4-induzierter RNAi 95
3.3.2.2 Analyse der Zytoskelett-Organisation in *ork1* 99
3.3.2.3 Zusammenfassung: Ergebnisse des RNAi-Screens . . . 101

4 Diskussion 105
4.1 Zusammenhänge zwischen Achsenpolarität, bioelektrischer Polarität und Zytoskelettpolarität im WT und in der Mutante *grk* 105
4.1.1 Fazit: Zusammenhänge zwischen Achsenpolarität, bioelektrischer Polarität und Zytoskelettpolarität 109
4.2 Nachweis von Ionentransportmechanismen im FE mittels genetisch codierter V_{mem}- und pH_i-Sensoren 109
4.2.1 Fazit: Nachweis von Ionentransportmechanismen im FE mittels genetisch codierter V_{mem}- und pH_i-Sensoren 113
4.3 Bedeutung bioelektrischer Signale für die Entwicklung des Ovars und die Oogenese 113
4.3.1 Mögliche Funktionen des K^+-Kanals Ork1 113

4.3.2 Bedeutung der Ionentransportmechanismen- und Gap Junction-Gene *rpk*, *vha55*, *inx1* und *inx3* in der Entwicklung des Ovars und im Verlauf der Oogenese . . . 116
4.3.2.1 Mögliche Funktionen der DEG/ENaC-Untereinheit RPK 117
4.3.2.2 Mögliche Funktionen der V-ATPase-Untereinheit Vha55 118
4.3.2.3 Mögliche Funktionen der Gap Junction-Proteine Inx1 und Inx3 . . . 119
4.3.3 Fazit: Bedeutung bioelektrischer Signale für die Entwicklung des Ovars und die Oogenese . . . 120
4.4 Ausblick . . . 121

Literatur **123**

A Anhang **141**
A.1 Überprüfung des pH_i-sensitiven Farbstoffs CFDA . . . 141
A.2 Stadienbestimmung . . . 142
A.3 Bioelektrische Unterschiede zwischen WT und *grk* . . . 143
A.3.1 Variabilität zwischen analysierten S9- und S10B-Follikeln . . . 144
A.4 Unterschiede im Zytoskelett von WT und *grk* . . . 147
A.4.1 Variabilität zwischen analysierten S9- und S10B-Follikeln . . . 147
A.5 RNAi-Screen . . . 148
A.5.1 Ergebnisse der im Vorfeld des RNAi-Knockdown-Screens durchgeführten Expressionsanalyse mittels Genexpressionsdatenbank FlyAtlas . . . 148
A.5.1.1 FlyAtlas-Analyse vom 03.08.2015: . . . 148
A.5.1.2 FlyAtlas-Analyse vom 17.10.2018: . . . 149
A.5.2 Weitere Beispiele für größenreduzierte Ovarien nach *rpk*- und *inx3*-Knockdown . . . 155

Abkürzungs- und Bedeutungsverzeichnis **157**

Publikationsliste **161**

Danksagung **163**

Zusammenfassung

Entwicklungs- und Regenerationsprozesse werden unter anderem von interzellulären bioelektrischen Signalen gesteuert. Dabei nehmen zellübergreifende Membranpotential (V_{mem})- und intrazelluläre pH-Wert (pH_i)-Änderungen, wie elektrochemische Gradienten, Einfluss auf Zytoskelettorganisation und planare Zellpolarität. Der Schwerpunkt dieser Arbeit besteht darin, einige der Regulation zugrundeliegenden Ionentransportmechanismen und Signalwege zu identifizieren und bereits früher gewonnene Erkenntnisse einer erneuten Analyse mittels genetisch basierter Methoden zu unterziehen.

Die Festlegung der Achsenpolarität gehört zu den Entwicklungsprozessen, für die eine elektrochemische Regulation belegt ist und Korrelationen zwischen bioelektrischer Polarität und Zytoskelettpolarität angenommen werden. Im Rahmen dieser Arbeit konnten eindeutige Belege dafür gefunden werden, dass im Wildtyp von *Drosophila* und in der Achsenpolaritätsmutante *gurken (grk)* bioelektrische Polarität und Zytoskelettpolarität in einer engen Beziehung zur Achsenpolarität während der Oogenese stehen.

Aufgrund einer gestörten anterior-posterioren (A-P)-Polarität in *grk* zeigte das Follikelepithel (FE) im Stadium 9 einen signifikant flacheren A-P-V_{mem}-Gradienten als der Wildtyp und Veränderungen in der Zytoskelettorganisation. Am deutlichsten waren die Unterschiede bei der Entstehung der dorsal-ventralen (D-V)-Polarität im Stadium 10B zu erkennen. Während im Wildtyp gleichzeitig mit einer morphologischen D-V-Polarität deutliche D-V elektrochemische Gradienten und charakteristische stadienspezifische basale Mikrofilament- und Mikrotubuli-Muster auftraten, fehlten transversale elektrochemische Gradienten und charakteristische Zytoskelett-Muster ebenso wie eine morphologische D-V-Polarität in *grk*. Daraus lässt sich ableiten, dass eine fehlende Signalgebung über Grk-EGFR Einfluss auf die asymmetrische Verteilung oder Aktivierung von Ionentransportmechanismen und Gap Junctions nimmt. Als Folge werden elektrochemische Gradienten beeinflusst, bestimmte Veränderungen in der Organisation des Zytoskeletts bleiben aus und die Morphologie des FE ändert sich.

Bereits identifizierte Ionentransportmechanismen im FE wurden unter Verwendung des genetisch codierten V_{mem}-Sensors ArcLight und des pH_i-Sensors pHluorin-Moesin sowie spezifischer Inhibitoren überprüft und spezifiziert. Die Inhibitionsexperimente mit den genetisch codierten Sensoren bestätigen, dass die betreffenden Ionentransportmechanismen eine entscheidende Rolle bei der Generierung bioelektrischer Signale im FE

einnehmen. Es konnten signifikante V_{mem}- und pH_i-Änderungen detektiert werden, die den mit Hilfe der spannungs- und pH-sensitiven Fluoreszenzfarbstoffen DiBAC und CFDA ermittelten, vergleichbar sind.

Durch einen RNAi-Screen konnten fünf Ionentransportmechanismen- und Gap Junction-Gene ausfindig gemacht werden, welche die Entwicklung des Ovars und/oder die Oogenese beeinflussen. Ein kompletter Verlust der Ovarien oder eine verringerte Größe waren als Folge des Somaknockdowns der Innexine *inx1*, *inx3* und des DEG/ENaC-Mitglieds *ripped pocket (rpk)*, sowie infolge des Keimbahnknockdowns von *rpk* zu beobachten. Ein im Soma durchgeführter Knockdown der V-ATPase-Untereinheit B *vha55* führte zu größenreduzierten Ovarien mit degenerierten Follikeln ab Stadium 10A. Aufgrund der penetranten Phänotypen in den Knockdowns wird die Hypothese aufgestellt, dass die induzierte elektrochemische Fehlregulation einen massiven Einfluss auf die Organisation des Zytoskeletts hat, wodurch die Differenzierung von z. B. somatischen Stammzellen gestört und die Ovarmorphologie oder die Follikelentwicklung grundlegend beeinträchtigt werden.

Vergleichbar den veränderten Zytoskeletteigenschaften in *grk*, führte der Somaknockdown des *open rectifier* K^+ *channel 1 (ork1)* zu veränderten basalen Mikrofilament- und Mikrotubuli-Mustern. Als Folge zeigen entsprechende *ork1*-Follikel einen charakteristischen *round-egg*-Phänotyp, der dem bekannter *round-egg*-Mutanten ähnelt. Diese Mutanten werden mit dem Fat2-vermittelten Signalweg zur Ausbildung planarer Zellpolarität im FE in Verbindung gebracht.

Zusammengefasst liefern die Ergebnisse dieser Arbeit weitere Hinweise auf eine elektrochemische Regulation von Entwicklungsprozessen durch die Beeinflussung von Signalwegen und Zytoskelettelelementen. Die Analysen der RNAi-Knockdowns und der Mutante *grk* deuten darauf hin, dass elektrochemische Fehlregulationen essentielle Funktionen während der Ovarentwicklung und Oogenese von *Drosophila* beeinträchtigen. Änderungen der bioelektrischen Eigenschaften verursachen Veränderungen in der Organisation des Zytoskeletts. Diese äußern sich in einer veränderten Morphologie des FE oder des gesamten Follikels.

Summary

Several developmental and regenerative processes are known to be controlled by bioelectrical signals. Transcellular changes in membrane potential (V_{mem})- and intracellular pH (pH_i)-patterns, like electrochemical gradients, affect cytoskeletal organisation and planar cell polarity. The main focus of the present study was the identification of ion-transport mechanisms and signalling pathways that form the basis of this electrochemical regulation, and the evaluation of earlier results using genetic methods.

Axis formation is one of several developmental processes for which electrochemical regulation has been demonstrated, and connections between bioelectrical polarity and cytoskeletal polarity are therefore assumed. The present study clearly indicates that bioelectrical polarity and cytoskeletal polarity are closely linked to axial polarity in *Drosophila* wild-type and *gurken* (*grk*) mutant follicles during the course of oogenesis.

Corresponding to a disturbed morphological anterior-posterior (a-p) polarity in *grk*, the follicular epithelium (FE) showed, in stage 9, a significantly reduced a-p V_{mem}-gradient compared to wild type and changes in cytoskeletal organisation. The most striking differences were visible during stage 10B when dorsal-ventral (d-v) polarity is established. Concurrent with morphological d-v polarity, significant d-v electrochemical gradients and characteristic stage-specific basal microfilament and microtubule patterns emerged in the wild type. In *grk*, however, comparable transversal electrochemical gradients, characteristic cytoskeletal patterns and a morphological d-v polarity were absent. Presumably, missing Grk-EGFR signalling acts influence on the asymmetric distribution or activation of ion-transport mechanisms and gap junctions. Consequently, electrochemical gradients are influenced, alterations in cytoskeletal organisation fail to occur, and the morphology of the FE changes.

Previously identified ion-transport mechanisms in the FE were reevaluated using the genetically-encoded V_{mem}-sensor ArcLight and the pH_i-sensor pHluorin-Moesin in combination with specific inhibitors. The inhibition experiments using the genetically-encoded sensors confirm that the targeted ion-transport mechanisms play important roles in generating bioelectrical signals in the FE. We detected significant V_{mem}- and pH_i-changes which are comparable to previously described changes using the voltage- and pH-sensitive fluorescent dyes DiBAC and CFDA.

In a RNAi-knockdown screen, five genes of ion-transport mechanisms and gap-junction subunits were identified excerting influence on ovary development and/or oogenesis. Complete loss of ovaries or small ovaries were observed as results of soma knockdowns of the innexins *inx1* and *inx3*, and of the DEG/ENaC family member *ripped pocket* (*rpk*), as well as of germline knockdown of *rpk*. Soma knockdown of the V-ATPase-subunit *vha55* caused size-reduced ovaries with degenerating follicles from stage 10B onward. The highly penetrant knockdown phenotypes suggest that the induced electrochemical dysregulation has massive impact on cytoskeletal organisation. Accordingly, differentiation of somatic stem cells as well as ovary morphology or the development of follicles are disturbed.

Comparable to changes in cytoskeletal properties in *grk*, soma knockdown of the *open rectifier* K^+ *channel 1 (ork1)* resulted in altered basal microfilament and microtubule patterns. *ork1*-follicles show a characteristic round-egg phenotype, resembling the phenotype of known round-egg-mutants. Round-egg mutants have been associated with the Fat2 planar cell-polarity pathway in the FE.

In summary, the results of this study provide further evidence for electrochemical regulation of developmental processes via the control of signalling pathways and cytoskeletal elements. As the analysis of RNAi-knockdowns and the mutant *grk* indicate, electrochemical dysregulation affects essential functions during *Drosophila* ovary development and oogenesis. Changes in bioelectrical properties cause alterations in the organisation of the cytoskeleton, which finally result in altered morphology of the FE and the whole follicle.

1 Einleitung

1.1 Bedeutung bioelektrischer Signale für die Entwicklung von Organismen

Zellübergreifende Entwicklungs- und Regenerationsprozesse, wie z. B. die Spezifizierung von Geweben, Wundheilung oder Krebssuppression, erfordern eine koordinierte interzelluläre Kommunikation. Zahlreiche Untersuchungen weisen darauf hin, dass bioelektrische Signale bei dieser Art der Zellkommunikation eine entscheidende Rolle spielen. Bioelektrische Signale können hierzu über Gap Junctions zwischen Zellen ausgetauscht werden und so zellübergreifend, z. B. durch Regulation verschiedenster Zytoskelettelemente und/oder Komponenten von Signalwegen, einen bestimmten Entwicklungs- oder Regenerationsprozess einleiten und regulieren. Zu den in diesen Prozessen agierenden bioelektrischen Signalen gehören lokale Membranpotential- (V_{mem}) und intrazelluläre pH-Wert (pH_i)-Änderungen sowie zellübergreifende V_{mem}- und pH_i-Gradienten (elektrochemische Gradienten), welche mit Hilfe von asymmetrisch verteilten oder aktivierten Ionentransportmechanismen (Cl^--, Ca^{2+}-, Na^+- und K^+-Kanäle, Antiporter sowie Protonenpumpen) generiert werden. In Form räumlich-zeitlicher elektrochemischer Muster und Gradienten liefern sie Informationen zur Koordination dieser Vorgänge und dienen dazu, diese über eine Regulation von Zytoskelettelementen und der planaren Zellpolarität (PCP) zu beeinflussen (Chifflet et al., 2003; Priel et al., 2006; Beane et al., 2011; Campetelli et al., 2012; Levin, 2014b; Emmons-Bell et al., 2015; Krüger und Bohrmann, 2015; Weiß und Bohrmann, 2019a; Weiß und Bohrmann, 2019b).

Proliferation, Differenzierung, Migration, Formänderungen, Apoptose und Veränderungen in der Genexpression sind Vorgänge, die bekanntermaßen von bioelektrischen Signalen maßgeblich beeinflusst werden (Adams und Levin, 2013; Chang und Minc, 2014; Levin, 2014a; McLaughlin und Levin, 2018; Pietak und Levin, 2018; Cervera et al., 2020). Ein im Flügel von *Drosophila* durchgeführter RNAi-Screen ergab beispielsweise, dass eine Vielzahl von Ionentransportmechanismen für die Morphogenese des Flügels erforderlich ist (George et al., 2019). Ebenso sind zahlreiche morphologische Defekte, die mit menschlichen Syndromen und Krankheiten assoziiert sind, auf Mutationen in Ionentransportmechanismen zurückzuführen (Plaster et al., 2001; Splawski et al., 2004; Harguindey et al., 2007; Masotti et al., 2015; Simons et al., 2015; White et al., 2017;

Srivastava et al., 2020).

1.1.1 Elektrochemische Regulation von Signalwegen

Biolelektrische Signale werden im Zuge elektrochemischer Regulation in zelluläre Antworten überführt. Von zentraler Bedeutung für die Generierung und Weiterleitung koordinierter bioelektrischer Signale während eines Entwicklungsprozesses ist zunächst eine Gap Junction-vermittelte Kommunikation zwischen den Zellen, die es ermöglicht, Ionen und somit auch V_{mem}- und pH_i-Änderungen innerhalb eines Gewebes oder zwischen unterschiedlichen Geweben auszutauschen (Bohrmann und Haas-Assenbaum, 1993; Levin, 2007). Neuere Erkenntnisse deuten darüber hinaus darauf hin, dass Gap Junctions auch mit einer Reihe von Proteinen interagieren, die sie mit dem Zytoskelett und mit Signalwegen verbinden (Hervé et al., 2012; Richard und Hoch, 2015). Daraus lässt sich die Vermutung ableiten, dass Gap Junctions auch direkt an der elektrochemischen Regulation von Entwicklungs- und Regenerationsprozessen beteiligt sein könnten.

Im Allgemeinen äußert sich eine elektrochemische Regulation von Signalwegen darin, dass zellspezifische V_{mem}- und pH_i-Änderungen sowie transzelluläre elektrochemische V_{mem}- und pH_i-Gradienten über verschiedene Mechanismen in *second messenger*-Kaskaden von Signalwegen eingreifen und auf diese Weise indirekt die Transkription entwicklungsspezifischer Gene beeinflussen. Zu den Mechanismen, die diese bioelektrischen Signale zu Beginn wahrnehmen und weiterleiten, gehören V_{mem}- und pH_i-sensitive Ionenkanäle (z. B. spannungsabhängige Ca^{2+}-Kanäle), spannungssensitive Phosphatasen, der Gap Junction-vermittelte Transport von Signalmolekülen und Morphogenen, die spannungsabhängige Regulation des Transports von Signalmolekülen, die pH-abhängige Rekrutierung von Proteinen an die Membran, die posttranslationale Modifikation pH-sensitiver Proteine in Form von Protonierung und Deprotonierung sowie die Regulation von Zytoskelettelementen (Kap. 1.1.2).

Second messenger, wie z. B. Ca^{2+}, IP_3, cAMP oder andere Signalmoleküle, sorgen für eine Verstärkung dieser Signale und aktivieren *downstream* gelegene genetische Signalwege. Diese genetischen Signalwege, wie beispielsweise der Notch-, Wnt-, Hedgehog- oder Decapentaplegic (Dpp)-Signalweg, setzen schließlich über eine transkriptionelle Kaskade Änderungen der bioelektrischen Eigenschaften in spezifisches Zellverhalten um (Levin, 2014b; Tatapudy et al., 2017; Tyler, 2017; Cervera et al., 2020).

Wie eine elektrochemische Beinflussung von Signalwegen in Entwicklungsprozessen umgesetzt wird, soll anhand der folgenden Beispiele verdeutlicht werden:
Bezüglich einer V_{mem}-abhängigen Regulation von Signalwegen konnte z. B. gezeigt werden, dass K^+-Kanäle Einfluss auf die Dpp-Signalgebung während der Morphogenese

des *Drosophila*-Flügels nehmen. K^+-Kanäle bewirken hier durch eine Depolarisation des V_{mem} einen Anstieg der intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration. Dies beeinflusst die Freisetzung des Morphogens Dpp, welches wiederum die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors Mad beeinflusst und letztendlich bestimmt, in welchem Ausmaß Dpp-Zielgene exprimiert werden. Der RNAi-Knockdown von *irk2* (einem K^+-Kanal-Gen) oder eine Mutation in *irk2* haben eine reduzierte Phosphorylierung von Mad sowie eine reduzierte Expression der Dpp-Zielgene zur Folge (Dahal et al., 2017).

Rückkoppungsschleifen, bestehend aus V_{mem}-Änderungen und Komponenten von Signalwegen wie Notch oder Ca^{2+}-Strömen, könnten bei der Überführung geringer elektrochemischer Unterschiede in deutliche morphologische Veränderungen eine wichtige Rolle spielen. Pai et al. (2015) schlagen in diesem Zusammenhang ein Modell vor, welches über Rückkoppungsschleifen, bestehend aus V_{mem}-vermittelten Signalen und Notch-Signalgebung, die Gehirnmorphologie von *Xenopus*-Embryonen reguliert. Über Gap Junctions sowie spannungsabhängige Ca^{2+}-Kanäle weitergeleitete bioelektrische Signale beeinflussen in diesem Modell die Expression Gehirn-spezifischer Transkriptionsfaktoren.

Hinsichtlich einer pH_i-abhängigen Regulation von Signalwegen konnten mehrere Forschungsgruppen belegen, dass V-ATPasen und Na^+/H^+-Antiporter in den *Drosophila*-Signalwegen Notch, Wingless, PCP oder Hedgehog eine Rolle spielen, indem sie einen geeigneten pH_i erzeugen, der entweder die Signalgebung unterstützt, Einfluss auf das *Trafficking* von Rezeptoren nimmt oder die Konformation der Rezeptoren beeinflusst (Hermle et al., 2010; Vaccari et al., 2010; Tognon et al., 2016; Ulmschneider et al., 2016). Wie Simons et al. (2009) vorschlagen, kann ein bestimmter pH_i-Wert auch die Wahrscheinlichkeit erhöhen, dass ein Ligand an seinen Rezeptor binden kann. Gemäß diesem Modell bindet der Frizzled (Fz)-Ligand Dishevelled (Dsh) schwach an den Fz-Rezeptor, wobei die Nähe zum Na^+/H^+-Antiporter dabei hilft, einen schwach basischen pH_i beizubehalten, der eine Interaktion zwischen Dsh und Fz erleichtert. Unter sauren Bedingungen wird diese Bindung geschwächt und es kommt zur Abstoßung zwischen beiden Komponenten.

1.1.2 Elektrochemische Regulation des Zytoskeletts

Das Zytoskelett wird in verschiedenen Studien als ein vielversprechendes Ziel bioelektrischer Regulation angesehen (Chifflet et al., 2003; Priel et al., 2006; Campetelli et al., 2012; Weiß und Bohrmann, 2019a):
Passend hierzu konnten Cantero et al. (2016) beispielsweise zeigen, dass elektrische Signale über Mikrotubuli (MT) weitergeleitet und verstärkt werden können. In Epithelzellen werden Veränderungen in der Zytoskelettorganisation von V_{mem}-Änderungen

gefördert (Chifflet et al., 2003; Chifflet und Hernández, 2012; Weiß und Bohrmann, 2019a). Umordnungen oder eine Stabilisierung des MT-Zytoskeletts korrelieren dabei mit einem bestimmten V_{mem} (Callies et al., 2011; Chifflet und Hernández, 2012; Weiß und Bohrmann, 2019a).

Bezüglich einer pH_i-abhängigen Regulation des Zytoskeletts ist bereits seit längerem bekannt, dass sowohl die Bindung Aktin-assoziierter Faktoren (Busa, 1986; Schmoller et al., 2012), als auch die Kontraktilität von Aktomyosin-Komplexen und die Assemblierung von Aktin vom pH_i kontrolliert werden (Wang et al., 1989; Priel et al., 2006). Auch die Polymerisation und Depolymerisation von Tubulin zeigen eine pH-Abhängigkeit (Regula et al., 1981; Busa, 1986).

1.1.3 Bedeutung bioelektrischer Signale während der embryonalen Achsenbildung

Die embryonale Achsenbildung ist ein morphogenetischer Prozess, dem eine asymmetrische Verteilung von Musterbildungsfaktoren zugrundeliegt. Bei diesen handelt es sich häufig um Transkriptionsfaktoren, welche die Transkription anderer Gene aktivieren oder reprimieren und auf diese Weise, über die Spezifizierung eines bestimmten Zellschicksals, die Körperachsen festlegen. Embryonen bilateralsymmetrischer Tiere entwickeln drei Körperachsen: eine anterior-posteriore Achse (A-P-Achse), eine dorsal-ventrale Achse (D-V-Achse) und eine Links-Rechts-Achse. Während die A-P-Achse der Linie entspricht, die vom Kopf- zum Schwanzende verläuft, bezieht sich die D-V-Achse auf die Linie, die vom Rücken (Dorsum) zum Bauch (Ventrum) verläuft. Die Links-Rechts-Achse entspricht wiederum der Linie zwischen den beiden Seiten des Körpers (Gilbert et al., 2006).

Eine Bedeutung bioelektrischer Signale bei der Ausbildung dieser Achsen ist bereits für einige Spezies belegt. In *Xenopus*- und Hühnerembryonen ist z. B. eine rechtsseitige H^+/K^+-ATPase-Aktivität obligatorisch für eine normale Orientierung der Links-Rechts-Achse. Substanzen, die den aus der H^+/K^+-ATPase-Aktivität resultierenden ungleichen Ionenstrom beeinflussen, stören die einseitige Genexpression und verursachen auf diese Weise Defekte in der Festlegung dieser Achse, und damit verbunden, in der Anlage entsprechender Organe (Levin et al., 2002; Aw et al., 2010). Vergleichbares tritt auch bei der Augenbildung in *Xenopus*-Embryonen auf. Während einer normalen Embryogenese definieren zwei bilateral angelegte hyperpolarisierte Zellhaufen die Position, an der sich Augen ausbilden. Ein Ca^{2+}-abhängiger Signalweg leitet dieses Augen-induzierende Signal weiter und reguliert so die Verteilung spezifischer Transkriptionsfaktoren. Eine Manipulation des V_{mem} führt auch in diesem Fall zu Defekten

in der Entwicklung (Pai et al., 2012).

Auch die A-P-Achse in Planarien wird von bioelektrischen Signalen kontrolliert. Nach einer Amputation sorgt ein A-P-Gradient, mit dem am stärksten depolarisierten V_{mem} am anterioren Pol und dem am schwächsten depolarisierten V_{mem} am posterioren Pol, in diesen Organismen für die Ausbildung eines Kopfendes am anterioren Pol und eines Schwanzendes am posterioren Pol. Eine Inhibition der H^+/K^+-ATPase mittels spezifischer Inhibitoren führt zu Planarien mit zwei Schwanzenden, aber ohne Kopfende (Beane et al., 2011; Beane et al., 2013). Vermutlich erfolgt die Überführung dieser Signale in eine zelluläre Antwort auch in diesem Fall über spannungsabhängige Ca^{2+}-Kanäle.

Zusammenhänge zwischen morphologischer Polarität und bioelektrischen Signalen sind auch seit längerem für einige *Drosophila*-Mutanten belegt, welche eine veränderte Achsenpolarität aufweisen. In *egalitarian*- oder *Bicaudal D*-mutanten Follikeln, die keine Oozyte (Ooz) und keine A-P-Polarität vorweisen können, korrelieren veränderte Muster extrazellulärer Ionenströme mit einer veränderten A-P-Polarität. Außerdem wurden bei der Mutante *dicephalic* veränderte bioelektrische Eigenschaften gefunden (Bohrmann et al., 1986a; Bohrmann et al., 1986b; Bohrmann et al., 1992).

1.2 *Drosophila melanogaster* als Modellorganismus

Das Genom der Taufliege *Drosophila melanogaster* war eines der ersten, deren Kartierung und Sequenzierung abgeschlossen werden konnte. Dabei hat sich gezeigt, dass für 75% der für humane Erkrankungen verantwortlichen Gene ein homologes Gen im *Drosophila*-Genom gefunden werden kann (Reiter et al., 2001). Da sich zudem zahlreiche grundlegende Funktionen und Organisationsprinzipien der Fliege und des Menschen gleichen, ist *Drosophila* ein idealer Modellorganismus zur Erforschung biomedizinischer Fragestellungen.

Desweiteren weist der Modellorganismus *Drosophila* mehrere praktische Vorteile auf: Aufgrund der kurzen Generationszeit von 10 Tagen bei 25 °C und der großen Anzahl von Nachkommen ist es möglich, innerhalb kürzester Zeiträume genetische und entwicklungsbiologische Experimente durchzuführen. Die dafür benötigten Fliegen können von entsprechenden Stammsammlungen, wie dem *Bloomington Drosophila Stock Center* (BDSC), oder transgenen RNAi-Stammsammlungen, wie dem *Vienna Drosophila Resource Center* (VDRC) und dem *Drosophila Transgenic RNAi Project* (TRiP), bezogen werden (Dietzl et al., 2007; Cook et al., 2010; Ni et al., 2011). Eine im Verhältnis zu höheren Organismen reduzierte Redundanz erleichert zudem die Charakterisierung von Proteinfunktionen in *Drosophila*. Im Fliegengenom kodieren häufig nur ein oder wenige Gene für ein Protein mit einer bestimmten Funktion.

Eine Reihe von Datenbanken, wie z. B. FlyBase und FlyAtlas, die auch im Rahmen dieser Arbeit Verwendung finden, ermöglichen zudem den Erwerb umfassender Informationen zum *Drosophila*-Genom und zur Expression von Genen in verschiedenen Geweben (Robinson et al., 2013; Marygold et al., 2016). Schließlich sprechen zahlreiche Möglichkeiten der genetischen Manipulation für eine Verwendung des Modellorganismus *Drosophila*. Insbesondere das vielseitige Gal4-UAS-System eignet sich für eine zielgerichtete Expression oder einen gewebespezifischen RNA-Interferenz (RNAi)-Knockdown eines Zielgens (Brand und Perrimon, 1993; Duffy, 2002).

1.2.1 Das somatische Follikelepithel des Ovars als Modellsystem

Das somatische FE des *Drosophila*-Ovars erfüllt verschiedene Funktionen, welche für die Entwicklung des reifen Eis entscheidend sind. Dazu gehören neben der Festlegung räumlicher Koordinaten bei der Ausbildung der Achsenpolarität (González-Reyes et al., 1995; Ray und Schüpbach, 1996; Riechmann und Ephrussi, 2001; Roth und Lynch, 2009) auch entscheidende Funktionen bei epithelialen Rotationsprozessen und der Elongation des Follikels entlang der A-P-Achse (Viktorinová et al., 2009; Haigo und Bilder, 2011; Gates, 2012; Cetera et al., 2014; Viktorinová et al., 2017). Dieser Prozess, der eine PCP sowie eine polarisierte Anordnung der MT im FE voraussetzt, überführt prävitellogene sphärische Follikel in Follikel mit einer länglichen Form. Diese Form ermöglicht es den Keimbahnzellen im Verlauf der Oogenese ihr Volumen zu vergrößern (Gutzeit et al., 1991; Gates, 2012; Viktorinová et al., 2017). Auch die Sezernierung der Eihüllen gehört zu den Aufgaben des FE (Cavaliere et al., 2008).

Gleichzeitig findet im FE eine Vielzahl von Differenzierungsprozessen[1] (González-Reyes und St Johnston, 1998; Cavaliere et al., 2008; Wu et al., 2008; Duhart et al., 2017), koordinierten Zellmigrationen[2] (King, 1970; Duchek und Rørth, 2001; Montell, 2003) und Neuanordnungen des Zytoskeletts[3] statt (Gutzeit, 1990; Gutzeit et al., 1991; Doerflinger et al., 2003; Viktorinová et al., 2009; Weiß und Bohrmann, 2019b). Diese Eigenschaften machen das FE zu einem geeigneten Modellsystem für Untersuchungen entwicklungsbiologischer Fragestellungen. Aufgrund charakteristischer bioelektrischer Eigenschaften und eines einschichtigen Aufbaus stellt das FE zusätzlich ein geeignetes Untersuchungsobjekt für die Analyse bioelektrischer Signale im Verlauf der Epithelentwicklung dar (Overall und Jaffe, 1985; Bohrmann et al., 1986a; Bohrmann et al., 1986b; Krüger, 2014; Krüger und Bohrmann, 2015; Weiß und Bohrmann, 2019a; Weiß und Bohrmann, 2019b).

[1] z. B. die Differenzierung des FE in die verschiedenen Follikelzell (FZ)-Populationen
[2] z. B. die Wanderung der Grenzzellen und zentripetalen FZ
[3] Kennzeichen der planaren und apikal-basalen Zellpolarität

1.3 Die Oogenese von *Drosophila melanogaster*

Drosophila besitzt ein polytroph-meroistisches paariges Ovar, welches aus 15-20 Ovariolen mit eigenen Stammzellpopulationen besteht. In jeder dieser Ovariolen sind von anterior nach posterior zunehmend ältere Entwicklungsstadien von Follikeln, welche über Stielzellen miteinander verbunden sind, aufgereiht (Abb. 1.1a; King, 1970; Mahowald und Kambysellis, 1980; Spradling, 1993). Diese Anordnung ermöglicht sowohl die gleichzeitige Untersuchung verschiedener Follikelstadien als auch im Verlauf der Oogenese aufeinanderfolgender morphogenetischer Ereignisse.

Von anterior nach posterior lässt sich jede Ovariole in drei Bereiche aufteilen: Das Terminalfilament, das Germarium (die Bildungsstätte der Follikel) und das Vitellarium. Das Terminalfilament, welches aus Stapeln von acht bis neun Zellen besteht, wird bereits im dritten Larvalstadium angelegt und verbindet das Germarium mit der Muskelhülle der Ovariole (Abb. 1.2; Godt und Laski, 1995; Bratu und McNeil, 2015).

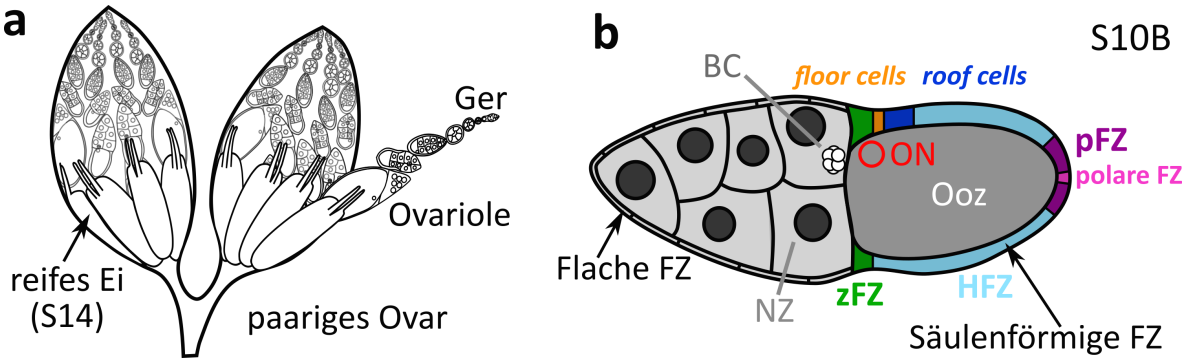


Abbildung 1.1: Aufbau des *Drosophila*-Ovars und der darin gebildeten Follikel a: Schematische Darstellung eines *Drosophila*-Ovars mit seinen paarigen Ovarien. Jedes Ovar setzt sich aus mehreren Ketten zunehmend älterer Entwicklungsstadien zusammen, den Ovariolen. An der anterioren Spitze einer jeden Ovariole befindet sich die Bildungsstätte der Follikel, das Germarium (Ger). Reife Eier (S14) sind am posterioren Ende einer Ovariole zu finden. Abb. in Anlehnung an Bratu und McNeil (2015). **b:** Schematische Darstellung eines S10B-Follikels mit den morphologisch unterschiedlichen Populationen von Follikelzellen (FZ). Während flache FZ die Nährzellen (NZ) bedecken, befinden sich über der Oozyte (Ooz) säulenförmige FZ. Diese differenzieren wiederum in zentripetale FZ (zFZ, grüner Bereich), *floor cells* (orange) und *roof cells* (dunkelblau), Hauptkörperfollikelzellen (HFZ, hellblau), posteriore FZ (pFZ, violett) und polare FZ (pink). Grenzzellen (*border cells*, BC, weißer Zellhaufen) nehmen, nachdem sie ihre posteriore Wanderung zwischen den NZ in S10B abgeschlossen haben, eine Position in der Nähe des Oozytenkerns (ON) ein. Abb. in Anlehnung an Duhart et al. (2017).

An der vorderen Spitze des Germariums befinden sich zwei bis drei Keimbahnstammzellen (*germline stem cells*, KSZ), welche die Nährzellen (NZ) und die Ooz der späteren Follikel hervorbringen. Ebenso wie die Follikelstammzellen (*follicle stem cells*, FSZ),

aus denen die FZ hervorgehen, bilden diese zusammen mit verschiedenen unterstützenden Zelltypen eine Stammzellnische (Margolis und Spradling, 1995; Xie und Spradling, 1998; Voog und Jones, 2010). Diese sorgt für ein Gleichgewicht zwischen Stammzellerneuerung und Differenzierung der KSZ in Tochterzellen, sogenannte Zystoblasten (ZB; Decotto und Spradling, 2005). Durch vier synchron aufeinander folgende mitotische Teilungen mit einer unvollständigen Zytokinese entstehen aus einem dieser ZB 16 Zystozyten, welche durch Interzellulärbrücken (Ringkanäle) miteinander verbunden sind (King et al., 1968). Jede dieser Zellgruppen (Zysten) wird von somatischen FZ umschlossen (Margolis und Spradling, 1995). Ein polarisiertes MT-Zytoskelett sorgt im weiteren Verlauf dafür, dass eine der 16 Zystozyten zur Ooz wird, während die übrigen 15 zu NZ differenzieren und die Ooz mit Organellen und Nährstoffen versorgen (King, 1970; Mahowald und Kambysellis, 1980).

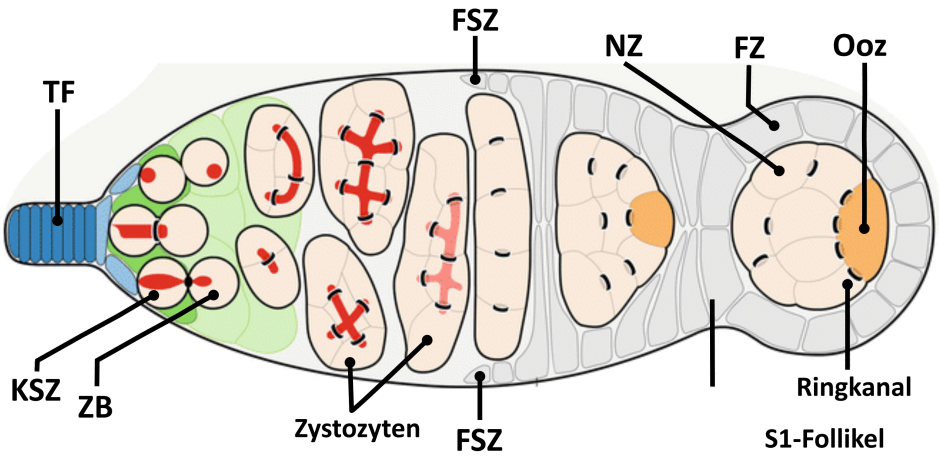


Abbildung 1.2: Aufbau des *Drosophila*-Germariums. An der Spitze eines jeden Germariums befinden sich zwei bis drei Keimbahnstammzellen (KSZ), aus denen die späteren Nährzellen (NZ) und die Oozyte (Ooz) hervorgehen. Zu diesem Zweck teilen sich die KSZ und bilden dabei Tochterzellen, sogenannte Zystoblasten (ZB). Durch synchron aufeinanderfolgende mitotische Teilungen mit unvollständiger Zytokinese entstehen aus diesen ZB Zystozyten, welche durch Ringkanäle miteinander verbunden sind. FZ, welche von Follikelstammzellen (FSZ) gebildet werden, schließen diese Zystozyten im Verlauf der Follikelbildung ein (S1-Follikel). Terminale Filamentzellen (TF, Terminalfilament), am anterioren Pol des Germariums, verbinden das Germarium mit der Muskelhülle der Ovariole. Modifizierte Abb. aus Nezis (2016).

Im Verlauf der Oogenese durchlaufen die Follikel 14 Entwicklungsstadien (S), welche in prävitellogene (S1-8) und vitellogene Stadien (S9-14) unterteilt werden (zur Stadienbestimmung siehe Tabelle A.1 im Anhang). Die prävitellogenen Stadien sind vor allem durch Polyploidisierung (erfolgt bis S10B) und Größenwachstum der NZ sowie Streckung des Follikels gekennzeichnet. Die durch Dottereinlagerungen in die Ooz ge-

prägten vitellogenen Stadien hingegen sind vorwiegend durch FZ-Wanderungen, Aufbau der Eihüllen (Vitellinmembran, Endo- und Exochorion), Abgabe des NZ-Inhalts an die Ooz, Apoptose der NZ sowie Bildung der Chorionfilamente und der Mikropyle charakterisiert (King, 1970; Mahowald und Kambysellis, 1980; Spradling, 1993; Ashburner et al., 2005). In S9 nimmt der Oozytenkern (ON) seine, für die Ausbildung der D-V-Achse entscheidende, anterior-dorsale Position in der Ooz ein (Kap. 1.3.1.2).

Im Verlauf der Oogenese differenziert das FE in morphologisch unterschiedliche FZ-Populationen (Abb. 1.1b): Flache FZ (*squamous follicle cells*), Grenzzellen (*border cells*, BC) und säulenförmige FZ (*columnar follicle cells*), welche wiederum in zentripetale (zFZ), Hauptkörperfollikelzellen (HFZ), posteriore terminale FZ (pFZ), *roof cells*, *floor cells* und polare FZ unterteilt werden (González-Reyes et al., 1995; Cavaliere et al., 2008; Duhart et al., 2017). Während flache FZ die NZ bedecken, befinden sich säulenförmige FZ über der Ooz. HFZ erstrecken sich, in S9-10B, über ein breites Band zwischen zFZ am anterioren Pol und pFZ am posterioren Pol. *Roof cells* und *floor cells*, welche sich auf der Dorsalseite am anterioren Pol der Ooz zwischen zFZ und HFZ befinden, bilden später die dorsalen Chorionfilamente.

Ein Paar von polaren FZ befindet sich am posterioren Pol der Ooz, wohingegen die Gruppe aus sechs bis sieben BC am anterioren Pol des Follikels ab S9 mit ihrer Wanderung zur Ooz beginnt (González-Reyes und St Johnston, 1998; Cavaliere et al., 2008; Duhart et al., 2017). Entscheidend für die Determination der BC und ihre posteriore Wanderung zwischen den NZ zu einer Position gegenüber des ON (S9/10A) ist der C/EBP-Transkriptionsfaktor *slow border cells* (*slbo*). Entsprechend verursacht ein partieller Verlust der *slbo*-Genfunktion eine verzögerte Wanderung der BC (Montell et al., 1992). Die Wanderung der BC in posterior-dorsale Richtung ist ebenso wie die Ausbildung der primären Körperachsen vom Gen *gurken* (*grk*) abhängig (Kap. 1.3.1; Duchek und Rørth, 2001).

1.3.1 Ausbildung der primären Achsen

Das Gen *gurken* codiert für ein Ovar-spezifisches Homolog des *transforming growth factor* α (TGF-α). Dieses Grk-Protein aktiviert als Ligand des *epidermal growth-factor* (EGF)-Rezeptors Torpedo (Top)/DER eine Kaskade, die zunächst zur Ausbildung der A-P-Polarität und in einem zweiten Schritt zur Ausbildung der D-V-Polarität in *Drosophila*-Follikeln führt (Neuman-Silberberg und Schüpbach, 1993; Neuman-Silberberg und Schüpbach, 1996).

Zu diesem Zweck wird *grk* mRNA in den NZ synthetisiert und mit Hilfe eines polarisierten MT-Netzwerks (MT-Plusenden am anterioren Ende der Ooz), welches vom ON

am posterioren Ende der Ooz ausgeht, in die Nähe der terminalen FZ transportiert und dort in Grk-Protein translatiert (Cáceres und Nilson, 2005; Bernard et al., 2018). Dieses Grk-Protein aktiviert im weiteren Verlauf der Oogenese ein räumlich begrenztes Signal im FE (Neuman-Silberberg und Schüpbach, 1993; Neuman-Silberberg und Schüpbach, 1996), welches innerhalb von zwei Runden zu unterschiedlichen Zeiten die Ausbildung der Achsenpolarität sicherstellt (Abb. 1.3).

1.3.1.1 Anterior-posteriore Polarität

Zu einem frühen Zeitpunkt (Stadien S6-7) wird zunächst durch Aktivierung des EGFR-Signalwegs in den terminalen FZ eine A-P-Polarität etabliert (Abb. 1.3a). Hierzu bindet Grk an den Grk-Rezeptor Torpedo in den terminalen FZ. Als Folge dieses Signals differenzieren die terminalen FZ zu pFZ („posteriorisierte“ FZ) und senden ein Signal an die Ooz zurück. Dieses Signal führt wiederum zur Ausbildung eines entlang der A-P-Achse polarisierten MT-Zytoskeletts in der Ooz (MT-Plusenden am posterioren Ende der Ooz; González-Reyes et al., 1995; Roth et al., 1995). Entlang dieser polarisierten MT transportieren die Motorproteine Kinesin I und Dynein maternale *bicoid* (*bcd*) bzw. *oskar* (*osk*) mRNA an das anteriore bzw. posteriore Ende der Ooz. Die spätere Bildung von Bicoid-Protein am anterioren Ende und Oskar-Protein, gebunden an *nanos* am posterioren Ende, ist für eine Etablierung der A-P-Polarität im Embryo entscheidend (Gilbert et al., 2006).

1.3.1.2 Dorsal-ventrale Polarität

In der Mitte der Oogenese führen von den pFZ ausgehende Veränderungen in der Organisation des MT-Zytoskeletts (Entstehung eines polarisierten MT-Netzwerks mit MT-Plusenden am posterioren Ende der Ooz) zur MT-abhängigen Wanderung des ON zu einer anterior-dorsalen Position (Abb. 1.3b; Cáceres und Nilson, 2005; Zhao et al., 2012; Bernard et al., 2018). Diese Position definiert im weiteren Verlauf die dorsale Seite des Follikels, da sie die Region bestimmt, in der sich ein A-P-Grk-Gradient entlang der dorsalen Oberfläche der Ooz bildet (Neuman-Silberberg und Schüpbach, 1993). FZ, die sich in der Nähe dieses Gradienten befinden, erhalten das Grk-Signal und nehmen ein dorsales Schicksal an (Nilson und Schüpbach, 1999; van Eeden und St Johnston, 1999; Guichet et al., 2001). Somit ist die aus der Lage des ON resultierende lokale Begrenzung der EGFR-Aktivität für die Ausbildung der D-V-Polarität entscheidend (González-Reyes et al., 1995; Roth et al., 1995; González-Reyes und St Johnston, 1998; Nilson und Schüpbach, 1999). Es wird angenommen, dass eine asymmetrische Verteilung oder Aktivierung von Ionentransportmechanismen im FE ebenfalls auf diesen Vorgang zurückzuführen ist (Krüger und Bohrmann, 2015). Im dorsalen FE führt die

Aktivität des Rezeptors Torpedo im weiteren Verlauf der Kaskade zur Inhibition der Expression des Musterbildungsgens *pipe*.

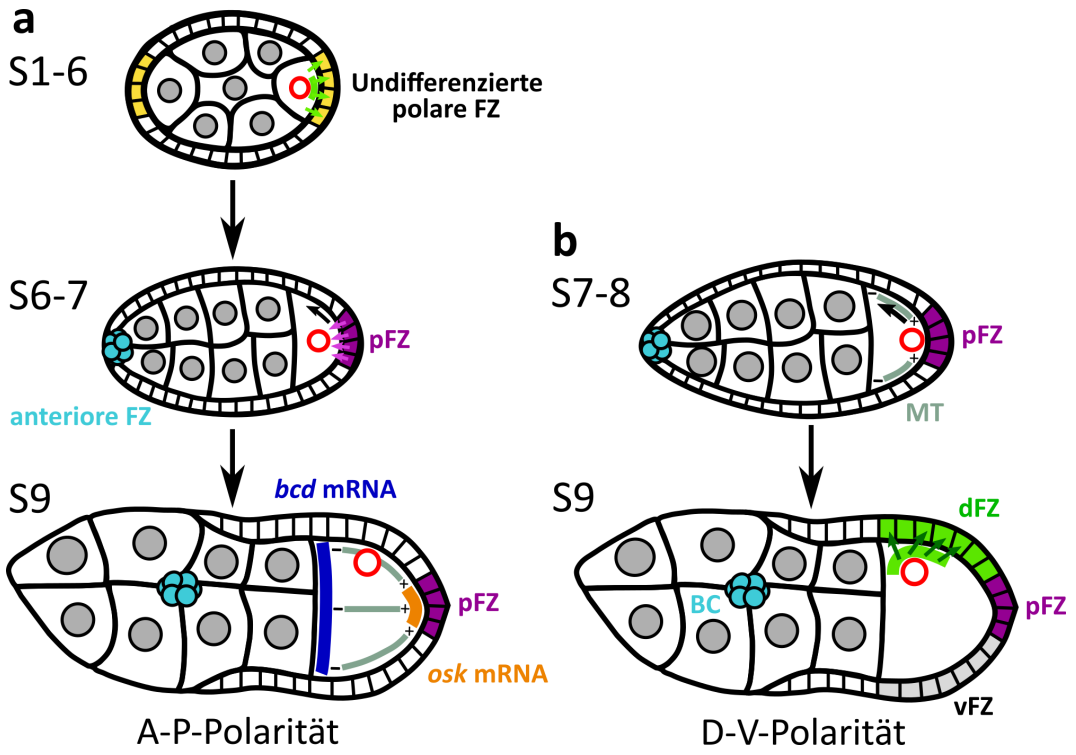


Abbildung 1.3: *grk*-vermittelte Etablierung der A-P- und D-V-Achsenpolarität in *Drosophila*-Follikeln. Dargestellt sind die Prozesse, die zur Ausbildung der A-P-(**a**) und D-V-(**b**) Achsenpolarität führen. **a:** Entscheidend für die Ausbildung der A-P-Polarität ist die Wanderung der Ooz an das posteriore Ende des Follikels. Durch diese Wanderung gelangen der ON (roter Kreis) und *grk* mRNA an das posteriore Ende des Follikels. Das Grk-Protein (grüne Pfeile) aktiviert dort durch Bindung an den Rezeptor Torpedo den EGFR-Signalweg in den posterior gelegenen undifferenzierten terminalen FZ (gelbe Zellen; S1-6). Als Folge dieses Grk-Signals differenzieren diese terminalen FZ zu pFZ (violette Zellen) und senden ein Signal an die Ooz zurück (violette Pfeile, S6-7). Dieses Signal wiederum führt zur Ausbildung eines polarisierten MT-Zytoskeletts (MT, graue Linien) in der Ooz, welches *bicoid*- (blauer Streifen) und *oskar*-mRNA (orangefarbener Streifen) an entgegengesetzten Polen lokalisiert (S9) und somit die A-P-Achse im späteren Embryo definiert. **b:** Ein von den pFZ ausgehendes Signal induziert die MT-abhängige Wanderung des ON zu einer anterior-dorsalen Position in der Ooz (S7-8) und bestimmt die Region, in der Grk-Protein (grüner Streifen) gebildet wird. FZ, die sich oberhalb des entstehenden Grk-Gradienten befinden, differenzieren, durch Aktivierung des EGFR-Signalweges, in dorsale FZ (dFZ, grüne Zellen). Gegenüberliegende FZ, die aufgrund ihrer Entfernung kein Grk-Signal erhalten, differenzieren zu ventralen FZ (vFZ, graue Zellen). Die posteriore Wanderung der BC (türkisfarbene Zellen) ist ebenfalls von *grk* abhängig (S9). Abb. in Anlehnung an González-Reyes et al. (1995).

Dieses Vorgehen stellt sicher, dass Pipe-Protein ausschließlich in ventralen FZ (vFZ) gebildet wird (Sen et al., 1998; Amiri und Stein, 2002). Mehrere Proteasen führen anschließend zur Aktivierung des Toll-Rezeptors und zur Etablierung der D-V-Polarität

im Embryo (Moussian und Roth, 2005; Gilbert et al., 2006).

1.3.1.3 Die Achsenpolaritätsmutante *grk*

Follikel der Mutante *grk* weisen bezüglich beider Achsen morphologische Defekte auf. Dabei unterscheiden sich *grk*-Follikel in zwei Aspekten entscheidend von Wildtyp (WT)-Follikeln: Der ON ist in vitellogenen Stadien häufig am posterioren Ende der Ooz lokalisiert und das FE zeichnet sich durch eine entlang der Tranversalachse (entspricht der D-V-Achse im WT) vorliegende gleichmäßige Gestalt aus.

Die Wanderung des ON zu einer anterior-dorsalen Position findet in *grk* nicht statt. Infolgedessen ist sowohl die Ausbildung der longitudinalen Achse (entspricht der A-P-Achse) als auch der transversalen Achse gestört (Spradling, 1993; Cáceres und Nilson, 2005). Mit Hilfe des anterior-spezifischen FZ-Markers *slbo* wurde gezeigt, dass pFZ in starken *grk*-Mutanten ein anteriores Schicksal annehmen, wodurch sich anterior-spezifische Mikropylen-Strukturen an beiden Polen entwickeln (González-Reyes et al., 1995; Roth et al., 1995).

1.3.2 Organisation und Funktion des Zytoskeletts

Das Zytoskelett von *Drosophila*-Follikeln, insbesondere das Zytoskelett des FE, dient im Rahmen dieser Arbeit als Modellsystem, um die physiologische Relevanz bioelektrischer Signale im Verlauf der Oogenese zu untersuchen. Tatsächlich wurde bereits gezeigt, dass Zytoskelettelemente im FE von *Drosophila* dazu geeignet sind, bioelektrische Signale in zelluläre Antworten zu übersetzen (Weiß und Bohrmann, 2019a; Weiß und Bohrmann, 2019b).

Sowohl das Mikrofilament (MF)- als auch das MT-Zytoskelett ist im Verlauf der Oogenese in zahlreiche Prozesse involviert. MF an der Basalseite des gesamten FE sind in prävitellogenen Stadien bis S8 durch eine zur A-P-Achse senkrechte Orientierung charakterisiert (Gutzeit, 1990; Viktorinová et al., 2009; Weiß und Bohrmann, 2019b). Diese polarisierte Orientierung im FE sorgt z. B. für die Elongation des Follikels entlang der A-P-Achse (Viktorinová et al., 2009). Follikel aus Mutanten, in denen die Polarität der basalen MF (bMF) beeinträchtigt ist, weisen entsprechend eine runde Form auf (*round-egg*-Phänotyp; Gutzeit et al., 1991; Viktorinová et al., 2009; Horne-Badovinac et al., 2012). In den Keimbahnzellen von *Drosophila*-Follikeln liegen verschiedene Arten von MF-Populationen vor. Zu den Funktionen dieses MF-Zytoskeletts zählt u. a. die Befestigung der NZ-Kerne in einer zentralen Lage. Dies verhindert, dass diese beim Ausstrom des NZ-Inhalts in S11 die Ringkanäle verstopfen. Daneben bildet ein Teil

dieses MF-Zytoskeletts die Ringkanäle, welche die NZ miteinander und mit der Ooz verbinden.

Differenzierungsprozesse im FE spiegeln sich sowohl in der Organisation des MF- als auch des MT-Zytoskeletts wider. Dementsprechend treten im Verlauf der Oogenese stadienspezifische bMF- und MT-Muster im FE auf (Kap. 1.3.2.1 und 1.3.2.2; Gutzeit, 1986; Gutzeit, 1990; Gutzeit et al., 1991; Weiß und Bohrmann, 2019a). Insbesondere im Bezug auf beide Körperachsen (A-P- und D-V-Achse) manifestieren sich charakteristische stadienspezifische bMF- und MT-Muster im FE (Kap. 1.3.2.1 und 1.3.2.2).

MT sind Polymere aus α- und β-Tubulin, die mit einer Vielzahl von MT-assoziierten Proteinen (MAPs) verbunden sein können. Dazu gehören u.a. die Kinesin- und Dynein-Motorproteinfamilien, die einen gerichteten Transport von Proteinen, mRNAs, Organellen und Vesikeln im Follikel ermöglichen (Marx et al., 2006; Bernard et al., 2018). Ein vom ON ausgehendes MT-Netzwerk, welches den ON an seiner anterior-dorsalen Position hält, sorgt in diesem Zusammenhang für die Erhaltung der D-V-Polarität im FE (1.3.1.2; González-Reyes et al., 1995; Roth et al., 1995; González-Reyes und St Johnston, 1998; Guichet et al., 2001; Bernard et al., 2018). Zusätzlich sorgen MT für die Wanderung des ON (S8/9) zu seiner anterior-dorsalen Position (Theurkauf et al., 1992; Bernard et al., 2018).

Eine weitere Rolle spielen MT im Verlauf der Rotationsprozesse des FE um die A-P-Achse. Dabei scheinen MT indirekt für die Rotation verantwortlich zu sein, indem sie, basierend auf ihrer Polarität, die Richtung der von MF bewirkten Follikelepithelrotation vorgeben (Viktorinová und Dahmann, 2013). Auch aktiv migrierende Zellen, z. B. BC und zFZ, zeichnen sich durch ein dichtes MT-Zytoskelett aus. Dieses wird für die posteriore Wanderung der BC sowie die zentripetale Wanderung der zFZ zwischen NZ und Ooz benötigt. In Anwesenheit von Colchizin, weisen diese Zellen Veränderungen auf, und eine zentripetale Wanderung der zFZ bleibt aus (Gutzeit, 1986). Neben diesen Funktionen ist das MT-Zytoskelett auch am Ausstrom des NZ-Inhalts in die Ooz in den Stadien S10-12, bei der Exozytose von Dotterproteinen und Vitellinmembrankomponenten aus den FZ sowie bei der Etablierung apikal-basaler FZ-Polarität beteiligt (Gutzeit, 1986; Theurkauf et al., 1992; Doerflinger et al., 2003).

1.3.2.1 Stadienspezifische bMF-Muster im FE

In prävitellogenen Stadien bis S8 ist die Organisation der bMF durch eine senkrecht zur A-P-Achse parallele Anordnung gekennzeichnet (transversale Anordnung der bMF, Abb. 1.4). Diese parallelen bMF-Bündel kondensieren in den zFZ von S9- und den dorsalen zFZ von S10B-Follikeln zu sternförmigen Strukturen im Zentrum der Zellen

(siehe Sterne in Abb. 1.4, bMF-Kondensationen). Diese Kondensationen der bMF stellen charakteristische Merkmale im Zytoskelett von WT S9- und S10B-Follikeln dar. Im weiteren Verlauf der Oogenese greifen diese Kondensationen auch auf andere FZ-Populationen über, woraufhin in S11 das gesamte FE durch fächerförmige kondensierte Strukturen gekennzeichnet ist. Dieses Muster wird in S12 wieder durch eine transversale Anordnung paralleler bMF-Bündel ersetzt (Gutzeit, 1990; Weiß und Bohrmann, 2019a).

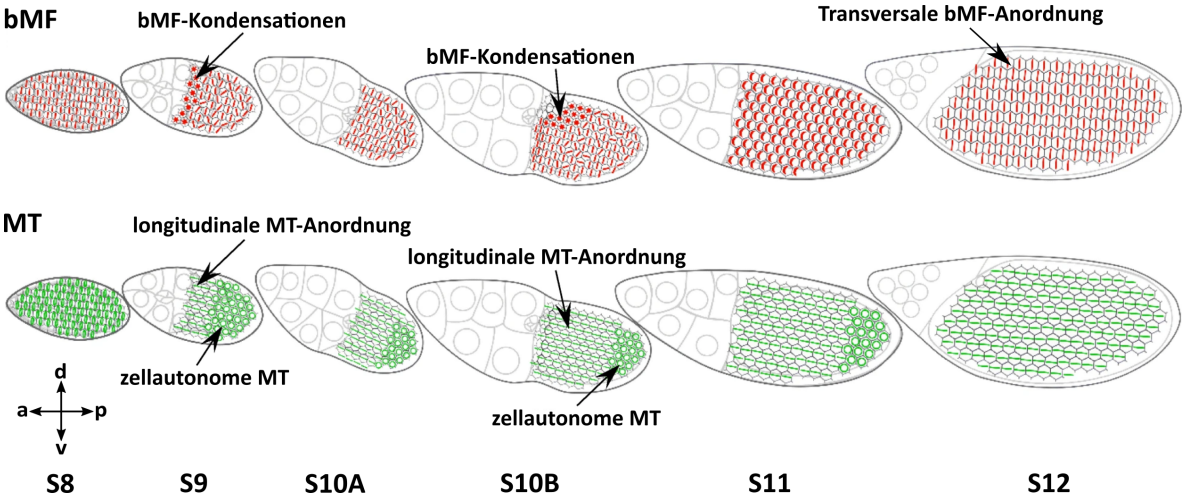


Abbildung 1.4: Stadienspezifische bMF- und MT-Muster im FE von S8 bis S12. bMF: In S8 weisen die bMF aller FZ eine senkrecht zur A-P-Achse parallele Anordnung auf (Striche, transversale Anordnung). Ab S9 geht diese transversale Anordnung im Bereich der sich abflachenden zFZ verloren und die bMF kondensieren dort zu sternförmigen Strukturen im Zentrum der Zellen (Sterne, bMF-Kondensationen). Diese treten in dorsalen zFZ von S10B-Follikeln erneut auf und depolymerisieren anschließend. Dieser Vorgang breitet sich bis S11 entlang der A-P-Achse aus. S12 ist wiederum durch eine transversale bMF-Anordnung charakterisiert. **MT:** Auch die Organisation der MT ist zunächst in allen S8-FZ gleich (senkrecht zur A-P-Achse). Ab S9 ändert sich dies: Während in den HFZ und pFZ eine zellautonome Organisation (korbförmige MT-Anordnung um den Zellkern) existiert, taucht in den zFZ eine longitudinale MT-Anordnung (entlang der A-P-Achse polarisiert) auf. Diese longitudinale MT-Anordnung breitet sich in den folgenden Stadien (bis S12) entlang der A-P-Achse bis zu den pFZ aus. Modifizierte Abb. aus Weiß und Bohrmann (2019a).

1.3.2.2 Stadienspezifische MT-Muster im FE

Vergleichbar mit dem bMF-Muster besitzen die MT zu Beginn der Vitellogenese (S8) in allen FZ die gleiche transversale Anordnung (Abb. 1.4). Wie auch bei der Organisation der bMF beobachtet wurde, ändert sich dies jedoch in den zFZ des S9. Ein Muster aus zellübergreifenden longitudinal angeordneten MT im anterioren Bereich und zellautonomen MT im posterioren Bereich des säulenförmigen FEs entsteht. Im

weiteren Verlauf der Oogenese nimmt der Anteil an FZ mit longitudinal angeordneten MT immer weiter zu, sodass in S12 das gesamte säulenförmige FE eine longitudinale zellübergreifende Anordnung der MT aufweist (Gutzeit, 1986; Weiß und Bohrmann, 2019a).

1.3.2.3 Ausbildung der planaren Zellpolarität (PCP) und deren Bedeutung für die Elongation des Follikels

Koordiniertes Zellverhalten, wie z. B. Veränderungen der Zellform, zielgerichtete Zellteilungen oder Zellmigrationen, ist die Voraussetzung für Morphogenese. Die Steuerung solcher Verhaltensmuster der Zellen basiert dabei auf der Fähigkeit eine Richtung (Polarität) in einem Gewebe wahrzunehmen. Epitheliale Gewebe zeigen zwei Arten von Polarität: Zum einen eine apikal-basale Zellpolarität, die es ihnen ermöglicht außen von innen zu unterscheiden, zum anderen eine senkrecht zur apikal-basalen Polarität vorliegende PCP (Adler, 2002; Mlodzik, 2002; Aurich, 2017).

Bei *Drosophila* sind mindestens zwei unterschiedliche Signalwege bekannt, die zur Ausbildung der PCP führen. Einer der beiden Signalwege agiert im Auge, Flügel und Notum und basiert auf einer Interaktion der Wnt-Proteine Dsh und Fz, der andere Signalweg basiert auf einer Fat2-vermittelten Interaktion des bMF-Zytoskeletts mit der extrazellulären Matrix in FZ des Ovars (Gutzeit et al., 1991; Viktorinová et al., 2009). Atypische Cadherine, wie Fat2 und Fat (Fat2-Homolog), nehmen eine Schlüsselrolle bei der Etablierung von PCP in verschiedenen Geweben ein, indem sie Zell-Zell-Interaktionen vermitteln (Viktorinová et al., 2009; Thomas und Strutt, 2012) und auf diese Weise zur Koordination der Vorgänge beitragen. Daneben sind sie besonders wichtig für die polarisierte Orientierung der bMF im FE und für die in den Stadien S5-7 stattfindende Elongation der Follikel (Viktorinová et al., 2009). Follikel besitzen zu Beginn der Oogenese eine kugelförmige Gestalt (Verhältnis A-P- : D-V-Achse 1:1). Im Verlauf der Oogenese verändert sich diese Gestalt und die Follikel nehmen eine entlang der A-P-Achse verlängerte Form ein (Verhältnis A-P- : D-V-Achse: 2,5:1; Haigo und Bilder, 2011).

Gutzeit et al. (1991) beschrieben den *round-egg*-Phänotyp der Mutante *kugelei* (*fat2*-Allel). Follikel dieser Mutante sind nicht in der Lage entlang der A-P-Achse zu elongieren und zeichnen sich durch eine defekte Polarisierung der bMF aus (Gutzeit, 1990; Gutzeit et al., 1991). In diesem Zusammenhang wurde die Hypothese aufgestellt, dass ein planar-polarisiertes bMF-Zytoskelett senkrecht zur A-P-Achse eine Art Korsett darstellt, welches die Größenzunahme des Follikels entlang der Transversalachse reguliert und durch Rotationen des FE zur Elongation des Follikels beiträgt (Gutzeit et al., 1991; Viktorinová et al., 2009; Haigo und Bilder, 2011; Gates, 2012). Diese Annahme

wurde von der Beobachtung gestützt, dass Follikel von weiteren *round-egg*-Mutanten durch eine gestörte planar-polarisierte Anordnung der bMF oder extrazellulärer Matrixkomponenten sowie durch eine fehlende Fähigkeit zur Elongation charakterisiert sind (Gutzeit et al., 1991; Bateman et al., 2001; Frydman und Spradling, 2001; Viktorinová et al., 2009; Horne-Badovinac et al., 2012; Duhart et al., 2017). Neuere Arbeiten deuten jedoch darauf hin, dass die FE-Rotation und die Elongation des Follikels zeitlich zusammenfallen, aber die Rotationen, im Gegensatz zur PCP, keine notwendige Voraussetzung für die Elongation darstellen (Aurich und Dahmann, 2016; Viktorinová et al., 2017).

Für eine korrekte Polarisierung der bMF ist neben Integrinen auch eine planar-polarisierte Verteilung der Rezeptor-Tyrosinkinase Lar erforderlich, welcher eine Beteiligung an der Signalgebung zwischen dem Zytoskelett und der extrazellulären Matrix (Basalmembran) zugeschrieben wird (Bateman et al., 2001; Frydman und Spradling, 2001). Planar-polarisierte MT werden ebenfalls für die Elongation der Follikel benötigt. Wie vermutet wird, tragen diese durch Proteintransport dazu bei, eine asymmetrische Verteilung der beteiligten Proteine beizubehalten (Shimada et al., 2006). Diese Vermutung wird von der Beobachtung gestützt, dass WT-Fliegen, deren MT-Polymerisation im FE inhibiert wurde, runde Eier produzieren (Viktorinová und Dahmann, 2013).

1.4 Bioelektrische Phänomene während der Oogenese

In *Drosophila*-Follikeln sind sowohl stadienspezifische Muster extrazellulärer Ströme als auch stadienspezifische V_{mem}- und pH_i-Muster im FE und in den Keimbahnzellen nachweisbar (Overall und Jaffe, 1985; Bohrmann et al., 1986a; Bohrmann et al., 1986b; Sun und Wyman, 1993; Krüger, 2014; Krüger und Bohrmann, 2015; Weiß und Bohrmann, 2019b). Diese Muster entsprechen Verteilungs- bzw. Aktivitätsmustern von Protonenpumpen (V-ATPasen), spannungsabhängigen Typ-L Ca^{2+}-Kanälen, Amiloridsensitiven Na^+-Kanälen, Na^+/H^+-Antiportern (NHEs) und Gap Junction-Proteinen (Bohrmann et al., 1986b; Bohrmann, 1991b; Sun und Wyman, 1993; Munley et al., 2009; Krüger und Bohrmann, 2015; Lautemann und Bohrmann, 2016). Insbesondere Korrelationen zwischen V_{mem}-Mustern und der Aktivität von spannungsabhängigen Typ-L Ca^{2+}-Kanälen sind festzustellen. Dies weist auf einen Mechanismus hin, der bioelektrische Signale via Ca^{2+}-Ionen in zelluläre Antworten überführt (Krüger und Bohrmann, 2015).

Diese im FE auftretenden V_{mem}- und pH_i-Muster sowie A-P und D-V elektrochemische Gradienten korrelieren zudem mit Zytoskelett-Änderungen. Beide (bioelektrische Signale und Zytoskelett-Änderungen) können durch die Verwendung spezifischer In-

hibitoren beeinflusst werden. Dadurch wurde gezeigt, dass langsame Änderungen der biolelektrischen Eigenschaften, wie sie während der Differenzierung des FE beobachtet werden, Einfluss auf die Eigenschaften des Zytoskeletts nehmen und auf diese Weise Entwicklungsprozesse regulieren (Weiß und Bohrmann, 2019a; Weiß und Bohrmann, 2019b).

1.4.1 Stadienspezifische V_{mem}- und pH_i-Muster

In den vitellogenen Stadien S8-12, in denen das FE entscheidenden morphologischen Veränderungen unterliegt, wurden deutliche Änderungen des V_{mem} und pH_i im FE und in den Keimbahnzellen (NZ und Ooz) erfasst (Abb. 1.5, Krüger, 2014; Krüger und Bohrmann, 2015; Weiß und Bohrmann, 2019b). Bei diesen Änderungen handelt es sich um langsame Potentialänderungen, die unter dem Schwellenwert von Aktionspotentialen liegen (*subthreshold*-Depolarisationen), sowie um geringfügige Änderungen des pH_i. Gemäß Bohrmann und Gutzeit (1987) liegen die pH_i-Änderungen des NZ-Zytoplasmas und des Ooplasmas im neutralen Bereich zwischen pH 6,8 und pH 7,2. Ulmschneider et al. (2016) stellten pH_i-Werte im Bereich von 6,8 bis 7,8 in FSZ sowie in pFZ und HFZ prävitellogener Stadien fest. Durch quantitativen Vergleich der Fluoreszenzintensitäten, die mit Hilfe von Indikatorfarbstoffen in verschiedenen Follikelregionen erfasst wurden, ergeben sich entlang beider Körperachsen (A-P- und D-V-Achse) stadienspezifische V_{mem}- und pH_i-Gradienten.

1.4.2 Elektrochemische Gradienten

1.4.2.1 V_{mem}-Gradienten

In jungen Stadien bis S8 zeigen alle FZ ein im Vergleich zu den Keimbahnzellen relativ depolarisiertes V_{mem} (siehe V_{mem}-Muster im FE in Abb. 1.5). Dies ändert sich in S9, wenn sich ein A-P-Gradient im FE ausbildet. Zusätzlich zu diesem A-P-Gradienten entwickelt sich ab S10B auch ein D-V-Gradient im FE. Bei diesem weist, bezogen auf die Transversalachse, eine der beiden Seiten des FE (meist die Ventralseite) ein stärker depolarisiertes V_{mem} auf. Von S10B bis S12 wird dieser D-V-Gradient immer deutlicher. In späten S10B-Follikeln kehrt sich der Gradient dann um und die dorsalen zFZ sind durch ein depolarisiertes V_{mem} gekennzeichnet. Insgesamt betrachtet ist das dorsale FE in späteren Stadien im Vergleich zum ventralen FE jedoch hyperpolarisiert (Krüger und Bohrmann, 2015; Weiß und Bohrmann, 2019b).

1.4.2.2 pH_i-Gradienten

In S8-Follikeln ist der pH_i im gesamten FE gleich (siehe pH_i-Muster im FE in Abb. 1.5) und weist einen im Vergleich zu den NZ sauren Wert auf. Während S9 bis S11 bilden sich A-P-Gradienten im FE und in den NZ aus. Zur gleichen Zeit manifestiert sich auch ein D-V-Gradient in den NZ, mit dem sauersten pH_i in der NZ gegenüber der anterior-dorsalen Region der Ooz. Ab S10B etabliert sich zusätzlich zu diesem D-V-Gradienten in den NZ auch ein D-V-Gradient im FE. Dieser wird in S11-12 noch deutlicher (Krüger und Bohrmann, 2015; Weiß und Bohrmann, 2019b).

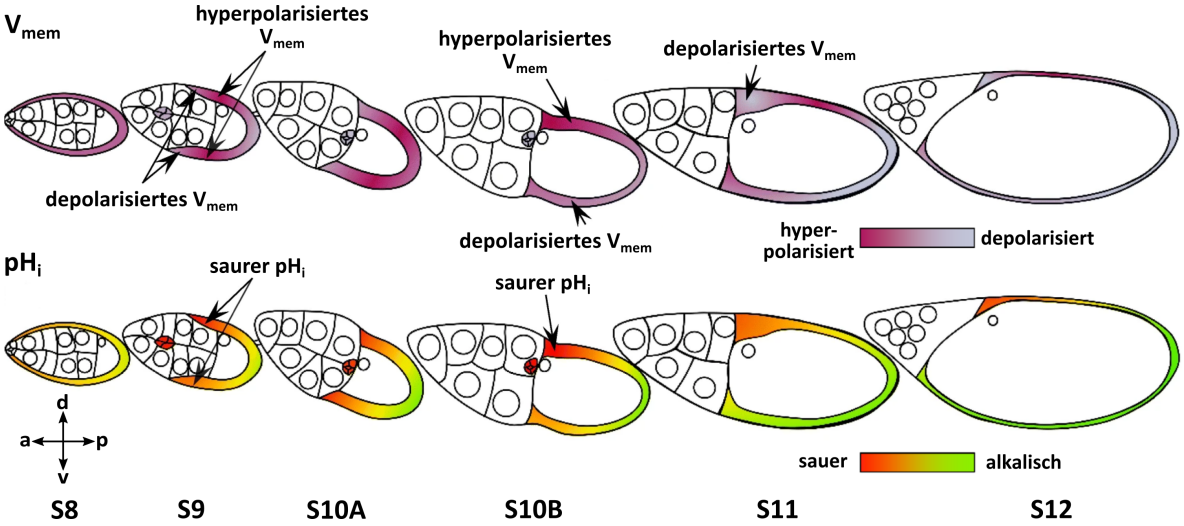


Abbildung 1.5: Stadienspezifische V_{mem}- und pH_i-Muster im FE von S8 bis S12. V_{mem}: Ab S9 entwickelt sich ein A-P-V_{mem}-Gradient im FE mit hyperpolarisierten HFZ (rot) im Vergleich zu benachbarten depolarisierten zFZ und pFZ (grau). Ab S10B manifestiert sich zusätzlich zu diesem A-P-Gradienten auch ein D-V-V_{mem}-Gradient mit überwiegend hyperpolarisierten dorsalen FZ (rot) und depolarisierten ventralen FZ (grau). Die Polarität dieses Gradienten kehrt sich in späten S10B/11-Follikeln um (depolarisierte dorsale zFZ). **pH_i:** Auch bezüglich des pH_i etabliert sich ab S9 ein A-P-Gradient mit dem alkalischsten pH_i (grün) in den pFZ. Dieser wird ebenfalls ab S10B von einem D-V-Gradienten mit einem sauren pH_i (rot) in dorsalen FZ und einem alkalischen pH_i in ventralen FZ begleitet. Modifizierte Abb. aus Weiß und Bohrmann (2019a).

1.4.3 Stadienspezifische Verteilungs- bzw. Aktivitätsmuster von Ionentransportmechanismen

Die elektrochemischen Gradienten korrelieren mit Verteilungs- bzw. Aktivitätsmustern von Ionentransportmechanismen im Follikel (Krüger, 2014; Krüger und Bohrmann, 2015; Lautemann und Bohrmann, 2016; Weiß und Bohrmann, 2019b). Beispielsweise wurde passend zu den D-V-Gradienten eine asymmetrische Verteilung der V-ATPasen

im FE von S9 bis S10B ermittelt. Dabei war eine größere Menge von V-ATPasen auf der ventralen Seite des FE vorhanden. V-ATPasen sind in lateralen und apikalen FZ-Membranen sowie in NZ-Membranen und im Oolemma vorzufinden.

Auch das Verteilungs- bzw. Aktivitätsmuster von spannungsabhängigen Typ-L Ca^{2+}-Kanälen weist Ähnlichkeiten zu den beobachteten V_{mem}-Mustern auf: In den Stadien S9 und S10A sind höhere Konzentrationen an aktiven Ca^{2+}-Kanälen in zFZ und pFZ festzustellen. Die stärkste Konzentration zeigen BC und pFZ in S9. In S10B besitzt das ventrale FE passend zum beobachteten D-V-Gradienten eine höhere Konzentration an aktiven Ca^{2+}-Kanälen. Die zFZ, welche in S10B zwischen NZ und Ooz entlang der D-V-Achse einwandern, sind besonders durch Gap Junctions, die Innexin 3 (Inx3) enthalten, miteinander gekoppelt. Passend zum A-P-Gradienten in den NZ wurde während S9 bis S10B ein korrespondierendes Muster aus Amilorid-sensitiven Na^+-Kanälen identifiziert (Krüger, 2014; Krüger und Bohrmann, 2015).

1.4.4 Einfluss bioelektrischer Eigenschaften auf die Organisation des Zytoskeletts im FE

Weiß und Bohrmann (2019a) untersuchten das Zytoskelett in vitellogenen *Drosophila*-Follikeln und stellten stadienspezifische bMF- und MT-Muster fest (Kap. 1.3.2 und Abb. 1.4), die sowohl räumlich als auch zeitlich mit stadienspezifischen V_{mem}- und pH_i-Mustern korrelieren (Abb. 1.5).

Um herauszufinden, ob Veränderungen in der Zytoskelett-Organisation direkt auf Änderungen der bioelektrischen Eigenschaften zurückzuführen sind, wurden Ionentransportmechanismen mit Hilfe spezifischer Inhibitoren blockiert. Es konnte zunächst gezeigt werden, dass jeder dieser Inhibitoren Einfluss auf das V_{mem} und/oder den pH_i und die entsprechenden A-P- und D-V-V_{mem}- und pH_i-Gradienten nimmt. Eine Inhibition der NHEs/Na^+-Kanäle (Amilorid) und Typ-L Ca^{2+}-Kanäle (Verapamil) hatte eine relative Hyperpolarisation zur Folge, während eine Inhibition der $Na^+/K^+/2Cl^-$-Cotransporter (Furosemid), ATP-abhängigen K^+-Kanäle (Glibenclamid), Cl^--Kanäle (9-Anthracencarbonsäure) und V-ATPasen (Bafilomycin A1) zu einer schwachen Hyperpolarisation oder zu keinem eindeutigen Effekt auf das V_{mem} führte. Bezüglich des pH_i bewirkte eine Inhibition der $Na^+/K^+/2Cl^-$-Cotransporter (Furosemid), ATP-abhängigen K^+-Kanäle (Glibenclamid), Cl^--Kanäle (9-Anthracencarbonsäure) und Typ-L Ca^{2+}-Kanäle eine relative Alkalisierung, während eine Inhibition der NHEs/Na^+-Kanäle (Amilorid) sowie V-ATPasen (Bafilomycin) eine relative Azidifizierung des FE zur Folge hatte (Weiß und Bohrmann, 2019b).

Verschiedene Inhibitoren führten ferner zu vergleichbaren Effekten auf das Zytoskelett.

Daraus kann der Schluss gezogen werden, dass ähnliche Veränderungen in der Organisation des Zytoskeletts auf ähnliche Änderungen der bioelektrischen Eigenschaften zurückzuführen sind und nicht, wie vermutet werden könnte, auf die Wirkung spezifischer Ionen (Weiß und Bohrmann, 2019a). Zusammenfassend stellen Weiß und Bohrmann (2019a) fest, dass einer Alkalisation ein stabilisierender Einfluss auf die parallele transversale bMF-Anordnung zugeschrieben werden kann und diese eine longitudinale MT-Anordnung verhindert. Im Gegensatz hierzu führt eine Azidifizierung zu bMF-Kondensationen und anschließendem Abbau der bMF. Eine longitudinale Anordnung der MT wird durch eine Azidifizierung in Verbindung mit einer Hyperpolarisation unterstützt, wohingegen eine Depolarisation mit dem Abbau der bMF korreliert.

1.5 Ionentransportmechanismen

1.5.1 Na^+/H^+-Antiporter (NHEs) und Amilorid-sensitive Na^+-Kanäle

Die DEG/ENaC (Degenerin/epithelialer Na^+-Kanal)-Familie stellt mit ihren 31 Mitgliedern eine der größten Ionenkanal-Familien bei *Drosophila* dar (Zelle et al., 2013). Mitglieder der Vertebraten-ENaC-Familie vermitteln die Absorption von Na^+ über die apikale Membran diverser Epithelien und spielen somit eine wichtige Rolle bei der Na^+-Homöostase (Adams et al., 1998; Kellenberger und Schild, 2002). Gene dieser Familie (*pickpocket*-Gene) werden in Gonaden und Neuronen von *Drosophila* exprimiert (Adams et al., 1998; Darboux et al., 1998; Kellenberger und Schild, 2002). Eine besonders starke Expression im Ovar weist die DEG/ENaC-Untereinheit (UE) *ripped pocket* (*rpk*; auch *dGNaC1*) auf (Zelle et al., 2013). Aus diesem Grund wird eine wichtige Funktion dieses Kanals während der Oogenese angenommen (Darboux et al., 1998; Mano und Driscoll, 1999).

Es wurde gezeigt, dass Amilorid-sensitive Na^+-Kanäle, darunter auch die Mitglieder der DEG/ENaC-Familie, an einigen sehr frühen Ereignissen in der Entwicklung beteiligt sind. Beispielsweise verhindern sie Polyspermie bei der Fertilisation von *Xenopus*-Eiern und sind bei der Bildung des Blastocoels in Vertebraten involviert (Mano und Driscoll, 1999). Amilorid, ein Diuretikum, agiert als reversibler Inhibitor dieser Na^+-Kanäle sowie der Na^+/H^+-Antiporter (Na^+/H^+-*exchanger*, NHEs), indem es den Eintritt von Na^+-Ionen verhindert (Wieczorek, 1992; Adams et al., 1998; Kellenberger und Schild, 2002).

NHEs sind Transmembranproteine, die den elektroneutralen Austausch von extrazellulärem Na^+ und intrazellulären H^+ katalysieren. Gemäß eines Modells energetisieren

vakuoläre H^+-ATPasen (V-ATPasen) diesen Transport in den Plasmamembranen von Insekten-Epithelien, indem sie einen H^+-Gradienten erzeugen, der NHEs und K^+/H^+-Antiporter antreibt (Wieczorek et al., 1991; Wieczorek, 1992). In Vertebraten sind 10 NHE-Isoformen bekannt, die für pH-Homöostase, Regulation des Zellvolumens sowie transepithelialen Na^+-Transport verantwortlich sind (Giannakou und Dow, 2001; Valles et al., 2015). NHE1, ein ubiquitär exprimiertes Plasmamembranprotein, übernimmt eine entscheidende Rolle bei der Kontrolle des pH_i. Durch seinen nach außen gerichteten H^+-Transport trägt es maßgeblich zum Schutz der Zelle bei, indem es eine Azidifizierung des Zytoplasmas verhindert. Daneben wird NHE1 mit einer Reihe von Zytoskelett-assoziierten Funktionen in Verbindung gebracht (Putney et al., 2002; Watts et al., 2005; Valles et al., 2015).

Die *Drosophila*-NHE-Familie besteht aus den drei Na^+/H^+-Antiportern Nhe1-3. Gene dieser Familie weisen, ähnlich dem humanen NHE1, eine ubiquitäre Expression im Kopf, Körper und in den Malpighischen Gefäßen sowie in allen Entwicklungsstadien auf (Giannakou und Dow, 2001). Damit scheinen auch sie essentielle zelluläre Funktionen zu übernehmen.

1.5.2 Vakuoläre H^+-ATPasen (V-ATPasen)

Protonen-pumpende vakuoläre H^+-ATPasen (V-ATPasen) treiben aktiv sekundäre Transportprozesse in apikalen Membranen nahezu aller epithelialer Gewebe von Insekten an (Wieczorek et al., 1991; Allan et al., 2005). Daneben werden sie für die Azidifizierung zytoplasmatischer Vesikel in *Drosophila*-Follikeln benötigt (Krüger und Bohrmann, 2015). Sie bestehen aus zwei funktionalen Domänen: einer katalytischen V_1- und einer Transmembran-V_o-Domäne. Die V_1-Domäne ist auf der zytoplasmatischen Seite der Plasmamembran lokalisiert, besteht aus acht verschiedenen UE (A-H) und ist für die ATP-Hydrolyse verantwortlich. Die membranständige V_o-Domäne hingegen besteht aus den UE a-e und ist für die Translokation von Protonen zuständig (Wieczorek et al., 1991). Auf diese Weise wird die Energie aus der ATP-Hydrolyse für die Etablierung eines Protonengradienten genutzt (Maxson und Grinstein, 2014).

Im *Drosophila*-Genom codieren 31 Gene für die 14 UE der V-ATPase (Dow et al., 1997; Dow, 1999; Allan et al., 2005). Somit zählt die V-ATPase-Familie, zusammen mit der DEG/ENaC-Familie, zu den größten Familien von Ionentransportmechanismen in *Drosophila*. Mit Ausnahme der UE B,C,E,G und H und den akzessorischen UE vhaAC45 und vhaM8.9 werden alle UE durch mehr als zwei Gene codiert (Allan et al., 2005). Der genetische Knockout des Gens *vha55*, welches für die V-ATPase UE B codiert, führt zu einem larval-lethalen Phänotyp (Davies et al., 1996). Verbunden mit einer starken

Expression der V-ATPasen in Ovarien ist dieser ein Beleg für die Relevanz von V-ATPasen in der Entwicklung von *Drosophila* (Bohrmann und Braun, 1999; Lautemann und Bohrmann, 2016).

Bohrmann und Braun (1999) nehmen eine Beteiligung von V-ATPasen bei der Generierung bioelektrischer Signale an. Insbesondere die verstärkte Lokalisation von V-ATPasen auf einer Seite des FE deutet auf eine entsprechende regulatorische Funktion bei der Organisation räumlicher Koordinaten hin (Krüger und Bohrmann, 2015; Lautemann und Bohrmann, 2016). Durch eine Beteiligung am Aufbau von Gap Juntions könnten V-ATPase-UE auch Einfluss auf die Weiterleitung bioelektrischer Signale nehmen. Dieser Vermutung entsprechend konnte mit Hilfe von Mikroinjektionsexperimenten belegt werden, dass Antikörper gegen Ductin, der V-ATPase Untereinheit c (Vha16-1), den Austausch zwischen Keimbahnzellen und FZ blockieren (Bohrmann, 1993; Bohrmann und Lämmel, 1998). Neuere Arbeiten zeigen, dass V-ATPasen auch für eine Notch- und Wingless-Signalgebung benötigt werden (Hermle et al., 2010; Vaccari et al., 2010; Tognon et al., 2016).

1.5.3 Glibenclamid-sensitive ATP-abhängige K^+-Kanäle

ATP-abhängige K^+-Kanäle (K_{ATP}) gehören zur Familie der *inwardly rectifying potassium channels* (Kir, einwärts gerichtete K^+-Kanäle). Mitglieder dieser Familie werden mit verschiedenen humanen Entwicklungsdefekten in Verbindung gebracht. Beispielweise konnten Zusammenhänge zwischen Mutationen im humanen *KCNJ2*-Gen, welches für den *inwardly rectifying* K^+-Kanal Kir2.1 codiert, und dem Andersen-Tawil-Syndrom sowie dem fetalen Alkoholsyndrom hergestellt werden (Plaster et al., 2001; Bates, 2013; Adams et al., 2016). Auch in anderen Spezies, wie beispielweise Mäusen, Fröschen und *Drosophila*, führt ein in seiner Funktion beeinträchtiger Kir2.1-Kanal zu Defekten in der Morphogenese. Daraus lässt sich ableiten, dass die Funktion der Kir-Kanäle in Entwicklungsprozessen einen in der Evolution konservierten Regulationsmechanismus darstellt (Zaritsky et al., 2000; Dahal et al., 2012; Adams et al., 2016; Dahal et al., 2017; George et al., 2019).

Das *Drosophila*-Genom besitzt drei zum humanen Kir2.1-Kanal homologe Gene, Irk1-3 (Döring et al., 2002). Durch Verbindung eines Sulfonylharnstoff-Rezeptors (SURx; ABC-Transporter-Familie) mit der porenbildenden Kir6.x-UE (Inagaki et al., 1995; Aguilar-Bryan et al., 1998) sind diese Ionenkanäle dazu in der Lage, Stoffwechselvorgänge mit V_{mem}-Änderungen erregbarer Zellen[4] und der von Epithelzellen zu koppeln

[4] z. B. β-Zellen des Pankreas, Muskelzellen des Herzens, Zellen der glatten und Skelettmuskulatur und Neuronen

(Ashcroft, 1988; Nasonkin et al., 1999). K_{ATP} bilden Oktamer-Komplexe aus vier porenbildenden Kir-UE und vier SURx-UE, welche die Öffnung des Kanals regulieren (Clement et al., 1997).

In Säugetieren übernehmen K_{ATP}-Kanäle eine regulierende Funktion bei der Insulinsekretion (Babenko et al., 1998). Eine derartige Funktion ist auch in der *Drosophila*-Oogenese bekannt: Ein großer ATP/ADP-Quotient, welcher sich aus einer Zunahme der Glucose-Verfügbarkeit ergibt, erhöht durch Schließung der K_{ATP}-Kanäle und anschließende Insulin-Freisetzung die Proliferationsrate von somatischen und Keimbahnstammzellen des Ovars (Drummond-Barbosa und Spradling, 2004). Sulfonylharnstoffe, wie das Antidiabetikum Glibenclamid und rekombinantes α-Endosulfin, sind ebenfalls dazu in der Lage, an diese Kanäle zu binden und eine Schließung herbeizuführen (Ashcroft, 1988; Nasonkin et al., 1999; Ball et al., 2000; Drummond-Barbosa und Spradling, 2004).

Ein weiterer K^+-Kanal, der in erregbaren Geweben von *Drosophila* nachweisbar ist (Goldstein et al., 1996), jedoch nicht mit Hilfe von Glibenclamid inhibiert werden kann, wird vom *open rectifier K^+ channel 1* (*ork1*)-Gen codiert. Gemäß der FlyAtlas-Genexpressionsdatenbank ist eine verstärkte Expression dieses Ionenkanals auch im *Drosophila*-Ovar nachweisbar und somit eine Funktion im Verlauf der Oogenese wahrscheinlich. Ork1 gehört zur Familie der *two pore open rectifier K^+ channels* (auswärts gerichtete K^+-Kanäle). Diese unterscheidet sich von der Superfamilie der Kir-Kanäle durch zwei im Tandem vorliegende Poren-Domänen (P-Domänen) (Ketchum et al., 1995; Goldstein et al., 1996). Mitglieder dieser Familie tragen zur Regulation des Ruhepotentials bei (Lalevée et al., 2006). Zusätzlich sind Funktionen bei der Regulation des Kurzzeitgedächtnisses und der Schlafzeiten sowie bei der Kontrolle des Herzrhythmus bekannt (Lalevée et al., 2006; Zhang et al., 2017).

1.5.4 Spannungsabhängige Typ-L Ca^{2+}-Kanäle

Ca^{2+}-Ionen sind als *second messenger* an zahlreichen Prozessen, wie Achsenbildung, Differenzierung und Proliferation, während der Entwicklung multizellulärer Organismen beteiligt. Durch ihren Einfluss auf *downstream* gelegene Signalwege sind sie in der Lage, diese Prozesse entscheidend zu beeinflussen (Kume et al., 1997; Berridge et al., 2000; Splawski et al., 2004; Clapham, 2007; Atsuta et al., 2019). Spannungsabhängige Ca^{2+}-Kanäle könnten in diesen Prozessen von besonderer Bedeutung für die Überführung bioelektrischer Signale (V_{mem}- und pH_i-Änderungen bzw. elektrochemische Gradienten) in zelluläre Antworten sein (Cho et al., 1999; Krüger und Bohrmann, 2015; Atsuta et al., 2019; George et al., 2019). In *Drosophila*-Follikeln wurde übereinstimmend mit dieser Annahme festgestellt, dass aktive spannungsabhängige Typ-L

Ca^{2+}-Kanäle eine asymmetrische Verteilung im FE aufweisen, die den ermittelten A-P und D-V elektrochemischen Gradienten entspricht (Kap. 1.4.3; Krüger und Bohrmann, 2015; Weiß und Bohrmann, 2019b). Hohe intrazelluläre Ca^{2+}-Konzentrationen wirken sich darüber hinaus auf die Gap Junction-vermittelte Zell-Zell-Kommunikation aus und könnten über diesen Weg auch die bioelektrischen Signale und deren Weiterleitung in *Drosophila*-Follikeln beeinflussen (Bohrmann und Haas-Assenbaum, 1993).

Stromal interaction molecules (STIM) aktivieren in ihrer Funktion als Ca^{2+}-Sensoren des endoplasmatischen Retikulums speichergesteuerte Ca^{2+}-Kanäle (SOC-Kanäle) in der Plasmamembran (Eid et al., 2008). Auf diese Weise sorgen sie für ein Ca^{2+}-Gleichgewicht in der Zelle und sind damit wesentlich an der Aufrechterhaltung der Calciumsignalgebung beteiligt. Entsprechend werden Mutationen in *stim*-Genen mit Defekten in der Entwicklung verschiedener Spezies assoziiert (Misceo et al., 2014; George et al., 2019).

Spannungsabhängige Ca^{2+}-Kanäle in *Drosophila* bestehen aus einer porenbildenden α-Untereinheit, welche wiederum in die Subtypen L, G und T unterteilt wird, sowie akzessorischen β- und $\alpha 2\delta$-UE (Littleton und Ganetzky, 2000). Spannungsabhängige Ca^{2+}-Kanäle des L-Typs zeichnen sich durch eine niedrige spannungsabhängige Inaktivierung aus und können von Phenylalkylaminen, wie Verapamil-HCl, spezifisch inhibiert werden (Hockerman et al., 1997). Eine Depolarisation sowie eine Hyperpolarisation reduzieren die Bindeaffinität von Verapamil, während ein inaktiver Kanal die Bindeaffinität des Inhibitors erhöht (Rakotoarisoa et al., 1990; Krüger und Bohrmann, 2015).

1.5.5 $Na^+/K^+/2Cl^-$-Cotransporter

$Na^+/K^+/2Cl^-$-Cotransporter stellen durch einen elektroneutralen Transport die Verfügbarkeit von Na^+-, K^+- und Cl^--Ionen in der Zelle sicher. Diese Ionen werden für den zellulären Wasser- und Elektrolythaushalt sowie zur Regulation des Zellvolumens benötigt. In Verbindung mit anderen Ionentransportmechanismen, einschließlich Na^+- und K^+-Kanälen sowie der Na^+/K^+-Pumpe, ermöglichen $Na^+/K^+/2Cl^-$-Cotransporter außerdem transepithelialen NaCl-Transport. Durch den von ihnen vermittelten Cotransport im stöchiometrischen Verhältnis 1:1:2 sind sie entscheidend an der Regulation von Ionengradienten beteiligt (Haas, 1994).

In *Drosophila*-Follikeln konnte gezeigt werden, dass diese Ionentransportmechanismen an der Regulation des V_{mem} und pH_i im FE beteiligt sind und eine Inhibition dieser Cotransporter A-P- und D-V-pH_i-Gradienten deutlich beeinflusst (Weiß und Bohrmann, 2019b). Als spezifischer Inhibitor der $Na^+/K^+/2Cl^-$-Cotransporter fungiert das Schleifendiuretikum Furosemid, welches, als Medikament eingesetzt,

$Na^+/K^+/2Cl^-$-Cotransporter in den Nieren inhibiert (Haas, 1994). In *Drosophila* werden $Na^+/K^+/2Cl^-$-Cotransporter vom *NKCC*-Gen codiert und sind in vielen Epithelien angereichert (Chintapalli et al., 2013).

1.5.6 Cl^--Kanäle

Alle Epithelien von *Drosophila* weisen hohe Expressionslevel eines oder mehrerer Mitglieder der ClC oder CLIC Cl^--Kanalfamilien auf. Spannungsabhängige Cl^--Kanäle gehören zur ClC-Familie, die in *Drosophila* durch insgesamt 3 Vertreter (CLC-a, CLC-b und CLC-c) repräsentiert wird (Chintapalli et al., 2013). Auch pH-sensitive Cl^--Kanäle, die durch extrazelluläre Protonen inhibiert werden (Schnizler et al., 2005), könnten an der Weiterleitung bioelektrischer Signale zwischen Zellen beteiligt sein.

Basierend auf ihrer Lokalisation in Plasmamembranen und intrazellulären Organellen übernehmen Cl^--Kanäle Funktionen bei der Ionenhomöostase, bei der Zellvolumenregulation, beim transepithelialen Transport von Ionen sowie bei der Regulation elektrischer Erregbarkeit (Jentsch et al., 2002; Chintapalli et al., 2013). Die physiologische Relevanz von Cl^--Kanälen in zellulären Prozessen und während der Entwicklung ist durch die Vielzahl vererbbarer Krankheiten, die auf Mutationen in Cl^--Kanälen zurückzuführen sind, belegt (Fisher et al., 1994; Fahlke et al., 1997; Simon et al., 1997; Turcios, 2005). Eine Relevanz von Cl^--Kanälen bei der Generierung bioelektrischer Signale in *Drosophila*-Follikeln wurde bereits mit Hilfe des Cl^--Kanal-spezifischen Inhibitors 9-Anthracencarbonsäure (9-AC) bestätigt (Weiß und Bohrmann, 2019b).

1.5.7 Gap Junctions

Sowohl Zellen des Somas als auch der Keimbahn sind in *Drosophila*-Follikeln durch Gap Junctions miteinander verbunden (Giorgi und Postlethwait, 1985; Bohrmann und Haas-Assenbaum, 1993). Gap Junctions nehmen in diesen Zellen eine entscheidende Rolle bei der Weitergabe bioelektrischer Signale (V_{mem} und pH_i) ein (Krüger und Bohrmann, 2015) und ermöglichen es, entwicklungsbiologische sowie physiologische Prozesse zu koordinieren (Tazuke et al., 2002; Gilboa et al., 2003; Sahu et al., 2017).

Mitglieder der Innexin-Familie erwiesen sich als die Hauptvertreter der Gap Junction-Proteine in Invertebraten (Bauer et al., 2005; Phelan, 2005). Von insgesamt acht bekannten Vertretern der Innexine in *Drosophila* konnten Inx1,2,3,4 und 7 auch im Ovar nachgewiesen werden (Stebbings et al., 2002). Inx1-4 sind nachweislich an der Bildung verschiedener Typen von Gap Junctions beteiligt (Bohrmann und Zimmermann, 2008). Während Inx1 (auch als *ogre* bekannt) ausschließlich im basolateralen Bereich der FZ lokalisiert ist, sind Inx2 und Inx3 sowohl in FZ als auch in Keimbahnzellen (Ooz und

NZ) lokalisiert. Keimbahnspezifisches Inx4 (*zpg*) hingegen ist ausschließlich im Oolemma und in Nährzellmembranen lokalisiert (Stebbings et al., 2002; Tazuke et al., 2002; Bohrmann und Zimmermann, 2008; Lautemann und Bohrmann, 2016).

Verschiedene Autoren (Bohrmann, 1993; Finbow et al., 1995; Bohrmann und Lämmel, 1998) nehmen an, dass weitere Proteine, wie Ductin, welches der Untereinheit c der V-ATPase entspricht, ebenfalls an der Bildung von Gap Junctions beteiligt sind und somit auch eine Funktion bei der Weiterleitung bioelektrischer Signale einnehmen. Eine entsprechende Colokalisation zwischen Inx2, Inx3 und Ductin ist für *Drosophila*-Follikel belegt (Lautemann und Bohrmann, 2016). Auch in zahlreichen anderen Spezies wurden Gap Junctions eine entscheidende Funktion bei der Organisation entwicklungsbiologischer Prozesse, wie Musterbildung, Morphogenese und Gewebehomöostase, zugeordnet (Levin, 2007; Cervera et al., 2018).

1.6 Genetisch codierte Sensoren zur Analyse elektrochemischer Eigenschaften

Genetisch codierte Sensoren bieten einige Vorteile gegenüber spannungs- und pH-sensitiven Fluoreszenzfarbstoffen: In Verbindung mit dem Gal4-UAS-System von *Drosophila* ermöglichen sie die Untersuchung elektrochemischer Eigenschaften in einem Gewebe der Wahl ohne störende Einflüsse durch angrenzende Zellen, wie sie bei Fluoreszenzfarbstoffen auftreten (z. B. Effekte durch Überbelichtung). Genetisch codierte Sensoren zeichnen sich zudem durch eine reduzierte Sensitivität gegenüber *photobleaching* aus. Diese Eigenschaft in Verbindung mit einer stabilen Expression des Sensors ermöglicht *in vivo*-Langzeitstudien. Auch einige praktische Vorteile ergeben sich aus der Verwendung genetisch codierter Sensoren, da Inkubationszeiten und mögliche unerwünschte Interaktionen mit anderen Substanzen entfallen (Osterwalder et al., 2001; Cao et al., 2013; Lin und Schnitzer, 2016).

Die Grundlage der in dieser Arbeit verwendeten genetisch codierten Sensoren bildet das pH-sensitive WT-GFP aus *Aequorea victoria* (Tsien, 1998). Das Anregungsspektrum dieses WT-GFP ändert sich jedoch kaum zwischen pH 5,5 und pH 7,5 (Abb. 1.6a), weshalb es ungeeignet für die Darstellung von pH-abhängigen Fluoreszenzintensitätsunterschieden im sauren bis alkalischen Bereich ist. Miesenböck et al. (1998) entwickelten neue GFP-Varianten (*green fluorescent protein-based sensors*, pHluorins) mit reduzierter Fluoreszenz bei pH 5,5 (dunkel oder *ecliptic*, Abb. 1.6b). Weitere Mutationen aus EGFP führten zur Verbesserung der Eigenschaften dieses pHluorins und zur Entwicklung von superekliptischem pHluorin (*superecliptic* pHluorin; Sankaranara-

yanan et al., 2000; Mahon, 2011; Lin und Schnitzer, 2016). Superekliptisches pHluorin zeigt bei saurem pH eine sehr geringe Fluoreszenzintensität, während es bei alkalischem pH erhöhte Fluoreszenzintensitäten aufweist.

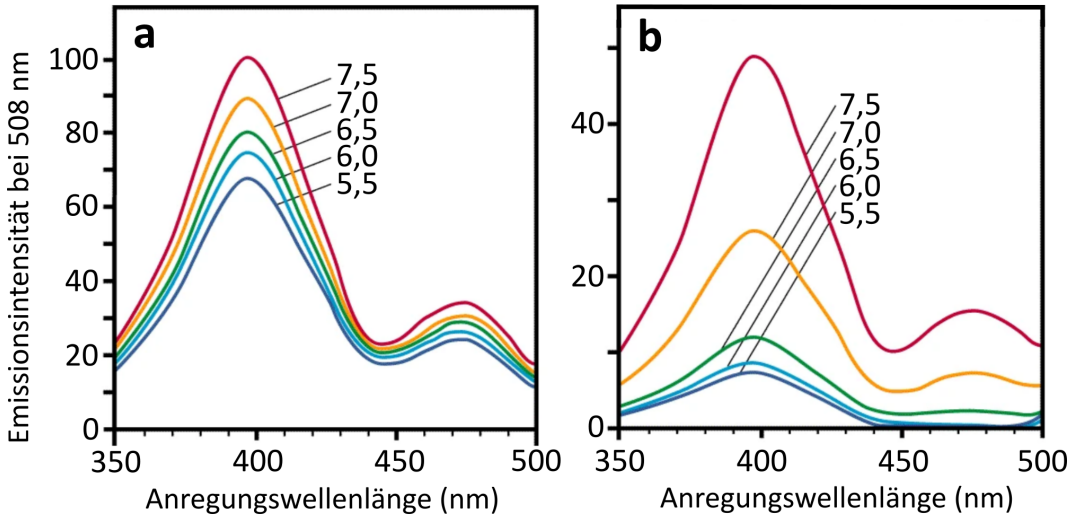


Abbildung 1.6: Vergleich der Anregungsspektren von GFP und ekliptischem pHluorin. Dargestellt sind die Anregungsspektren von GFP (**a**) und ekliptischem pHluorin (**b**). **a:** Beim WT-GFP unterscheidet sich die Emissionsintensität nach Anregung der Fluoreszenz bei 400 nm im Bereich der pH-Werte 5,5 bis 7,5 kaum. **b:** Die Entwicklung des GFP-Derivats *ecliptic* pHluorin führt zu einer deutlichen Reduzierung der Emissionsintensitäten im sauren Bereich (pH 5,5) und somit zur verbesserten Darstellung von pH-abhängigen Fluoreszenzintensitätsunterschieden. Modifizierte Abb. aus Miesenböck et al. (1998).

Den ersten genetisch codierten spannungssensitiven Sensor, bestehend aus einer Fusion von GFP mit dem Shaker K^+-Kanal, entwickelten Siegel und Isacoff (1997). Dieser Sensor eignete sich jedoch nicht für die Darstellung von Aktionspotentialen. Dimitrov et al. (2007) fanden heraus, dass dieser durch Einsatz der *voltage-sensing domain* (VSD) der *voltage-sensitive phosphatase* aus *Ciona intestinalis* verbessert werden kann. Die meisten der eingesetzten Sensoren, wie auch das hier verwendete ArcLight-Konstrukt, basieren auf einer Fusion dieser Domäne oder eines Ionenkanals mit einem Fluoreszenzprotein (Kulkarni und Miller, 2017). ArcLight besteht aus einer Fusion der VSD mit superekliptischem pHluorin. Eine spannungsabhängige Konformationsänderung der VSD, infolge einer Depolarisation, führt bei ArcLight zu einer Dimerisierung des superekliptischen pHluorins und zu einer Abnahme der Fluoreszenz. Eine Hyperpolarisation hingegen bewirkt eine Zunahme der Fluoreszenz (siehe auch Kap. 2.6 Abb. 2.5).

Das für die Analyse des pH_i verwendete Konstrukt pHMA, besteht aus einer Fusion des pH-sensitiven GFP-Derivats pHluorin und der Aktin-Bindedomäne von Moesin.

Dadurch ist pHluorin-Moesin, wie auch ArcLight, in Zellmembranen lokalisiert (Fishilevich et al., 2010; Cao et al., 2013; Lin und Schnitzer, 2016).

1.7 Ziele der Arbeit

In letzter Zeit häufen sich in der Fachliteratur Hinweise, welche für eine zentrale Rolle bioelektrischer Signale bei der Regulation von Entwicklungsprozessen sprechen. Die exakten Mechanismen dieser Regulation, einschließlich der ihnen zugrundeliegenden Ionentransportmechanismen und beteiligten Signalwege, sind in vielen Fällen jedoch noch nicht identifiziert oder umfassend geklärt. Diese Arbeit soll dazu dienen, einige dieser Wissenslücken zu schließen und Erkenntnisse, welche unter Verwendung anderer Methoden gewonnen worden sind, einer erneuten Bewertung durch genetisch basierte Methoden zu unterziehen.

Untersuchungen an verschiedenen Organismen belegen beispielsweise, dass bioelektrische Signale an der Achsenbildung beteiligt sind (Levin et al., 2002; Aw et al., 2010; Beane et al., 2011; Pai et al., 2012; Beane et al., 2013) und legen die Existenz von Korrelationen zwischen bioelektrischer Polarität, Zytoskelettpolarität und Achsenpolarität nahe. Ein erstes Ziel der Arbeit bestand darin, diese bereits seit längerem vermuteten Korrelationen in der Achsenpolaritätsmutante *grk* zu belegen. Zu diesem Zweck wurden WT- und *grk*-Follikel hinsichtlich ihrer bioelektrischen Signale sowie der Organisation ihres Zytoskeletts miteinander verglichen. Ein potentiometrischer Fluoreszenzfarbstoff und ein pH-sensitiver Fluoreszenzfarbstoff wurden dabei zur Charakterisierung von V_{mem} und pH_i verwendet. Eine Analyse der Zytoskelettorganisation von WT- und *grk*-Follikeln erfolgte mit Hilfe von F-Aktin-Färbungen mit fluoreszierendem Phalloidin und indirekten Immunfluoreszenzfärbungen der MT mit einem monoklonalen Antikörper gegen acetyliertes α-Tubulin.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit bestand darin, mit Hilfe eines RNAi-Knockdown-Screens einige der Ionentransportmechanismen ausfindig zu machen, die über V_{mem}- und pH_i-Änderungen im FE die Entwicklung des Ovars und/oder die Oogenese beeinflussen. Unter Verwendung genetisch codierter V_{mem}- und pH_i-Sensoren sowie spezifischer Inhibitoren verschiedener Ionentransportmechanismen sollten zudem frühere Ergebnisse, die mittels elektrophysiologischer Ableitungen und Experimenten mit V_{mem}- und pH_i-sensitiven Fluoreszenzfarbstoffen gewonnen worden waren, überprüft und spezifiziert werden. Für diese Analysen wurden ein Mitglied der ArcLight-Familie zur Untersuchung des V_{mem} und pHluorin-Moesin zur Untersuchung des pH_i ausgewählt.

2 Material und Methoden

2.1 *Drosophila melanogaster*-Stämme

Tabelle 2.1: Übersicht über die verwendeten *Drosophila melanogaster*-Stämme

Stamm[1]	**Genotyp**	**Herkunft**
Oregon R	w^a; +; + Wildtyp (WT)	Bloomington Drosophila Stock Center, USA
gurken	+; $\frac{\text{grk}^{\text{HF48}}\text{cn bw}^b}{\text{CyO}}$; +	Labor S. Roth, Universität Köln, Deutschland
gurken	+; $\frac{\text{grk}^{\text{2B6}}\text{b pr cn wx bw}^c}{\text{CyO}}$; +	Labor S. Roth, Universität Köln, Deutschland
Sensoren		
Spannungssensor ($\mathbf{V_{mem}}$-Sensor)		
ArcLight (51056)	w; +; P{y[+t7.7]w[+mC] = UAS-ArcLight}attP2	Bloomington Drosophila Stock Center, USA
$\mathbf{pH_i}$-Sensor		
pHluorin-Moesin (44593)	w^{1118}; $\frac{\text{P\{UAS-pHMA\}1.4 P\{UAS-pHMA\}1.5A}}{\text{CyO}}$; $\frac{\text{TM2}}{\text{TM6B,Tb}}$	Bloomington Drosophila Stock Center, USA

(***Fortsetzung nächste Seite***)

[a] white
[b] cinnabar brown
[c] bar purple cinnabar waxy brown

Tabelle 2.1 ***(Fortsetzung von vorheriger Seite)***

Stamm[1]	**Genotyp**	**Herkunft**
RNAi-Stämme		
Protonenpumpen		
vha55 (v46553)	w^{1118}; +; $\frac{\text{P\{GD9363\}}v46553}{\text{TM3}}$	Vienna Drosophila Research Center, Österreich[2]
vha55 (40884)	*yv*; +; P{TRiP.HMS02132}attP40	Bloomington Drosophila Stock Center, USA
vha16-1 (40923)	*yv*; P{TRiP.HMS02171}attP40; +	Bloomington Drosophila Stock Center, USA
NHEs & Natriumkanäle		
nhe1 (v7245)	w^{1118}; +; P{GD775}*v*7245	Vienna Drosophila Research Center, Österreich
nhe1 (28589)	yv^{a}; +; P{TRiP.HM05077}attP2	Bloomington Drosophila Stock Center, USA
rpk (v8549)	w^{1118}; +; P{GD3621}*v*8549	Vienna Drosophila Research Center, Österreich
rpk (39053)	*yv*; P{TRiP.HMS01973}attP40; +	Bloomington Drosophila Stock Center, USA
Kaliumkanäle		
ork1 (v40953)	w^{1118}; P{GD3306}*v*40953; +	Vienna Drosophila Research Center, Österreich
ork1 (25885)	*yv*; +; P{TRiP.JF01926}attP2	Bloomington Drosophila Stock Center, USA
ork1 (53994)	*yv*; +; P{TRiP.HMJ21398}attP40	Bloomington Drosophila Stock Center, USA

(***Fortsetzung nächste Seite***)

[a] yellow vermillion

Tabelle 2.1 ***(Fortsetzung von vorheriger Seite)***

Stamm[1]	**Genotyp**	**Herkunft**
mri (v17043)	w^{1118}; P{GD7508}v17043; +	Vienna Drosophila Research Center, Österreich
Chloridkanäle		
clc-b (v4642)	w^{1118}; +; $\frac{\text{P\{GD1958\}}v4642}{\text{TM3}}$	Vienna Drosophila Research Center, Österreich
clc-b (51877)	*yv*; P{TRiP.HMC03451}attP40; +	Bloomington Drosophila Stock Center, USA
clc-c (27034)	*yv*; +; P{TRiP.JF02360}attP2	Bloomington Drosophila Stock Center, USA
Calciumkanäle		
stim (v47073)	w^{1118}; +; P{GD16187}v47073	Vienna Drosophila Research Center, Österreich
Innexine		
inx1 (44048)	*y sc* v^a; +; P{TRiP.HMS02764}attP2	Bloomington Drosophila Stock Center, USA
inx2 (42645)	*y sc v*; +; P{TRiP.HMS02481}attP2	Bloomington Drosophila Stock Center, USA
inx3 (60112)	*y sc v*; +; P{TRiP.HMC05106}attP2	Bloomington Drosophila Stock Center, USA
weitere Stämme		
gurken (38913)	*y sc v*; +; $\frac{\text{P\{TRiP.GL00685\}attP2}}{\text{TM3}}$	Bloomington Drosophila Stock Center, USA
Treiberstämme		
tj-Gal4	*w*; *tj*-Gal4; +	Labor S. Roth, Universität Köln, Deutschland

(***Fortsetzung nächste Seite***)

[a]yellow scute vermillion

Tabelle 2.1 ***(Fortsetzung von vorheriger Seite)***

Stamm[1]	**Genotyp**	**Herkunft**
MTD-Gal4	w; $\frac{\text{Sco}^a}{\text{CyO}}$; MTD-Gal4	Labor P. Becker, Universität München, Deutschland
mat-tub-Gal4-GeneSwitch (sh110)	w; $\frac{\text{mat-tub-Gal4-GeneSwitch}-8.1}{\text{CyO}}$; +	N. Lowe, (Labor D. St. Johnston), Cambridge, UK[3]
mat-tub-Gal4-GeneSwitch (sh111)	w; +; $\frac{\text{mat-tub-Gal4-GeneSwitch}-5.2}{\text{TM6B, Hu e Tb}}$	N. Lowe, (Labor D. St. Johnston), Cambridge, UK[3]
mat-tub-Gal4.VP16.3	w; +; mat-tub-Gal4-VP16.3	N. Lowe, (Labor D. St. Johnston), Cambridge, UK[3]
mat-tub-Gal4.VP16.2	w; +; mat-tub-Gal4-VP16.2	N. Lowe, (Labor D. St. Johnston), Cambridge, UK[3]
GFP-Stämme		
myrGFP (58721)	yw; $\frac{\text{M\{UASp-myr.mGFP6\}ZH-51D}}{\text{SM6a}}$; +	Bloomington Drosophila Stock Center, USA[3]
UAST-GFP	w; UAST-GFP.S65T; +	Bloomington Drosophila Stock Center, USA[3]
UAST-GFP	w; +; UAST-GFP.S65T	Bloomington Drosophila Stock Center, USA[3]
UAST-GFP (Valium10-Vektor; 35786)	yv; +; P{UAS-GFP.Valium10}attP2	Bloomington Drosophila Stock Center, USA

[a]scutoid

2.2 Fliegenhaltung

Die Aufzucht und Haltung der Fliegen, welche unmittelbar für Experimente verwendet wurden, erfolgte in röhrenförmigen Zuchtgefäßen im Dunkeln bei 25 °C, da durch die erhöhte Temperatur die Generationszeit der Fliegen verkürzt wird. Alle weiteren

[1]Zur Erläuterung der Genabkürzungen und aller weiteren Abkürzungen siehe Abkürzungs- und Bedeutungsverzeichnis S. 157.
[2]VDRC-Stämme zur Verfügung gestellt von A. Voigt, Universitätsklinikum RWTH Aachen
[3]Zur Verfügung gestellt von S. Huelsmann, Universität Tübingen

Fliegen, die zur Erhaltung des Stammes dienten, wurden bei 18 °C beziehungsweise Raumtemperatur (RT) gehalten. Als Nahrungsquelle diente ein Standard-Nährmedium für *Drosophila* (siehe Tabelle 2.2). Für 1 l Nährmedium wurden die in der Tabelle aufgeführten Zutaten unter ständigem Rühren in 1 l Leitungswasser aufgekocht und nach Abkühlen auf 60 °C mit Nipagin, Propion- und Ascorbinsäure versetzt. Anschließend wurde das Medium in die Zuchtgefäße gegossen und nach Abkühlen auf RT bei 4 °C gelagert.

Tabelle 2.2: Standard-Nährmedium für *Drosophila*[a]

Menge	Zutat
50 g	Maismehl
84 g	frische Bäckerhefe
12 g	Agar
32 g	Zucker
640 µl	10 % (w/v) Nipagin in Ethanol
5 ml	Propionsäure
2 Spatelspitzen	Ascorbinsäure

[a] Gemäß Labor A. Huber, Universität Hohenheim

2.3 Kreuzungen

In Kreuzungen wurden ausschließlich unbegattete weibliche Fliegen verwendet, da bei diesen ausgeschlossen werden kann, dass eine Befruchtung der Eier bereits vor dem Verkreuzen stattgefunden hat. Diese Weibchen können von adulten Weibchen zum einen durch ihre schwache Pigmentierung und zum anderen durch einen dunklen Fleck (larvaler Kot) auf der ventralen Seite des Abdomens sowie einen aufgedunsenen Körper unterschieden werden. Neben diesen Weibchen wurden für die Kreuzungen auch solche Fliegen eingesetzt, die nach Abschütteln der bereits vorhandenen Fliegen innerhalb von 6 h bei 25 °C geschlüpft waren. Bei diesen weiblichen Fliegen ist es nicht notwendig, nach den oben genannten Merkmalen zu selektieren, da die entsprechenden männlichen Fliegen innerhalb dieses Zeitraums noch nicht die Geschlechtsreife erlangt haben und somit nicht zur Begattung in der Lage sind (Ashburner et al., 2005).

Für die Kreuzungen wurden weibliche und männliche Fliegen der gewünschten Genotypen im Verhältnis 3:1 in einem Fliegengefäß zusammengesetzt und im Dunkeln bei 25 °C gehalten. Als zusätzliche Nahrungsquelle und zur Anregung der Oogenese diente in Leitungswasser angerührte frische Hefe, welche auf das Nährmedium gegeben wurde.

2.3.1 Balancerchromosomen

Balancerchromosomen weisen strukturelle Mutationen auf, die ihnen die Fähigkeit verleihen, Crossover mit einem strukturell nicht veränderten Chromosom zu unterdrücken und somit den Verlust eines mutanten Fliegenstamms zu verhindern. Daneben besitzen Balancerchromosomen dominante und rezessive Markermutationen, welche es erlauben, die Anwesenheit des Balancerchromosoms zu überprüfen. Letal- oder Sterilitätsmutationen schließen zusätzlich ein homozygotes Auftreten des Balancerchromosoms und somit von Genotypen, die nicht von der Parentalgeneration (P) abstammen, aus (Ashburner et al., 2005).

In Kreuzungen dieser Arbeit wurden die folgenden Balancerchromosomen zur Verifizierung des korrekten Genotyps der F1-Generation verwendet: CyO (2. Chromosom; verwendete Markermutation Cy (Curly), gebogene Flügel), SM6a (2. Chromosom; Cy, Curly), TM2 (3. Chromosom; Ubx (Ultrabithorax), größere Halteren), TM3 (3. Chromosom; Sb (Stubble); kurze und stumpfe Borsten) und TM6B (3. Chromosom; Hu (Humeral), zusätzliche Borsten am Propleurum und/oder Tb (Tubby), größenreduzierte Larven des 3. Stadiums und Puppen).

2.3.2 Kreuzung zur Erzeugung der transheterozygoten *grk*-Fliegen

Für die Erzeugung von transheterozygoten grk^{HF48}/grk^{2B6}-Fliegen wurden unbegattete Weibchen der Stämme *w; grk^{HF48}/CyO* oder *w; grk^{2B6}/CyO* mit männlichen Fliegen der Stämme *w; grk^{2B6}/CyO* oder *w; grk^{HF48}/CyO* (Abb. 2.1) in einem Fliegengefäß gekreuzt.

$$P: ♀\ \frac{grk^{HF48}\ cn\ bw}{CyO} \times ♂\ \frac{grk^{2B6}\ b\ pr\ cn\ wx\ bw}{CyO} \qquad oder$$

$$P: ♀\ \frac{grk^{2B6}\ b\ pr\ cn\ wx\ bw}{CyO} \times ♂\ \frac{grk^{HF48}\ cn\ bw}{CyO}$$

$$F1: \frac{grk^{HF48}\ cn\ bw}{grk^{2B6}\ b\ pr\ cn\ wx\ bw} + \frac{grk^{2B6}\ b\ pr\ cn\ wx\ bw}{CyO} + \frac{grk^{HF48}\ cn\ bw}{CyO} + \frac{CyO}{CyO}$$

Abbildung 2.1: Kreuzungsschema zur Erzeugung von transheterozygoten *grk*-Fliegen. Für die Erzeugung der Transheterozygoten (blau markiert) wurden ♀ Fliegen der Stämme grk^{2B6} oder grk^{HF48} und ♂ Fliegen mit dem jeweils anderen mutanten Allel verkreuzt (P). Fliegen, die homozygot das Balancerchromosom CyO (rot) tragen, sind aufgrund einer Letalmutation nicht unter den Nachkommen zu finden (F1).

Transheterozygote konnten von heterozygoten Fliegen durch das Vorliegen glatter Flügel und weißer Augen gegenüber *Curly* (gebogene Flügel) sowie der roten Augenfarbe unterschieden werden (Abb. 2.2).

Obwohl es sich bei dem Nullallel grk^{2B6} bereits um das stärkste bekannte *grk*-Allel handelt (Neuman-Silberberg und Schüpbach, 1993; Neuman-Silberberg und Schüpbach, 1994; Thio et al., 2000), führte ausschließlich die transheterozygote Kombination aus den *grk*-Nullallelen grk^{HF48} und grk^{2B6} zu einer 100%-Penetranz von ventralisierten *grk*-Follikeln (siehe Abb. 3.1). Weibliche transheterozygote Nachkommen der F1-Generation (siehe Abb. 2.1) wurden für 2 Tage (ältere *grk*-Ovarien beeinhalteten viele degenerierende Follikel) sowie weibliche WT-Fliegen für 3 Tage auf Standard-Nährmedium mit Frischhefe gehalten.

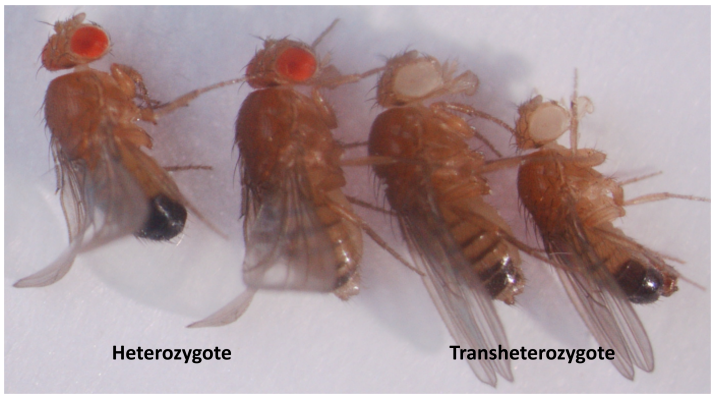


Abbildung 2.2: Phänotypen der *grk*-F1-Generation. Dargestellt sind exemplarisch heterozygote (♂ und ♀) und transheterozygote Fliegen (♀ und ♂). Verwendete transheterozygote *grk*-Fliegen zeichnen sich durch weiße Augen und glatte Flügel aus.

2.3.3 Kreuzungen zur Aktivierung des Gal4-UAS-Systems

Das Gal4-UAS-System ist ein Zwei-Komponenten-System, welches für eine gezielte Genexpression in *Drosophila* entwickelt wurde (Abb. 2.3). Dabei werden transgene Fliegenlinien, die den Transkriptionsfaktor Gal4 aus *Saccharomyces cerevisiae* unter der Kontrolle verschiedener gewebespezifischer Enhancer exprimieren (Treiberstamm), mit sogenannten Effektorlinien (UAS-Stamm) gekreuzt. Diese UAS-Stämme enthalten das Zielgen und sogenannte *Upstream Activating Sequences* (UAS-Elemente), welche durch Gal4 aktiviert werden können und das nachgeschaltete Gen ektopisch exprimieren (Brand und Perrimon, 1993; Duffy, 2002).

Durch Kreuzen der Treiberstämme mit UAS-Stämmen, welche UAS-RNAi-Konstrukte enthalten, kann dieses System ebenfalls zum zielgerichteten Knockdown bestimmter

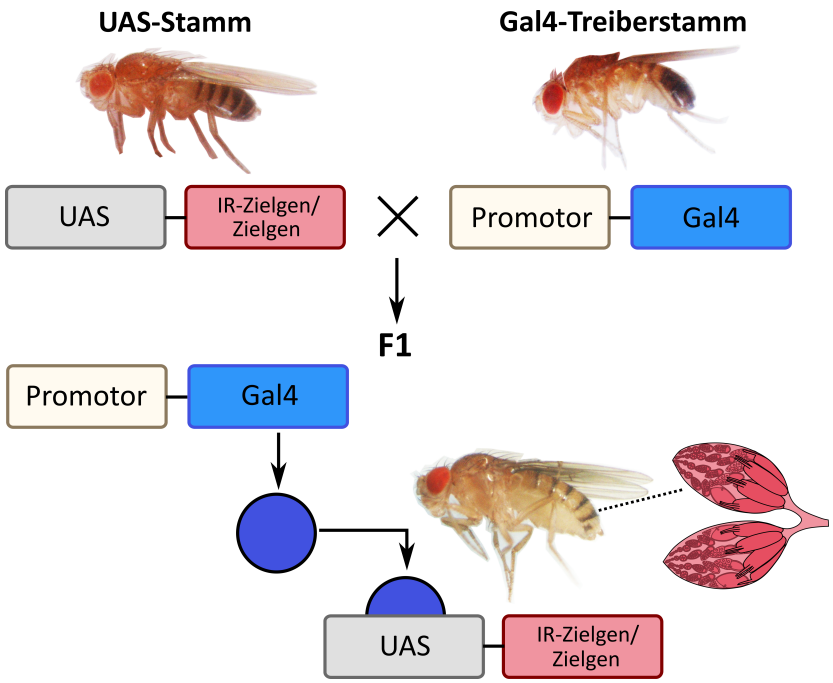


Abbildung 2.3: Verwendung des Gal4-UAS-Systems zur Ovar-spezifischen Expression von Zielgenen bzw. des Ovar-spezifischen RNAi-Knockdowns. Weibliche Fliegen einer UAS-Linie, welche die DNA-Sequenz eines Zielgens oder zueinander revers-komplementäre Nukleotidsequenzen eines Zielgens (*inverted repeats*, IR) unter Kontrolle von *Upstream activating sequences* (UAS-Elemente) tragen, werden zu diesem Zweck mit männlichen Fliegen, welche den Transkriptionsfaktor Gal4 unter Kontrolle eines gewebespezifischen Promotors exprimieren, verkreuzt. In nachfolgenden weiblichen Fliegen der F1-Generation wird das Gal4-Protein (blauer Kreis) gewebespezifisch exprimiert und bindet an die UAS-Elemente. Dies führt in Ovarien dieser Fliegen (rote Ovarien) zur Expression des Zielgens oder zum RNAi-Knockdown eines Zielgens, indem die zueinander revers-komplementären RNAs aneinander binden. Abb. in Anlehnung an Brand und Perrimon (1993) und Bratu und McNeil (2015).

Gene durch RNAi-Interferenz genutzt werden. Hierfür werden revers-komplementäre Nukleotidsequenzen eines Zielgens durch Kreuzen mit entsprechenden Treiberstämmen gewebespezifisch exprimiert. Diese zueinander komplementären doppelsträngigen *long hairpin* RNAs (lhRNA) oder *short hairpin* RNAs (shRNA) aktivieren die zielgerichtete RNA-Interferenz (Dietzl et al., 2007; Ni et al., 2011). Das Gal4-UAS-System wurde in dieser Arbeit zur Expression der genetisch codierten V_{mem}- und pH_i-Sensoren ArcLight und pHluorin-Moesin im FE eingesetzt. Für diesen Zweck wurden diese Stämme mit dem *tj*-Gal4-Stamm verkreuzt. Desweiteren diente das Gal4-UAS-System im RNAi-Knockdown-Screen (siehe Kap. 2.12).

2.4 Präparation der Follikel

Für die folgenden Experimente wurden die weiblichen Fliegen, ohne vorheriges Betäuben, durch Zerquetschen des Kopfes mit einer Pinzette getötet und die paarigen Ovarien mit Hilfe von Pinzetten aus dem Abdomen herauspräpariert. Einzelne Follikel der Stadien S8-12 (Abb. 2.4) wurden dabei durch Ziehen an den Ovariolen aus der Muskelhülle herausgelöst.

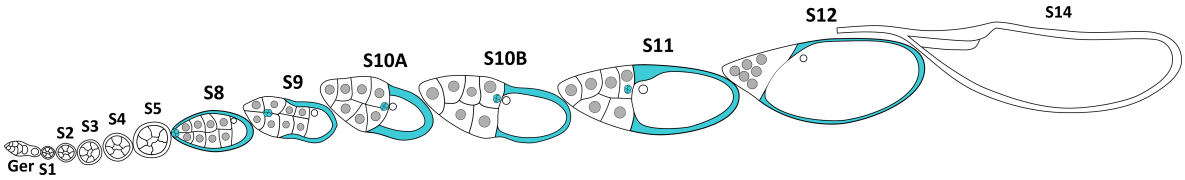


Abbildung 2.4: Untersuchte Stadien der Oogenese. Schematische Darstellung einer Ovariole mit den untersuchten vitellogenen Stadien S8-12. Am anterioren Ende (links) einer jeden Ovariole befinden sich das Germarium (Ger), die Bildungsstätte der Follikel, sowie Follikel prävitellogener Entwicklungsstadien. Jeder Follikel beeinhaltet 16 Keimbahnzellen darunter eine Ooz sowie 15 NZ (in weiß), welche wiederum von einem somatischen FE (in türkis) umgeben sind. Abb. in Anlehnung an Frydman und Spradling (2001).

Die Präparation der Follikel sowie die Zytoskelett-Färbungen (Kap. 2.7) erfolgten in *Drosophila phosphate buffered saline* (DPBS; siehe Tabelle 2.3), Färbungen mit den fluoreszierenden Farbstoffen, Analysen mit den genetischen Sensoren, Inhibitionsexperimente und morphologische Analysen erfolgten in R14-Medium (Robb, 1969). Letzteres bietet optimale Bedingungen für eine in vitro-Kultivierung der Follikel (Bohrmann, 1991a).

2.5 Untersuchung bioelektrischer Eigenschaften mit Fluoreszenzfarbstoffen

2.5.1 Fluoreszenz-Färbung mit DiBAC

Für die Analyse der V_{mem}-Muster wurde der potentiometrische Fluoreszenzfarbstoff DiBAC ($DiBAC_4(3)$; Bis-(1,3-Dibutylbarbituric Acid) Trimethine Oxonol; Molecular Probes/Thermo Fisher Scientific, USA) verwendet. Wie in Krüger und Bohrmann (2015) und Weiß und Bohrmann (2019b) beschrieben, kann dieser anionische Farbstoff in depolarisierte Zellen eindringen und dort auf eine spannungsabhängige Weise an intrazelluläre Membranen oder Proteine binden. Somit führt eine relative Depolarisation zu einer Akkumulierung des Farbstoffs und zu einer Zunahme der Fluoreszenzintensität, während eine relative Hyperpolarisation zu einer Abnahme der Fluoreszenzintensität

führt. Die Anregungs- und Emissionsmaxima von DiBAC liegen bei Wellenlängen von 490 bzw. 516 nm.

Durchführung: Die lebenden Follikel wurden unter langsamem Schütteln für 20 min in R14-Medium mit 4 µM DiBAC (Stammlösung 4 mM in 70% Ethanol) inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Follikel in R14-Medium überführt und sofort mit Hilfe der 10×/0,25- und 20×/0,5-Objektive und optischen Medianschnitten (siehe Abb. 2.6a) analysiert.

Tabelle 2.3: Zusammensetzung von PBS und *Drosophila* PBS (DPBS)

Konzentration PBS	**Zutat**
145 mM	NaCl
2,6 mM	KH_2PO_4
26,2 mM	Na_2HPO_4
	Einstellen des pH-Wertes auf 7,4 mit KOH
***Drosophila* PBS**	
Lösung A (4×)	
52 mM	$CaCl_2$
	in Aqua bidest. lösen
10 mM	Glucose × H_2O
0,1 M	Saccharose
	Zugabe von Glucose & Saccharose,
	dann der weiteren Komponenten
52 mM	NaCl
40 mM	KCl
1,2 mM	Mg_2SO_4 × 7 H_2O
1,2 mM	Mg_2Cl_2 × 6 H_2O
1 mM	$CaCl_2$
	ad 250 ml Aqua bidest.
Lösung B (4×)	
2 mM	Na_2HPO_4 × 12 H_2O
0,37 mM	KH_2PO_4
	ad 250 ml Aqua bidest.
	Zum Gebrauch Lösung A und B mit Aqua bidest.
	im Verhältnis 1:1:2 mischen

Die Dokumentation der Follikel erfolgte mit Hilfe eines Zeiss Axio ImagerM2 *structured-illumination microscope*, welches mit einem Zeiss ApoTome, einer Zeiss AxioCamMRm Kamera und den entsprechenden Filtersets ausgerüstet war (Tabelle 2.5 für einen Überblick über die verwendeten Filtersets und Tabelle A.2 im Anhang für einen Überblick

über die Anzahl der analysierten S8-12 *grk*-Follikel). Fluoreszenzintensitäten im FE wurden, wie in Abb. 2.6b beschrieben, quantifiziert.

2.5.2 Fluoreszenz-Färbung mit CFDA

Für die Analyse der pH_i-Muster wurde der fluoreszierende pH-Indikator CFDA (5-CFDA,AM; 5-Carboxyfluorescein Diacetate, Acetoxymethyl Ester, Molecular Probes) verwendet. Wie in Krüger und Bohrmann (2015) und Weiß und Bohrmann (2019b) beschrieben, dringt dieser anionische Farbstoff in Zellen ein und zeigt den pH_i durch Änderungen der Fluoreszenzintensitäten an. Da eine Protonierung des Farbstoffs im Zytoplasma zu einer Abnahme der Fluoreszenz führt, wird eine relative Alkalisierung durch eine Zunahme der Fluoreszenzintensität angezeigt, während eine relative Azidifizierung an einer Abnahme der Fluoreszenzintensität zu erkennen ist. Die Anregungs- und Emissionsmaxima von CFDA liegen bei Wellenlängen von 490 bzw. 516 nm.

Durchführung: Die lebenden Follikel wurden für 20 min unter langsamem Schütteln in 4 µM CFDA (Stammlösung: 1 mM in Dimethylsulfoxid, DMSO) in R14-Medium inkubiert. Anschließend wurde die Lösung gegen frisches R14-Medium ausgetauscht und, wie in Kap. 2.5.1 beschrieben, die Färbung sofort mit Hilfe von optischen Medianschnitten dokumentiert (Tabelle A.2 im Anhang für einen Überblick über die Anzahl der analysierten S8-12 *grk*-Follikel).

2.5.2.1 Überprüfung der pH-Sensitivität des Farbstoffs

Zum Nachweis der pH-Sensitivität des Farbstoffs wurden S10B-Follikel für 1 h in R14-Medium, welches zuvor mit Salzsäure auf den pH 5,5 oder mit Natriumhydroxid auf den pH 8,0 eingestellt worden war, inkubiert und anschließend Aufnahmen von Follikeln aus beiden Lösungen mit Hilfe des 10×/0,25-Objektivs und Weitfeldfluoreszenzmikroskopie (WFM; Kap. 2.10.2) erstellt (Abb. A.1 im Anhang).

2.6 Untersuchung bioelektrischer Eigenschaften mittels genetisch codierter Sensoren

2.6.1 Genetisch codierter V_{mem}-Sensor ArcLight

Aus einer Vielzahl verfügbarer genetisch codierter V_{mem}-Indikatoren (GEVIs), welche auf der VSD von *Ciona intestinalis* basieren, wurde für die Experimente dieser Arbeit

ein Mitglied der ArcLight-Familie gewählt. ArcLight, welches aus der VSD einer spannungsabhängigen Phosphatase und dem superekliptischen pHluorin A227D-Derivat besteht, weist eine relativ hohe Sensitivität gegenüber Änderungen des V_{mem} auf und zeichnet sich zudem durch eine langsame Aktivierungs- und Inaktivierungskinetik aus (Lin und Schnitzer, 2016; Kulkarni und Miller, 2017). Beide Eigenschaften sind für eine Darstellung langsamer V_{mem}-Änderungen, wie sie im FE von *Drosophila* auftreten, von Vorteil. Superekliptisches pHluorin reagiert auf eine relative Depolarisation nach Blaulichtanregung mit der Abnahme von grünem Fluoreszenzlicht, während eine relative Hyperpolarisation durch eine Zunahme von grünem Fluoreszenzlicht angezeigt wird. Ein relativ depolarisiertes V_{mem} führt zur Protonierung von superekliptischem pHluorin (dunkel oder ekliptisch), während ein relativ hyperpolarisiertes V_{mem} den deprotonierten Zustand hervorruft (Abb. 2.5a).

Durchführung: Lebende Follikel der Stadien S8-12 aus *tj-Gal4>ArcLight*-Fliegen wurden, wie in Kap. 2.5.1 beschrieben, ohne vorherige Inkubation, in R14-Medium mit Hilfe von optischen Medianschnitten analysiert.

2.6.2 Genetisch codierter pH_i-Sensor pHluorin-Moesin

Für eine Analyse des pH_i im FE wurde der genetisch codierte pH_i-Sensor pHluorin-Moesin verwendet. Dieser membranständige Sensor, welcher ursprünglich zur Darstellung apoptotischer Zellphagozytose verwendet wurde, besteht aus einer Fusion von pHluorin mit der Aktin-Bindedomäne von Moesin (Fishilevich et al., 2010). Da eine Protonierung des Sensors zu einer Abnahme der grünen Fluoreszenz und eine Deprotonierung zu einer Zunahme der grünen Fluoreszenz führt, wird eine relative Alkalisierung durch eine Zunahme der Fluoreszenzintensitäten angezeigt, während eine relative Azidifizierung an einer Abnahme der Fluoreszenzintensitäten zu erkennen ist (Abb. 2.5b).

Durchführung: Lebende Follikel der Stadien S8-12 aus *tj-Gal4>pHluorin*-Fliegen wurden, wie in Kap. 2.5.1 beschrieben, ohne vorherige Inkubation, in R14-Medium mit Hilfe von optischen Medianschnitten analysiert.

2.6.3 Validierung der verwendeten genetischen Sensoren

Zur Charakterisierung der ArcLight- und pHluorin-Expression im Zeitverlauf, mit dem Ziel etwaige Schwankungen der Fluoreszenzintensitäten im FE aufzudecken, wurden je 5 ArcLight- bzw. pHluorin-exprimierende S10B-Follikel in ein Glasblockschälchen mit R14-Medium überführt und mit Hilfe des 10×/0,25-Objektivs und WFM (Tabelle

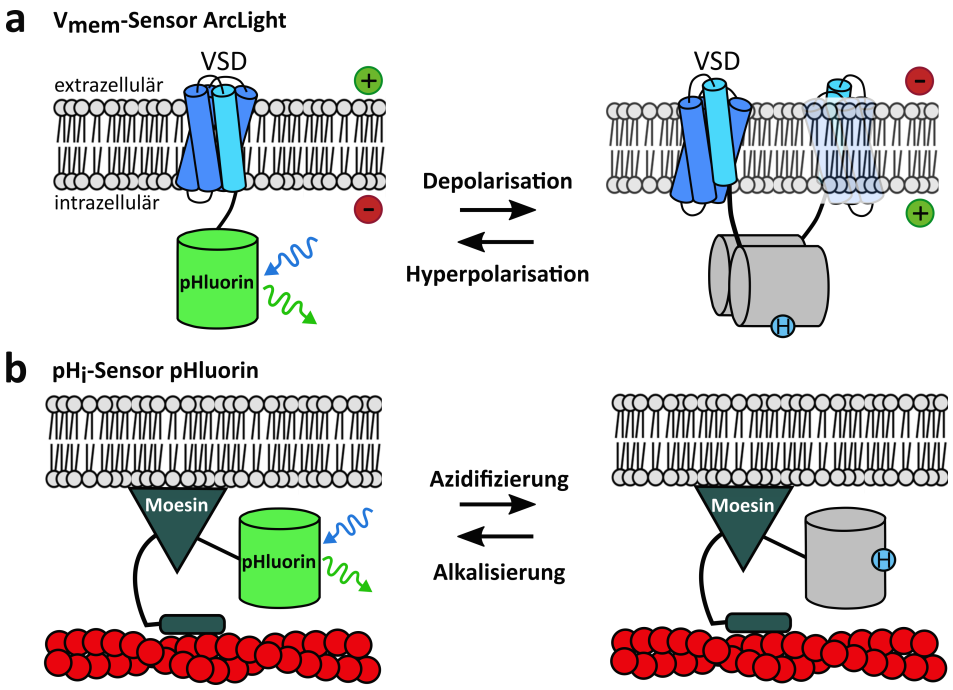


Abbildung 2.5: Wirkungsweise der Sensoren ArcLight und pHluorin-Moesin. Beide Sensoren verwenden das Chromophor pHluorin, welches auf Blaulichtanregung (blauer Pfeil) im unprotonierten Zustand mit der Emission von grünem Licht reagiert (grüner Pfeil). Der genaue Mechanismus von ArcLight (**a**) ist nicht bekannt, allerdings wird davon ausgegangen, dass eine spannungsabhängige Dimersierung des Chromophors zur Protonierung des Chromophors und somit zur Abnahme der Fluoreszenzintensität führt (VSD, *voltage sensing domain*; Schema in Anlehnung an Lin und Schnitzer, 2016). Dementsprechend weisen schwächere Fluoreszenzintensitäten auf eine relative Depolarisation des V_{mem} bzw. eine relative Azidifizierung des pH_i (**b**) hin, während stärkere Fluoreszenzintensitäten eine relative Hyperpolarisation bzw. relative Alkalisierung anzeigen.

2.5) innerhalb einer Stunde jeweils alle 10 min eine Aufnahme der Follikel erstellt (Belichtungszeiten: ArcLight, 1000 ms bzw. pHluorin, 300 ms).

Die Fluoreszenzintensitäten im FE wurden, wie in Abb. 2.8 beschrieben, quantifiziert. Eine Normierung der Werte eines jeden Experiments erfolgte auf den Mittelwert der Fluoreszenzintensitäten im FE zum Zeitpunkt 0 min. Die Mittelwerte aus drei Experimenten (n = 15 Follikel) und ihre Standardabweichungen wurden mit Hilfe eines multiplen t-Tests mit Holm-Sidak-Korrektur (One-way ANOVA) verglichen.

2.7 Untersuchung des Zytoskeletts

2.7.1 Mikrofilament-Färbung mit fluoreszierendem Phalloidin

Um das Aktin-Zytoskelett darzustellen, wurde fluoreszenz-markiertes Phalloidin verwendet. Phalloidin ist ein Gift des Knollenblätterpilzes, welches an F-Aktin bindet und

aufgrund der Kopplung an einen Fluoreszenzfarbstoff die MF direkt sichtbar macht. Dazu wurden die Follikel für 20 min in MF-Stabilisierungs-Puffer (MF-Puffer; Gutzeit, 1990; Weiß und Bohrmann, 2019a, Zusammensetzung siehe Tabelle 2.4) mit 4% Formaldehyd und 0,2% Triton X-100 bei RT fixiert.

Tabelle 2.4: Zusammensetzung MF-Puffer

Konzentration	Zutat
20 mM	Pipes
80 mM	KCl
5,6 mM	Glucose × H_2O
1,5 mM	$MgCl_2$ × 6 H_2O
1,5 mM	$CaCl_2$ × 2 H_2O
10 mM	EGTA
	Einstellen des pH-Wertes auf 7,2 mit KOH
4%	Formaldehyd
0,2%	Triton X-100

Nach drei Waschschritten mit *phosphate buffered saline* (PBS; Zusammensetzung siehe Tabelle 2.3), wurden die Follikel für 20 min mit 0,3 µg/ml Rhodaminyl-Phalloidin (Stammlösung: 30 µg/ml in PBS; Geschenk von Th. Wieland) in PBS oder mit 0,25 µg/ml Phalloidin-FluoProbes 550A (Stammlösung: 10 µg/ml in DMSO; Interchim, Frankreich) in PBS gefärbt. Nach drei weiteren Waschschritten mit PBS wurden die Follikel in Fluoromount G (Interchim) überführt und mit Hilfe des 40×/1,3 Öl-Objektivs sowie optischen Tangentialschnitten begutachtet (siehe Tabelle A.2 im Anhang für einen Überblick über die Anzahl der analysierten S8-12 *grk*-Follikel).

2.7.2 Indirekte Immunfluoreszenz-Färbung der Mikrotubuli

Für eine indirekte Immunfluoreszenz-Färbung der Mikrotubuli wurde das dreistufige Streptavidin-Biotin-System verwendet. Dazu wurden die Follikel in MF-Puffer, wie in Kap. 2.7.1 beschrieben, fixiert und dreimal für jeweils 10 min mit 0,1% Triton X-100 in PBS gewaschen. Anschließend wurden die Follikel für 1 h bei RT mit 2% *bovine serum albumin* (BSA)/0,1% Triton X-100 in PBS in einer feuchten Kammer blockiert und mit einem monoklonalen Antikörper gegen acetyliertes α-Tubulin (6-11B-1; Santa Cruz Biotechnology, USA), verdünnt 1:100 in PBS mit 1% BSA/0,1% Triton X-100, für 1 h oder über Nacht bei 4 °C inkubiert (Weiß und Bohrmann, 2019a). Nach weiteren sechs Waschschritten für 10 min mit 0,1% Triton X-100 in PBS erfolgte eine Inkubation von 1 h mit dem *goat anti-mouse*-(GAM)-Biotin Antikörper (Dianova, Deutschland), verdünnt 1:200 in PBS mit 1% BSA/0,1% Triton X-100, bei RT in einer feuchten Kam-

mer. Auf diesen Schritt folgten sechs weitere Waschschritte für jeweils 5 min mit PBS. Abschließend wurden die Follikel für 30 min mit Streptavidin-TexasRed (Dianova), verdünnt 1:100 in PBS mit 1% BSA/0,1% Triton X-100, inkubiert, dreimal für 10 min mit PBS gewaschen, in Fluoromount G überführt und, wie in Kap. 2.7.1 beschrieben, mit Hilfe von optischen Tangentialschnitten analysiert (siehe Tabelle A.2 im Anhang für einen Überblick über die Anzahl der analysierten S8-12 *grk*-Follikel). Als Kontrolle wurden Färbungen ohne primären Antikörper durchgeführt.

2.8 Stadienbestimmung der Follikel und Definition der Achsen

Die Definition der Stadien erfolgte mittels der in Tabelle A.1 im Anhang beschriebenen Kriterien (King, 1970; Spradling, 1993). Zur Festlegung der A-P-Achse wurde die anteriore Position der NZ als Marker verwendet, während für die Bestimmung der D-V-Achse die anterior-dorsale Lage des ON sowie das hochprismatische dorsale FE (S10B) herangezogen wurden. Charakteristisch für dieses ist eine im Vergleich zur ventralen Seite größere Dicke (Abb. 3.1a). Dieses Kriterium wurde insbesondere bei jenen Follikeln berücksichtigt, bei denen die Position des ON nicht bestimmt werden konnte.

2.8.1 Stadienbestimmung und Achsendefinition in *grk*-Follikeln

Bei *grk*-Follikeln wurden die gleichen Kriterien zur Stadienbestimmung und zur Festlegung der Achsen angewandt wie im WT (Tabelle A.1 im Anhang). Eine dorsale Seite konnte aufgrund der posterioren Lokalisation des ON und eines tranversal homogenen FE nicht bestimmt werden (Abb. 3.1b).

2.9 Quantitative Analysen im FE von WT und *grk*

2.9.1 Vergleich von Gradienten der Fluoreszenzintensitäten in WT- und *grk*-Follikeln

Zur Quantifizierung der A-P- und D-V-V_{mem}- und pH_i-Gradienten im FE von WT und von *grk* wurden optische Medianschnitte DiBAC- oder CFDA-gefärbter S10B-Follikel verwendet. Fluoreszenzintensitäten („mean grey value“) beider Seiten (FE_1 und FE_2 oder aFE und pFE) wurden mit Hilfe von ImageJ (NIH; Abb. 2.6b) gemessen und ein Quotient beider Werte ermittelt. Zur Bestimmung der A-P-V_{mem}-Gradienten in S9 wurden die Fluoreszenzintensitäten der zFZ, HFZ und pFZ (zur Einteilung des FE in

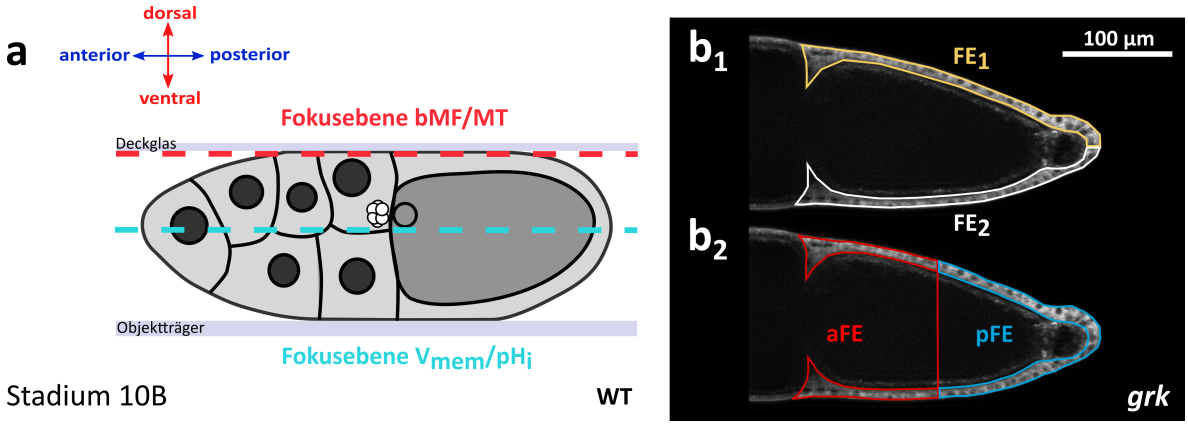


Abbildung 2.6: Analyse von WT- und *grk*-Follikeln. a: Für eine Darstellung der basalen Mikrofilamente (bMF) und Mikrotubuli (MT) im FE von WT- und *grk*-Follikeln wurden tangentiale optische Schnitte (SIM; Fokusebene: rot) verwendet. Um V_{mem}- and pH_i-Muster zu analysieren wurden optische Medianschnitte verwendet (SIM; Fokusebene: türkis). **b:** Quantifizierung der transversalen (**b**$_1$) und A-P-(**b**$_2$) Gradienten von V_{mem} und pH_i im FE von S10B-Follikeln. Darstellung der mit Hilfe von ImageJ („mean grey value“) quantifizierten Bereiche FE_1 (gelb markierter Bereich) und FE_2 (weiß) sowie aFE (rot) and pFE (blau) am Beispiel eines mit DIBAC gefärbten *grk*-Follikels. Die D-V-Achse im WT wurde mit Hilfe der dorsalen Position des ON bestimmt; anschließend wurden die Fluoreszenzintensitäten der dorsalen und ventralen Seite des FE gemessen.

diese drei FZ-Typen siehe Abb. 3.1a und 1.1b) gemessen und entsprechende Quotienten dieser Fluoreszenzintensitäten, wie in Weiß und Bohrmann (2019b) beschrieben, bestimmt. Je größer diese Fluoreszenzintensitätsquotienten sind, desto ausgeprägter sind die Gradienten. Quotienten mit einem Wert von 1,0 würden dementsprechend auf das Fehlen eines Gradienten hinweisen. Zur Verdeutlichung der Unterschiede in den Gradienten des WT und der Mutante *grk* wurde zudem für alle untersuchten Gradienten der Anteil an Follikeln mit Fluoreszenzintensitätsquotienten $\geq$ 1,5 bestimmt. Da A-P-pH_i-Gradienten im Vergleich zu A-P-V_{mem}-Gradienten in S9 flacher sind, wurden zum Vergleich der A-P-pH_i-Gradienten in S9 der Anteil an Follikeln mit Fluoreszenzintensitätsquotienten $\geq$ 1,3 ermittelt.

2.9.2 Vergleich von bMF-Kondensationen in WT- und *grk*-Follikeln

Charakteristisch für das Aktin-Zytoskelett des WT sind bMF-Kondensationen, welche in den zFZ des Stadiums S9 und in dorsalen zFZ sowie HFZ des Stadiums S10B zu finden sind. Diese breiten sich in S11 bis zu den pFZ aus (siehe Weiß und Bohrmann, 2019a). Um herauszufinden, ob sich diesbezüglich das WT- und *grk*-Zytoskelett unterscheiden, wurde die Anzahl der zFZ bzw. HFZ mit bMF-Kondensationen von WT und *grk* bestimmt. Dazu wurden die Zellen mit bMF-Kondensationen in einem festgelegten 3000 μm^2-großen Ausschnitt im Bereich der zFZ (S9) und einem 5000 μm^2-großen Aus-

schnitt im Bereich der HFZ (S10B) von WT- und *grk*-Follikeln (siehe weißer Kasten Abb. 2.7) ausgezählt und die Mittelwerte und ihre Standardabweichungen mit Hilfe eines ungepaarten t-Tests verglichen.

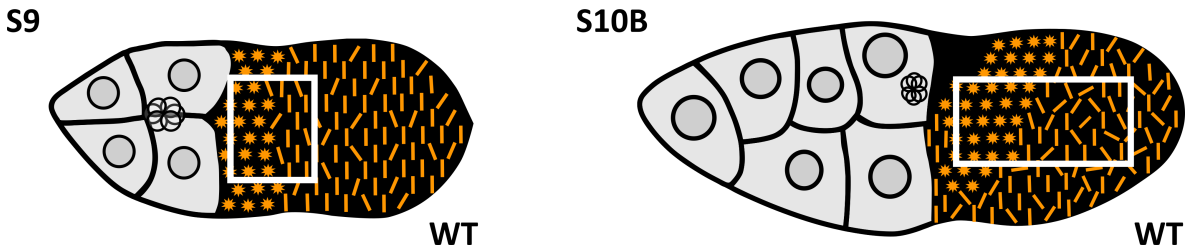


Abbildung 2.7: Quantitative Auswertung der bMF-Kondensationen in S9 (zFZ) und S10B (HFZ). Weiße Kästen markieren den für die Quantifizierung relevanten Bereich in S9- und S10B-Follikeln.

2.10 Fluoreszenzmikroskopie

2.10.1 Structured-illumination microscopy (SIM)

Structured-illumination microscopy (SIM) wurde für die Analysen der V_{mem}- und pH_i-Muster sowie für die des Zytoskeletts eingesetzt. SIM ermöglicht es relativ unkompliziert, optische Schnitte eines Objekts anzufertigen. Dies ist insbesonders bei Vitalpräparaten, die nur kurze Zeit belichtet werden können, entscheidend. Dabei verwendet SIM eine strukturierte Beleuchtung, bestehend aus hellen und dunklen Streifen. Diese werden mit Hilfe eines zum Objektiv passenden Gitters erzeugt, das in den Strahlengang des AxioImager.M2 (ApoTome, Zeiss) geschoben wird. Die Streifenposition wird geändert und drei Aufnahmen mit jeweils unterschiedlichen Gitterpositionen werden erzeugt. Abschließend wird anhand dieser Aufnahmen ein optischer Schnitt berechnet.

Durchführung: Je nach Experiment wurden lebende Follikel entweder mit einem Tropfen R14-Medium oder fixierte Follikel mit der gleichen Menge Fluoromount G auf einen Objektträger überführt und mit einem Deckgläschen (18×24 mm) abgedeckt. Um ein Zerquetschen der Follikel zu verhindern, wurden kleine Papierplättchen (aus Parafilm-Deckpapier) als Abstandshalter zwischen Objektträger und Deckgläschen eingesetzt. Die Auswahl der Fokusebene war abhängig von der Art des Experiments: Bioelektrische Eigenschaften (V_{mem}/pH_i) wurden mit Hilfe von optischen Medianschnitten

Tabelle 2.5: Mikroskope und Mikroskopzubehör

Mikroskop	**Axiovert 200 (Zeiss)**	**AxioImager.M2 (Zeiss) mit ApoTome (Zeiss)**
Objektive	5×/0,17 10×/0,25 1,6× Optovar	10×/0,25 20×/0,5 40×/1,3 Öl
Fluoreszenz-filtersets	**DiBAC/CFDA/ ArcLight/pHluorin** BP 470/40 (Ex.) FT 495 BP 525/50 (Em.)	**DiBAC/CFDA/ArcLight/ pHluorin/FluoProbes 488/ GFP** BP 470/40 (Ex.) FT 495 BP 525/50 (Em.) **Rhodamin/TexasRed/ FluoProbes 550A** BP 550/25 (Ex.) FT 570 BP 605/70 (Em.) **DAPI** G 365 (Ex.) FT 395 BP 445/50 (Em.)
Kamera	Orca ER (Hamamatsu)	AxioCam MRm (Zeiss)
Kamera-programm	Wasabi (Hamamatsu)	AxioVision (Zeiss)
Beleuchtung	HBO 100	HBO 100

analysiert, Eigenschaften des Zytoskeletts mit Hilfe optischer Tangentialschnitte (Abb. 2.6a).

2.10.2 Weitfeldfluoreszenzmikroskopie (WFM)

Diese Methode wurde bei der Durchführung mehrerer Experimente eingesetzt. Dazu wurden die Follikel, wie in Kap. 2.11 erläutert, in 3er-Glasblockschälchen (Glasblöcke mit drei kreisförmigen Vertiefungen mit einem Durchmesser von 20 mm und einer maximalen Tiefe von circa 5 mm) mit den entsprechenden Lösungen inkubiert. Das inverse Mikroskop Axiovert 200 (Zeiss, siehe Tabelle 2.5) bot dabei die Möglichkeit, die Follikel im Glasblockschälchen von unten zu betrachten und so unmittelbar nach Beginn der Inhibition Aufnahmen der Follikel zu erzeugen.

2.10.3 Differentieller Interferenzkontrast (*Differential Interference Contrast, DIC*)

Der differentielle Interferenzkontrast (DIC; nach Nomarski) ist eine lichtmikroskopische Methode, die es ermöglicht transparente und farblose Präparate physikalisch zu kontrastieren, sodass ein plastischer Eindruck der Objekte erzeugt wird. Die Bildkontraste entstehen dabei durch Unterschiede in den optischen Wellenlängen im Objekt, die in Helligkeitsunterschiede des Bildes umgewandelt werden. Entsprechende Aufnahmen wurden mit dem AxioImager.M2 (Tabelle 2.5) erzeugt.

2.10.4 Nachbearbeitung der Aufnahmen

Eine Tonwertkorrektur sowie eine Anpassung von Konstrast und Helligkeit der Graustufen-Fluoreszenz-Aufnahmen wurden zur Verbesserung der Bildqualität mit Hilfe von Adobe Photoshop CS6 durchgeführt. Innerhalb eines Experiments wurden die Einstellungen stets konstant gehalten und die Aufnahmen der Inhibitions- und Kontrollgruppe in gleicher Weise nachbearbeitet (Wasabi und AxioVision, siehe Tabelle 2.5). Analoge Kontrast- („offset“) und Helligkeits- („gain“) Einstellungen der Kamera blieben bei den Aufnahmen unverändert.

2.10.4.1 Falschfarbendarstellung

Aufnahmen in Falschfarben-Darstellung wurden mit Hilfe des Bildbearbeitungs- und Bildverarbeitungsprogramms ImageJ (NIH) und darin enthaltener Farbskalen erzeugt. Die Auswahl der Farbskala wurde dabei von der Reaktion des Farbstoffs oder Sensors auf Änderungen des V_{mem} bzw. pH_i abhängig gemacht: Eine Alkalisierung führt sowohl bei pHluorin als auch bei CFDA zu einer Zunahme der Fluoreszenzintensität, während eine Azidifizierung eine Abnahme der Fluoreszenzintensität zur Folge hat. Deshalb wurde für beide Methoden die Farbskala „Fire“ verwendet. ArcLight und DiBAC hingegen reagieren unterschiedlich auf eine Depolarisation bzw. Hyperpolarisation. Daher wurde für ArcLight-Aufnahmen die Farbskala „Green Fire Blue“ und für DiBAC-Aufnahmen die Farbskala „Royal“ gewählt.

2.11 Inhibitionsexperimente

Alle S10B-Follikel aus einer Fliege (6-20 Follikel, die entweder ArcLight oder pHluorin exprimierten oder mit DiBAC bzw. CFDA gefärbt wurden) wurden in zwei gleich große Gruppen aufgeteilt, eine Inhibitions- und eine Kontrollgruppe. Follikel der Inhibitionsgruppe wurden unter langsamem Schütteln für 20 min in R14-Medium mit einem der

folgenden, in Tabelle 2.6 aufgeführten, Inhibitoren von Ionentransportmechanismen inkubiert: Amilorid, 9-Anthracencarbonsäure (9-AC), Concanamycin A, Furosemid, Glibenclamid und Verapamil.

Kontrollexperimente wurden in R14-Medium, welches äquivalente Mengen eines der beiden verwendeten Lösungsmittel (0,25-1% v/v Ethanol oder DMSO), ohne Inhibitor, enthielt, durchgeführt. Im Falle der Inhibitionsexperimente mit DiBAC oder CFDA wurden der Lösung entweder 4 µM DiBAC oder CFDA zugesetzt (Kap. 2.5) und die Follikel während der 20 min-Inkubation mit dem Inhibitor gefärbt.

Im Anschluss an die Inkubation der Follikel mit der jeweiligen Lösung wurden sofort Aufnahmen beider Gruppen, bestehend aus 3-10 Follikeln in überdeckten Glasblockschälchen, mit Hilfe des ZeissAxiovert 200 Weitfeldfluoreszenz-Mikroskops und dem 10×/0.25-Objektiv, erstellt. Für jede der vier verwendeten Methoden (Belichtungszeit für die ArcLight-Experimente: 1000 ms, pHluorin: 300 ms, DiBAC: 15 ms und CFDA: 7,5 ms) wurden alle Einstellungen während der Experimente konstant gehalten.

2.11.1 Analyse der Fluoreszenzintensitäten im FE nach Inhibition verschiedener Ionentransportmechanismen

Um die Fluoreszenzintensitäten im hochprismatischen FE jedes S10B-Follikels der Inhibitions- und Kontrollgruppe zu quantifizieren, wurden die originalen Graustufen-WFM-Aufnahmen verwendet („mean grey value“, Abb. 2.8). Die Werte der Inhibitions- und Kontrollgruppe wurden gemittelt (alle Follikel eines Experiments stammen aus der derselben Fliege). Für jeden Inhibitor wurden mindestens vier Wiederholungen eines Experiments durchgeführt und die auf den Mittelwert der Kontrollgruppe normierten Werte der einzelnen Follikel in einer Auswertung zusammengefasst (relative Intensität, Kap. 3.2 Abb. 3.11 und 3.14). Für einen direkten Vergleich der Effekte aller verwendeter Inhibitoren auf das V_{mem} oder den pH_i wurden mittlere Intensitätsquotienten der Inhibitions- und Kontrollgruppe (Inhibiert/Kontrolle) von je vier Experimenten berechnet und diese in einer Auswertung zusammengefasst (Abb. 3.12, 3.13, 3.15 und 3.16). Die Mittelwerte und ihre Standardabweichungen wurden entweder unter Verwendung eines ungepaarten t-Tests (Abb. 3.11 und 3.14) oder eines *one-sample* t-Tests verglichen (Abb. 3.12, 3.13, 3.15 und 3.16). Für die statistische Auswertung wurden die Programme Microsoft Excel und GraphPad Prism sowie für die Darstellung der Daten GraphPad Prism verwendet.

Tabelle 2.6: Übersicht über die verwendeten Inhibitoren

Inhibitor	Hersteller	Konzentration (Stammlösung / Gebrauchslösung)	Inhibierte Zielstruktur
Allicin	Labor Slusarenko RWTH Aachen	10 mM in H_2O/ 2,5, 5, 10, 20 und 100 µM in R14	Aquaporine
Amilorid	Sigma-Aldrich	100 mM in DMSO/ 1 mM in R14	Na^+/H^+-Antiporter, Na^+-Kanäle
9-Anthracen-carbonsäure	Sigma-Aldrich	100 mM in DMSO/ 1 mM in R14	Cl^--Kanäle
Concanamycin A	Biomol	100 µM in DMSO/ 1 µM in R14 und 2,5 µM in R14	V-ATPasen (Protonenpumpen)
Furosemid	Sigma-Aldrich	150 mM in DMSO/ 1,5 mM in R14	$Na^+/K^+/2Cl^-$-Cotransporter
Glibenclamid	Biomol	100 mM in DMSO/ 250 µM in R14	ATP-sensitive K^+-Kanäle
Natriumazid	Merck	150 mM in H_2O/ 10 mM in R14	Cytochrom-C-Oxidase
Verapamil	Sigma-Aldrich	200 mM in 70% Ethanol/ 1 mM in R14	Spannungsabhängige Typ-L Ca^{2+}-Kanäle

2.11.2 Inhibitionsexperimente mit Natriumazid

Um im Vorfeld der Inhibitionsexperimente zu überprüfen, ob Änderungen des V_{mem} oder pH_i grundsätzlich mit Hilfe der genetisch codierten Sensoren detektiert werden können, wurden Inhibitionsexperimente mit Natriumazid (Tabelle 2.6) durchgeführt. Durch Inhibition der Cytochrom-C-Oxidase und somit der oxidativen Phosphorylierung blockiert Natriumazid alle engergieabhängigen Ionentransportmechanismen der Zellen.

Durchführung ArcLight- oder pHluorin-exprimierende S10B-Follikel wurden, wie in Kap. 2.11 beschrieben, mit 10 µM Natriumazid inkubiert und das Ergebnis dokumentiert. Die Quantifizierung der Fluoreszenzintensitäten erfolgte wie in Kap. 2.11.1 beschrieben. Die Werte eines Experiments wurden auf den Mittelwert der Kontrollgruppe normiert und, im Falle der Arclight-Experimente, die Werte aus vier Experimenten gemittelt und in einer Auswertung zusammengefaßt (n = 19 Follikel). Für pHluorin

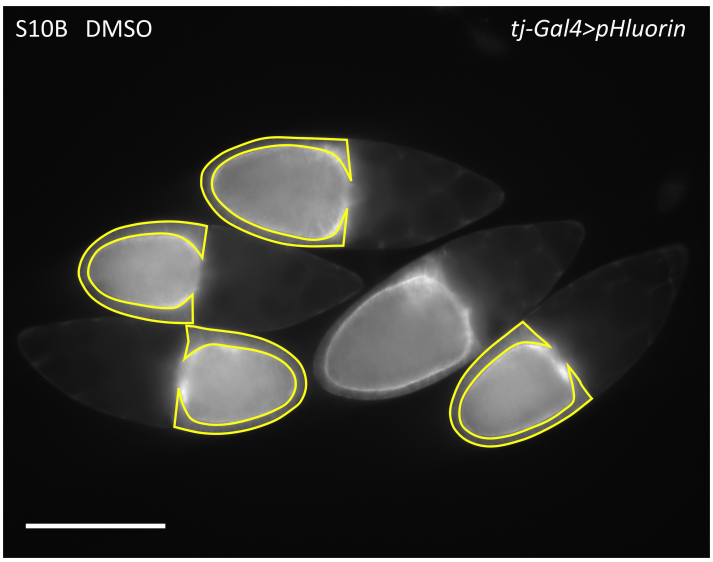


Abbildung 2.8: Quantifizierung der Fluoreszenzintensitäten im FE. Analyse der Fluoreszenzintensitäten im FE („mean grey value"; gelb markierter Bereich) pHluorin-exprimierender S10B (und ein S11)-Follikel (WFM-Bild; Maßstabsbalken 200 µm).

wurde ein Experiment durchgeführt (n = 4 Follikel). Die Mittelwerte und ihre Standardabweichungen wurden mit Hilfe eines ungepaarten t-Tests verglichen.

2.11.3 Inhibitionsexperimente mit dem Knoblauch-Wirkstoff Allicin

Allicin (Diallylthiosulphinat), ein Inhaltsstoff des Knoblauchs, besitzt antimikrobielle Eigenschaften und ist daher im Hinblick auf eine zunehmende Resistenz gegen Antibiotika von großem Interesse. Da Allicin membranpermeabel ist und sowohl einen Einfluss auf das elektrochemische Potential von Zellen hat als auch eine inhibitorische Wirkung auf Aquaporine besitzt (Gruhlke et al., 2010; Reiter et al., 2017; Verma und Pandey, 2017), wurde der Effekt verschiedener Allicinkonzentration auf die bioelektrischen Eigenschaften im FE von S10B-Follikeln untersucht.

Zu diesem Zweck wurde zwölf S10B-Follikel aus einer Fliege in sechs gleich große Gruppen aufgeteilt, eine Kontrollgruppe und fünf Inhibitions-Gruppen, die mit einer der folgenden Konzentrationen Allicin inkubiert wurden: 2,5 µM, 5 µM, 10 µM, 20 µM und 100 µM Allicin bei DiBAC bzw. 10 µM, 20 µM und 100 µM Allicin bei CFDA. Hierzu wurde zunächst das in Aqua bidest gelöste synthetisch hergestellte Allicin (Stammlösung 10 mM; siehe Tabelle 2.6) mit dest. Wasser 1:20 verdünnt. Aus diesen beiden Konzentrationen (10 mM und 500 µM Allicin) wurde anschließlich durch weitere Verdünnung mit R14-Medium, welches zuvor mit 4 µM DiBAC oder CFDA versetzt worden war, alle verwendeten Lösungen hergestellt und die Follikel für 20 min

mit der entsprechenden Lösung inkubiert. Kontrollexperimente wurden in R14-Medium mit 4 µM DiBAC oder CFDA sowie 2% dest. Wasser (entspricht der größten in den Allicin-Lösungen verwendeten Menge) durchgeführt. Im Anschluss an die Inkubation der Follikel mit der jeweiligen Lösung in überdeckten Glasblockschälchen wurden sofort Aufnahmen aller Gruppen mit Hilfe des 10×/0,25-Objektivs und WFM erstellt (Belichtungszeiten siehe Kap. 2.11).

Die Fluoreszenzintensitäten im FE wurden, wie in Abb. 2.8 beschrieben, mit Hilfe von ImageJ (NIH) quantifiziert und die Werte auf den Mittelwert der Kontrolle normiert. Die Mittelwerte der normierten Werte (DiBAC, n = 4 Follikel und CFDA, n = 2 Follikel) und ihre Standardabweichungen wurden mit Hilfe eines multiplen t-Tests mit Holm-Sidak-Korrektur (One-way ANOVA) verglichen. Um zu überprüfen, ob Allicin die Weiterentwicklung der Follikel in R14-Medium hemmt, wurden nach 18-20 h erneut Aufnahmen von Follikeln, die in 100 µM Allicin verblieben waren, erstellt.

2.12 RNAi-Screen von Ionentransportmechanismen im Ovar

2.12.1 Validierung der verwendeten Treiberstämme

Vor der Durchführung des Screens wurden die Expressionsmuster der verwendeten Treiberstämme überprüft. Dazu wurden weibliche Fliegen des Stammes UAST-GFP (Tabelle 2.1) mit männlichen Fliegen des Somatreibers *tj*-Gal4 bzw. weibliche Fliegen der Keimbahntreiber mat-tub-Gal4-GeneSwitch, mat-tub-Gal4 und MTD-Gal4 mit männlichen UASp-myrGFP Fliegen verkreuzt. Weibchen der F1-Generation wurden nach 3-4 Tagen bei 25 °C auf Standard-Nährmedium mit zusätzlicher frischer Hefe präpariert und die enthaltenen S8-12-Follikel in R14-Medium mit Hilfe des 5×-Objektivs sowie des 1,6×-Optovars (Tabelle 2.5) und WFM oder der 10×/0,25- und 20×/0,5-Objektive und SIM (siehe Kap. 2.10.1) analysiert (Abb. 3.9a und Abb. 3.18c-e).

2.12.2 VDRC RNAi-Stämme

Die verwendeten VDRC RNAi-Stämme sind Teil einer genomweiten Bibliothek aus *Drosophila*-RNAi-Transgenen. Durch *inverted repeats* in einem modifizierten pUAST-Vektor (pMF3), sind diese UAS-Konstrukte in der Lage, RNA-Interferenz in somatischen Zellen von *Drosophila* zu aktivieren (Dietzl et al., 2007). Aufgrund des pUAST-Vektors eignen sich diese nicht für einen RNAi-Knockdown in der Keimbahn (siehe Rørth, 1998). VDRC-Stämme unterscheiden sich von verwendeten TRiP-Stämmen dar-

in, dass sie sowohl P-Element- als auch ΦC31-vermittelte Insertionen beeinhalten, während das TRiP zur Erzeugung seiner Transgenen ausschließlich das ΦC31-Integrase-System verwendet.

2.12.3 TRiP RNAi-Stämme

TRiP-Stämme verwenden ebenfalls das Gal4-UAS-System für die zielgerichtete Expression von RNAi-Transgenen, welche anschließend zur Herunterregulierung der Expression der Zielgene führen. Lange doppelsträngige *hairpin* RNAs, wie sie in vielen RNAi-Konstrukten Verwendung finden, eignen sich jedoch nicht für *gene silencing* in der weiblichen Keimbahn von *Drosophila* (Rørth, 1998). Um diesem Zustand Abhilfe zu schaffen, wurde im Rahmen des *Transgenic RNAi Project* (TRiP) ein Vektor entwickelt, der durch Expression von shRNAs sowohl einen effektiven Knockdown des Zielgens im Soma als auch in der Keimbahn ermöglicht (Valium20-Vektor; Ni et al., 2008; Ni et al., 2011). Gene, deren RNAi-Konstrukte nicht im Valium20-Vektor verfügbar waren, wurden mit Hilfe des *long hairpin*-gestützten Vektors Valium10 im Soma still gelegt.

2.12.4 Durchführung des Screens

Ausgehend von der Genexpressions-Datenbank FlyAtlas 2 (http://flyatlas.gla.ac.uk/; vgl. Robinson et al., 2013) wurden Kandidatengene verschiedener Ionentransportmechanismen und Gap Junction-Kanalproteine ausgewählt, die, bezogen auf die Expression in der gesamten Fliege, eine verstärkte Expression im Ovar von *Drosophila* aufwiesen (siehe RNAi-Stämme Tabelle 2.1, Tabelle 2.7 und Tabelle A.5, Abb. A.4a - Abb. A.4k im Anhang). In einer ersten Runde des Screens wurden die entsprechenden VDRC UAS-Stämme für einen Knockdown im FE verwendet. Da mit Ausnahme eines Stammes (v46553) keiner der eingesetzten Stämme Veränderungen in der Morphologie des Ovars oder in der Oogenese verursachte, wurde der Screen mit TRiP UAS-shRNA-Stämmen wiederholt. Tatsächlich sind *short hairpins*, eingebettet in ein micro-RNA-Rückgrat, sehr effektiv für einen Knockdown sowohl in der Keimbahn als auch im Soma (Ni et al., 2011).

Die Expressionsmuster der verwendeten Treiberstämme mat-tub-Gal4-GeneSwitch (Osterwalder et al., 2001), mat-tub-Gal4 (Gal4VP16-Stamm; Sadowski et al., 1988), *tj*-Gal4 und MTD-Gal4 (Tabelle 2.1) wurden im Vorfeld des Screens überprüft (Kap. 2.12.1). Nach dem Verkreuzen (Kap. 2.12.5 und Tabelle 2.7) geschlüpfte weibliche Fliegen der F1-Generation wurden 3 Tage im Dunkeln bei 25 °C auf Standard-Nährmedium mit zusätzlicher frischer Hefe gehalten und anschließend, wie in Kap. 2.4 beschrieben, präpariert (Anzahl untersuchter Fliegen pro Stamm $n \geq 10$). Als Kontrollen dienten Ovarien

von *mat-tub-Gal4-GeneSwitch>UAS-shRNA/lhRNA*-Fliegen mit einer niedrigen basalen Expression. Diese Stämme führen in Abwesenheit eines chemischen Aktivators zu einem, im Vergleich zu den Treiberstämmen mat-tub-Gal4 (VP16-Stamm) und MTD-Gal4, schwach konstitutiven Knockdown der entsprechenden Gene und sollten daher zu keinen Veränderungen der Ovar-Morphologie oder zu Veränderungen in der Oogenese führen.

Ovarien von Fliegen, in denen der Knockdown zu größenreduzierten Ovarien geführt hatte, wurden, wie in Kap. 2.12.6 beschrieben, mit DAPI gefärbt. Der Knockdown in Fliegen des Stammes *open rectifier* K^+ *channel* (*ork1*; BL53994) führte zu kugelförmigen Follikeln. Ihr bMF- und MT-Zytoskelett im FE wurde, wie in den Kap. 2.7.1 und 2.7.2 beschrieben, analysiert.

2.12.5 Kreuzungen

Aufgrund ihrer jeweiligen Eignung für Soma- und/oder Keimbahnknockdown wurden weibliche Fliegen mit Konstrukten im Valium10-Vektor oder im pMF3-Vektor mit männlichen Fliegen des Treiberstamms *tj*-Gal4 verkreuzt, während weibliche Fliegen mit Konstrukten im Valium20-Vektor mit männlichen Fliegen sowohl des *tj*-Gal4-Stamms als auch mit männlichen Fliegen der Keimbahntreiber mat-tub-Gal4-GeneSwitch (Osterwalder et al., 2001), mat-tub-Gal4 und MTD-Gal4 verkreuzt wurden (für einen Überblick über diese Stämme siehe Tabelle 2.7). Fliegen der F1-Generation, die nicht beide Konstrukte (Gal4- und UAS-Konstrukt) enthielten und somit nicht in der Lage waren, RNAi zu betreiben, wurden mit Hilfe der in Kap. 2.3.1 aufgeführten Balancer identifiziert und verworfen.

2.12.6 DAPI-Färbung der Zellkerne

Um herauszufinden, ob in den größenreduzierten Ovarien Ovariolen oder einzelne Follikel vorhanden sind, wurden die Zellkerne zur weiteren Analyse mit DAPI gefärbt. Dazu wurden die Ovarien für 20 min mit MF-Puffer (Zusammensetzung siehe Tabelle 2.4) bei RT fixiert, dreimal mit PBS gewaschen und für 5 min mit 0.2 µg/ml DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol; Sigma-Aldrich) gefärbt. Nach erneutem dreimaligem Waschen wurden die Follikel in Fluoromount G überführt und, wie in Kap. 2.10.2 beschrieben, mit dem 20×/0,5-Objektiv oder dem 40×/1,3 Öl-Objektiv WFM-Aufnahmen erstellt (n = 7-8 Ovarien pro Fliegenstamm).

Tabelle 2.7: Übersicht der im RNAi-Knockdown-Screen untersuchten Gene und deren Expressionsmuster

Genname	Stamm ID	Vektor [abc]	Expressionsmuster gemäß Literatur[d]
vha55	BL40884	Valium20	FE & NZ (Du et al., 2006)
	VDRC46553	pMF3	s.o.
vha16-1	BL40923	Valium20	Stadienabhängig in verschiedenen Regionen von Soma und Keimbahn (Lautemann und Bohrmann, 2016)
nhe1	BL28589	Valium10	Kopf, Körper & Malpighische Gefäße, sowie alle Entwicklungsstadien (Giannakou und Dow, 2001)
	VDRC7245	pMF3	s.o.
rpk	BL39053	Valium20	stärkste Expression in NZ & Ooz in S10, ab S10 im FE (Darboux et al., 1998)
	VDRC8549	pMF3	s.o.
ork1	BL53994	Valium20	insbesondere in Muskeln, Gehirn & Ovarien (Goldstein et al., 1996)
	BL25885	Valium10	insbesondere in Muskeln, Gehirn & Ovarien (Goldstein et al., 1996)
	VDRC40953	pMF3	s.o.
mri	VDRC17043	pMF3	Starke Expression in S7-10B in NZ (Rusconi und Challa, 2007)
clc-b	BL51877	Valium20	keine detaillierten Informationen über eine Expression im Ovar
	VDRC4642	pMF3	s.o.
clc-c	BL27034	Valium10	keine detaillierten Informationen über eine Expression im Ovar
stim	VDRC47073	pMF3	keine detaillierten Informationen über eine Expression im Ovar
inx1	BL44048	Valium20	Basolateraler Bereich der FZ (Bohrmann und Zimmermann, 2008)
inx2	BL42645	Valium20	Apikal-lateral sowie apikal zwischen FZ & Keimbahnzellen (Bohrmann und Zimmermann, 2008; Lautemann und Bohrmann, 2016)
inx3	BL60112	Valium20	Lateral in FZ & NZ (Bohrmann und Zimmermann, 2008; Lautemann und Bohrmann, 2016)

[a] Konstrukte im Valium10-Vektor wurden, aufgrund ihrer Eignung für eine Somaexpression, mit dem *tj*-Gal4-Treiber verkreuzt.

[b] Konstrukte im Valium20-Vektor wurden, aufgrund ihrer Eignung für eine Soma- und Keimbahnexpression mit dem Soma-Treiber *tj*-Gal4 sowie den Keimbahntreibern mat-tub-Gal4-GeneSwitch, mat-tub-Gal4 und MTD-Gal4 verkreuzt.

[c] Konstrukte im pUAST-Vektor pMF3 wurden, aufgrund ihrer Eignung für eine Somaexpression, mit dem Treiber *tj*-Gal4 verkreuzt.

[d] Für alle untersuchten Gene ist, gemäß FlyAtlas 2, eine Expression im Ovar von *Drosophila* nachweisbar (Tabelle A.5, Abb. A.4a - Abb. A.4k im Anhang).

3 Ergebnisse

3.1 Vergleich der bioelektrischen Eigenschaften und des Zytoskeletts im FE des WT und der Mutante *grk*

Zum Vergleich der bioelektrischen Eigenschaften im FE des WT und der Achsenpolaritätsmutante *grk* wurden Färbungen mit den Fluoreszenzfarbstoffen DiBAC und CFDA durchgeführt. Untersuchungen aus vorangegangenen Arbeiten, die zum Ziel hatten, mögliche Zusammenhänge zwischen bioelektrischen Eigenschaften und dem Zytoskelett in WT-Follikeln aufzudecken, zeigen, dass im Verlauf der Oogenese stadienspezifische V_{mem}- und pH_i-Muster im FE auftreten und diese Änderungen der bioelektrischen Eigenschaften mit Veränderungen in der Organisation des Zytoskeletts im FE korrelieren (Krüger und Bohrmann, 2015; Weiß und Bohrmann, 2019a; Weiß und Bohrmann, 2019b). Ein Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, diese Veränderungen der bioelektrischen Eigenschaften und des Zytoskeletts mit denen der Mutante *grk* zu vergleichen.

3.1.1 Morphologische Besonderheiten der Mutante *grk*

Ventralisierte *grk*-Follikel aus weiblichen transheterozygoten *grk*-Fliegen zeigen Defekte bezüglich beider primärer Achsen (A-P- und D-V-Achse) und weisen, wie in Abb. 3.1 erläutert, einige morphologische Besonderheiten im Vergleich zu WT-Follikeln auf. Charakteristisch für die dorsale Seite von WT S10B-Follikeln ist ein hochprismatisches FE und eine anterior-dorsale Position des ON (siehe auch Spradling, 1993). Im Gegensatz hierzu zeichnet sich das *grk*-FE durch eine entlang der Transversalachse gleichmäßige kubische Form aus. Dabei ist der ON in vitellogenen Stadien häufig am posterioren Ende der Ooz lokalisiert. WT- und *grk*-Follikel unterscheiden sich somit deutlich hinsichtlich ihrer Morphologie. Ein besonders penetranter *grk*-Phänotyp konnte in allen vitellogenen Stadien der Transheterozygoten beobachtet werden (Abb. 3.1c).

Zusätzlich zur Analyse der transheterozygoten Fliegen durchgeführte RNAi-Knockdown-Experimente des Gens *grk* (VDRC17610 und BL38913) führten nicht zu ventralisierten *grk*-Follikeln in der F1-Generation und wurden daher nicht weiter verfolgt.

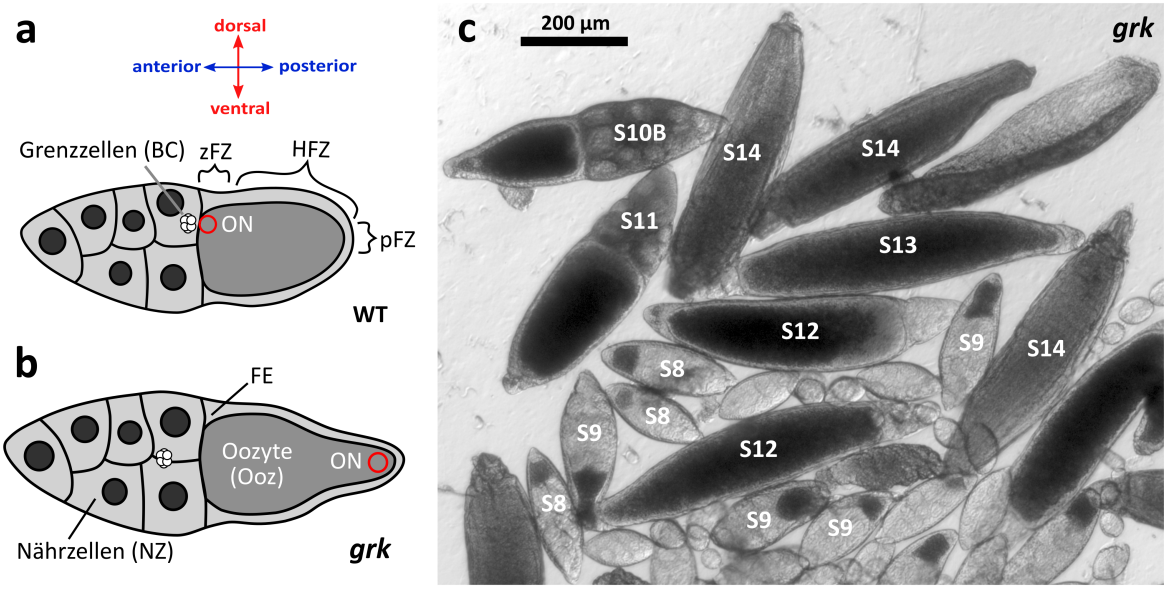


Abbildung 3.1: Morphologische Charakteristika von *grk*-Follikeln. a: Charakteristisch für die dorsale Seite des WT S10B sind ein dickeres Follikelepithel (FE) und eine anterodorsale Position des Oozytenkerns (ON; zFZ, zentripetale Follikelzellen; HFZ, Hauptkörperfollikelzellen; pFZ, posteriore Follikelzellen). **b:** *grk* S10B-Follikel zeichnen sich durch eine fehlende D-V-Polarität aus. BC sind in WT S10B-Follikeln in der Nähe des ON lokalisiert, in *grk* hingegen führt eine gestörte Ausbildung der primären Achsen zu einer undefinierten Positionierung der BC zwischen den NZ. Der ON ist im Gegensatz zum WT häufig am posterioren Ende der Ooz lokalisiert. **c:** Eine transheterozygote Kombination der *grk*-Allele HF48 und 2B6 sorgt für eine starke Penetranz von ventralisierten *grk*-Follikeln in allen vitellogenen Stadien der Oogenese (S8-14; Hellfeldaufnahme).

3.1.2 Bioelektrische Unterschiede zwischen dem WT und der Mutante *grk*

Wie bereits von Krüger und Bohrmann (2015) und Weiß und Bohrmann (2019b) beschrieben, sind eine relative Depolarisation des V_{mem} bzw. ein relativ alkalischer pH_i an verstärkten Fluoreszenzintensitäten der verwendeten Farbstoffe zu erkennen, wohingegen eine relative Hyperpolarisation des V_{mem} bzw. ein relativ saurer pH_i an vergleichsweise schwachen Fluoreszenzintensitäten zu erkennen sind.

Während der frühen und mittleren vitellogenen Stadien S8-10A wiesen WT- (Abb. 3.2a-c und m-o) und *grk*-Follikel (Abb. 3.2g-i und s-u) ähnliche V_{mem}- und pH_i-Muster im gesamten Follikel auf (siehe auch Krüger und Bohrmann, 2015; Weiß und Bohrmann, 2019b). Sowohl im WT als auch in der Mutante *grk* war das FE im Stadium S8 durch ein, im Vergleich zu den entsprechenden Keimbahnzellen (Ooz und NZ), stärker depolarisiertes V_{mem} und einen saureren pH_i charakterisiert. Darüber hinaus entwickelten *grk*-Follikel in diesen Stadien ein dem WT ähnliches A-P-V_{mem}-Muster im FE, bei

dem die HFZ im Vergleich zu benachbarten pFZ und zFZ ein hyperpolarisiertes V_{mem} aufwiesen. Auch bezogen auf den pH_i waren in diesem Stadium Gemeinsamkeiten festzustellen: Sowohl im FE des WT als auch in der Mutante *grk* waren A-P-Gradienten mit dem alkalischsten pH_i in den pFZ nachweisbar. Dies traf auch auf die NZ beider Genotypen zu, da der alkalischste pH_i in den NZ am anterioren Pol vorlag.

Im Stadium S9 begannen sich die ersten Unterschiede zwischen dem WT und der Mutante *grk* zu manifestieren. So wies das *grk*-FE bezogen auf das V_{mem} einen deutlich flacheren A-P-Gradienten auf, wie aus der Abb. 3.2 und der Tabelle 3.1 zu entnehmen ist (für einen Überblick über die Variabilität der S9-Follikel siehe Abb. A.2 im Anhang).

Tabelle 3.1: Das *grk*-FE weist in S9 einen flacheren A-P-V_{mem}-Gradienten auf.

	V_{mem}	pH_i
Gradienten A-P	**Anteil von S9-Follikeln mit zFZ/HFZ $\geq$ 1,5**[a]	**Anteil von S9-Follikeln mit pFE/aFE $\geq$ 1,3**[b]
wt	5/5	2/5
grk	0/5	2/5

[a] A-P-V_{mem}-Gradienten (Fluoreszenzintensitätsquotienten zFZ/HFZ) im FE von WT und *grk* S9-Follikeln wurden, wie in Weiß und Bohrmann (2019b) beschrieben, quantifiziert.

[b] A-P-pH_i-Gradienten (Fluoreszenzintensitätsquotienten pFE/aFE) wurden, wie in Abb. 2.6b_2 beschrieben, quantifiziert. Je größer der Fluoreszenzintensitätsquotient ist, desto ausgeprägter ist der Gradient (siehe Abb. 3.3a).

Im Vergleich zum WT waren *grk*-Follikel durch einen A-P-V_{mem}-Gradienten mit einem signifikant reduzierten Steigungswinkel gekennzeichnet (Abb. 3.3a). Die HFZ in *grk* besaßen zudem ein signifikant weniger hyperpolarisiertes V_{mem} im Verhältnis zu den benachbarten zFZ; *grk*-Follikel wiesen ein insgesamt stärker depolarisiertes FE auf (Abb. 3.2b und h). Deutliche Unterschiede in den A-P-pH_i-Gradienten von WT und *grk* konnten in diesem Stadium nicht festgestellt werden (Abb. 3.3a). Das *grk*-FE schien aber verglichen mit dem WT ingesamt saurer zu sein (vgl. auch Abb. A.2).

Noch deutlichere Unterschiede waren im Stadium S10B zu beobachten. In diesem Stadium wurden im WT D-V elektrochemische Gradienten im FE sichtbar (Abb. 3.2d und p). Diese fehlten jedoch, mit Ausnahme des V_{mem} einzelner Follikel, in der Mutante *grk* (Abb. 3.2j_1 und v, Tabelle 3.2, Abb. 3.3b und Tabelle A.3 im Anhang).

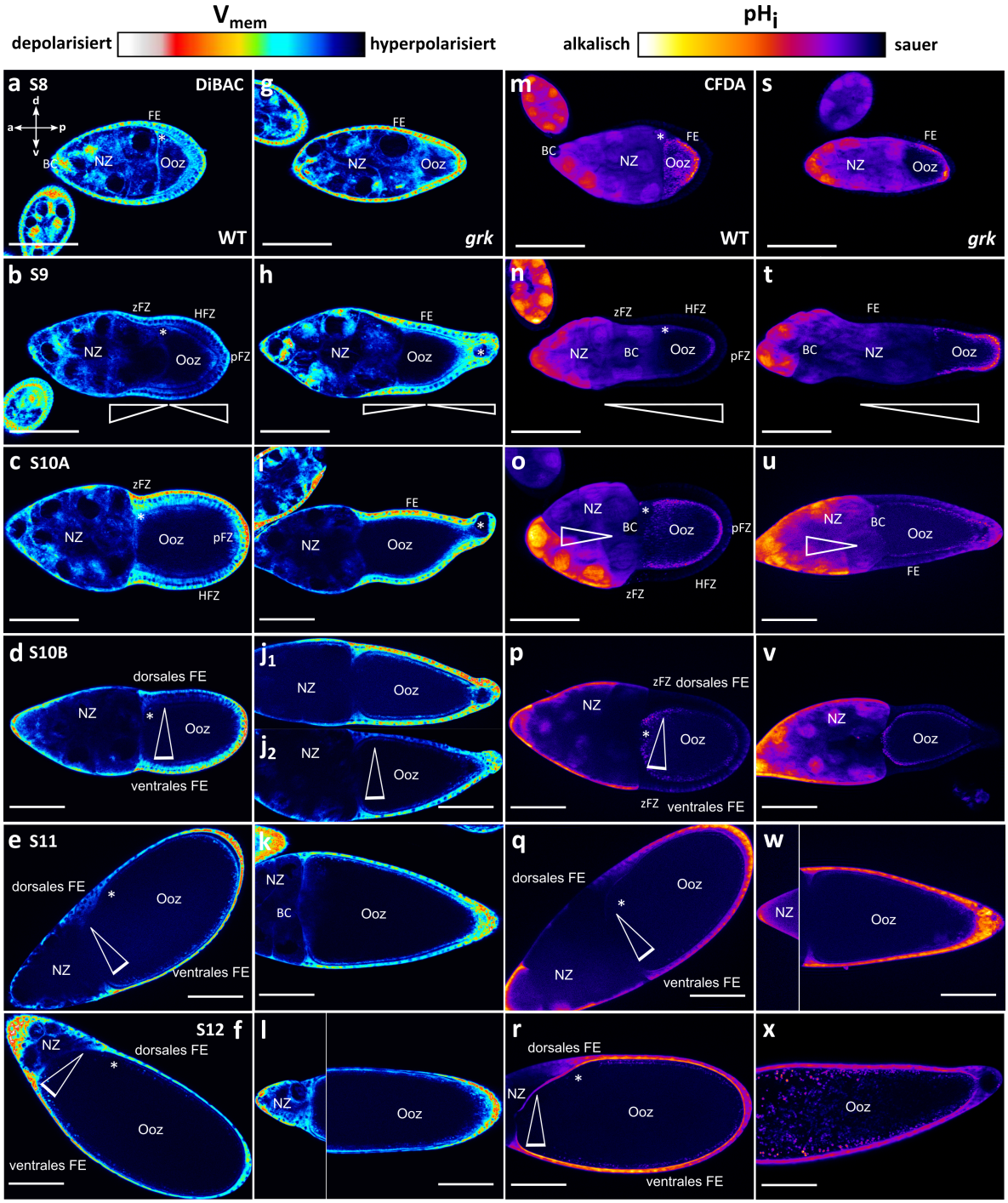


Abbildung 3.2: Typische D-V elektrochemische Gradienten, wie sie im WT FE ab S10B vorliegen, fehlen in der Mutante *grk*. DiBAC- (V_{mem}, **a-l**) und CFDA-Färbung (pH_i, **m-x**), dargestellt sind optische Medianschnitte (SIM) typischer Follikel der Stadien S8 bis S12. **a-l:** Falschfarben-Darstellung von DiBAC-gefärbten WT- (**a-f**) und *grk*-Follikeln (**g-l**). Während eine relative Depolarisation des V_{mem} an verstärkten Fluoreszenzintensitäten (rot) zu erkennen ist, zeichnet sich eine relative Hyperpolarisation durch vergleichsweise schwache Fluoreszenzintensitäten aus (blau; die Maßstabsbalken entsprechen einer Länge von 100 µm; zusammengesetzte Bilder stellen verschiedene Regionen desselben Follikels dar; Sterne kennzeichnen die Positionen des ON). **m-x:** Falschfarben-Darstellung von CFDA-gefärbten WT- (**m-r**) und *grk*- (**s-x**) Follikeln. Ein relativ alkalischer pH_i ist an verstärkten Fluoreszenzintensitäten (gelb) zu erkennen, ein relativ saurer pH_i ist durch vergleichsweise schwache Fluoreszenzintensitäten (blau) gekennzeichnet. (Fortsetzung nächste Seite)

Abbildung 3.2: (Fortsetzung von vorheriger Seite) In den frühen vitellogenen Stadien S8-10A sind in beiden Genotypen noch keine transversalen Gradienten (**a-c, g-i, m-o, s-u**), aber bereits A-P-Gradienten im FE (**b-c, h-i, n-o, t-u**) und in den NZ (**m-o, s-u**) sichtbar (Dreiecke weisen auf die Polarität der Gradienten hin, die spitzen Winkel der Dreiecke verdeutlichen die Steigung der Gradienten). Bezogen auf die pH_i-Gradienten zeigen die pFZ im FE und die NZ am anterioren Pol des Follikels den alkalischsten pH_i. BC weisen in allen untersuchten Stadien beider Genotypen ein relativ depolarisiertes V_{mem} auf und einen relativ sauren pH_i. Erste Unterschiede zwischen WT- und *grk*-Follikeln manifestieren sich in S9 in den A-P-V_{mem}-Gradienten im FE (**b und h**). *grk*-Follikel zeigen ein dem WT ähnliches A-P-V_{mem}-Muster, bei dem die HFZ im Vergleich zu benachbarten pFZ und zFZ ein hyperpolarisiertes V_{mem} aufweisen. Jedoch unterscheiden sich die A-P-Gradienten in ihrer Steigung: Das V_{mem} im *grk*-FE ist insgesamt stärker depolarisiert und die HFZ besitzen ein signifikant weniger hyperpolarisiertes V_{mem} im Verhältnis zu den benachbarten zFZ. Besonders deutliche Unterschiede zwischen WT- und *grk*-Follikeln werden ab S10B erkennbar, wenn D-V-V_{mem}- und pH_i-Gradienten im FE des WT (**d,p**) auftreten, nicht aber im FE von *grk*-Follikeln (**j_1,v**). Bei einigen *grk* S10B-Follikeln ist ein transversaler V_{mem}-Gradient im FE festzustellen (**j_2**; für weitere Beispiele von Follikeln der Stadien S9 und S10B siehe Abb. A.2 im Anhang), im Gegensatz zum WT kann dieser in späteren Stadien jedoch nicht beobachtet werden (**k,l**).

Tabelle 3.2: Eindeutige transversale V_{mem}- und pH_i-Gradienten fehlen im FE von *grk* S10B-Follikeln.

	V_{mem}	pH_i
Gradienten	**Anteil von S10B-Follikeln**	**Anteil von S10B-Follikeln**
transversale[1]	**mit $FE_2/FE_1 \geq 1{,}5$**	**mit $FE_2/FE_1 \geq 1{,}5$**
wt	5/7	4/7
grk	1/7	0/7
A-P[2]	**mit pFE/aFE $\geq$ 1,5**	**mit pFE/aFE $\geq$ 1,5**
wt	2/7	4/7
grk	4/7	6/7

[1] Transversale Gradienten (Fluoreszenzintensitätsquotienten FE_2/FE_1, größerer Wert geteilt durch den kleineren Wert) und

[2] A-P-Gradienten (Fluoreszenzintensitätsquotienten pFE/aFE) im FE des WT und der *grk*-Mutante wurden, wie in Abb. 2.6b_2 beschrieben, quantifiziert (für einen Eindruck der Variabilität zwischen einzelnen Follikeln siehe Abb. A.2 im Anhang). Je größer der Fluoreszenzintensitätsquotient ist, desto ausgeprägter ist der Gradient. A-P-Gradienten in *grk* scheinen im Vergleich zum WT steiler zu sein. Dies ist darauf zurückzuführen, dass zFZ und HFZ (entsprechen dem aFE bei der Quantifizierung der A-P-Gradienten in S10B) in *grk* häufig ein vergleichsweise stärker hyperpolarisiertes V_{mem} und einen saureren pH_i aufweisen. Diese Unterschiede sind allerdings nicht signifikant (siehe Abb. 3.3c).

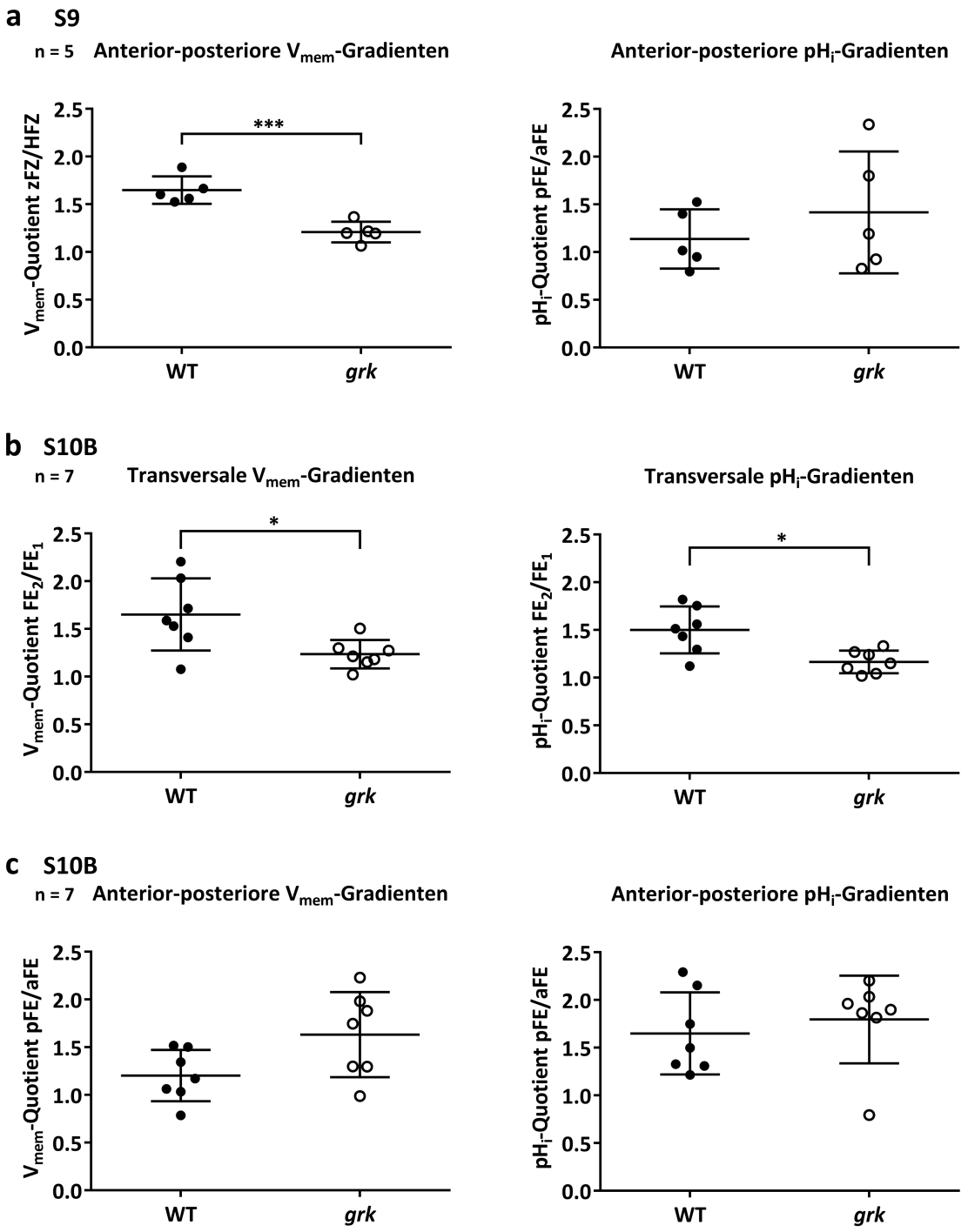


Abbildung 3.3: Im Vergleich zum WT fehlen im FE der Mutante *grk* transversale V_{mem}- und pH_i-Gradienten, darüber hinaus treten in S9 deutlich flachere A-P-V_{mem}-Gradienten auf. a: Die A-P-V_{mem}-Gradienten (Fluoreszenzintensitätsquotienten zFZ/HFZ) in S9 wurden, wie in Weiß und Bohrmann (2019b) beschrieben, quantifiziert. Die A-P-pH_i-Gradienten (Fluoreszenzintensitätsquotienten pFE/aFE) wurden gemäß Abb. 2.6b$_2$ bestimmt. Je größer die Fluoreszenzintensitätsquotienten sind, desto steiler ist der Gradient. Die Mittelwerte und ihre Standardabweichungen wurden mit Hilfe eines ungepaarten t-Tests verglichen (*** $p < 0{,}001$). Während sich die Unterschiede in den pH_i-Gradienten nicht signifikant unterscheiden (pH_i-Gradienten sind flacher als V_{mem}-Gradienten), weisen die V_{mem}-Gradienten signifikante Unterschiede auf. (Fortsetzung nächste Seite)

Abbildung 3.3: (Fortsetzung von vorheriger Seite) **b:** Transversale Gradienten (Fluoreszenzintensitätsquotienten FE_2/FE_1, größerer Wert dividiert durch den kleineren Wert) und **c:** A-P-Gradienten (Fluoreszenzintensitätsquotienten pFE/aFE) wurden in S10B, wie in Abb. 2.6b beschrieben, quantifiziert. Die transversalen Gradienten beider Genotypen weisen einen signifikanten Unterschied auf (* $p < 0{,}05$). A-P-Gradienten hingegen unterscheiden sich nicht signifikant, scheinen allerdings im Vergleich zum WT in der Mutante *grk* etwas steiler zu sein. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die zFZ und HFZ (welche dem aFE bei der Quantifizierung der V_{mem}- und pH_i-Gradienten in S10B entsprechen) in *grk*-Follikeln häufig im Vergleich zu den pFZ stärker hyperpolarisiert und saurer sind.

In den meisten WT-Follikeln wurde, gemäß der Position des ON, die ventrale Seite als diejenige mit dem stärker depolarisierten V_{mem} und dem alkalischeren pH_i identifiziert (vgl. Krüger und Bohrmann, 2015; Weiß und Bohrmann, 2019b).

Ein transversaler V_{mem}-Gradient in *grk* (Abb. 3.2j_2) trat vereinzelt in S10B auf und wurde, im Gegensatz zum WT, in späteren Stadien (S11-12) nicht beobachtet (Abb. 3.2e,f und k,l). Den pH_i betreffend wurde ein solcher Gradient in keinem der analysierten *grk*-Follikel festgestellt (Abb. 3.2v-x, Tabelle 3.2, Abb. 3.3b und im Anhang Tabelle A.3). Desweiteren wurde bei beiden Genotypen in S10B keine signifikant unterschiedlichen A-P elektrochemischen Gradienten beobachtet (Tabelle 3.2, Abb. 3.3c und im Anhang Tabelle A.4). Somit korrelierten beobachtete morphologische Unterschiede zwischen den Follikeln des WT und der Mutante *grk* (Kap. 3.1.1) mit unterschiedlichen stadienspezifischen V_{mem}- und pH_i-Mustern im FE von WT und von *grk* (Abb. 3.2).

3.1.2.1 Zusammenfassung: Vergleich der bioelektrischen Eigenschaften im FE des WT und der Mutante *grk*

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass WT- und *grk*-Follikel ähnliche V_{mem}- und pH_i-Muster in den frühen und mittleren vitellogenen Stadien S8-10A zeigten. Die A-P elektrochemischen Gradienten im FE bzw. in den NZ glichen sich ebenfalls. Eine Ausnahme bildete der signifikant flachere A-P-V_{mem}-Gradient in *grk* S9-Follikeln. Transversale elektrochemische Gradienten waren in diesen Stadien in beiden untersuchten Genotypen nicht erkennbar.

Ab S10B änderte sich dies: Während im WT gleichzeitig mit einer sich manifestierenden morphologischen D-V-Polarität D-V elektrochemische Gradienten auftraten, fehlten diese transversalen Gradienten in der Achsenpolaritätsmutante *grk*. Die A-P-Gradienten waren von diesen in S10B auftretenden Änderungen der bioelektrischen Eigenschaften nicht betroffen (Abb. 3.6).

3.1.3 Unterschiede im Zytoskelett von WT und *grk*

Um das Zytoskelett im FE des WT in den Stadien S8-12 mit dem der Mutante *grk* zu vergleichen, wurden die bMF von Follikeln entsprechender Stadien mit fluoreszierendem Phalloidin sowie die MT mit einem monoklonalen Antikörper gegen acetyliertes α-Tubulin gefärbt (Abb. 3.5).

3.1.3.1 Vergleich der bMF von WT und *grk*

Im Verlauf des Stadiums S8 zeigten die bMF die gleiche parallele transversale Anordnung im WT und in der Mutante *grk* (Abb. 3.5a und g). Im weiteren Verlauf der Oogenese (S9-11), mit Ausnahme des Stadiums S10A, fehlte diese Anordnung im WT, blieb aber in *grk* in allen Stadien erhalten (Abb. 3.5g-k). Im WT entstanden Kondensationen der bMF in den zFZ in S9 und in den dorsalen zFZ in S10B. Dieses Phänomen wurde vom Verlust der zellübergreifenden parallelen Anordnung der bMF-Bündel im übrigen WT-FE begleitet (Abb. 3.5b und d und, für einen Überblick über die Variabilität innerhalb eines Stadiums, Abb. A.3a-c und d-f im Anhang). In der Mutante *grk* fehlten diese Kondensationen, und die zellübergreifende transversale Anordnung der bMF-Bündel im FE blieb in den genannten Stadien erhalten (Abb. 3.5g-l und 3.4).

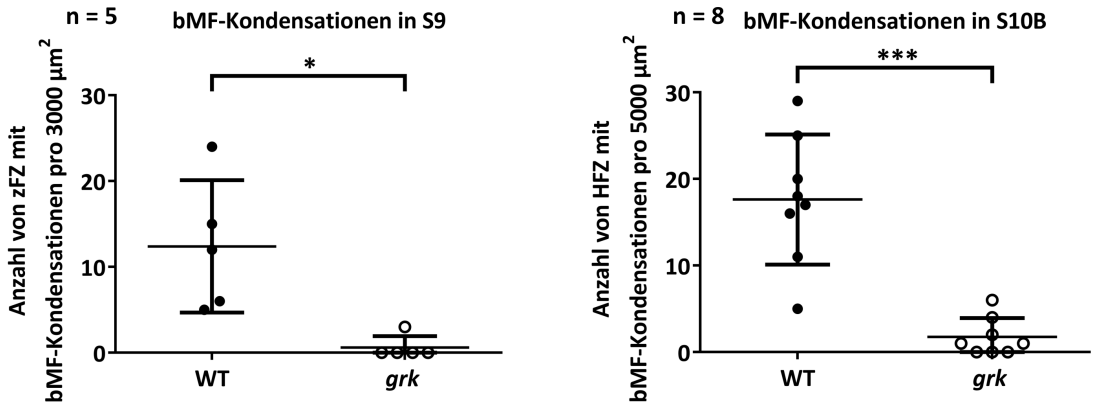


Abbildung 3.4: Quantitative Auswertung der bMF-Kondensationen in S9 (zFZ) und S10B (HFZ). Für den WT charakteristische Kondensationen der bMF (Schema mit den für die Quantifizierung relevanten Bereichen in Abb. 2.7) fehlen in der Mutante *grk*. Die Mittelwerte und ihre Standardabweichungen wurden mit Hilfe eines ungepaarten t-Tests verglichen (* $p < 0{,}05$, *** $p < 0{,}001$).

In S11 änderte sich diese Anordnung, und die bMF wiesen eine fächerförmige Struktur auf (Abb. 3.5e, vgl. Weiß und Bohrmann, 2019a). Eine vergleichbare Organisation der bMF konnte in *grk* nicht beobachtet werden. Stattdessen wiesen die FZ von *grk* S11-Follikeln vereinzelt sehr dichte Bündel auf, während in vielen anderen FZ nur sehr

schwache bMF-Bündel auftraten oder die bMF bereits vollständig abgebaut worden waren. Dieser Prozess der Depolymerisation setzte sich in der Mehrzahl der analysierten *grk*-Follikel in den HFZ in posteriorer Richtung fort, während in den HFZ einiger anderer *grk*-Follikel ein zum S12 des WT vergleichbares Muster der bMF zu erkennen war. Dieses WT-Muster zeichnete sich durch dichte Bündel paralleler bMF aus (Abb. 3.5f,l). Letzteres deutet darauf hin, dass sich das transversale Muster in *grk*-Follikeln langsamer als im WT in posteriorer Richtung ausbreitet und die parallele Anordnung der bMF im Vergleich zum WT weniger strikt ist.

Zusammenfassend lässt sich für die Organisation der bMF in der Mutante *grk* festzustellen, dass sich die bMF in allen analysierten Stadien durch eine transversale Anordnung auszeichneten. Für den WT charakteristische Kondensationen in den zFZ (S9) und in den dorsalen zFZ (S10B) fehlten in der Mutante *grk* (Abb. 3.5g-l, Abb. 3.4).

3.1.3.2 Vergleich der MT von WT und *grk*

Die MT-Organisation veränderte sich ebenso wie die Organisation der bMF im Verlauf der Oogenese. In S8 zeigten alle FZ eine mehr oder weniger zellautonome Organisation mit einer korbförmigen Anordnung der MT um die Zellkerne (Abb. 3.5m und A.3 im Anhang). Zu Beginn von S9 entwickelten die MT in den zFZ und HFZ des WT eine longitudinale Anordnung (Abb. 3.5n), während die MT in den pFZ ihre zellautonome Organisation beibehielten (Ausschnitt in Abb. 3.5n und A.3m-o im Anhang). Die longitudinale Anordnung begann in den zFZ und breitete sich über die HFZ bis zu den pFZ hin aus (vgl. Weiß und Bohrmann, 2019a). In *grk* hingegen war im gesamten FE und in allen untersuchten Stadien eine longitudinale Anordnung der MT festzustellen (Abb. 3.5s-x und A.3s-x im Anhang). Die longitudinale Anordnung schien dabei, verglichen mit dem WT, in einem größeren Ausmaß zwischen benachbarten Zellen koordiniert zu sein.

3.1.3.3 Zusammenfassung: Vergleich der Eigenschaften des Zytoskeletts des WT und der Mutante *grk*

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich das Zytoskelett des FE im WT und in der Mutante *grk* deutlich unterschied. Wie bei den bioelektrischen Eigenschaften korrelierten die morphologischen Unterschiede zwischen den Follikeln von WT und *grk* auch mit Änderungen der Zytoskeletteigenschaften. So fehlten z. B. für den WT charakteristische bMF-Kondensationen in den dorsalen zFZ von *grk* S10B-Follikeln. In allen analysierten Stadien waren *grk*-Follikel zudem durch eine transversale bMF-Anordnung und eine longitudinale MT-Anordnung sowie durch die Abwesenheit zellautonom-organisierter MT gekennzeichnet.

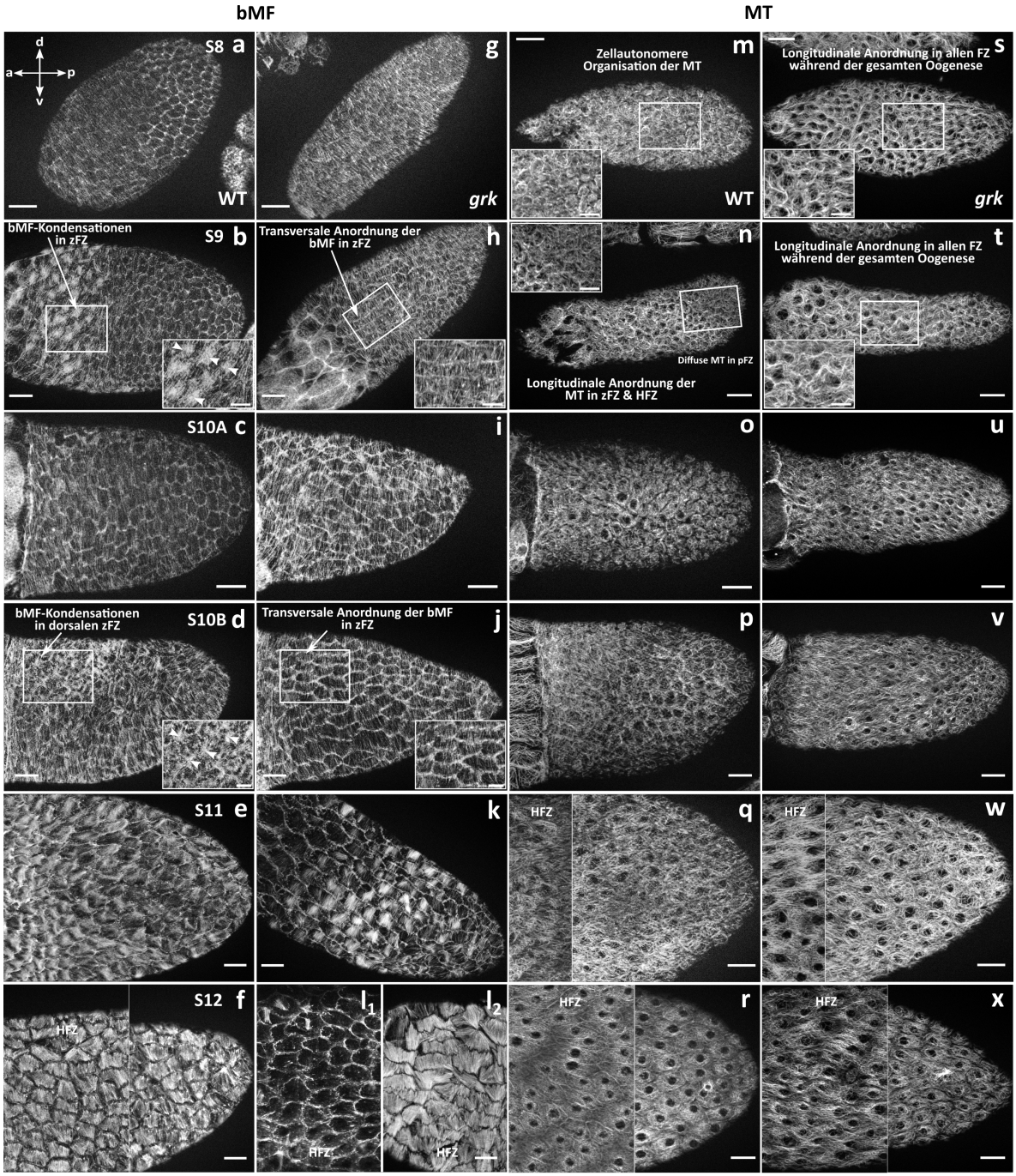


Abbildung 3.5: Im Vergleich zum WT zeigt das Zytoskelett des FE in *grk* deutliche Unterschiede. Färbung der bMF mit fluoreszierendem Phalloidin (**a-l**) und immunohistochemische Färbung der MT mit Hilfe eines Antikörpers gegen acetyliertes α-Tubulin (**m-x**); dargestellt sind Tangentialschnitte (SIM) typischer Follikel der Stadien S8 bis S12. **a-l:** Mit fluoreszierendem Phalloidin (bMF) gefärbte WT- (**a-f**) und *grk*-Follikel (**g-l**). **m-x:** Färbung von acetyliertem α-Tubulin (MT) in WT- (**m-r**) und *grk*- (**s-x**) Follikeln (die Maßstabsbalken aller Aufnahmen entsprechen einer Länge von 20 µm sowie die der vergrößerten Ausschnitte einer Länge von 10 µm; mit Ausnahme von l_1 und l_2 stellen zusammengesetzte Bilder verschiedene Regionen des selben Follikels dar; weiße Kästen markieren den in den Ausschnitten dargestellten vergrößerten Bereich eines Follikels). Wie bei den analysierten bioelektrischen Eigenschaften (Abb. 3.2) ist auch das *grk*-FE durch einige Besonderheiten im Zytoskelett charakterisiert: bMF der Mutante *grk* zeichnen sich, im Gegensatz zum WT, durch eine ausgeprägte transversale Anordnung in allen analysierten Stadien aus. (Fortsetzung nächste Seite)

Abbildung 3.5: (Fortsetzung von vorheriger Seite) Für den WT typische Kondensationen der bMF (Pfeilspitzen) in den zFZ (S9, **b**) und den dorsalen zFZ (S10B, **d**) fehlen hingegen (**h** und **j**). In S11 sind die bMF in einigen FZ vollständig abgebaut. Dieses Prozess setzt sich im FE einiger *grk* S12-Follikel fort ($\mathbf{l}_1$), sodass die bMF in diesen Follikeln nahezu vollständig abgebaut sind, andere Follikel entwickeln eine zum WT vergleichbar dichtes bMF-Netzwerk, welches jedoch im Vergleich zum WT eine weniger strenge tranversale Anordnung aufweist ($\mathbf{l}_2$). Bei den MT fällt eine starke longitudinale Anordnung im gesamten *grk*-FE während aller analysierten Stadien auf. Diesem gegenüber steht die longitudinale Anordnung im WT, welche sich im Verlauf der vitellogenen Stadien von den zFZ in Stadium S9 bis zu den pFZ in Stadium S12 ausbreitet (für Beispiele weiterer Follikel der Stadien S9 und S10B Abb. A.3 im Anhang).

Zellautonom-organisierte MT breiteten sich ab S9 entlang der A-P-Achse in den vitellogenen Stadien des WT aus, nicht aber in der Mutante *grk*.

3.1.4 Zusammenfassung der auffälligsten Unterschiede zwischen WT und *grk*

Im WT und in der Mutante *grk* wurden einige charakteristische Merkmale bezüglich der bioelektrischen Eigenschaften und des Zytoskeletts festgestellt. Diese sind in Abbildung 3.6 zusammengefasst. In frühen vitellogenen Stadien (bis S9) wiesen die A-P-V_{mem}- und pH_i-Gradienten im FE die gleiche Polarität auf. Jedoch unterschieden sich die A-P-V_{mem}-Gradienten beider Genotypen hinsichtlich ihrer Steigung im Stadium S9. *grk* S9-Follikel zeigten einen flacheren A-P-V_{mem}-Gradienten und ein ingesamt stärker depolarisiertes FE (Tabelle 3.1 und Abb. 3.3a). Im gleichen Stadium war das Zytoskelett von *grk*-Follikeln einerseits durch eine transversale Anordnung der bMF und andererseits durch den Verlust WT-typischer bMF-Kondensationen sowie durch die Abwesenheit zellautonom-organisierter MT gekennzeichnet (Abb. 3.6a).

Diese Unterschiede zwischen den beiden Genotypen wurden noch deutlicher ab S10B, als eine D-V-Polarität im WT, aber nicht in der Mutante *grk* sichtbar wurde. Tatsächlich traten im WT in Verbindung mit bMF-Kondensationen in dorsalen zFZ und zellautonom-organisierten MT in HFZ und pFZ deutliche A-P- und D-V-Gradienten des V_{mem} und pH_i im FE auf (Abb. 3.6b). In der Mutante *grk* hingegen korrelierte eine fehlende morphologische D-V-Polarität ab S10B mit dem Verlust transversaler V_{mem}- und pH_i-Gradienten (Abb. 3.3b und Tabelle 3.2). Dies spiegelte sich auch in der Organisation des Zytoskeletts wider, da bMF-Kondensationen und zellautonom-organisierte MT im gesamten FE der Mutante *grk* fehlten (Abb. 3.4).

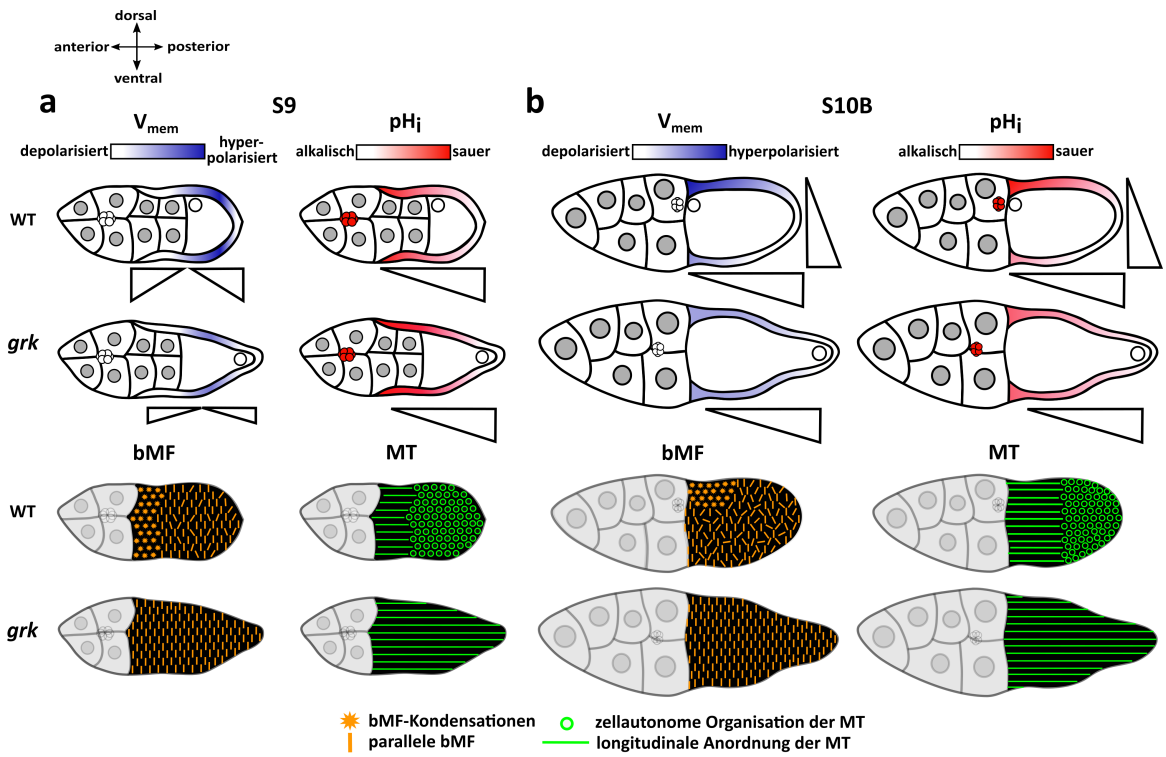


Abbildung 3.6: Zusammenfassung der hinsichtlich der bioelektrischen Eigenschaften und des Zytoskeletts auffälligsten Unterschiede zwischen WT und *grk*. In frühen vitellogenen Stadien, wie beispielsweise S9 (**a**), entsprechen die V_{mem}- (Gradient von weiß nach blau) und pH_i-Muster (Gradient von weiß nach rot) von *grk* denen des WT. Während sich die Farbe weiß auf eine Zunahme der Fluoreszenzintensitäten bezieht, welche einem stärker depolarisierten bzw. alkalischeren FE entspricht, zeigen die Farben blau (V_{mem}) und rot (pH_i) eine Abnahme der Fluoreszenzintensitäten an, was mit einer relativen Hyperpolarisation (blau) oder relativen Azidifizierung (rot) übereinstimmt. Dreiecke weisen auf die Polarität des Gradienten hin. Das FE von WT S9-Follikeln weist einerseits einen deutlichen A-P-V_{mem}-Gradienten auf: das V_{mem} der HFZ ist hyperpolarisiert (dunkelblau) im Verhältnis zu benachbarten zFZ und pFZ (weiß). Andererseits ist ein A-P-pH_i-Gradient mit dem alkalischsten pH_i in den pFZ (weiß) nachweisbar. Bei *grk* ist der A-P-V_{mem}-Gradient flacher als beim WT. Tatsächlich sind die HFZ im Stadium S9 bei *grk* im Verhältnis zu benachbarten FZ in geringerem Maße hyperpolarisiert. Insgesamt weist das FE von *grk* S9-Follikeln ein stärker depolarisiertes V_{mem} und einen saureren pH_i als im WT auf. Während die zFZ im Stadium S10B (**b**) von *grk* eine leichte Hyperpolarisation sowie eine leichte Azidifizierung im Verhältnis zu anderen FZ zeigen, sind die dorsalen zFZ des WT durch eine starke Hyperpolarisation sowie eine starke Azidifizierung gekennzeichnet. Ein relativ depolarisiertes V_{mem} und ein relativ saurer pH_i sind charakteristisch für die BC im WT und in der Mutante *grk*. Die bMF im Stadium S9 sind bei *grk* (**a**) durch eine transversale Anordnung (orangefarbene Striche) und die MT durch eine longitudinale Anordnung (grüne Striche) gekennzeichnet. Abweichend von der Organisation im WT konnten keine bMF-Kondensationen (Sterne) und zellautonom-organisierte MT (Kreise) beobachtet werden. Auffälligerweise korreliert die fehlende Etablierung der D-V-Achse ab S10B in der Mutante *grk* mit dem Fehlen transversaler V_{mem}- und pH_i-Gradienten, während eine korrekte Etablierung der D-V-Achsenpolariät im WT mit starken D-V-V_{mem}- und pH_i-Gradienten im FE einhergeht. Dementsprechend fehlen bMF-Kondensationen und zellautonom-organisierte MT im gesamten FE der Mutante *grk*, während Kondensationen und zellautonom-organisierte MT in den dorsalen zFZ und HFZ sowie pFZ des WT zu finden sind.

3.2 Nachweis von V_{mem}- und pH_i-Änderungen infolge einer Inhibition von Ionentransportmechanismen mit Hilfe genetisch codierter Sensoren

Trotz zahlreicher Studien, die eine regulatorische Rolle bioelektrischer Signale dokumentieren, sind die spezifischen Ionentransportmechanismen, mit Hilfe derer bioelektrische Signale Einfluss auf die Entwicklung von *Drosophila* nehmen, noch nicht vollständig aufgeklärt. Um deren Rolle in der Regulation des V_{mem} und pH_i im FE von S10B-Follikeln näher zu bestimmen und frühere Ergebnisse zu reevaluieren, wurden Experimente mit den genetisch codierten V_{mem}- und pH_i-Sensoren ArcLight und pHluorin-Moesin in Kombination mit sechs Inhibitoren von Ionentransportmechanismen durchgeführt (Abb. 3.7).

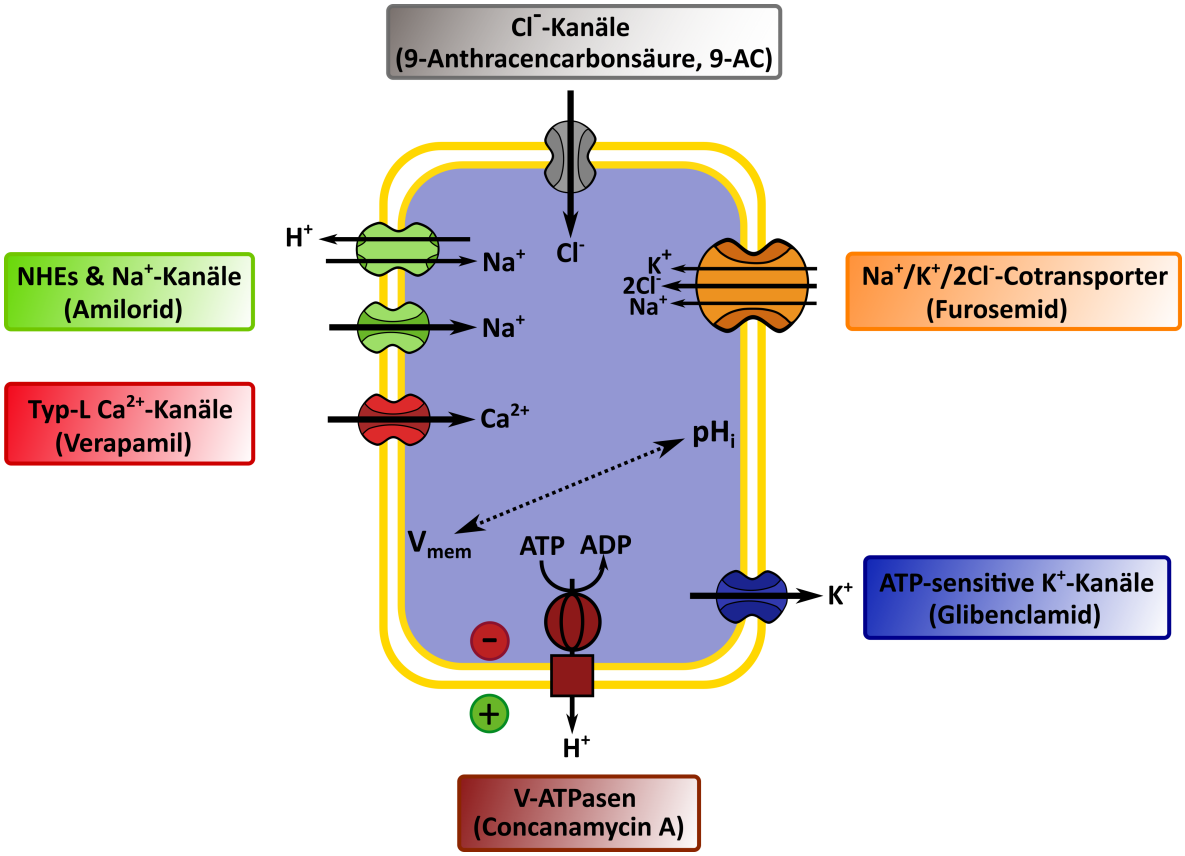


Abbildung 3.7: Übersicht über die verwendeten Inhibitoren. Schematische Darstellung einer Zelle mit den analysierten Ionentransportmechanismen und deren spezifischen Inhibitoren (in Klammern).

3.2.1 V_{mem}-Sensor ArcLight und pH_i-Sensor pHluorin

Eine relative Depolarisation des V_{mem} wird in ArcLight-exprimierenden FZ durch eine Abnahme des grünen Fluoreszenzlichts angezeigt, eine relative Hyperpolarisation hingegen durch eine Zunahme des grünen Fluoreszenzlichts (siehe auch Kap. 2.6). Eine Azidifizierung des pHluorin-Moesin exprimierenden FE ist wiederum als Folge einer Protonierung des Chromophors pHluorin an einer Abnahme des Fluoreszenzlichts zu erkennen, wohingegen eine Alkalisierung als Folge einer Deprotonierung durch eine Zunahme des Fluoreszenzlichts angegeben wird. Beide Sensoren sind am Zellkortex lokalisiert (Kap. 2.6).

Die Expression beider Sensoren wurde mit dem Ziel überprüft, etwaige Schwankungen der Fluoreszenzintensitäten auch ohne Zugabe eines Inhibitors aufzudecken. Dazu wurden die Fluoreszenzintensitäten im FE von ArcLight- oder pHluorin-exprimierenden S10B-Follikeln im Verlauf einer Stunde bestimmt. Sowohl für den V_{mem}-Sensor ArcLight als auch den pH_i-Sensor pHluorin konnten mit WFM nahezu konstante Fluoreszenzintensitäten im Zeitverlauf gemessen werden (Abb. 3.8).

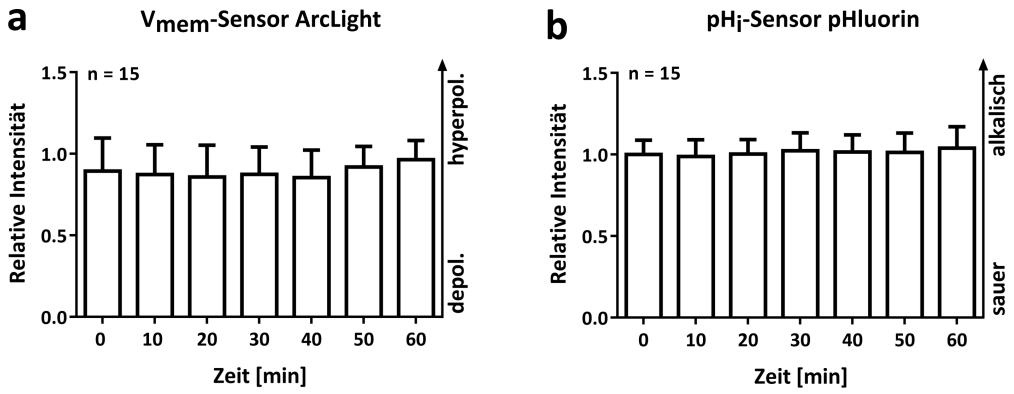


Abbildung 3.8: Sowohl der V_{mem}-Sensor ArcLight als auch der pH_i-Sensor pHluorin zeigen konstante Fluoreszenzintensitäten im Zeitverlauf. Für beide verwendete Sensoren, ArcLight (**a**) und pHluorin (**b**), wurden keine signifikanten Unterschiede in den Fluoreszenzintensitäten des FE im Verlauf einer Stunde in R14-Medium festgestellt. Basierend auf WFM-Aufnahmen (Abb. 2.8) wurden die Fluoreszenzintensitäten im FE von ArcLight- und pHluorin-exprimierenden S10B-Follikeln gemessen und die auf den Messzeitpunkt 0 min normierten Werte aus drei Experimenten (n = 15 Follikel) zusammengefasst. Die Mittelwerte und ihre Standardabweichungen wurden mit Hilfe eines multiplen t-Tests mit Holm-Sidak-Korrektur (One-way ANOVA) und der Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0{,}05$ verglichen.

Eine Analyse der FE-spezifischen Expression von ArcLight oder pHluorin anhand von optischen Medianschnitten (SIM) im Verlauf der Oogenese (S8-12) zeigte stadienspezifische V_{mem}- und pH_i-Muster (Abb. 3.9b und c). Ein D-V-V_{mem}-Gradient, wie er in

DiBAC-gefärbten Follikeln beobachtet wurde (Abb. 3.2), war auch im FE von ArcLight exprimierenden S10B-12-Follikeln zu finden (Abb. 3.9b). Auch A-P-V_{mem}- und pH_i-Gradienten waren im FE der ArcLight- bzw. pHluorin-exprimierenden Follikel nachweisbar. Obwohl diese Muster den Mustern, die mit Hilfe der Fluoreszenzfarbstoffe DiBAC und CFDA beobachtet wurden, ähnelten, unterschieden sie sich teilweise in ihrer Polarität von denen des WT (vgl. Weiß und Bohrmann, 2019a). In WT S10B-Follikeln etabliert sich normalerweise ein D-V-Gradient, bei dem meist die ventrale Seite als die stärker depolarisierte Seite zu erkennen ist. In ArcLight-exprimierenden Follikeln hingegen war in allen analysierten S10B-Follikeln (n = 30) die dorsale Seite als die stärker depolarisierte Seite zu erkennen. Die uniforme Expression im FE durch den Somatreiber *tj*-Gal4 wurde mittels GFP-Expression überprüft (Abb. 3.9a).

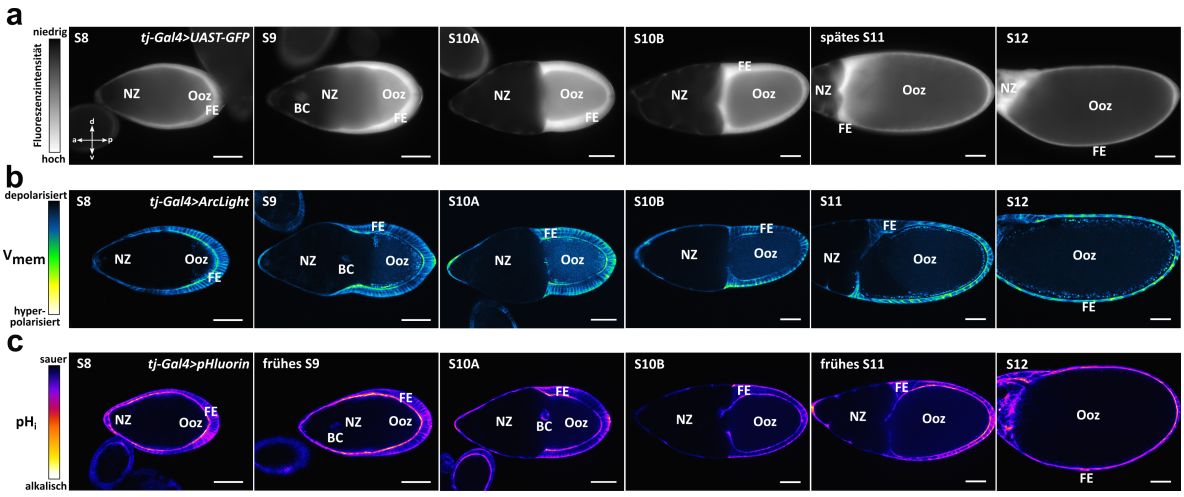


Abbildung 3.9: Verwendung der genetisch codierten fluoreszierenden V_{mem}- und pH_i-Sensoren ArcLight und pHluorin zur Analyse von V_{mem} und pH_i. a: Uniforme GFP-Expression im FE vitellogener *Drosophila*-Follikel unter Verwendung des Somatreibers *tj*-Gal4 (Kontrolle). Dargestellt sind WFM-Aufnahmen typischer S8 bis S12 *tj-Gal4>UAST-GFP*-Follikel. **b-c:** Falschfarben-Darstellung von ArcLight-(**b**) oder pHluorin-(**c**) exprimierenden Follikeln im FE. Dargestellt sind optische Medianschnitte (SIM) typischer S8 bis S12 *tj-Gal4>ArcLight- bzw. pHluorin*-Follikel (die Maßstabsbalken entsprechen einer Länge von 50 µm).

3.2.2 Effekte einer Inhibition aller energieabhängigen Ionentransportmechanismen auf V_{mem} und pH_i im FE

Zur Überprüfung der Tauglichkeit der beiden genetisch codierten Sensoren für quantitative Analysen im FE wurden alle engergieabhängigen Ionentransportmechanismen durch Blockierung der Cytochrom-C-Oxidase mit Natriumazid (NaN_3) inhibiert und die Fluoreszenzintensitäten im FE der Follikel quantifiziert. Im Falle der ArcLight-

Experimente wurden die normierten Werte (Normierung auf den Mittelwert der Kontrollgruppe) aus vier Experimenten gemittelt und in einer Auswertung zusammengefaßt (n = 19 Follikel). Für pHluorin wurde ein Experiment durchgeführt (n = 4 Follikel).

Wie aus Abbildung 3.10 zu entnehmen ist, zeigten beide Sensoren infolge der Inhibition mit Natriumazid signifikante Änderungen der Fluoreszenzintensität. Natriumazid führte zu einer deutlichen Depolarisation des V_{mem} und zu einer Alkalisierung des pH_i im FE.

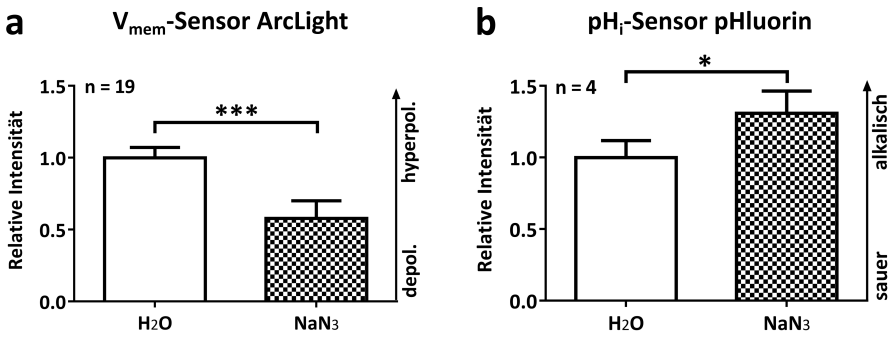


Abbildung 3.10: Eine Inhibition aller energieabhängigen Ionentransportmechanismen führt zu einer Depolarisation des V_{mem} und einer Alkalisierung des pH_i im FE. Natriumazid (NaN_3), ein Inhibitor der oxidativen Phosphorylierung und somit aller engergieabhängigen Ionentransportmechanismen, führt zu einer verstärkten Depolarisation des V_{mem} (**a**) und einer Alkalisierung des pH_i (**b**; n = Anzahl Follikel). Die Mittelwerte der normierten Werte und ihre Standardabweichungen wurden mit Hilfe eines ungepaarten t-Tests verglichen (* $p < 0{,}05$; *** $p < 0{,}001$).

3.2.3 Inhibition verschiedener Ionentransportmechanismen im ArcLight- und pHluorin-exprimierenden FE

Infolge der Inhibition, der in Abb. 3.7 dargestellten Ionentransportmechanismen, zeigten beide Sensoren verlässlich Änderungen der bioelektrischen Eigenschaften an (Abb. 3.11, 3.12 und 3.13). Normierte Werte (Kap. 2.11.1) von n = 15-21 S10B-Follikeln gingen in eine Auswertung ein (relative Intensität).

3.2.3.1 Direkter Vergleich der Effekte aller verwendeter Inhibitoren

Um die beschriebenen Effekte aller Inhibitoren auf das V_{mem} oder den pH_i im FE direkt vergleichen zu können, wurde eine zweite Auswertung der Daten durchgeführt. Dafür wurden die mittleren Intensitätsquotienten der Inhibitions- und Kontrollgruppe von vier Wiederholungen des Experiments berechnet und mit dem hypothetischen Mittelwert 1,0 verglichen (zur Durchführung siehe Kap. 2.11.1; Abb. 3.12b, 3.13b, 3.15b

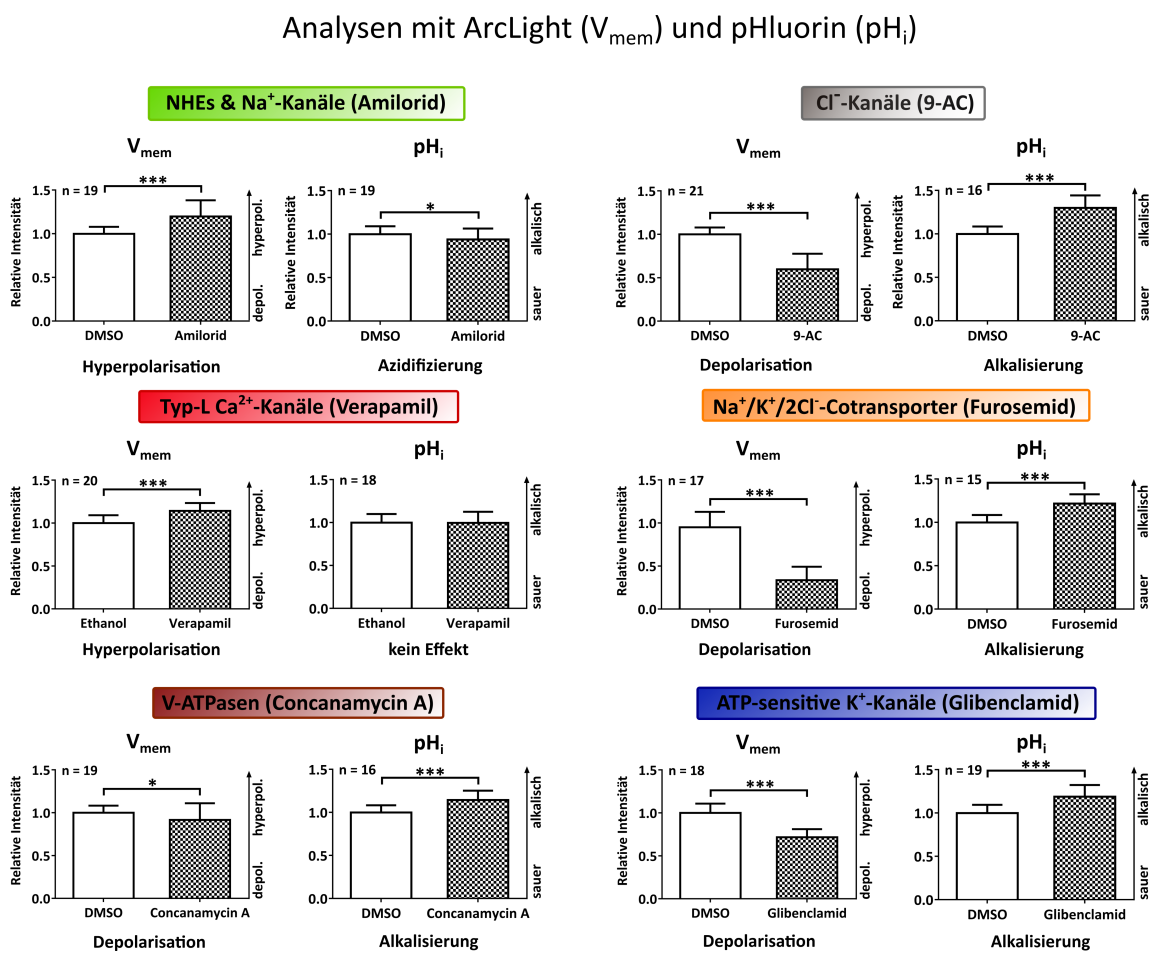


Abbildung 3.11: Mit Hilfe der genetisch codierten Sensoren lassen sich Änderungen der bioelektrischen Eigenschaften, herbeigeführt durch verschiedene Inhibitoren, detektieren. Alle verwendeten Inhibitoren führen zu signifikanten Änderungen des V_{mem} und/oder pH_i im FE. Während eine Inhibition der NHEs und Na^+-Kanäle oder von Typ-L Ca^{2+}-Kanälen zu einer Hyperpolarisation führt, bewirkt eine Inhibition der V-ATPasen, der Cl^--Kanäle, der $Na^+/K^+/2Cl^-$-Cotransporter oder der ATP-abhängigen K^+-Kanäle eine Depolarisation. Bezüglich des pH_i resultiert eine Inhibition der V-ATPasen, der Cl^--Kanäle, der $Na^+/K^+/2Cl^-$-Cotransporter oder der ATP-abhängigen K^+-Kanäle in einer Alkalisierung, eine Inhibition von NHEs und Na^+-Kanälen hingegen in einer Azidifizierung. Eine Inhibition von Typ-L Ca^{2+}-Kanälen hat keinen Effekt auf den pH_i im FE. Normierte Werte von n = 15-21 S10B-Follikeln gingen in eine Auswertung ein (relative Intensität). Die Mittelwerte und ihre Standardabweichungen wurden mit Hilfe eines ungepaarten t-Tests verglichen (* $p < 0{,}05$; *** $p < 0{,}001$).

und 3.16b). Diese Auswertung berücksichtigte im Gegensatz zu der in Abb. 3.11 und 3.14 dargestellten Analyse nicht die Variabilität zwischen einzelnen Follikeln, sondern zwischen einzelnen Experimenten. Beide Auswertungen deckten inhibitorische Effekte mit vergleichbarem Einfluss auf das V_{mem} oder den pH_i im FE von S10B-Follikeln auf (Tabelle 3.3).

3.2.3.2 Analyse mit dem V_{mem}-Sensor ArcLight

Während die Inhibitoren Amilorid (NHEs, Na^+-Kanäle) und Verapamil (spannungsabhängige Typ-L Ca^{2+}-Kanäle) zu verstärkten Fluoreszenzintensitäten (Hyperpolarisation) im ArcLight-exprimierenden FE führten, bewirkten die Inhibitoren Concanamycin A (V-ATPasen), 9-AC (Cl^--Kanäle), Furosemid ($Na^+/K^+/2Cl^-$-Cotransporter) und Glibenclamid (ATP-abhängige K^+-Kanäle) eine Reduzierung der Fluoreszenzintensitäten (Depolarisation; Abb. 3.11 und 3.12). Furosemid erzielte die stärksten Effekte auf das V_{mem} im FE, Concanamycin A die schwächsten (Abb. 3.12b).

3.2.3.3 Analyse mit dem pH_i-Sensor pHluorin

Den pH_i betreffend führten die Inhibitoren Concanamycin A, 9-AC, Furosemid und Glibenclamid zu verstärkten Fluoreszenzintensitäten (Alkalisierung) im pHluorin-exprimierenden FE, wohingegen die Behandlung der Follikel mit Amilorid reduzierte Fluoreszenzintensitäten zur Folge hatte (Azidifizierung). Die stärksten Effekte auf den pH_i im FE waren nach einer Inhibition mit 9-AC zu beobachten. Verapamil hatte unter den verwendeteten experimentiellen Bedingungen keinen signifikanten Einfluss auf den pH_i (Abb. 3.11).

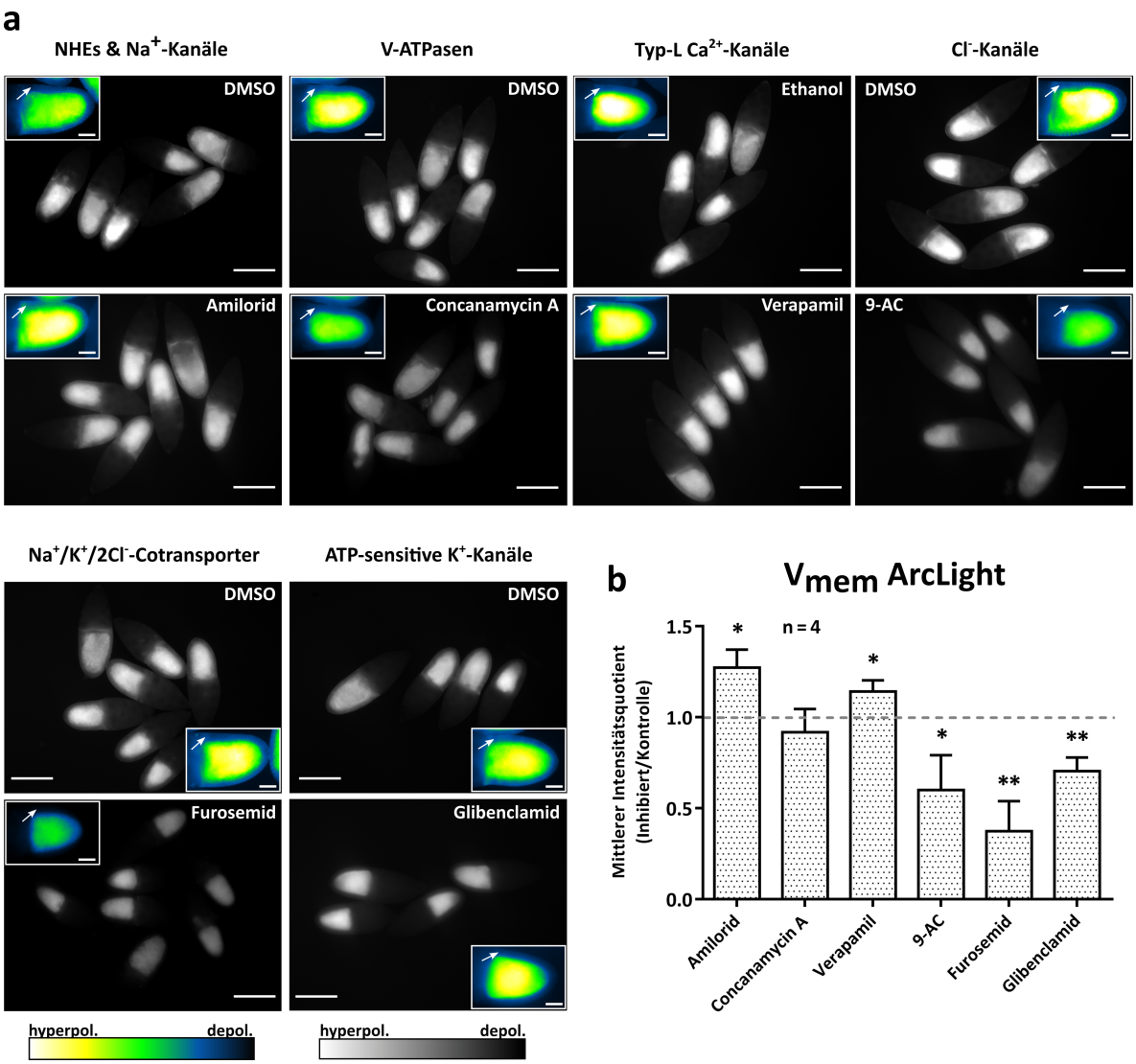


Abbildung 3.12: Vergleich der Einflüsse verschiedener Inhibitoren auf das V_{mem} des FE mittels ArcLight. a: WFM-Aufnahmen von typischen ArcLight-exprimierenden S10B-Follikeln nach Inkubation mit dem entsprechenden Inhibitor oder nach Inkubation in der Kontrolllösung (DMSO oder Ethanol; die Maßstabsbalken entsprechen einer Länge von 200 µm); die Ausschnitte zeigen vergrößerte Beispielbilder in Falschfarben-Darstellung (Pfeile deuten auf das FE; die Maßstabsbalken entsprechen hier einer Länge von 50 µm). Eine relative Hyperpolarisation ist an verstärkten Fluoreszenzintensitäten (weiß) zu erkennen, eine relative Depolarisation hingegen ist durch schwächere Fluoreszenzintensitäten (blau/dunkelblau) gekennzeichnet. **b:** Zunehmende Fluoreszenzintensitäten (Hyperpolarisation) sind das Resultat einer Inhibition mit Amilorid oder Verapamil, wohingegen eine Inhibition mit 9-AC, Furosemid, Glibenclamid oder Concanamycin A zu reduzierten Fluoreszenzintensitäten (Depolarisation) führt. Basierend auf den WFM-Aufnahmen (Abb. 2.8) wurden mittlere Intensitätsquotienten der Inhibitions- und Kontrollgruppe (Inhibiert/Kontrolle) aus n = 4 Experimenten für jeden Inhibitor berechnet. Diese flossen anschließend in eine Auswertung ein und gaben Aufschluss über die Variabilität zwischen einzelnen Experimenten. Die Mittelwerte und ihre Standardabweichungen wurden mit Hilfe eines *one-sample* t-Tests verglichen (* $p < 0{,}05$; ** $p < 0{,}01$). Die stärksten Effekte auf das V_{mem} sind nach der Inhibition mit 9-AC, Furosemid oder Glibenclamid zu beobachten.

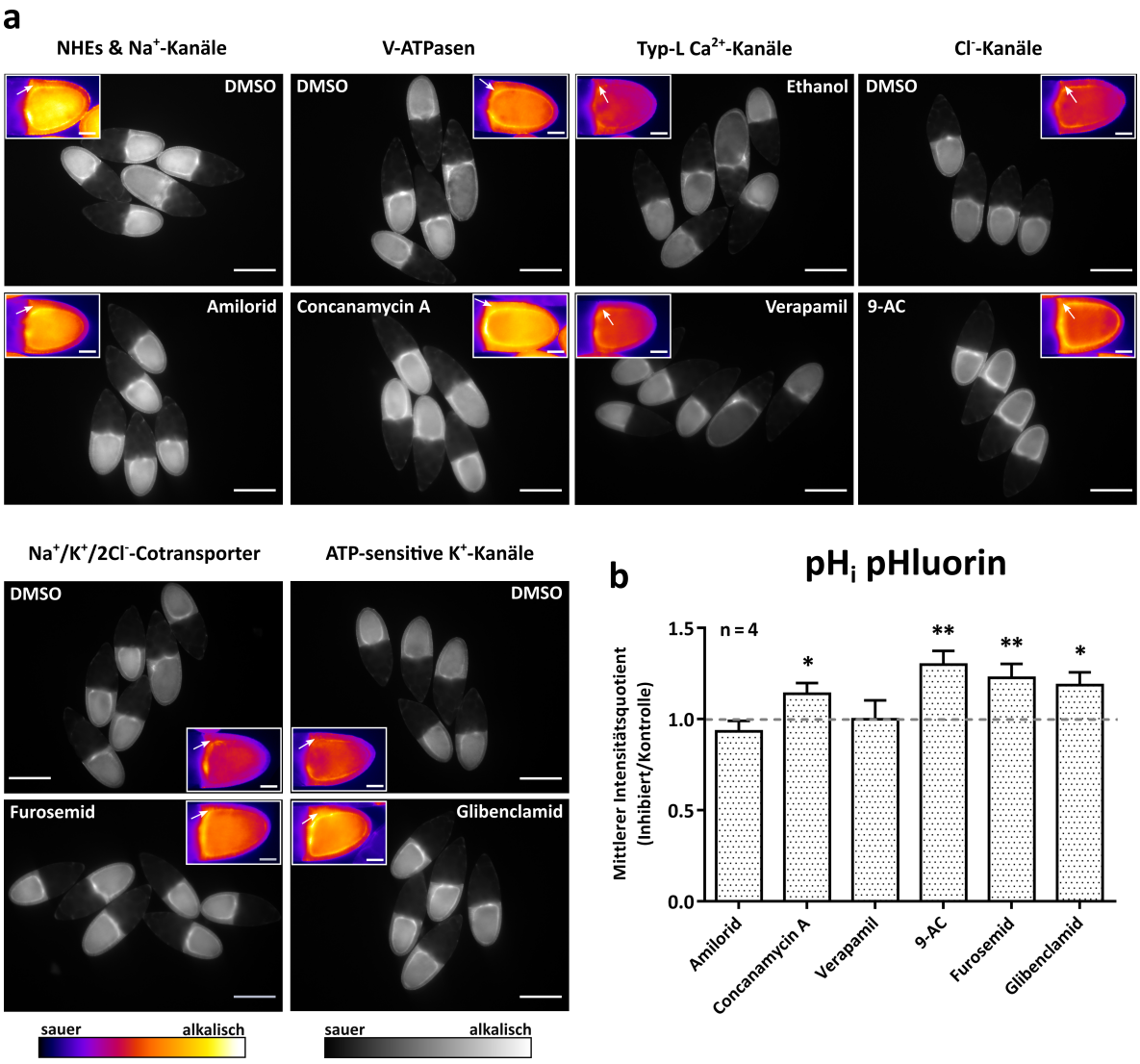


Abbildung 3.13: Vergleich der Einflüsse verschiedener Inhibitoren auf den pH_i des FE mittels pHluorin. a: WFM-Aufnahmen von typischen pHluorin-exprimierenden S10B-Follikeln nach Inkubation mit dem entsprechenden Inhibitor oder nach Inkubation in der Kontrolllösung (DMSO oder Ethanol; die Maßstabsbalken entsprechen einer Länge von 200 µm); die Ausschnitte zeigen vergrößerte Beispielbilder in Falschfarben-Darstellung (Pfeile deuten auf das FE; die Maßstabsbalken entsprechen hier einer Länge von 50 µm). Eine relative Alkalisierung ist an verstärkten Fluoreszenzintensitäten (weiß) zu erkennen, eine relative Azidifizierung hingegen ist durch schwächere Fluoreszenzintensitäten (dunkel/blau) gekennzeichnet. **b:** Während Amilorid zu einer leichten Abnahme der Fluoreszenzintensitäten (Azidifizierung) führt, hat eine Inhibition mit Concanamycin A, 9-AC, Furosemid oder Glibenclamid eine signifikante Zunahme der Fluoreszenzintensitäten zur Folge (Alkalisierung). Eine Inhibition mit Verapamil führt zu keiner signifikanten Änderung des pH_i. Basierend auf den WFM-Aufnahmen (Abb. 2.8) wurden mittlere Intensitätsquotienten der Inhibitions- und Kontrollgruppe (Inhibiert/Kontrolle) aus n = 4 Experimenten für jeden Inhibitor berechnet. Diese flossen anschließend in eine Auswertung ein und gaben Aufschluss über die Variabilität zwischen einzelnen Experimenten. Die Mittelwerte und ihre Standardabweichungen wurden mit Hilfe eines *one-sample* t-Tests verglichen (* $p < 0{,}05$; ** $p < 0{,}01$). Die stärksten Effekte auf den pH_i sind nach der Inhibition mit 9-AC, Furosemid oder Glibenclamid zu beobachten.

3.2.4 Inhibition verschiedener Ionentransportmechanismen im DiBAC- und CFDA-gefärbten FE

Eine Inhibition der V-ATPasen, der Cl^--Kanäle oder der $Na^+/K^+/2Cl^-$-Cotransporter führte im ArcLight-exprimierenden FE zu einer deutlichen Reduzierung der Fluoreszenzintensitäten (Depolarisation; Abb. 3.11 und 3.12). Da dies im Widerspruch zu einer früheren Analyse mit DiBAC (und geringeren Inhibitorkonzentrationen) steht, die einen hyperpolarisierenden Effekt auf das FE gezeigt hatte (vgl. Weiß und Bohrmann, 2019b), wurden zur Überprüfung Experimente mit den Fluoreszenzfarbstoffen DiBAC und CFDA und denselben Inhibitorkonzentrationen wie in Kap. 2.11 angegeben, durchgeführt (Abb. 3.14, 3.15 und 3.16).

3.2.4.1 Analyse mit dem V_{mem}-sensitiven Farbstoff DiBAC

Während die Inhibitoren Amilorid (NHEs, Na^+-Kanäle) oder Verapamil (spannungsabhängige Typ-L Ca^{2+}-Kanäle) zu reduzierten Fluoreszenzintensitäten (Hyperpolarisation) im DiBAC-gefärbten FE führten, bewirkten die Inhibitoren Concanamycin A (V-ATPasen), 9-AC (Cl^--Kanäle), Furosemid ($Na^+/K^+/2Cl^-$-Cotransportern) oder Glibenclamid (ATP-abhängige K^+-Kanäle) keine signifikanten Änderungen des V_{mem} im FE (Abb. 3.14 und 3.15). Die Inhibitoren Amilorid und Verapamil erzielten die stärksten Effekte auf das V_{mem} im FE (Abb. 3.15b).

3.2.4.2 Analyse mit dem pH-sensitiven Farbstoff CFDA

Alle verwendeten Inhibitoren verursachten eine signifikante Zunahme der Fluoreszenzintensitäten im FE (Alkalisierung; Abb. 3.14 und 3.16). Wie bereits mit pHluorin festgestellt wurde, hatten 9-AC, Furosemid oder Glibenclamid den stärksten Einfluss auf den pH_i im FE (Abb. 3.16b).

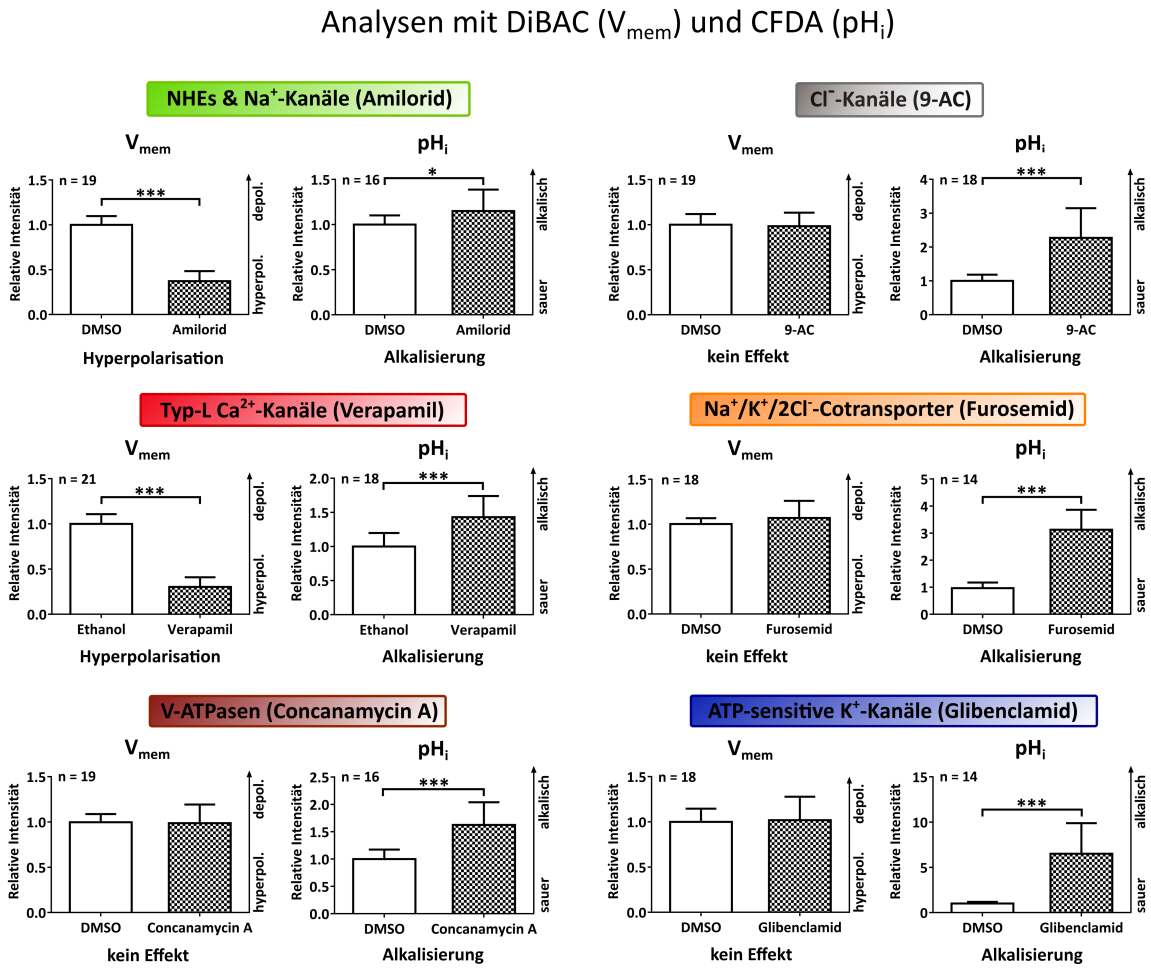


Abbildung 3.14: Mit Hilfe von DiBAC und CFDA lassen sich vergleichbare Änderungen der bioelektrischen Eigenschaften, herbeigeführt durch dieselben Inhibitorkonzentrationen, detektieren. Während Concanamycin A, 9-AC, Furosemid und Glibenclamid keinen signifikanten Einfluss auf das V_{mem} haben, können signifikante Änderungen des pH_i im FE mit allen verwendeten Inhibitoren erzielt werden. Eine Inhibition von NHEs und Na^+-Kanälen oder von Typ-L Ca^{2+}-Kanälen führt zu einer signifikanten Hyperpolarisation. Bezüglich des pH_i hat die Inhibition aller untersuchten Ionentransportmechanismen eine Alkalisierung im FE zur Folge. Normierte Werte von n = 14-21 S10B-Follikeln gingen in eine Auswertung ein (relative Intensität). Die Mittelwerte und ihre Standardabweichungen wurden mit Hilfe eines ungepaarten t-Tests verglichen (* $p < 0{,}05$; *** $p < 0{,}001$).

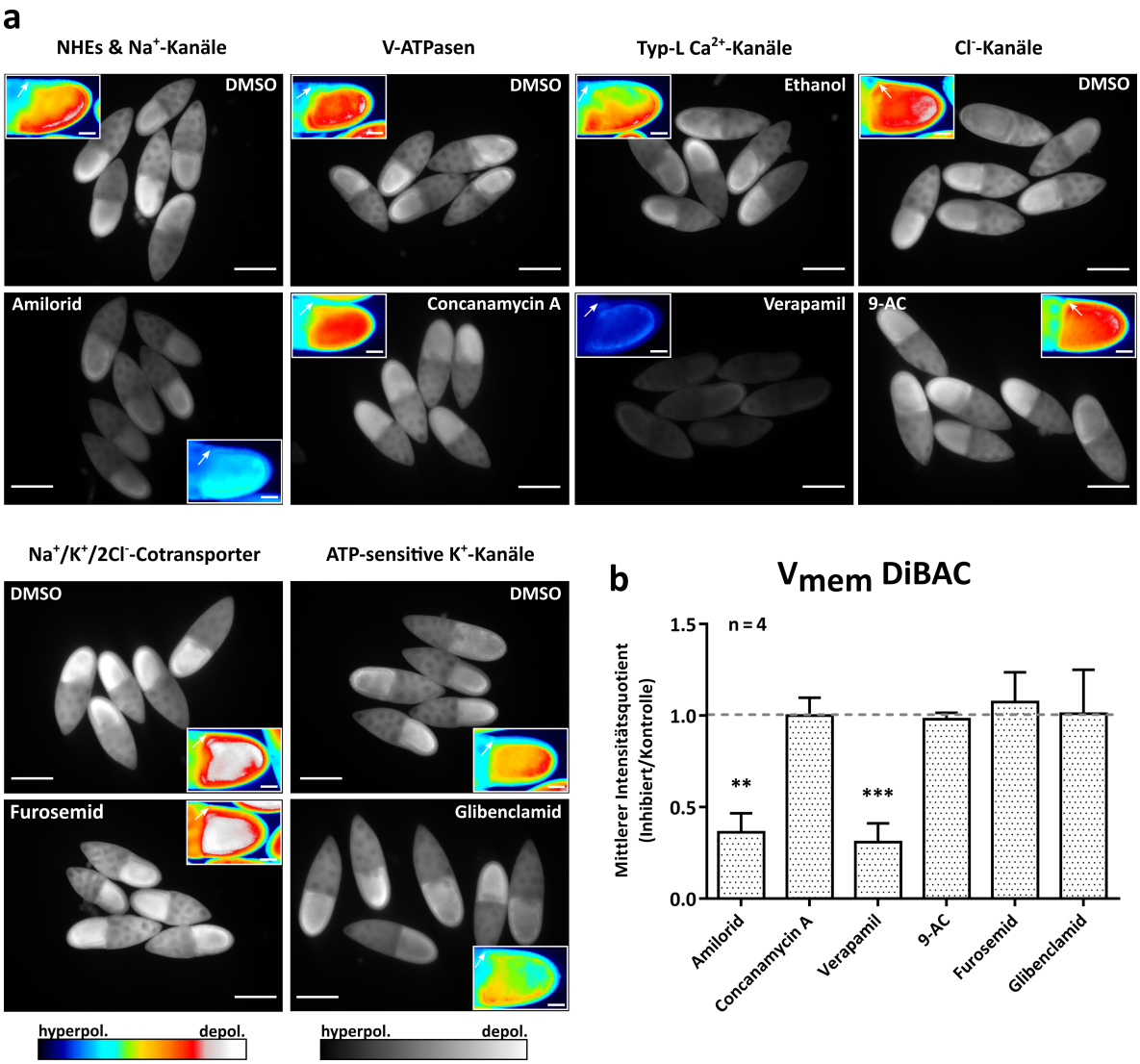


Abbildung 3.15: Im Gegensatz zu ArcLight detektiert DiBAC unter vergleichbaren Versuchsbedingungen mit den Inhibitoren Concanamycin A, 9-AC, Furosemid oder Glibenclamid keine signifikante Depolarisation im FE. a: WFM-Aufnahmen von typischen DiBAC-gefärbten S10B-Follikeln nach Inkubation mit dem entsprechenden Inhibitor oder nach Inkubation in der Kontrolllösung (DMSO oder Ethanol; die Maßstabsbalken entsprechen einer Länge von 200 µm; die Ausschnitte zeigen vergrößerte Beispielbilder in Falschfarben-Darstellung; Pfeile deuten auf das FE; die Maßstabsbalken entsprechen hier einer Länge von 50 µm). Eine relative Hyperpolarisation ist an einer Abnahme der Fluoreszenzintensitäten (dunkel/blau) zu erkennen, eine relative Depolarisation hingegen zeichnet sich durch verstärkte Fluoreszenzintensitäten (weiß) aus. **b:** Amilorid oder Verapamil führen zu einer signifikanten Abnahme der Fluoreszenzintensitäten (Hyperpolarisation). Alle anderen Inhibitoren führen zu keinen signifikanten Änderungen des V_{mem}. Basierend auf den WFM-Aufnahmen (Abb. 2.8) wurden mittlere Intensitätsquotienten der Inhibitions- und Kontrollgruppe (Inhibiert/Kontrolle) aus n = 4 Experimenten für jeden Inhibitor berechnet. Diese flossen anschließend in eine Auswertung ein und gaben Aufschluss über die Variabilität zwischen einzelnen Experimenten. Die Mittelwerte und ihre Standardabweichungen wurden mit Hilfe eines *one-sample* t-Tests verglichen (** $p < 0{,}01$; *** $p < 0{,}001$). Die stärksten Effekte auf das V_{mem} sind nach der Inhibition mit Amilorid oder Verapamil zu beobachten.

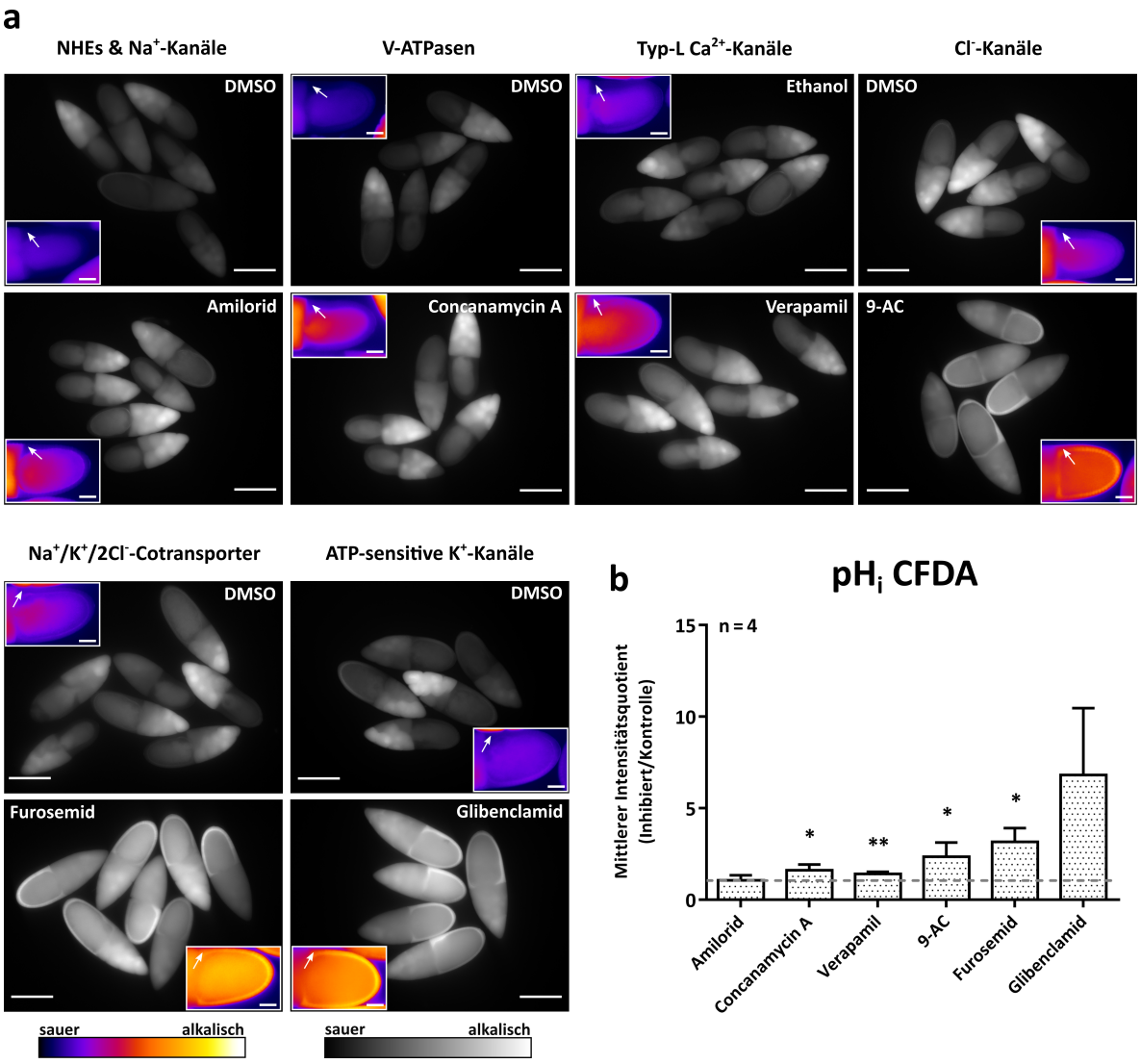


Abbildung 3.16: Übereinstimmend mit pHluorin, zeigen 9-AC, Furosemid und Glibenclamid auch mit CFDA die stärksten inhibitorischen Effekte auf den pH_i im FE. a: WFM-Aufnahmen von typischen mit CFDA-gefärbten S10B-Follikeln nach Inkubation mit dem entsprechenden Inhibitor oder nach Inkubation in der Kontrolllösung (DMSO oder Ethanol; die Maßstabsbalken entsprechen einer Länge von 200 µm); die Ausschnitte zeigen vergrößerte Beispielbilder in Falschfarben-Darstellung (Pfeile deuten auf das FE; die Maßstabsbalken entsprechen hier einer Länge von 50 µm). Eine relative Alkalisierung ist an verstärkten Fluoreszenzintensitäten (weiß) zu erkennen, eine relative Azidifizierung hingegen zeichnet sich durch schwächere Fluoreszenzintensitäten (dunkel/blau) aus. **b:** Eine Inhibition mit Concanamycin A, Verapamil, 9-AC, Furosemid oder Glibenclamid führt zu einer Zunahme der Fluoreszenzintensitäten (Alkalisierung). Eine Inhibition mit Amilorid führt zu keiner signifikanten Änderung des pH_i. Basierend auf den WFM-Aufnahmen (Abb. 2.8) wurden mittlere Intensitätsquotienten der Inhibitions- und Kontrollgruppe (Inhibiert/Kontrolle) aus n = 4 Experimenten für jeden Inhibitor berechnet. Diese flossen anschließend in eine Auswertung ein und gaben Aufschluss über die Variabilität zwischen einzelnen Experimenten. Die Mittelwerte und ihre Standardabweichungen wurden mit Hilfe eines *one-sample* t-Tests verglichen (* $p < 0{,}05$; ** $p < 0{,}01$). Wie bereits bei der pH_i-Analyse mit pHluorin festgestellt, sind die stärksten Effekte auf den pH_i nach der Inhibition mit 9-AC, Furosemid oder Glibenclamid zu beobachten.

3.2.5 Vergleich der zum Nachweis von V_{mem}- und pH_i-Änderungen verwendeten Methoden und Auswertungen

Beide Methoden (Fluoreszenzfarbstoff und genetischer Sensor) sowie beide Datenauswertungen (Auswertung 1: relative Intensität und Auswertung 2: mittlere Intensitätsquotienten) ergaben unter vergleichbaren Versuchsbedingungen weitestgehend die gleichen Einflüsse auf V_{mem} und pH_i (Tabelle 3.3).

Tabelle 3.3: Zusammenfassung der mittels genetisch codierter Sensoren und fluoreszierender Farbstoffe ermittelten Einflüsse verschiedener Inhibitoren auf V_{mem} und pH_i im FE.

		V_{mem}		pH_i	
Inhibitoren[a]		**ArcLight**	**DiBAC**	**pHluorin**	**CFDA**
Auswertung	1[b]				
Auswertung	2[c]				
Amilorid	1	Hyperpolarisation	Hyperpolarisation	Azidifizierung	Alkalisierung
	2	Hyperpolarisation	Hyperpolarisation	(Azidifizierung)[d]	–[e]
Verapamil	1	Hyperpolarisation	Hyperpolarisation	–	Alkalisierung
	2	Hyperpolarisation	Hyperpolarisation	–	Alkalisierung
Concanamycin A	1	Depolarisation	–	Alkalisierung	Alkalisierung
	2	(Depolarisation)[d]	–	Alkalisierung	Alkalisierung
9-AC	1	Depolarisation	–	Alkalisierung	Alkalisierung
	2	Depolarisation	–	Alkalisierung	Alkalisierung
Furosemid	1	Depolarisation	–	Alkalisierung	Alkalisierung
	2	Depolarisation	–	Alkalisierung	Alkalisierung
Glibenclamid	1	Depolarisation	–	Alkalisierung	Alkalisierung
	2	Depolarisation	–	Alkalisierung	Alkalisierung

[a] Die inhibierten Ionentransportmechanismen sind in Abb. 3.7 dargestellt.
[b] Auswertung 1: Variabilität zwischen einzelnen Follikeln (relative Intensität; Auswertung erläutert in Kap. 2.11).
[c] Auswertung 2: Variabilität zwischen einzelnen Experimenten (mittlere Intensitätsquotienten; Auswertung erläutert in Kap. 2.11).
[d] Leichter nicht signifikanter Effekt
[e] – Kein eindeutiger Effekt

So konnte hinsichtlich einer Inhibition mit Verapamil und Amilorid mit beiden Methoden ein signifikanter hyperpolarisierender Effekt auf das V_{mem} im FE festgestellt werden. Entsprechendes traf bezüglich des pH_i auch auf die übrigen Inhibitoren Concanamycin A, 9-AC, Furosemid und Glibenclamid in Verbindung mit den Analysemethoden pHluorin und CFDA zu: Beide Methoden und Datenauswertungen zeigten einen signifikanten alkalisierenden Effekt. Vermutlich wird diese Alkalisierung durch eine von Glibenclamid-induzierte indirekte Inhibition des H^+-Transports (Wieczorek et al., 1991; Weiß und Bohrmann, 2019b) bzw. durch Effekte von Furosemid oder 9-

AC auf den Cl^--HCO_3^--Antiport verursacht (Hoffmann, 1982; Sherwood et al., 1988; Benitez et al., 2019; Weiß und Bohrmann, 2019a).

Ausgenommen von dieser Beobachtung waren die pH_i-Analysen mit Amilorid, welche gegensätzliche Resultate ermittelten: Analysen mit pHluorin kamen zu dem Ergebnis, dass der Inhibitor Amilorid einen schwach signifikanten (* $p < 0{,}05$) azidifizierenden Effekt auf des FE hat, während Analysen mit CFDA (vergleicht man die Variabilität zwischen einzelnen Follikeln; Auswertung 1) zu dem Ergebnis kamen, dass Amilorid einen schwach signifikanten alkalisierenden Effekt auf den pH_i des FE hat. Verglich man jedoch die Variabilität zwischen einzelnen Experimenten (Auswertung 2), konnte mit CFDA kein eindeutiger Effekt auf den pH_i im FE festgestellt werden.

3.2.6 Auswirkungen von Allicin auf V_{mem} und pH_i im FE

Da Allicin nachweislich einen Einfluss auf das elektrochemische Potential von Hefezellen hat (Gruhlke et al., 2010), wurden die Auswirkungen verschiedener Allicinkonzentrationen auf die bioelektrischen Eigenschaften im FE von S10B-Follikeln untersucht. Zu diesem Zweck wurden DiBAC- und CFDA-gefärbte S10B-Follikel in zunehmend höher konzentrierten Allicin-Lösungen inkubiert und Änderungen in der Fluoreszenz des FE quantitativ ausgewertet (Abb. 3.17a-b).

Während Konzentrationen ab 10 µM Allicin zu einer signifikanten Depolarisation in DiBAC-gefärbten S10B-Follikeln führten, wurde erst ab 100 µM Allicin eine signifikante Alkalisierung des FE in CFDA-gefärbten S10B-Follikeln festgestellt. Somit nimmt auch Allicin Einfluss auf die bioelektrischen Eigenschaften von *Drosophila*-Follikeln. Eine 18-20 h-Inkubation von S10B-Follikeln mit 100 µM Allicin in R14-Medium (oder in höheren Allicin-Konzentrationen) verhinderte zudem eine Weiterentwicklung der Follikel und führte zum Aufquellen bzw. zu einer Verdickung des FE (Abb. 3.17c_2).

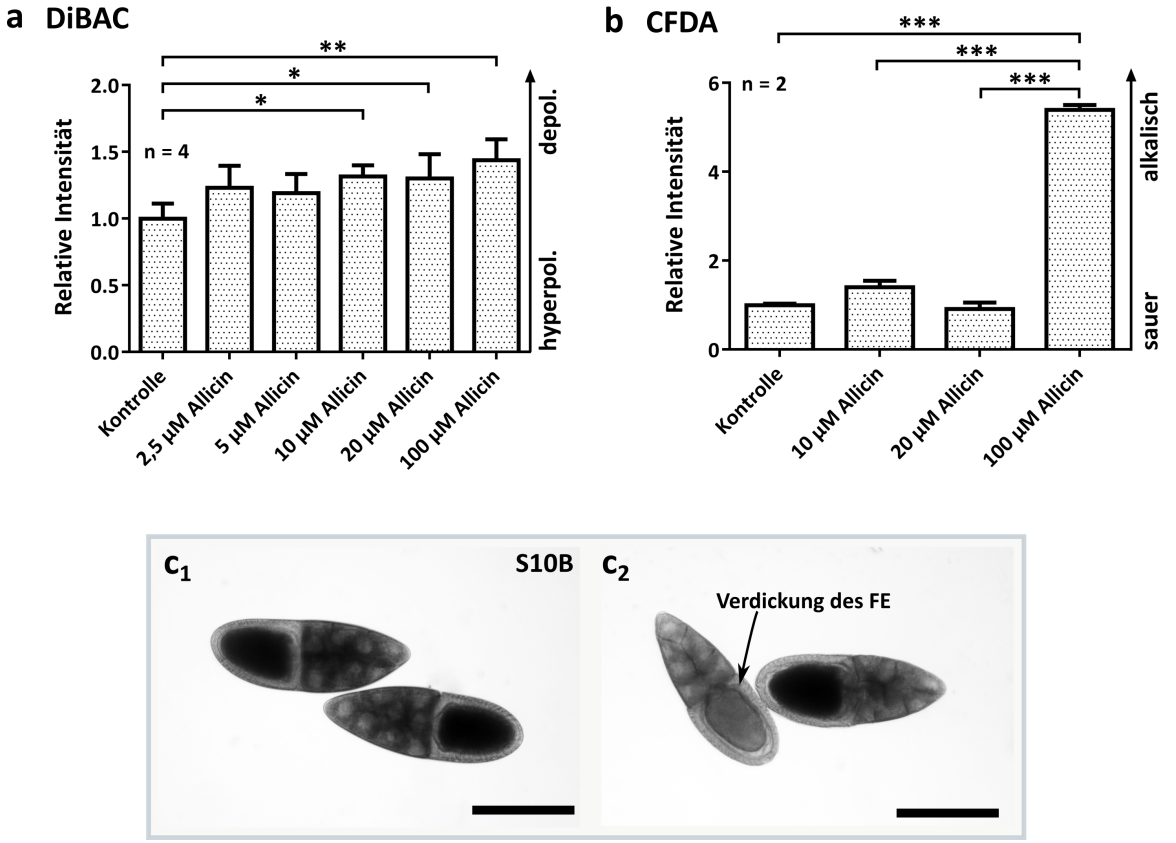


Abbildung 3.17: Auswirkungen von Allicin auf V_{mem} und pH_i im FE. Während eine Inkubation mit 10 µM Allicin bereits zu einer verstärkten Depolarisation in DiBAC- (**a**) gefärbten S10B-Follikeln führt, hat eine Behandlung mit 100 µM Allicin von CFDA- (**b**) gefärbten S10B-Follikeln einen alkalisierenden Effekt zur Folge (n = Anzahl untersuchter Follikel). Die Mittelwerte der normierten Werte sind mit ihren Standardabweichungen dargestellt und wurden anhand von multiplen t-Tests mit Holm-Sidak-Korrektur (One-way ANOVA) verglichen (* $p < 0{,}05$; ** $p < 0{,}01$; *** $p < 0{,}001$). **a:** Eine Inkubation mit 10, 20 und 100 µM Allicin führt im Vergleich zur Kontrolle zu einer signifikanten Depolarisation im FE. **b:** 100 µM Allicin bewirken eine im Vergleich zur Kontrolle signifikante Alkalisierung im FE. **c:** Über einen längeren Zeitraum angewendet (18-20 h), hemmen Allicin-Konzentrationen ab 100 µM die Fähigkeit der Follikel sich in R14-Medium weiterzuentwickeln. Entsprechend behandelte S10B-Follikel (**c_2**) unterscheiden sich von kurzzeitig behandelten S10B-Follikeln (20 min-Inkubation, **c_1**) durch ein aufgequollenes bzw. verdicktes FE (siehe Pfeil in c_2; die Maßstabsbalken entsprechen einer Länge von 200 µm).

3.2.7 Zusammenfassung: Nachweis von V_{mem}- und pH_i-Änderungen infolge einer Inhibition von Ionentransportmechanismen

Abschließend lässt sich sagen, dass beide Methoden (genetisch codierte Sensoren und Fluoreszenzfarbstoffe), mit Ausnahme des Inhibitors Amilorid, unter vergleichbaren

Versuchsbedingungen vergleichbare Einflüsse der verschiedenen Inhibitoren auf die bioelektrischen Signale im FE detektierten (Tabelle 3.3). Somit bestätigten beide Methoden (vgl. Weiß und Bohrmann, 2019b), dass die in den Analysen inhibierten Ionentransportmechanismen an der Generierung bioelektrischer Signale im FE beteiligt sind. Allerdings zeigte nur ArcLight eine signifikante Depolarisation durch die Inhibitoren Concanamycin A, 9-AC, Furosemid oder Glibenclamid an. Allicin, welches nachweislich einen Einfluss auf das elektrochemische Potential von Hefezellen ausübt (Gruhlke et al., 2010), beeinflusste auch das V_{mem} und den pH_i im FE von *Drosophila*-Follikeln.

3.3 Knockdown-Screen zur Identifizierung in der Oogenese relevanter Ionentransportmechanismen

Die im vorangegangenen Kapitel beschriebenen inhibitorischen Effekte zeigen, dass die ausgewählten Ionentransportmechanismen an der Regulierung des V_{mem} und des pH_i im FE von *Drosophila* beteiligt sind (siehe auch Weiß und Bohrmann, 2019b). Darüberhinaus ist bekannt, dass Änderungen des V_{mem} und pH_i, die durch Inhibition dieser Ionentransportmechanismen induziert werden, Einfluss auf die Organisation des Zytoskeletts nehmen (Weiß und Bohrmann, 2019a). Ein naheliegender nächster Schritt bestand dementsprechend darin, einen RNAi-Screen durchzuführen, um die Expression von Kandidatengenen von Ionentransportmechanismen oder Gap Junctions im FE herunter zu regulieren. Es sollte untersucht werden, ob diese RNAi-Knockdowns zu Änderungen der bioelektrischen Eigenschaften und des Zytoskeletts im FE führen können, welche vergleichbar zu denen sind, die mit Hilfe der Inhibitoren erzielt wurden (Krüger und Bohrmann, 2015; Weiß und Bohrmann, 2019a). Desweiteren sollte ermittelt werden, ob diese RNAi-Knockdowns deutliche Veränderungen im Verlauf der Oogenese induzieren und damit an Entwicklungsprozessen in der Oogenese beteiligt sind.

Zu diesem Zweck wurde die Expression verschiedener Ionentransportmechanismen- und Gap Junction-Gene, welche laut FlyAtlas 2 eine verstärkte Expression im Ovar aufweisen, mit Hilfe des *tj*-Gal4-Treibers in somatischen Zellen (FE) und mit Hilfe der mat-tub-Gal4- und MTD-Gal4-Treiber in Keimbahnzellen (Ooz und NZ) herunterreguliert. Ovarien von *mat-tub-Gal4-GeneSwitch>UAS-shRNA/lhRNA*-Fliegen, welche die UAS-Konstrukte auf einem niedrigen Level in der Keimbahn exprimieren, dienten als Negativkontrollen (siehe z. B. *mat-tub-Gal4-GeneSwitch>ork1 shRNA* in Abb. 3.19d). Wie erwartet, zeigten diese Kontrollovarien keine vom WT abweichenden Phänotypen. Vergleichbar den Ovarien aus Keimbahnknockdowns mit den starken Treibern mat-tub-Gal4 und MTD-Gal4, welche keine Besonderheiten zeigten (Tabelle 3.5), produzierten sie ausschließlich Follikel, die denen des WT ähnelten.

3.3.1 Validierung der verwendeten Treiberstämme

Im Vorfeld des Screens wurden die Expressionsmuster der vier verwendeten Treiberstämme überprüft. Dazu wurde GFP ektopisch mit Hilfe der Treiber exprimiert und die GFP-Expression in S8-12-Follikeln mittels WFM sowie SIM analysiert. Eine vom Somatreiber aktivierte Expression führte erwartungsgemäß zu einer ausschließlichen Expression von GFP im FE (Abb. 3.9a). Entsprechend aktivierten die Keimbahntreiber mat-tub-Gal4-GeneSwitch, mat-tub-Gal4 (VP16-Stamm) und MTD-Gal4 eine myrGFP-Expression in den Zellmembranen der Keimbahnzellen (NZ und Ooz), nicht aber im FE (Abb. 3.18c-e). myrGFP besitzt eine N-terminale Myristoylierungssequenz, welche sich für eine Lokalisation von GFP in Zellmembranen unter UASp-Kontrolle eignet. Aufgrund einiger Modifikationen am UAST-Vektor führen UASp-Vektoren zu einer effektiven Gal4-induzierten Expression des Konstrukts in der Keimbahn (Rørth, 1998).

3.3.2 Ergebnisse des RNAi-Screens

3.3.2.1 Morphologische Analyse der Ovarien nach Gal4-induzierter RNAi

Im Verlauf des RNAi-Screens wurden fünf für Ionentransportmechanismen und Gap Junctions codierende Gene identifiziert, welche die Morphologie der Ovarien oder die Follikel-Entwicklung beeinflussten (Tabellen 3.4 und 3.5 und Abb. 3.18b). Ein im Soma durchgeführter RNAi-Knockdown des Gens *vha55*, welches für eine UE der V-ATPase codiert, führte zu größenreduzierten Ovarien mit degenerierten Follikeln ab S10A (Abb. 3.18b vierte Reihe links). Abhängig vom verwendeten RNAi-Konstrukt (*UAS-vha55 shRNA*), hatte ein Knockdown desselben Gens in der Keimbahn Anomalien in den NZ von S11-14-Follikeln sowie überschüssige FZ im Bereich der Mikropyle in S14 zur Folge (mat-tub-Gal4-Treiber induzierter Knockdown).

Ein kompletter Verlust der Ovarien oder eine verringerte Größe der Ovarien waren als Folge des Somaknockdowns der Gene *inx1* oder *inx3* (Innexine; Gap Junction-Kanäle) zu beobachten (Abb. 3.18b zweite und dritte Reihe links). Der über mat-tub-Gal4 vermittelte Keimbahnknockdown von *inx1* führte zudem zu degenerierenden Follikeln in allen Stadien der Oogenese. Die Zellkerne der größenreduzierten *tj-Gal4>inx3 shRNA* Ovarien wurden zur weiteren Analyse der Effekte auf die Follikelentwicklung und den Aufbau der Ovarien mit Hilfe von DAPI gefärbt (siehe Kap. 2.12.6 und Abb. 3.18 dritte Reihe links und für weitere Ovarien Abb. A.5 zweite Reihe im Anhang). In diesen Ovarien konnten einzelne Follikel, jedoch keine Ovariolen, identifiziert werden.

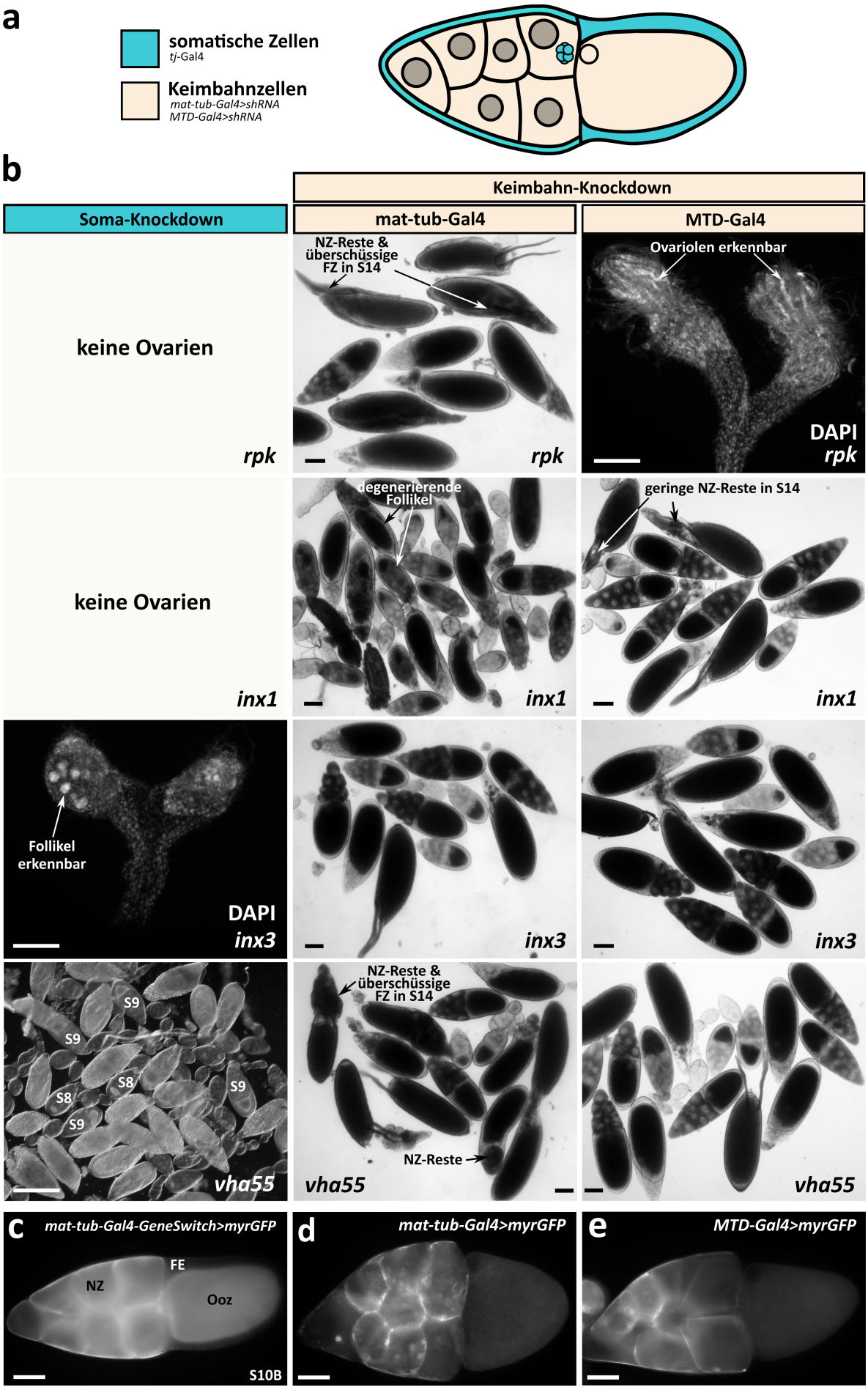


Abbildung 3.18: (Legende nächste Seite)

Abbildung 3.18: Übersicht über die im RNAi-Knockdown-Screen identifizierten Ionentransportmechanismen- oder Gap Junction-Gene (Abbildung von vorheriger Seite.) **a:** Schematische Darstellung der Verteilung somatischer Zellen (türkis) und Keimbahnzellen (beige) in einem S10B-Follikel. Für einen Knockdown der relevanten Gene im Soma wurde der *tj*-Gal4-Treiber verwendet, für den Keimbahnknockdown die Treiber mat-tub-Gal4 und MTD-Gal4. **b:** Von allen durchgeführten Knockdowns (links: Somaknockdown mittels *tj*-Gal4; Mitte und rechts: Keimbahnknockdown mit den Treibern mat-tub-Gal4 und MTD-Gal4) sind die auffälligsten Veränderungen in der Morphologie des Ovars (DAPI) oder der Oogenese nach den Knockdowns von *rpk* (erste Reihe), *inx1* (zweite Reihe), *inx3* (dritte Reihe, links: größenreduzierte Ovarien mit einzelnen Follikeln, Mitte und rechts: kein Effekt) oder *vha55* (vierte Reihe; rechts: kein Effekt) festzustellen (die Maßstabsbalken entsprechen einer Länge von 100 µm). Dabei führt ein Somaknockdown von *vha55* zu degenerierenden Follikeln ab S10A und der Keimbahnknockdown von *inx1*, *vha55* und *rpk* zu NZ-Resten und überschüssigem FZ-Gewebe im Bereich der Mikropyle. Die stärksten Effekte sind nach dem Knockdown von *rpk* zu beobachten: Im somatischen FE führen reduzierte Transkriptionslevel zum Verlust der Ovarien, in der Keimbahn hingegen sind sie verantwortlich für die Bildung größenreduzierter paariger oder einzelner Ovarien, in denen Ovariolen aber keine Follikel nachweisbar sind. **c-e:** myrGFP-Expression in den Zellmembranen der Keimbahnzellen (NZ und Ooz) zur Validierung der Keimbahntreiber (**c:** mat-tub-Gal4-GeneSwitch, **d:** mat-tub-Gal4 und **f:** MTD-Gal4). Für eine Expression von GFP im Soma zur Validierung des Somatreibers, siehe Abb. 3.9a.

Die stärksten Effekte auf die Morphologie der Ovarien und die Follikelentwicklung waren infolge des Knockdowns von *rpk*, einem Mitglied der DEG/ENaC-Familie, zu beobachten. Reduzierte *rpk*-Transkriptionslevel im FE resultierten in einem vollständigen Verlust der Ovarien, wohingegen eine reduzierte Transkription in der Keimbahn, aktiviert durch den MTD-Gal4-Treiber, zu größenreduzierten paarigen oder einzeln vorliegenden Ovarien führte (Abb. 3.18b erste Reihe und für weitere Ovarien Abb. A.5 erste Reihe im Anhang). In diesen Ovarien waren Ovariolen, jedoch keine Follikel erkennbar (DAPI-Färbung). Aus dem durch den mat-tub-Gal4-Treiber induzierten *rpk*-RNAi-Knockdown in der Keimbahn gingen S14-Follikel mit NZ-Resten und überschüssigen FZ im Bereich der Mikropyle hervor.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass ein Knockdown der Kandidatengene im Soma die stärksten Effekte auf die Morphologie und die Entwicklung der Follikel hatte. Kandidatengene, deren RNAi-Knockdown zu keinen Veränderungen hinsichtlich der Ovarmorphologie oder Follikelentwicklung geführt hatte, sind in Tabelle 3.5 aufgeführt.

Wie in Abb. 3.19a-c zu sehen ist, produzierten weibliche *tj-Gal4>ork1 shRNA*-Fliegen infolge des somatischen RNAi-Knockdowns des Kandidatengens *ork1 (open rectifier K^+ channel 1)* kugelförmige Follikel, welche Ähnlichkeiten mit Follikeln der Mutante *kugelei* aufwiesen (Gutzeit et al., 1991). Dieser *round-egg*-Phänotyp von *ork1* war insbesondere in Stadien älter als S10B und in reifen Eiern deutlich zu erkennen. Um den Einfluss

dieses K^+-Kanals auf die Organisation des Zytoskeletts im FE zu bestimmen, wurde das bMF- und MT-Zytoskelett im FE von *ork1*-Follikeln genauer charakterisiert.

Tabelle 3.4: Ionentransportmechanismen- und Gap Junction-Gene mit Effekten im RNAi-Knockdown-Screen.

Stamm ID [2]	Genname	Proteinfunktion	Phänotyp [1]	
			Soma [3]	Keimbahn
Protonenpumpen				
VDRC46553	*vha55*	Typ-V H^+-ATPase	verkleinerte Ovarien, Follikel > S9 degeneriert	nicht bestimmt
BL40884	*vha55*	Typ-V H^+-ATPase	kein Effekt	S11-14 Follikel mit NZ-Anomalien, überschüssiges Gewebe im Bereich der Mikropyle in S14[b]
Natriumkanäle				
BL39053	*rpk (dGNaC1)*	DEG/epithelialer Na^+-Kanal	keine Ovarien	kleine Ovarien, Ovariolen aber keine Follikel erkennbar[a], S11-14 Follikel mit NZ-Anomalien, überschüssiges Gewebe im Bereich der Mikropyle in S14[b]
Kaliumkanäle				
BL53994	*ork1*	*Open rectifier K^+ channel*	kugelförmige Follikel, ähnelt dem *kugelei*-Phänotyp; Veränderungen des basalen Zytoskeletts (bMF & MT)	kein Effekt[ab]
Innexine				
BL44048	*inx1*	Gap Junctions	keine Ovarien	S14-Follikel mit NZ-Anomalien[a]; Ovarien mit degenerierten Follikeln[b]
BL60112	*inx3*	Gap Junctions	kleine Ovarien, keine Ovariolen, aber Follikel erkennbar	kein Effekt[ab]

[1] Für jeden Fliegenstamm wurden mindestens 10 weibliche Fliegen untersucht.
[2] BL, Bloomington *Drosophila* Stock Center Nummer. VDRC, Vienna *Drosophila* Resource Center Nummer.
[3] Somatreiber: *tj*-Gal4
[a] Keimbahntreiber: MTD-Gal4
[b] Keimbahntreiber: mat-tub-Gal4

3.3.2.2 Analyse der Zytoskelett-Organisation in *ork1*

Sogenannte *round-egg*-Mutanten weisen einige Besonderheiten in der Organisation des Zytoskeletts auf (vgl. Gutzeit et al., 1991; Viktorinová et al., 2009; Horne-Badovinac et al., 2012). Derartige Veränderungen in der Organisation des Zytoskeletts konnten auch für *ork1* im Vergleich zum WT beobachtet werden (Abb. 3.19e-f). Daher erschien es sinnvoll, mit Hilfe von DiBAC und CFDA zu untersuchen ob auch die bioelektrischen Eigenschaften durch den Somaknockdown von *ork1* in S8-12-Follikeln beeinflusst werden. Deutliche Veränderungen der bioelektrischen Eigenschaften waren jedoch aufgrund der hohen Variabilität in den DiBAC- und CFDA-Färbungen nicht festzustellen.

Organisation der bMF: Aus WT-Analysen ist bekannt, dass die bMF insbesondere in den Stadien S8, S10A und S12 senkrecht zur A-P-Achse des Follikels angeordnet sind (transversale Anordnung). Die zFZ von S9- und die zFZ bzw. HFZ von S10B-Follikeln weisen zudem bMF-Kondensationen auf. Da diese im WT auftretenden bMF-Kondensationen in S10B-Follikeln eine Analyse der transversalen Anordnung der bMF erschweren, wurde für diese Analyse die ventrale Seite der WT- und *ork1*-Follikel untersucht (vFZ-Aufnahmen, Abb. 3.19).

Im Gegensatz zum WT fehlten die charakteristischen bMF-Kondensationen in S9 *ork1*-Follikeln. In frühen vitellogenen Stadien, z. B. S8-9, zeichneten sich die bMF-Bündel in *ork1* einerseits durch die gleiche parallele transversale Anordnung wie im WT aus, andererseits schien jedoch das bMF-Zytoskelett in einigen Bereichen des FE schwächer ausgebildet zu sein (Pfeilspitzen in Abb. 3.19). In späteren Stadien änderte sich dies und *ork1* S10B- und S12-Follikel waren im Gegensatz zum WT durch eine gestörte transversale bMF-Anordnung mit parallelen Bündeln innerhalb von Zellen, aber einer chaotischen Anordnung bezogen auf benachbarte Zellen gekennzeichnet (Abb. 3.19f). Im Stadium S11 bildete sich ein zum WT vergleichbares bMF-Muster aus.

Organisation der MT: Wie aus WT-Analysen bekannt, sind die MT der zFZ in S9, wie auch der zFZ und HFZ in S10B, durch eine longitudinale Anordnung entlang der A-P-Achse charakterisiert. In *ork1*-Follikeln hingegen konnte keine derartige A-P-Anordnung der MT festgestellt werden. Das MT-Zytoskelett schien, wie auch das bMF-Zytoskelett, insgesamt im Vergleich zum WT schwächer ausgebildet und weniger polarisiert zu sein (Abb. 3.19e).

Wie stark das bMF- und MT-Zytoskelett zwischen verschiedenen Follikeln eines Stadiums und innerhalb desselben Follikels variierte, war unterschiedlich. Abschließend lässt sich folgendes feststellen: WT-Follikel zeichnen sich bei einer transversalen bMF- und longitudinalen MT-Anordnung durch eine langgestreckte Follikelform aus. Dagegen waren *ork1*-Follikel durch eine gestörte bMF- und MT-Anordnung sowie durch eine

Tabelle 3.5: Übersicht der Ionentransportmechanismen- und Gap Junction-Kandidatengene ohne einen Effekt im RNAi-Knockdown-Screen.

Stamm ID [2]	Genname	Proteinfunktion	Phänotyp [1]	
			Soma [3]	Keimbahn
Protonenpumpen				
BL40923	*vha16-1 (ductin)*	Typ-V H^+-ATPase	kein Effekt	kein Effekt[ab]
Natriumkanäle				
VDRC8549	*rpk*	DEG/epithelialer Na^+-Kanal	kein Effekt	–
BL28589	*nhe1*	Na^+/H^+-Austauscher	kein Effekt	–
VDRC7245	*nhe1*	Na^+/H^+-Austauscher	kein Effekt	–
Kaliumkanäle				
VDRC40953	*ork1*	*Open rectifier K^+ channel*	kein Effekt	–
BL25885	*ork1*	*Open rectifier K^+ channel*	kein Effekt	–
VDRC17043	*mri*	Spannungsabhängiger K^+-Kanal	kein Effekt	–
Chloridkanäle				
VDRC4642	*clc-b*	Cl^--Kanal	kein Effekt	–
BL27034	*clc-c*	Cl^--Kanal	kein Effekt	–
Calciumkanäle				
VDRC47073	*stim*	Durch Ca^{2+}-induzierte Ca^{2+}-freisetzende Aktivität/ speichergesteuerter Ca^{2+}-Kanal	kein Effekt	–
Innexine				
BL42645	*inx2*	Gap Junctions	kein Effekt	kein Effekt[ab]

[1] Für jeden Fliegenstamm wurden mindestens 10 weibliche Fliegen untersucht.
[2] BL, Bloomington *Drosophila* Stock Center Nummer. VDRC, Vienna *Drosophila* Resource Center Nummer.
[3] Somatreiber: *tj*-Gal4
[a] Keimbahntreiber: MTD-Gal4
[b] Keimbahntreiber: mat-tub-Gal4
[–] Effekte einer Herunterregulierung des Gens durch RNAi in der Keimbahn wurden für diese Konstrukte nicht bestimmt, da die Konstrukte nicht für eine solche Expression geeignet waren.

kugelförmige Form charakterisiert.

3.3.2.3 Zusammenfassung: Ergebnisse des RNAi-Screens

Der RNAi-vermittelte Knockdown der Ionentransportmechanismen- und Gap Junction-Gene *vha55*, *inx1*, *inx3*, *rpk* und *ork1* induzierte charakteristische Veränderungen im Verlauf der Oogenese und in der Morphologie des Ovars. Die deutlichsten Veränderungen in Morphologie und Follikelentwicklung waren infolge reduzierter Transkriptlevel dieser Gene im Soma zu beobachten. Der Somaknockdown des K^+-Kanal-Gens *ork1* verursachte einen *round-egg*-Phänotyp, welcher daran zu erkennen war, dass die Follikel im Verlauf der Oogenese nicht entlang der A-P-Achse elongierten, sondern in allen Stadien eine kugelförmige Gestalt aufwiesen. Wie in anderen *round-egg*-Mutanten beobachtet wurde, korrelierte diese Veränderung in der Follikelgestalt auch in *ork1* mit einem veränderten basalen Zytoskelett im FE.

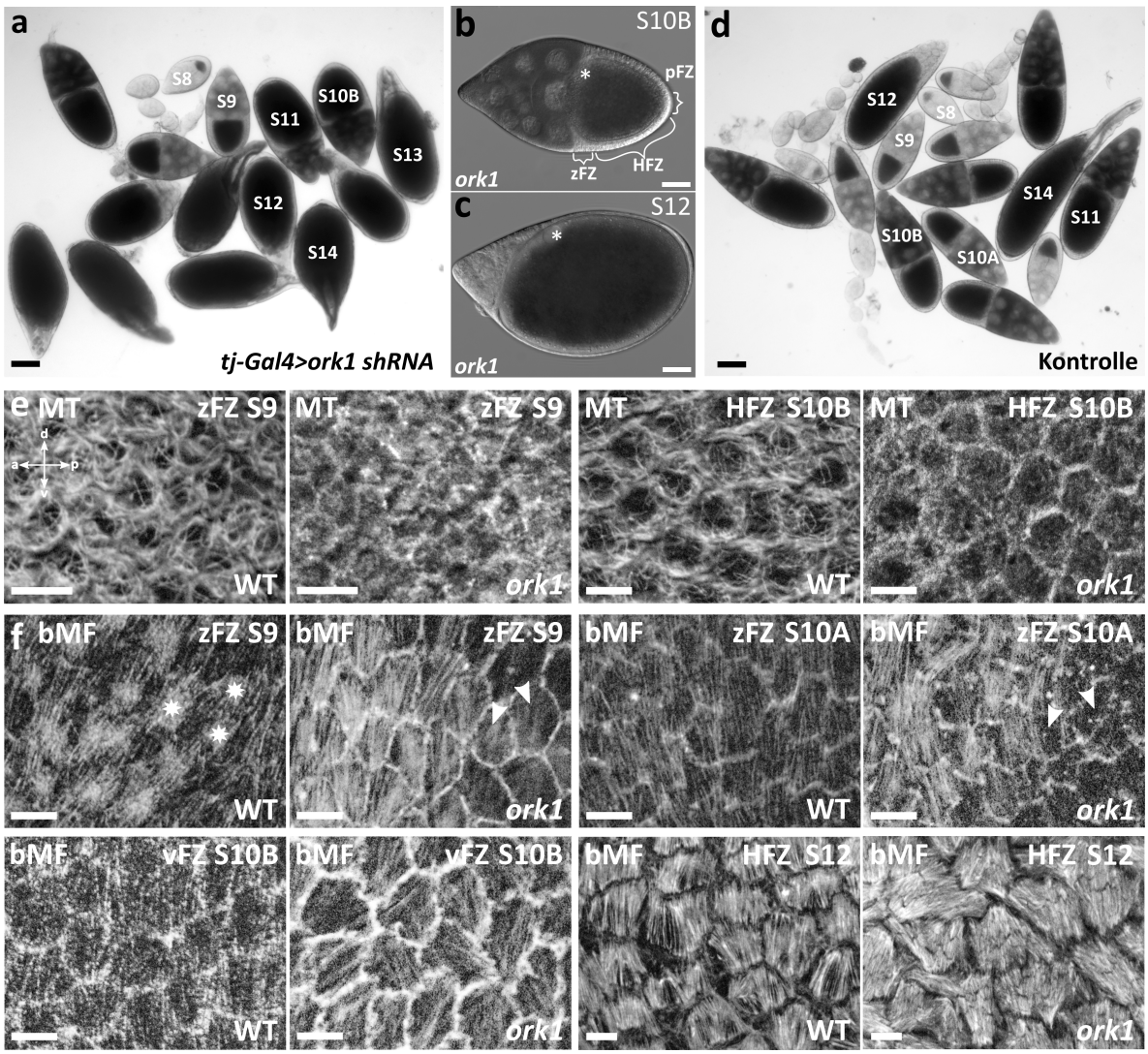


Abbildung 3.19: Ein Knockdown von *ork1* im FE führt zu kugelförmigen Follikeln sowie einer veränderten Organisation des Zytoskeletts. a-d: Hellfeld-Aufnahmen von Follikeln aus *tj-Gal4>ork1 shRNA*- (**a-c**) und *mat-tub-Gal4-GeneSwitch>ork1 shRNA*-Ovarien (Kontrolle, **d**). **a:** Für den Somaknockdown wurde der *tj*-Gal4-Treiber verwendet. Ovarien aller analysierter Fliegen beeinhalten kugelförmige Follikel und runde Eier (S8-14; der Maßstabsbalken entspricht einer Länge von 100 µm). **b und c:** Hellfeld-Aufnahmen von S10B und S12 *tj-Gal4>UAS-ork1 shRNA*-Follikeln (die Maßstabsbalken entsprechen einer Länge von 50 µm, Sterne markieren die Position des ON: dorsal). **d:** Als Kontrolle wurden Ovarien von *mat-tub-Gal4-GeneSwitch>UAS-shRNA*-Fliegen mit einer basalen *ork1-shRNA*-Transkription verwendet (der Maßstabsbalken entspricht einer Länge von 100 µm). Diese Ovarien produzieren ausschließlich Follikel, die denen des WT ähneln. **e und f:** Dargestellt sind optische Tangentialschnitte (SIM) typischer WT- und *ork1*-Follikel nach einer Inkubation mit dem anti-acetylierten α-Tubulin-Antikörper (**e**) sowie optische Tangentialschnitte typischer S9, S10A, S10B und S12 WT- und *ork1*-Follikel, deren bMF mittels fluoreszierendem Phalloidin sichtbar gemacht wurden (**f**; zFZ, zentripetale FZ; HFZ, Hauptkörperfollikelzellen; vFZ, ventrale FZ; a, anterior; p, posterior; d, dorsal; v, ventral. Die D-V-Orientierung (durch Pfeile in **e** angezeigt) bezieht sich auf alle dargestellten Aufnahmen, mit Ausnahme der Aufnahmen, die eine ventrale Ansicht des Follikels zeigen (vFZ-Aufnahmen; die Maßstabsbalken entsprechen hier einer Länge von 10 µm). (Fortsetzung nächste Seite)

Abbildung 3.19: (Fortsetzung von vorheriger Seite) Auch in der Organisation des Zytoskeletts im FE weisen *ork1*-Follikel einige Besonderheiten auf: Im Gegensatz zum WT sind sie durch ein schwach ausgebildetes MT-Zytoskelett (S9 und S10B) sowie in einigen Bereichen des Follikels (Pfeilspitzen in **f**, S9 und S10A) auch schwach ausgebildetes bMF-Zytoskelett charakterisiert. Typische bMF-Kondensationen, wie sie in zFZ des WT in S9 auftreten, fehlen in *ork1*. Zusätzlich fehlt die für den WT typische longitudinale MT-Anordnung (A-P-Achse). Die in jüngeren Stadien noch vorhandene transversale bMF-Anordnung geht ebenfalls in späteren Stadien verloren (S10B und S12).

4 Diskussion

4.1 Zusammenhänge zwischen Achsenpolarität, bioelektrischer Polarität und Zytoskelettpolarität im WT und in der Mutante *grk*

Die korrekte Festlegung der Achsenpolarität ist ein wichtiger Schritt in der Morphogenese bilateralsymmetrischer Tiere (Kap. 1.3.1). Bereits seit längerem häufen sich Hinweise, die dafür sprechen, dass die Festlegung der Achsenpolarität, neben anderen Entwicklungsprozessen, einer Regulation durch bioelektrische Signale unterliegt (Kap. 1.1.3; Bohrmann et al., 1986a; Bohrmann et al., 1986b; Bohrmann et al., 1992; Levin et al., 2002; Aw et al., 2010; Beane et al., 2011; Pai et al., 2012; Beane et al., 2013). Neben Signalkaskaden der planaren Zellpolarität wird insbesondere das Zytoskelett immer wieder als ein mögliches Ziel der bioelektrischen Regulation untersucht (Chifflet et al., 2003; Priel et al., 2006; Campetelli et al., 2012; Weiß und Bohrmann, 2019a). Ein entsprechender Zusammenhang zwischen V_{mem}- und pH_i-Änderungen und Änderungen in der Organisation von Zytoskelettelementen ist anhand zahlreicher Arbeiten belegt (Regula et al., 1981; Busa, 1986; Wang et al., 1989; Priel et al., 2006; Callies et al., 2011; Chifflet und Hernández, 2012; Schmoller et al., 2012; Cantero et al., 2016; Weiß und Bohrmann, 2019a).

Darüber hinaus konnten Zusammenhänge zwischen morphologischer Polarität und bioelektrischen Signalen in *Drosophila*-Mutanten (Bohrmann et al., 1986a; Bohrmann et al., 1986b; Bohrmann et al., 1992) und in anderen Organismen, beispielsweise Planarien und *Xenopus*-Embryonen, nachgewiesen werden (Kap. 1.1.3; Levin et al., 2002; Aw et al., 2010; Beane et al., 2011; Pai et al., 2012; Beane et al., 2013). Diese Ergebnisse bilden die Grundlage für seit längerem vermutete Korrelationen zwischen Achsenpolarität, bioelektrischer Polarität und Zytoskelettpolarität in der Oogenese von *Drosophila*. Es wird vermutet, dass auf der primären Achsenpolarität beruhende Signale zur Entstehung bioelektrischer Signale führen, welche über die Modifikation von Zytoskelettelementen die Morphogenese des Follikels steuern. Entsprechende Korrelationen zwischen Achsenpolarität, bioelektrischer Polarität und Zytoskelettpolarität konnten in dieser Arbeit anhand des Vergleichs von WT und *grk* belegt werden.

Neben morphologischen Unterschieden (Kap. 3.1.1) zeigten WT- und *grk*-Follikel einige charakteristische Unterschiede bezüglich der bioelektrischen Eigenschaften und der Eigenschaften des Zytoskeletts (zusammengefasst in Kap. 3.1.4 Abb. 3.6): In frühen vitellogenen Stadien (bis S9) wiesen beide Genotypen zwar A-P elektrochemische Gradienten mit der gleichen Polarität im FE auf, hinsichtlich ihrer Steigung unterschieden sich jedoch die A-P-V_{mem}-Gradienten beider Genotypen in S9 (Kap. 3.1.2). Auffällig war, dass in diesen Stadien, in denen noch keine morphologische D-V-Polarität etabliert ist, sich auch keine transversalen elektrochemischen Gradienten bei beiden Genotypen manifestierten (vgl. Krüger und Bohrmann, 2015; Weiß und Bohrmann, 2019b). Somit korrelieren vergleichbare V_{mem}- und pH_i-Muster in frühen bis mittleren vitellogenen Stadien (bis S10A) mit einer noch fehlenden D-V-Polarität im WT und in der Mutante *grk*.

Passend zu den A-P-V_{mem}-Gradienten mit unterschiedlichem Steigungswinkel in S9 unterschied sich auch das Zytoskelett von WT- und *grk*-Follikeln (Kap. 3.1.3). Für den WT charakteristische Kondensationen der bMF in den zFZ fehlten in der Mutante *grk*. Diese Beobachtung deckt sich mit der Beobachtung, dass *grk*-Follikel bereits in prävitellogenen Stadien (S6-7) eine gestörte A-P-Polarität mit morphologischen Defekten aufweisen (Kap. 1.3.1). Diese beeinträchtigte A-P-Polarität führt vermutlich zu veränderten Aktivitäts- oder Verteilungsmustern von Ionentransportmechanismen (Kap. 1.4.3), die wiederum A-P-V_{mem}-Gradienten mit reduziertem Steigungswinkel verursachen. Dass elektrochemische Gradienten im FE durch asymmetrisch verteilte oder aktivierte Ionentransportmechanismen und Gap Junctions generiert werden, wird seit langem vermutet (Bohrmann und Haas-Assenbaum, 1993; Bohrmann und Braun, 1999; Bohrmann und Zimmermann, 2008; Krüger und Bohrmann, 2015; Lautemann und Bohrmann, 2016; Mathews und Levin, 2017; Weiß und Bohrmann, 2019a). Entsprechend konnte beobachtet werden, dass die im FE beschriebenen elektrochemischen Gradienten (siehe auch Kap. 1.4.2 und Krüger und Bohrmann, 2015; Weiß und Bohrmann, 2019b) mit Verteilungs- bzw. Aktivitätsmustern von Ionentransportmechanismen und Gap Junctions im FE korrelieren (Krüger, 2014; Krüger und Bohrmann, 2015; Lautemann und Bohrmann, 2016; Weiß und Bohrmann, 2019b). Die aufgrund der gestörten Achsenpolarität flacheren A-P-V_{mem}-Gradienten beeinflussen wahrscheinlich das bMF-Zytoskelett dahingehend, dass sie eine transversale bMF-Anordnung stabilisieren und die Entstehung von bMF-Kondensationen verhindern. Besonders deutlich wurde dieser Zusammenhang zwischen gestörter morphologischer Polarität, geänderten bioelektrischen Eigenschaften und Zytoskeletteigenschaften bei der Herausbildung der D-V-Polarität in S10B-Follikeln. Während in diesem Stadium im WT deutliche D-V elektrochemische Gradienten (Kap. 3.1.4 Abb. 3.6b) einhergehend mit einer morpho-

logischen D-V-Polarität (Kap. 3.1.1) auftraten, fehlten transversale elektrochemische Gradienten ebenso wie eine morphologische D-V-Polarität in *grk*. Einige *grk*-Follikel zeigten zwar einen transienten transversalen V_{mem}-Gradienten in S10B, in späteren Stadien trat dieser jedoch nicht mehr auf. Ihre Entsprechung finden solche transienten transversalen V_{mem}-Gradienten in der morphologischen Variabilität von *grk*-Follikeln.

Vergleichbar der gestörten A-P-Polarität in S9 spiegelten sich geänderte bioelektrische Eigenschaften auch in S10B in der Organisation des bMF- und MT-Zytoskeletts wider. Die aus der beeinträchtigten D-V-Polarität resultierenden veränderten bioelektrischen Eigenschaften im *grk*-FE korrelierten mit einer deutlich reduzierten Anzahl von bMF-Kondensationen im gesamten FE. Wie Weiß und Bohrmann (2019a) im Detail gezeigt haben, korrelieren stadienspezifische Änderungen des V_{mem} und pH_i mit strukturellen Änderungen der bMF und MT im WT-FE. Die Autoren nehmen an, dass V_{mem}- und pH_i-Änderungen und damit verbundene strukturelle Änderungen der bMF und MT, die durch die Inhibition von Ionentransportmechanismen induziert werden können, den natürlichen, von bioelektrischen Signalen induzierten Umordnungen des Zytoskeletts in verschiedenen Entwicklungsstadien und Regionen des Follikels entsprechen.

Ein alkalischer pH_i, wie er in HFZ und pFZ vorliegt, stabilisiert gemäß Weiß und Bohrmann (2019a) die parallele transversale bMF-Anordnung und bewirkt einen Verlust der longitudinalen MT-Anordnung, was zu einer stärker zellautonomen MT-Anordnung in diesen Zellen führt. Ein saurer pH_i dagegen, wie er zum Beispiel im dorsalen FE früher S10B-Follikel vorliegt, begünstigt eine zunehmende Unordnung im bMF-Muster und führt zu bMF-Kondensationen sowie zu einer Stabilisierung der entlang der longitudinalen Achse angeordneten MT. Ein saurer pH_i in Verbindung mit einem depolarisierten V_{mem}, wie er beispielsweise in dorsalen zFZ später S10B-Follikel zu finden ist, fördert ebenfalls die Bildung von bMF-Kondensationen und begünstigt die anschließende Depolymerisation der bMF. Schwache oder fehlende V_{mem}-Gradienten und eine relative Alkalisierung, erzeugt durch Inhibition bestimmter Ionentransportmechanismen (Weiß und Bohrmann, 2019a), haben eine stabilisierende Wirkung auf das parallele transversale bMF-Muster im WT-FE.

Aus diesen Beobachtungen kann die Hypothese abgeleitet werden, dass graduelle Änderungen bioelektrischer Signale im FE zur Regulation des Zytoskeletts eingesetzt werden, indem diese vorgeben, auf welche Weise das Zytoskelett stadienspezifisch verändert werden soll (Weiß und Bohrmann, 2019a; Weiß und Bohrmann, 2019b). Diese Hypothese wird von den Ergebnissen des WT- und *grk*-Vergleichs gestützt: Schwache oder fehlende V_{mem}-Gradienten haben eine stabilisierende Wirkung auf das parallele transversale bMF-Muster im WT-FE. Dies trifft auch auf die Zytoskelett-Muster in den zFZ von *grk* S9- und *grk* S10B-Follikeln zu. Diese zeichnen sich zum einen dadurch aus, dass die

bMF ihre transversale Anordnung beibehielten und zum anderen dadurch, dass für den WT charakteristische Kondensationen fehlten. Flacheren oder fehlenden elektrochemischen Gradienten wird, laut Weiß und Bohrmann (2019a), zusätzlich eine stabilisierende Wirkung auf longitudinal angeordnete MT zugeschrieben. Auch diese Vermutung wird von den Ergebnissen dieser Arbeit gestützt, da ein flacherer A-P-V_{mem}-Gradient in *grk* S9-Follikeln mit der Stabilisierung longitudinal angeordneter MT in HFZ und pFZ korrelierte.

Da sich das Zytoskelett der *grk*-Follikel in späteren Stadien bezüglich seiner Organisation nicht von dem in S9 unterschied, ist anzunehmen, dass die in frühen Stadien festgelegten V_{mem}- und pH_i-Änderungen entlang der A-P-Achse auch die Zytoskelettorganisation in späteren Stadien beeinflussen. Flachere A-P-V_{mem}-Gradienten in *grk* S9-Follikeln stabilisieren dementsprechend transversal angeordnete bMF-Bündel und longitudinal angeordnete MT in S10B. In einem für V_{mem}- und pH_i-Änderungen sensiblen Zeitfenster in der frühen Oogenese scheinen diese Änderungen der A-P elektrochemischen Gradienten registriert und in Änderungen der Zytoskeletteigenschaften überführt zu werden. In späteren vitellogenen Stadien unterstützt ein fehlender transversaler pH_i-Gradient die longitudinale Anordnung der MT in den HFZ und pFZ von *grk*. Folglich ist das gesamte *grk*-FE durch eine longitudinale zellübergreifende MT-Anordnung gekennzeichnet, wohingegen die MT in den HFZ und pFZ des WT eher eine zellautonome Organisation aufweisen. Diesen Annahmen entspricht, dass eine entlang der Transversalachse polarisierte bMF-Anordnung sowie eine entlang der Longitudinalachse polarisierte MT-Anordnung im *grk*-FE besonders ausgeprägt ist, wohingegen zellautonom organisierte MT in *grk*-Follikeln fehlen.

Die pFZ betreffend unterscheiden sich die in der Mutante *grk* detektierten Korrelationen zwischen V_{mem} und MT-Organisation von denen von Weiß und Bohrmann (2019a) aufgedeckten Korrelationen in WT-pFZ. Erklären lässt sich dies mit der folgenden Hypothese: Follikel mit einem stark ausgeprägten *grk*-Phänotyp besitzen migrierende FZ am posterioren Pol (Kap. 3.1.2 Abb. 3.2h-j). Vorangegangenen Studien zufolge (González-Reyes et al., 1995; Roth et al., 1995) handelt es sich bei diesen FZ um anteriore FZ-Typen (BC, flache FZ und zFZ), welche am posterioren Ende des *grk*-Follikels dupliziert werden. Diese duplizierten anterioren FZ-Typen („pFZ“) besitzen folglich die gleichen bioelektrischen Eigenschaften und Zytoskeletteigenschaften wie die FZ am anterioren Pol und durchlaufen die gleichen morphologischen Veränderungen: „Posteriore zFZ“ unternehmen z. B. eine zentripetale Wanderung, bei der sie Teile der Ooz einschließen. Geht man nun von der Annahme aus, dass sich diese „pFZ“ mit anteriorem FZ-Schicksal bezüglich ihrer bioelektrischen Eigenschaften und Zytoskeletteigenschaften kaum vom anterioren FE unterscheiden, lassen sich sowohl die Abwesenheit

zellautonom organisierter MT in den pFZ als auch die Verstärkung des transversalen bMF- sowie longitudinalen MT-Musters in *grk* erklären.

4.1.1 Fazit: Zusammenhänge zwischen Achsenpolarität, bioelektrischer Polarität und Zytoskelettpolarität

Zusammengefasst liefern die im FE des WT und der Achsenpolaritätsmutante *grk* beobachteten bioelektrischen Eigenschaften und Zytoskeletteigenschaften weitere Hinweise darauf, dass Zusammenhänge zwischen Achsenpolarität, bioelektrischer Polarität und Zytoskelettpolarität in der Oogenese von *Drosophila* bestehen. Darüber hinaus lässt sich aus der Analyse der Achsenpolaritätsmutante *grk* der Schluss ziehen, dass nicht nur ein bestimmter zellspezifischer Wert für V_{mem} oder pH_i oder die Polarität der elektrochemischen Gradienten für die Erhaltung oder Umordnung von Zytoskelettelementen entscheidend sind, sondern auch die Steigungswinkel der Gradienten. Fehlen bestimmte Signale wie Grk, z. B. aufgrund einer beeinträchtigten Achsenpolarität, so beeinflusst dies die asymmetrische Verteilung oder Aktivierung von Ionentransportmechanismen und Gap Junctions und im weiteren Verlauf die Steigungswinkel der elektrochemischen Gradienten. Bestimmte Veränderungen in der Organisation des Zytoskeletts, die durch bioelektrische Signale induziert werden, bleiben infolgedessen aus, und die Morphologie des Follikels ändert sich.

4.2 Nachweis von Ionentransportmechanismen im FE mittels genetisch codierter V_{mem}- und pH_i-Sensoren

Um ein umfassendes Verständnis darüber zu erlangen, wie bioelektrische Signale als Regulatoren von Entwicklungsprozessen Einfluss nehmen, ist es notwendig, die an der Generierung und Modifikation dieser Signale beteiligten molekularen Mechanismen zu identifizieren. Bereits bekannt ist, dass Amilorid-sensitive NHEs und Na^+-Kanäle, V-ATPasen, ATP-abhängige K^+-Kanäle, spannungsabhängige Typ-L Ca^{2+}-Kanäle, $Na^+/K^+/2Cl^-$-Cotransporter, Cl^--Kanäle und Gap Junctions an der Generierung und Regulation bioelektrischer Signale im FE beteiligt sind (Kap. 1.4 und 1.5; Bohrmann und Braun, 1999; Bohrmann und Zimmermann, 2008; Krüger, 2014; Krüger und Bohrmann, 2015; Lautemann und Bohrmann, 2016; Weiß und Bohrmann, 2019a; Weiß und Bohrmann, 2019b).

Weiß und Bohrmann (2019b) wiesen nach, dass gegen die genannten Ionentransportmechanismen gerichtete Inhibitoren bioelektrische Signale (stadienspezifische V_{mem}- und pH_i-Muster und elektrochemische Gradienten) in S10B der Oogenese beeinflussen (Kap.

1.4.4). Eine Inhibition von $Na^+/K^+/2Cl^-$-Cotransportern führt zu deutlich steileren A-P-pH_i-Gradienten und flacheren D-V-V_{mem}-Gradienten, während eine Inhibition von ATP-abhängigen K^+-Kanälen zu deutlich steileren A-P- und D-V-pH_i-Gradienten und flacheren A-P- und D-V-V_{mem}-Gradienten führt (Weiß und Bohrmann, 2019b).

Die in früheren Studien mittels elektrophysiologischer Ableitungen und Experimenten mit den V_{mem}- bzw. pH_i-sensitiven Fluoreszenzfarbstoffen DiBAC und CFDA gewonnen Ergebnisse sollten in der vorliegenden Arbeit einer Überprüfung durch Verwendung der genetisch codierten V_{mem}- und pH_i-Sensoren ArcLight und pHluorin-Moesin (Kap. 1.6 und 2.6) sowie spezifischer Inhibitoren (Kap. 2.11 Tabelle 2.6 und Kap. 3.2 Abb. 3.7) unterzogen werden. Es konnte zunächst gezeigt werden, dass Änderungen bioelektrischer Eigenschaften, wie sie im Verlauf der Oogenese im FE auftreten, mit Hilfe der genetisch codierten Sensoren ArcLight und pHluorin-Moesin nachweisbar sind. Dass zeitliche Schwankungen der Fluoreszenzintensitäten im FE nicht auftreten, konnte durch Langzeit-Messungen in ArcLight- und pHluorin-exprimierenden S10B-Follikeln bestätigt werden (Kap. 3.2 Abb. 3.8).

A-P elektrochemische Gradienten, wie sie durch Verwendung von DiBAC und CFDA ermittelt werden konnten, waren im FE der ArcLight- bzw. pHluorin-exprimierenden Follikel ebenfalls nachweisbar. Diese Gradienten unterschieden sich allerdings teilweise in ihrer Polarität von den Gradienten der Fluoreszenzfarbstoffe (Kap. 3.2 Abb. 3.9). Im FE von ArcLight-exprimierenden S10B-Follikeln zeigte sich ein D-V-V_{mem}-Gradient, bei dem, im Gegensatz zum D-V-V_{mem}-Gradienten von DiBAC, die dorsale Seite meist als die stärker depolarisierte Seite identifiziert wurde. Gradienten mit unterschiedlicher Polarität haben möglicherweise ihren Ursprung in den unterschiedlichen zellulären Lokalisationen von Fluoreszenzfarbstoffen und fluoreszierenden Proteinen. Bei ArcLight und pHluorin handelt es sich um membrangebundene Sensoren, die vorwiegend V_{mem}- und pH_i-Änderungen nahe der Membranen anzeigen, wohingegen die Fluoreszenzfarbstoffe DiBAC und CFDA hauptsächlich V_{mem}- und pH_i-Änderungen des Zytoplasmas zeigen. Beobachtete Unterschiede zwischen den Gradienten schwacher Fluoreszenzintensitäten in den Membranen (genetisch codierte Sensoren) und den Gradienten stärkerer Fluoreszenzintensitäten im Zytoplasma (Fluoreszenzfarbstoffe) sind vermutlich darauf zurückzuführen, dass zur Analyse der Gradienten Aufnahmen optischer Schnitte (SIM; Kap. 2.10.1) verwendet wurden.

Die Inhibitionsexperimente mit den genetisch codierten Sensoren bestätigten erneut, dass NHEs, Na^+-Kanäle, V-ATPasen, ATP-abhängige K^+-Kanäle, spannungsabhängige Typ-L Ca^{2+}-Kanäle, Cl^--Kanäle und $Na^+/K^+/2Cl^-$-Cotransporter eine entscheidende Rolle bei der Generierung bioelektrischer Signale im FE einnehmen (Kap. 3.2.3). Während der Inhibitor 9-AC (Cl^--Kanäle) die stärksten Effekte auf den pH_i im FE

erzielte, hatte Verapamil (spannungsabhängige Typ-L Ca^{2+}-Kanäle) keinen signifikanten Einfluss auf den pH_i. Das V_{mem} betreffend erzielte Furosemid ($Na^+/K^+/2Cl^-$-Cotransporter) die stärksten Effekte, wohingegen Concanamycin A (V-ATPasen) den schwächsten depolarisierenden Einfluss auf das V_{mem} hatte.

In Experimenten von Weiß und Bohrmann (2019b) mit DiBAC und CFDA erzielten die Inhibitoren Furosemid und Glibenclamid die stärksten Effekte auf den pH_i, wohingegen Amilorid oder Bafilomycin A1 (ein anderer Inhibitor der V-ATPasen) keinen signifikanten Einfluss auf den pH_i hatten (WFM). Unter Verwendung von SIM zeigte Bafilomycin A1 eine Alkalisierung zytoplasmatischer Vesikel und somit eine Azidifizierung des Zytoplasmas von FZ an (Weiß und Bohrmann, 2019b). Es ist daher plausibel, dass auch die von Concanamycin A induzierte Alkalisierung (vgl. pHluorin-Experimente mit Concanamycin A, Kap. 3.2.3) auf zytoplasmatische Vesikel mit einem alkalischen pH_i zurückzuführen ist.

Die stärksten Effekte auf das V_{mem} erzielte in Experimenten von Weiß und Bohrmann (2019b) unter Verwendung von WFM der Inhibitor Verapamil, wohingegen die anderen Inhibitoren (Amilorid, Bafilomycin A1, 9-AC, Furosemid), mit Ausnahme von Glibenclamid, schwächere hyperpolarisierende Effekte auf das V_{mem} bewirkten. Damit unterscheiden sich die von Weiß und Bohrmann (2019b) ermittelten Einflüsse auf das V_{mem} teilweise von denen der genetisch codierten Sensoren in der vorliegenden Arbeit.

Eine mögliche aber weniger wahrscheinliche Ursache für reduzierte DiBAC-Fluoreszenzintensitäten (welche eine Hyperpolarisation anzeigen) könnte *quenching* sein (Adams und Levin, 2012). Moreno et al. (1998) und Ball et al. (2000) berichten jedoch ebenso wie die vorliegende Arbeit (Glibenclamid: 250 µM, Concanamycin A: 2,5 µM) von einem depolarisierenden Einfluss der Inhibitoren Glibenclamid (200 µM) und Bafilomycin A1 (1 µM) auf das V_{mem}.

Um V_{mem}- und pH_i-Änderungen mit den membrangebundenen genetisch codierten Sensoren verlässlich zu detektieren, waren höhere Inhibitorkonzentrationen als bei den Fluoreszenzfarbstoffen (bis zu 100×, vgl. Weiß und Bohrmann, 2019b) notwendig. Die beobachtete Depolarisation des V_{mem} im FE könnten deshalb auf diese erhöhten Inhibitorkonzentrationen zurückzuführen sein, die eine Herausforderung für jede Zelle darstellen. Es ist plausibel, dass Zellen, in denen die Generierung des V_{mem} massiv beeinträchtigt ist, auf diese Situation mit einer Depolarisation des V_{mem} reagieren. Es konnte gezeigt werden, dass eine Blockade der oxidativen Phosphorylierung und somit nahezu aller energieabhängigen Ionentransportmechanismen durch z. B. Natriumazid (NaN_3) oder Dinitrophenol (Bohrmann, 1991a) depolarisierende Effekte auf das V_{mem} im FE hat (Kap. 3.2.2). Auch membranpermeables Allicin, welches in hohen Konzentrationen die Weiterentwicklung von Follikeln in vitro verhinderte und durch Einfluss

auf Aquaporine (Verma und Pandey, 2017) zu einer Verdickung des FE führte, hatte depolarisierende Effekte auf das V_{mem} im DiBAC-gefärbten FE. Somit stellt die vergleichsweise niedrige Sensitivität von genetisch codierten Sensoren, die einerseits erhöhte Inhibitorkonzentrationen und andererseits längere Belichtungszeiten notwendig macht, einen Nachteil dar, da zu hohe Konzentrationen die selektive Analyse eines Ionentransportmechanismus behindern können. Aus diesem Grund wird angenommen, dass von Weiß und Bohrmann (2019b) abweichende Ergebnisse dieser Arbeit auf unterschiedlichem experimentellem Vorgehen, z. B. erhöhten Inhibitorkonzentrationen, beruhen.

Angesichts der mit den beiden Methoden ArcLight und DiBAC (vgl. Weiß und Bohrmann, 2019b) ermittelten unterschiedlichen Einflüsse bezüglich der Inhibitoren Concanamycin A/Bafilomycin A1, 9-AC und Furosemid wurden die Inhibitionsexperimente unter den gleichen experimentiellen Bedingungen mit den Fluoreszenzfarbstoffen wiederholt. In diesen Experimenten erzielten die Inhibitoren Amilorid und Verapamil die stärksten Effekte auf das V_{mem} im FE (Hyperpolarisation). Die Inhibitoren Concanamycin A, 9-AC und Furosemid führten, im Unterschied zu den von Weiß und Bohrmann (2019b) beschriebenen Effekten unter Verwendung von WFM, zu keinen signifikanten Effekten auf das V_{mem} im FE (Kap. 3.2.4). Den pH_i betreffend erzielte Glibenclamid mit CFDA den stärksten alkalisierenden Effekt im FE, während Amilorid den schwächsten Einfluss hatte. Beide Methoden (genetisch codierte Sensoren und Fluoreszenzfarbstoffe) detektierten somit, mit Ausnahme des Inhibitors Amilorid, unter vergleichbaren Versuchsbedingungen vergleichbare Einflüsse der verschiedenen Inhibitoren auf die bioelektrischen Eigenschaften im FE. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die genetisch codierten Sensoren verlässliche Werkzeuge für derartige Analysen darstellen, die zudem bei der Durchführung der Experimente einige praktische Vorteile gegenüber Fluoreszenzfarbstoffen bieten (Kap. 1.6).

Zusammenfassend konnten anhand der Inhibitionsexperimente signifikante V_{mem}- und pH_i-Änderungen im FE detektiert werden, die denen mit Hilfe der V_{mem}- und pH-sensitiven Fluoreszenzfarbstoffe DiBAC und CFDA ermittelten V_{mem}- und pH_i-Änderungen (Han und Burgess, 2010; Adams und Levin, 2012; Weiß und Bohrmann, 2019b) vergleichbar sind. Relativ schwache inhibitorische Wirkungen, wie sie von den Inhibitoren Verapamil oder Concanamycin A herbeigeführt wurden, sind vermutlich auf kompensatorische Effekte anderer Ionentransportmechanismen zurückzuführen. Insbesondere bei großen Ionentransportmechanismen-Familien mit zahlreichen Mitgliedern, wie beispielsweise den Mitgliedern der V-ATPase- und DEG/ENaC-Familie (Kellenberger und Schild, 2002; Allan et al., 2005; Zelle et al., 2013) ist anzunehmen, dass weniger empfindliche Mitglieder dieser Familien oder auch andere Typen von Ionentransport-

mechanismen deren Funktion übernehmen können.

4.2.1 Fazit: Nachweis von Ionentransportmechanismen im FE mittels genetisch codierter V_{mem}- und pH_i-Sensoren

Auch wenn das Ausmaß des detektierten Einflusses auf V_{mem} und pH_i sich zwischen den beiden verwendeten Methoden (genetisch codierte Sensoren und Farbstoffe) manchmal unterscheidet, so weisen doch beide Methoden darauf hin, dass die inhibierten Ionentransportmechanismen eine entscheidende Rolle bei der Generierung bioelektrischer Phänomene im FE einnehmen. Genetisch codierte Sensoren bieten gegenüber Fluoreszenzfarbstoffen einige Vorteile, können aber auch mit Nachteilen verbunden sein. Resultate aus vorangegangenen Analysen, die eine Beteiligung dieser Ionentransportmechanismen an der Generierung bioelektrischer Signale im FE von *Drosophila* nahelegen, konnten durch Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigt werden.

4.3 Bedeutung bioelektrischer Signale für die Entwicklung des Ovars und die Oogenese

Aufgrund der beschriebenen Beobachtungen lag es nahe zu überprüfen, ob RNAi-Knockdowns der identifizierten Ionentransportmechanismen zu Änderungen der bioelektrischen Eigenschaften und des Zytoskeletts im FE führen, welche vergleichbar zu denen sind, die mit Hilfe der Inhibitoren erzielt wurden (Weiß und Bohrmann, 2019a; Weiß und Bohrmann, 2019b). Von besonderem Interesse war dabei die Frage, ob mit Hilfe der RNAi-Knockdowns spezifische Ionentransportmechanismen ausfindig gemacht werden können, die über V_{mem}- und pH_i-Änderungen im FE die Entwicklung des Ovars und/oder die Oogenese beeinflussen.

Hierfür wurde die Expression verschiedener Ionentransportmechanismen- und Gap Junction-Gene, welche gemäß der FlyAtlas-Genexpressionsdatenbank eine verstärkte Expression im Ovar von *Drosophila* aufweisen, mit Hilfe des *tj*-Gal4-Treibers in somatischen Zellen (FE) und mit Hilfe der mat-tub-Gal4- und MTD-Gal4-Treiber in Keimbahnzellen (Ooz und NZ) reduziert.

4.3.1 Mögliche Funktionen des K^+-Kanals Ork1

Weiß und Bohrmann (2019a) haben gezeigt, dass mit Hilfe der Inhibitoren von Ionentransportmechanismen die Organisation des Zytoskeletts im FE beeinflusst werden kann. Eine entsprechende Modifikation von Zytoskelettelementen war auch anhand des

Knockdowns von *ork1* zu beobachten: Der Somaknockdown von *ork1* führte zu einer veränderten Follikelform. *ork1*-Follikel wiesen eine defekte Polarisierung der bMF und eine kugelförmige Gestalt auf, während WT-Follikel sich durch eine transversale bMF-Anordnung in S8-12 (vgl. Weiß und Bohrmann, 2019a) sowie eine entlang der longitudinalen Achse verlängerte Follikelform auszeichneten. Dieser Phänotyp von *ork1*-Follikeln ähnelt dem Phänotyp der *round-egg*-Mutanten *fat2/kugelei*, *trc*, *fry*, *msn* und *Lar* (Kap. 1.3.2.3; Gutzeit et al., 1991; Bateman et al., 2001; Frydman und Spradling, 2001; Viktorinová et al., 2009; Horne-Badovinac et al., 2012; Duhart et al., 2017). In diesen Mutanten, ebenso wie in *ork1*, korreliert ein fehlendes global koordiniertes bMF-Muster (planar-polarisiertes bMF-Muster) mit dem Verlust der Fähigkeit der Follikel entlang der Longitudinalachse zu elongieren. Daraus lässt sich die Vermutung ableiten, dass auch *ork1* eine Funktion im Fat2-vermittelten PCP-Signalweg besitzt.

Den WT betreffend wurde die Hypothese aufgestellt, dass das planar-polarisierte bMF-Muster als eine Art „molekulares Korsett“ fungiert, welches die Größenzunahme der Follikel entlang der Transversalachse beschränkt und so zur Elongation der Follikel in den Stadien S5-7 beiträgt (Kap. 1.3.2.3; Gutzeit et al., 1991; Viktorinová et al., 2009). Entscheidend für dieses koordinierte Verhalten der FZ ist eine funktionierende Zell-Zell-Kommunikation. Dies ist daran zu erkennen, dass Mutationen in atypischen Cadherinen, wie fat2 (*kugelei*-Allel), welche die Interaktion des bMF-Zytoskeletts mit der extrazellulären Matrix in FZ des Ovars vermitteln (Gutzeit et al., 1991; Viktorinová et al., 2009), einen besonders starken *round-egg*-Phänotyp induzieren. Lar, eine Rezeptor-Tyrosin-Phosphatase, interagiert im Zuge dieser Elongation ebenfalls mit extrazellulären Matrixkomponenten sowie mit dem bMF-Zytoskelett und wird auch für die polarisierte bMF-Anordnung im WT benötigt (Bateman et al., 2001; Frydman und Spradling, 2001; Viktorinová et al., 2009). Dementsprechend weisen Mutanten von Lar und einer der beteiligten extrazellulären Matrixkomponenten (LanA) eine gestörte PCP (planar-polarisierte bMF-Anordnung) im FE auf und produzieren runde Eier (Gutzeit et al., 1991; Bateman et al., 2001; Frydman und Spradling, 2001).

Drei weitere Regulatoren der Follikelelongation, welche sich ebenfalls durch eine gestörte PCP im FE und runde Eier auszeichnen, wurden mit Hilfe eines Screens zur Charakterisierung von *round-egg*-Mutanten identifiziert: Einer dieser Regulatoren, die *Nuclear Dbf2-related* (NDR)-Kinase Tricornered (Trc), übernimmt, wie vermutet wird, eine Funktion bei der Regulation der bMF sowie bei der Regulation von Interaktionen der extrazellulären Matrixkomponenten mit den FZ. Auch eine Funktion als Transkriptionsfaktor, wie sie bei anderen NDR-Kinasen beobachtet wurde, wird in diesem Kontext diskutiert. Die anderen beiden Regulatoren Furry (Fry, Aktivator von Trc) wie auch Mishappen (Msn, eine Kinase, die *upstream* von Trc agiert) werden zu Beginn der

Follikelelongation für die Etablierung der PCP im FE benötigt (Horne-Badovinac et al., 2012). Somit scheint auch ein NDR-Kinase-Signalweg an der Regulation der Follikelelongation beteiligt zu sein. Denkbar ist in diesem Zusammenhang eine von Ork1 abhängige elektrochemische Regulation dieses NDR-Kinase-Signalwegs.

Im Hinblick auf andere Entwicklungsprozesse gibt es bereits Belege dafür, dass Ionentransportmechanismen, wie Ork1, an einer elektrochemischen Regulation von Signalwegen beteiligt sind (Kap. 1.1.1; Simons et al., 2009; Pai et al., 2015; Ulmschneider et al., 2016; Dahal et al., 2017). Ein weiteres Beispiel für einen derartigen Zusammenhang ist im Wnt/Fz-abhängigen PCP-Signalweg des *Drosophila*-Auges zu finden (Simons et al., 2009): Der Rezeptor Dsh ist in diesem Signalweg zunächst durch eine schwache Bindung mit dem Liganden Fz verbunden. Durch räumliche Nähe zu einem Ionentransportmechanismus, dem Na^+/H^+-Antiporter Nhe2, kann diese Bindung jedoch stabilisiert werden (Kap. 1.1.1). Eine vergleichbare Funktion ist auch hinsichtlich des K^+-Kanals Ork1 denkbar.

Die Identifizierung der V-ATPase UE VhaPRR als Regulator des Wingless- und PCP-Signalwegs stützt diese Vermutung zusätzlich: Es konnte gezeigt werden, dass VhaPRR, indem es einen geeigneten pH-Wert einstellt, entweder die Fz-vermittelte Signalgebung unterstützt, Einfluss auf die Fz-Konformation nimmt, die Fz-Assemblierung fördert oder das Fz-*Trafficking* reguliert (Hermle et al., 2010). Die Analyse von *ork1*-Knockdown-Fliegen ermöglicht es in diesem Kontext erstmalig, einen Zusammenhang zwischen elektrochemischer Regulation und der Etablierung von PCP im FE von *Drosophila* herzustellen.

Im Zuge der *ork1*-Zytoskelettanalysen wurde eine gewisse Variabilität hinsichtlich der planar-polarisierten bMF-Anordnung innerhalb des FE eines Follikels sowie zwischen verschiedenen Follikeln festgestellt. Die Gründe für diese Variabilität liegen vermutlich im mehr oder weniger koordinierten Verhalten der FZ, welches unabdingbar für eine korrekte planare Polarisierung der bMF ist (Viktorinová et al., 2009). Der Knockdown von *ork1* im Soma wirkte sich vermutlich negativ auf dieses koordinierte Zellverhalten aus und störte auf diese Weise eine globale Polarisierung der bMF-Bündel, welche für die Elongation des Follikels notwendig ist.

Defekte in der Follikelform von *trc*-, *fry*- oder *kugelei*-mutanten Follikeln sind in späteren Stadien (ab S10) besonders ausgeprägt (Gutzeit et al., 1991; Horne-Badovinac et al., 2012). Auch diesbezüglich waren Übereinstimmungen mit *ork1*-Follikeln festzustellen: Die deutlichsten *round-egg*-Phänotypen waren in *ork1*-Follikeln älterer Entwicklungsstadien (ab S10B) festzustellen. Zusammengenommen stützt die Analyse des K^+-Kanals Ork1 damit die Hypothese, dass Ork1 neben seinen bereits bekannten Funktionen (Kap. 1.5.3; Lalevée et al., 2006; Zhang et al., 2017) auch an der Etablierung von

PCP im FE beteiligt ist. Über eine elektrochemische Regulation des bekannten Fat2-vermittelten PCP-Signalwegs oder eines ebenfalls beteiligten NDR-Signalwegs trägt Ork1 möglicherweise zur Elongation der Follikel bei.

Weiß und Bohrmann (2019a) und Weiß und Bohrmann (2019b) haben gezeigt, dass bioelektrische Signale in Form von elektrochemischen Gradienten Einfluss auf die PCP im FE von *Drosophila*-Follikeln nehmen und graduelle Änderungen des Zytoskeletts bewirken. Ein weiterer Hinweis für eine Rolle bioelektrischer Signale bei der Ausbildung der PCP im FE ergibt sich aus der Analyse der Mutante *grk*, die belegte, dass Änderungen in den bioelektrischen Signalen mit einer veränderten PCP im FE korrelieren. Die stärksten Indizien für diese Hypothese ergaben sich jedoch aus der veränderten Follikelform sowie der gestörten Polarisierung von Zytoskelettelementen in *ork1*-Follikeln: Neben einer fehlenden transversalen bMF- und longitudinalen MT-Anordnung schien sowohl das bMF- als auch das MT-Zytoskelett im FE von *ork1*-Fliegen ingesamt schwächer ausgebildet zu sein.

Auch andere Studien belegen einen Zusammenhang zwischen der Organisation des MT-Zytoskeletts im FE und der Follikel- bzw. Eiform verschiedener Insektenspezies (Tucker und Meats, 1976; Viktorinová und Dahmann, 2013). So ist es interessant, dass eine Depolymerisation der MT die Follikelelongation unterbindet (Viktorinová und Dahmann, 2013). Polarisierte MT könnten am Transport der für die Elongation der Follikel notwendigen Proteine (Shimada et al., 2006), wie Fat2, beteiligt sein.

4.3.2 Bedeutung der Ionentransportmechanismen- und Gap Junction-Gene *rpk*, *vha55*, *inx1* und *inx3* in der Entwicklung des Ovars und im Verlauf der Oogenese

Auch in anderen Fällen wirkte sich der RNAi-Knockdown von Ionentransportmechanismen vermutlich auf das Zytoskelett aus: Der Knockdown von *rpk*, *vha55*, *inx1* und *inx3* im FE führte zu Phänotypen mit hoher Penetranz, welche die Ovarmorphologie und/oder die Oogenese betrafen, wobei sie zum Verlust der Ovarien, größenreduzierten Ovarien oder einer gestörten Follikelbildung führten (Kap. 3.3.2). Reduzierte Transkriptionslevel dieser Gene im Soma riefen die deutlichsten Veränderungen in der Morphologie des Ovars und der Follikelentwicklung hervor. Dies untermauert die Annahme, dass die entsprechenden Proteine wichtige Funktionen in der elektrochemischen Regulation von Entwicklungsprozessen des FE übernehmen.

Im *Drosophila*-Ovar wurden bereits mehrere Ionentransportmechanismen mit einer pH_i-abhängigen Regulation von Entwicklungsprozessen in Verbindung gebracht. Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass der Na^+/H^+-Antiporter Nhe2 für eine Zunahme des

pH_i im Verlauf der präfollikulären Zelldifferenzierung verantwortlich ist (Benitez et al., 2019). Zugleich wurde ae2, ein Cl^--HCO_3^--Antiporter, identifiziert, der als pH_i-Regulator in der FZ-Stammzelllinie fungiert. Der Verlust von ae2 führt zu reduzierter Fertilität, einer verminderten Anzahl von Ovariolen, einer reduzierten Follikelanzahl und größenreduzierten Ovarien. Dies weist darauf hin, dass dieser Phänotyp durch eine Fehlregulation des pH_i verursacht ist (Benitez et al., 2019). Eine Ähnlichkeit mit den im RNAi-Screen beobachteten Defekten stützt die Annahme, dass auch die in dieser Arbeit untersuchten Knockdown-Phänotypen auf eine Fehlregulation des V_{mem} und/oder pH_i zurückzuführen sind. Die durch den Knockdown der DEG/ENaC-UE RPK, der V-ATPase UE Vha55 oder der Gap Junction-UE Inx1 und Inx3 induzierte elektrochemische Fehlregulation scheint so starke Effekte (u. a. auf das Zytoskelett) zu haben, dass z. B. somatische Stammzellen nicht korrekt ausdifferenzieren und infolgedessen die Ovarmorphologie und/oder die Follikelentwicklung deutlich beeinträchtigt sind.

4.3.2.1 Mögliche Funktionen der DEG/ENaC-Untereinheit RPK

Der Knockdown von *rpk* im Soma und in der Keimbahn beeinträchtigte besonders deutlich die Ovar- und Follikelentwicklung. Dies weist darauf hin, dass RPK eine wichtige Funktion in der Ovarentwicklung übernimmt. Dieser Annahme entspricht auch die bereits seit längerem vermutete Funktion in der Gametogenese und die Tatsache, dass *rpk* eine besonders starke und spezifische Expression in Gonaden und im frühen Embryo aufweist (Kap. 1.5.1; Darboux et al., 1998; Mano und Driscoll, 1999; Chintapalli et al., 2013). Passend dazu führte der im RNAi-Screen durchgeführte Somaknockdown von *rpk* mittels shRNAs zu einem vollständigen Verlust der paarigen Ovarien, während der Keimbahnknockdown zu größenreduzierten paarigen oder auch einzelnen Ovarien führte, in denen zwar eine beginnende Ovariolenbildung, jedoch keine sich entwickelnden Follikel nachgewiesen werden konnten (Kap. 3.3.2.1).

Die Bildung des Ovars beginnt bereits im dritten Stadium der Larvalentwicklung (Godt und Laski, 1995; Bratu und McNeil, 2015) und ist in *rpk*-Fliegen in beträchtlichem Ausmaß gestört. Daraus lässt sich die Annahme ableiten, dass die beobachteten Phänotypen im Zusammenhang mit essentiellen Funktionen stehen, die bereits in der Larvalentwicklung von Bedeutung sind. Tatsächlich zeigen viele Gene der *pickpocket*-Familie während der frühen Entwicklung und in adulten weiblichen Fliegen wechselnde Expressionsmuster. Auch diese deuten darauf hin, dass Mitglieder der *pickpocket*-Familie Funktionen bei der Signalgebung in Entwicklungsprozessen und in der Morphogenese übernehmen (Zelle et al., 2013; Benitez et al., 2019). Auch in weiteren Spezies, wie *Xenopus* und anderen Vertebraten, ist eine Beteiligung von Mitgliedern der DEG/ENaC-Familie an frühen Entwicklungsprozessen bekannt (Mano und Driscoll, 1999).

Mikroarray-Daten aus der FlyAtlas-Datenbank belegen, dass die größten *rpk*-Expressionslevel in Ovarien und Hoden zu finden sind. Eine Funktion in den Stammzellen der Ovariolen, den FSZ und KSZ, oder in den Zystozyten ist dennoch unwahrscheinlich, da *rpk*-RNA in keinem dieser Zelltypen nachgewiesen werden konnte (Darboux et al., 1998). Kellenberger und Schild (2002) vermuten, dass *rpk* sowie verwandte Gene eine Funktion in der Flüssigkeitsverteilung und Zellvolumenregulation während der Gametogenese und frühen Entwicklung übernehmen. Eine entsprechende Funktion in der Zellvolumenregulation von Follikeln könnte die beobachteten Defekte in *rpk*-Knockdown-Fliegen, die mit NZ-Resten und überschüssigem FZ-Gewebe (geschwollene NZ und FZ) in S14-Follikeln einhergehen, erklären.

4.3.2.2 Mögliche Funktionen der V-ATPase-Untereinheit Vha55

Der Somaknockdown des Gens *vha55*, welches für die UE B der vakuolären H^+-ATPase codiert, verursachte im RNAi-Screen größenreduzierte Ovarien mit degenerierenden Follikeln ab S10A. Einen noch deutlicheren Effekt auf die Entwicklung von *Drosophila* wurde nur durch den genetischen Knockout von *vha55* erzielt, der wie Davies et al. (1996) berichten, zu einem larval-lethalen Phänotyp führt.

V-ATPasen werden verstärkt in Ovarien exprimiert (Kap. 1.5.2, Allan et al., 2005; Du et al., 2006). Vorwiegend sind sie dort in apikalen Membranen und im Oolemma lokalisiert (Bohrmann und Braun, 1999; Lautemann und Bohrmann, 2016). In Verbindung mit einer asymmetrischen Verteilung von V-ATPasen im FE von S9-S10B-Follikeln (Krüger, 2014; Krüger und Bohrmann, 2015; Lautemann und Bohrmann, 2016), sowie einer vermuteten Beteiligung von V-ATPasen am Aufbau von Gap Junctions (Bohrmann, 1993; Bohrmann und Lämmel, 1998) unterstützt diese Lokalisation die Annahme, dass V-ATPasen an bioelektrischen Phänomenen während der Oogenese beteiligt sind (Bohrmann, 1993; Bohrmann und Lämmel, 1998; Weiß und Bohrmann, 2019b). Eine Beteiligung an der Notch- bzw. Wingless-Signalgebung (Hermle et al., 2010; Vaccari et al., 2010; Tognon et al., 2016) belegt zusätzlich die Relevanz von V-ATPasen in der Entwicklung von *Drosophila*.

Auch eine Beteiligung von V-ATPasen an der Osmoregulation und dem Follikelwachstum durch Wasseraufnahme wird angenommen, insbesondere während der Stadien S10-12 (Bohrmann und Braun, 1999). Daraus ergibt sich eine mögliche Erklärung für den beobachteten Phänotyp in *vha55*-Knockdown-Fliegen: Der Verlust der Vha55-Funktion beeinflusste möglicherweise das Follikelwachstum in S10. Als eine Konsequenz dieses inhibierten Wachstums degenerierten die Follikel in diesem Stadium.

Andererseits sind V-ATPasen auch an der Azidifizierung von zytoplasmatischen Vesikeln beteiligt (vgl. Bohrmann und Braun, 1999; Krüger und Bohrmann, 2015; Ulm-

schneider et al., 2016). Folglich ist in Zellen, in denen diese V-ATPase-Aktivität fehlt, die Azidifizierung des endosomalen Kompartiments beeinträchtigt, und die Zellen sind dementsprechend nicht in der Lage, endozytierte Stoffe abzubauen (Vaccari et al., 2010). Auch dies könnte die Degeneration der Follikel in *vha55*-Knockdown-Ovarien erklären, da *Cargo sorting* für verschiedene Entwicklungsprozesse, darunter auch epitheliale Polarisierung und Vitellogenese, von Bedeutung ist (Eaton und Martin-Belmonte, 2014).

4.3.2.3 Mögliche Funktionen der Gap Junction-Proteine Inx1 und Inx3

Der Somaknockdown von *inx1* führte zum vollständigen Verlust der Ovarien. Demnach ist eine Funktion in der somatischen Stammzellbildung sehr wahrscheinlich. In Übereinstimmung damit wird *inx1* vorwiegend in FZ exprimiert (Kap. 1.5.7; Bohrmann und Zimmermann, 2008). Kein vollständiger Verlust, aber größenreduzierte Ovarien waren auch in *inx4*-mutanten Fliegen festzustellen. *Inx4* wird in *Drosophila* für das Überleben von differenzierenden KSZ benötigt (Tazuke et al., 2002; Phelan, 2005). Eine entsprechende Größenabnahme der Ovarien wurde auch infolge des Somaknockdowns von *inx3* beobachtet. Ovariolen waren in diesen *inx3*-Knockdown-Ovarien nicht erkennbar, jedoch vereinzelte Follikel. Daraus lässt sich der Schluss ziehen, dass Inx3 von Bedeutung für die Differenzierung von FZ ist. Ein vergleichbarer Phänotyp, der rudimentäre Ovarien in Verbindung mit einer gestörten Follikelreifung aufweist, wurde auch in Mutanten anderer Gene, z. B. in *stonewall*-mutanten Fliegen, gefunden. Mutationen im Transkriptionsfaktor *stonewall* beeinträchtigen die Erhaltung von weiblichen KSZ und führen so zum Verlust dieser Zellen (Akiyama, 2002).

Entsprechend der vorwiegenden Expression von *inx3* in FZ (Bohrmann und Zimmermann, 2008), waren infolge des Keimbahnknockdowns von *inx3* keine Defekte zu beobachten. Zieht man allerdings in Betracht, dass bioelektrische Signale via Gap Junctions zwischen somatischen Zellen und Keimbahnzellen ausgetauscht werden können (Bohrmann und Haas-Assenbaum, 1993), wäre es durchaus denkbar, dass RNAi-induzierte V_{mem}- und/oder pH_i-Änderungen in angrenzendes Gewebe weitergeleitet werden und dort Einfluss nehmen.

Knockdowns von *inx2* oder *ductin* (*vha16-1*) zeigten keine Effekte auf die Ovar- oder Follikelmorphologie (Kap. 3.3.2 Tabelle 3.5). In vorangegangenen Arbeiten wurde *inx2* hingegen mit Defekten in der Oogenese in Verbindungen gebracht und bezüglich *ductin* die Vermutung aufgestellt, dass die UE c der V-ATPase an der Generierung bioelektrischer Signale beteiligt ist (Bohrmann, 1993; Bohrmann und Zimmermann, 2008; Lautemann und Bohrmann, 2016; Sahu et al., 2017).

Treten in einem RNAi-Screen erwartete Effekte nicht ein, obwohl für entsprechende

Mutanten der Gene Defekte beobachtet wurden, kann dies an den verwendeten RNAi-Stämmen liegen, da auch hinsichtlich der Gene *rpk* und *ork1* nicht alle verwendeten RNAi-Stämme zu Effekten in der Oogenese oder Ovarmorphologie geführt hatten. Tatsächlich fällt auf, dass die stärksten Effekte mit TRiP-RNAi-Stämmen in Kombination mit dem Valium20-Vektor erzielt wurden. Neuere TRiP-RNAi-Konstrukte mit shRNAs nutzen statt des Valium10-Vektors den modifizierten Vektor Valium20. Dieser Vektor der zweiten Generation zeichnet sich sowohl durch einen effektiven Knockdown des Zielgens im Soma als auch in der Keimbahn aus (Ni et al., 2011). Im Vergleich zum ebenfalls in dieser Arbeit verwendeten Valium10-Vektor der ersten Generation oder VDRC-RNAi-Stämmen vermitteln RNAi-Stämme mit Valium20-Vektoren einen effektiveren Knockdown, der zudem den Phänotypen eines genetischen Knockouts ähnelt (Ni et al., 2011; Bartoletti et al., 2017). Auch in der vorliegenden Arbeit waren die robusteren Knockdowns infolge der auf shRNAs basierenden RNAi zu beobachten.

Gene von Ionentransportmechanismen, die nur im Valium10-Vektor verfügbar waren, zeigten keine Knockdown-Effekte im RNAi-Screen. Dies trifft auf die Somaknockdowns der Gene *clc-b*, *ork1* (BL25885) und *nhe1* zu. Putney et al. (2002) weisen NHE1 eine Rolle bei der Kontrolle des pH_i und der Zellvolumenregulation zu. Auch bezüglich *stim* wurde berichtet, dass ein Verlust des Transkripts schwere Flügeldefekte sowie größenreduzierte Flügel verursacht (George et al., 2019). Mutationen in *stim*-Genen werden mit Defekten in der Entwicklung verschiedener Spezies assoziiert (Misceo et al., 2014; George et al., 2019). Dennoch konnten mittels des RNAi-Screens keine Effekte infolge des *stim*-Knockdowns im Ovar detektiert werden.

4.3.3 Fazit: Bedeutung bioelektrischer Signale für die Entwicklung des Ovars und die Oogenese

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Modifikation bioelektrischer Signale über einen RNAi-Knockdown bestimmter Ionentransportmechanismen zu deutlichen Veränderungen in der Organisation des Zytoskeletts im FE führte. Vergleichbar den Zytoskelett-Modifikationen, die mit Hilfe der Inhibitoren herbeigeführt wurden (Weiß und Bohrmann, 2019a; Weiß und Bohrmann, 2019b), oder den veränderten Zytoskeletteigenschaften der Mutante *grk*, wies das Zytoskelett von *ork1*-Knockdown-Follikeln veränderte Zytoskeletteigenschaften auf. Als Folge dieser veränderten Zytoskeletteigenschaften zeichneten sich entsprechende Follikel durch eine veränderte Form aus, welche dem *round-egg*-Phänotyp verschiedener mit dem PCP-Signalweg assoziierter Mutanten ähnelte (Gutzeit et al., 1991; Viktorinová et al., 2009; Horne-Badovinac et al., 2012). Daraus lässt sich die Schlussfolgerung ziehen, dass Ork1 über eine elektrochemische

Regulation des bekannten Fat2-vermittelten PCP-Signalwegs oder eines ebenfalls beteiligten NDR-Signalwegs zur Follikelelongation beiträgt.

Darüberhinaus konnten mit Hilfe des RNAi-Screens einige weitere Ionentransportmechanismen ausfindig gemacht werden, die über V_{mem}- und pH_i-Änderungen im FE die Entwicklung des Ovars und/oder die Oogenese beeinflussen. Einer dieser Ionentransportmechanismen, die DEG/ENaC UE RPK, konnte mit essentiellen Funktionen in der Larvalentwicklung in Verbindung gebracht werden. Eine Rolle bei der Flüssigkeitsverteilung und Zellvolumenregulation während der Gametogenese und frühen Entwicklung könnte die beobachteten Defekte in der Ovarmorphologie und Oogenese erklären. Aufgrund der penetranten Phänotypen in den entsprechenden Knockdowns dieser Ionentransportmechanismen- und Gap Junction-Gene wird die Hypothese aufgestellt, dass die durch den Knockdown induzierte elektrochemische Fehlregulation einen so massiven Einfluss auf die Organisation des Zytoskeletts hat, dass die Differenzierung von z. B. FSZ gestört ist und infolgedessen die Ovarmorphologie und/oder die Follikelentwicklung grundlegend beeinträchtigt sind. Beobachtete Phänotypen in *vha55*-Knockdown-Ovarien weisen sowohl auf Defekte bei der Osmoregulation und dem Follikelwachstum durch Wasseraufnahme als auch auf eine gestörte Azidifizierung von zytoplasmatischen Vesikeln hin. Bezüglich der Gap Junction-Proteine Inx1 und Inx3 deuten die beobachteten Effekte des Knockdowns auf eine Fehlfunktion in der somatischen Stammzellbildung bzw. bei der Differenzierung von FZ hin.

4.4 Ausblick

Nachdem die Bedeutung bioelektrischer Signale für die Oogenese und andere Entwicklungsprozesse immer deutlicher wird, sollte der Fokus zukünftiger Untersuchungen auf der Identifizierung elektrochemisch regulierter Signalwege in der Oogenese liegen. In dieser Arbeit identifizierte Ionentransportmechanismen, die über V_{mem}- und pH_i-Änderungen im FE die Entwicklung des Ovars und/oder die Oogenese beeinflussten, wie auch mit diesen in Verbindung gebrachte Funktionen in der Entwicklung des Ovars und in der Oogenese, könnten vielversprechende Ausgangspunkte für weitere Analysen sein. Dabei könnte es hilfreich sein, die Expression der identifizierten Ionentransportmechanismen mit Hilfe von spezifischen Antikörpern im FE zu analysieren, um den Funktionen von Ork1, RPK und Vha55 in der Ovarentwicklung und Oogenese näher zu kommen. Änderungen der bioelektrischen Eigenschaften, wie sie durch die Inhibition von Ionentransportmechanismen induziert wurden, konnten durch den RNAi-Screen nicht direkt belegt werden. Daher sollten erneut TRiP-Stämme dieser Gene in Verbindung mit schwächeren Somatreibern (schwächer als der *tj*-Gal4-Treiber), die es even-

tuell ermöglichen V_{mem}- und pH_i-Änderungen direkt nachzuweisen, in einem weiteren RNAi-Screen untersucht werden.

Der RNAi-Screen lieferte jedoch eindeutige Hinweise auf eine Funktion von *ork1* im Fat2-vermittelten PCP-Signalweg, der zur Elongation des Follikels beiträgt. Damit deuten die Ergebnisse dieser Arbeit erstmalig auf einen Zusammenhang zwischen einem spezifischen Ionentransportmechanismus und der Etablierung von PCP im FE von *Drosophila* hin. Dieser mögliche Zusammenhang sollte in nachfolgenden Analysen weiter untersucht werden. Einige der im RNAi-Screen still gelegten Gene zeigten keine Effekte auf die Ovar- oder Follikelmorphologie. In vorangegangenen Arbeiten wurden diese Ionentransportmechanismen- und Gap Junction-Gene jedoch mit Funktionen in der Oogenese in Verbindung gebracht. Für eine Identifizierung elektrochemisch regulierter Signalwege ist es sinnvoll, auch bezüglich dieser Gene weitere Knockdown-Stämme auf eine mögliche Funktion in der Oogenese hin zu untersuchen.

Literatur

Adams, C. M., M. G. Anderson, D. G. Motto, M. P. Price, W. A. Johnson und M. J. Welsh (1998). Ripped Pocket and Pickpocket, novel *Drosophila* DEG/ENaC subunits expressed in early development and in mechanosensory neurons. J. Cell Biol. 140.1, 143–152.

Adams, D. S. und M. Levin (2012). Measuring resting membrane potential using the fluorescent voltage reporters $DiBAC_4(3)$ and CC2-DMPE. Cold Spring Harb. Protoc. 4, 459–464.

– (2013). Endogenous voltage gradients as mediators of cell-cell communication: strategies for investigating bioelectrical signals during pattern formation. Cell Tissue Res. 352.1, 95–122.

Adams, D. S., S. G. M. Uzel, J. Akagi, D. Wlodkowic, V. Andreeva, P. C. Yelick, A. Devitt-Lee, J.-F. Pare und M. Levin (2016). Bioelectric signalling via potassium channels: A mechanism for craniofacial dysmorphogenesis in KCNJ2-associated Andersen-Tawil syndrome. J. Physiol. (London, U. K.) 594.12, 3245–3270.

Adler, P. N. (2002). Planar signaling and morphogenesis in *Drosophila*. Dev. Cell 2.5, 525–535.

Aguilar-Bryan, L., J. P. Clement, G. Gonzalez, K. Kunjilwar, A. Babenko und J. Bryan (1998). Toward understanding the assembly and structure of K_{ATP} channels. Physiol. Rev. 78.1, 227–245.

Akiyama, T. (2002). Mutations of *stonewall* disrupt the maintenance of female germline stem cells in *Drosophila melanogaster*. Dev. Growth Differ. 44.2, 97–102.

Allan, A. K., J. Du, S. A. Davies und J. A. T. Dow (2005). Genome-wide survey of V-ATPase genes in *Drosophila* reveals a conserved renal phenotype for lethal alleles. Physiol. Genomics 22.2, 128–138.

Amiri, A. und D. Stein (2002). Dorsoventral Patterning: A direct route from ovary to embryo. Curr. Biol. 12.15, R532–R534.

Ashburner, M., K. G. Golic und R. S. Hawley (2005). *Drosophila*: A laboratory handbook. 2nd. Edition. New York, U.S.A.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Ashcroft, F. M. (1988). Adenosine 5'-triphosphate-sensitive potassium channels. Annu. Rev. Neurosci. 11, 97–118.

Atsuta, Y., R. R. Tomizawa, M. Levin und C. J. Tabin (2019). L-type voltage-gated Ca^{2+} channel $Ca_V1.2$ regulates chondrogenesis during limb development. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 116.43, 21592–21601.

Aurich, F. (2017). Analysis of the role of the atypical cadherin Fat2 during tissue elongation in the developing ovary of *Drosophila melanogaster*. Diss. Dresden: Technische Universität Dresden.

Aurich, F. und C. Dahmann (2016). A mutation in *fat2* uncouples tissue elongation from global tissue rotation. Cell Rep. 14.11, 2503–2510.

Aw, S., J. C. Koster, W. Pearson, C. G. Nichols, N.-Q. Shi, K. Carneiro und M. Levin (2010). The ATP-sensitive K^+-channel (K_{ATP}) controls early left-right patterning in *Xenopus* and chick embryos. Dev. Biol. 346.1, 39–53.

Babenko, A. P., L. Aguilar-Bryan und J. Bryan (1998). A view of sur/K_{IR}6.X, K_{ATP} channels. Annu. Rev. Physiol. 60, 667–687.

Ball, A. J., P. R. Flatt und N. H. McClenaghan (2000). Desensitization of sulphonylurea- and nutrient-induced insulin secretion following prolonged treatment with glibenclamide. Eur. J. Pharmacol. 408.3, 327–333.

Bartoletti, R., B. Capozzoli, J. Moore, J. Moran, B. Shrawder und P. Vivekanand (2017). Short hairpin RNA is more effective than long hairpin RNA in eliciting pointed loss-of-function phenotypes in *Drosophila*. Genesis 55.7.

Bateman, J., R. Reddy, H. Saito und D. van Vactor (2001). The receptor tyrosine phosphatase Dlar and integrins organize actin filaments in the *Drosophila* follicular epithelium. Curr. Biol. 11.17, 1317–1327.

Bates, E. A. (2013). A potential molecular target for morphological defects of fetal alcohol syndrome: Kir2.1. Curr. Opin. Genet. Dev. 23.3, 324–329.

Bauer, R., B. Löer, K. Ostrowski, J. Martini, A. Weimbs, H. Lechner und M. Hoch (2005). Intercellular communication: The *Drosophila* innexin multiprotein family of gap junction proteins. Chem. Biol. (Oxford, U. K.) 12.5, 515–526.

Beane, W. S., J. Morokuma, D. S. Adams und M. Levin (2011). A chemical genetics approach reveals H,K-ATPase-mediated membrane voltage is required for planarian head regeneration. Chem. Biol. (Oxford, U. K.) 18.1, 77–89.

Beane, W. S., J. Morokuma, J. M. Lemire und M. Levin (2013). Bioelectric signaling regulates head and organ size during planarian regeneration. Development (Cambridge, U. K.) 140.2, 313–322.

Benitez, M., S. Tatapudy, Y. Liu, D. L. Barber und T. G. Nystul (2019). *Drosophila* anion exchanger 2 is required for proper ovary development and oogenesis. Dev. Biol. 452.2, 127–133.

Bernard, F., J.-A. Lepesant und A. Guichet (2018). Nucleus positioning within *Drosophila* egg chamber. Semin. Cell Dev. Biol. 82, 25–33.

Berridge, M. J., P. Lipp und M. D. Bootman (2000). The versatility and universality of calcium signalling. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 1.1, 11–21.

Bohrmann, J. (1991a). In vitro culture of *Drosophila* ovarian follicles: The influence of different media on development, RNA synthesis, protein synthesis and potassium uptake. Rouxs Arch. Dev. Biol. 199.6, 315–326.

– (1991b). Potassium uptake into *Drosophila* ovarian follicles: Relevance to physiological and developmental processes. J. Insect Physiol. 37.12, 937–946.

– (1993). Antisera against a channel-forming 16 kDa protein inhibit dye-coupling and bind to cell membranes in *Drosophila* ovarian follicles. J. Cell Sci. 105.2, 513–518.

Bohrmann, J. und B. Braun (1999). Na,K-ATPase and V-ATPase in ovarian follicles of *Drosophila melanogaster*. Biol. Cell 91.2, 85–98.

Bohrmann, J., A. Dorn, K. Sander und H. Gutzeit (1986a). The extracellular electrical current pattern and its variability in vitellogenic *Drosophila* follicles. J. Cell Sci. 81, 189–206.

Bohrmann, J., A. Frey und H. O. Gutzeit (1992). Observations on the polarity of mutant *Drosophila* follicles lacking the oocyte. Rouxs Arch. Dev. Biol. 201.5, 268–274.

Bohrmann, J. und H. Gutzeit (1987). Evidence against electrophoresis as the principal mode of protein transport in vitellogenic ovarian follicles of *Drosophila*. Development (Cambridge, U. K.) 101.2, 279–288.

Bohrmann, J. und A. Haas-Assenbaum (1993). Gap junctions in ovarian follicles of *Drosophila melanogaster*: Inhibition and promotion of dye-coupling between oocyte and follicle cells. Cell Tissue Res. 273.1, 163–173.

Bohrmann, J., E. Huebner, K. Sander und H. Gutzeit (1986b). Intracellular electrical potential measurements in *Drosophila* follicles. J. Cell Sci. 81, 207–221.

Bohrmann, J. und H. Lämmel (1998). Microinjected antisera against ductin affect gastrulation in *Drosophila melanogaster*. Int. J. Dev. Biol. 42.5, 709–721.

Bohrmann, J. und J. Zimmermann (2008). Gap junctions in the ovary of *Drosophila melanogaster*: localization of innexins 1, 2, 3 and 4 and evidence for intercellular communication via innexin-2 containing channels. BMC Dev. Biol. 8, 111.

Brand, A. H. und N. Perrimon (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. Development (Cambridge, U. K.) 118.2, 401–415.

Bratu, D. P. und G. P. McNeil, Hrsg. (2015). *Drosophila* oogenesis: Methods and protocols. Bd. 1328. Springer protocols. New York, U.S.A.: Springer.

Busa, W. B. (1986). Mechanisms and consequences of pH-mediated cell regulation. Annu. Rev. Physiol. 48, 389–402.

Cáceres, L. und L. A. Nilson (2005). Production of *gurken* in the nurse cells is sufficient for axis determination in the *Drosophila* oocyte. Development (Cambridge, U. K.) 132.10, 2345–2353.

Callies, C., J. Fels, I. Liashkovich, K. Kliche, P. Jeggle, K. Kusche-Vihrog und H. Oberleithner (2011). Membrane potential depolarization decreases the stiffness of vascular endothelial cells. J. Cell Sci. 124.11, 1936–1942.

Campetelli, A., D. Bonazzi und N. Minc (2012). Electrochemical regulation of cell polarity and the cytoskeleton. Cytoskeleton (Hoboken) 69.9, 601–612.

Cantero, M. D. R., P. L. Perez, M. Smoler, C. Villa Etchegoyen und H. F. Cantiello (2016). Electrical oscillations in two-dimensional microtubular structures. Sci. Rep. 6, 27143.

Cao, G., J. Platisa, V. A. Pieribone, D. Raccuglia, M. Kunst und M. N. Nitabach (2013). Genetically targeted optical electrophysiology in intact neural circuits. Cell 154.4, 904–913.

Cavaliere, V., F. Bernardi, P. Romani, S. Duchi und G. Gargiulo (2008). Building up the *Drosophila* eggshell: First of all the eggshell genes must be transcribed. Dev. Dyn. 237.8, 2061–2072.

Cervera, J., M. Levin und S. Mafe (2020). Bioelectrical coupling of single-cell states in multicellular systems. J. Phys. Chem. Lett., 3234–3241.

Cervera, J., A. Pietak, M. Levin und S. Mafe (2018). Bioelectrical coupling in multicellular domains regulated by gap junctions: A conceptual approach. Bioelectrochemistry 123, 45–61.

Cetera, M., G. R. Ramirez-San J., P. W. Oakes, L. Lewellyn, M. J. Fairchild, G. Tanentzapf, M. L. Gardel und S. Horne-Badovinac (2014). Epithelial rotation promotes the global alignment of contractile actin bundles during *Drosophila* egg chamber elongation. Nat. Commun. 5, 5511.

Chang, F. und N. Minc (2014). Electrochemical control of cell and tissue polarity. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 30, 317–336.

Chifflet, S. und J. A. Hernández (2012). The plasma membrane potential and the organization of the actin cytoskeleton of epithelial cells. Int. J. Cell Biol. 2012.

Chifflet, S., J. A. Hernández, S. Grasso und A. Cirillo (2003). Nonspecific depolarization of the plasma membrane potential induces cytoskeletal modifications of bovine corneal endothelial cells in culture. Exp. Cell Res. 282.1, 1–13.

Chintapalli, V. R., J. Wang, P. Herzyk, S. A. Davies und J. A. T. Dow (2013). Data-mining the FlyAtlas online resource to identify core functional motifs across transporting epithelia. BMC Genomics 14.518.

Cho, M. R., H. S. Thatte, M. T. Silvia und D. E. Golan (1999). Transmembrane calcium influx induced by ac electric fields. FASEB J. 13.6, 677–683.

Clapham, D. E. (2007). Calcium signaling. Cell 131.6, 1047–1058.

Clement, J. P., K. Kunjilwar, G. Gonzalez, M. Schwanstecher, U. Panten, L. Aguilar-Bryan und J. Bryan (1997). Association and stoichiometry of K_{ATP} channel subunits. Neuron 18.5, 827–838.

Cook, K. R., A. L. Parks, L. M. Jacobus, T. C. Kaufman und K. A. Matthews (2010). New research resources at the Bloomington Drosophila Stock Center. Fly 4.1, 88–91.

Dahal, G. R., S. J. Pradhan und E. A. Bates (2017). Inwardly rectifying potassium channels influence *Drosophila* wing morphogenesis by regulating Dpp release. Development (Cambridge, U. K.) 144.15, 2771–2783.

Dahal, G. R., J. Rawson, B. Gassaway, B. Kwok, Y. Tong, L. J. Ptácek und E. Bates (2012). An inwardly rectifying K^+ channel is required for patterning. Development (Cambridge, U. K.) 139.19, 3653–3664.

Darboux, I., E. Lingueglia, G. Champigny, S. Coscoy, P. Barbry und M. Lazdunski (1998). dGNaC1, a gonad-specific amiloride-sensitive Na^+ channel. J. Biol. Chem. 273.16, 9424–9429.

Davies, S. A., S. F. Goodwin, D. C. Kelly, Z. Wang, M. A. Sozen, K. Kaiser und J. A. Dow (1996). Analysis and inactivation of *vha55*, the gene encoding the vacuolar ATPase B-subunit in *Drosophila melanogaster* reveals a larval lethal phenotype. J. Biol. Chem. 271.48, 30677–30684.

Decotto, E. und A. C. Spradling (2005). The *Drosophila* ovarian and testis stem cell niches: Similar somatic stem cells and signals. Dev. Cell 9.4, 501–510.

Dietzl, G., D. Chen, F. Schnorrer, K.-C. Su, Y. Barinova, M. Fellner, B. Gasser, K. Kinsey, S. Oppel, S. Scheiblauer, A. Couto, V. Marra, K. Keleman und B. J. Dickson (2007). A genome-wide transgenic RNAi library for conditional gene inactivation in *Drosophila*. Nature 448.7150, 151–156.

Dimitrov, D., Y. He, H. Mutoh, B. J. Baker, L. Cohen, W. Akemann und T. Knöpfel (2007). Engineering and characterization of an enhanced fluorescent protein voltage sensor. PLoS One 2.5, e440.

Doerflinger, H., R. Benton, J. M. Shulman und D. St Johnston (2003). The role of PAR-1 in regulating the polarised microtubule cytoskeleton in the *Drosophila* follicular epithelium. Development (Cambridge, U. K.) 130.17, 3965–3975.

Döring, F., E. Wischmeyer, R. P. Kühnlein, H. Jäckle und A. Karschin (2002). Inwardly rectifying K^+ (Kir) channels in *Drosophila*. A crucial role of cellular milieu factors Kir channel function. J. Biol. Chem. 277.28, 25554–25561.

Dow, J. A. (1999). The multifunctional *Drosophila melanogaster* V-ATPase is encoded by a multigene family. J. Bioenerg. Biomembr. 31.1, 75–83.

Dow, J. A., S. A. Davies, Y. Guo, S. Graham, M. E. Finbow und K. Kaiser (1997). Molecular genetic analysis of V-ATPase function in *Drosophila melanogaster*. J. Exp. Biol. 200.2, 237–245.

Drummond-Barbosa, D. und A. C. Spradling (2004). Alpha-endosulfine, a potential regulator of insulin secretion, is required for adult tissue growth control in *Drosophila*. Dev. Biol. 266.2, 310–321.

Du, J., L. Kean, A. K. Allan, T. D. Southall, S. A. Davies, C. J. McInerny und J. A. T. Dow (2006). The *SzA* mutations of the B subunit of the *Drosophila* vacuolar H^+ ATPase identify conserved residues essential for function in fly and yeast. J. Cell Sci. 119.12, 2542–2551.

Duchek, P. und P. Rørth (2001). Guidance of cell migration by EGF receptor signaling during *Drosophila* oogenesis. Science (New York, N.Y.) 291.5501, 131–133.

Duffy, J. B. (2002). GAL4 system in *Drosophila*: A fly geneticist's Swiss army knife. Genesis 34.1-2, 1–15.

Duhart, J. C., T. T. Parsons und L. A. Raftery (2017). The repertoire of epithelial morphogenesis on display: Progressive elaboration of *Drosophila* egg structure. Mech. Dev. 148, 18–39.

Eaton, S. und F. Martin-Belmonte (2014). Cargo sorting in the endocytic pathway: A key regulator of cell polarity and tissue dynamics. Cold Spring Harbor Perspect. Biol. 6.10, a016899.

Eid, J.-P., A. M. Arias, H. Robertson, G. R. Hime und M. Dziadek (2008). The *Drosophila* STIM1 orthologue, dSTIM, has roles in cell fate specification and tissue patterning. BMC Dev. Biol. 8.104.

Emmons-Bell, M., F. Durant, J. Hammelman, N. Bessonov, V. Volpert, J. Morokuma, K. Pinet, D. S. Adams, A. Pietak, D. Lobo und M. Levin (2015). Gap junctional blockade stochastically induces different species-specific head anatomies in genetically wild-type *girardia dorotocephala* flatworms. Int. J. Mol. Sci. 16.11, 27865–27896.

Fahlke, C., C. L. Beck und A. L. George (1997). A mutation in autosomal dominant myotonia congenita affects pore properties of the muscle chloride channel. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 94.6, 2729–2734.

Finbow, M. E., M. Harrison und P. Jones (1995). Ductin–a proton pump component, a gap junction channel and a neurotransmitter release channel. Bioessays 17.3, 247–255.

Fisher, S. E., G. C. Black, S. E. Lloyd, E. Hatchwell, O. Wrong, R. V. Thakker und I. W. Craig (1994). Isolation and partial characterization of a chloride channel gene which is expressed in kidney and is a candidate for Dent's disease (an X-linked hereditary nephrolithiasis). Hum. Mol. Genet. 3.11, 2053–2059.

Fishilevich, E., J. A. J. Fitzpatrick und J. S. Minden (2010). pHMA, a pH-sensitive GFP reporter for cell engulfment, in *Drosophila* embryos, tissues, and cells. Dev. Dyn. 239.2, 559–573.

Frydman, H. M. und A. C. Spradling (2001). The receptor-like tyrosine phosphatase Lar is required for epithelial planar polarity and for axis determination within *Drosophila* ovarian follicles. Development (Cambridge, U. K.) 128.16, 3209–3220.

Gates, J. (2012). *Drosophila* egg chamber elongation: Insights into how tissues and organs are shaped. Fly 6.4, 213–227.

George, L. F., S. J. Pradhan, D. Mitchell, M. Josey, J. Casey, M. T. Belus, K. N. Fedder, G. R. Dahal und E. A. Bates (2019). Ion channel contributions to wing development in *Drosophila melanogaster*. G3: Genes, Genomes, Genet. 9.4, 999–1008.

Giannakou, M. E. und J. A. Dow (2001). Characterization of the *Drosophila melanogaster* alkali-metal/proton exchanger (NHE) gene family. J. Exp. Biol. 204.21, 3703–3716.

Gilbert, S. F., S. R. Singer und M. S. Tyler (2006). Developmental biology. 8th. Edition., 2nd Print. Sunderland, U.S.A.: Sinauer Associates, Inc.

Gilboa, L., A. Forbes, S. I. Tazuke, M. T. Fuller und R. Lehmann (2003). Germ line stem cell differentiation in *Drosophila* requires gap junctions and proceeds via an intermediate state. Development (Cambridge, U. K.) 130.26, 6625–6634.

Giorgi, F. und J. H. Postlethwait (1985). Development of gap junctions in normal and mutant ovaries of *Drosophila melanogaster*. J. Morphol. 185.1, 115–129.

Godt, D. und F. A. Laski (1995). Mechanisms of cell rearrangement and cell recruitment in *Drosophila* ovary morphogenesis and the requirement of bric à brac. Development (Cambridge, U. K.) 121.1, 173–187.

Goldstein, S. A., L. A. Price, D. N. Rosenthal und M. H. Pausch (1996). ORK1, a potassium-selective leak channel with two pore domains cloned from *Drosophila melanogaster* by expression in *Saccharomyces cerevisiae*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 93.23, 13256–13261.

González-Reyes, A. und D. St Johnston (1998). Patterning of the follicle cell epithelium along the anterior-posterior axis during *Drosophila* oogenesis. Development (Cambridge, U. K.) 125, 2837–2846.

González-Reyes, A., H. Elliott und D. St Johnston (1995). Polarization of both major body axes in *Drosophila* by *gurken-torpedo* signalling. Nature 375.6533, 654–658.

Gruhlke, M. C. H., D. Portz, M. Stitz, A. Anwar, T. Schneider, C. Jacob, N. L. Schlaich und A. J. Slusarenko (2010). Allicin disrupts the cell's electrochemical potential and induces apoptosis in yeast. Free Radical Biol. Med. 49.12, 1916–1924.

Guichet, A., F. Peri und S. Roth (2001). Stable anterior anchoring of the oocyte nucleus is required to establish dorsoventral polarity of the *Drosophila* egg. Dev. Biol. 237.1, 93–106.

Gutzeit, H. O. (1990). The microfilament pattern in the somatic follicle cells of mid-vitellogenic ovarian follicles of *Drosophila*. Eur. J. Cell Biol. 53.2, 349–356.

Gutzeit, H. O., W. Eberhardt und E. Gratwohl (1991). Laminin and basement membrane-associated microfilaments in wild-type and mutant. J. Cell Sci. 100.4, 781–788.

Gutzeit, H. (1986). The role of microtubules in the differentiation of ovarian follicles during vitellogenesis in *Drosophila*. Rouxs Arch. Dev. Biol. 195.3, 173–181.

Haas, M. (1994). The Na-K-Cl cotransporters. Am. J. Physiol. 267.4, C869–85.

Haigo, S. L. und D. Bilder (2011). Global tissue revolutions in a morphogenetic movement controlling elongation. Science (New York, N.Y.) 331.6020, 1071–1074.

Han, J. und K. Burgess (2010). Fluorescent indicators for intracellular pH. Chem. Rev. 110.5, 2709–2728.

Harguindey, S., S. J. Reshkin, G. Orive, J. L. Arranz und E. Anitua (2007). Growth and trophic factors, pH and the Na^+/H^+ exchanger in Alzheimer's disease, other neurodegenerative diseases and cancer: New therapeutic possibilities and potential dangers. Curr. Alzheimer Res. 4.1, 53–65.

Hermle, T., D. Saltukoglu, J. Grünewald, G. Walz und M. Simons (2010). Regulation of Frizzled-dependent planar polarity signaling by a V-ATPase subunit. Curr. Biol. 20.14, 1269–1276.

Hervé, J.-C., M. Derangeon, D. Sarrouilhe, B. N. G. Giepmans und N. Bourmeyster (2012). Gap junctional channels are parts of multiprotein complexes. Biochim. Biophys. Acta 1818.8, 1844–1865.

Hockerman, G. H., B. Z. Peterson, B. D. Johnson und W. A. Catterall (1997). Molecular determinants of drug binding and action on L-type calcium channels. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 37, 361–396.

Hoffmann, E. K. (1982). Anion exchange and anion-cation co-transport systems in mammalian cells. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 299.1097, 519–535.

Horne-Badovinac, S., J. Hill, G. Gerlach, W. Menegas und D. Bilder (2012). A screen for round egg mutants in *Drosophila* identifies Tricornered, Furry, and Misshapen as regulators of egg chamber elongation. G3: Genes, Genomes, Genet. 2.3, 371–378.

Inagaki, N., T. Gonoi, J. P. Clement, N. Namba, J. Inazawa, G. Gonzalez, L. Aguilar-Bryan, S. Seino und J. Bryan (1995). Reconstitution of I_{KATP}: An inward rectifier subunit plus the sulfonylurea receptor. Science (New York, N.Y.) 270.5239, 1166–1170.

Jentsch, T. J., V. Stein, F. Weinreich und A. A. Zdebik (2002). Molecular structure and physiological function of chloride channels. Physiol. Rev. 82.2, 503–568.

Kellenberger, S. und L. Schild (2002). Epithelial sodium channel/degenerin family of ion channels: A variety of functions for a shared structure. Physiol. Rev. 82.3, 735–767.

Ketchum, K. A., W. J. Joiner, A. J. Sellers, L. K. Kaczmarek und S. A. Goldstein (1995). A new family of outwardly rectifying potassium channel proteins with two pore domains in tandem. Nature 376.6542, 690–695.

King, R. C. (1970). Ovarian development in *Drosophila melanogaster*. New York: Academic Press.

King, R. C., S. K. Aggarwal und U. Aggarwal (1968). The development of the female *Drosophila* reproductive system. J. Morphol. 124.2, 143–166.

Krüger, J. (2014). Bioelektrische Phänomene im Ovar von *Drosophila melanogaster*: Stadienspezifische Verteilungsmuster von Membranpotential, pH-Wert und Membrankanalproteinen sowie deren Wechselwirkungen. Diss. Aachen: RWTH Aachen.

Krüger, J. und J. Bohrmann (2015). Bioelectric patterning during oogenesis: Stage-specific distribution of membrane potentials, intracellular pH and ion-transport mechanisms in *Drosophila* ovarian follicles. BMC Dev. Biol. 15, 1.

Kulkarni, R. U. und E. W. Miller (2017). Voltage Imaging: Pitfalls and Potential. Biochemistry 56.39, 5171–5177.

Kume, S., A. Muto, T. Inoue, K. Suga, H. Okano und K. Mikoshiba (1997). Role of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in ventral signaling in *Xenopus* embryos. Science (New York, N.Y.) 278.5345, 1940–1943.

Lalevée, N., B. Monier, S. Sénatore, L. Perrin und M. Sémériva (2006). Control of cardiac rhythm by ORK1, a *Drosophila* two-pore domain potassium channel. Curr. Biol. 16.15, 1502–1508.

Lautemann, J. und J. Bohrmann (2016). Relating proton pumps with gap junctions: colocalization of ductin, the channel-forming subunit c of V-ATPase, with subunit a and with innexins 2 and 3 during *Drosophila* oogenesis. BMC Dev. Biol. 16.1, 24.

Levin, M. (2007). Gap junctional communication in morphogenesis. Prog. Biophys. Mol. Biol. 94.1-2, 186–206.

– (2014a). Endogenous bioelectrical networks store non-genetic patterning information during development and regeneration. J. Physiol. (London, U. K.) 592.11, 2295–2305.

– (2014b). Molecular bioelectricity: how endogenous voltage potentials control cell behavior and instruct pattern regulation in vivo. Mol. Biol. Cell 25.24, 3835–3850.

Levin, M., T. Thorlin, K. R. Robinson, T. Nogi und M. Mercola (2002). Asymmetries in H^+/K^+-ATPase and cell membrane potentials comprise a very early step in left-right patterning. Cell 111.1, 77–89.

Lin, M. Z. und M. J. Schnitzer (2016). Genetically encoded indicators of neuronal activity. Nat. Neurosci. 19.9, 1142–1153.

Littleton, J. und B. Ganetzky (2000). Ion channels and synaptic organization. Neuron 26.1, 35–43.

Mahon, M. J. (2011). pHluorin2: an enhanced, ratiometric, pH-sensitive green florescent protein. Adv. Biosci. Biotechnol. 2.3, 132–137.

Mahowald, A. P. und M. P. Kambysellis (1980). Oogenesis. In: M. Ashburner und T. R. F. Wright, Hrsg. Genetics and Biology of *Drosophila*. New York, London: Academic Press, 141–224.

Mano, I. und M. Driscoll (1999). DEG/ENaC channels: A touchy superfamily that watches its salt. Bioessays 21.7, 568–578.

Margolis, J. und A. Spradling (1995). Identification and behavior of epithelial stem cells in the *Drosophila* ovary. Development (Cambridge, U. K.) 121.11, 3797–3807.

Marx, A., J. Müller, E.-M. Mandelkow, A. Hoenger und E. Mandelkow (2006). Interaction of kinesin motors, microtubules, and MAPs. J. Muscle Res. Cell Motil. 27.2, 125–137.

Marygold, S. J., M. A. Crosby und J. L. Goodman (2016). Using FlyBase, a database of *Drosophila* genes and genomes. Methods Mol. Biol. 1478, 1–31.

Masotti, A., P. Uva, L. Davis-Keppen, L. Basel-Vanagaite, L. Cohen, E. Pisaneschi, A. Celluzzi, P. Bencivenga, M. Fang, M. Tian, X. Xu, M. Cappa und B. Dallapiccola (2015). Keppen-Lubinsky syndrome is caused by mutations in the inwardly rectifying K^+ channel encoded by *KCNJ6*. Am. J. Hum. Genet. 96.2, 295–300.

Mathews, J. und M. Levin (2017). Gap junctional signaling in pattern regulation: Physiological network connectivity instructs growth and form. Dev. Neurobiol. 77.5, 643–673.

Maxson, M. E. und S. Grinstein (2014). The vacuolar-type H^+-ATPase at a glance - more than a proton pump. J. Cell Sci. 127.23, 4987–4993.

McLaughlin, K. A. und M. Levin (2018). Bioelectric signaling in regeneration: Mechanisms of ionic controls of growth and form. Dev. Biol. 433.2, 177–189.

Miesenböck, G., D. A. de Angelis und J. E. Rothman (1998). Visualizing secretion and synaptic transmission with pH-sensitive green fluorescent proteins. Nature 394.6689, 192–195.

Misceo, D., A. Holmgren, W. E. Louch, P. A. Holme, M. Mizobuchi, R. J. Morales, A. M. de Paula, A. Stray-Pedersen, R. Lyle, B. Dalhus, G. Christensen, H. Stormorken, G. E. Tjønnfjord und E. Frengen (2014). A dominant *STIM1* mutation causes Stormorken syndrome. Hum. Mutat. 35.5, 556–564.

Mlodzik, M. (2002). Planar cell polarization: Do the same mechanisms regulate *Drosophila* tissue polarity and vertebrate gastrulation? Trends Genet. 18.11, 564–571.

Montell, D. J. (2003). Border-cell migration: The race is on. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 4.1, 13–24.

Montell, D. J., P. Rorth und A. C. Spradling (1992). *Slow border cells*, a locus required for a developmentally regulated cell migration during oogenesis, encodes *Drosophila* CEBP. Cell 71.1, 51–62.

Moreno, S. N., L. Zhong, H. G. Lu, W. D. Souza und M. Benchimol (1998). Vacuolar-type H^+-ATPase regulates cytoplasmic pH in *Toxoplasma gondii* tachyzoites. Biochem. J. 330, 853–860.

Moussian, B. und S. Roth (2005). Dorsoventral axis formation in the *Drosophila* embryo–shaping and transducing a morphogen gradient. Curr. Biol. 15.21, R887–899.

Munley, S. M., S. Kinzeler, R. Lizzano und R. I. Woodruff (2009). Fractional contribution of major ions to the membrane potential of *Drosophila melanogaster* oocytes. Arch. Insect Biochem. Physiol. 70.4, 230–243.

Nasonkin, I., A. Alikasifoglu, C. Ambrose, P. Cahill, M. Cheng, A. Sarniak, M. Egan und P. M. Thomas (1999). A novel sulfonylurea receptor family member expressed in the embryonic *Drosophila* dorsal vessel and tracheal system. J. Biol. Chem. 274.41, 29420–29425.

Neuman-Silberberg, F. S. und T. Schüpbach (1993). The *Drosophila* dorsoventral patterning gene *gurken* produces a dorsally localized RNA and encodes a TGF alpha-like protein. Cell 75.1, 165–174.

– (1994). Dorsoventral axis formation in *Drosophila* depends on the correct dosage of the gene *gurken*. Development (Cambridge, U. K.) 120.9, 2457–2463.

– (1996). The *Drosophila* TGF-alpha-like protein Gurken: Expression and cellular localization during *Drosophila* oogenesis. Mech. Dev. 59.2, 105–113.

Nezis, I. P. (2016). Oogenesis: Methods and protocols: Antibody Staining in *Drosophila* Germaria. Bd. 1457. Methods in molecular biology. New York, U.S.A.: Humana Press.

Ni, J.-Q., M. Markstein, R. Binari, B. Pfeiffer, L.-P. Liu, C. Villalta, M. Booker, L. Perkins und N. Perrimon (2008). Vector and parameters for targeted transgenic RNA interference in *Drosophila melanogaster*. Nat. Methods 5.1, 49–51.

Ni, J.-Q., R. Zhou, B. Czech, L.-P. Liu, L. Holderbaum, D. Yang-Zhou, H.-S. Shim, R. Tao, D. Handler, P. Karpowicz, R. Binari, M. Booker, J. Brennecke, L. A. Perkins, G. J. Hannon und N. Perrimon (2011). A genome-scale shRNA resource for transgenic RNAi in *Drosophila*. Nat. Methods 8.5, 405–407.

Nilson, L. A. und T. Schüpbach (1999). EGF receptor signaling in *Drosophila* oogenesis. Curr. Top. Dev. Biol. 44, 203–243.

Osterwalder, T., K. S. Yoon, B. H. White und H. Keshishian (2001). A conditional tissue-specific transgene expression system using inducible GAL4. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 98.22, 12596–12601.

Overall, R. und L. F. Jaffe (1985). Patterns of ionic current through *Drosophila* follicles and eggs. Dev. Biol. 108.1, 102–119.

Pai, V. P., S. Aw, T. Shomrat, J. M. Lemire und M. Levin (2012). Transmembrane voltage potential controls embryonic eye patterning in *Xenopus laevis*. Development (Cambridge, U. K.) 139.2, 313–323.

Pai, V. P., J. M. Lemire, J.-F. Paré, G. Lin, Y. Chen und M. Levin (2015). Endogenous gradients of resting potential instructively pattern embryonic neural tissue via Notch signaling and regulation of proliferation. J. Neurosci. 35.10, 4366–4385.

Phelan, P. (2005). Innexins: Members of an evolutionarily conserved family of gap-junction proteins. Biochim. Biophys. Acta 1711.2, 225–245.

Pietak, A. und M. Levin (2018). Bioelectrical control of positional information in development and regeneration: A review of conceptual and computational advances. Prog. Biophys. Mol. Biol. 137, 52–68.

Plaster, N. M., R. Tawil, M. Tristani-Firouzi, S. Canún, S. Bendahhou, A. Tsunoda, M. R. Donaldson, S. T. Iannaccone, E. Brunt, R. Barohn, J. Clark, F. Deymeer, A. L. George, F. A. Fish, A. Hahn, A. Nitu, C. Ozdemir, P. Serdaroglu, S. H. Subramony, G. Wolfe, Y. H. Fu und L. J. Ptácek (2001). Mutations in Kir2.1 cause the developmental and episodic electrical phenotypes of Andersen's syndrome. Cell 105.4, 511–519.

Priel, A., A. J. Ramos, J. A. Tuszynski und H. F. Cantiello (2006). A biopolymer transistor: Electrical amplification by microtubules. Biophys. J. 90.12, 4639–4643.

Putney, L. K., S. P. Denker und D. L. Barber (2002). The changing face of the Na^+/H^+ exchanger, NHE1: Structure, regulation, and cellular actions. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 42, 527–552.

Rakotoarisoa, L., I. Sayet, C. Mironneau und J. Mironneau (1990). Selective modulation by membrane potential of desmethoxyverapamil binding to calcium channels in rat portal vein. J. Pharmacol. Exp. Ther. 255.3, 942–947.

Ray, R. P. und T. Schüpbach (1996). Intercellular signaling and the polarization of body axes during *Drosophila* oogenesis. Genes Dev. 10.14, 1711–1723.

Regula, C. S., J. R. Pfeiffer und R. D. Berlin (1981). Microtubule assembly and disassembly at alkaline pH. J. Cell Biol. 89.1, 45–53.

Reiter, J., N. Levina, M. van der Linden, M. Gruhlke, C. Martin und A. J. Slusarenko (2017). Diallylthiosulfinate (Allicin), a volatile antimicrobial from garlic (*Allium sativum*), kills human lung pathogenic bacteria, including MDR strains, as a vapor. Molecules 22.10, 1711.

Reiter, L. T., L. Potocki, S. Chien, M. Gribskov und E. Bier (2001). A systematic analysis of human disease-associated gene sequences in *Drosophila melanogaster*. Genome Res. 11.6, 1114–1125.

Richard, M. und M. Hoch (2015). *Drosophila* eye size is determined by Innexin 2-dependent Decapentaplegic signalling. Dev. Biol. 408.1, 26–40.

Riechmann, V. und A. Ephrussi (2001). Axis formation during *Drosophila* oogenesis. Curr. Opin. Genet. Dev. 11.4, 374–383.

Robb, J. A. (1969). Maintenance of imaginal discs of *Drosophila melanogaster* in chemically defined media. J. Cell Biol. 41.3, 876–885.

Robinson, S. W., P. Herzyk, J. A. T. Dow und D. P. Leader (2013). FlyAtlas: database of gene expression in the tissues of *Drosophila melanogaster*. Nucleic Acids Res. 41.Database issue, D744–750.

Rørth, P. (1998). Gal4 in the *Drosophila* female germline. Mech. Dev. 78.1-2, 113–118.

Roth, S. und J. A. Lynch (2009). Symmetry breaking during *Drosophila* oogenesis. Cold Spring Harbor Perspect. Biol. 1.2, a001891.

Roth, S., F. S. Neuman-Silberberg, G. Barcelo und T. Schüpbach (1995). *cornichon* and the EGF receptor signaling process are necessary for both anterior-posterior and dorsal-ventral pattern formation in *Drosophila*. Cell 81.6, 967–978.

Rusconi, J. C. und U. Challa (2007). *Drosophila Mrityu* encodes a BTB/POZ domain-containing protein and is expressed dynamically during development. Int. J. Dev. Biol. 51.3, 259–263.

Sadowski, I., J. Ma, S. Triezenberg und M. Ptashne (1988). GAL4-VP16 is an unusually potent transcriptional activator. Nature 335.6190, 563–564.

Sahu, A., R. Ghosh, G. Deshpande und M. Prasad (2017). A Gap Junction Protein, Inx2, Modulates Calcium Flux to Specify Border Cell Fate during *Drosophila* oogenesis. PLoS Genet. 13.1, e1006542.

Sankaranarayanan, S., D. de Angelis, J. E. Rothman und T. A. Ryan (2000). The Use of pHluorins for Optical Measurements of Presynaptic Activity. Biophys. J. 79.4, 2199–2208.

Schmoller, K. M., S. Köhler, A. H. Crevenna, R. Wedlich-Söldner und A. R. Bausch (2012). Modulation of cross-linked actin networks by pH. Soft Matter 8.37, 9685–9690.

Schnizler, K., B. Saeger, C. Pfeffer, A. Gerbaulet, U. Ebbinghaus-Kintscher, C. Methfessel, E.-M. Franken, K. Raming, C. H. Wetzel, A. Saras, H. Pusch, H. Hatt und G. Gisselmann (2005). A novel chloride channel in *Drosophila melanogaster* is inhibited by protons. J. Biol. Chem. 280.16, 16254–16262.

Sen, J., J. S. Goltz, L. Stevens und D. Stein (1998). Spatially Restricted Expression of *pipe* in the *Drosophila* Egg Chamber Defines Embryonic Dorsal–Ventral Polarity. Cell 95.4, 471–481.

Sherwood, A. C., K. John-Alder und M. M. Sanders (1988). Characterization of chloride uptake in *Drosophila* Kc cells. J. Cell. Physiol. 136.3, 500–506.

Shimada, Y., S. Yonemura, H. Ohkura, D. Strutt und T. Uemura (2006). Polarized transport of Frizzled along the planar microtubule arrays in *Drosophila* wing epithelium. Dev. Cell 10.2, 209–222.

Siegel, M. S. und E. Y. Isacoff (1997). A Genetically Encoded Optical Probe of Membrane Voltage. Neuron 19.4, 735–741.

Simon, D. B., R. S. Bindra, T. A. Mansfield, C. Nelson-Williams, E. Mendonca, R. Stone, S. Schurman, A. Nayir, H. Alpay, A. Bakkaloglu, J. Rodriguez-Soriano, J. M. Morales, S. A. Sanjad, C. M. Taylor, D. Pilz, A. Brem, H. Trachtman, W. Griswold, G. A. Richard, E. John und R. P. Lifton (1997). Mutations in the chloride channel gene, *CLCNKB*, cause Bartter's syndrome type III. Nat. Genet. 17.2, 171–178.

Simons, C., L. D. Rash, J. Crawford, L. Ma, B. Cristofori-Armstrong, D. Miller, K. Ru, G. J. Baillie, Y. Alanay, A. Jacquinet, F.-G. Debray, A. Verloes, J. Shen, G. Yesil, S. Guler, A. Yuksel, J. G. Cleary, S. M. Grimmond, J. McGaughran, G. F. King, M. T. Gabbett und R. J. Taft (2015). Mutations in the voltage-gated potassium channel gene *KCNH1* cause Temple-Baraitser syndrome and epilepsy. Nat. Genet. 47.1, 73–77.

Simons, M., W. J. Gault, D. Gotthardt, R. Rohatgi, T. J. Klein, Y. Shao, H.-J. Lee, A.-L. Wu, Y. Fang, L. M. Satlin, J. T. Dow, J. Chen, J. Zheng, M. Boutros und M. Mlodzik (2009). Electrochemical cues regulate assembly of the Frizzled/Dishevelled complex at the plasma membrane during planar epithelial polarization. Nat. Cell Biol. 11.3, 286–294.

Splawski, I., K. W. Timothy, L. M. Sharpe, N. Decher, P. Kumar, R. Bloise, C. Napolitano, P. J. Schwartz, R. M. Joseph, K. Condouris, H. Tager-Flusberg, S. G. Priori, M. C. Sanguinetti und M. T. Keating (2004). $Ca_V1.2$ calcium channel dysfunction causes a multisystem disorder including arrhythmia and autism. Cell 119.1, 19–31.

Spradling, A. C. (1993). Developmental genetics of oogenesis. In: Bate M. und Martinez Arias A, Hrsg. The Development of *Drosophila melanogaster*. New York, U.S.A.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1–70.

Srivastava, P., A. Kane, C. Harrison und M. Levin (2020). A meta-analysis of bioelectric data in cancer, embryogenesis, and regeneration. Bioelectricity.

Stebbings, L. A., M. G. Todman, R. Phillips, C. E. Greer, J. Tam, P. Phelan, K. Jacobs, J. P. Bacon und J. A. Davies (2002). Gap junctions in *Drosophila*: Developmental expression of the entire innexin gene family. Mech. Dev. 113.2, 197–205.

Sun, Y. A. und R. J. Wyman (1993). Reevaluation of electrophoresis in the *Drosophila* egg chamber. Dev. Biol. 155.1, 206–215.

Tatapudy, S., F. Aloisio, D. Barber und T. Nystul (2017). Cell fate decisions: Emerging roles for metabolic signals and cell morphology. EMBO Rep. 18.12, 2105–2118.

Tazuke, S. I., C. Schulz, L. Gilboa, M. Fogarty, A. P. Mahowald, A. Guichet, A. Ephrussi, C. G. Wood, R. Lehmann und M. T. Fuller (2002). A germline-specific gap junction protein required for survival of differentiating early germ cells. Development (Cambridge, U. K.) 129.10, 2529–2539.

Theurkauf, W. E., S. Smiley, M. L. Wong und B. M. Alberts (1992). Reorganization of the cytoskeleton during *Drosophila* oogenesis: Implications for axis specification and intercellular transport. Development (Cambridge, U. K.) 115.4, 923–936.

Thio, G. L., R. P. Ray, G. Barcelo und T. Schüpbach (2000). Localization of *gurken* RNA in *Drosophila* oogenesis requires elements in the 5' and 3' regions of the transcript. Dev. Biol. 221.2, 435–446.

Thomas, C. und D. Strutt (2012). The roles of the cadherins Fat and Dachsous in planar polarity specification in *Drosophila*. Dev. Dyn. 241.1, 27–39.

Tognon, E., F. Kobia, I. Busi, A. Fumagalli, F. de Masi und T. Vaccari (2016). Control of lysosomal biogenesis and Notch-dependent tissue patterning by components of the TFEB-V-ATPase axis in *Drosophila melanogaster*. Autophagy 12.3, 499–514.

Tsien, R. Y. (1998). The green fluorescent protein. Annu. Rev. Biochem. 67, 509–544.

Tucker, J. B. und M. Meats (1976). Microtubules and control of insect egg shape. J. Cell Biol. 71.1, 207–217.

Turcios, N. L. (2005). Cystic fibrosis: An overview. J. Clin. Gastroenterol. 39.4, 307–317.

Tyler, S. E. B. (2017). Nature's electric potential: A systematic review of the role of bioelectricity in wound healing and regenerative processes in animals, humans, and plants. Front. Physiol. 8, 627.

Ulmschneider, B., B. K. Grillo-Hill, M. Benitez, D. R. Azimova, D. L. Barber und T. G. Nystul (2016). Increased intracellular pH is necessary for adult epithelial and embryonic stem cell differentiation. J. Cell Biol. 215.3, 345–355.

Vaccari, T., S. Duchi, K. Cortese, C. Tacchetti und D. Bilder (2010). The vacuolar ATPase is required for physiological as well as pathological activation of the Notch receptor. Development (Cambridge, U. K.) 137.11, 1825–1832.

Valles, P. G., V. Bocanegra, A. Gil Lorenzo und V. V. Costantino (2015). Physiological functions and regulation of the Na^+/H^+ exchanger NHE1 in renal tubule epithelial cells. Kidney Blood Pressure Res. 40.5, 452–466.

van Eeden, F. und D. St Johnston (1999). The polarisation of the anterior-posterior and dorsal-ventral axes during *Drosophila* oogenesis. Curr. Opin. Genet. Dev. 9.4, 396–404.

Verma, S. und A. K. Pandey (2017). Garlic treatment to brain cancer: An in-silico evaluation to explore the therapeutic efficacy of Allicin by inhibition of brain aquaporin. J. In Silico In Vitro Pharmacol. 3.3, 21.

Viktorinová, I. und C. Dahmann (2013). Microtubule polarity predicts direction of egg chamber rotation in *Drosophila*. Curr. Biol. 23.15, 1472–1477.

Viktorinová, I., I. Henry und P. Tomancak (2017). Epithelial rotation is preceded by planar symmetry breaking of actomyosin and protects epithelial tissue from cell deformations. PLoS Genet. 13.11, e1007107.

Viktorinová, I., T. König, K. Schlichting und C. Dahmann (2009). The cadherin Fat2 is required for planar cell polarity in the *Drosophila* ovary. Development (Cambridge, U. K.) 136.24, 4123–4132.

Voog, J. und D. L. Jones (2010). Stem cells and the niche: A dynamic duo. Cell Stem Cell 6.2, 103–115.

Wang, F., R. V. Sampogna und B. R. Ware (1989). pH dependence of actin self-assembly. Biophys. J. 55.2, 293–298.

Watts, B. A. r., T. George und D. W. Good (2005). The basolateral NHE1 Na^+/H^+ exchanger regulates transepithelial HCO_3^- absorption through actin cytoskeleton remodeling in renal thick ascending limb. J. Biol. Chem. 280.12, 11439–11447.

Weiß, I. und J. Bohrmann (2019a). Electrochemical gradients are involved in regulating cytoskeletal patterns during epithelial morphogenesis in the *Drosophila* ovary. BMC Dev. Biol. 19.1, 22.

– (2019b). Electrochemical patterns during *Drosophila* oogenesis: Ion-transport mechanisms generate stage-specific gradients of pH and membrane potential in the follicle-cell epithelium. BMC Dev. Biol. 19.1, 12.

White, K. A., B. K. Grillo-Hill und D. L. Barber (2017). Cancer cell behaviors mediated by dysregulated pH dynamics at a glance. J. Cell Sci. 130.4, 663–669.

Wieczorek, H. (1992). The insect V-ATPase, a plasma membrane proton pump energizing secondary active transport: Molecular analysis of electrogenic potassium transport in the tobacco hornworm midgut. J. Exp. Biol. 172, 335–343.

Wieczorek, H., M. Putzenlechner, W. Zeiske und U. Klein (1991). A vacuolar-type proton pump energizes K^+/H^+ antiport in an animal plasma membrane. J. Biol. Chem. 266.23, 15340–15347.

Wu, X., P. S. Tanwar und L. A. Raftery (2008). *Drosophila* follicle cells: Morphogenesis in an eggshell. Semin. Cell Dev. Biol. 19.3, 271–282.

Xie, T. und A. C. Spradling (1998). *decapentaplegic* is essential for the maintenance and division of germline stem cells in the *Drosophila* ovary. Cell 94.2, 251–260.

Zaritsky, J. J., D. M. Eckman, G. C. Wellman, M. T. Nelson und T. L. Schwarz (2000). Targeted disruption of Kir2.1 and Kir2.2 genes reveals the essential role of the inwardly rectifying K^+ current in K^+-mediated vasodilation. Circ. Res. 87.2, 160–166.

Zelle, K. M., B. Lu, S. C. Pyfrom und Y. Ben-Shahar (2013). The genetic architecture of degenerin/epithelial sodium channels in *Drosophila*. G3: Genes, Genomes, Genet. 3.3, 441–450.

Zhang, X., Y. Zheng, Q. Ren und H. Zhou (2017). The involvement of potassium channel ORK1 in short-term memory and sleep in *Drosophila*. Medicine 96.27, e7299.

Zhao, T., O. S. Graham, A. Raposo und D. St Johnston (2012). Growing microtubules push the oocyte nucleus to polarize the *Drosophila* dorsal-ventral axis. Science (New York, N.Y.) 336.6084, 999–1003.

A Anhang

A.1 Überprüfung des pH_i-sensitiven Farbstoffs CFDA

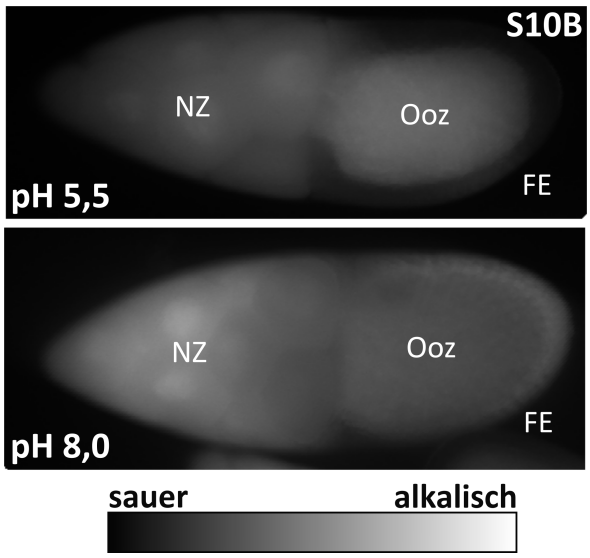
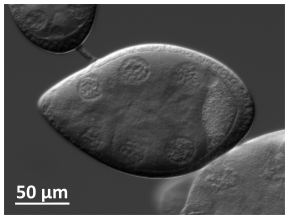
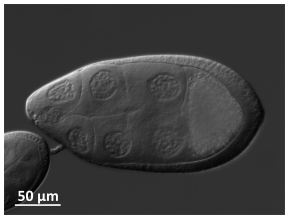
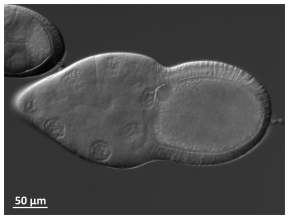
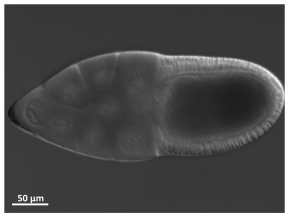
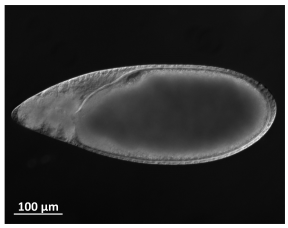
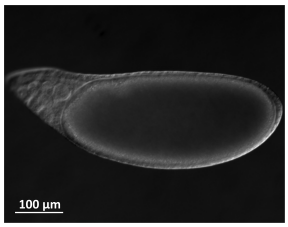


Abbildung A.1: Nachweis der pH_i-Sensitivität des Farbstoffs CFDA. Dargestellt sind exemplarische WFM-Aufnahmen von S10B-Follikeln nach einer 1 h-Inkubation in R14-Medium mit pH 5,5 (Salzsäure) und pH 8,0 (Natriumhydroxid, vgl. Weiß und Bohrmann, 2019b). Während schwächere Fluoreszenzintensitäten im FE einem niedrigeren pH_i (saurer pH_i) entsprechen, zeigen stärkere Fluoreszenzintensitäten einen höheren pH_i (stärker alkalischen pH_i) an.

A.2 Stadienbestimmung

Tabelle A.1: Kriterien zur Bestimmung der vitellogenen Entwicklungsstadien S8 bis S12 in *Drosophila*

Stadium	Beispielbild	Beschreibung
S8		Erstes vitellogenes Stadium: Die Follikel weisen eine mehr oder weniger einheitliche Follikelzellschicht auf. Die Grenzzellwanderung (BC) hat noch nicht begonnen, die BC befinden sich noch am anterioren Pol der Follikel.
S9		Beginn der Follikelzellmigration in Richtung der Ooz, anteriore FZ sind weniger zahlreich und abgeflacht, die Ooz nimmt etwa 1/3 der Eikammer ein, Beginn der Grenzellwanderung zwischen den NZ hindurch zur Ooz.
S10A		Noch keine zentripetale Wanderung von FZ zwischen NZ und Ooz erkennbar. Die BC haben den anterioren Pol der Ooz erreicht. Die Ooz nimmt die halbe Eikammer ein.
S10B		Die zentripetale Migration der anterioren, hochprismatischen FZ des FE über der Ooz beginnt.
S11		Die Ooz nimmt mehr als die Hälfte der Eikammer ein, Nährzellapoptose und -rückbildung setzt ein. Die Ooz ist fast vollständig von der Vitellinmembran umgeben, außer dort, wo das Zytoplasma aus den NZ einströmt.
S12		Anterior befinden sich nur noch die Kerne der NZ, zwischen Vitellinmembran und FZ beginnt sich das Endochorion zu bilden.

A.3 Bioelektrische Unterschiede zwischen WT und *grk*

Tabelle A.2: Anzahl Follikel (n) für jedes untersuchte Entwicklungsstadium und jede verwendete Methode

	WT				***grk***		
$\mathbf{V_{mem}}$	**n**	$\mathbf{pH_i}$	**n**	$\mathbf{V_{mem}}$	**n**	$\mathbf{pH_i}$	**n**
S8	27	**S8**	18	**S8**	9	**S8**	13
S9	15	**S9**	19	**S9**	24	**S9**	24
S10A	19	**S10A**	13	**S10A**	13	**S10A**	5
S10B	41	**S10B**	23	**S10B**	9	**S10B**	15
S11	12	**S11**	19	**S11**	6	**S11**	6
S12	10	**S12**	12	**S12**	5	**S12**	8
bMF	**n**	**MT**	**n**	**bMF**	**n**	**MT**	**n**
S8	5	**S8**	18	**S8**	11	**S8**	9
S9	7	**S9**	15	**S9**	26	**S9**	17
S10A	5	**S10A**	13	**S10A**	12	**S10A**	6
S10B	16	**S10B**	22	**S10B**	13	**S10B**	8
S11	7	**S11**	9	**S11**	8	**S11**	4
S12	9	**S12**	16	**S12**	11	**S12**	7

A.3.1 Variabilität zwischen analysierten S9- und S10B-Follikeln

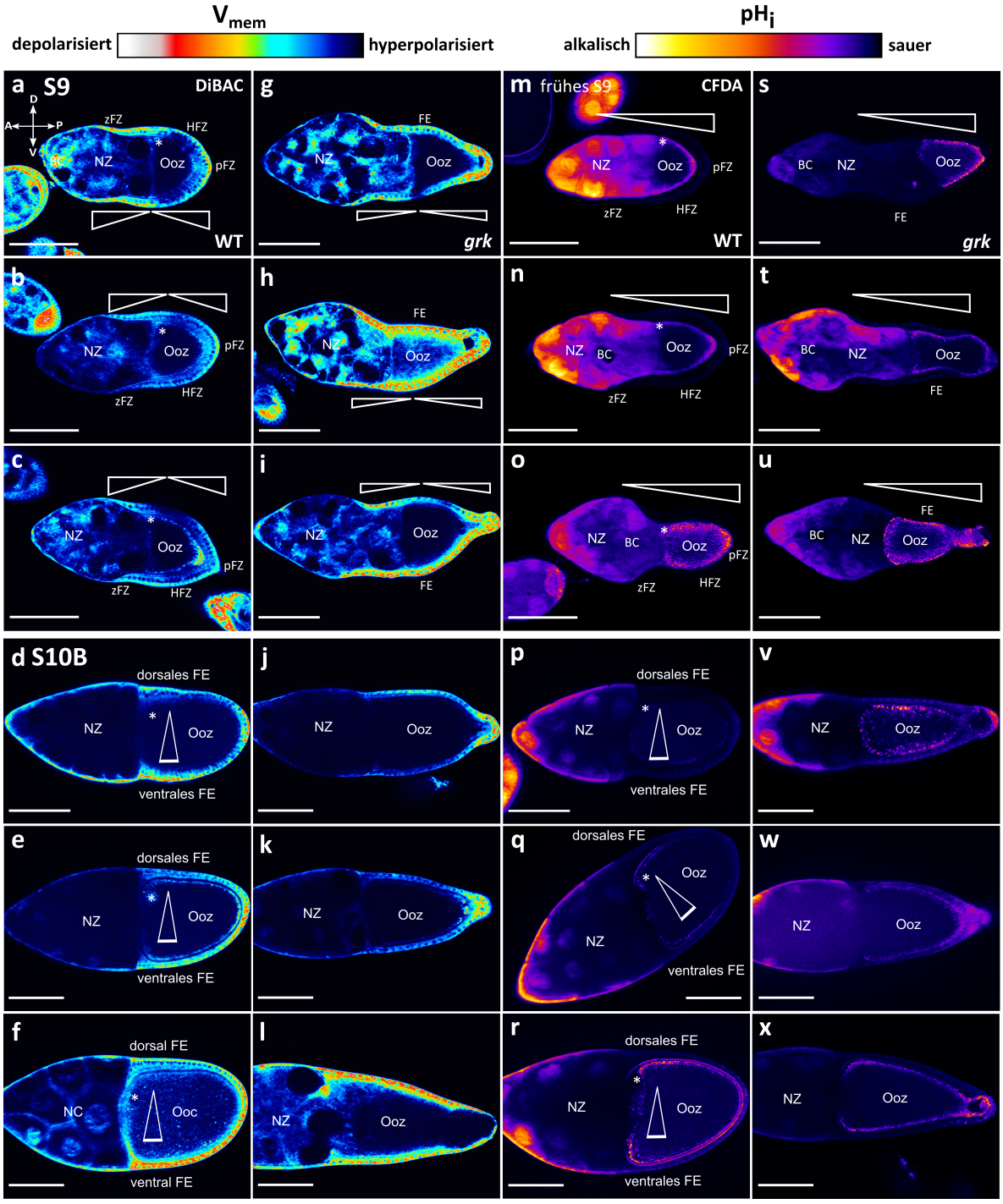


Abbildung A.2: Typische D-V elektrochemische Gradienten, wie sie im WT-FE zu Beginn von S10B beobachtet wurden, fehlen in *grk*. Weitere Beispiele zu Abb. 3.2, welche die Variabilität zwischen Follikeln des gleichen Stadiums darstellen. **a-l:** Pseudofarben-Abbildungen von DiBAC- (V_{mem}) gefärbten WT S9- (**a-c**) und S10B- (**d-f**) sowie *grk* S9- (**g-i**) und S10B- (**j-l**) Follikeln. **m-x:** Pseudofarben-Abbildungen von CFDA- (pH_i) gefärbten WT S9- (**m-o**) und S10B- (**p-r**) sowie *grk* S9- (**s-u**) und S10B- (**v-x**) Follikeln (Maßstabsbalken entsprechen 100 µm; Dreiecke weisen auf die Polarität der Gradienten hin, Sterne markieren die Positionen des ON).

Tabelle A.3: Quantifizierung der Fluoreszenzintensitäten der transversalen elektrochemischen Gradienten im FE von WT und *grk* (S10B). Daten zu Tabelle 3.2. Fluoreszenzintensitäten ("mean grey value") der beiden Seiten des FE (FE_1 and FE_2) wurden mit Hilfe von ImageJ gemessen (siehe Abb. 2.6b$_1$). Der Quotient berechnet sich aus dem größeren Wert geteilt durch den kleineren Wert (FE_2/FE_1). Bei einigen späten WT S10B-Follikeln (Nummer 3 und 7) ist eine Umkehrung der D-V-Polarität des transversalen V_{mem}-Gradienten (dorsal depolarisiert) im Vergleich zu früheren S10B-Follikeln in Abb. 3.2 (vgl. Weiß und Bohrmann, 2019b) festzustellen.

Mittlere Fluoreszenzintensität		**WT**			***grk***		
im FE von S10B-Follikeln		**FE_1**	**FE_2**	**Quotient**	**FE_1**	**FE_2**	**Quotient**
	Follikel 1	47,549	96,665	2,03	53,940	81,147	1,50
	Follikel 2	87,134	93,925	1,08	54,312	64,269	1,18
	Follikel 3	50,875	77,874	1,53	116,148	141,018	1,21
V_{mem}	**Follikel 4**	54,227	86,196	1,59	91,955	119,399	1,30
	Follikel 5	66,310	93,636	1,41	58,158	59,392	1,02
	Follikel 6	82,120	140,956	1,72	56,750	72,321	1,27
	Follikel 7	44,366	97,796	2,20	28,814	33,256	1,15
	Follikel 1	27,376	39,256	1,43	11,915	15,877	1,33
	Follikel 2	7,963	13,977	1,76	1,091	1,354	1,24
	Follikel 3	5,782	9,033	1,56	18,275	21,024	1,15
pH_i	**Follikel 4**	9,352	10,494	1,12	25,883	26,991	1,04
	Follikel 5	16,600	21,542	1,30	15,032	19,093	1,27
	Follikel 6	8,997	13,623	1,51	10,802	11,018	1,02
	Follikel 7	12,231	22,268	1,82	6,437	7,085	1,10

Tabelle A.4: Quantifizierung der Fluoreszenzintensitäten der A-P elektrochemischen Gradienten im FE von WT und *grk* (S10B). Daten zu Tabelle 3.2. Fluoreszenzintensitäten ("mean grey value") der anterioren und posterioren Hälfte des säulenförmigen FE (aFE und pFE) wurden mit Hilfe von ImageJ gemessen (siehe Abb. 2.6b$_2$). Der Quotient berechnet sich aus pFE/aFE.

Mittlere Fluoreszenzintensität		WT			*grk*		
im FE von S10B-Follikeln		aFE	pFE	Quotient	aFE	pFE	Quotient
V_{mem}	**Follikel 1**	54,687	82,225	1,50	44,455	88,138	1,98
	Follikel 2	87,093	92,574	1,06	93,915	121,706	1,29
	Follikel 3	55,051	74,046	1,35	40,100	75,469	1,88
	Follikel 4	65,824	68,068	1,03	51,718	67,134	1,30
	Follikel 5	64,369	97,711	1,52	127,958	126,426	0,99
	Follikel 6	97,739	114,622	1,17	53,689	80,274	1,74
	Follikel 7	71,888	56,524	0,79	20,235	45,114	2,29
pH_i	**Follikel 1**	21,080	45,383	1,43	7,476	14,197	1,90
	Follikel 2	8,238	12,342	1,76	10,512	21,395	2,04
	Follikel 3	6,710	8,905	1,56	3,685	2,927	0,79
	Follikel 4	9,213	11,206	1,12	17,344	32,323	1,86
	Follikel 5	11,663	26,749	1,30	11,908	23,356	1,96
	Follikel 6	9,389	12,291	1,51	4,407	7,998	1,81
	Follikel 7	12,306	21,521	1,82	4,103	9,043	2,20

A.4 Unterschiede im Zytoskelett von WT und *grk*

A.4.1 Variabilität zwischen analysierten S9- und S10B-Follikeln

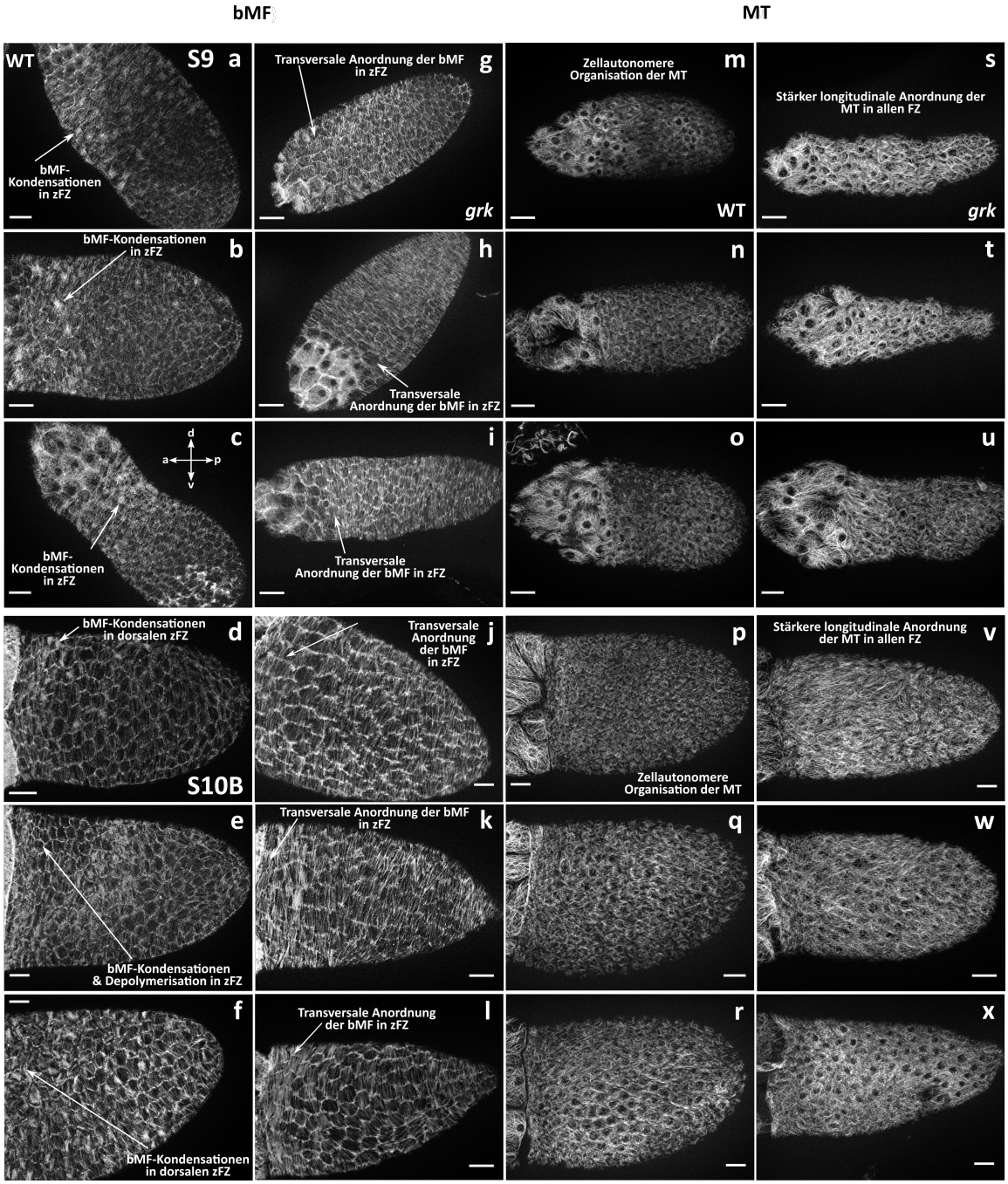


Abbildung A.3: Das Zytoskelett des *grk*-FE zeigt auffällige Unterschiede im Vergleich zum Zytoskelett des WT-FE (S9 und S10B). Weitere Beispiele zu Abb. 3.5, welche die Variabilität zwischen Follikeln des gleichen Stadiums darstellen. **a-l:** Mit fluoreszierendem Phalloidin (bMF) gefärbte WT S9- (**a-c**) und S10B- (**d-f**) sowie *grk* S9- (**g-i**) und S10B- (**j-l**) Follikel. **m-x:** Mit acetyliertem α-Tubulin (MT) gefärbte WT S9- (**m-o**) und S10B- (**p-r**) sowie *grk* S9- (**s-u**) und S10B- (**v-x**) Follikel (Maßstabsbalken entsprechen 20 µm).

A.5 RNAi-Screen

A.5.1 Ergebnisse der im Vorfeld des RNAi-Knockdown-Screens durchgeführten Expressionsanalyse mittels Genexpressionsdatenbank FlyAtlas

A.5.1.1 FlyAtlas-Analyse vom 03.08.2015:

Tabelle A.5: Microarray-ermittelte Expression der im RNAi-Knockdown-Screen untersuchten Gene im Ovar adulter *Drosophila*-Fliegen

Genname	*Abundance*[1]	*& Enrichment*[2]
vha55	1147	1.1
nhe1	206	1.7
rpk	904	2.5
ork1	479	2.7
mri	373	1.4
clc-b	214	1.6
clc-c	541	1.7
stim	573	1.5
inx1	93	0.50
inx2	449	1.4
inx3	72	0.60

[1] Absolute Expression im Ovar von adulten *Drosophila*-Fliegen (grau).
[2] Auf den Durchschnitt in der gesamten Fliege bezogene relative Expression. Von einer Anreicherung der mRNA des untersuchten Gens (*Enrichment*, dunkelgelb-orange) im Ovar adulter Fliegen ist auszugehen, wenn der Wert $> 1{,}0$ ist.

A.5.1.2 FlyAtlas-Analyse vom 17.10.2018:

Symbol	Name	Annotation Symbol	FlyBase ID
Vha55	Vacuolar H^+-ATPase 55kD subunit	CG17369	FBgn0005671

Gene FPKMs and Enrichments ☐ SDs ☐ Whole Body ☐ Male v. Female

	Adult Male		Adult Female		Larval	
Tissue	FPKM	Enrichment	FPKM	Enrichment	FPKM	Enrichment
Head	90	0.8	82	0.8		
Eye	78	0.7	64	0.7		
Brain / CNS	87	0.8	80	0.8	36	0.2
Thoracicoabdominal ganglion	71	0.6	80	0.8		
Crop	70	0.6	64	0.7		
Midgut	414	3.7	384	4.0	222	1.4
Hindgut	680	6.0	777	8.0	941	6.1
Malpighian Tubules	424	3.8	446	4.6	576	3.7
Fat body	pending	—	pending	—	89	0.6
Salivary gland	508	4.5	317	3.3	170	1.1
Heart	pending	—	pending	—		
Trachea					102	0.7
Ovary			80	0.8		
Virgin Spermatheca			65	0.7		
Mated Spermatheca			72	0.7		
Testis	85	0.8				
Accessory glands	87	0.8				
Carcass	78	0.7	88	0.9	72	0.5
Rectal pad	161	1.4	198	2.0		

(a) *vha55*-Expression

Symbol	Name	Annotation Symbol	FlyBase ID
Vha16-1	Vacuolar H^+ ATPase 16kD subunit 1	CG3161	FBgn0262736

Gene FPKMs and Enrichments ☐ SDs ☐ Whole Body ☐ Male v. Female

	Adult Male		Adult Female		Larval	
Tissue	FPKM	Enrichment	FPKM	Enrichment	FPKM	Enrichment
Head	239	0.9	217	1.3		
Eye	246	0.9	204	1.2		
Brain / CNS	279	1.1	256	1.5	160	0.3
Thoracicoabdominal ganglion	302	1.1	352	2.0		
Crop	271	1.0	231	1.3		
Midgut	1731	6.5	1438	8.4	812	1.5
Hindgut	2778	10	2819	16	3218	5.9
Malpighian Tubules	1473	5.5	1567	9.1	2189	4.0
Fat body	pending	—	pending	—	300	0.6
Salivary gland	1475	5.6	963	5.6	666	1.2
Heart	pending	—	pending	—		
Trachea					649	1.2
Ovary			114	0.7		
Virgin Spermatheca			423	2.5		
Mated Spermatheca			454	2.6		
Testis	110	0.4				
Accessory glands	315	1.2				
Carcass	268	1.0	285	1.7	336	0.6
Rectal pad	611	2.3	775	4.5		

(b) *vha16-1* (*ductin*)-Expression

Abbildung A.4: Mittels RNA-Seq ermittelte Expression in verschiedenen Geweben adulter *Drosophila*-Fliegen und -Larven. Dargestellt ist die absolute Expression (FPKM, *Fragments Per Kilobase Million*; grau) und die auf den Durchschnitt in der gesamten Fliege (1,0) bezogene relative Expression (*Enrichment*, gelb-rot). Von einer Anreicherung der mRNA des untersuchten Gens im Ovar adulter Fliegen ist auszugehen, wenn der Wert > 1,0 ist.

Symbol	Name	Annotation Symbol	FlyBase ID
Nhe1	Na^+/H^+ hydrogen exchanger 1	CG12178	FBgn0026787

Gene FPKMs and Enrichments ☐ SDs ☐ Whole Body ☐ Male v. Female

	Adult Male		Adult Female		Larval	
Tissue	FPKM	Enrichment	FPKM	Enrichment	FPKM	Enrichment
Head	9.9	0.7	10	0.9		
Eye	8.3	0.5	6.2	0.6		
Brain / CNS	13	0.8	11	1.0	7.9	0.5
Thoracicoabdominal ganglion	13	0.9	14	1.3		
Crop	19	1.3	18	1.6		
Midgut	30	2.0	21	2.0	25	1.6
Hindgut	18	1.2	19	1.8	15	1.0
Malpighian Tubules	30	2.0	34	3.2	34	2.2
Fat body	pending	—	pending	—	4.2	0.3
Salivary gland	49	3.3	46	4.3	134	8.6
Heart	pending	—	pending	—		
Trachea					9.9	0.6
Ovary			9.7	0.9		
Virgin Spermatheca			11	1.0		
Mated Spermatheca			13	1.2		
Testis	19	1.3				
Accessory glands	75	5.0				
Carcass	16	1.0	11	1.1	9.5	0.6
Rectal pad	36	2.4	21	2.0		

(c) *nhe1*-Expression

Symbol	Name	Annotation Symbol	FlyBase ID
rpk	ripped pocket	CG1058	FBgn0022981

Gene FPKMs and Enrichments ☐ SDs ☐ Whole Body ☐ Male v. Female

	Adult Male		Adult Female		Larval	
Tissue	FPKM	Enrichment	FPKM	Enrichment	FPKM	Enrichment
Head	0.0	N.A.	0.0	0.0		
Eye	0.0	N.A.	0.1	0.0		
Brain / CNS	0.1	N.A.	0.0	0.0	0.6	N.A.
Thoracicoabdominal ganglion	0.0	N.A.	0.3	0.0		
Crop	0.1	N.A.	0.5	0.0		
Midgut	0.0	N.A.	0.0	0.0	0.0	N.A.
Hindgut	0.1	N.A.	0.1	0.0	0.0	N.A.
Malpighian Tubules	0.0	N.A.	0.2	0.0	0.0	N.A.
Fat body	pending	—	pending	—	0.2	N.A.
Salivary gland	0.3	N.A.	4.3	0.4	0.1	N.A.
Heart	pending	—	pending	—		
Trachea					0.1	N.A.
Ovary			18	1.6		
Virgin Spermatheca			0.2	0.0		
Mated Spermatheca			0.1	0.0		
Testis	5.5	2.8				
Accessory glands	0.0	N.A.				
Carcass	0.2	N.A.	2.0	0.2	0.2	N.A.
Rectal pad	0.0	N.A.	0.6	0.1		

(d) *rpk*-Expression

Abbildung A.4: Mittels RNA-Seq ermittelte Expression in verschiedenen Geweben adulter *Drosophila*-Fliegen und -Larven. Dargestellt ist die absolute Expression (FPKM, *Fragments Per Kilobase Million*; grau) und die auf den Durchschnitt in der gesamten Fliege (1,0) bezogene relative Expression (*Enrichment*, gelb-rot). Von einer Anreicherung der mRNA des untersuchten Gens im Ovar adulter Fliegen ist auszugehen, wenn der Wert > 1,0 ist.

Symbol	Name	Annotation Symbol	FlyBase ID
Ork1	Open rectifier K^+ channel 1	CG1615	FBgn0017561

Gene FPKMs and Enrichments ☐ SDs ☐ Whole Body ☐ Male v. Female

	Adult Male		Adult Female		Larval	
Tissue	FPKM	Enrichment	FPKM	Enrichment	FPKM	Enrichment
Head	2.8	1.0	5.5	0.4		
Eye	3.4	1.2	5.6	0.4		
Brain / CNS	4.6	1.6	3.8	0.3	0.3	N.A.
Thoracicoabdominal ganglion	5.4	1.9	5.2	0.4		
Crop	0.4	0.1	0.8	0.1		
Midgut	13	4.6	4.7	0.3	1.2	N.A.
Hindgut	8.4	2.9	9.3	0.7	3.3	1.6
Malpighian Tubules	3.0	1.1	1.7	0.1	0.6	N.A.
Fat body	pending	—	pending	—	5.2	2.6
Salivary gland	2.4	0.8	5.6	0.4	0.2	N.A.
Heart	pending	—	pending	—		
Trachea					0.1	N.A.
Ovary			18	1.2		
Virgin Spermatheca			4.4	0.3		
Mated Spermatheca			7.5	0.5		
Testis	0.2	0.1				
Accessory glands	2.5	0.9				
Carcass	3.5	1.2	5.9	0.4	0.1	N.A.
Rectal pad	2.5	0.9	4.3	0.3		

(e) *ork1*-Expression

Symbol	Name	Annotation Symbol	FlyBase ID
ClC-b	Chloride channel-b	CG8594	FBgn0033755

Gene FPKMs and Enrichments ☐ SDs ☐ Whole Body ☐ Male v. Female

	Adult Male		Adult Female		Larval	
Tissue	FPKM	Enrichment	FPKM	Enrichment	FPKM	Enrichment
Head	14	1.2	15	1.4		
Eye	15	1.3	15	1.3		
Brain / CNS	15	1.3	15	1.4	17	1.2
Thoracicoabdominal ganglion	15	1.3	15	1.4		
Crop	21	1.8	19	1.7		
Midgut	12	1.0	11	1.0	26	1.8
Hindgut	11	1.0	12	1.1	11	0.8
Malpighian Tubules	8.7	0.8	10	0.9	14	1.0
Fat body	pending	—	pending	—	27	1.9
Salivary gland	14	1.2	11	1.0	14	1.0
Heart	pending	—	pending	—		
Trachea					13	0.9
Ovary			13	1.2		
Virgin Spermatheca			8.0	0.7		
Mated Spermatheca			11	1.0		
Testis	11	1.0				
Accessory glands	40	3.6				
Carcass	13	1.2	14	1.2	12	0.9
Rectal pad	10	0.9	10	0.9		

(f) *clc-b*-Expression

Abbildung A.4: Mittels RNA-Seq ermittelte Expression in verschiedenen Geweben adulter *Drosophila*-Fliegen und -Larven. Dargestellt ist die absolute Expression (FPKM, *Fragments Per Kilobase Million*; grau) und die auf den Durchschnitt in der gesamten Fliege (1,0) bezogene relative Expression (*Enrichment*, gelb-rot). Von einer Anreicherung der mRNA des untersuchten Gens im Ovar adulter Fliegen ist auszugehen, wenn der Wert > 1,0 ist.

Symbol	Name	Annotation Symbol	FlyBase ID
ClC-c	Chloride channel-c	CG5284	FBgn0036566

Gene FPKMs and Enrichments ☐ SDs ☐ Whole Body ☐ Male v. Female

	Adult Male		Adult Female		Larval	
Tissue	FPKM	Enrichment	FPKM	Enrichment	FPKM	Enrichment
Head	19	1.1	21	1.3		
Eye	25	1.5	21	1.3		
Brain / CNS	21	1.3	20	1.2	14	0.8
Thoracicoabdominal ganglion	16	1.0	17	1.0		
Crop	20	1.2	17	1.1		
Midgut	28	1.6	19	1.2	48	2.6
Hindgut	16	0.9	18	1.1	18	0.9
Malpighian Tubules	51	3.0	58	3.6	42	2.3
Fat body	pending	—	pending	—	20	1.1
Salivary gland	25	1.5	21	1.3	87	4.6
Heart	pending	—	pending	—		
Trachea					18	0.9
Ovary			17	1.0		
Virgin Spermatheca			20	1.2		
Mated Spermatheca			21	1.3		
Testis	13	0.8				
Accessory glands	27	1.6				
Carcass	18	1.1	19	1.2	16	0.9
Rectal pad	20	1.2	17	1.0		

(g) *clc-c*-Expression

Symbol	Name	Annotation Symbol	FlyBase ID
Stim	Stromal interaction molecule	CG9126	FBgn0045073

Gene FPKMs and Enrichments ☐ SDs ☐ Whole Body ☐ Male v. Female

	Adult Male		Adult Female		Larval	
Tissue	FPKM	Enrichment	FPKM	Enrichment	FPKM	Enrichment
Head	29	0.9	31	1.0		
Eye	34	1.0	32	1.1		
Brain / CNS	21	0.6	23	0.8	14	0.5
Thoracicoabdominal ganglion	24	0.7	24	0.8		
Crop	57	1.7	55	1.8		
Midgut	33	1.0	25	0.8	51	1.9
Hindgut	38	1.2	42	1.4	34	1.3
Malpighian Tubules	52	1.6	62	2.0	40	1.5
Fat body	pending	—	pending	—	19	0.7
Salivary gland	54	1.6	42	1.4	28	1.1
Heart	pending	—	pending	—		
Trachea					27	1.0
Ovary			32	1.1		
Virgin Spermatheca			34	1.1		
Mated Spermatheca			34	1.1		
Testis	43	1.3				
Accessory glands	53	1.6				
Carcass	43	1.3	38	1.3	25	0.9
Rectal pad	52	1.6	44	1.5		

(h) *stim*-Expression

Abbildung A.4: Mittels RNA-Seq ermittelte Expression in verschiedenen Geweben adulter *Drosophila*-Fliegen und -Larven. Dargestellt ist die absolute Expression (FPKM, *Fragments Per Kilobase Million*; grau) und die auf den Durchschnitt in der gesamten Fliege (1,0) bezogene relative Expression (*Enrichment*, gelb-rot). Von einer Anreicherung der mRNA des untersuchten Gens im Ovar adulter Fliegen ist auszugehen, wenn der Wert > 1,0 ist.

Symbol	Name	Annotation Symbol	FlyBase ID
ogre	optic ganglion reduced	CG3039	FBgn0004646

Gene FPKMs and Enrichments ☐ SDs ☐ Whole Body ☐ Male v. Female

	Adult Male		Adult Female		Larval	
Tissue	FPKM	Enrichment	FPKM	Enrichment	FPKM	Enrichment
Head	39	2.3	38	2.6		
Eye	48	2.8	45	3.1		
Brain / CNS	31	1.8	31	2.2	54	2.6
Thoracicoabdominal ganglion	48	2.9	55	3.8		
Crop	27	1.6	28	1.9		
Midgut	4.6	0.3	0.5	0.0	0.7	0.0
Hindgut	12	0.7	13	0.9	11	0.5
Malpighian Tubules	0.5	0.0	1.0	0.1	0.2	0.0
Fat body	pending	—	pending	—	32	1.5
Salivary gland	5.9	0.3	4.2	0.3	21	1.0
Heart	pending	—	pending	—		
Trachea					55	2.6
Ovary			13	0.9		
Virgin Spermatheca			19	1.3		
Mated Spermatheca			31	2.1		
Testis	9.4	0.6				
Accessory glands	38	2.2				
Carcass	27	1.6	28	1.9	32	1.5
Rectal pad	37	2.2	22	1.5		

(i) *inx1* (*ogre*)-Expression

Symbol	Name	Annotation Symbol	FlyBase ID
inx2	Innexin 2	CG4590	FBgn0027108

Gene FPKMs and Enrichments ☐ SDs ☐ Whole Body ☐ Male v. Female

	Adult Male		Adult Female		Larval	
Tissue	FPKM	Enrichment	FPKM	Enrichment	FPKM	Enrichment
Head	56	2.0	52	1.5		
Eye	74	2.6	67	1.9		
Brain / CNS	64	2.3	65	1.8	92	1.7
Thoracicoabdominal ganglion	151	5.4	158	4.4		
Crop	36	1.3	29	0.8		
Midgut	44	1.5	28	0.8	28	0.5
Hindgut	22	0.8	26	0.7	26	0.5
Malpighian Tubules	48	1.7	57	1.6	50	0.9
Fat body	pending	—	pending	—	56	1.0
Salivary gland	9.6	0.3	10	0.3	25	0.5
Heart	pending	—	pending	—		
Trachea					178	3.3
Ovary			34	0.9		
Virgin Spermatheca			25	0.7		
Mated Spermatheca			44	1.2		
Testis	12	0.4				
Accessory glands	8.3	0.3				
Carcass	35	1.2	36	1.0	113	2.1
Rectal pad	25	0.9	21	0.6		

(j) *inx2*-Expression

Abbildung A.4: Mittels RNA-Seq ermittelte Expression in verschiedenen Geweben adulter *Drosophila*-Fliegen und -Larven. Dargestellt ist die absolute Expression (FPKM, *Fragments Per Kilobase Million*; grau) und die auf den Durchschnitt in der gesamten Fliege (1,0) bezogene relative Expression (*Enrichment*, gelb-rot). Von einer Anreicherung der mRNA des untersuchten Gens im Ovar adulter Fliegen ist auszugehen, wenn der Wert > 1,0 ist.

Symbol	Name	Annotation Symbol	FlyBase ID
Inx3	Innexin 3	CG1448	FBgn0265274

Gene FPKMs and Enrichments ☐ SDs ☐ Whole Body ☐ Male v. Female

	Adult Male		Adult Female		Larval	
Tissue	FPKM	Enrichment	FPKM	Enrichment	FPKM	Enrichment
Head	23	1.8	31	3.0		
Eye	43	3.4	40	3.8		
Brain / CNS	16	1.3	20	1.8	36	1.0
Thoracicoabdominal ganglion	40	3.2	38	3.5		
Crop	32	2.5	33	3.1		
Midgut	5.9	0.5	2.8	0.3	9.1	0.3
Hindgut	56	4.4	57	5.4	23	0.6
Malpighian Tubules	1.2	0.1	1.8	0.2	0.4	0.0
Fat body	pending	—	pending	—	24	0.7
Salivary gland	5.5	0.4	4.4	0.4	7.7	0.2
Heart	pending	—	pending	—		
Trachea					88	2.5
Ovary			6.3	0.6		
Virgin Spermatheca			28	2.6		
Mated Spermatheca			28	2.6		
Testis	22	1.8				
Accessory glands	4.0	0.3				
Carcass	16	1.2	20	1.9	67	1.9
Rectal pad	49	3.9	44	4.2		

(k) *inx3*-Expression

Abbildung A.4: Mittels RNA-Seq ermittelte Expression in verschiedenen Geweben adulter *Drosophila*-Fliegen und -Larven. Dargestellt ist die absolute Expression (FPKM, *Fragments Per Kilobase Million*; grau) und die auf den Durchschnitt in der gesamten Fliege (1,0) bezogene relative Expression (*Enrichment*, gelb-rot). Von einer Anreicherung der mRNA des untersuchten Gens im Ovar adulter Fliegen ist auszugehen, wenn der Wert > 1,0 ist.

A.5.2 Weitere Beispiele für größenreduzierte Ovarien nach *rpk*- und *inx3*-Knockdown

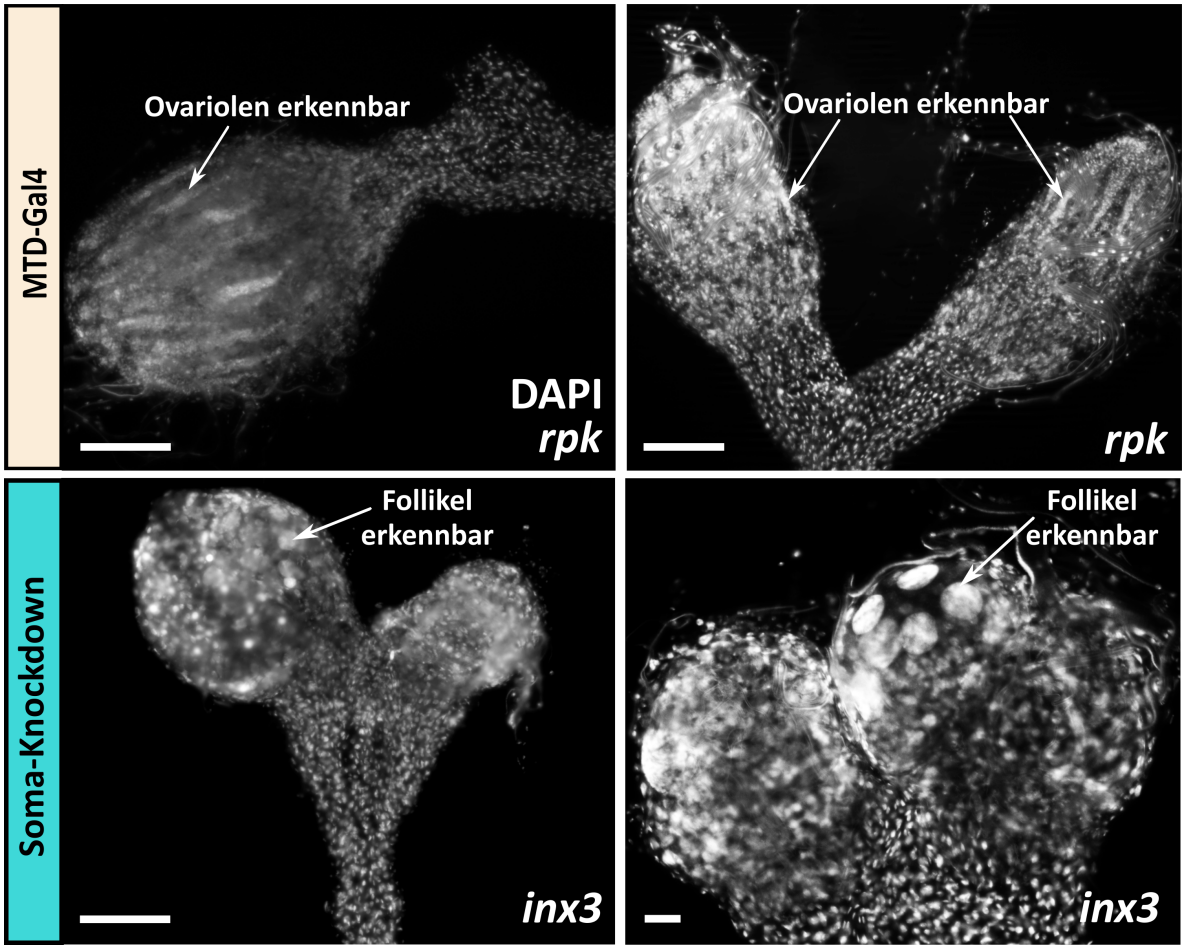


Abbildung A.5: *rpk*- und *inx1*-Knockdown-Fliegen beinhalten Ovarien mit veränderter Morphologie. Weitere Beispiele der in Abb. 3.18 dargestellten größenreduzierten *rpk*- und *inx3*-Ovarien. **Erste Reihe:** Dargestellt sind ein einzelnes (links) und paariges Ovar (rechts) von *MTD-Gal4>rpk shRNA*-Fliegen. In allen *rpk*-Ovarien sind, ausgehend von der DAPI-Färbung, zwar Ovariolen aber keine Follikel erkennbar. **Zweite Reihe:** Dargestellt sind paarige Ovarien von *tj-Gal4>inx3 shRNA*-Fliegen. In allen *inx3*-Ovarien sind keine Ovariolen aber einzelne Follikel (große Zellkerne) erkennbar (die Maßstabsbalken entsprechen einer Länge von 100 µm mit Ausnahme der Aufnahme in der untere Reihe rechts; der Maßstabsbalken dieser Aufnahme entspricht einer Länge von 25 µm).

Abkürzungs- und Bedeutungsverzeichnis

aFE anteriore Hälfte des Follikelsepithels

A-P Anterior-Posterior

Aqua bidest. bidestilliertes Wasser

BC *border cells* (Grenzzellen)

BL *Bloomington Drosophila Stock Center*-Nummer

BDSC *Bloomington Drosophila Stock Center*

bMF basale Mikrofilamente

BSA *bovine serum albumin*

CFDA 5-Carboxyfluorescein-Diacetat, Acetoxymethyl-Ester

D-V Dorsal-Ventral

DAPI 4,6-Diamidin-2-phenylindol-dihydrochlorid

DEG/ENaC Degenerin/epithelialer Na^+-Kanal

DiBAC Bis-(1,3-Dibutylbarbituric Acid) Trimethine Oxonol

DMSO Dimethylsulfoxid

dFZ dorsale Follikelzellen

DPBS *Drosophila phosphate buffered saline*

EGFR *Epidermal Growth Factor Receptor*

EtOH Ethanol

FE Follikelepithel (*follicular epithelium*)

FSZ Follikelstammzellen (*follicle stem cells*)

FZ Follikelzellen (*follicle cells*)

HFZ Hauptkörperfollikelzellen (*mainbody follicle cells*)

IR *inverted repeats*

K_{ATP} ATP-abhängiger K^+-Kanal

Kir *inwardly rectifying* K^+-Kanal

KSZ Keimbahnstammzellen (*germline stem cells*)

lhRNA *long hairpin* RNA

MF Mikrofilamente

MT Mikrotubuli

9-AC 9-Anthracencarbonsäure

n Anzahl

NHE Na^+/H^+-*exchanger*

NZ Nährzelle (*nurse cell*)

Ooz Oozyte (*oocyte*)

ON Oozytenkern (*oocyte nucleus*)

PCP Planare Zellpolarität (*planar cell polarity*)

pFE posteriore Hälfte des Follikelepithels

pFZ posteriore Follikelzellen (*posterior follicle cells*)

PBS *phosphate buffered saline*

pH_i intrazellulärer pH

RNAi RNA-Interferenz

RT Raumtemperatur

S Stadium

shRNA *short hairpin* RNA

SIM *structured-illumination microscopy*

TF Terminale Filamentzellen

TRiP *Transgenic RNAi Project*

UE Untereinheit

VDCR *Vienna Drosophila Resource Center*

V_{mem} Membranpotential

vFZ ventrale Follikelzellen

VSD *voltage sensing domain*

WFM Weitfeldfluoreszenzmikroskopie

WT Wildtyp

ZB Zystoblast (*cystoblast*)

zFZ zentripetale Follikelzellen (*centripetal follicle cells*)

Gen- und Proteinabkürzungen

bcd *bicoid*

clc *chloride channel*

Dsh Dishevelled

Fz Frizzled

GFP *green fluorescent protein*

grk *gurken*

inx *innexin*

mri *mrityu*

nhe Na^+/H^+-*exchanger*

ork1 *open rectifier* K^+ *channel 1*

osk *oskar*

rpk *ripped pocket*

slbo *slow border cells*

stim *stromal interaction molecule*

vha55 Typ-V H^+-ATPase Untereinheit B

vha16-1 Typ-V H^+-ATPase Untereinheit c, auch als *ductin* bekannt

Publikationsliste

Originalpublikationen

Schotthöfer S. K., Bohrmann J. (2020a). Bioelectrical and cytoskeletal patterns correlate with altered axial polarity in the follicular epithelium of the *Drosophila* mutant *gurken*. BMC Dev. Biol. 20, 5

Schotthöfer S. K., Bohrmann J. (2020b). Analysing bioelectrical phenomena in the *Drosophila* ovary with genetic tools: tissue-specific expression of sensors for membrane potential and intracellular pH, and RNAi-knockdown of mechanisms involved in ion exchange. BMC Dev. Biol. 20, 15

Tagungsbeiträge

Schotthöfer S. K., Weiß I., Bohrmann J. (2016a). Axial polarity in the *Drosophila* mutant *gurken*: Altered bioelectrical polarity correlates with cytoskeletal polarity in the follicular epithelium. German *Drosophila* Meeting, Köln

Schotthöfer S. K., Bohrmann J. (2016b). Bioelectrical polarity is linked to cytoskeletal polarity in ovarian follicle cells of the *Drosophila* mutant *gurken*. 109. Tagung der Deutschen Zoologischen Gesellschaft, Kiel

Schotthöfer S. K., Bohrmann J. (2017). The genetically encoded voltage sensor ArcLight is a useful tool for investigating bioelectric phenomena during *Drosophila* oogenesis. 110. Tagung der Deutschen Zoologischen Gesellschaft, Bielefeld

Schotthöfer S. K., Bohrmann J. (2018). Analyzing bioelectric phenomena during *Drosophila* oogenesis: Quantification of changes in membrane potential and intracellular pH by genetically encoded sensors expressed in epithelial cells. 111. Tagung der Deutschen Zoologischen Gesellschaft, Greifswald

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt:

Herrn Prof. Dr. Johannes Bohrmann für die Vergabe des Themas. Seine herzliche und hervorragende Betreuung dieser Dissertation, einschließlich moralischer und fachlicher Unterstützung sowie zahlreicher konstruktiver Vorschläge und anregender Gespräche haben im besonderen Maße zur Entstehung dieser Dissertation beigetragen.

Herrn Prof. Dr. Marc Spehr für die freundliche Übernahme der Zweitkorrektur und die zeitweilige Beherbergung der Fliegenzucht in seinen Laborräumen.

Darüberhinaus danke ich:

Allen Mitarbeitern der AG Bohrmann für das außergewöhnlich angenehme Arbeitsklima einschließlich zahlreicher interessanter fachlicher und persönlicher Gespräche sowie technischer Unterstützung.

Herrn Prof Dr. Siegfried Roth, Herrn Oliver Karst, Herrn Prof Dr. Peter Becker, Herrn Dr. Aaron Voigt und Herrn Dr. Sven Huelsmann für ihre Kooperation und Hilfsbereitschaft.

Meiner Freundin und Kollegin Ursula Baumann-Groten für die moralische Unterstützung und die Durchsicht dieser Arbeit.

Meinen Eltern für die Ermöglichung meines Studiums und die liebevolle und bedingungslose Unterstützung in allen Bereichen.

Meinem Partner Andre für seine Unterstützung, seine Geduld und seine Liebe.

Meinem Bruder Alexander und allen Freunden die immer für mich da waren.

Euer Vertrauen in mich hat mich immer wieder motiviert.