

**Charakterisierung der Funktion von Stardust im
Komplexauge von *Drosophila melanogaster***

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Heinrich Heine Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Sandra Marion Berger
aus Köln

Düsseldorf 2005

Berichterstatter:

Prof. Dr. Elisabeth Knust

Prof. Dr. Johannes Hegemann

Tag der mündlichen Prüfung:

9. Juni 2005

Für meine Familie

1	Einleitung	1
1.1	Zellpolarität in Epithelien.....	1
1.2	Primäre und sekundäre Epithelien in <i>Drosophila melanogaster</i>	2
1.3	Zelluläre Verbindungen in <i>Drosophila</i> Epithelien.....	3
1.4	Verschiedene Proteinkomplexe sind an der Ausbildung der Zellpolarität während der Embryogenese beteiligt	4
1.4.1	Crb und Sdt sind weitere Faktoren zur Spezifizierung der Zellpolarität.....	5
1.4.2	Die Interaktionen der Proteine im Crb-Komplex	6
1.5	Sdt kolokalisiert mit Crb im subapikalen Komplex	7
1.5.1	<i>sdt</i> kodiert für verschiedene Isoformen	7
1.6	Die Funktion von humanen Crb1 und <i>Drosophila</i> Crb im Auge.....	10
1.7	Entwicklung des Komplexauges von <i>Drosophila melanogaster</i>	10
1.8	Das Komplexauge von <i>Drosophila melanogaster</i>	11
1.8.1	Mutationen in <i>Drosophila crb</i> verursachen Defekte in der Morphogenese der Photorezeptorzellen	13
1.8.2	Crb-mutante Augen zeigen lichtinduzierte Degeneration	15
1.8.3	Lichtinduzierte Degeneration kann in <i>crb</i> mutanten Augen mit einer Vitamin A Mangelernährung verhindert werden	16
1.9	Zielsetzung dieser Arbeit	17
2	Material und Methoden	18
2.1	Material	18
2.1.1	Chemikalien	18
2.1.2	Geräte, Computer und Software.....	19
2.1.3	Puffer, Lösungen und Medien.....	20
2.1.4	Antikörper	26
2.1.5	Fliegenstämme	28
2.1.6	Bakterienstämme	32
2.1.7	Verwendete Vektoren.....	32
2.2	Molekularbiologische Methoden.....	33
2.2.1	Herstellung und Transformation kompetenter Bakterien.....	33
2.2.2	Mini-Präparation von Plasmid-DNA	34
2.2.3	Midi-Präparation von Plasmid-DNA	35
2.2.4	Isolierung von genomischer DNA.....	35
2.2.5	Isolierung von Gesamt-RNA.....	35

2.2.6	Isolierung von poly(A) ⁺ RNA	36
2.2.7	Quantifizierung von DNA und RNA	36
2.2.8	Restriktionsverdau von Plasmid-DNA	37
2.2.9	Auffüllen 5'-überhängender Enden von DNA-Fragmenten	37
2.2.10	Dephosphorylierung von Vektorenden	38
2.2.11	Agarosegel-Elektrophorese	38
2.2.12	Elution von DNA-Fragmenten aus präparativen Gelen	38
2.2.13	Ligation von DNA-Fragmenten	38
2.2.14	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	39
2.2.15	Tabelle der verwendeten Primer zur Herstellung des GST-Fusionsproteins ...	40
2.2.16	Tabelle der verwendeten Primer zur Ermittlung der Mutationen	40
2.2.17	RT-PCR	41
2.2.18	RT-PCR Primer	43
2.2.19	Northern Blot Analyse	43
2.2.20	Herstellung DIG-markierter RNA Sonden	44
2.2.21	RNA/RNA in situ-Hybridisierung	44
2.2.22	Hybridisierung und Chemilumineszenz	45
2.3	Biochemische Methoden	47
2.3.1	Erzeugung von Sdt spezifischen Antikörpern	47
2.3.2	Herstellung von GST-Fusionsproteinen	47
2.3.3	Spezifität der Sdt-PDZ und Sdt-GUK-Antiseren	48
2.3.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	49
2.3.5	Coomassie Färbung	49
2.3.6	Western Blot Analyse	49
2.3.7	Herstellung von Embryo- oder Kopf-Extrakten	50
2.4	Genetische „ <i>Drosophila</i> “ Methoden	50
2.4.1	Fliegenzucht	51
2.4.2	Spezial-Futter für <i>Drosophila</i>	51
2.4.3	Das UAS/GAL4-System	52
2.4.4	Das FLP/FRT Expressionssystem	53
2.4.5	Herstellung von <i>sdt</i> Augenklonen mittels FLP/FRT System	53
2.4.6	Kreuzungen für die Rekombination von <i>sdt</i> mit FR19A	56
2.4.7	Kreuzungen zur Erzeugung kleiner und großer Augenklone	57
2.5	Histologische Methoden	58

2.5.1	Kutikulapräparation.....	58
2.5.2	Fixierung von Embryonen.....	58
2.5.3	Dechorionisierung für Embryonenlysate	59
2.5.4	Antikörperfärbungen an Embryonen.....	59
2.5.5	Antikörperfärbungen an Augen-Antennen-Imaginalscheiben	60
2.5.6	Antikörperfärbungen an <i>whole mount</i> adulten Augen	60
2.5.7	Osmiumfixierungen für Semidünnschnitte und Ultradünnschnitte an Augen .	60
2.5.8	Herstellung von Semidünnschnitten.....	61
2.5.9	Herstellung von Ultradünnschnitten für die elektronenmikroskopische Analyse.....	61
2.5.10	Lichtbedingungen für die Augenanalysen - Schwachlicht und Dauerlicht.....	62
3	Ergebnisse.....	63
3.1	Vorversuche	63
3.1.1	Die ausgewählten Stardust Allele zeigen <i>sdt</i> spezifische Kutikulaphänotypen	65
3.1.2	Sdt-PDZ und Sdt-GUK Antikörper zeigen spezifisch lokalisierte Sdt Färbungen an Embryonen	67
3.1.3	Stardust Expression in den verschiedenen <i>sdt</i> Allelen im Embryo.....	69
3.1.4	Stardust kolokalisiert mit Crb und DPatj im Rhabdomerstiel des adulten Komplexauges	71
3.2	Analyse von <i>sdt</i> mutanten Augenklonen.....	72
3.2.1	Die mutanten <i>sdt</i> -Allele lassen sich in vier phänotypische Klassen unterteilen.....	72
3.2.2	<i>sdt</i> Allele der Klasse I zeigen keinen mutanten Phänotyp im adulten Auge....	73
3.2.3	<i>sdt</i> Allele der Klasse II zeigen morphologische Defekte	77
3.2.4	<i>sdt</i> Allele der Klasse III zeigen lichtinduzierte Degeneration.....	80
3.2.5	<i>sdt</i> Allele der Klasse IV zeigen morphologische Defekte und lichtinduzierte Degeneration	83
3.3	Sdt wird in den mutanten Allelen unterschiedlich exprimiert.....	86
3.3.1	Klasse I: <i>sdt</i> ^{EH681} zeigt Sdt Expression im Auge.....	87
3.3.2	Klasse II: <i>sdt</i> ^{XP96} zeigt keine Sdt Expression in den Photorezeptoren	88
3.3.3	Klasse III: <i>sdt</i> ^{N5} ist kein <i>sdt</i> Null Allel im Auge	91
3.3.4	Die Klasse IV Allele <i>sdt</i> ^{K70} und <i>sdt</i> ^{K85} zeigen keine Sdt Expression	93
3.3.5	Die lichtabhängige Degeneration in <i>sdt</i> mutanten Klonen kann über ein Vitamin A Mangelmedium abgeschwächt werden	94

3.4	Molekulare Analyse der Mutationen der verschiedenen <i>sdt</i> Allele	97
3.5	EST-Klon Analysen identifizieren eine weitere embryonale Sdt Isoform.....	100
3.6	Nachweis spezifischer <i>sdt</i> Transkripte im Kopf mittels Northern Blot Analyse ...	101
3.7	Nachweis von gewebespezifischen Splicevarianten von Stardust	102
3.8	Identifizierung eines kopfspezifischen MAGUK-Transkriptes	105
4	Diskussion.....	108
4.1	Die analysierten <i>sdt</i> Allele bewirken unterschiedliche mutante Phänotypen im Komplexauge von <i>Drosophila</i>	108
4.1.1	Klasse I Allele: Sdt-MAGUK1 und Sdt-GUK1 sind im Komplexauge funktionslos.....	109
4.1.2	Klasse II Allel: Sdt zeigt eine Funktion in der Morphologie der PRZ.....	110
4.1.3	Klasse III Allel: Sdt zeigt eine Funktion in der lichtinduzierten Degeneration	112
4.1.4	Klasse IV Allele: Der völlige Verlust von Sdt bewirkt einen <i>crb</i> ähnlichen Phänotyp in <i>sdt</i> mutanten Augen.....	112
4.1.5	Sdt Isoformen besitzen unterschiedliche Funktion im Auge und im Embryo	113
4.2	Spezifische <i>sdt</i> Transkripte existieren im Komplexauge von <i>Drosophila</i>	116
4.3	Besitzt das identifizierte kopfspezifische MAGUK Transkript eine funktionelle Bedeutung?	117
4.4	Die lichtinduzierte Degeneration in <i>sdt</i> mutanten Augen weist auf eine Beteiligung von stabilen Rh1-Arr2 Komplexen hin	118
4.5	Welchen Einfluss besitzt das Pigment auf die lichtinduzierte Degeneration?	121
4.6	Crb Homologe im Auge von Vertebraten	122
4.7	MPP5: ein Sdt Homolog in Säugern	124
4.8	Ausblick	125
5	Zusammenfassung	127
6	Literatur	129
7	Anhang.....	135
7.1	Abkürzungen	135
7.2	RT-PCR-Sequenzen	136
7.2.1	<i>sdt</i> -i (2.902 bp)	136
7.2.2	<i>sdt</i> -k (1.211 bp)	137
7.3	Vergleich der verschiedenen <i>sdt</i> Transkripte auf genomischer Ebene.....	137
	Erklärung.....	139

1 Einleitung

Die Ausbildung einer Zellpolarität spielt bei vielen entwicklungsbiologischen Prozessen eine zentrale Rolle. Die Polarität einer Zelle bildet die Grundlage für gerichtete Sekretion, Signalübertragung und lokales Zellwachstum. Häufig wird Zellpolarität auch genutzt, um Entscheidungen über das Schicksal der Tochterzellen zu fällen, und somit ist sie letztendlich eine Voraussetzung für Zelldiversität und Gestaltbildung der Organe.

Zellpolarität wird als Asymmetrie in Zellform, in der Lokalisation zellulärer Komponenten und Organellen, von Membran und Membran-assoziierten Komponenten und Zellfunktion definiert. Nach heutigem Kenntnisstand sind viele der hierbei verwendeten molekularen Grundlagen für die Ausbildung der Zellpolarität in verschiedenen Organismen konserviert. Zellpolarität ist charakteristisch für Einzell-Organismen genauso wie für Zellen in Geweben von Vielzellern wie Würmern, Fliegen und Säugern. Diese Diversität wirft viele Fragen bezüglich der Mechanismen und der Vermittlung von Zellpolarität auf (zur Übersicht: Nelson, 2003).

Epithelien stellen eines der am Besten verstandenen Gewebe für die Etablierung und Aufrechterhaltung der Zellpolarität dar. Die Entwicklung von *Drosophila*, insbesondere die Entstehung und Aufrechterhaltung von Epithelien, ist genauestens beschrieben. Abweichungen von der wildtypischen Entwicklung können einfach ermittelt werden. Somit stellt *Drosophila* ein gutes Modellsystem dar, um Aspekte der Zellpolarität in verschiedenen Geweben zu untersuchen.

1.1 Zellpolarität in Epithelien

Epithelien werden auch als Abschlussgewebe bezeichnet, da sie aufgrund ihrer Anordnung eine hohe mechanische Festigkeit besitzen und Permeabilitätsgrenzen für Flüssigkeiten darstellen. Sie können unterschiedliche Funktionen ausüben: Sie dienen dem Schutz (Hautepithel), der Resorption (Darmzottenepithel), der Sekretion (Drüsen) und der Reizaufnahme (Sinnesepithel). Alle epithelialen Zellen besitzen einen polaren Aufbau, der an drei verschiedenen Aspekten gezeigt werden kann: Der Polarität der Membran, der polaren Organisation des Zytoskeletts und der polaren Organisation von Zellorganellen und Membran-assoziierten Komponenten. So kann die Plasmamembran in eine apikale und eine basolaterale Domäne unterteilt werden. Dabei ist die apikale Membran der Außenwelt oder einem Lumen zugewandt, die basolaterale Domäne ist mit den benachbarten Zellen und dem

Interzellularraum verbunden. Über die Zell-Matrix-Haftverbindungen sind die Epithelzellen mit der darunter liegenden Basallamina verknüpft. Die Domänen unterscheiden sich nicht nur funktionell, sondern auch in ihrer Protein- und Lipidzusammensetzung (Eaton und Simons, 1995).

An der lateralen Membran übernehmen die verschiedenen Zell-Zell-Kontaktstrukturen je nach Art unterschiedliche Funktionen. Einige verbinden die benachbarten epithelialen Zellen miteinander, andere bilden Diffusionsbarrieren oder dienen der interzellulären Kommunikation. Dadurch regulieren Epithelien die Bewegung von Ionen und Molekülen und beeinflussen so die physiologische Zusammensetzung der Körperkompartimente (zur Übersicht: Nelson, 2003; Rodriguez-Boulan und Nelson, 1989; Tepass et al., 2001; Yeaman et al., 1999).

Auch die zytoplasmatische Organisation zeigt einen polaren Aufbau. Die Mikrotubuli sind apiko-basal ausgerichtet, wodurch sie den gerichteten Transport von Membranproteinen und die asymmetrische Verteilung von zytoplasmatischen Komponenten ermöglichen (Eaton und Simons, 1995; Mays et al., 1995). Lokalisationssignale in den Proteinen ermöglichen über das Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) einen Transport in Vesikeln an die apikale und basolaterale Membran (Matter et al., 1992).

Im apikalen Bereich werden Komponenten des Aktinzytoskeletts konzentriert (Adhäsionsgürtel). Über die spezifische Expression unterschiedlicher Spektrine wird ein spezifisches Membranzytoskelett aufgebaut (Dubreuil und Yu, 1994), das mit F-Aktin und den jeweiligen Membranproteinen und Phospholipiden verbunden ist (zur Übersicht: Nelson et al., 2000). Dieses polare Zytoskelett stellt die Basis für Zellformveränderungen und die Stabilität der Epithelien dar. Es bewahrt die Integrität der Epithelien, die vielfältigen morphogenetischen Bewegungen unterworfen sind.

Der Verlust der interzellulären Verbindungen führt zum Zerfall des Epithels und häufig zum Zelltod. Außerdem kann der Verlust von Zelladhäsion einhergehen mit Tumorentwicklung und Metastasis.

1.2 Primäre und sekundäre Epithelien in *Drosophila melanogaster*

In *Drosophila melanogaster* wird zwischen primären und sekundären Epithelien unterschieden. Primäre Epithelien entwickeln sich direkt aus dem primären Epithel des *Drosophila* Embryos, dem einschichtigen Blastoderm. Epithelien ektodermalen Ursprungs sind die larvale und adulte Epidermis, Vorder- und Hinterdarm, Malpighische Gefäße,

Tracheen und Speicheldrüsen. Sekundäre Epithelien entstehen später in der Entwicklung aus mesenchymalen Geweben. Zu ihnen gehören das Mitteldarmgewebe und das dorsale Gefäß. Sie unterscheiden sich von den primären Geweben nicht nur durch ihre Entstehung, sondern auch durch ihre Struktur und den Mechanismus, der zur Zellpolarisierung verwendet wird (zur Übersicht: Tepass, 1997).

1.3 Zelluläre Verbindungen in *Drosophila* Epithelien

Epithelien besitzen entlang ihrer basolateralen Zelloberfläche verschiedene Zell-Zell-Kontaktstrukturen. Diesen Kontaktstrukturen fallen unterschiedliche Aufgaben zu. Zum einen vermitteln sie die Adhäsion zwischen den benachbarten Zellen und tragen somit zur Festigkeit des Epithels bei. Zweitens ermöglichen sie den Transport spezifischer Ionen und Moleküle von Zelle zu Zelle, aber auch durch die Epithelschicht hindurch. Zum dritten sind einige der Kontaktstrukturen an Signalprozessen für die Bewegung, Differenzierung und Wachstum beteiligt. In *Drosophila* existieren verschiedene Typen von zellulären Verbindungen. Dazu gehören die *Gap junctions* (kommunizierende Verbindungen), die *Septate junctions* (Verschlusskontakte) und *Zonula adherens* (Haftverbindungen). Die in Vertebraten apikal lokalisierten undurchlässigen Verbindungen *Tight junctions* (TJ) (Eaton und Simons, 1995; Gumbiner, 1993) konnten in Epithelien von Arthropoden bislang nicht nachgewiesen werden.

Die *Gap junctions* (GJ) ermöglichen den Transport von Ionen und kleinen Molekülen zwischen den benachbarten Zellen, wodurch diese physiologisch miteinander verbunden sind. Sie kommen in fast allen Geweben vor (zur Übersicht: Bryant, 1997).

Die *Septate junctions* (SJ) stellen eine trans-epitheliale Barriere in den meisten Epithelien der Nicht-Chordata dar, indem sie den parazellulären Fluss blockieren (Skaer et al., 1987). Es wird angenommen, dass sie damit ein funktionelles Homolog zu den *Tight junctions* (TJ) der Vertebraten bilden, obwohl sie keinerlei homologe Proteine beinhalten. Sie erstrecken sich jedoch, anders als die apikalen TJ in Vertebraten, über einen weiteren Bereich der lateralen Membran, basal der *Zonula adherens* (ZA).

Die SJ werden erst nach der Zellularisierung sichtbar, wenn die Zellpolarität etabliert und die ZA gebildet ist (ab Stadium 14). Die Bedeutung der SJ bei der Etablierung der Zellpolarität ist unklar, da die ZA und die apikale und basolaterale Polarität schon vor ihrem Entstehen etabliert sind, obwohl einige ihrer Komponenten schon in der frühen Embryogenese exprimiert werden (Dlg, Scrib). Mutationen in verschiedenen SJ Komponenten

beeinträchtigen nur die SJ selbst, jedoch nicht die ZA oder andere apikale Komponenten (Tepass et al., 2001).

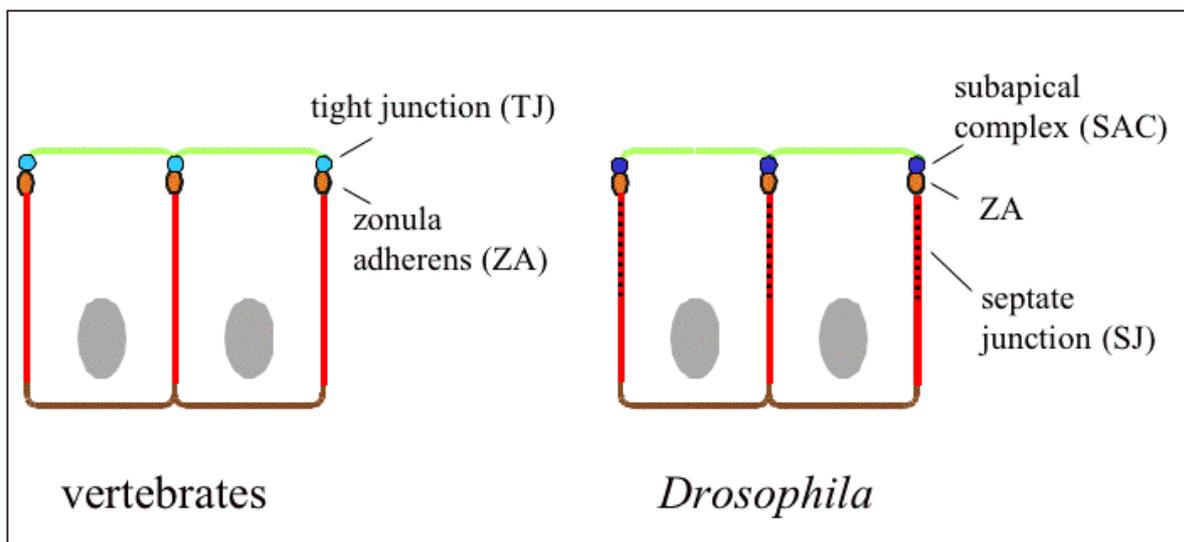


Abb. 1.1 Vertebraten und *Drosophila* Epithelzellen mit ihren spezialisierten Membrandomänen. Im linken Teil der Abb. ist das Schema einer Vertebraten Epithelzelle dargestellt. Als Zellkontaktstrukturen finden sich *Tight junctions* (TJ) und *Zonula adherens* (ZA). In den rechts gezeigten *Drosophila* Zellen finden sich die *Zonula adherens* (ZA), *Septate junctions* (SJ) und die subapikale Region. Die subapikale Region (SAR), apikal der ZA, ist keine Zellkontaktstruktur im engeren Sinne, dort sind Proteinkomplexe (Crb- und Baz-Komplex) lokalisiert, die an Bildung und Aufrechterhaltung der ZA beteiligt sind (entnommen aus: Knust und Bachmann, 2003).

Die *Adherens junctions* (AJ) sind für die feste Verbindung der benachbarten Zellen miteinander verantwortlich. Sie befinden sich an der Grenze zwischen apikaler und basolateraler Domäne, wo sie einen durchgehenden Gürtel ausbilden. Die Adhäsion benachbarter Zellen wird in den AJ durch die Interaktion des Cadherin-Catenin-Komplexes aus DE-Cadherin (Shotgun, Shg), α -Catenin und β -Catenin (Armadillo, Arm) erreicht (Grawe et al., 1996; Müller und Wieschaus, 1996; Tepass et al., 1996), die auch mit dem Aktin-Zytoskelett vernetzt sind.

1.4 Verschiedene Proteinkomplexe sind an der Ausbildung der Zellpolarität während der Embryogenese beteiligt

Die Untersuchung der epithelialen Differenzierung in *Drosophila melanogaster* führte zur Charakterisierung von verschiedenen Proteinkomplexen, die an der Regulierung der Polarität und Ausbildung der Zell-Zell-Verbindungen beteiligt sind. Die Proteine Crumbs (Crb), Scribble (Scrib), Bazooka (Baz), Armadillo (Arm), Lethal giant larvae (Lgl) und Stardust (Sdt) zeigen eine asymmetrische Verteilung in den sich bildenden lateralen Membranen und

liegen in Komplexen vor, die mit der Plasmamembran assoziiert sind (zur Übersicht: Tepass, 2002).

Durch die Aufteilung der verschiedenen apikalen und lateralen Proteinkomplexe in die Regionen der Plasmamembran, wird die Plasmamembran der Epithelzellen in drei Bereiche unterteilt: Die apikale Membrandomäne, die sich in die apikale und subapikale Region (SAR) gliedern lässt, die Region der ZA und die basolaterale Region, die basal der ZA liegt.

Der Crumbs- (Crb, Sdt, DPatj) (Bachmann et al., 2001; Pielage et al., 2003; Tepass et al., 1990) und der Bazooka-Komplex (Baz, Par-6, aPKC und Cdc-42) (Gotta et al., 2001; Joberty et al., 2000; Kuchinke et al., 1998; Petronczki und Knoblich, 2001) befinden sich in der subapikalen Region. Basal dazu konnte an der lateralen Membran der Discs large Komplex (Dlg, Lgl, Scrib) (Bilder et al., 2000) als basolaterale Komponente identifiziert werden. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass das multi-PDZ Protein Bazooka die initiale Rolle in der Etablierung der apikalen Membrandomäne und dem Aufbau der ZA spielt (Harris TJ, 2004). Daraus folgt, dass der apikale Crb Komplex eher eine Funktion in der Etablierung der ZA und der Aufrechterhaltung der Zellpolarität besitzt. Dabei interagieren der apikale Crb und der basolaterale Dlg Komplex antagonistisch miteinander, um die distinkten apikalen und basolateralen Domänen zu definieren. In diesen Prozessen der Aufrechterhaltung der epithelialen Polarität besitzen Baz, Crb und Sdt stark redundante Funktionen (Harris TJ, 2004).

1.4.1 Crb und Sdt sind weitere Faktoren zur Spezifizierung der Zellpolarität

Homozygot mutante *crb* und *sdt* Embryonen sterben durch den Verlust der Zellpolarität während der Embryogenese. Die mutanten Embryonen dieser beiden Gene zeigen in Keimbahnklonen keine verstärkten Defekte, so dass maternale Komponenten ausgeschlossen werden können. In *crb* und *sdt* mutanten Embryonen wird keine ZA etabliert und das punktierte *Adhärens junctions* Material verbleibt verteilt (Grawe et al., 1996; Müller und Wieschaus, 1996; Tepass, 1996). Das Fehlen der ZA ist eine der Hauptursachen des Gewebezusammenbruchs, der in den mutanten Embryonen beobachtet wird. Die epithelialen Zellen runden sich ab, und ein massiver Zelltod eliminiert die meisten der epithelialen Zellen der Epidermis. Eine Reihe von apikalen Markern wie β -h-Spektrin gehen in mutanten *crb* Embryonen verloren (Wodarz et al., 1995), was auf den Verlust der apikalen Domäne schließen lässt. Somit kommt den Proteinen des Crb Komplexes eine entscheidende Bedeutung für die Etablierung der ZA und Aufrechterhaltung der Zellpolarität zu. *crb* und *sdt* zeigen, neben den Ähnlichkeiten im Phänotyp, auch eine genetische Interaktion (Knust et al.,

1993). Eine zusätzliche Kopie von *sdt* schwächt den *crb*-mutanten Phänotyp stark ab, umgekehrt ist dies allerdings nicht der Fall. Damit ist *sdt* in der Wirkungskette unterhalb von *crb* anzuordnen.

1.4.2 Die Interaktionen der Proteine im Crb-Komplex

Der Crb-Komplex (Abb. 1.2) besteht aus dem Transmembranprotein Crb (Tepass et al., 1990), dem MAGUK Protein Sdt (Bachmann et al., 2001; Hong et al., 2001), dem Multi-PDZ Protein DPatj (*protein associated to tight junctions*) (Pielage et al., 2003) und dem PDZ-Protein DLin-7 (Bachmann et al., 2004). *crb* wurde als erstes Schlüsselgen in der epithelialen Polarisation identifiziert und kodiert ein Transmembranprotein (2146 AS). Es besitzt eine große extrazelluläre Domäne mit 30 EGF-ähnlichen (EGF= epidermaler Wachstumsfaktor) und vier LG Domänen, die mit der globulären Domäne von Laminin A verwandt sind (Tepass et al., 1990). Bisher wurde noch kein Interaktionspartner für diese extrazelluläre Domäne identifiziert. Die kurze zytoplasmatische Domäne (37AS) besitzt zwei bekannte funktionelle Motive: Das carboxy-terminale Aminosäuremotiv „ERLI“ und die sogenannte FERM-Domäne (4.1-Protein/Ezrin/Radixin/Moesin) (Chishti et al., 1998). Ersteres ist ein PSD95/discs large/zonula occludens (PDZ) Bindemotiv und interagiert mit Sdt (Bachmann et al., 2001). DMoesin bindet an die FERM-Domäne und verbindet den Crb Komplex über β -Heavy-Spektrin mit dem Spektrin-Zytoskelett (Medina et al., 2002).

Stardust gehört zu den MAGUK Proteinen (*membrane associated guanylate kinase homologs*), die multiple Proteininteraktionsdomänen besitzen und dadurch in der Lage sind, Proteinnetzwerke auszubilden (zur Übersicht: Caruana, 2002).

Das MAGUK Protein Stardust besitzt eine PDZ, eine SH3 (*Src homology region 3*), eine Hook, eine C-terminale Guanylat Kinase-ähnliche Domäne (GUK) und zwei L27 (Lin-2 Lin-7) Motive. Es bindet mit seiner L27N Domäne an die L27 Domäne von DPatj, ein Protein mit 4 PDZ und einem L27 Motiv, (Roh et al., 2002, persönl. Mitteilung Ö. Kempkens). Außerdem kann es mit seiner zweiten L27C Domäne an DLin-7 binden (Bachmann et al., 2004, Abb. 1.2). Eine direkte Interaktion für Sdt und D-Par-6 konnte gezeigt werden (Wang et al., 2004). Hierbei ist die evolutionär konservierte Region (ECR1) im Aminoterminus von Sdt für die Bindung an die CRIB-PDZ Region von Par-6 essentiell. Durch diese Interaktion von Crb oder Sdt zu Par-6 entsteht eine Verbindung zwischen Komponenten des Crb und Baz Komplexes. Obwohl vielfältige Interaktionspartner des Crb Komplexes identifiziert werden konnten, war es bisher nicht möglich, die einzelnen Proteine speziellen Signalkaskaden oder Prozessen zuzuordnen.

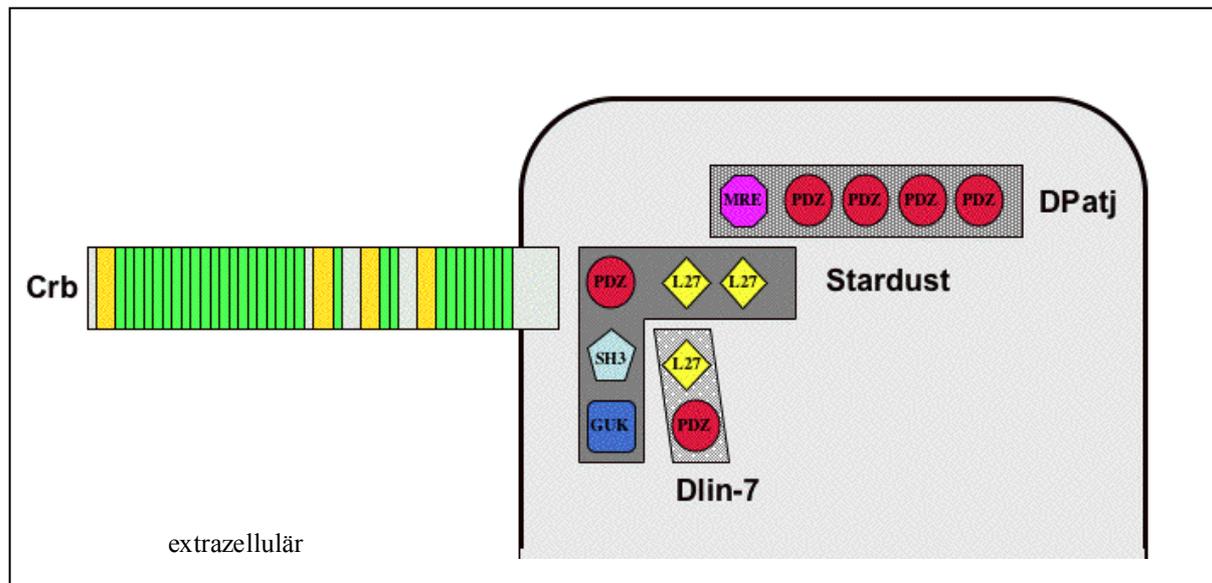


Abb. 1.2 Die Proteine des Crb-Komplexes (modifiziert nach: Knust und Bachmann, 2003).

Gezeigt ist ein schematischer Ausschnitt einer epithelialen Zelle, in der die Proteine des Crb Komplexes in der subapikalen Region lokalisieren. Das Transmembranprotein Crb interagiert mit dem MAGUK-Protein Sdt, das wiederum mit DPatj und Dlin7 interagiert (Details und weitere interagierende Proteine s. Text).

1.5 Sdt kolokalisiert mit Crb im subapikalen Komplex

Sdt Protein wird während der Embryogenese in allen Epithelien ektodermaler Herkunft ab dem Blastodermstadium exprimiert und apikal zur ZA in der sogenannten subapikalen Region (SAR) lokalisiert. Das entspricht dem Expressionsmuster von Crb. In älteren Stadien konnte eine apikale Färbung in den vom Ektoderm abstammenden primären Epithelien (Epidermis, Vorderdarm, Hinterdarm, Tracheen, Malpighische Gefäße) gezeigt werden (Bachmann et al., 2001; Hong et al., 2001). Auch in den larvalen Imaginalscheiben, die ektodermalen Ursprungs sind, ist Sdt Expression zu finden. Aus den Imaginalscheiben leiten sich die meisten adulten Strukturen ab (wie Auge, Flügel).

1.5.1 *sdt* kodiert für verschiedene Isoformen

Der *sdt* Locus umfasst eine genomische Region von über 50000 bp (Berkeley Drosophila genome project, BDGP), in der bisher bis zu 13 Exons (10 kodierende und drei UTR Bereiche, Abb. 1.3) für die verschiedenen Sdt Proteine kodieren (Abb. 1.4). Die Transkripte unterscheiden sich in ihrem 5'-UTR und der Anzahl der Exons (Abb. 1.3).

Bisher konnten vier differentiell gespleisste *sdt* cDNAs aus embryonalen cDNA Bibliotheken identifiziert werden (Bachmann et al., 2001; Hong et al., 2001). Diese *sdt* Transkripte können entweder für ein Protein der MAGUK Familie (Sdt-MAGUK1, SdtB) oder ein GUK-Protein

(Sdt-GUK1) kodieren (Abb. 1.4). Die Sdt-MAGUK Proteine gehören in der Familie der MAGUK Proteine zur p55 Subfamilie (Dimitratos et al., 1999). Diese sind gekennzeichnet durch vielfältige Interaktionsdomänen: Eine PDZ (PSD-95, Discs large, ZO-1), eine SH3, eine Hook, eine GUK (Guanylate Kinase) Domäne und zwei L27 Motive (Bachmann et al., 2004). Neben den beschriebenen Domänen wurden zwei evolutionär konservierte Regionen (ECR1 und ECR2) im aminoterminalen Bereich von Sdt identifiziert (Wang et al., 2004), die für die Bindung mit Par-6 von Bedeutung sind. Dadurch können MAGUK Proteine Signal- und Zytoskelettmoleküle in Multiproteinkomplexen verbinden und diese an Zell-Zell Kontaktstrukturen lokalisieren.

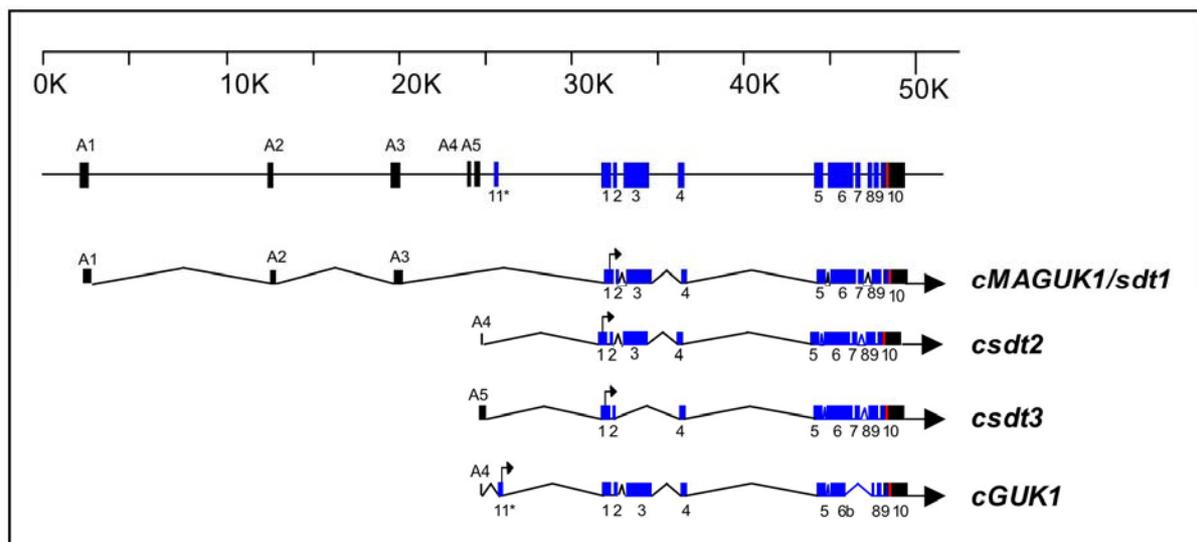


Abb. 1.3 Der genomische *sdt* Lokus.

Der Sdt Lokus umfasst eine genomische Region von über 50 kb und kodiert für drei verschiedene *sdt* Transkripte. Blau = kodierende Exons, schwarz = UTR Bereiche, Pfeil = putativer Translationsstart (ATG). Die Nummerierungen wurden aus der Veröffentlichung von Hong *et al.* übernommen, die keine *cGUK1* kannten. Durch die nachträgliche Übertragung der Nummerierung auf das *cGUK1* Transkript ergab sich deshalb ein Exon 11 als erstes Exon (weitere Details siehe Text).

Die *cMAGUK1* cDNA oder *sdt1* wurde sowohl von Bachmann *et al.* (*cMAGUK1*) als auch von Hong *et al.* (*sdt1*) identifiziert. Sie hat eine Größe von 5,7 kb, und das daraus resultierende Protein (Abb. 1.4) entspricht einem MAGUK Protein mit zwei L27-Domänen, je einer PDZ, SH3, Hook und GUK Domäne sowie den zwei evolutionär konservierten Regionen (ECR1 und 2). Die *cMAGUK1* cDNA besteht aus drei nicht Protein-kodierenden Regionen (A1-A3, UTR= *untranslated regions*) und 10 kodierenden Exons (1-10, beginnend mit dem ersten Exon, in dem sich der putative Translationsstart befindet).

Eine zweite für ein MAGUK Protein kodierende cDNA ist *csdt2* (Hong et al., 2001) . Diese hat eine Größe von 6,2 kb und unterscheidet sich von *cMAGUK1* nur in einem anderen 5'-

UTR. Auf Proteinebene resultiert daraus jedoch das gleiche Protein Sdt-MAGUK1 (Sdt1) (Abb. 1.4), da der Translationsstart (Pfeil) auch hier im Exon 1 liegt (Hong et al., 2001).

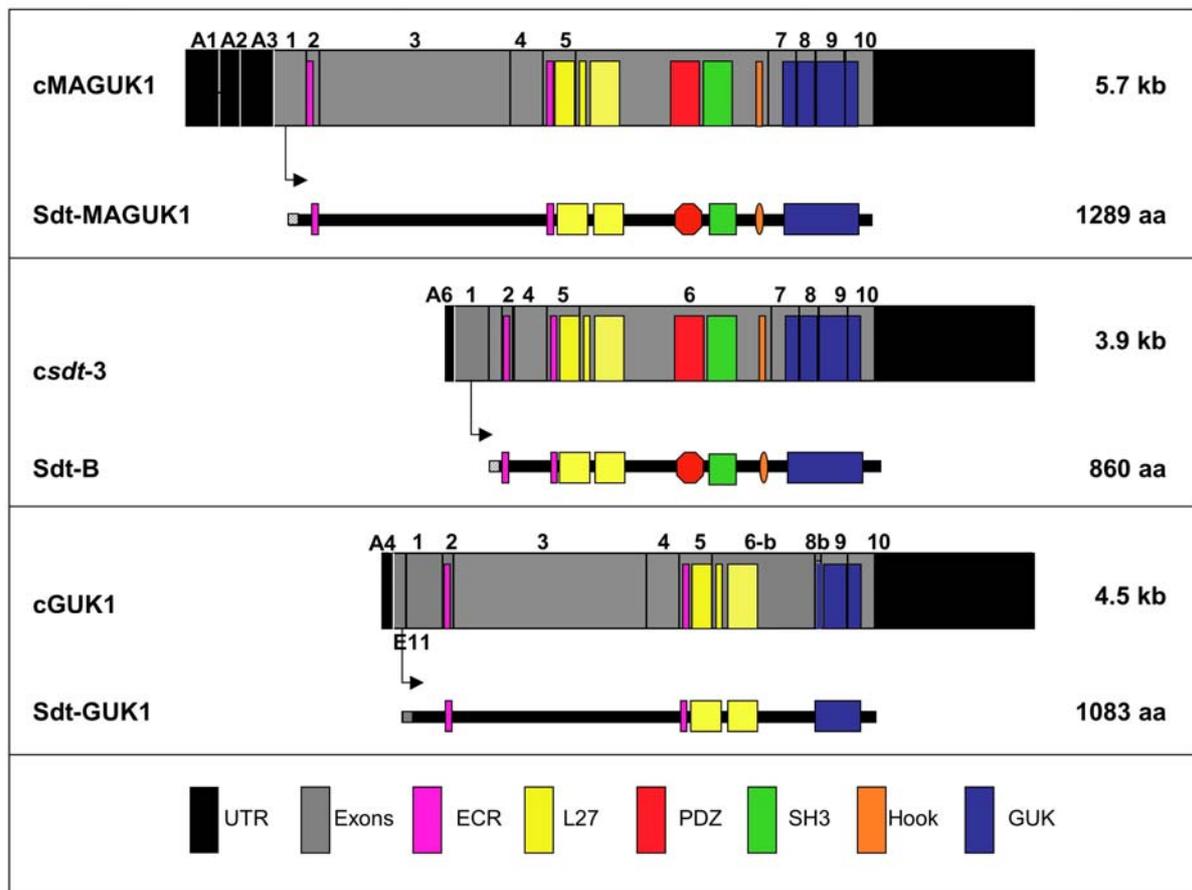


Abb. 1.4 Schematische Übersicht der embryonalen *sdt* Transkripte und Sdt Isoformen.

Die Protein-kodierenden Exons sind in grau dargestellt und durchnummeriert, die nicht Protein-kodierenden UTR Bereiche sind in schwarz dargestellt und mit A und einer Zahl durchnummeriert. Teilweise gibt es verkürzte Exons, was durch ein b in der Nummerierung gezeigt wird. In den einzelnen Exons ist die Lokalisation der verschiedenen Motive eingezeichnet, so dass die genaue Zusammensetzung der einzelnen cDNAs ersichtlich wird. Der putative Translationsstart (ATG) ist in dem jeweiligen Exon mit einem Pfeil angedeutet

Eine dritte und letzte MAGUK kodierende cDNA ist *csdt3*. Im Vergleich zur *cMAGUK1* cDNA besitzt sie einen deutlich kürzeren 5'-UTR und Exon 3 fehlt vollständig (1300 bp). Der 5'-UTR ist der gleiche wie in *csdt2* und auch der Translationsstart liegt hier in Exon 1. Das daraus resultierende Protein SdtB unterscheidet sich von dem Sdt-MAGUK1 Protein durch eine kürzere aminoterminal Region (fehlendes Exon 3).

Die alternativ gespleisste *cGUK1* kodiert für ein GUK-Protein. Sie besitzt einen anderen 5'-UTR und Translationsstart (in Exon 11). Das daraus resultierende Protein (Sdt-GUK1, Abb. 1.4) enthält nur die ECR Motive, L27 Domänen und Teile der GUK Domäne. Die PZD, SH3, Hook Domäne sowie Teilbereiche der GUK Domäne aus Exon 7 und 8 fehlen.

1.6 Die Funktion von humanen CRB1 und *Drosophila* Crb im Auge

Crb Homologe sind bereits in Maus, *C. elegans*, *Homo sapiens* und *Tribolium castaneum* identifiziert worden. Insbesondere die zytoplasmatische Domäne zeigt eine hohe Konservierung. So ist die zytoplasmatische Domäne des humanen CRB1 in der Lage, den *crb*-mutanten Phänotyp in *Drosophila* genauso gut abzuschwächen, wie die entsprechende Domäne von *Drosophila*. Überexpression der humanen zytoplasmatischen CRB1-Domäne in *Drosophila* erzeugt, wie die *Drosophila* Domäne selbst, ein vielschichtiges Epithel (den Hollander et al., 2001b).

Mutationen im humanen CRB1 sind Auslöser verschiedener retinaler Dystrophien, wie Retinitis pigmentosa (RP12) und Leber congenital amaurosis (LCA) (Cremers et al., 2002; den Hollander et al., 2001a; den Hollander et al., 1999; Lotery et al., 2001).

RP12 ist charakterisiert durch einen frühen Beginn der retinalen Degeneration und führt zu einem vollständigen Erblinden der Patienten im Alter von etwa zwanzig Jahren. LCA dagegen ist eine noch früher einsetzende retinale Dystrophy, die schon während der Geburt oder in den ersten Lebensmonaten zur vollkommenen Erblindung führt.

Die strukturelle und funktionelle Konservierung von Crb und CRB1 führte zu näheren Analysen in *Drosophila*, die sowohl die morphologischen Aspekte (Izaddoost et al., 2002; Pellikka et al., 2002), als auch die retinalen Degenerationsphänotypen betreffen (Johnson et al., 2002).

1.7 Entwicklung des Komplexauges von *Drosophila melanogaster*.

Die Komplexaugen von *Drosophila* werden während der Embryogenese als Augen-Antennen-Imaginalscheiben angelegt. Sie entstehen aus dem Blastoderm und gehören zu den primären Epithelien (Wolff und Ready, 1991).

Während der larvalen Stadien laufen zwei Wellen mitotischer Aktivität von posterior nach anterior über die Imaginalscheibe (Wolff und Ready, 1991). In der ersten Welle finden nur Zellteilungen statt, ohne dass eine Festlegung bzw. Differenzierung der Zellen auftritt. Zwischen den beiden Wellen läuft die sogenannte morphogenetische Furche. Diese Furche ist bei großer Vergrößerung auch als solche zu erkennen und läuft mit den mitotischen Wellen mit. Im frühen dritten Larvenstadium beginnt direkt hinter der morphogenetischen Furche die Differenzierung der ommatidialen Vorläuferzellen. Die Gruppierung beginnt bei der Photorezeptorzelle R8, um die sich die weiteren sieben Photorezeptorzellen nacheinander anordnen (R2 und R5, gefolgt von R3 und R4, R1 und R6, zuletzt R7). Danach entstehen die

vier Semperzellen (Linsen-sezernierende Zellen). Während der pupalen Entwicklung differenzieren sie sich durch induktive Prozesse die interommatidialen Pigmentzellen und Borsten (Cagan und Ready, 1989; Rubin, 1989). Überschüssige Zellen werden mittels Zelltod eliminiert (PCD), so dass ein regelmäßiges hexagonales Wabenmuster entsteht (Hay et al., 1994; Wolff und Ready, 1991). Zu diesem Zeitpunkt wird auch die Linse sekretiert. Während der zweiten Phase, der sogenannten Reifung der Ommatidien, neigen sich die Photorezeptorzellen um 90° zur Seite, so dass ihre apikalen Membranen im Inneren des Ommatidiums zueinander liegen (s. Abb. 1.5, C) (Wolff und Ready, 1993). Ein starkes Wachstum der apikalen Membrandomäne führt zur Bildung der Rhabdomere. Außerdem wird nun der Rhabdomerstiel (*stalk membrane*) von der apikalen Domäne ausgebildet, die zwischen dem Rhabdomer und der Adhäsionsverbindung liegt. Die Photorezeptorzellen (Ommatidien) verlängern sich nun in proximo-distaler Richtung und wachsen von einer Länge von 15 µm (50% Pupalentwicklung) auf 100 µm am Ende der pupalen Entwicklung heran (Izaddoost et al., 2002; Johnson et al., 2002; Pellikka et al., 2002).

1.8 Das Komplexauge von *Drosophila melanogaster*

Das adulte Komplexauge von *Drosophila* besteht aus ca. 800 Ommatidien, die in einem sich streng wiederholenden Muster angeordnet sind (Abb. 1.5, A). Jedes einzelne, hexagonale Ommatidium besteht aus acht Photorezeptorzellen, die mit ihren photosensitiven Rhabdomeren für die Reizaufnahme verantwortlich sind, vier linsensezernierenden Semperzellen (*cone cells*) und zwei primären Pigmentzellen (Abb. 1.5, D). Zusätzlich teilt sich jedes Ommatidium mit seinem Nachbarommatidium sechs sekundäre und drei tertiäre Pigmentzellen. Außerdem besitzt jedes Ommatidium eine interommatidiale Borste.

Die Phototransduktion findet in den hoch spezialisierten Rhabdomeren statt. Die Rhabdomere bestehen aus in Mikrovilli gefalteten Membranen, die die apikale Zelloberfläche der Photorezeptorzelle darstellen.

Von den acht Photorezeptorzellen sind in einem tangentialen Schnitt (entspricht einem Querschnitt durch ein Ommatidium) immer nur sieben Zellen mit ihren Rhabdomeren zu sehen (Abb. 1.5, C). Ein Querschnitt durch den distalen Teil des Ommatidiums zeigt die äußeren R1 - R6 Zellen sowie die innere R7 Zelle (der lange Rhabdomerstiel und das relativ kleine Rhabdomer sind charakteristisch für R7), während ein proximaler Schnitt anstelle der R7 die R8 Zelle zeigt (s. Abb. 1.5, D).

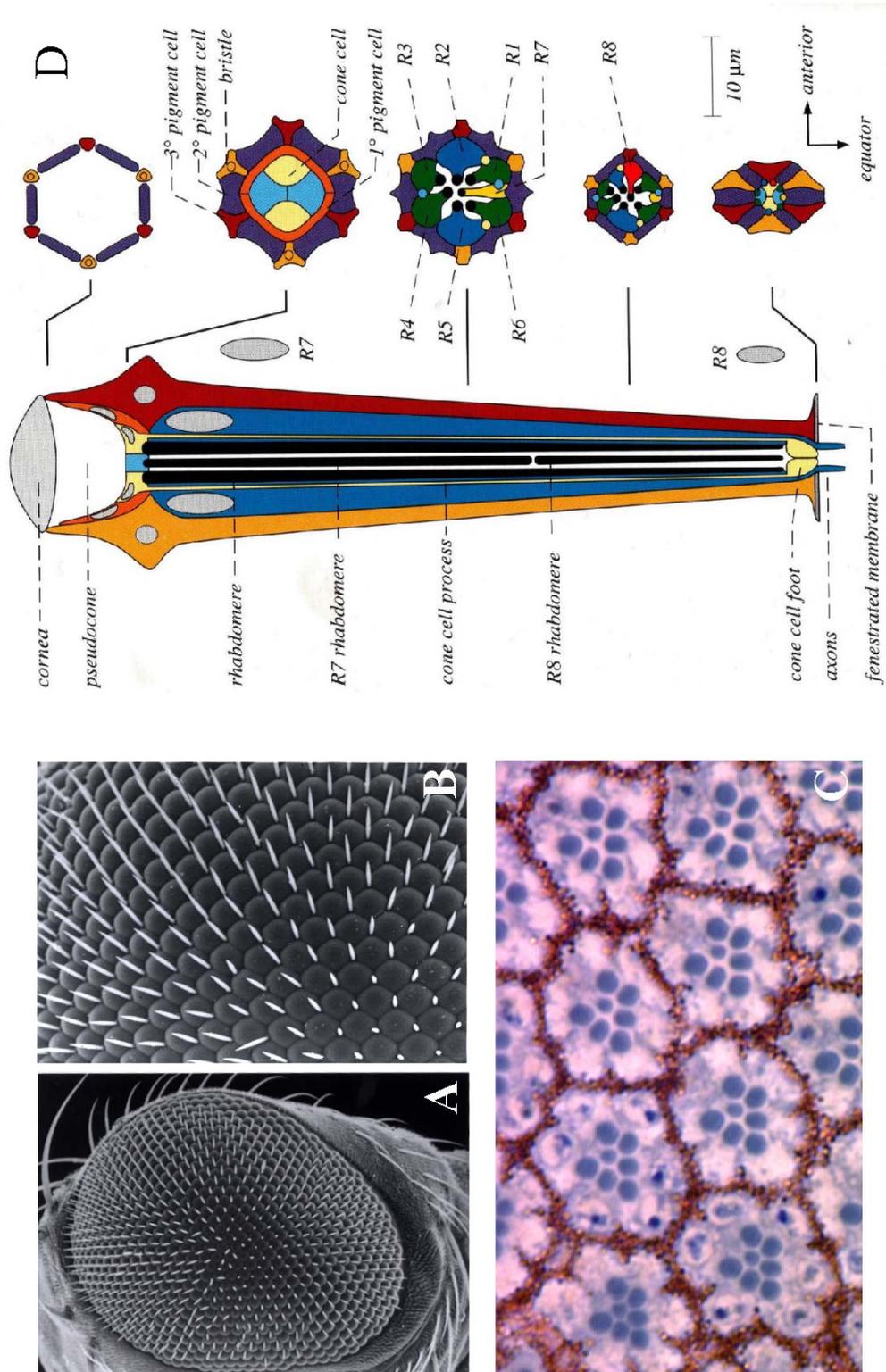


Abb. 1.5 Übersicht über das Komplexauge von *Drosophila* (entnommen aus: Cagan und Ready, 1989). (A/B) Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen eines wildtypischen Auges in Übersicht und Vergrößerung. Semidünnschnitt durch ein wildtypisches Auge (Details siehe Einleitung). (C) Ommatidien eines wildtypischen Auges im Querschnitt. (D) Schematische Darstellung eines einzelnen Ommatidiums und Schnitte von distal nach proximal durch das Ommatidium.

Die Photorezeptorzellen werden, in Abhängigkeit des von ihnen exprimierten Pigments, in drei verschiedene Klassen unterteilt. Die äußeren R1 bis R6 Zellen exprimieren Rhodopsin 1, ein für blaues Licht sensitives Opsin, und strecken sich durch das gesamte Ommatidium (von proximal nach distal). Die innere R7 Zelle exprimiert Rhodopsin 3 oder 4, ultraviolett sensitive Opsine, und erstreckt sich nur durch den distalen Teil des Ommatidiums. Die innere R8 Zelle exprimiert Rhodopsin 5 oder 6, die Opsine absorbieren blaues (Rh5) bis grünes (Rh6) Licht (Chou et al., 1996; Fortini und Rubin, 1990; Montell et al., 1987), und erstreckt sich nur durch das proximale Drittel des Ommatidiums. Während R1 - R6 für die Erkennung von Bewegung zuständig sind, zeigen sich die beiden inneren Photorezeptorzellen R7 und R8 für das Farbsehen verantwortlich (Cook und Desplan, 2001). Die Unterscheidung der Photorezeptorzellen spiegelt sich auch in der Lokalisation ihrer Axonendigungen wieder: Sie projizieren durch die Basallamina hindurch in die Medulla (R7 und R8) oder in die Lamina (R1 bis R6) (Hardie, 1985).

1.8.1 Mutationen in *Drosophila crb* verursachen Defekte in der Morphogenese der Photorezeptorzellen

Die Photorezeptorzellen sind differenzierte, primäre Epithelzellen, die die typische apiko-basale Polarität der Epithelzellen des Embryos besitzen, wenn sie um 90° gedreht werden (Abb. 1.6). Crb lokalisiert in den adulten Photorezeptorzellen (PRZ) im Rhabdomerstiel (*stalk membrane*), dies entspricht einem Teilbereich der apikalen Membrandomäne (Johnson et al., 2002; Pellikka et al., 2002). In frühen, undifferenzierten retinalen Epithelzellen ist Crb an der gesamten apikalen Membran zu finden. Nach der Etablierung des Rhabdomerstiels befindet es sich ausschließlich im Rhabdomerstiel, benachbart zur *Zonula adherens* und den Rhabdomeren (Johnson et al., 2002; Pellikka et al., 2002). Die *Zonula adherens* grenzt auch in den PRZ die apikale Membrandomäne von der basolateralen Domäne ab. An der lateralen Domäne befinden sich die *Septate junctions*.

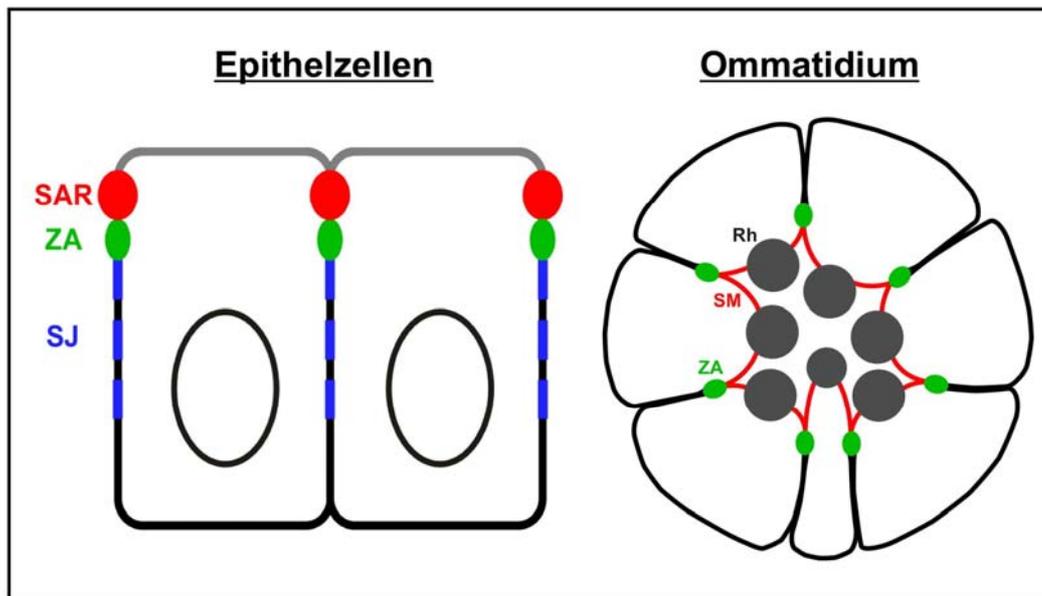


Abb. 1.6 Schematische Darstellung der apiko-basalen Polarität von Epithelzellen im Vergleich zu einem Ommatidium (entnommen aus: Knust und Bachmann, 2003).

Längsschnitt durch ein Epithel (links) und Querschnitt durch die Photorezeptorzellen eines Ommatidiums (rechts). In der subapikalen Region (SAR, rot) lokalisieren die Proteine des Crb Komplexes. ZA= Zonula adherens (grün), SJ= Septate junctions (blau), Rh= Rhabdomer, SM= Stalk membrane (Rhabdomerstiel).

Die Analysen von *crb* mutanten Augenklonen zeigten zwei verschiedene Arten von Phänotypen im Auge, den morphologischen Phänotyp und den lichtinduzierten, progressiven Degenerationsphänotyp. Ersterer ist unter normalen Lichtbedingungen zu beobachten, während der Degenerationsphänotyp nur unter konstantem Dauerlicht zu detektieren ist.

Der morphologische Phänotyp zeigt Defekte, die zwischen den Ommatidien variieren können und die Photorezeptorzellen und Pigmentzellen der Ommatidien betreffen. Das *crb*^{11A22} Allel zeigt Unregelmäßigkeiten in der Anordnung der Ommatidien sowie in der Position und Anzahl der Borsten (Pellikka et al., 2002). Die Rhabdomere in diesem Allel expandieren nur bis auf 40-60% ihrer normalen proximo-distalen Länge, wobei sie auf den distalen Bereich der Retina begrenzt bleiben. Die verkürzten Rhabdomere sind dicker und haben häufig Kontakt zu benachbarten Rhabdomeren, dies ist im wildtypischen Ommatidium nicht zu beobachten. Die sekundären und tertiären Pigmentzellen sterben durch Apoptose nach dem Schlüpfen.

Die Defekte in den sich bildenden ZAs sind abhängig vom Entwicklungsstadium. So ist im dritten Larvenstadium eine normale Morphologie und ZA Integrität zu beobachten, während in der pupalen Entwicklung, wenn die Photorezeptoren ihre dramatische Expansion erfahren, eine stark fragmentierte ZA zu finden ist (50% Pupalentwicklung). Ab ca. 70% Pupalentwicklung werden diese Defekte schwächer, während im adulten Auge nur im

proximalen Bereich Defekte zu finden sind (Pellikka et al., 2002). Das bedeutet, dass das Fehlen von Crb nur in der Expansionsphase zu ZA Defekten führt, die in späteren Stadien ausgeglichen werden können.

Es konnte außerdem in *crb* mutanten Augen beobachtet werden, dass der Rhabdomerstiel deutlich (um 50%) verkürzt ist. Eine Überexpression von Crb in den Photorezeptorzellen führt zu einer Vergrößerung des Rhabdomerstiels. Die ektopische Expression einzelner Crb-Domänen hat gezeigt, dass die extrazelluläre Domäne essentiell für die korrekte Lokalisation im Rhabdomerstiel ist. Die Länge des Rhabdomerstiels hingegen wird durch Ko-Expression der Transmembrandomäne und der extrazellulären Domäne beeinflusst. Die zytoplasmatische Domäne zeigte keinen Einfluss auf die Bildung des Rhabdomerstiels.

Weitere apikale Marker wie DPatj und β -heavy Spektrin (Komponente des Zytoskeletts) sind in *crb*-mutanten Photorezeptorzellen in der lateralen Membrandomäne fehllokalisiert. Dies deutet auf Defekte in der Zellpolarität hin (Pellikka et al., 2002).

1.8.2 Crb-mutante Augen zeigen lichtinduzierte Degeneration

Wie im menschlichen Auge führt der Verlust von Crb im Auge von *Drosophila* zu einem Degenerationsphänotyp. Dieser lichtinduzierte und progressive Defekt tritt nur in mutanten *crb*^{11A22} Augen auf, die für mehrere Tage konstantem Licht ausgesetzt waren (Johnson et al., 2002). Mutante Augen, die unter Schwachlicht gehalten wurden, zeigen zwar keine Degeneration, jedoch die unter Abschnitt 1.8.1 beschriebenen morphologischen Defekte (lichtunabhängig). Die lichtabhängigen Defekte treten frühestens nach fünf Tagen auf und verstärken sich mit längerer Belichtungszeit. Typische Zeichen von Degeneration sind das Auflösen der Rhabdomerstruktur, Verlust der geordneten Rhabdomerbasis, das Abrunden der Zellkerne, sowie Kondensation des Zytoplasmas von Nukleolus und Zellkern. Diese Merkmale sind charakteristisch für Zellen, die programmierten Zelltod (Apoptose) begehen und können durch Überexpression eines Apoptoseinhibitors (p35) verhindert werden (Hay et al., 1994; Johnson et al., 2002).

Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass humanes CRB1 und *Drosophila* Crb sich nicht nur im Embryo funktionell ersetzen können, sondern dass Crb auch im adulten Auge von *Drosophila* und im Menschen eine konservierte Funktion zur Unterdrückung von Zelltod besitzt.

crb^{8F105} mutante Augenklone zeigen keine lichtinduzierte Degeneration, obwohl sie die gleichen morphologischen Defekte wie *crb*^{11A22} aufweisen. In *crb*^{8F105} fehlen 23 Aminosäuren im C-terminalen (extrazellulären) Bereich von Crb. Johnson *et al.* konnten zeigen, dass das

Fehlen der extrazellulären Domäne zu lichtinduzierter Degeneration führt, wohingegen die morphologischen Defekte durch Ko-Expression der Transmembran- und der zytoplasmatischen Domäne gerettet (aufgehoben) werden konnten. Dieses Ergebnis ist umso interessanter, als die bisher bekannten Mutationen im humanen CRB1 alle in der extrazellulären Domäne identifiziert wurden. (Cremers et al., 2002; Meulemann et al., 2004). Die oben beschriebenen Resultate zeigen, dass Crb im Auge von *Drosophila* mehrere Funktionen besitzt. Es spielt sowohl eine Rolle bei der Ausbildung des Rhabdomerstiels als auch bei der Morphogenese der Photorezeptorzellen und ist außerdem für ein Überleben der Photorezeptorzellen unter konstantem Licht von Bedeutung.

1.8.3 Lichtinduzierte Degeneration kann in *crb* mutanten Augen mit einer Vitamin A Mangelernährung verhindert werden

Die Mechanismen, in die Crb beim Überleben der Photorezeptorzellen involviert ist, sind bisher nur in ersten Ansätzen analysiert. Da Crb nicht in den Rhabdomeren exprimiert ist, kann es nicht direkt in die Signaltransduktionskaskade involviert sein.

So wurde von Dolph et al. ein Modell postuliert, in dem stabile lichtinduzierte Meta-Rhodopsin/Arrestin Komplexe die retinale Degeneration in verschiedenen Mutanten verursachen könnten. Diese stabilen Komplexe können bei der Inaktivierung des lichtaktivierten Rhodopsins entstehen. Es wird angenommen, dass diese stabilen Komplexe durch Rezeptor-vermittelte Endozytose aus dem Rhabdomer in den Zellkörper entfernt werden, wodurch sie zu apoptotischem Zelltod führen.

Verschiedene Mutationen, die eine Phosphorylierung des Arrestins oder die Aktivierung seiner Kinase verhindern, könnten demnach die Bildung der Komplexe induzieren; die retinale Degeneration konnte in diesen Mutanten verhindert werden, indem die Endozytose unterbrochen wurde (Orem und Dolph, 2002).

Der lichtinduzierten Degeneration in *crb* mutanten Augen könnte ein ähnlicher Mechanismus zu Grunde liegen (Johnson et al., 2002). Dazu wurde die Endozytose (hier mittels Einfügen einer *shibire* Mutation) inhibiert oder die Menge an Rhodopsin (mittels einer Vitamin A Mangelernährung) reduziert (Nichols und Pak, 1985), was in den *crb* mutanten Augen jeweils die lichtinduzierte Degeneration verhinderte (persönliche Mitteilung K. Johnson, Johnson et al., 2002).

1.9 Zielsetzung dieser Arbeit

In dieser Arbeit soll eine mögliche Funktion des Gens *sdt* im adulten Komplexauge anhand von 12 verschiedenen EMS induzierten Allelen analysiert werden. Da homozygot mutante Embryonen sterben, werden für die Analyse homozygot mutante *sdt* Augenkclone mittels mitotischer Rekombination induziert. Diese Augenkclone werden molekular, histologisch und immunhistochemisch auf mögliche Defekte untersucht. Dabei soll die Frage geklärt werden, inwieweit auch *sdt* mutante Augenkclone lichtinduzierte Degeneration zeigen und somit in Verbindung mit der für CRB1 gezeigten *Retinitis pigmentosa* stehen könnten. Parallel dazu soll eine Analyse gewebespezifischer Transkripte durchgeführt werden und einige EST-Klone molekular charakterisiert werden.

Die Ergebnisse sollen aufzeigen, ob *sdt* eine Funktion im Komplexauge von *Drosophila melanogaster* besitzt und welche Konsequenz sich aus dem Ausfall oder der Veränderung des Sdt Proteins ergeben. Diese Analyse kann neue Einblicke in die Signalkette des Crb-Komplexes geben und zu einem besseren Verständnis der Entstehung von *Retinitis pigmentosa* beitragen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Verbrauchskemikalien wurden, soweit erhältlich, in der Qualität pro Analysis (p. A.) und wenn nicht anders erwähnt, von folgenden Firmen bezogen:

Aldrich (Steinheim), Amersham (Braunschweig), Applichem (Darmstadt), Baker ((Deventer, Niederlande), Biomol (Hamburg), Bio-Rad (München), Biozym (Hameln), Difco (Detroit, USA), Fluka (Neu-Ulm), Gibco/BRL Life Technologies (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Pharmacia (Freiburg), Roth (Karlsruhe), Riedel-de Haën (Seelze), Roche Diagnostics GmbH (Mannheim), Sigma-Aldrich (Steinheim).

Die verwendeten Enzyme für molekularbiologische Arbeiten wurden, falls nicht anders erwähnt, von folgenden Firmen bezogen:

Boehringer/Roche Diagnostics (Mannheim), Gibco/BRL (Eggenstein), MBI Fermentas (St. Leon-Rot), New England Biolabs (Schwalbach/Taunus), Promega (Madison, USA).

Sämtliche Lösungen für molekularbiologische Arbeiten wurden mit Bidest H₂O angesetzt und autoklaviert oder sterilfiltriert.

2.1.1.2 Besondere Chemikalien und Reaktionssets

DIG-Markierungs-Kit	Boehringer (Mannheim)
Diaminobenzidin	Sigma (Deisenhofen)
DIG RNA Labelling Kit	Boehringer/Roche Diagnostics (Mannheim)
Expand High Fidelity PCR-System	Roche (Mannheim)
Jetquick Gel Extraction Spin Kit	Genomed (Bad Oeynhausen)
µMACS mRNA Isolation Kit	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
Normal Goat Serum (NGS)	Dianova (Hamburg)
Nucleobond AX	Machery-Nagel (Düren)
PCR clean up kit	Machery-Nagel (Düren)
High pure PCR Purification Kit	Qiagen (Hilden)
Qiagen Plasmid Maxi/Midi Kit	Qiagen (Hilden)
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma (Deisenhofen)

Protein G Sepharose	Pharmacia (Freiburg)
Proteinase K Lösung	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)
One Step RT PCR Kit	Qiagen (Hilden)
Röntgenfilm Fuji Super RX	Fuji (Tokio)
Röntgenfilm Kodak X-OMAT, AR	Kodak (Rochester)
Röntgenfilmentwickler	Tenetal Roentogen, Tenetal (Norderstedt)
Röntgenfilmfixierer	Tenetal Roentogen, Tenetal (Norderstedt)
TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen (Groningen)
Vectashield Einbettungsmedium	Vector-Laboratories (Burlingame)

2.1.2 Geräte, Computer und Software

Es wurden Apple Macintosh Computer mit folgenden Programmen verwendet:

Adobe Photoshop (Adobe Systems), Canvas (Deneba Systems), Microsoft Word, Powerpoint und Excel (Microsoft Corp.).

Mikroskope und Kameras:

Fluoreszenzbilder wurden an einem Axiophot 2 (Zeiss) mit einer Quantix CCD Kamera (Photometrics) oder an einem konfokalen Mikroskop, Leica TCS NT (Leica), aufgenommen.

Das verwendete Elektronenmikroskop ist ein ZEISS EM 109 (Zeiss).

2.1.3 Puffer, Lösungen und Medien

Ampicillin	100 mg /ml in H ₂ O
APS	10% in H ₂ O
Auftrags-Puffer (DNA)	0,25% Bromphenolblau 0,25% Xylencyanol
BCIP-Lösung	50 mg /ml 5-Bromo-4-Chloro- Indolylphosphat in Dimethylformamid
Blockierlösung	3% Milchpulver, 1% BSA in 1xTBST
Bleicitratlösung	1.33 g Bleinitrat 1,76 g Natriumcitrat (x 2 H ₂ O) in 30 ml H ₂ O vorlösen mit 7 ml 1 M NaOH, pH 12,0 und auf 50 ml mit H ₂ O auffüllen
Coomassie Färbelösung	0.25% Coomassie brilliant blue, R250 50% Methanol 10% Eisessig
DAB-Stocklösung	1 mg /ml Diaminobenzidin in PBS
DEPC-H ₂ O	0.1% DEPC in H ₂ O geben, gut vermischen und 12 h inkubieren, anschließend autoklavieren. Eliminiert mögliche RNasen.
Entfärbelösung (für Proteingele)	10% Eisessig 30% Ethanol
GST-Bindungs-Puffer	500 µl 50%ige Glutathion Sepharose 4 B pro 25ml 15 mM DTT 0,1% Tween-20

GST-Elutions-Puffer	10 mM Glutathion (reduz.) 50 mM Tris, pH 8,0 250 mM KCl 2 mM DTT
GST-Suspensions-Puffer	500 µl 0,5M PMSF 2 µg/ml Leupeptin 2 µg/ml Pepstatin A 2 µg/ml Chymostatin 2 µg/ml Aprotinin 1 x PBS
GST-Wasch-Puffer	100 mM NaCl 10 mM Tris, pH 8,0 1 mM EDTA 500 µl 0,5M PMSF 2 µg/ml Leupeptin 2 µg/ml Pepstatin A 2 µg/ml Chymostatin 2 µg/ml Aprotinin
Homogenisierungs-Puffer (Embryonen)	10 mM Tris, pH 7,5 80 mM K-β-Glycerophosphat, pH 7,3 20 mM EGTA, pH 8,0 15 mM MgCl ₂ 10% Glycerol kurz vor Gebrauch: 1 mM Benzamidin 2 mM Na ₃ VO ₄ 1 mM DTT 25 µg/ml Aprotinin 25 µg/ml Leupeptin 0,5 mM PMSF
Hoyers/Lactat	50 ml H ₂ O + 30 g Gummi arabicum über Nacht rühren, 200 g Chloralhydrat und 16 ml Glycerin zugeben; mindestens 3 h bei 12000 rpm

	zentrifugieren und den Überstand verwerfen; 1:1 mit Lactat mischen
Hybridisierlösung (Northern)	5 x SSC, 50% Formamid, 0.1% Natriumlaurylsarcosin, 0.02% SDS, 2% Blocking Reagenz (Roche)
SDS-Probenpuffer (2X)	4% SDS 200 mM DTT 100 mM Tris, pH 6,8 0,2% Bromphenolblau 20% Glycerol
Laufpuffer für SDS-Polyacrylamid-Gele	25 mM Tris 250 mM Glyzin, pH 8,3 0.1% SDS
LB-Medium (1l)	10 g Bacto Trypton 5 g Bacto Yeast Extrakt 10 g NaCl (für Platten: 15 g Agar)
Mini-Präp-Puffer	P1: 50 mM Glucose 25 mM Tris, pH 8,0 10 mM EDTA 100 µg/ml RNase 5 mg/ml Lysozym Lysis Puffer: 200 mM NaOH 1% SDS Neutralisations-Puffer: 3 M KAc, pH 5,5
NBT-Lösung	10 mg /ml Nitro-Blau-Tetrazolium in 70% Dimethylformamid

NBT-Puffer	100 mM NaCl 50 mM MgCl ₂ 100 mM Tris HCl pH 9.5 0.1% Triton X-100
Lysispuffer für Proteinextrakte (nach U. Thomas)	50 mM Tris pH 8,0 150 mM NaCl 0.5% Triton 1 mM MgCl ₂ Protease Inhibitoren, je 2 µg /ml
Mowiol	5 g Mowiol/Elvanol mit 20 ml PBS 16 h bei Raumtemperatur (RT) mischen, 10 ml Glycerin zufügen und nochmals 16 h bei RT mischen, bei 4000 rpm 10 min zentrifugieren und aliquotieren. Vor Gebrauch das Antibleichagenz DABCO (1,4-diazabicyclo{2.2.2}octane) hinzufügen.
O,1 M Phosphatpuffer, pH 7.2	Lösung 1: Na ₂ HPO ₄ = 0,2 M Lösung 2: NaH ₂ PO ₄ = 0,2 M, pH 7,2 36 ml Lsg.1 + 14 ml Lsg.2 + 50 ml H ₂ O = 0,1M
Paraformaldehyd (4%) (PFA)	4% (w/v) PFA in 1x PBS
PBS	130 mM NaCl 2,7 mM KCl 7 mM Na ₂ HPO ₄ 3 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,4
PBT	0,1% Tween-20 in PBS
PBX	0,1% Triton in PBS
Ponceau S (10x)	2 g Ponceau S 30 g Trichloressigsäure 30 g Sulfosalicylsäure

Ringer-Lösung (<i>Drosophila</i>)	182 mM KCl 46 mM NaCl 3 mM CaCl ₂ 10 mM Tris pH 7,2, filtrieren und autoklavieren
RNase Stocklösung	10 mg /ml in H ₂ O, zur Inaktivierung von DNasen 10 min kochen
20x SSC	3 M NaCl 0,3 M Na-Citrat pH 7,0
4x Sammelgel-Puffer (500ml)	30,3 g Tris 20 ml 10% SDS pH 6,8
TBS	50 mM Tris, pH 7.5 150 mM NaCl
TBST	0.1% Tween in 1x TBS
Transfer-Puffer (für Western-Blots, 1 L)	5,82 g Tris 2,93 g Glycin 3,75 ml 10% SDS 200 ml Methanol
4x Trenngel-Puffer (1L)	181,7 g Tris 4 ml 10% SDS pH 8,8

SDS-Polyacrylamid-Minigele (Trenngel)

	8,5%	10%	12,5%
H ₂ O	3,5 ml	3,1 ml	2,5 ml
30% Acrylamid	2,0 ml	2,4 ml	3,0 ml
4x Trenngel-Puffer	1,9 ml	1,9 ml	1,9 ml
10% APS	112 µl	112 µl	112 µl
TEMED	5 µl	5 µl	5 µl

SDS-Polyacrylamid-Minigele (Sammelgel)

H ₂ O	1,1 ml
30% Acrylamid	350 µl
4x Sammelgel-Puffer	500 µl
10% APS	28 µl
TEMED	5 µl

8% Stefaninis Fixativ

2,2 ml	37% Formaldehyd
1,5 ml	PIPES, 500 mM
1,5 ml	Picrid Acid
4,8 ml	H ₂ O

TAE

40 mM Tris-acetat
1 mM EDTA

TE

10 mM Tris, pH 8,0
1 mM EDTA

2.1.4 Antikörper

2.1.4.1 Primäre Antikörper

Antikörper	Beschreibung	Verdünnung	Referenz
α - β -Galactosidase	monoklonaler Maus-Antikörper	Embryonen: 1:1000	Cappel
α Arm	monoklonaler Maus-Antikörper	Embryonen/Augen: 1:50	Riggelman et al., 1990
α Crb Cq4	monoklonaler Maus-Antikörper	Embryonen: 1:10	Teepass und Knust, 1993
α Crb2.8 (extrazellul.)	polyklonaler Ratten-Antikörper	Embryonen/Augen: 1:500	E. Knust (unveröffentlicht)
α DPatj	polyklonaler Kaninchen-Antikörper	Embryonen/Augen 1:500	E. Knust (unveröffentlicht)
α Neurotaktin (BP106)	monoklonaler Maus-Antikörper	Embryonen 1:5	Hortsch et. al. 1990. Hybridoma Bank
α SDT-Guk	polyklonaler Ratten-Antikörper	Embryonen: 1:100 Western: 1:500	eigene Herstellung (Eurogentec)
α SDT-PDZ	polyklonaler Kaninchen-Antikörper	Embryonen: 1:500 Western: 1:1000	eigene Herstellung (Eurogentec)
α SDT-PDZ	polyklonaler Ratten-Antikörper	Embryonen: 1:500 Western: 1:1000	eigene Herstellung (Eurogentec)
α Rhodopsin1	monoklonaler Maus-Antikörper	Embryonen 1:50	Developmental Studies Hybridoma Bank

2.1.4.2 Sekundäre Antikörper

Antikörper	Beschreibung	Verdünnung	Referenz
Esel- α -Kaninchen-Cy3	polyklonaler Esel-Antikörper	1:200	Dianova
Esel- α -Ratte-Cy3	polyklonaler Esel-Antikörper	1:200	Dianova
Ziege- α -Maus-Cy3	polyklonaler Ziegen-Antikörper	1:200	Dianova

Antikörper	Beschreibung	Verdünnung	Referenz
Ziege- α -Kaninchen-Cy5	polyklonaler Ziegen-Antikörper	1:200	Dianova
Esel- α -Ratte-Cy5-	polyklonaler Esel-Antikörper	1:200	Dianova
Ziege- α -Maus-CY5	polyklonaler Ziegen-Antikörper	1:200	Dianova
Esel- α -Kaninchen-Cy2	polyklonaler Esel-Antikörper	1:200	Dianova
Esel- α -Ratte-Cy2	polyklonaler Esel-Antikörper	1:200	Dianova
Ziege- α -Maus-Cy2	polyklonaler Ziegen-Antikörper	1:200	Dianova
Ziege- α -Ratte HRP	polyklonaler Ziegen-Antikörper	Western: 1:7500	Jackson Immuno Research Laboratories, Inc.
Ziege- α -Maus-HRP	polyklonaler Ziegen-Antikörper	Western:1:750	Jackson Immuno Research Laboratories
Kaninchen- α -DIG-Meerrettichperoxidase	polyklonaler Kaninchen- Antikörper gekoppelt mit HRP	Western 1:10000	Jackson Immuno Research Laboratories

Aktinreiche Strukturen, wie die Rhabdomere der Photorezeptorzellen, können mit Hilfe von fluoreszenzmarkiertem, aktinbindendem Phalloidin sichtbar gemacht werden. Das Phalloidin ist mit einem Fluorochrom, Alexa Fluor 488 oder 660 (Molecular Probes, Eugene, USA) gekoppelt.

Wheat germ agglutinin (WGA) bindet an Glykoproteine, so dass die Rhabdomere in den Photorezeptorzellen markiert werden. Es ist mit einem Fluorochrom gekoppelt, Alexa Fluor 488 oder 660 (Molecular Probes, Eugene, USA).

2.1.5 Fliegenstämme

Als Wildtyp-Stamm wurden entweder Oregon R oder w^{1118} verwendet. Alle verwendeten Marker sind bei Lindsey und Zimm, 1992 beschrieben.

2.1.5.1 Balancer-Chromosomen

Balancer-Chromosomen werden in der *Drosophila*-Genetik verwendet, um Mutationen oder größere Defizienzen zu balancieren, d. h. heterozygot stabil über einem wildtypischen Chromosom zu halten und gleichzeitig beide Chromosomen anhand von dominanten Markern separat verfolgen zu können. Bei Balancer-Chromosomen handelt es sich um wildtypische Chromosomen, deren Sequenz allerdings mehrfach invertiert vorliegt, sodass Rekombinationsereignisse unmöglich gemacht werden. Damit wird eine Rekombination zwischen den Chromosomen verhindert.

Stämme	Bemerkung	Referenz
<u>1. Chromosom</u>		
FM7	Balancer-Chr.	Lindsley and Zimm, 1992
FM7blue ^{ftz}	Balancer-Chr.	Y. Hiromi
<u>2. Chromosom</u>		
CyO	Balancer-Chr.	Lindsley and Zimm, 1992
<u>3. Chromosom</u>		
TM3	Balancer-Chr.	Lindsley and Zimm, 1992
TM6B	Balancer-Chr.	Lindsley and Zimm, 1992
<u>2./3. Chromosom</u>		
<u>SM6-TM6B</u>	Compound-Balancer	Thomas Klein

In immunhistologischen Präparaten müssen häufig die homozygot mutanten Embryonen von heterozygoten oder wildtypischen unterschieden werden. Dies ist aufgrund der Morphologie nicht immer möglich. Aus diesem Grund werden zum Balancieren der P-Element-Linien spezifische "Blue-Balancer" verwendet. Diese Art von Balancer trägt neben einem dominanten Marker, wie z.B. FM7 mit der Mutation Bar, ein lacZ-Gen, welches unter der Kontrolle des ftz (fushi-tarazu)-Promotors steht. Homozygote „Blue-Balancer“ Embryonen sterben, so dass nur heterozygote von den homozygot mutanten Embryonen zu unterscheiden sind. Mit Hilfe einer lacZ Färbung können Embryonen, die den "Blue-Balancer" tragen, von

den homozygot mutanten Embryonen (ohne “Blue-Balancer“) unterschieden werden. Das lacZ-Gen wird unter der Kontrolle des ftz-Promotors exprimiert und zeigt dabei während der Embryogenese ein signifikantes zeitliches und räumliches Expressionsmuster in sieben Streifen. Die Expression von lacZ kann mittels Immunhistochemie unter Verwendung eines α - β -Galactosidase Antikörpers sichtbar gemacht werden.

2.1.5.2 Mutante Fliegenstämme, Aktivator- und Effektorlinien

Stämme	Bemerkung	Referenz
<u>1. Chromosom</u>		
Y[1]w[118]P{ry[+t7.2]=neoFRT}19A ; P{ry[+t7.2]=eyFLP.N}5	eyeless Flipase Treiber, zur Herstellung kleiner Augenkclone	Barry Dickson
y[1]w[118]P{ry[+t7.2]=neoFRT}19A	für die Rekombination der <i>sdt</i> Allele	Barry Dickson
P{ry[+t7.2]=neoFRT}19A ; P{ry[+t7.2]=eyFLP.N}5	eyeless Flipase Treiber, zur Herstellung kleiner Augenkclone	K. Johnson/ S. Berger eigene Kreuzung
<i>sdt</i> ^{7D22} /FM7	für die FRT Rekombination	Wieschaus et al., 1984
<i>sdt</i> ^{E195} /FM7	für die FRT Rekombination	T. Hummel, Schneider, 1996
<i>sdt</i> ^{EH681} /FM7	für die FRT Rekombination	Eberl und Hilliker, 1988
<i>sdt</i> ^{G463} /FM7	P(lacW) Insertionslinie	U. Schäfer, Bachmann, 2000
<i>sdt</i> ^{K70} /FM7	für die FRT Rekombination	T. Hummel, Schneider, 1996
<i>sdt</i> ^{K85} /FM7	für die FRT Rekombination	T. Hummel, Schneider, 1996
<i>sdt</i> ^{M120} /FM7	für die FRT Rekombination	T. Hummel, Schneider, 1996
<i>sdt</i> ^{N5} /FM7	für die FRT Rekombination	C. Nüsslein-Vollhardt M. Seeger

Stämme	Bemerkung	Referenz
<i>sdt</i> ^{Q292} /FM7	für die FRT Rekombination	Schneider, 1996
<i>sdt</i> ^{XH21} /FM7	für die FRT Rekombination	Lindsley and Zimm, 1992
<i>sdt</i> ^{XN05} /FM7	für die FRT Rekombination	Wieschaus et al., 1984
<i>sdt</i> ^{XP96} /FM7	für die FRT Rekombination	Wieschaus et al., 1984
<i>sdt</i> ^{YK88} /FM7	für die FRT Rekombination	Lindsley and Zimm, 1992
<i>yw</i> ⁻ <i>sdt</i> ^{7D22} P{ry[+t7.2]=neoFRT} 19A /FM7	zur Herstellung kleiner Augenklone	eigene Kreuzung
<i>yw</i> ⁻ <i>sdt</i> ^{E195} P{ry[+t7.2]=neoFRT} 19A /FM7	zur Herstellung kleiner Augenklone	eigene Kreuzung
<i>yw</i> ⁻ <i>sdt</i> ^{EH681} P{ry[+t7.2]=neoFRT} 19A /FM7	zur Herstellung kleiner Augenklone	eigene Kreuzung
<i>sdt</i> ^{G463} P{ry[+t7.2]=neoFRT} 19A /FM7	zur Herstellung kleiner Augenklone	eigene Kreuzung
<i>yw</i> ⁻ <i>sdt</i> ^{K70} P{ry[+t7.2]=neoFRT} 19A /FM7	zur Herstellung kleiner Augenklone	eigene Kreuzung
<i>ywsdt</i> ^{K85} P{ry[+t7.2]=neoFRT} 19A /FM7	zur Herstellung kleiner Augenklone	eigene Kreuzung
<i>yw</i> ⁻ <i>sdt</i> ^{M120} P{ry[+t7.2]=neoFRT} 19A /FM7	zur Herstellung kleiner Augenklone	eigene Kreuzung
<i>yw</i> ⁻ <i>sdt</i> ^{N5} P{ry[+t7.2]=neoFRT} 19A /FM7	zur Herstellung kleiner Augenklone	eigene Kreuzung
<i>yw</i> ⁻ <i>sdt</i> ^{Q292} P{ry[+t7.2]=neoFRT} 19A /FM7	zur Herstellung kleiner Augenklone	eigene Kreuzung
<i>yw</i> ⁻ <i>sdt</i> ^{XH21} {ry[+t7.2]=neoFRT} 19A /FM7	zur Herstellung kleiner Augenklone	eigene Kreuzung
<i>ysdt</i> ^{XN05} P{ry[+t7.2]=neoFRT} 19A /FM7	zur Herstellung kleiner Augenklone	eigene Kreuzung
<i>yw</i> ⁻ <i>sdt</i> ^{XP96} P{ry[+t7.2]=neoFRT} 19A /FM7	zur Herstellung kleiner	eigene Kreuzung

Stämme	Bemerkung	Referenz
	Augenklone	
$yw^{-}sd t^{YK88} P\{ry[+t7.2]=neoFRT\} 19A / FM7$	zur Herstellung kleiner Augenklone	eigene Kreuzung
Df(1)HA11/FM7	Defizienz 7D13-14;22. <i>sd t</i>	Lindsley and Zimm, 1992
<u>1. und 2. Chromosom</u>		
GMRhid cl P{ry[+t7.2]=neoFRT}19A ; UAS FLP ey GAL4	kombinierte Aktivatorlinie in den Augen-Antennen-Scheiben (zur Herstellung großer Augenklone)	Newsome <i>et. al.</i> , 1984
<u>2. Chromosom</u>		
$sd t^{7D22}/Y ; Tp(1,2)sn+72d/CYO$	Transposition 7A; 8A5; 58E <i>sd t</i> Duplikation	Craymer and Roy, 1980
CYO/Gla; UAS MAGUK/ UAS MAGUK	Sdt-Effektor	Bachmann <i>et. al.</i> , 2001
<i>en</i> GAL4	Aktivatorlinie <i>engrailed-GAL4</i>	N. Perrimon, Bloomington
<u>2. und 3. Chromosom</u>		
$yw^{-}sd t^{XP96} P\{ry[+t7.2]=neoFRT\} 19A / Y ; Tp(1,2)sn/CYO$	zur Herstellung großer Augenklone	eigene Kreuzung
$yw^{-}sd t^{EH647} P\{ry[+t7.2]=neoFRT\} 19A / Y ; Tp(1,2)sn/CYO$	zur Herstellung großer Augenklone	eigene Kreuzung
$yw^{-}sd t^{XN05} P\{ry[+t7.2]=neoFRT\} 19A / Y ; Tp(1,2)sn/CYO$	zur Herstellung großer Augenklone	eigene Kreuzung
$yw^{-}sd t^{K70} P\{ry[+t7.2]=neoFRT\} 19A / Y ; Tp(1,2)sn/CYO$	zur Herstellung großer Augenklone	eigene Kreuzung
$yw^{-}sd t^{K85} P\{ry[+t7.2]=neoFRT\} 19A / Y ; Tp(1,2)sn/CYO$	zur Herstellung großer Augenklone	eigene Kreuzung
$yw^{-}sd t^{XP96} P\{ry[+t7.2]=neoFRT\} 19A / Y ; Tp(1,2)sn/CYO$	zur Herstellung großer Augenklone	eigene Kreuzung
$yw^{-}sd t^{EH647} P\{ry[+t7.2]=neoFRT\} 19A / Y ; Tp(1,2)sn/CYO$	zur Herstellung großer Augenklone	eigene Kreuzung
$yw^{+}P\{ry[+t7.2]=neoFRT\} 19A ;$	eyFlipase Treiber, zur	eigene Kreuzung

Stämme	Bemerkung	Referenz
P{ry[+7.2]=eyFLP.N}5	Herstellung kleiner Augenklone	
<u>3. Chromosom</u>		
<i>daG32</i>	<i>daughterless</i> -GAL4	Wodarz <i>et. al.</i> , 1995

2.1.6 Bakterienstämme

Bezeichnung	Verwendungszweck	Anmerkung
<i>E. coli</i> DH5 α	Standardwirt für diverse Plasmide	Tetrazyklin-Resistenz
<i>E. coli</i> XL1-Blue MRF'	Standardwirt für diverse Plasmide	-
<i>E. coli</i> BL21	Standardwirt zur Herstellung von GST-Fusionsproteinen	-

Tab. 2.1: Eingesetzte Bakterienstämme.

Für nähere Angaben zu den Genotypen der verwendeten Bakterienstämme sei auf die Kataloge der Hersteller molekularbiologischer Produkte verwiesen, z.B. *MBI Fermentas*, St. Leon-Rot; *Stratagene*, La Jolla, Canada.

2.1.7 Verwendete Vektoren

Für Klonierungen wurden die Grundgerüste folgender Vektoren verwendet:

- pBluescript KS+/SK+: Vektor für Subklonierung, Sequenzierung, *in vitro*-Transkription (Stratagene, Heidelberg)
- pGEX: Vektor zur Erzeugung von GST-Fusionsproteinen in *E. coli* (Smith und Johnson, 1988); Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, (England)
- TOPO-TA Cloning vector (Invitrogen, Groningen)

2.2 Molekularbiologische Methoden

Molekularbiologische Standardtechniken wie Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen, DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen, Dephosphorylierung der 5'-Enden linearer DNA-Moleküle mit alkalischer Phosphatase (CIP), Phenol/Chloroform-Extraktion, Fällung von Nukleinsäuren, Ligation mit T4-DNA-Ligase und Gelelektrophorese sind in Sambrook *et. al.* beschrieben und werden hier nicht mehr im Detail aufgeführt (Sambrook *et al.*, 1989).

Die Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte unter Verwendung des Jetquick Gel Extraction Spin Kit der Firma *Genomed*, Bad Oeynhausen, nach Angaben des Herstellers. DNA-Sequenzierungen wurden von der Firma Agowa, Berlin oder Seqlab, Göttingen durchgeführt.

2.2.1 Herstellung und Transformation kompetenter Bakterien

Plasmide wurden durch Elektroporation in Bakterien transformiert. Als transformationskompetente Bakterien wurde der XL1-blue-Stamm verwendet (12.5 µg/ml Tetrazyklin hinzufügen). Die Herstellung erfolgte nach folgendem Verfahren:

- Animpfen von 0,5 l LB-Medium mit einer frischen Übernachtskultur im Verhältnis 100:1
- Inkubation bei 37°C auf einem Schüttler bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6-0,8
- Alle weiteren Schritte auf Eis im Kühlraum durchführen!
- 15-20 min auf Eis kühlen
- 15 min bei 4°C und 4000 rpm in einem GSA-Rotor zentrifugieren
- Überstand verwerfen
- Pellet in 0,5 l kaltem bidestillierten Wasser lösen
- erneut zentrifugieren (siehe oben)
- Pellet in 0,5 l kaltem bidestillierten Wasser lösen
- erneut zentrifugieren (siehe oben)
- Pellet in 20 ml 10% Glycerin/H₂O lösen
- erneut zentrifugieren (siehe oben)
- Pellet in 1,5ml 10% Glycerin/H₂O lösen
- Suspension in 50 µl Aliquots aufteilen und in flüssigem Stickstoff einfrieren
- Lagerung bei -70°C

Eine Testtransformation wird standardmäßig mit einem pBluescript-Plasmid Vektor in einer Konzentration von 1 ng / μ l durchgeführt. Die Kompetenz der so getesteten Bakterien sollte nicht weniger als 1×10^8 Kolonien / μ g Vektor betragen.

Für die Transformation wurde der E. coli GenePulser von BioRad, München, gemäß den Angaben des Herstellers verwendet. Die Bakterien wurden langsam auf Eis aufgetaut, mit 0,5-2 μ l der gewünschten Plasmid-DNA/Ligation gemischt und in auf Eis gekühlte 0,2 cm Elektroporationsküvetten überführt. Die Küvette wurde in einen Gene PulserTM (Biorad) gestellt und es wurde für 4-5 ms eine Feldstärke von 12,5 kV/cm angelegt (Geräteeinstellung: Kapazität 25 μ F; Spannung 2,5 kV; Widerstand 200 Ω). Anschließend wurde die Küvette schnell entnommen, 1 ml LB-Medium hinzugegeben und der Ansatz für 30-60 min bei 37°C geschüttelt. Schließlich wurde ein geeignetes Volumen auf selektive Agarplatten (LB-Agarplatten mit 100 μ g Ampicillin/ml) ausplattiert und bei 37°C ü. N. inkubiert.

2.2.2 Mini-Präparation von Plasmid-DNA

Zur schnellen analytischen Charakterisierung von Plasmiden in transformierten Bakterien wurde das Protokoll der Firma Qiagen modifiziert und wie folgt vorgegangen:

- Animpfen einer einzelnen Bakterienkolonie von einer Platte in ca. 2 ml LB/Amp-Medium (50 μ g /ml)
- Inkubation in einem Schüttler bei 37°C ü. N.
- Bakterienkultur bei 4000 rpm für 10 min in Eppendorf-Tischzentrifuge zentrifugieren
- Überstand absaugen und Pellet in 300 μ l P1-Puffer lösen
- 300 μ l P2-Puffer hinzugeben, mischen (nicht vortexen!), 5 min stehen lassen
- 300 μ l P3-Puffer hinzugeben, mischen, 5 min stehen lassen
- 10 min bei 13000 rpm in Eppendorf-Tischzentrifuge zentrifugieren
- Überstand in ein neues Eppendorf-Gefäß überführen
- Fällung der DNA durch Zugabe von 600 μ l Isopropanol, mischen
- 15 min bei 13000 rpm zentrifugieren
- Überstand verwerfen, Pellet mit 70% Ethanol waschen und trocknen
- Pellet in 20-50 μ l H₂O lösen
- Charakterisierung der DNA durch geeignete Restriktionsanalyse
- DNA kann direkt zur Sequenzierung eingesetzt werden

2.2.3 Midi-Präparation von Plasmid-DNA

Zur Isolierung größerer DNA-Mengen für präparative Zwecke wurde das Plasmid Midi Prep Kit der Firma Qiagen oder der Firma Machery-Nagel verwendet, wobei entsprechend den Herstellerangaben vorgegangen wurde.

2.2.4 Isolierung von genomischer DNA

Zur Isolierung genomischer DNA aus *Drosophila* Embryonen mittels Chelex-Extraktion wurde nach einem Protokoll von Walsh *et al.*, 1991 vorgegangen.

a) Herstellung von Chelex

- 5% Gewichts/Volumen Chelex in sterilem H₂O (1250 mg /25 ml) in einem Falcon Röhrchen im Kühlschrank aufbewahren

b) Isolierung der DNA:

- 5 Embryonen des gewünschten Genotyps in ein Epi mit H₂O sortieren
- 50 µl Chelex Lösung hinzufügen mit einem Minimörser homogenisieren
- 10 min bei 95°C kochen
- auf Eis abkühlen und für 1 min bei 13000 rpm zentrifugieren
- den Überstand vorsichtig in ein frisches Eppendorf-Gefäß überführen
- im Kühlschrank lagern.

2.2.5 Isolierung von Gesamt-RNA

Die Isolierung der Gesamt-RNA erfolgte mit Hilfe einer Trizol-Lösung, Gibco/BRL Life Technologies, Karlsruhe. Es wurden *w*⁻ *Drosophila* Embryonen und Köpfe von *w*⁻ Fliegen verwendet.

- Embryonen in Trizol homogenisieren (1 ml Trizol/100mg Embryonen oder Köpfe) und 5 min bei RT inkubieren
- 0.2 ml Chloroform/1 ml Trizol hinzufügen, 15 sec kräftig schütteln und 3 min bei RT stehen lassen
- 15 min bei 4°C, 11000 rpm zentrifugieren
- wässrige Oberphase abnehmen und mit Isopropanol versetzen (0.5 ml Isopropanol /1 ml Trizol) und 10 min bei RT inkubieren
- 10 min bei 4°C, 110000 rpm zentrifugieren

- Überstand verwerfen, Pellet in einem geeigneten Volumen DEPC-H₂O lösen.

2.2.6 Isolierung von poly(A)⁺RNA

Es konnte sowohl direkt aus Embryonen als auch aus Köpfen sowie aus der isolierten Gesamt-RNA die poly(A)⁺RNA isoliert werden. Dazu wurde das μ MACS mRNA Isolation Kit der Firma Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach) verwendet. Der Anreicherungs-effekt beruht dabei auf der Bindung des poly(A)-Schwanzes der mRNAs an die oligo(dT)₂₅-Reste der paramagnetischen Dynabeads. RNA-Populationen ohne poly(A)-Schwanz (rRNA und tRNA) werden dagegen ausgewaschen. Die so gewonnene poly(A)⁺RNA wurde für die Northern Blot Analyse und die RT-PCRs verwendet.

- 20 mg Embryonen/Köpfe homogenisieren (Mörser) und 1 ml Lysis/Binding Puffer hinzufügen. Gewebelysat in ein frisches Reaktionsgefäß (RNase frei) überführen.
- 50 μ l Oligo(dT) MicroBeads/1 ml Gewebelysat hinzufügen und mischen.
- Eine MACS-Säule in den magnetischen Säulenhalter hängen und mit 100 μ l Lysis/Binding Puffer äquilibrieren.
- Das Gewebelysat auf die Säulen auftragen und durchlaufen lassen.
- 2x mit 200 μ l Waschpuffer waschen
- Weitere 4x mit 100 μ l Waschpuffer waschen
- Zur Elution 120 μ l erwärmten Elutionspuffer (65°C) auf die Säule geben. Den 2-ten bis 4-ten Tropfen in ein frisches Reaktionsgefäß aufnehmen.

2.2.7 Quantifizierung von DNA und RNA

In der Regel wurde die DNA-Menge durch Agarosegel-Elektrophorese abgeschätzt, wobei eine 1 kb-Leiter von Gibco/BRL mit bekannter Konzentration als Referenz diente.

Für eine genauere Quantifizierung wurde eine photometrische Bestimmung vorgenommen. Dazu wurden geeignete Verdünnungen in Wasser hergestellt und deren Extinktion bei $\lambda = 260$ nm gemessen. Für eine Schichtdicke von 1 cm gilt hier:

Doppelsträngige DNA: 1 OD=50 μ g

Einzelsträngige DNA oder RNA: 1 OD=40 μ g

Zur Überprüfung der Sauberkeit wurde auch die Extinktion bei $\lambda = 280 \text{ nm}$ gemessen und der Quotient gebildet. Hier gilt für DNA bzw. RNA guter Reinheit: $\text{OD } 260 \text{ nm} / 280 \text{ nm} = 1,8\text{-}2,0$.

2.2.8 Restriktionsverdau von Plasmid-DNA

Analytische Restriktionsverdau zur Charakterisierung von Plasmid-DNA wurden in der Regel in Endvolumina von $20 \mu\text{l}$ durchgeführt, präparative Restriktionsverdau in Endvolumina von $50\text{-}200 \mu\text{l}$. Die Inkubation erfolgte für 1-2 Stunden (h) oder ü. N. bei für das jeweilige Enzym geeigneten Temperatur- und Pufferbedingungen.

2.2.9 Auffüllen 5'-überhängender Enden von DNA-Fragmenten

Während die meisten Klonierungsschritte über kohäsive Enden („sticky ends“) erfolgten, war es teilweise notwendig, die Enden von zu ligierenden DNA-Fragmenten durch eine Auffüllreaktion kompatibel zu machen („blunt ends“). Hierzu wurde das „Klenow-Fragment“ der Polymerase I aus *E. coli* verwendet, welches die Fähigkeit besitzt, die komplementären Nukleosidtriphosphate (dNTPs) an 5'-überhängenden Enden einzufügen. Die Reaktionen wurden in einem Volumen von $30 \mu\text{l}$ unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

- DNA Substrat
- $0,5 \text{ mM}$ dNTPs
- 1x Klenow-Puffer
- 1U Klenow-Enzym
- Inkubation: 15 min bei 25°C .

Die Reaktion wurde durch Zugabe von EDTA auf eine Endkonzentration von 10 mM gestoppt. Anschließend wurde das Enzym durch eine 10 min Inkubation bei 70°C inaktiviert und die DNA mit Hilfe des PCR Purification-Kits (Qiagen) gereinigt.

2.2.10 Dephosphorylierung von Vektorenden

Die Dephosphorylierung linearisierter Vektorenden zur Vermeidung von Religation erfolgte mit Hilfe der alkalischen Phosphatase aus Kälberdarm (CIP). 1 U Enzym wurde dem Restriktionsansatz direkt zugegeben und für 1 h bei 37°C inkubiert.

Anschließend wurde die Phosphatase 15 min bei 70°C inaktiviert und die DNA mit Hilfe des PCR Purification-Kits (Qiagen) gereinigt.

2.2.11 Agarosegel-Elektrophorese

DNA-Fragmente wurden nach Standardmethoden in 0,8-1,5% TAE-Agarosegelen bei einer Feldstärke von ca. 10 V/cm aufgetrennt. Pro 100 ml Gelvolumen wurden 5 µl einer Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml) zugegeben. Mit einem UV-Transluminator ($\lambda = 312 \text{ nm}$) konnten die DNA-Banden sichtbar gemacht, über Videokamera und das Gelprint 2000E System fotografiert und das Bild über einen Sony Digital Graphic Printer UPD890 ausgegeben werden.

Die Größenbestimmung von DNA-Fragmenten erfolgte über Vergleich der Laufstrecken mit Fragmenten bekannter Länge (1 kb-Leiter von Gibco/BRL).

2.2.12 Elution von DNA-Fragmenten aus präparativen Gelen

DNA-Fragmente wurden durch Gelelektrophorese in 0,8-1,2%igen Agarosegelen aufgetrennt. Die gewünschten Banden wurden mit Hilfe einer sauberen Rasierklinge auf einem UV-Tisch ausgeschnitten. Anschließend wurde die DNA mit Hilfe des Gel extraction Kits der Firma Machery-Nagel entsprechend der Herstellerangaben eluiert.

2.2.13 Ligation von DNA-Fragmenten

Ligationen erfolgten durch das Enzym T4-DNA-Ligase (Roche). Die Reaktionen wurden in einem Gesamtvolumen von 10 µl durchgeführt. Es wurden 100-200 ng geschnittene und mit CIP behandelte Vektoren eingesetzt. Die zu klonierenden Restriktionsfragmente wurden in einem 3-fachen molaren (sticky ends) bzw. 10-fachen molaren (blunt ends) Überschuss hinzugegeben. Die Reaktionen wurden bei 18°C ü. N. unter den empfohlenen Pufferbedingungen durchgeführt.

- Ligation 1:5 bis 1:10, Mini/Midi 1:50 bis 1:100 in H₂O verdünnen

- auf Eis 1 µl der DNA-Lösung zu 50 µl kompetenten Zellen geben, mischen und in vorgekühlte Elektroporationsküvette pipettieren
- Elektroporation durchführen, die Bakteriensuspension mit 450 µl SOC auffüllen und in ein Eppendorf-Gefäß überführen
- 1 h bei 37°C inkubieren
- eine geeignete Menge auf eine LB_{amp}-Agarplatte (100 µg/ml Ampicillin) ausstreichen und ü. N. bei 37°C inkubieren

2.2.14 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Bei der Polymerase-Kettenreaktion wird ein ausgewählter DNA-Sequenzabschnitt amplifiziert. Dazu dienen zwei auf den entgegengesetzten DNA-Strängen liegende Oligonukleotide als Startstelle für eine thermostabile DNA-Polymerase. Die zwischen den Primern liegende Sequenz wird durch sich wiederholende Zyklen aus Aufschmelzen der DNA, Anlagern der Oligonukleotide und Strangsynthese exponentiell vervielfältigt.

Standardamplifizierungen für Klonierungen wurden in einem Endvolumen von 50 µl durchgeführt. Um Fehler während der PCR-Reaktion zu minimieren, wurde entweder die Pfu-Polymerase oder das Expand High Fidelity PCR-Kit (Roche) verwendet.

∑ 50 µl	PCR-Ansatz
1 µl	DNA (10 ng)
5 µl	10x Reaktionspuffer
40 µl	H ₂ O
1 µl	dNTPs (10mM)
1 µl	Primer 1 (12,5 mM)
1 µl	Primer 2 (12,5 mM)
1 µl	1 U Pfu-Polymerase

PCR- Standard-Programm:

Schritt	Dauer	Temperatur	Bedeutung
1	5 min	94°C	Initiale Denaturierung der DNA

2	30 sec	94°C	Denaturierung der DNA
3	1 min	Primer spezifisch: 3-6°C unter Schmelztemperatur	Bindung der Primer an die template-DNA
4	1 min*	68°C	DNA-Synthese mit der Pfu-Polymerase (Elongation)
5	10 min	68°C	finale DNA-Synthese
6	∞	4°C	Reaktionsende

*Elongation bei 68°C bei einer Dauer von 1 min pro 1 kb der gewünschten Fragmentlänge. Es wurden 30 Reaktionszyklen durchgeführt. Für alle PCR-Anwendungen wurde der MJ-Research PTC-200 Peltier Thermal Cycler (Biozym Diagnostik GmbH) eingesetzt.

2.2.15 Tabelle der verwendeten Primer zur Herstellung des GST-Fusionsproteins

Primer	Sequenz	Temperatur T _m
3'GST-PDZXhoI	CGA CAG AAT TCG TAT CAT CCA GAT	58°C
5'GST-PDZXhoI	CGACAGAATTTCGTATCATCCAGAT	61°C

Zur Herstellung der GST-Fusionsproteine wurden die PCR Fragmente mit dem High Pure PCR Purification Kit (Roche) aufgereinigt. Diese wurden dann über die eingefügten Schnittstellen in den entsprechend geöffneten pGEx-4T-2 Vektor subkloniert (über Eco RI und XhoI, s. 2.3.2: Herstellung von GST-Fusionsproteinen).

2.2.16 Tabelle der verwendeten Primer zur Ermittlung der Mutationen

Zur Charakterisierung der EMS induzierten Mutationen in den verschiedenen *sdt* Allelen wurden alle bisher bekannten Exons inklusive der Intron-Exon Übergänge sequenziert. Dazu wurden die folgenden Primer verwendet:

Primer	Sequenz
1RB-32275-5'	CTG ACC GAG ATC TCA CCG GTA ATC
1RB'3'32913	CTG TGG TTG TGA TTG TAC GTT GG

Primer	Sequenz
2RB-5'33509	ACA CCA CCA CCA CAT GCA CCA CTT A
2RB'3'-34400	TGT GAC CGC TGC TGC TGC TGC TC
3RB-5'34254	CAA TAC CAA CAG CAA CAC CAA CA
3RB'-3'-35060	AAT CAA CTG CCA AAA CAC ATC ACT G
4RB-5'-36443	GAA CAC TGG CAA CAA ATA AAC TCA
4RB'-3'-36964	GTT ATA TTC TTG GCA CAG TTT GAG
5RB-5'-44110	GCC CCT GCT TGT TTG ACT TCC TGG
5RB'-3'-45302	CCC AGC GGC TCC GTT GAC TTC T
6RB-5'-45025	GCG GCG ACG GGA TCG ACA CTC AG
6RB'-3'-46234	TTG GAT TTA AGG ATG GAC AGG AT
7RB-5'-46054	CCT ACG AGG AGG TGG CCT TGT AC
7RB'-3'-47203	GTC GCG ATT GTT GTG CAC CCA CT
8RB-5'-46999	ATC GAA TCT ATT TAA ACA GGA GGA A
8RB'-3'-47849	TCG GAG TCG CTT ATG GGT ATT ATT A
9RA-5'24653	TTG TGC TAT TGT TTG CTC CCC TCT C
9RA'-3'-25109	CCA CTG TAC GTT GCT GTT TTT GTT A
10RA-5'-25585	CGC AAG CGC ACC ACC ACA TT
10RA'-3'-25894	GGC TTT CCC CAT CCC CAA CTT
RM11-5'-1925	GCT GGG CTT TGG TGC TTT TGC G
RM11-3'2316	TGC CAT AGA TAG TTC GCC CAG TTT TAG A
RM12-5'	ATT ATT CCA TCC ACT TGT CCT CCC TCT T
RM12-3'	CAT AACGCT GTG ATC AAA CTC CCA ACC A
RM13-5'	TGA TTT GTT TTG AGC CAG CAT TTG
RM13-3'	CTT CCC GCG AGA TCA TTT AGC A

Die so amplifizierten PCR-Produkte wurden mittels Gelelektion (Jetquick Gel Extraction Spin Kit (Genomed)) aufgereinigt, konzentriert (zumeist wurden fünf PCR Reaktionen vereinigt) und zum Sequenzieren an Seqlab geschickt.

2.2.17 RT-PCR

Bei der RT-PCR geht der eigentlichen PCR eine reverse Transkription (RT) voraus, in der, ausgehend von der poly(A)⁺RNA, einzelsträngige DNA synthetisiert wird. Dazu wird die

reverse Transkriptase aus RNA-enthaltenen Retroviren eingesetzt (z. B. aus dem avian myeloblastosis virus (AMV) oder Monoleukämie murine Leukämie Virus (MMLV)). Diese reversen Transkriptasen besitzen zusätzlich noch eine H-Aktivität zum Abbau der RNA des entstehenden RNA-DNA Hybrids.

Die RNA wird zuerst in der RT-Reaktion revers transkribiert, entweder mit Oligo-dT-Primern oder mit genspezifischen Primern, gefolgt von einer PCR mit genspezifischen Oligonukleotiden. Bei der RT-PCR wurde das ONE-STEP-RT-PCR-Kit von Qiagen nach Herstellerangaben verwendet.

Ein typischer Reaktionsansatz sieht wie folgt aus:

Σ 50 μ l	RT-PCR
1 μ l	poly(A) ⁺ RNA (ca. 100 ng)
40,5 μ l	H ₂ O
5 μ l	10x RT-Puffer
1 μ l	dNTP Mix (10mM)
0,5 μ l	spezif. Primer oder Oligo-dT-Primer
0,5 μ l	spezif. Primer oder Oligo-dT-Primer
0,5 μ l	RNase Inhibitor
1 μ l	Omniscript Reverse Transkriptase (4U/ μ l)

Das RT-PCR Programm sieht folgendermaßen aus:

Schritt	Dauer	Temperatur	Bedeutung
1	45 min	50°C	Reverse Transkription
2	15 min	94°C	- Inaktivierung der reversen Transkriptase - Aktivierung der Hot Star Taq Polymerase - Denaturierung der DNA
3	30 sec	94°C	Denaturierung der DNA
4	1 min	Primer spezifisch: 3-6°C unter Schmelztemperatur	Bindung der Primer an die template-DNA
5	1 min*	72°C	DNA-Synthese mit der Pfu-

			Polymerase (Elongation)
6	10 min	72°C	finale DNA-Synthese
7	∞	4°C	Reaktionsende

Die Dauer der Elongation bei 72°C ist abhängig von der Größe der gewünschten Fragmente: 1 min pro 1kb Fragmentgröße. Es wurden 30 Reaktionszyklen durchgeführt.

2.2.18 RT-PCR Primer

Primer	Sequenz	Temperatur T _m
3'-B-46125	TGG GCG GGC CGA TGA GGA	62°C
3'-cMAGUK-2909	CAC ACT GGC GCT GGC CAG GAC ACT GTG G	94°C
3'-cMAGUK-44743	TGT GGG CGG CCG AAA CGC GAC CCG CCA G	98°C
5'-B-12153	GCA GCA GCA GCA GCA GCA ACA AAA C	78°C
5'-cGUK-UTR	GGG AAA GAC GCA GAA AAA GTG AGA AAG G	82°C
5'-cPDZ-MAGUK292	CCT GGG ACA TTG GCA ACT CGG TGC AGG A	90°C
5'-cPDZ-MAGUK322	CCT TCG TCA TCG CCG TCG AGG AGC ACG C	94°C
5'-RB-ATG-32599	ATG TTG ACC ATG TTG TCC GTG AAC CAA G	82°C
5'-RB-EX2-3725	CAC ACC GTG AGA TGG CCG TCG ATT GTC C	90°C
for1	GTC AGA CCT CGA GAG GGA AAG ACG	58°C
rev1	GTT GAT GGA TTC TAG AGA AGA TGG	58°C

Die erhaltenen PCR-Produkte wurden mittels Jetquick Gel Extraction Spin Kit (Genomed) aufgereinigt und mit dem TOPO TA Cloning Kit von Invitrogen kloniert. Nach Überprüfen der klonierten PCR-Fragmente mittels Mini-Plasmid-DNA-Präparation und anschließendem Verdau wurden die jeweiligen Vektoren mit den Fragmenten zum Sequenzieren an SeqLab geschickt.

2.2.19 Northern Blot Analyse

Ein Northern Transfer beschreibt die Übertragung von Gesamt- oder poly(A)⁺-RNA auf eine Nylonmembran (Amersham Pharmacia Biotech). Die RNA wird nach spezieller Vorbehandlung unter denaturierenden Bedingungen in einem Formaldehyd-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel wird anschließend direkt für den Northern Transfer eingesetzt. Mittels Hybridisierung mit einer DIG-markierter RNA Sonde (hier: Sdt-3'-

MAGUK) können die vorhandenen Transkripte in den aufgetrennten Gesamt- oder poly(A)⁺-RNA Proben auf der Nylonmembran nachgewiesen werden.

2.2.20 Herstellung DIG-markierter RNA Sonden

Digoxigenin-dUTP markierte Sonden werden für den *in situ* mRNA Nachweis in Embryonen oder in den Northern Blot Analysen eingesetzt.

Erkenntnisse über die räumliche und zeitliche Verteilung von Transkripten in Geweben lassen sich durch deren Detektion mit Hilfe von DNA- bzw. RNA-Sonden gewinnen. Bei der Herstellung der Sonden wird Digoxigenin-markiertes dUTP (DIG-dUTP) eingebaut und nach erfolgter Hybridisierung mit einem gegen das Digoxigenin gerichteten Antikörper *in situ* nachgewiesen. Ein Hauptvorteil von RNA-Sonden gegenüber DNA-Sonden ist ihre höhere Sensitivität. Außerdem erlauben sie beim zu untersuchenden Transkript eine Unterscheidung von Sense- und Antisense-Strang. Aufgrund der allgegenwärtigen RNasen erfordern RNA-Sonden allerdings besondere Sorgfalt und sind anfälliger für unspezifische Hintergrundfärbungen.

2.2.21 RNA/RNA *in situ*-Hybridisierung

DIG-markierte RNA-Sonden wurden durch *in vitro*-Transkription, mit Hilfe des DIG RNA Labeling Mix von Boehringer/Roche Diagnostics, nach Angaben des Herstellers gewonnen. Qualität und Quantität der RNA-Sonden wurden durch denaturierende Gelelektrophorese ermittelt. Zur Qualitätskontrolle der hergestellten RNA-Sonden wurden diese außerdem an fixierten Embryonen getestet.

- Embryonen in einem 1:1 Gemisch aus Xylol und Ethanol für 30 min inkubieren
- 4x kurz mit Ethanol, 2x kurz mit Methanol, 3x kurz mit 1x PBT waschen
- 25 min in 1x PBS + 5% Formaldehyd fixieren
- 4x kurz mit 1x PBT waschen
- 8 min in 1x PBT + 4 µg/ml Proteinase K inkubieren
- 4x kurz mit 1x PBT waschen
- 25 min in 1x PBS + 5% Formaldehyd nachfixieren
- 5x kurz mit 1x PBT waschen
- kurz in einem 1:1 Gemisch aus 1x PBT und Hybridisierlösung inkubieren
- 2x kurz mit Hybridisierlösung waschen

- mindestens 1 h in Hybridisierlösung bei 55°C vorhybridisieren
- Überstand abziehen und 100 µl Hybridisierlösung + 1-2 µl RNA-Sonde (5 min in Hybridisierlösung auf 65°C erwärmt und auf Eis abgekühlt) zugeben
- ü. N. bei 55°C hybridisieren
- 4x über 90 min in Hybridisierlösung bei 55°C waschen
- kurz in einem 1:1 Gemisch aus 1xPBT und Hybridisierlösung waschen
- 4x über 1 h mit 1xPBT waschen
- 1 h mit präabsorbiertem α -DIG-Antikörper (1:2000, verdünnt in 1x PBT) inkubieren
- 4x 15 min mit 1xPBT waschen
- 3x 5 min mit NBT-Puffer waschen
- Färbereaktion durchführen, Embryonen entwässern und Dauerpräparat anfertigen

2.2.22 Hybridisierung und Chemilumineszenz

Bei dem eigentlichen “Northern blotting“ wird die elektrophoretisch aufgetrennte RNA (Gesamt- oder poly(A)⁺RNA) auf eine Membran transferiert. Auf dieser erfolgt dann in einer Hybridisierung mit markierten Sonden der Nachweis spezifischer RNA-Fragmente. Es wurde wie folgt vorgegangen:

- unter dem Abzug ein großes RNA-Gel gießen: 1,5 g Agarose mit 85 ml H₂O und 10 ml 10x MOPS mischen, 2 min in der Mikrowelle bei max. Leistung (800 W) aufkochen, unter Rühren auf ca. 75°C abkühlen lassen und 5 ml 37% Formaldehyd zugeben.
- es wird jeweils eine Gesamt-RNA-Probe je ca. 30 µg, eine poly(A)⁺RNA-Probe (hier jeweils eine kopf- und eine embryonen-spezifische) und der RNA-Längenstandard (5 µl, RNA Marker der Firma Promega) wie folgt vorbereitet:
- x µl RNA mit 10 µl Formamid, 4 µl 37% Formaldehyd, 3 µl 10x MOPS, 1 µl Ethidiumbromid (400 µg/ml) mischen und 5 min bei 70°C inkubieren. Auf Eis abkühlen, 3 µl RNA-Probenpuffer hinzufügen und auftragen. Gellauf bei 100 V in 1x MOPS.
- währenddessen Northern Blot vorbereiten: Nylonmembran (Hybond N⁺, Amersham) zuschneiden
- Gelfoto anfertigen; dabei ein Lineal links am Gel anlegen, sodass sich der Nullpunkt auf Höhe der Geltaschen befindet.

- Gel für 15 min in dest. H₂O schwenken
- Gel für 2x 15min in 10x SSC schwenken
- Blot folgendermaßen aufbauen: Auf eine Glasplatte wird ein Whatman-Papier so aufgelegt, dass es beidseitig in ein mit 10x SSC gefülltes Pufferreservoir hineinreicht; RNA-Gel auflegen (Geltaschen-Öffnung oben) und mit Parafilmstreifen vollständig umranden; Nylonmembran passend und luftblasenfrei auf das RNA-Gel auflegen; mit den drei vorher in 10x SSC angefeuchteten Whatman-Papieren ebenso verfahren; 'Apura'-Papierstapel (ca. 6 cm dick) auflegen; mit Gewicht (ca. 500 g) beschweren
- RNA-Transfer über Nacht (ca. 18 h)
- Abbau des Northern Blots, dabei die Geltaschen auf der Nylonmembran markieren. Membran und Gel trennen und Transfer unter UV-Licht überprüfen; Nylonmembran trocknen lassen, beschriften und durch UV-Bestrahlung (120 mJ) die RNA auf der Nylon-Membran fixieren; bis zur Hybridisierung zwischen zwei 'Apura'-Papieren aufbewahren
- Nylonmembran/RNA mit 15 ml Vorhybridisierlösung für mindestens 1 h im Wasserbad bei 68°C inkubieren.
- Hybridisierlösung (7 ml) vorbereiten: antisense-RNA-Sonde (ca. 1,5 µg) in 100 µl Hybridisierlösung für 5 min aufkochen und anschließend direkt auf Eis abkühlen
- Vorhybridisierlösung gegen die Hybridisierlösung inklusive antisense-RNA-Sonde ersetzen und über Nacht im Wasserbad bei 68°C inkubieren.
- Nylonmembran/RNA bei RT für 2x 5 min in jeweils 50 ml 2x SSC/0.1%SDS waschen
- bei 68°C für 2x 15 min in jeweils 50 ml 0.1x SSC/0.1% SDS waschen
- äquilibrieren in Wasch-Puffer
- für 1 h in Blockierlösung inkubieren
- Antikörperinkubation mit anti-DIG-Meerrettichperoxidase-AK (1:10000) in Blockierlösung für 1h schwenken
- 2x 15 min in Waschpuffer schwenken
- 2x 5 min in TBS-T schwenken; Färbelösung herstellen (BM Chemiluminescence Blotting Substrate, Roche): 5 ml Lösung A mit 50 µl Lösung B mischen und im Dunkeln auf Raumtemperatur erwärmen lassen.
- Färbelösung auf Nylonmembran/RNA bringen, 90 sec stehen lassen

- Nylonmembran/RNA abtropfen lassen, in Folie in eine Röntgenfilmkassette legen und in der Dunkelkammer einen Röntgenfilm auflegen (Expositionsdauer wenige sec bis einige min).

2.3 Biochemische Methoden

2.3.1 Erzeugung von Sdt spezifischen Antikörpern

Ausgehend von der isolierten cMAGUK1 cDNA wurden zwei in *E. coli* exprimierte GST-Fusionsproteine hergestellt und zur Immunisierung von Ratten bzw. Kaninchen verwendet. Der Sdt-PDZ Antikörper ist gegen die PDZ Domäne gerichtet, wohingegen der Sdt-GUK Antikörper gegen die GUK Domäne gerichtet ist. Während der Sdt-PDZ Antikörper nur die Sdt-MAGUK-Proteine erkennen sollte (und nicht die GUK1), könnte der Sdt-GUK Antikörper sowohl die Sdt-MAGUK Proteine als auch die Sdt-GUK-Proteine erkennen. Die so hergestellten polyklonalen Antiseren sollten Informationen über mögliche Unterschiede in der Lokalisation der Sdt-GUK und MAGUK Proteine geben.

2.3.2 Herstellung von GST-Fusionsproteinen

Für das Fusionsprotein mit der Sdt-GUK Domäne wurde ein bereits hergestellter pGex-GUK-Vektor von A. Bachmann verwendet. Das für die PDZ Domäne kodierende Fragment (298 bp) wurde mittels PCR amplifiziert (Primer: 5'-PDZ-EcoRI und 3'-PDZ-XhoI) und *in frame* an das 3'-Ende des Glutathion-S-Transferase (GST)-Gens in den pGex-4T-2 Vektor kloniert (über Eco RI und XhoI).

Das pGex-Sdt-PDZ-Konstrukt, das pGex-Sdt-GUK-Konstrukt sowie der pGex Vektor alleine wurden separat in elektrokompente XL-1 blue Bakterienzellen transformiert, mehrere Klone in Einzelkulturen angeimpft und durch Zugabe von IPTG die Expression der GST-Fusionsproteine bzw. des GST-Proteins induziert.

Nach Aufarbeitung, SDS-PAGE-Gelelektrophorese und Coomassie blue-Färbung konnte durch Vergleich mit der GST-Kontrolle (29 kDa) die Bildung des Sdt-PDZ-GST- (41 kDa) und des Sdt-GUK-GST-Fusionsproteins (54 kDa) nachgewiesen werden. Größere Mengen des Fusionsproteins wurden dann folgendermaßen aus einem positiven pGex-Sdt-PDZ-Klon und einem pGex-Sdt-GUK-Klon isoliert:

Mit einer einzelnen Kolonie wurde eine 50 ml LB/Amp (50 µg/ml) Übernachtskultur bei 37°C angeimpft und am nächsten Tag mit 10 ml davon eine 500 ml Kultur bei 37°C angesetzt. Bei

Erreichen einer OD_{600} von 1 wurde die Expression des GST-Fusionsproteins durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration: 1 mM) induziert. Nach weiteren 4 h Inkubation wurden die Zellen abzentrifugiert (10 min, 5000 rpm, 4°C), der Überstand verworfen und das Pellet mit 25 ml kaltem GST-Wasch-Puffer resuspendiert. Die Zellen wurden erneut abzentrifugiert (10 min, 10000 rpm, 4°C), der Überstand verworfen und das Pellet diesmal in 10 ml kaltem 1x PBS resuspendiert. Diese Lösung wurde auf Eis 6x für 2 min sonifiziert und danach wurde schrittweise 500 µl 20% Triton X-100 (= 1%) zugegeben. Es folgte eine 30-minütige Inkubation auf einem Schüttler bei 4°C. Hiernach wurde die Lösung erneut zentrifugiert (10 min, 10000 rpm, 4°C) und der Überstand, in dem sich das zu reinigende Protein befindet, in ein neues Gefäß überführt. Pro 25 ml Überstand wurden 500 µl Glutathion Sepharose 4B zugegeben und diese Mischung bei 4°C für 1 h auf einer Wippe inkubiert, um die Bindung des GST-Fusionsproteins an die GST-Sepharose zu erlauben. Die Suspension wurde für 15 min bei 2500 rpm und 4°C zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgegossen. Die Glutathion Sepharose 4B wurde anschließend 3x mit 500 µl kaltem PBS gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurden 100 µl Glutathion Elutionspuffer hinzugegeben und für 10 min bei RT inkubiert. Die Suspension wurde für 2 min bei 13000 rpm zentrifugiert und der Überstand verwahrt. Die Herstellung dieser Elution mit jeweils 100 µl Glutathion Elutionspuffer wurde noch 3x wiederholt und die Überstände gesammelt (insg. 400 µl Eluat). Diese wurden dann bei -70°C eingefroren.

Zum Überprüfen der GST-Fusionsproteine wurden 10 µl des finalen Überstandes sowie jeweils 10 µl einiger Kontrollproben aus den einzelnen Aufreinigungsschritten mit 10 µl 2x Probenpuffer versetzt und für 10 min aufgeköcht. Zur Konzentrationsbestimmung wurden verschiedene Mengen auf ein 10 % SDS-Polyacrylamidgel im Vergleich zu einer BSA-Eichreihe aufgetragen. Die GST-Fusionsproteine konnten im Überstand detektiert werden und waren somit löslich (im Gegensatz zu unlöslichen Proteinen, die im Pellet vorkommen), so dass diese, ohne weitere Aufarbeitung, in den entsprechenden Konzentrationen zur Immunisierung zu Eurogentec (Belgien) geschickt wurden.

2.3.3 Spezifität der Sdt-PDZ und Sdt-GUK-Antiseren

Die gewonnenen Antiseren aus den Immunisierungen mussten auf ihre Spezifität hin untersucht werden. Dazu wurden sie in Western Blot Analysen und in *whole mount*-Antikörperfärbungen an Embryonen getestet. Die PDZ- und GUK-GST-Antiseren detektierten dabei in Western Blot Analysen das jeweilige GST-Fusionsprotein, jedoch konnten in wildtypischen Embryonenlysaten keine Proteine spezifisch detektiert werden. So

wurden in Embryonen mittels UAS-Gal4 System das Sdt-MAGUK Protein mit einem *dag32Gal4* Treiber überexprimiert (Fliegen wurden freundlicherweise von André Bachmann zur Verfügung gestellt) und ein Embryonenlysat hergestellt. Hierbei wurden mit dem Kaninchen-PDZ-Antiseren mehrere Proteine mit einer Größe zwischen 55 und 110 kDa detektiert. Die *whole mount*-Antikörperfärbungen zeigten eine Färbung in wildtypischen Embryonen (s. Ergebnis 2.3). In Embryonen, die Defizient für die *sdt* Region sind (ohne Sdt Expression), konnte mit den verschiedenen Sdt-Antiseren keine Expression detektiert werden.

2.3.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Proteine wurden in einem 0,75 mm dicken Polyacrylamid-Gel in einem diskontinuierlichen SDS-Puffersystem aufgetrennt. Hierzu wurde das Mini-Trans-Blot System der Firma BioRad gemäß den Angaben des Herstellers, verwendet. Proben wurden mit 2x SDS Probenpuffer versetzt und für mindestens 5 min aufgekocht. Die Elektrophorese erfolgte bei konstanter Stromstärke bei einer Anfangsspannung von 100V. Relative Molekülmassen wurden mit Hilfe von vorgefärbten Proteinstandards bestimmt (BioRad).

2.3.5 Coomassie Färbung

Proteingele wurden in ca. 5 Volumen Coomassie Färbelösung für mindestens 60 min bei RT inkubiert. Anschließend mit Entfärbelösung entfärbt und fixiert und auf Whatman 3MM Papier getrocknet.

2.3.6 Western Blot Analyse

Zum immunologischen Nachweis von den in SDS-PAGE aufgetrennten Proteinen wurden diese auf eine Nitrozellulosemembran (Hybond ECL, Amersham) transferiert. Der Transfer erfolgte bei 5 mA/cm² bei einer Dauer von 60 min bei 4°C.

Die Membran wurde für 5-10 min in 1X Ponceau S bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit destilliertem Wasser solange entfärbt, bis die Proteinbanden deutlich zu

sehen waren. Die Membran wurden danach entweder auf Whatman 3MM Papier getrocknet und aufbewahrt oder direkt für immunologische Nachweise verwendet.

Die Membran wurde anschließend in 5% Milchpulver in TBST für 1 h bei RT blockiert und danach mit dem primären Antikörper (ebenfalls in 5% Milchpulver/PBT) ü. N. bei 4°C inkubiert. Es folgten 3 Waschschrte mit TBST für jeweils 15 min bei RT und danach die Inkubation der Membran mit dem sekundären HRP gekoppelten Antikörper für 2 h bei RT. Die Membran wurde hiernach wieder 3 mal für 15 min mit TBST gewaschen. Die Proteine wurden mit Hilfe des Chemilumineszenz-Substrates (BM Chemiluminescence Blotting Substrate (POD), Boehringer/Roche Diagnostics) nachgewiesen.

2.3.7 Herstellung von Embryo- oder Kopf-Extrakten

Dieses Protokoll zur Herstellung von Proteinlysaten aus verschiedenen *Drosophila* Geweben hat sich für die Herstellung von Embryo und Kopf-Lysaten besonders gut bewährt. Es stammt von U. Thomas (Thomas et al., 1997).

Dem Lysispuffer werden vor dem Gebrauch die verschiedenen Protease Inhibitoren (Aprotinin, Leupeptin, Pepstatin, Pefaloc) in einer Konzentration von 2 µg/ml frisch hinzugefügt.

Drosophila Embryonen (aus übernacht Ablagen) oder junge adulte Köpfe wurden direkt in Eppendorf-Gefäße überführt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Eine Menge von ca. 0,4 ml Embryonen oder Köpfen (im Eppendorf-Reaktionsgefäß abgemessen) wurden mittels Mörser und Pistill homogenisiert und dann in einen Glashomogenisator überführt und mit ca. 250 µl Lysispuffer auf Eis homogenisiert.

Das Homogenisat wurde für 90 min auf einem Taumler bei RT inkubiert und dann für 5 min und 5000 rpm in einer Eppendorf Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches Eppendorf-Gefäß überführt, in 50 µl Aliquots aufgeteilt und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

Die Konzentrationsbestimmung des Proteins wurde wie folgt durchgeführt:

800 µl H₂O + 200 µl RotiQuant (Roth, Karlsruhe) + 2 µl Embryonenlysate mischen und OD₅₉₅ photometrisch bestimmen; OD₅₉₅=1 entspricht ca. 1 mg/ml Gesamtprotein.

2.4 Genetische „*Drosophila*“ Methoden

2.4.1 Fliegenzucht

Die Fliegen wurden bei Temperaturen zwischen 18°C und 25°C gehalten, und je nach Temperatur alle 2-4 Wochen auf frisches Futter gesetzt.

Detaillierte Beschreibungen zur Fliegenzucht, Herstellung des Fliegenfutters und anderen praktischen Anleitungen finden sich bei Ashburner, 1989 (Ashburner, 1989). Zur Sammlung von Embryonen wurde, wie von Wieschaus und Nüsslein-Vollhard 1986 beschrieben, vorgegangen (Wieschaus und Nüsslein-Vollhard, 1986).

2.4.2 Spezial-Futter für *Drosophila*

Abweichend von den Standardbedingungen wurden die Larven und Fliegen für verschiedene Experimente auf Spezialfutter gehalten.

2.4.2.1 Vitamin A Mangel-Diät

Die Larven und Fliegen wurden hierbei einer Vitamin A Mangel-Diät ausgesetzt, um die Menge an Rhodopsin in den Rhabdomeren der Photorezeptorzellen zu reduzieren (Nichols und Pak, 1985).

Vitamin A freies Medium:

270 ml	H ₂ O
230 ml	Traubensaft
auf einer Kochplatte erhitzen und	
5 g	Fructose
10 g	Sucrose
30 g	Glukose
11 g	Bacto-Agar

hinzufügen und aufkochen.

Auf 60°C abkühlen und

10 g	Trockenhefe (Bäcker)
10 ml	NaOH (1 M)
2 ml	Propionsäure
0.2 ml	Phosphorsäure
7.5 ml	Nipagin (10%)

hinzugeben und gut verrühren.

Das Medium in kleine Fliegenröhrchen abfüllen (20 - 25 ml) und für einige Tage trocknen lassen (4°C), bevor es verwendet wird.

2.4.2.2 G418 Selektion

Einige der FRT-Regionen auf den verschiedenen Chromosomen sind gekoppelt mit einer Resistenz gegen G418 (Neomycin (Neo)), sodass die Fliegen, die diese Region auf ihrem Chromosom besitzen, resistent sind gegen G418. So können, bei einer Rekombination mit G418, die Fliegen selektioniert werden, die diese FRT-Region besitzen (Xu und Rubin, 1993). Die Fliegen, die diese Resistenz nicht tragen (und somit nicht rekombiniert haben), sterben auf G418 Medium.

G418 wird in einer Stammlösung von 25 mg/ml vor Gebrauch frisch angesetzt. Die Endkonzentration von G418 soll zwischen 0,5- 0,75 mg je ml Fliegenfutter betragen. Das heißt, von der hergestellten Stammlösung werden 250 µl auf 10 ml Standard-Fliegenbrei pipettiert. In die Fliegenröhrchen mit dem Standardfutter werden viele kleine Löcher in den Brei hineingestanz (mittels Pasteurpipettenspitzen), damit sich die G418 Lösung möglichst gleichmäßig im Fliegenfutter verteilt. Neben den zu testenden Fliegen sollten, für neu hergestellte G418 Röhrchen, immer eine positive (Fliegen mit Neo-Resistenz) und eine negative Kontrolle (Fliegen ohne Neo-Resistenz) auf die Röhrchen gesetzt werden, um sicher zu gehen, dass die gewünschte Selektion auch erzielt wird.

2.4.3 Das UAS/GAL4-System

Das UAS/GAL4 System erlaubt die ektopische Expression von Genen zu einem bestimmten Zeitpunkt und in einem bestimmten Gewebe (Brand und Perrimon, 1993). Das System besteht aus einer Aktivator- und einer Effektor-Komponente. Der Aktivator ist der Hefe-Transkriptionsfaktor GAL4. Dieser kann in einer Fliege unter ausgewählten regulatorischen Sequenzen der Fliege exprimiert werden. Die Expression von GAL4 allein hat keine Auswirkungen, da GAL4 nicht als Aktivator für *Drosophila* Gene fungieren kann. Um die Transkription zu aktivieren benötigt GAL4 eine bestimmte DNA Sequenz, eine sogenannte "Upstream Activating Sequences" (UAS). Um ein bestimmtes Gen unter GAL4 Kontrolle zu exprimieren, bringt man es hinter fünf hintereinandergeschaltete GAL4 Bindungssequenzen in eine Fliege (Effektorstamm). Diese cis regulatorischen Elemente führen ohne GAL4 nicht zur Expression des nachgeschalteten Gens. Nach Kreuzung von Aktivator- und Effektor-Stamm kommt es in dem Teil der Nachkommenschaft, der beide Komponenten trägt, zur

ektopischen Expression des Zielgens. Die regulatorische Sequenz vor dem Aktivator bestimmt Zeitpunkt und Gewebe dieser Expression. In dieser Arbeit wurden als Aktivatorstamm dag32GAL4 verwendet.

2.4.4 Das FLP/FRT Expressionssystem

Die klonale Analyse der mutanten Augen wurde mit Hilfe des FLP/FRT Systems durchgeführt (Xu und Rubin, 1993). Das System besteht aus zwei Komponenten: einer **FLP**-Rekombinase (FLP) und einer spezifischen Sequenz, FRT (**FLP-recombinase-target**) genannt, an der die FLPase die Rekombination vornimmt. Voraussetzung für ein solches Rekombinationsereignis ist das Vorhandensein von zwei getrennten FRT Sequenzen; zwischen diesen kann das Enzym die Rekombination vermitteln. Sitzen die FRT Sequenzen in der Nähe des Zentromers zweier homologer Chromosomen, so werden bei Anwesenheit der FLPase diese Chromosomenarme mit hoher Frequenz ausgetauscht. Tragen die Chromosomenarme verschiedene Allele eines Gens, so entstehen nach der Teilung Tochterzellen, die für die entsprechenden Allele homozygot sind. Diese Zellen teilen sich weiter und bilden einen Klon im jeweiligen Gewebe der Fliege. Ist das Chromosom mit einer zell-autonomen Markermutation versehen, so können die Klone identifiziert und der Phänotyp des zu testenden Allels analysiert werden. Mit dieser Methode lassen sich die Auswirkungen von embryonal letalen Mutationen auch in späteren Entwicklungsstadien analysieren.

2.4.5 Herstellung von *sdt* Augenklonen mittels FLP/FRT System

Da *sdt* Mutationen embryonal letal sind, mussten für die Analyse der adulten Augen homozygot mutante *sdt* Augenklone induziert werden. Dies geschah über das FRT/FLP System. Da *sdt* auf dem X-Chromosom lokalisiert ist, wurde ein FRT19A tragendes Chromosom zur Rekombination verwendet. Die *sdt* FRT19A Chromosomen besitzen als Marker ein mutantes *white* (*w*⁻) Gen, wodurch die homozygoten *sdt* Augenklone kein Pigment besitzen. Das Gegenchromosom ohne *sdt* Mutation trägt ein wildtypisches *white* Gen, sodass die heterozygoten und die homozygoten Zellen als Marker rotes Pigment in den Ommatidien exprimieren. Als FLPase Quellen wurde entweder ein UAS System verwendet (*eyless*-GAL4/UAS-FLP) oder das FLPase Gen direkt unter die Kontrolle des augenspezifischen Enhancers *eyeless* (*ey*) exprimiert. Der *eyeless* Enhancer aktiviert die Expression eines Gens ausschließlich ab der späten Embryogenese in der sich entwickelnden Augen-Antennenscheibe.

Die so hergestellten homozygot mutanten Augenklone besitzen eine Größe von 20 bis 30% des adulten Auges. Die verbleibenden 70 bis 80% sind wildtypisch oder heterozygot.

Um die Größe der Augenklone zu steigern, wurde auf das eigentlich wildtypische FRT tragende Chromosom eine homozygot letale Mutation rekombiniert (Newsome et al., 2000). Dadurch sterben die Zellen, die diesen letalen Faktor homozygot besitzen, während der frühen Entwicklung ab. Die verbleibenden homozygot mutanten (hier: *sdt*) und heterozygoten Klone gleichen die fehlenden Klone aus, so dass das Auge zu 96-98% aus homozygot mutanten Klonen für das zu untersuchende Gen bestehen.

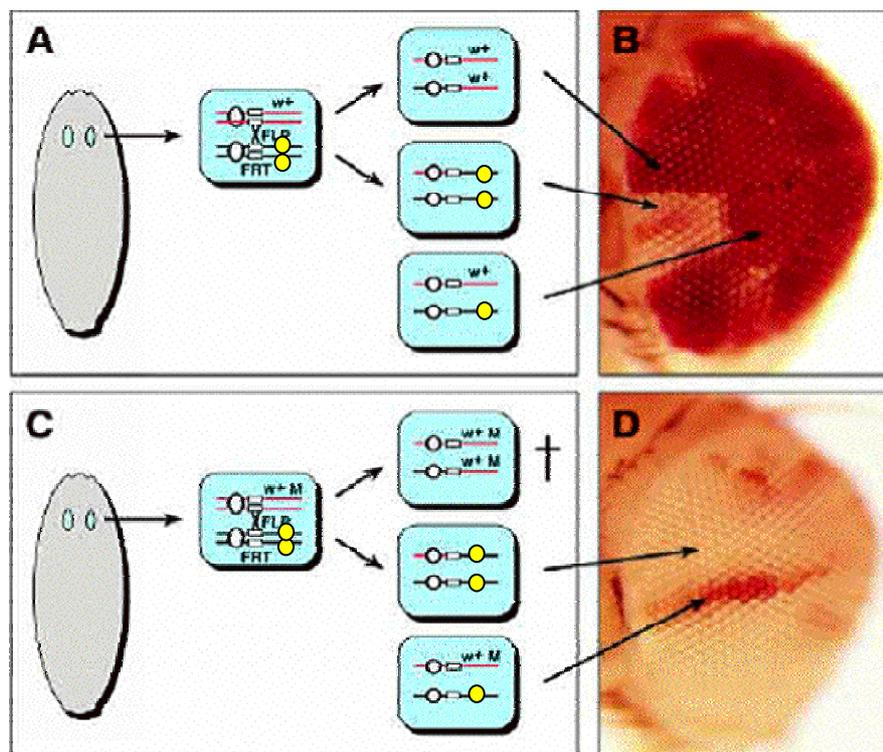


Abb. 2.1 Erzeugung mitotischer Rekombination mit Hilfe des FLP/FRT-Technik (modifiziert nach: Newsome et al., 2000.)

(A und C) Schematische Darstellung zweier verschiedener Möglichkeiten zur Erzeugung mitotischer Rekombination mittels FLP/FRT Technik am Beispiel einer einzelnen Zelle.

(B und D) Photographie der Komplexaugen mit unterschiedlich großen Augenklonen, die durch die FLP/FRT Technik hergestellt wurden.

(A) Gezeigt ist eine Zelle mit einem homologen Chromosomenpaar, die die FRT-Elemente in der Nähe ihrer Zentromere tragen (weißes Kästchen) und nur auf einem Chromosom das FRT-Element mit der zu untersuchenden Mutation (gelb) aufweisen. Das Chromosom, das keine Mutation trägt, ist zusätzlich mit einem w^+ Marker versehen (rote Linien), wohingegen das die Mutation tragende Chromosom mit einem w^- Marker versehen ist (schwarze Linie). Durch Expression der FLP-Rekombinase in diesen Zellen (blaue Farbe) durch den augenspezifischen Enhancer *ey*, wird die Rekombination zwischen den FRT-Elementen induziert. Es entstehen Tochterzellen mit drei unterschiedlichen Genotypen. Eine Zelle ist homozygot wildtypisch und trägt den w^+ Marker, wodurch die Ommatidien rot pigmentiert sind (B), eine weitere Zelle ist homozygot für die Mutation und trägt keinen Marker (w^-), die Ommatidien sind somit weiß. Die dritte Zelle ist heterozygot für die Mutation und trägt auch den w^+ Marker, so dass diese Ommatidien auch rot sind.

(C-D) In den in C abgebildeten Zellen trägt das w^+ markierte Chromosom (ohne Mutation) eine zusätzliche zell-letale Mutation (M), die dazu führt, dass die so entstandenen homozygoten (M) Zellen sterben. Dadurch erhöht sich die Anzahl der homozygoten Zellen (gelb), die durch diese Analyse untersucht werden sollen. Augenklone, die mittels dieser Methode hergestellt werden, bestehen zu 95 bis 99% aus mutanten Ommatidien (**D**).

2.4.6 Kreuzungen für die Rekombination von *sdt* mit FR19A

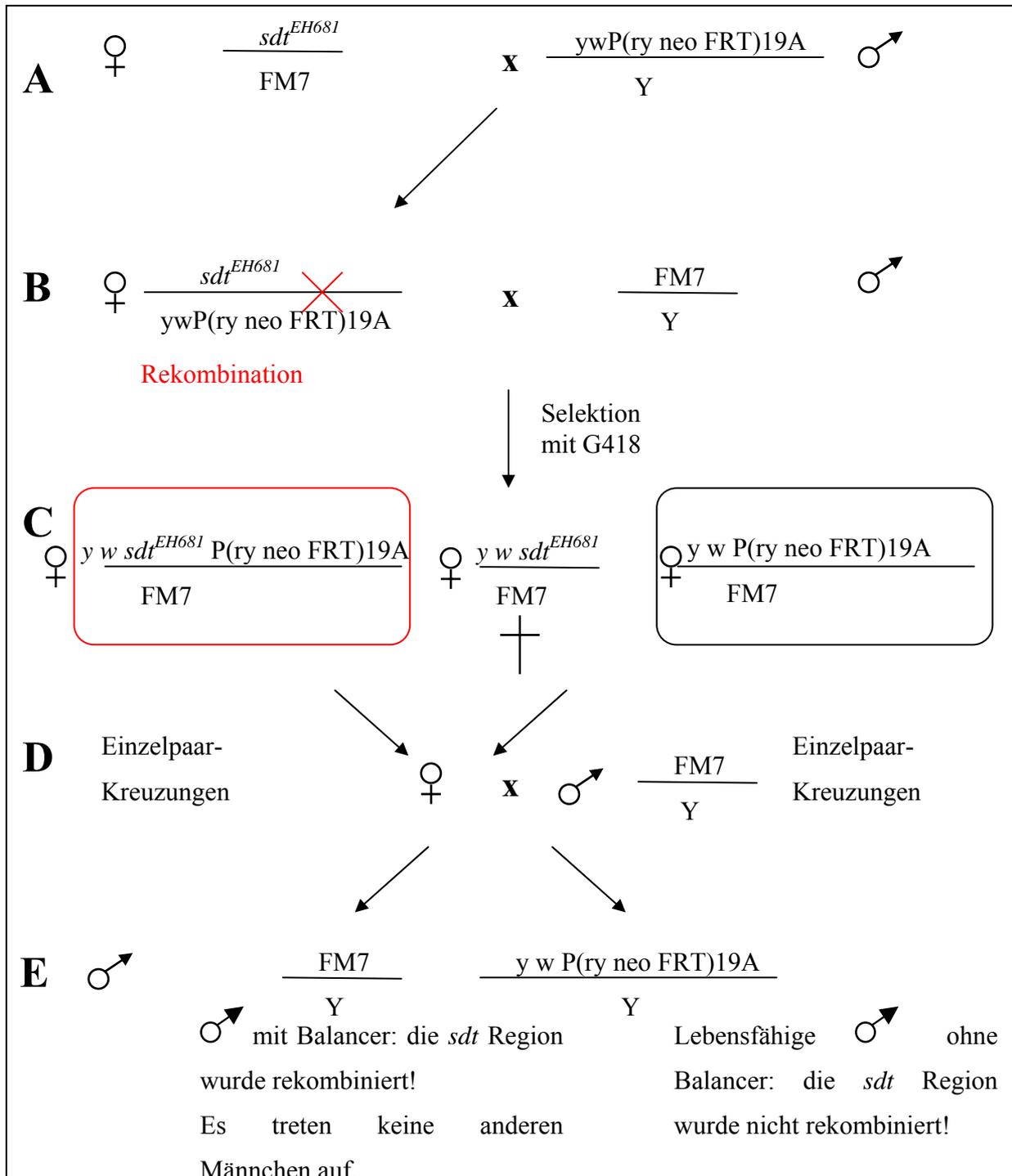


Abb. 2.2 Kreuzungsschemata zur Erzeugung von *sdtFRT19A* Allelen.

Für die Rekombination der verschiedenen *sdt* Allele mit der FRT19A Region wurden die verschiedenen Genotypen in einem ersten Schritt zusammengekreuzt (Abb. 2.2 A). Dabei gehen aus dieser Kreuzung neben anderen Genotypen Weibchen hervor (Abb. 2.2, B), die sowohl *sdt* als auch die FRT Region tragen. Die Rekombination (s. Abb. 2.2, B:

Rekombination= X) findet zwischen den beiden homozygoten Chromosomen in den Keimzellen der Weibchen während der Meiose statt. Diese Weibchen werden mit FM7 Männchen gekreuzt. FM7 ist ein Balancer Chromosom, das weitere Rekombinationen verhindert. Durch Selektion mit G418, das einen Marker für die FRT Region darstellt, werden Fliegen, die kein FRT tragen, selektioniert (nur am Beispiel der weiblichen Nachkommen gezeigt) (Abb. 2.2, C). Auch hier sind nicht alle möglichen Nachkommen aufgeführt. Die Weibchen mit dem gewünschten rekombinierten Genotyp (Abb. 2.2, C: in Rot umrandet) können von den anderen Weibchen durch Analyse der Nachkommen aus der folgenden Einzelpaarkreuzung mit FM7 Männchen (Abb. 2.2, D) unterschieden werden. In diesen Nachkommen (Abb. 2.2, E) besitzen nur die Linien korrekt rekombinierte Regionen, die nur Balancer FM7 tragende Männchen aufweisen, da *sdt* in Hemizygotie letal ist. Die so ermittelten *sdt*FRT Linien werden mittels Kutikulapräparation und Kreuzen gegen die Duplikation (Abb. 2.3, 2.) auf ihren *sdt* Genotyp überprüft.

2.4.7 Kreuzungen zur Erzeugung kleiner und großer Augenklone

Es wurden kleine und große *sdt* mutante Augenklone induziert. Die kleinen Augenklone wurden zur Analyse der morphologischen Defekte (Semidünnschnitte und Ultradünnschnitte) eingesetzt, da die homozygot mutanten Augenklone direkt benachbart zu den wildtypischen als Kontrollregionen ausgewertet werden konnten. Für die *whole mount* Antikörperfärbungen wurden in der Regel große Augenklone induziert, da das Pigment in den wildtypischen und heterozygoten Regionen zu Autofluoreszenz in den Ommatidien führt und so auch größere Klonbereiche analysiert werden konnten.

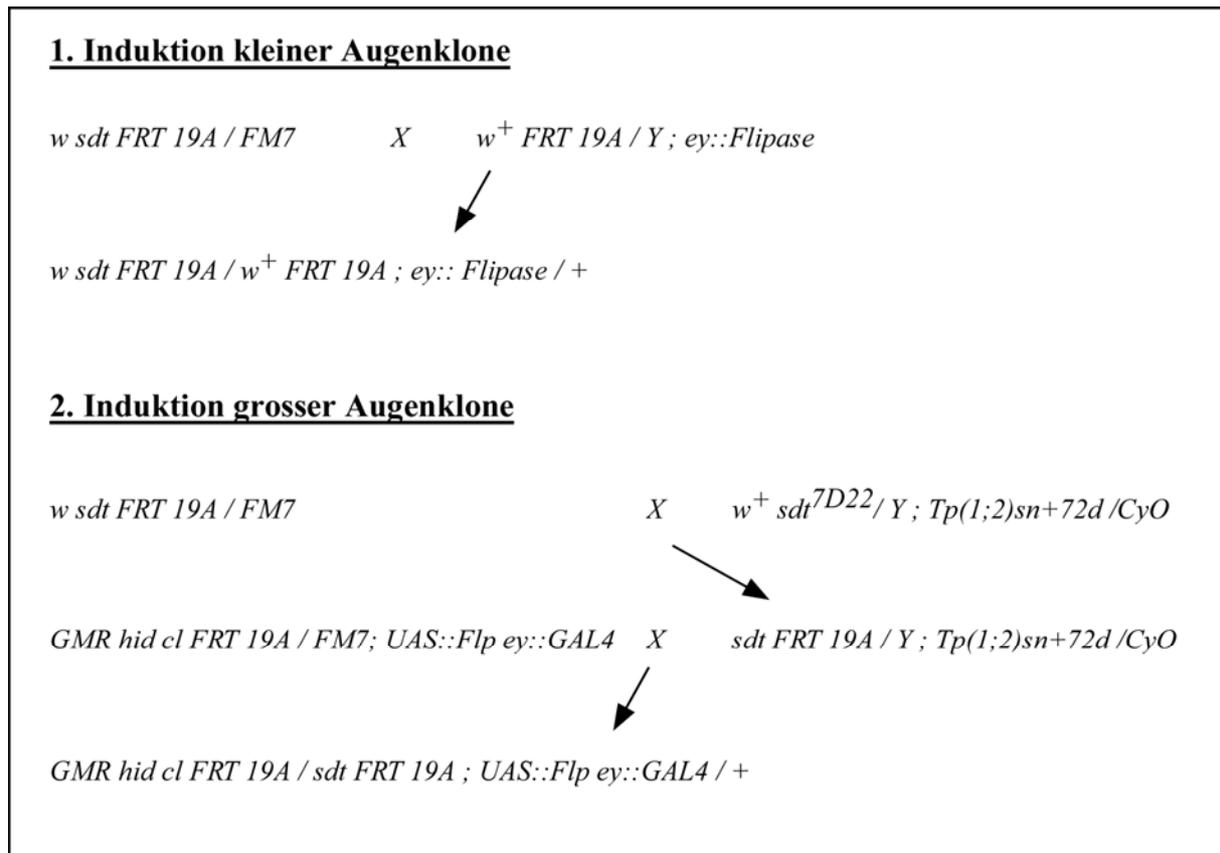


Abb. 2.3 Kreuzungsschemata zur Herstellung von *sdt* homozygot mutanten Augenklonen.

2.5 Histologische Methoden

2.5.1 Kutikulapräparation

Fliegen des gewünschten Genotyps werden zur Eiablage auf Apfelsaft-Agarplatten gesetzt. Die abgelegten Eier einer ü. N. Ablage werden anschließend für weitere 48 h bei 25 °C inkubiert, so dass alle Embryonen die Embryonalentwicklung vom zeitlichen Rahmen hätten abschließen können und Kutikula sekretiert haben.

Nach dem Waschen in H₂O werden die Embryonen dechorionisiert (ca. 4 min in Natriumhypochlorid) und nochmals mit H₂O gewaschen. Die Embryonen werden auf einem Objektträger mit einem Tropfen Hoyers/Lactat überführt und eingedeckelt. Diese Objektträger werden ü. N. bei 65°C erhitzt, wodurch sie sich klären.

2.5.2 Fixierung von Embryonen

Die Fixierung von Embryonen für Antikörperfärbungen und *in situ* Hybridisierung erfolgte an der Phasengrenze zwischen 3,7% Formaldehyd und Heptan. Es wurde wie folgt vorgegangen:

Die Embryonen werden auf Apfelsaft-Agarplatten mit einer Hypochloridlösung (ca. 6% aktives Chlor) dechorionisiert, auf Siebe abgegossen und mit destilliertem Wasser gründlich gewaschen. Dann werden sie in ein 2,0 ml Eppendorf-Gefäß überführt, das 1 ml Heptan, 900 µl PBS und 100 µl 37% Formaldehyd enthält, und für 15 min (für Antikörperfärbungen) bzw. 30 min (für *in situ* Hybridisierungen) bei 37°C geschüttelt. Anschließend wird die wässrige (untere) Phase entnommen. Nach Zugabe von 1 ml Methanol wird zur Entfernung der Vitellinmembran ca. 1 min geschüttelt. Die Embryonen ohne Vitellinmembran sinken zu Boden und werden mehrmals mit Methanol gewaschen. Fixierte Embryonen können in Methanol bei -20°C gelagert werden.

2.5.3 Dechorionisierung für Embryonenlysate

Zur Verwendung von fixierten Embryonen für SDS-Page- und Western Blot Analyse müssen diese ohne Formaldehyd fixiert werden. Die Embryonen werden wie oben beschrieben dechorionisiert, gesammelt und gewaschen. Dann werden sie in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

2.5.4 Antikörperfärbungen an Embryonen

Embryonen sollten bei allen Schritten in der Lösung in Bewegung sein.

- Rehydrierung der fixierten Embryonen durch 3x schnelles Waschen mit PBT
- 30 min Inkubation mit 10% NGS in PBT
- Inkubation mit dem primären Antikörper in 5% NGS in PBT für 2 h bei RT oder ü. N. bei 4°C
- Abnehmen des primären Antikörpers
- 3x 15 min waschen mit PBT
- Inkubation mit dem sekundären Antikörper in 5% NGS in PBT für 2 h bei Raumtemperatur
- Abnehmen des sekundären Antikörpers
- 3x 15 min Waschen mit PBT
- Einbettung der Embryonen in Mowiol mit DABCO auf einem Objektträger.

2.5.5 Antikörperfärbungen an Augen-Antennen-Imaginalscheiben

- Imaginalscheiben wurden in *Drosophila* Ringer-Lösung präpariert (gekühlt) und in einem Dreierblockschälchen auf Eis gesammelt
- 15 min in 4% Paraformaldehyd bei RT fixieren
- 3x 10 min in 0,3% PBT waschen
- 30 min in 10% NGS in 0,3% PBT blockieren (Blockierung kann auch für ein paar Tage bei 4°C stattfinden)
- Inkubation mit primärem Antikörper in 5% NGS in 0,3% PBT für mindestens 2 h bei RT oder ü. N. bei 4°C
- 3x 20 min mit 0,3% PBT waschen
- Inkubation mit sekundärem Antikörper in 5% NGS in 0,3% PBT für 2 h bei RT
- 3x 20 min mit 0,3% PBT waschen
- Einbettung der Embryonen in Mowiol mit DABCO auf einem Objektträger

2.5.6 Antikörperfärbungen an *whole mount* adulten Augen

- Adulte Augen wurden in *Drosophila* Ringer-Lösung präpariert (gekühlt) und in einem Dreierblockschälchen auf Eis gesammelt
- 30 min in 8% Stefanini's Fixativ auf Eis fixieren
- 3x 15 min in 0,1 % PBT waschen
- Inkubation mit primärem Antikörper in 5% NGS in 0,1% PBT für mindestens 2 h bei RT oder ü. N. bei 4°C
- 3x 20 min mit 0,1% PBT waschen
- Inkubation mit sekundärem Antikörper in 5% NGS in 0,1% PBT für 2 h bei RT
- Einbettung der Embryonen in Mowiol mit DABCO auf einem Objektträger.

2.5.7 Osmiumfixierungen für Semidünnschnitte und Ultradünnschnitte an Augen

- *Drosophila*-Köpfe abtrennen und halbieren, so dass ein Auge und die Mundwerkzeuge zusammenbleiben.
- Köpfe direkt in 25% Glutaraldehyd überführen und für 20 min bei RT fixieren.
- 2x 20 min in 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,2 waschen
- 30 min Simultanfixierung mit 1% Osmium und 2% Glutaraldehyd in Phosphatpuffer, pH 7,2, auf Eis und im Dunklen

- 2x 20 min mit Phosphatpuffer waschen
- 60 min in 2% Osmiumin Phosphatpuffer fixieren, auf Eis und im Dunklen
- 2x kurz in H₂O waschen
- aufsteigende Ethanolreihe zum Dehydrieren: jeweils 5 min in 50, 70, 90, 96% EtOH auf Eis
- 2x 10 min 100% EtOH bei RT
- 2x 10 min Aceton
- In Aceton/Araldit (1:1) ü. N. bei 4°C Grad (Dreierblockschälchen)
- Aceton für ca. 1,5 h unter dem Abzug abdampfen lassen
- Augen in frisches Araldit überführen (ca. 4 h)
- Augen in Einbettungsformen mit frischem Araldit überführen, für mind. 48 h bei 65°C polymerisieren lassen.
- Fixierte und eingebettete Augen können nun für Semidünnschnitte oder Ultradünnschnitte verwendet werden.

2.5.8 Herstellung von Semidünnschnitten

Nach der Einbettung der Augen in Araldit wurden die Einbettungsformen pyramidenförmig angetrimmt. Die Semidünnschnitte (2,5 µm) wurden mit einem Glasmesser am Mikrotom REICHERT OM 2 geschnitten, in einen Wassertropfen (auf einen Objektträger) überführt und für 20 min auf einer 95°C heißen Heizplatte gestreckt. Nach der Trocknung wurden sie mit einer Mischung aus einer 1% Toluidin (Serva) und einer 1% Borax Lösung (Serva) für ca. 45 Sekunden gefärbt, anschließend kurz angetrocknet und in DePex (Serva) eingedeckelt.

2.5.9 Herstellung von Ultradünnschnitten für die elektronenmikroskopische Analyse

Ultradünnschnitte (ca. 50 Angström - golden bis silberfarbig) wurden mit einem Diamantmesser am Mikrotom REICHERT OM 2 geschnitten, auf Nickelnetzchen überführt und getrocknet. Anschließend wurden die Schnitte auf den Netzchen mit einer 2% Uranylacetat Lösung für 5 min inkubiert; mit H₂O gewaschen auf den Netzchen mit einer Bleicitratlösung inkubiert (Kontrastieren). Nach erneutem Waschen in H₂O wurden die Netzchen getrocknet und mit einem Elektronenmikroskop EM109 der Firma Zeiss analysiert.

2.5.10 Lichtbedingungen für die Augenanalysen - Schwachlicht und Dauerlicht

Die Fliegen mit den induzierten *sdt* mutanten Augenklonen wurden für die Analysen der lichtinduzierten Phänotypen unter Dauerlicht und unter Schwachlicht (als Kontrolle) gehalten.

Dauerlicht-Bedingungen werden durch die Verwendung einer Schreibtischlampe und einer Lichttafel erreicht, die sich gegenüber stehen und für eine gleichmäßige Beleuchtung von zwei Seiten sorgen. Dabei sind die Fliegenröhrchen spezifisch auf einer Mittellinie ausgerichtet. Die Lichtintensität entspricht $17 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}^1$ einer photosynthetisch aktiven Bestrahlung im Wellenbereich 380-710 nm. Dabei beträgt die Temperatur 24-25°C.

Die Birnen der Lampen (Osram 60W) werden regelmäßig gewechselt. Die Fliegenröhrchen werden alle drei Tage gewechselt, da der Futterbrei sehr stark austrocknet.

Schwachlicht-Bedingungen werden durch Halten der Fliegen bei minimalem Licht in einem Fliegeninkubatorschrank (25°C) ohne separate Lichtquelle erreicht. Die Fliegen sind keiner direkten Bestrahlung ausgesetzt und befinden sich in nahezu vollständiger Dunkelheit.

3 Ergebnisse

3.1 Vorversuche

Ziel dieser Arbeit war es, unterschiedliche *sdt* Allele auf ihre Funktion im *Drosophila* Komplexauge zu untersuchen. Die Allele können durch unterschiedlich lokalisierte Mutationen in ihren Genprodukten variieren, was sich in unterschiedlichen *sdt* Phänotypen widerspiegeln kann. Die Analyse dieser Phänotypen soll ermöglichen, Rückschlüsse auf Sdt-Funktionen im Auge und ggf. auf die Bedeutung der Sdt-Domänen zu ziehen.

Dazu wurden verschiedene, teilweise bereits charakterisierte (Hong et al., 2001), sowie weitere, noch nicht näher charakterisierte *sdt* Allele ausgewählt (Tab. 3.1), die mittels EMS-Mutagenese hergestellt wurden (Eberl et al., 1992; Nüsslein-Volhard et al., 1984; Wieschaus et al., 1984) und Hummel (unpubliziert). Die meisten der so erzeugten Mutanten wurden aufgrund ihres spezifischen *sdt* Kutikulaphänotyps und Komplementationstests als *sdt* Allele eingestuft.

Bei einer EMS Mutagenese werden durch zusätzliche Alkylgruppen Basenfehlpaarungen induziert, die zu Punktmutationen (Transitionen) führen. Diese Punktmutationen können zu zusätzlichen Stopps (*nonsense* Mutation) oder zum Aminosäureaustausch (*missense* Mutationen) führen, die eine Veränderungen oder sogar den Verlust der Proteinfunktion zur Folge haben. Grundsätzlich können durch EMS-Mutagenese amorphe Allele (Allel, das funktionslos ist), hypomorphe Allele (Allel zeigt nur noch eingeschränkte wildtypische Funktion) und hypermorphe Allele (Allel ist aktiver als das wildtypische) erzeugt werden.

Die im Rahmen dieser Arbeit ausgewählten Allele wurden mit einem Chromosom rekombiniert, das eine FRT Sequenz an der zytologischen Position 19A besitzt (*FRT19A*). Somit können in späteren Analysen homozygot mutante Augenklone durch FRT/FLP vermittelte mitotische Rekombination induziert werden (s. Methoden: 2.1.6).

Um sicherzustellen, dass bei der Rekombination das jeweilige *sdt* Allel erhalten blieb, wurde im Folgenden ihr Kutikulaphänotyp untersucht. Außerdem wurde getestet, ob die *sdt* Mutation die Ursache für den Phänotyp ist. Dazu wurde eine *sdt*-Duplikation ($Dp(1,2)sn^{72d+}/CyO$) eingekreuzt, um zu sehen, ob der *sdt* mutante Phänotyp von dieser gerettet werden kann (Tab. 3.1). Durch Tragen der Duplikation werden die hemizygoten *sdt* Männchen lebensfähig.

Alle Linien bis auf eine (*sdt*^{YK88}) konnten durch die Duplikation gerettet werden. Somit wurden bis auf *sdt*^{YK88} alle Allele für die weiteren Analysen zur Herstellung von großen und kleinen Augenklonen verwendet (Tab. 3.1).

<i>sdt</i> Allel	Referenz	Bemerkung	Rettung Dp(1,2)sn ^{72d+} /CyO
<i>sdt</i> ^{7D22}	Wieschaus et al., 1984	amorph* EMS induziert	+
<i>sdt</i> ^{E195}	T. Hummel Schneider, 1996	amorph* EMS induziert	+
<i>sdt</i> ^{EH681}	Eberl und Hilliker, 1988	amorph* EMS induziert	+
<i>sdt</i> ^{G463}	U. Schäfer Bachmann, 2000	hypomorph* P(lacw)Insertionslinie	+
<i>sdt</i> ^{K70}	T. Hummel Schneider, 1996	amorph* EMS induziert	+
<i>sdt</i> ^{K85}	T. Hummel, Schneider, 1996	amorph* EMS induziert	+
<i>sdt</i> ^{M120}	T. Hummel Schneider, 1996	amorph* EMS induziert	+
<i>sdt</i> ^{N5}	C. Nüsslein Vollhardt M. Seeger	amorph*	+
<i>sdt</i> ^{Q292}	Schneider, 1996	hypomorph* EMS induziert	+
<i>sdt</i> ^{XH21}	Lindsley and Zimm, 1992	hypomorph* EMS induziert	+
<i>sdt</i> ^{XN05}	Wieschaus et al., 1984	hypomorph EMS induziert	+
<i>sdt</i> ^{XP96}	Wieschaus et al., 1984	amorph* EMS induziert	+
<i>sdt</i> ^{YK88}	Lindsley and Zimm, 1992	amorph* EMS induziert	keine Rettung

Tab. 3.1 Übersicht der rekombinierten *sdt* Allele, die für die weiteren Analysen eingesetzt worden sind. * - bezogen auf embryonalen Phänotyp.

3.1.1 Die ausgewählten Stardust Allele zeigen *sdt* spezifische Kutikulaphänotypen

Die phänotypische Charakterisierung von *sdt* mutanten Embryonen zeigte, dass sie als Embryonen sterben und einen charakteristischen Kutikulaphänotyp aufweisen (Tepass und Knust, 1990; Wieschaus et al., 1984). Die Kutikula ist das Sekretionsprodukt einiger ektodermaler Epithelien und wird gegen Ende der Embryogenese u. a. von der Epidermis und den Tracheen sezerniert (Abb. 3.1, A). Daher gibt ihr Zustand Aufschluss über die Morphologie des (darunterliegenden) sezernierenden Epithels. Bei den für diese Arbeit ausgewählten *sdt* Allelen können unterschiedlich starke amorphe und hypomorphe Allele unterschieden werden (Bachmann, 2000; Bachmann et al., 2001; Schneider, 1996).

Die Embryonen amorpher Allele zeigen einen starken bis sehr starken Kutikulaphänotyp, der noch kleinere Reste zusammenhängender Kutikula aufweist oder nur noch Kutikulakrümel (stardust = Sternenstaub). Diese Kutikulaphänotypen ähneln dem Phänotyp amorpher *crb* Allele (Jürgens et al., 1984; Wieschaus et al., 1984). Die meisten der analysierten *sdt* Allele können als amorphe Allele eingestuft werden (Abb. 3.1, B - H und Tab. 3.1).

Die hypomorphen *sdt* Allele zeigen einen schwächeren Kutikulaphänotyp (Abb. 3.2, C - E). Es existieren noch kleinere zusammenhängende Kutikulastücke und seltener findet man auch wildtypisch aussehende Kutikulas (mit Kopfstrukturen), die jedoch dorsal ein Loch aufweisen (Schneider, 1996).

Neben den Phänotypen der amorphen und hypomorphen Allele wurden Kutikulaphänotypen gefunden, deren Allele als intermediär bezeichnet werden können. Sie weisen sowohl Aspekte des starken *sdt* Phänotyps (Kutikula-Krümel) als auch kleine, zusammenhängende Kutikulaschilde auf (Abb. 3.2, B).

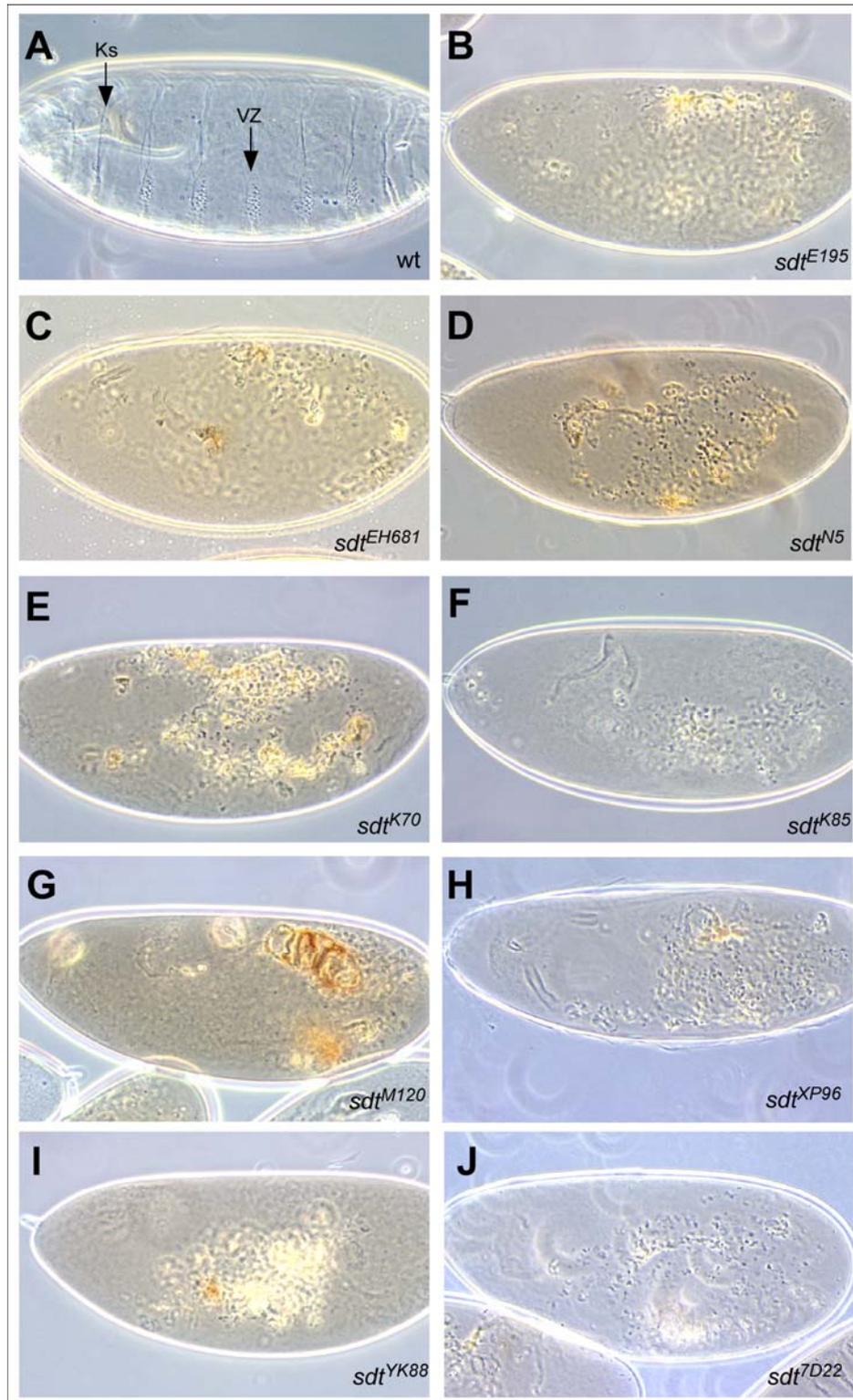


Abb. 3.1 Kutikulaphänotypen amorpher *sdt* Allele.

(A) Wildtypische Kutikula mit Fokus auf die ventralen Zähnchenbänder (anterior zeigt bei allen Bildern nach links und dorsal nach oben, Filzkörper und Kopfskelett sind außerhalb der Fokusebene). Ks= Kopfskelett, VZ= ventrale Zähnchenbänder. (B - H) amorphe Kutikulaphänotypen der *sdt* FRT19A Embryonen: *sdt*^{E195} (B), *sdt*^{EH681} (C), *sdt*^{N5} (D), *sdt*^{K70} (E), *sdt*^{K85} (F), *sdt*^{M120} (G), *sdt*^{XP96} (H), *sdt*^{YK88} (I), *sdt*^{7D22} (J). Die Kutikula besteht nur noch aus Kutikularesten (Krümeln), es existieren weder Kopfskelett, noch ventrale Zähnchenbänder oder Filzkörper.

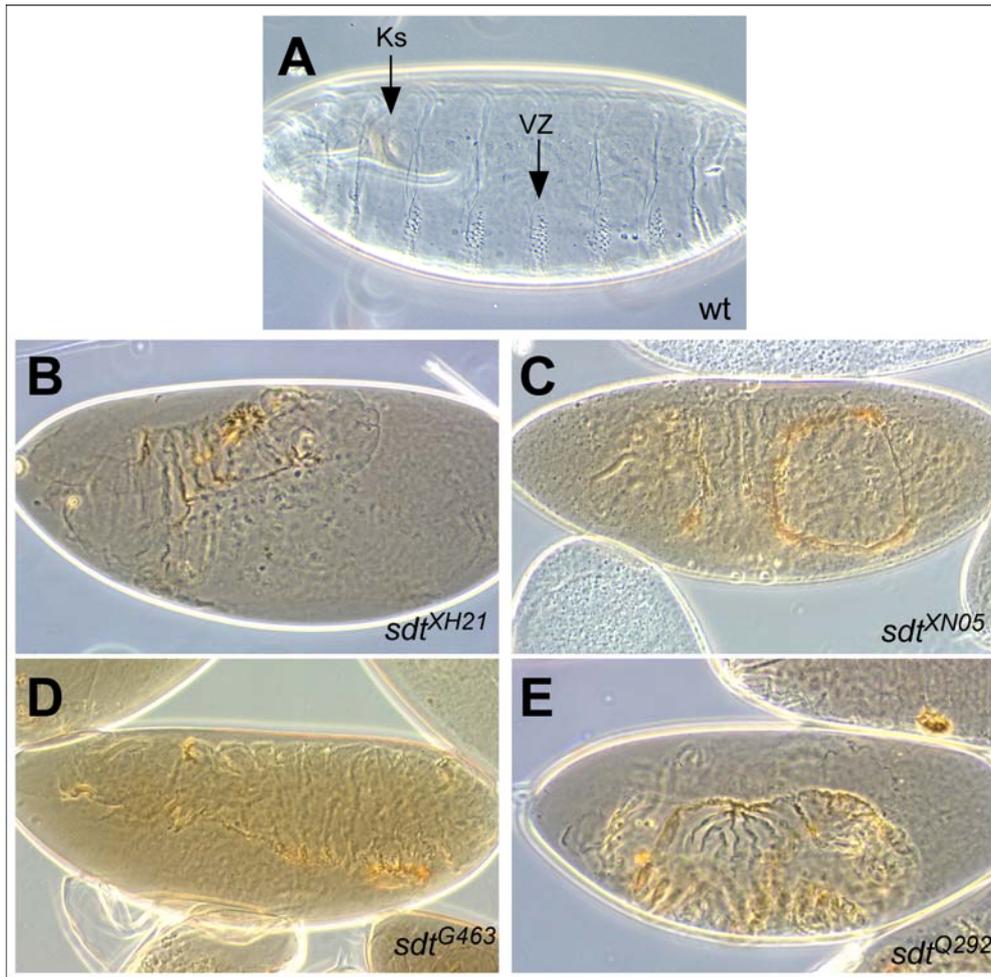


Abb. 3.2 Kutikulaphänotypen intermediärer und hypomorpher *sdt* Allele.

(A) Wildtypische Kutikula mit Fokus auf die ventralen Zähnenbänder (anterior zeigt bei allen Bildern nach links und dorsal nach oben, Filzkörper und Kopfskelett sind außerhalb der Fokusebene). Ks= Kopfskelett, VZ= ventrale Zähnenbänder.

(B) intermediärer Kutikulaphänotyp von *sdt*^{XH21}. (C-E) Kutikulaphänotypen der hypomorphen *sdt* Embryonen: *sdt*^{Q292} (C), *sdt*^{XN05} (D) und *sdt*^{G463} (E). Die Embryonen weisen alle noch zusammenhängende Kutikulareste auf.

3.1.2 Sdt-PDZ und Sdt-GUK Antikörper zeigen spezifisch lokalisierte Sdt Färbungen an Embryonen

Um Sdt Protein in den zu untersuchenden Augenklonen nachzuweisen, wurden zwei verschiedene Antikörper hergestellt. Der Sdt-PDZ Antikörper ist gegen die PDZ Domäne, der Sdt-GUK Antikörper gegen die GUK-Domäne gerichtet. Durch die unterschiedliche Spezifität der Antiseren sollte eine Differenzierung zwischen den Sdt-GUK und Sdt-MAGUK Isoformen ermöglicht werden (Abb. 1.4). Es wurden GST-Fusionsproteine hergestellt, die jeweils zur Immunisierung zweier Ratten und im Falle von Sdt-PDZ zusätzlich zur Immunisierung zweier Kaninchen durch die Firma Eurogentec, Herstal, Belgien verwendet wurden.

Die erhaltenen Antiseren wurden mittels Immunhistochemie an Embryonen und mit Hilfe einer Western Blot Analyse auf ihre Spezifität getestet. Mit beiden Antikörpern kann eine apikale Lokalisation von Sdt in Derivaten des Ektoderms, Epidermis, Vorderdarm, Hinterdarm, Tracheen, Speicheldrüsen und Malpighischen Gefäßen nachgewiesen werden (Abb. 3.3, A). Dieses Ergebnis stimmt mit bereits veröffentlichten Daten überein (Bachmann et al., 2001). Die Spezifität der Antiseren wurde durch Immunhistochemie an Embryonen, die Defizient für die Sdt Region sind, getestet. Es konnte keine spezifische Färbung detektiert werden, wodurch die Spezifität der Antiseren gezeigt wurde.

In Western Blot Analysen detektieren die Antikörper die bakteriellen GST-Fusionsproteine, aber nur das Kaninchen-Sdt-PDZ Serum konnte auch weitere Proteine in Lysaten aus Embryo, Kopf und überexprimierten daG32/UAS-cMAGUK1 Embryonen detektieren (Abb. 3.3, B). Die erwartete Größe für das Sdt-MAGUK Protein ist 140 kDa (Bachmann et al., 2001). Im Embryo konnten nur sehr kleine Proteine (< 54 kDa) detektiert werden, während in den mit dem UAS-GAL4 System ubiquitär überexprimierten Sdt-MAGUK1-Protein verschiedene Proteine mit Größen von 54 , 60 , 70, 130 kDa detektiert werden konnten. Im Kopf konnten Proteine mit einer Größe von 54, 60, 65, 90, 100, 140 kDa detektiert werden. In Körperlysaten finden sich auch verschieden große Sdt Proteine, die jedoch eine maximale Größe von ca. 100 kDa besitzen. Nur die kleineren Proteine unter einer Größe von 50 kDa konnten auch in einer Western Blot Kontrolle mit den Präimmunseren detektiert werden (Daten nicht gezeigt), so dass sie als unspezifisch anzusehen sind. Somit detektiert der Kaninchen-Sdt-PDZ Antikörper Sdt Proteine unterschiedlicher Größen. Welche dieser Proteine tatsächlichen Sdt Isoformen entsprechen oder aber Abbauprodukte sind, muss in weiteren Analysen gezeigt werden.

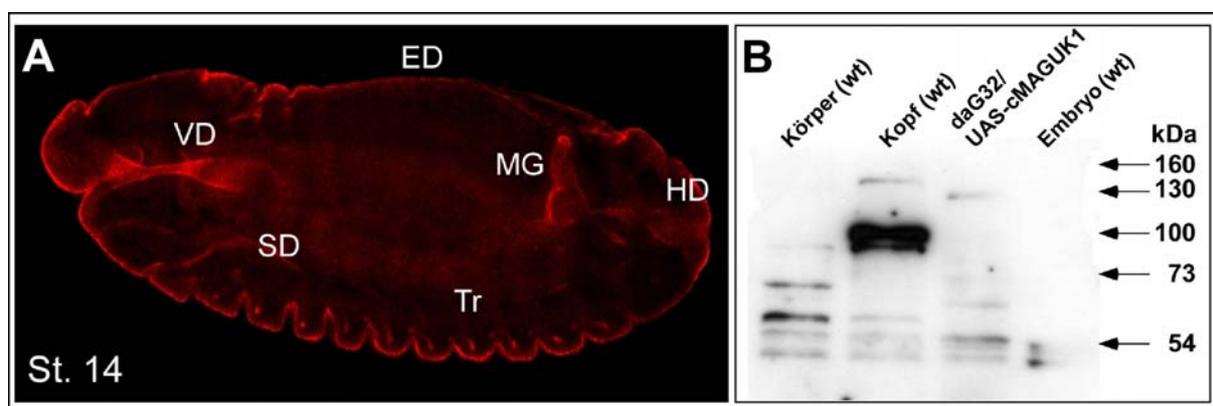


Abb. 3.3 Untersuchungen zur Spezifität der α -Sdt-PDZ-Antiseren durch Antikörperfärbungen an Embryonen und in Western Blot Analysen.

(A) Das Sdt-PDZ Kaninchen Antiserum detektiert ein spezifisches Sdt Muster in wildtypischen Embryonen. Embryo Stadium 14, alle Epithelien ektodermaler Herkunft werden mit dem Sdt-PDZ Antikörper (rot) detektiert. Die Ratten-PDZ Antiseren und Guk-Kaninchen Antiseren zeigten die

gleiche Spezifität. VD=Vorderdarm, HD=Hinterdarm, EP=Epidermis, MP=Malpighische Gefäße, Tr=Tracheen, SD=Speicheldrüsen.

(B) In der Western Blot Analyse detektiert nur das Sdt-PDZ Antiserum in Lysaten aus *Drosophila* Körper, Kopf, daG32/UAS-cMAGUK1 überexprimierenden Embryonen und Wildtyp-Embryonen Proteine verschiedener Größen.

3.1.3 Stardust Expression in den verschiedenen *sdt* Allelen im Embryo

Um festzustellen, inwieweit die *sdt* Allele noch eine Sdt Expression besitzen, oder ob es sich um ein Protein Null-Allel handelt, wurden zygotisch mutante Embryonen mit den Sdt Antiseren gefärbt. Die *sdt* Embryonen zeigen schon sehr früh morphologische Veränderungen, die auf dem Verlust der Zellpolarität beruhen und sich unter anderem in einem Abrunden der Zellen widerspiegeln (Bachmann et al., 2001). Ab Stadium 12 weichen diese mutanten Embryonen in ihrer äußeren Form deutlich von den wildtypischen ab, da sie ein „klötzchenförmiges“ Aussehen annehmen. Es ist anzunehmen, dass in derartig defekten Embryonen, ähnlich wie in *crb*-mutanten Embryonen, bereits Zellen mittels Apoptose eliminiert werden. In diesem fortgeschrittenem Stadium ist keinerlei Sdt Expression mehr zu detektieren, außer vereinzelt eine (wahrscheinlich) unspezifische Färbung in den Tracheengruben.

Aus diesem Grund wurden vor allem jüngere Stadien analysiert, die noch nicht so starke Defekte zeigten (Abb. 3.4). Mittels einer Doppelfärbung mit Neurotaktin (NT), wurden die basolateralen Membranen der Epidermiszellen markiert, so dass Zellformveränderungen gut erkennbar wurden. Um die homozygot mutanten Embryonen von den wildtypischen und heterozygoten zu unterscheiden, wurde eine β -Galaktosidase Färbung durchgeführt, die nur die wildtypischen Embryonen markiert (Streifenmuster in rot). Diese tragen auf ihrem zweiten Chromosom einen Balancer, der ein Reporter-gen (*ftz::lacZ*) trägt, das mittels einer Antikörperfärbung detektiert wurde. Während in den wildtypischen Embryonen die apikalen Membranen der epidermalen Zellen durch den Sdt Antikörper markiert werden (Abb. 3.4, A, B, C, D), kann in den mutanten Embryonen weder mit dem Sdt-PDZ (Abb. 3.4, C, D, E, F), noch mit dem Sdt-GUK Antikörper (Daten nicht gezeigt) eine Sdt Expression detektiert werden. Neben den in der Abbildung 3.4 gezeigten Embryonen der Allele *sdt*^{K85} (Abb. 3.4 C und D), *sdt*^{N5} (Abb. 3.4, E und F) zeigen auch die mutanten Embryonen der Allele *sdt*^{E195}, *sdt*^{K70}, *sdt*^{EH681}, *sdt*^{XN05}, *sdt*^{XP96} keine Sdt Expression mehr (Daten nicht gezeigt). Die Neurotaktin-Färbung markiert in den jüngeren mutanten Embryonen (bis St. 10) die basolateralen Membranen (Abb. 3.4, C, mittlerer Embryo), während sie in älteren Embryonen nicht mehr zu detektieren (älter als St. 12, unterer Embryo Abb. 3.4, C) oder nur noch delokalisiert vorzufinden ist (St. 11, Abb. 3.4, E und F).

Als Negativkontrolle dienten Embryonen der *sdt* Defizienz *HA11*, in der große Teile des *sdt* Locus fehlen (*Bachmann et al., 2001*). Mutante Embryonen dieser Linie zeigen mit keinem der vorhandenen Antiseren eine *sdt* Färbung (Daten nicht gezeigt).

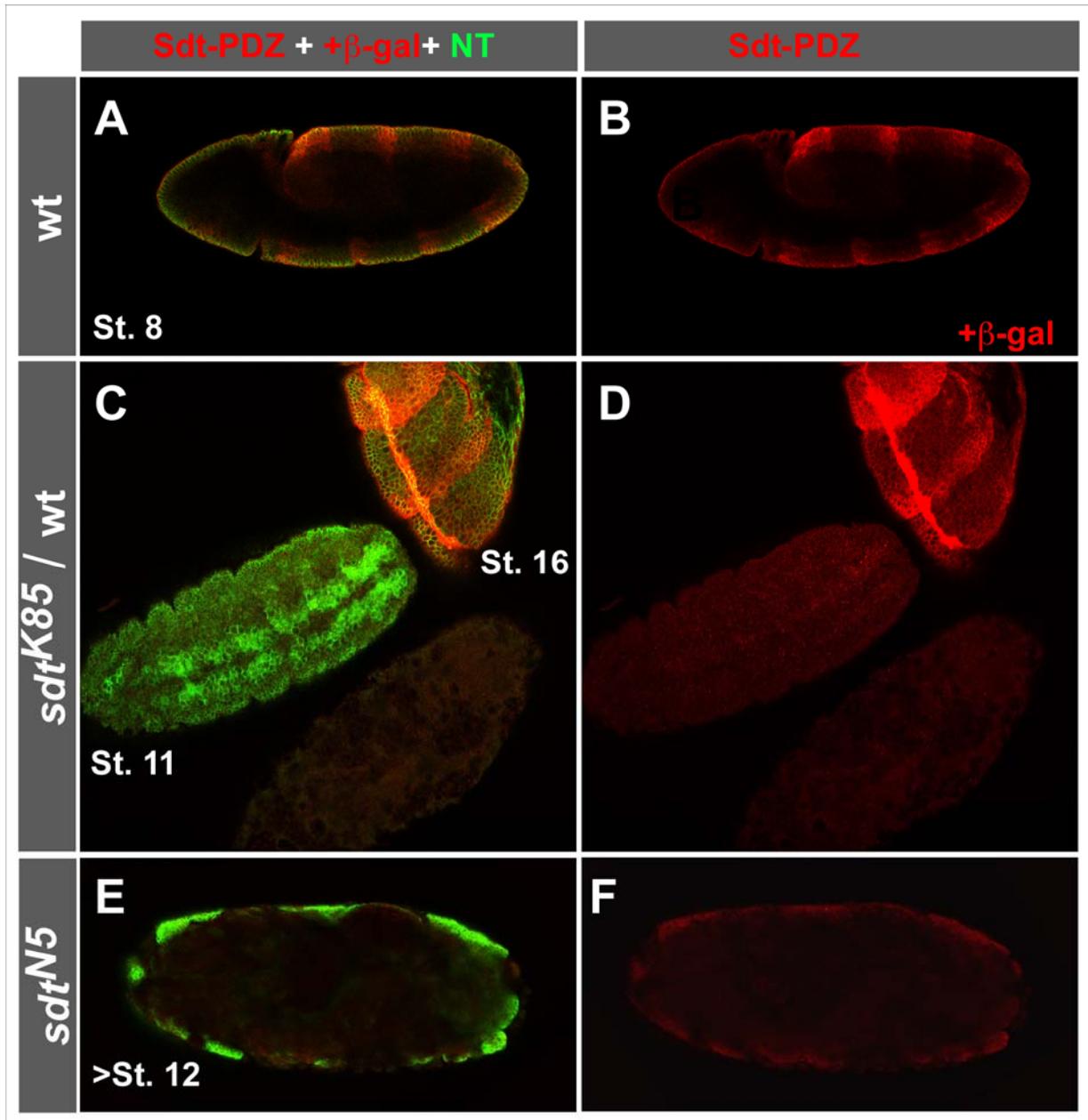


Abb. 3.4 Verlust von Sdt Expression in *sdt* mutanten Embryonen.

Antikörperfärbungen an wt, *sdt*^{K85} und *sdt*^{N5} zgotisch mutanten Embryonen mit Sdt-PDZ (rot) und Neurotaktin (NT, grün, als Marker für die basolaterale Membran) sowie einer β -gal Färbung (rot, nur im wt). (**A**, **B**) Die wildtypischen Embryonen (Stadium 8) sind mit einer Dreifachfärbung mit Sdt-PDZ (rot, **B**), β -Gal Antikörper (rot, Streifenmuster, **B**) und NT (grün), anterior zeigt nach links, dorsal nach oben. (**C**, **D**) Zwei mutante *sdt*^{K85} Embryonen (mittlerer Embryo ~ Stadium 12, Aufsicht auf ventral, keine Sdt Färbung; unterer Embryo älter als Stadium 14, Orientierung nicht mehr zuzuordnen, keine Sdt und NT Färbung) neben einem wildtypischen Embryo (oben rechts, Stadium 16, mit β -Gal, Sdt-PDZ und NT Färbung). (**E**, **F**) *sdt*^{N5} mutanter Embryonen (älter als Stadium 12) dargestellt.

3.1.4 Stardust kolokalisiert mit Crb und DPatj im Rhabdomerstiel des adulten Komplexauges

In der Epidermis und anderen epithelialen Geweben von *Drosophila* ist der subapikal gelegene Crb-Komplex an der Aufrechterhaltung der apiko-basalen Polarität und der Ausbildung der ZA beteiligt. Sdt interagiert als Teil dieses Komplexes mit Crb, DPatj und DLin-7 (Bachmann et al., 2001; Bachmann et al., 2004).

Ebenfalls epithelialen Ursprungs sind die Komplexaugen von *Drosophila*. Bei ihren Photorezeptoren handelt es sich um stark modifizierte Epithelzellen, deren apikaler Bereich während der pupalen Entwicklung eine Spezialisierung in zwei Bereiche erfährt: in Rhabdomer und Rhabdomerstiel. Analysen ergaben, dass auch im Komplexauge Crb exprimiert wird und im Rhabdomerstiel lokalisiert ist. Es wird dort bei der Aufrechterhaltung der ZA sowie der Ausbildung des Rhabdomerstiels benötigt. Verlust von Crumbs führt sowohl zu morphologischen als auch degenerativen Defekten im adulten Auge (Izaddoost et al., 2002; Johnson et al., 2002; Pellikka et al., 2002).

Da Sdt als direkter Interaktionspartner von Crb agiert, stellte sich die Frage, inwieweit auch andere Komponenten des subapikalen Komplexes, speziell Stardust, im Komplexauge exprimiert werden und auch an der Ausbildung ähnlich mutanter Phänotypen wie dem von Crb beteiligt sind. Bei Antikörperfärbungen sowohl mit dem Sdt-GUK (Abb. 3.5 A, C) als auch mit dem Sdt-PDZ Antikörper (Abb. 3.16, A) konnte gezeigt werden, dass das Sdt Protein benachbart zu den Rhabdomeren lokalisiert ist. Doppelfärbungen mit DPatj (Abb. 3.5, B, C) zeigten eine Kolokalisation mit Sdt im Rhabdomerstiel (Abb. 3.5 C), was darauf hinweist, dass der embryonale Crumbs Komplex auch im adulten Auge konserviert ist.

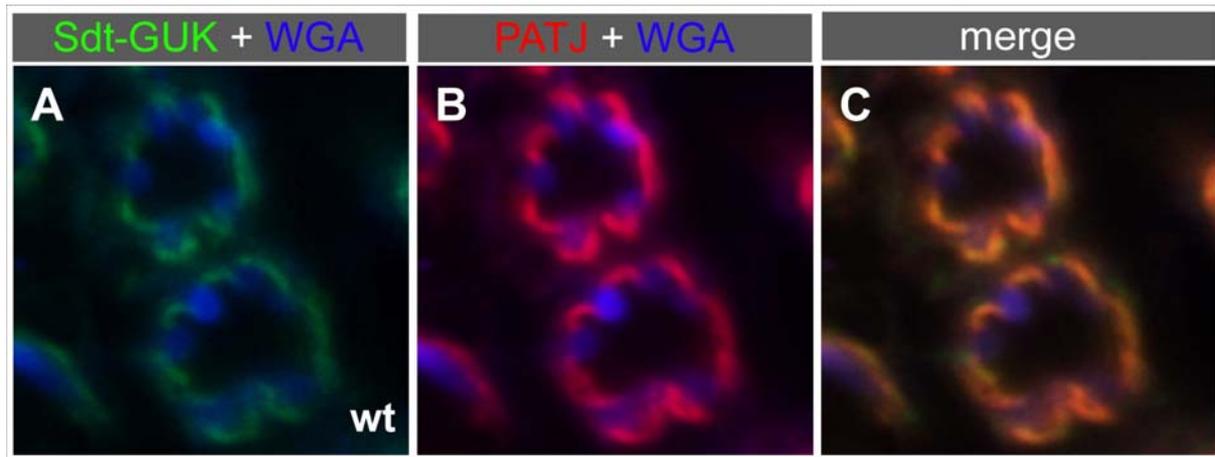


Abb. 3.5 Expression von Sdt im adulten Komplexauge von *Drosophila*.

(A – C) Dreifachfärbung mit Sdt-GUK (grün), *DPatj* (rot) und WGA (Wheat Germ Agglutinin, blau), ein Marker für die Rhabdomere. Sdt und *DPatj* kolokalisieren im Rhabdomerstiel (C), der vom Rhabdomere und der ZA begrenzt wird. (s. Abb. 3.16, G für Sdt-PDZ Färbung)

3.2 Analyse von *sdt* mutanten Augenklonen

Um die Funktion von Sdt in den Photorezeptorzellen näher zu analysieren, wurde der Funktionsverlust-Phänotyp (*loss of function*) von *stardust* untersucht. Die *sdt* Mutation ist homozygot letal, so dass homozygot mutante Augenklone durch *FRT/FLP*-spezifische mitotische Rekombination erzeugt werden müssen (Newsome et al., 2000; Xu und Rubin, 1993). Das Enzym Flipase, das die spezifische Rekombination an den FRT Stellen katalysiert, wird dazu von einem *eyeless*- Enhancer spezifisch in den Augen-Antennenscheiben exprimiert. Die verschiedenen *sdt FRT19A* Allele (siehe 3.1) wurden zur Erzeugung von Augenklonen eingesetzt. Die *sdt* mutanten Augenklone wurden, in Anlehnung an den bereits näher analysierten Phänotyp *crumbs*-mutanter Augen, sowohl auf morphologische Defekte und Veränderungen in den Ommatidien (unter normalen bzw. Schwachlicht Bedingungen) hin untersucht, als auch auf lichtinduzierte Degeneration (unter konstantem Licht).

3.2.1 Die mutanten *sdt*-Allele lassen sich in vier phänotypische Klassen unterteilen

Der Phänotyp der *sdt* mutanten Augenklone wurde nach 7 Tagen bei niedriger Lichtintensität sowie nach 7 Tagen bei Dauerlicht analysiert und die getesteten Allele konnten in Abhängigkeit von ihrem Phänotyp in vier Klassen unterteilt werden.

Klasse I Allele wiesen keine identifizierbaren morphologischen Veränderungen auf. Klasse II Allele wiesen einen *crb*-ähnlichen morphologischen Phänotyp auf. Klasse III Allele wiesen lichtinduzierbare Degeneration auf. Klasse IV Allele wiesen einen *crb*-ähnlichen morphologischen Phänotyp und lichtinduzierte Degeneration auf.

In *crb* mutanten Augen konnte gezeigt werden, dass der morphologische Phänotyp charakterisiert ist durch das Fehlen von Photorezeptorzellen (PRZ) und einer Reihe von variablen Veränderungen in den Photorezeptorzellen: Verkürzung des Rhabdomerstiels, Verdickungen, Verkürzungen der Rhabdomere, benachbarte Rhabdomeren kontaktieren einander, *Zonula adherens* Defekte in den proximalen Regionen (Johnson et al., 2002; Pellikka et al., 2002).

Die lichtinduzierte Degeneration ist in *crb* mutanten Augen ein lichtabhängiger, dynamischer Prozess, der je nach Belichtungsdauer einen schwachen oder stärkeren Phänotyp zur Folge hat (Johnson et al., 2002). Zuerst sterben nur einzelne Photorezeptorzellen bis nach 7 - 10 Tagen nur noch wenige Photorezeptorzellen pro Ommatidium vorhanden sind, bzw. vollständige Ommatidien fehlen (Johnson et al., 2002). Die Rhabdomere zeigen dabei Zeichen starker Auflösung, die betroffenen Zellkerne runden sich ab, Nukleolus, Nukleoplasma und Zytoplasma erscheinen kondensiert (typische Anzeichen für programmierten Zelltod).

Klasse	Allel	Morphologischer Phänotyp	Licht induzierter Phänotyp
I	<i>sdt</i> ^{7D22}	-	-
I	<i>sdt</i> ^{EH681}	-	-
I	<i>sdt</i> ^{M120}	-	-
I	<i>sdt</i> ^{Q292}	-	-
I	<i>sdt</i> ^{XH21}	-	-
I	<i>sdt</i> ^{G463}	-	-
I	<i>sdt</i> ^{XN05}	-	-
II	<i>sdt</i> ^{XP96}	+	-
III	<i>sdt</i> ^{N5}	-	+
IV	<i>sdt</i> ^{E195}	+	+
IV	<i>sdt</i> ^{K70}	+	+
IV	<i>sdt</i> ^{K85}	+	+

Tab 3.2 Einteilung der *sdt* Allele in vier verschiedene phänotypische Klassen.

3.2.2 *sdt* Allele der Klasse I zeigen keinen mutanten Phänotyp im adulten Auge

Zur Klasse I gehören die Allele *sdt*^{7D22}, *sdt*^{EH681}, *sdt*^{M120}, *sdt*^{Q292}, *sdt*^{XH21}, *sdt*^{G463} und *sdt*^{XN05}. Diese Augenklone zeigten keine auffälligen Veränderungen oder Abweichungen von

wildtypischen Ommatidien (s. Abb. 3.6), und sind auch bei näherer Analyse mittels Elektronenmikroskopie wildtypisch (Abb. 3.7, am Beispiel von *sdt^{EH681}*). Es konnten weder Zeichen einer veränderten Morphologie, noch lichtinduzierter Zelltod beobachtet werden.

Die wildtypischen Klonbereiche sind durch die Pigmentkörner in den umgebenden Pigmentzellen identifizierbar, wohingegen die mutanten *sdt* Ommatidien kein Pigment in ihren Pigmentzellen aufweisen, ausgenommen die Augenklone von *sdt^{XN05}*, bei denen die *sdt* mutanten (und heterozygoten) Augenklone rot sind (Abb. 3.6, I und J). Die benachbarten mutanten und wildtypischen Klonbereiche (Abb. 3.6) ermöglichen einen direkten Vergleich zwischen diesen.

Bei einem Querschnitt durch das wildtypische Komplexauge sind typischerweise die sieben (der insgesamt acht) Rhabdomere zu erkennen (Abb. 3.7 R1-7, C), die sich trapezartig um den intraommatidialen Raum anordnen. Die Rhabdomere besitzen eine kristalline Struktur, die zum Zellinneren mit der Rhabdomer-Basis (RB, Abb. 3.7, D) abschließt. An die Rhabdomere anschließend findet sich der Zellkörper der Photorezeptorzellen (PRZ, Abb. 3.7, C), mit dem apikalen Rhabdomerstiel (RS, Abb. 3.7, D) und der *Zonula adherens* (ZA, Abb. 3.7, D). Umschlossen werden die Photorezeptoren von den sekundären und tertiären Pigmentzellen, in denen sich (falls vorhanden) die Pigmentkörner befinden.

Die Augenklone der Klasse I zeigten keine auffälligen Veränderungen oder Abweichungen von wildtypischen Ommatidien (s. Abb. 3.6), und sind auch bei näherer Analyse mittels Elektronenmikroskop wildtypisch (Abb. 3.7, A, B am Beispiel von *sdt^{EH681}*). Es konnten weder Zeichen einer veränderten Morphologie, noch lichtinduzierter Zelltod beobachtet werden. Es ist hier sehr deutlich zu erkennen, dass die mutanten Ommatidien keine (offensichtlichen) Unterschiede oder Defekte aufweisen. Keine der Strukturen weist Veränderungen auf oder fehlt: Die Rhabdomerstruktur ist nicht verändert, der Rhabdomerstiel zeigt keine auffälligen Verkürzungen, die ZAs sind vorhanden (Abb. 3.6, A und B, Abb. 3.7, A und B). Gleiches gilt für die Allele *sdt^{XH21}* (Abb. 3.6, C, D), *sdt^{7D22}* (Abb. 3.6, E, F), *sdt^{M120}* (Abb. 3.6, G, H), *sdt^{XN05}* (Abb. 3.6, I, J), *sdt^{O292}* (Daten nicht gezeigt) und *sdt^{G643}* (Daten nicht gezeigt). In den Augenkonen der Allele *sdt^{XH21}* (Abb. 3.6, C, D), *sdt^{7D22}* (Abb. 3.6, E, F) und *sdt^{M120}* (Abb. 3.6, G, H) ist eine leichte Variabilität bezüglich der Anzahl der Rhabdomere zu beobachten, wenn sie im Dauerlicht gehalten wurden. Die Anzahl der Rhabdomere ist oftmals kleiner als sieben, wodurch die typische Form der Ommatidien verändert wird. Es sind jedoch keine typischen Anzeichen von programmiertem Zelltod in diesen mutanten Augenklonen zu erkennen. Die Untersuchung der Allele unter Schwachlichtbedingungen zeigte kein Fehlen von Rhabdomeren und auch keine anderen morphologischen Defekte (Daten nicht gezeigt).

Die mutanten Klonbereiche von sdt^{XN05} (Abb. 3.6, I, J) und sdt^{G463} (nicht gezeigt) sind im Gegensatz zu sdt^{EH681} durch Pigmentkörner in den Pigmentzellen charakterisiert, während die wildtypischen Bereiche keine Pigmentierung tragen. Es sei darauf hingewiesen, dass im Falle der pigmentierten Mutanten nicht mehr zwischen den homozygot mutanten und heterozygoten Klonbereichen (die wildtypisch sind) unterschieden werden kann. In beiden Fällen wurde jedoch zur Analyse das gesamte Auge betrachtet, und keines der pigmentierten Ommatidien wies eine Veränderung auf.

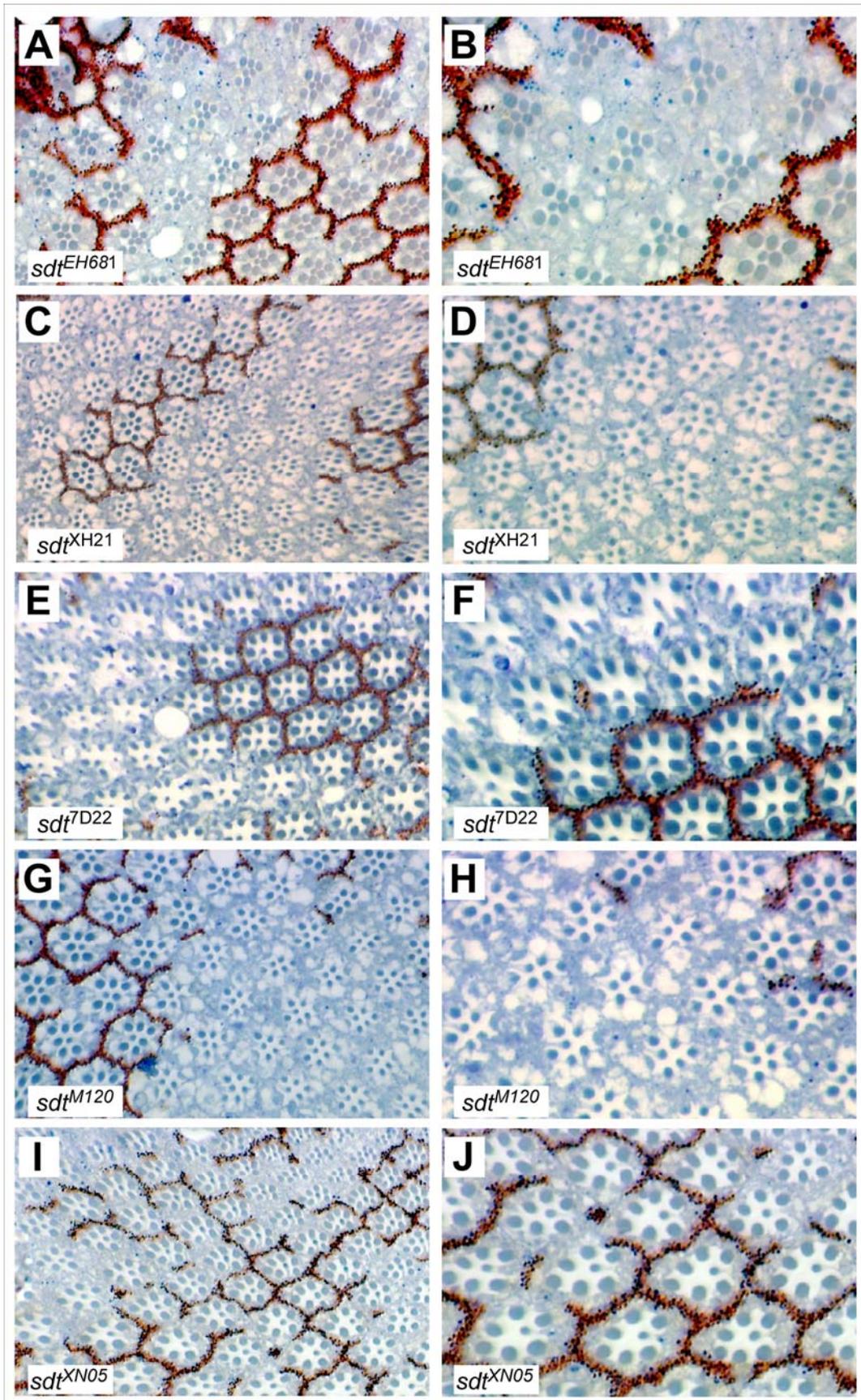


Abb. 3.6

Abb. 3.6 *sdt* mutante Augenklone der Klasse I zeigen weder einen morphologischen Phänotyp noch lichtinduzierte Degeneration. (s. vorherige Seite)

Semidünnschnitte an sieben Tagen im Dauerlicht gehaltenen Komplexaugen. In den tangentialen Schnitten der Klasse I sind keine Anzeichen für lichtinduzierte Degeneration und/oder morphologische Veränderungen zu erkennen.

(A und B) *sdt*^{EH681} mutante Augenklone (ohne Pigment) mit angrenzenden wildtypischen Ommatidien (mit Pigment), genauso wie in (C und D) *sdt*^{Q292}, (E und F) *sdt*^{7D22}, (G und H) *sdt*^{M120}. (I und J) *sdt*^{XN05}, die mutanten und die heterozygoten Augenklone sind pigmentiert, wohingegen die wildtypischen Klone nicht pigmentiert sind.

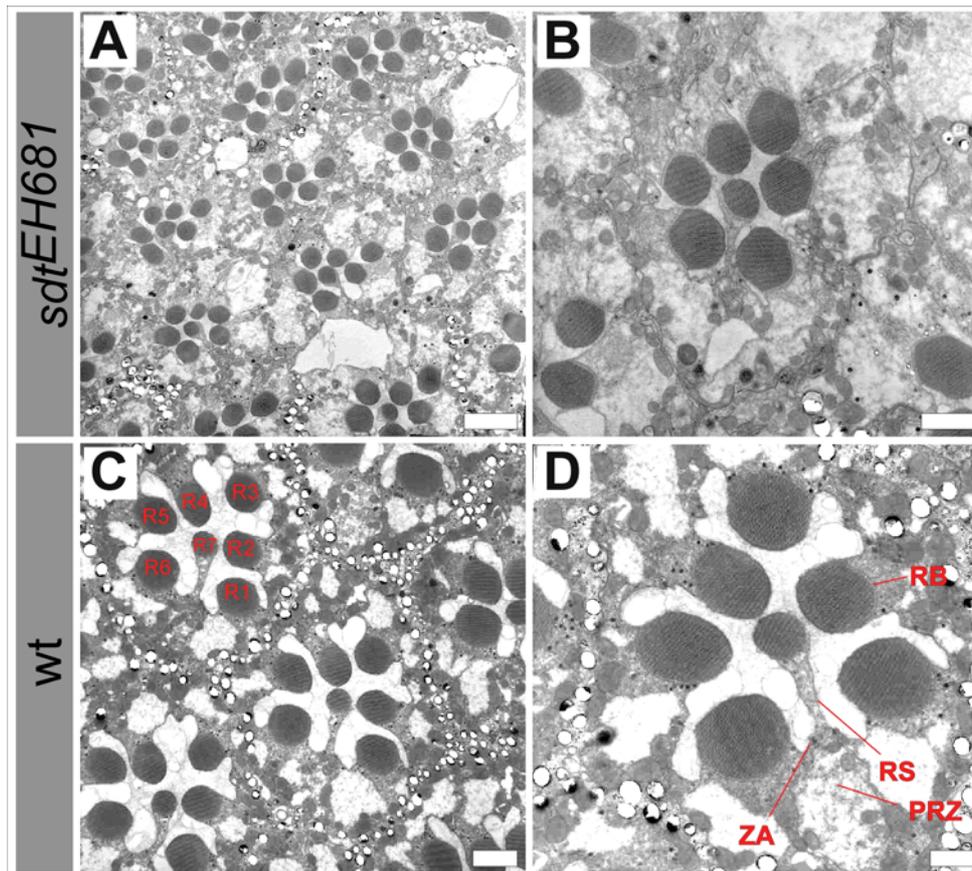


Abb. 3.7 Elektronenmikroskopische Aufnahmen des Klasse I Allels *sdt*^{EH681}.

Die ultradünnen Tangentialen Schnitte wurden von Augen angefertigt, die für sieben Tage konstantem Licht ausgesetzt waren. (A, B) Die mutanten *sdt*^{EH681} Ommatidien (ohne Pigment) weisen keine Defekte auf (s. Text). (C, D) Ommatidien aus einem wildtypischen Bereich des Augenklons (mit Pigment). PRZ=Photorezeptorzelle, R1-7= 7 Rhabdomere eines Ommatidiums, RB=Rhabdomerbasis, RS=Rhabdomerstiel, ZA=Zonula adherens. Maßstab in A, C: 1,1 µm, B, D: 2,5 µm.

3.2.3 *sdt* Allele der Klasse II zeigen morphologische Defekte

Zur Klasse II gehört das Allel *sdt*^{XP96}. Dieses Allel weist einen morphologischen Phänotyp, aber keinen lichtinduzierten Zelltod auf.

Nach sieben Tagen (Abb. 3.8) und auch nach 14 Tagen im Dauerlicht (Daten nicht gezeigt) zeigen die homozygot mutanten Augenklone keinerlei Anzeichen für verstärkten Zelltod.

Jedoch kann ein deutlicher, wenngleich variabler, morphologischer Phänotyp beobachtet werden, der dem *crb* mutanten Phänotyp ähnelt. Die Rhabdomere verlieren ihre runde Form und ihre stereotypische Anordnung. Einige Rhabdomere sind vergrößert, andere treten in Kontakt mit benachbarten Rhabdomeren (Abb. 3.8, A, Pfeil). Teilweise ragen sie nicht mehr in den intraommatidialen Raum hinein, teilweise sind die R7 Rhabdomere gespalten (Abb. 3.8, roter Pfeilkopf). Der Rhabdomerstieler ist verkürzt (Pfeil, Abb. 3.10, A). Die ZA (Abb. 3.10, roter Pfeilkopf) zwischen den Photorezeptorzellen zeigen keine Defekte. Vereinzelt zeigen einzelne Photorezeptorzellen Anzeichen von Degeneration nach sieben Tagen konstantem Licht (Asterisk, Abb. 3.10, B), jedoch ist kein massiver Zelltod zu beobachten, wie in Klasse IV oder *crb* mutanten Augen.

Insgesamt bietet sich ein unregelmäßiges Bild der Ommatidien, da ihre strenge Ordnung gestört ist. Die genannten Defekte betreffen jedoch nicht einheitlich alle Ommatidien, so dass dieser Phänotyp variabel ist.

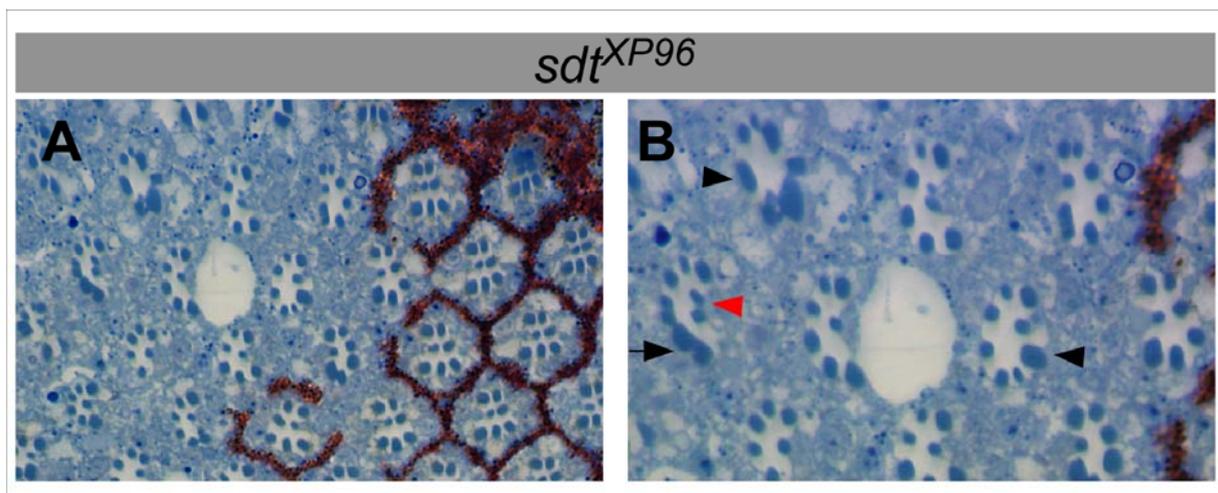


Abb. 3.8 Klasse II Allel sdt^{XP96} zeigt einen morphologischen Phänotyp, aber keine lichtinduzierte Degeneration.

(A und B) Tangentiale Schnitte durch kleine Augenklone des Allels sdt^{XP96} , die für 7 Tage im Licht gehalten wurden. Die mutanten Bereiche können durch das Fehlen von Pigment identifiziert werden. Rote Pfeilköpfe weisen auf gesplattene R7, schwarze Pfeilköpfe weisen auf vergrößerte Rhabdomere, schwarze Pfeile auf Rhabdomere, die in engem Kontakt zu ihren Nachbarrhabdomeren liegen.

Ähnlich wie bei *crb* mutanten Ommatidien kann in horizontalen Schnitten am Beispiel von sdt^{XP96} gezeigt werden, dass die Rhabdomere im distalen Bereich verdickt sind und nicht mehr vollständig bis in den proximalen Bereich zur Basallamina projizieren (Abb. 3.9, A und B). Das Pigment markiert die wildtypische und heterozygote Region, Bereiche ohne Pigment sind mutant für sdt^{XP96} . Während die wildtypischen Rhabdomere bis zur Basallamina (BL) projizieren (Abb. 3.9, B, linker Bildausschnitt), erreichen die wenigsten mutanten

Rhabdomere die Basallamina (Abb. 3.9, B, rechter Bildausschnitt ohne Pigment), sondern enden im proximalen Bereich vor der Lamina.

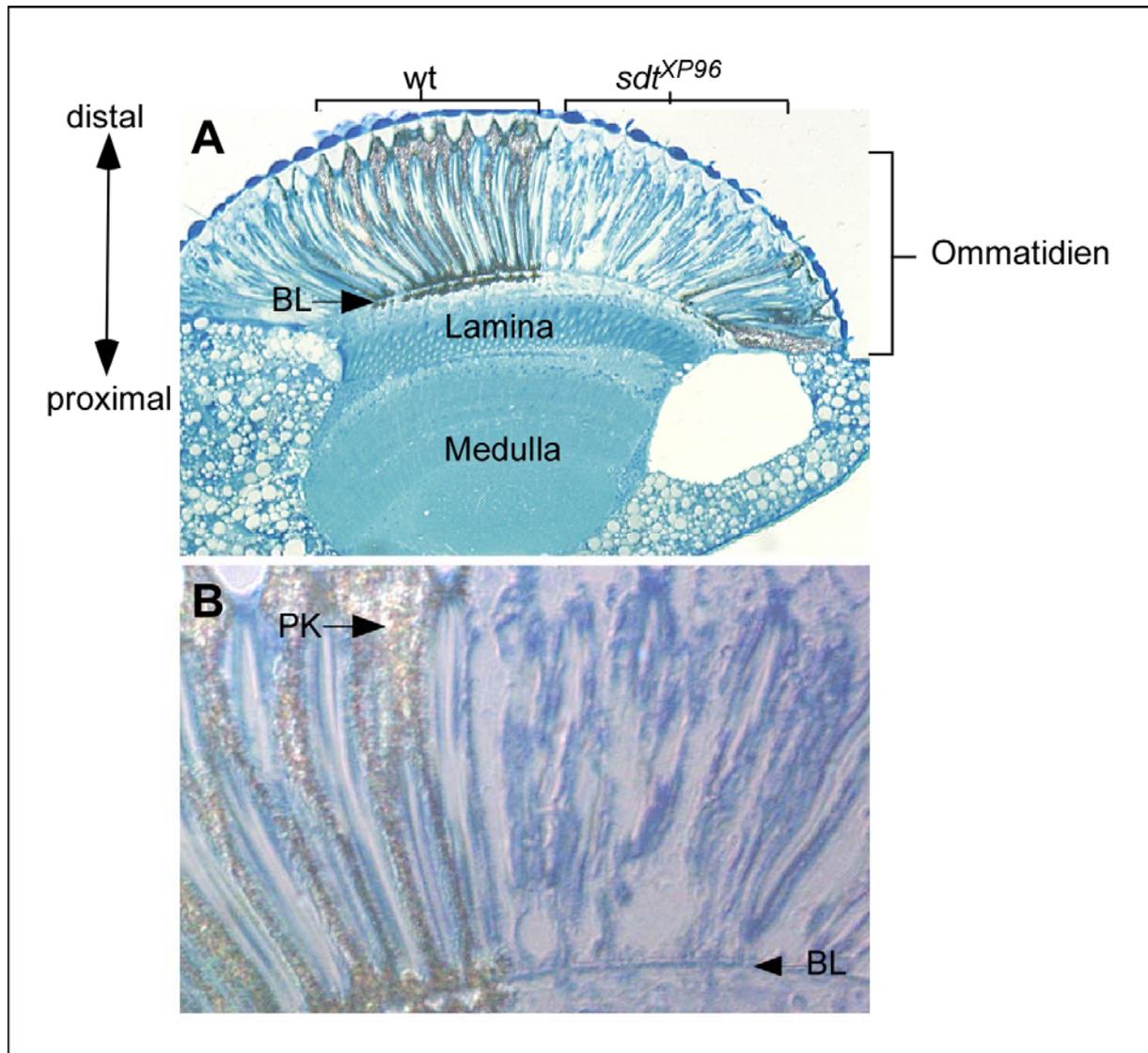


Abb. 3.9 Mutanter Phänotyp der sdt^{XP96} Augen in einem longitudinalen Schnitt. (Distal weist nach oben, proximal nach unten) (A) Übersicht über das mutante sdt^{XP96} Auge, mit einem wildtypischen (links, mit Pigment) und einem mutanten Klonbereich (rechts, ohne Pigment) (B) Vergrößerung der mutanten und wildtypischen Ommatidienregion. BL: Basallamina, PK Pigmentkörner.

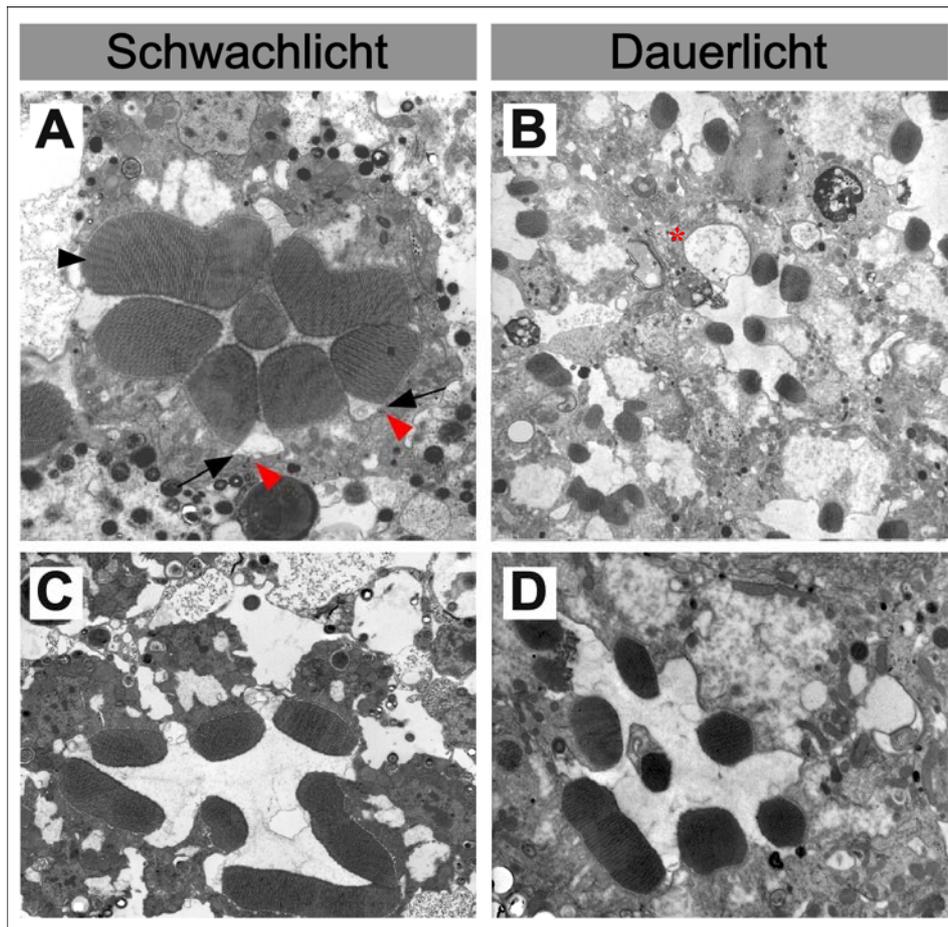


Abb. 3.10 sdt^{XP96} mutante Augen zeigen einen morphologischen Phänotyp.

Elektronenmikroskopische Aufnahmen von tangentialen Schnitten der sdt^{XP96} mutanten Augen.

(A und C) Die Augen wurden sieben Tage bei Schwachlicht gehalten. (B und D) Die Augen waren für sieben Tage konstantem Licht ausgesetzt. Pfeil deutet auf den verkürzten Rhabdomerstiel, roter Pfeilkopf deutet auf die ZA, schwarzer Pfeilkopf deutet auf die vergrößerten Rhabdomere, roter Asterisk weist auf eine sterbende Photorezeptorzelle hin.

3.2.4 sdt Allele der Klasse III zeigen lichtinduzierte Degeneration

In die Klasse III wird das Allel sdt^{N5} eingeordnet. Der Phänotyp dieses Allels ist charakterisiert durch eine lichtinduzierte Degeneration, es weist jedoch keine morphologischen Defekte auf.

Nach 7 Tagen zeigen die mutanten Augenklone starke Anzeichen von Degeneration: In nahezu jedem Ommatidium degenerieren ein bis zwei Photorezeptorzellen und es fehlen Photorezeptorzellen (Abb. 3.11, A und B). Die lichtinduzierte Degeneration verstärkt sich nach 14 Tagen Licht (Abb. 3.12, A und B), so dass nur noch 2 bis vier Rhabdomere je Ommatidium zu erkennen sind. Die hochkristalline Rhabdomerstruktur löst sich auf (Abb. 3.12, B: schwarzer Pfeil) und außerdem sind einige Rhabdomere vollständig von benachbarten (Pigment-) Zellen eingeschlossen (Abb. 3.12, B: roter Pfeil). Im Gegensatz dazu können in

mutanten Augen, die unter Schwachlicht gehalten wurden keine Degenerationserscheinungen detektiert werden und auch keine morphologischen Veränderungen (Abb. 3.11, C und D und 3.12, C und D). Die ZA weist auf elektronenmikroskopischer Ebene keine Veränderungen auf (Abb. 3.12, D: roter Pfeil) und auch der Rhabdomerstieler erscheint nicht verkürzt. Die proximo-distale Projektion der Rhabdomere ist in den sdt^{N5} mutanten Rhabdomeren nicht betroffen (Daten nicht gezeigt).

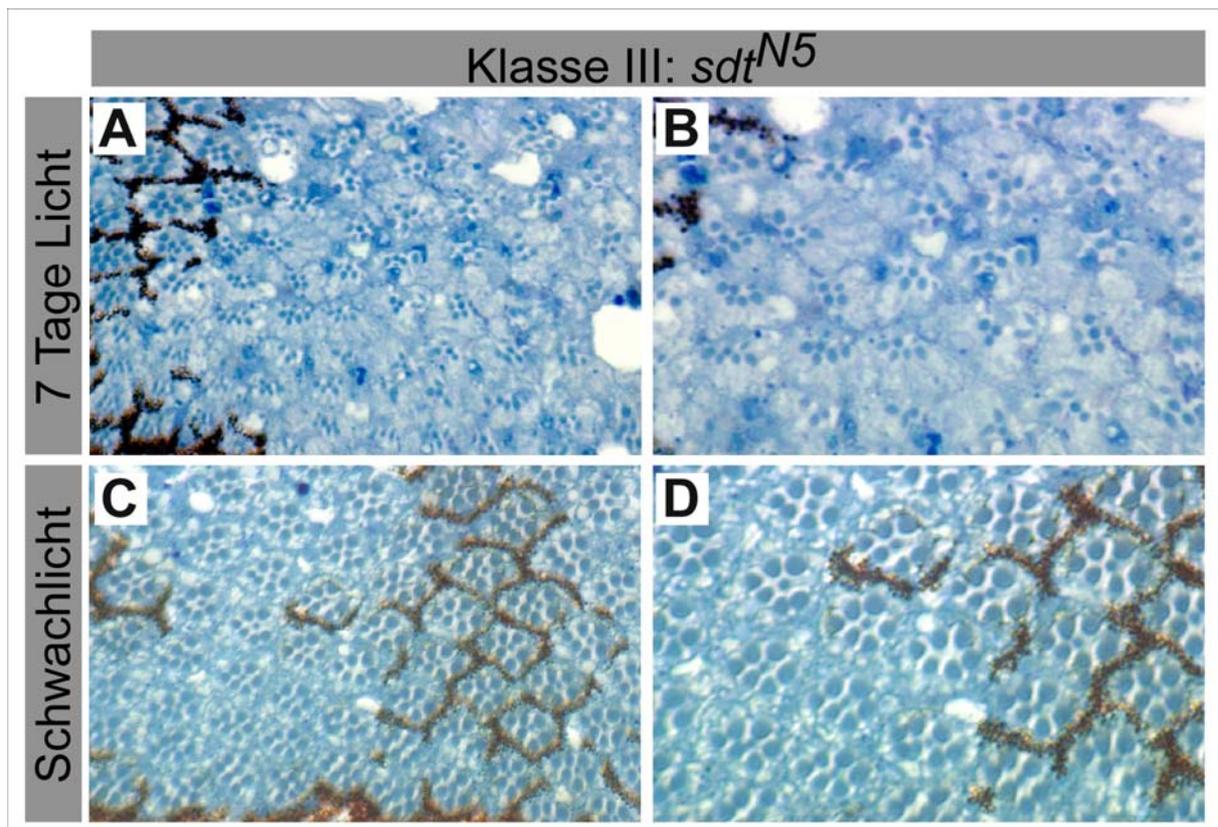


Abb. 3.11 Klasse III sdt^{N5} Allel zeigt lichtinduzierte Degeneration.

Semidünnschnitte (tangentielle Schnitte) von sdt^{N5} mutanten Augenklonen. (A und B) Augen wurden für sieben Tage unter konstantem Licht gehalten. (C und D) Augen wurden für 14 Tage unter Schwachlicht gehalten und zeigen keine morphologischen Defekte.

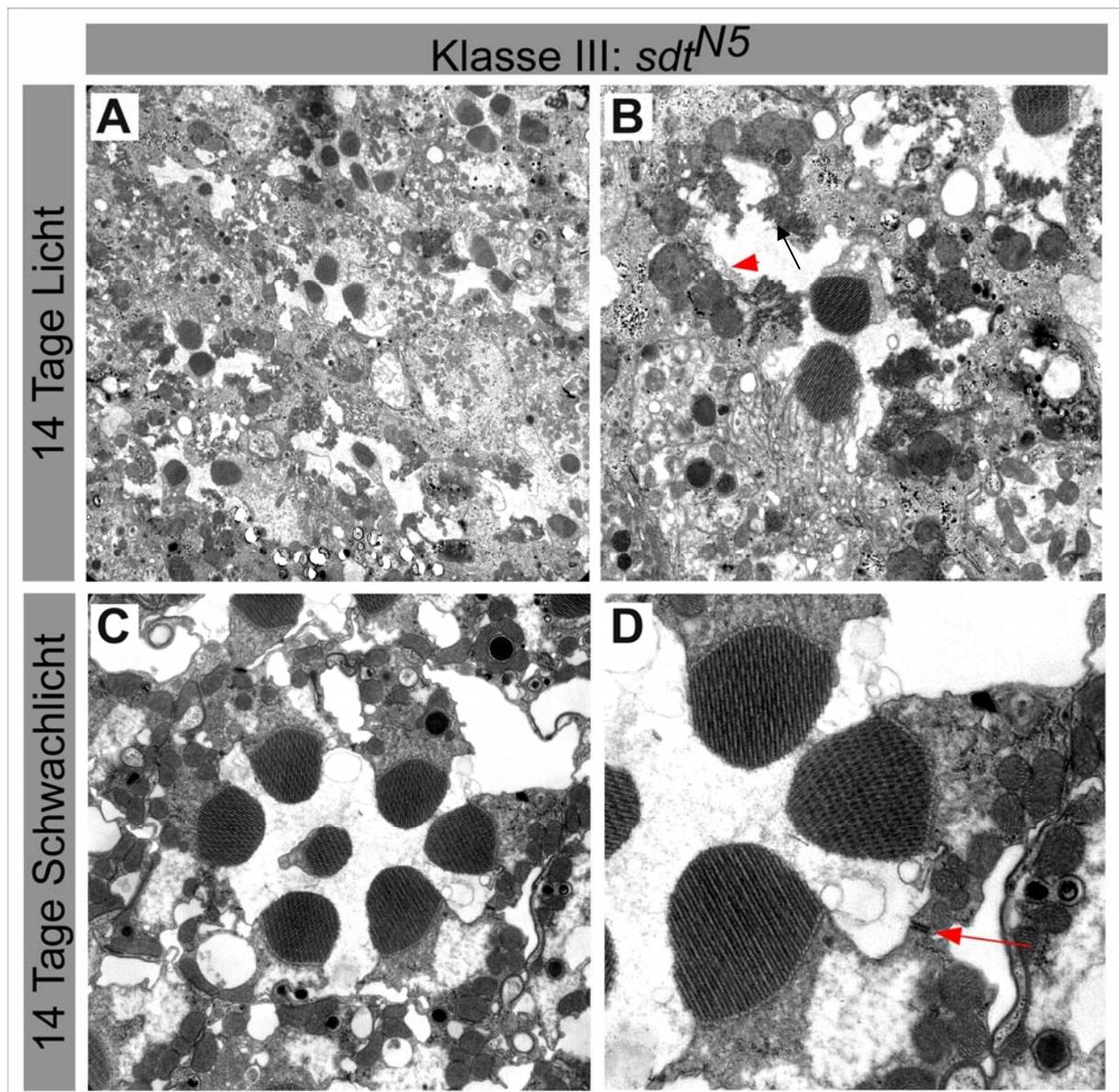


Abb. 3.12 Elektronenmikroskopische Aufnahmen von *sdt^{N5}* Augenklonen.
 (A, B) Mutante *sdt^{N5}* Augenklone zeigen nach 14 Tagen konstanter Lichteinwirkung starke Degenerationserscheinungen (s. Text für Details). (C, D) *sdt^{N5}* Augenklone, die für 14 Tage unter Schwachlicht gehalten wurden. Es sind keine morphologischen Defekte erkennbar. Schwarzer Pfeilkopf zeigt auf die sich auflösenden Rhabdomere. Pfeilkopf weist auf von benachbarten Zellen eingeschlossene Rhabdomere. Pfeil weist auf die ZA.

3.2.5 *sdt* Allele der Klasse IV zeigen morphologische Defekte und lichtinduzierte Degeneration

Die vierte Klasse der *sdt* Allele zeigt beide bisher beschriebenen Phänotypen: zum einen die morphologischen Defekte, zum anderen die lichtinduzierte Degeneration. Von den untersuchten Allelen sind drei in diese Klasse einzuordnen: *sdt*^{K70}, *sdt*^{K85} und *sdt*^{E195}.

Alle drei Allele zeigen den bereits für Klasse II beschriebenen morphologischen Phänotyp, der durch den Verlust der stereotypen Anordnung der Rhabdomere charakterisiert ist. Die benachbarten Rhabdomere kontaktieren sich teilweise (Abb. 3.14, A und B). Dieser Kontakt benachbarter Rhabdomere geht einher mit einer Verkürzung des Rhabdomerstiels. In einigen Fällen kommt es zu Vergrößerungen der Rhabdomere (gehäuft die R1, Abb. 3.13, A, C, E, Asterisk), jedoch auch zur Verkleinerung oder zur Spaltung der Rhabdomere (Abb. 3.13, C, Pfeil).

Die morphologischen Veränderungen der Rhabdomere führen in einigen Fällen dazu, dass die Rhabdomere von R7 und R8 (in wildtypischen Ommatidien gekennzeichnet durch kleinere Rhabdomere und längere Rhabdomerstiele) zusammen in der gleichen Ebene auftreten (Abb. 3.13, C, Pfeilkopf), obwohl benachbarte wildtypische Bereiche noch keinen Wechsel von R7 zur R8 Ebene andeuten. Die R8 ist durch ihre Lokalisation zwischen den Rhabdomeren R1 und R2 von der R7, die zwischen R1 und R5 liegt, zu unterscheiden. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die R8 Photorezeptorzelle in den distalen Bereich des Auges verschoben wird. Da auch hier wie in den Klasse II Allelen eine Verkürzung der Rhabdomere im proximalen Bereich beobachtet wird (Daten nicht gezeigt).

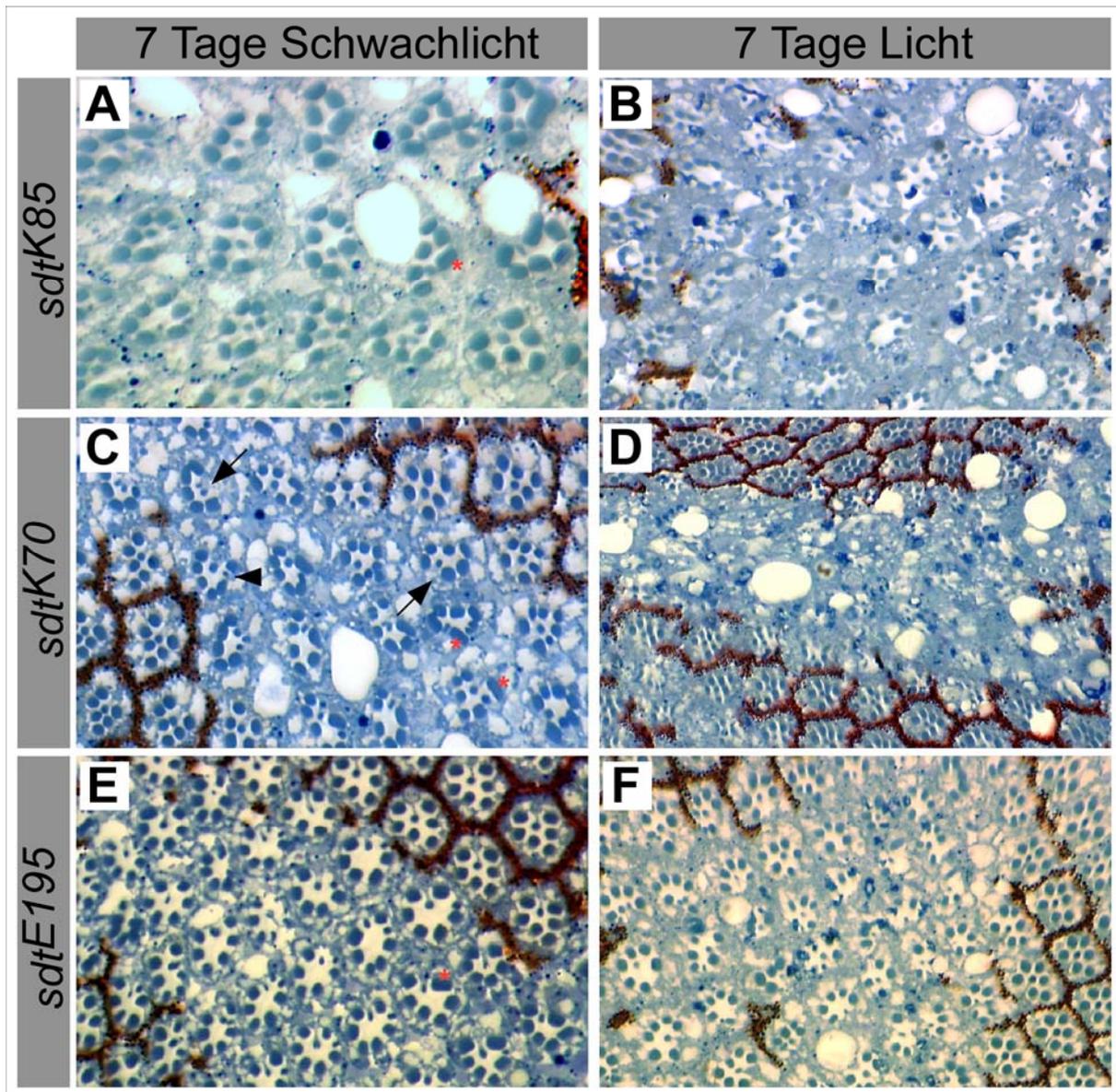


Abb. 3.13 *sdt* mutanter Phänotyp der Klasse IV.

Tangentiale Schnitte durch *sdt* mutante kleine Augenklone (ohne Pigment) mit angrenzenden wildtypischen Bereichen (mit Pigment) der Allele *sdt*^{K85} (A, B), *sdt*^{K70} (C, D) und *sdt*^{E195} (E, F). (A, C, E) Die Fliegen wurden für sieben Tage unter Schwachlicht Bedingungen gehalten. (B, D, F) die Fliegen wurden für sieben Tage mit konstantem Licht bestrahlt. Pfeil = gesplante R7, Pfeilkopf = R8 zusätzlich zur R7 Rhabdomer in einer Ebene, Asterisk = vergrößerte Rhabdomere.

Wenn die Augenklone dieser Allele mit konstantem Licht bestrahlt werden, tritt eine starke Degeneration auf (Abb. 3.13, B, D, F und 3.14, C-H), die nach 7 Tagen nahezu jedes Ommatidium betrifft (dunkelblau gefärbte Regionen in den Rhabdomeren) und nach 14 Tagen keine Ommatidienstrukturen mehr erkennen lässt (Daten nicht gezeigt).

Dabei zeigt *sdt*^{K70} (Abb. 3.12, D) nach sieben Tagen konstantem Licht deutlich stärkere Degeneration, als die *sdt*^{K85} (Abb. 3.12, B) und *sdt*^{E195} (Abb. 3.12, F) Allele. Während in *sdt*^{K70} (Abb. 3.12, D) nahezu keine Ommatidien mehr vollständig zu erkennen sind, zeigen *sdt*^{K85} (B) und *sdt*^{E195} (F) Ommatidien jeweils 1-2 degenerierende Photorezeptorzellen. Diese

Beobachtung kann nicht auf unterschiedliche Lichtbedingungen zurückgeführt werden, da die Fliegen parallel im Licht gehalten und untersucht worden sind.

Im Elektronenmikroskop sind diese Veränderungen detaillierter zu erkennen (Abb. 3.14). Die unter Schwachlicht gehaltenen mutanten Augen zeigen die typischen morphologischen Defekte (Abb. 3.14, A und B), die sich vor allem in den eng benachbarten Rhabdomeren, deren veränderter Rhabdomerform und den verkürzten Rhabdomerstielen zeigt. Die mutanten Augen, die unter Dauerlicht gehalten wurden (Abb. 3.14, C und D), zeigen ebenso den morphologischen Defekte als auch die lichtinduzierten Degenerationserscheinungen. Letzteres zeigt sich in stark verkleinerten Rhabdomeren (vgl. mutante Rhabdomere links mit wildtypischen Rhabdomeren rechts in Abb. 3.14, C, roter Pfeil) oder in sich auflösenden Rhabdomeren (Abb. 3.14, D, weißer Pfeil). Die Rhabdomere innerhalb eines Ommatidiums können unterschiedlich stark betroffen sein (Abb. 3.14, D): Während einige Rhabdomere gerade erst ihre hochkristalline Struktur verlieren (Abb. 3.14, D, weißer Pfeilkopf), erkennt man in weiter fortgeschrittenen Stadien die typischen Anzeichen für programmierten Zelltod (Abb. 3.14, D, Asterisk): Das Zytoplasma ist stark kondensiert, der Zellkern ist abgerundet mit kondensiertem Nukleoplasma und es sind nur noch Reste des sich auflösenden Rhabdomers erkennbar. Es ist regelmäßig zu beobachten, dass die R7 (#, in Abb. 3.14, C) zumeist noch keine Defekte zeigen, während benachbarte Zellen schon stark degenerieren. Das ist wahrscheinlich auf die Spezifität des in R7 exprimierten Rhodopsins (Rh3/Rh4) auf UV Licht zurückzuführen. Unter den verwendeten Normallichtbedingungen wird nur Rhodopsin 1 verstärkt aktiviert, wodurch der programmierte Zelltod ausgelöst wird (Kiselev et al., 2000).

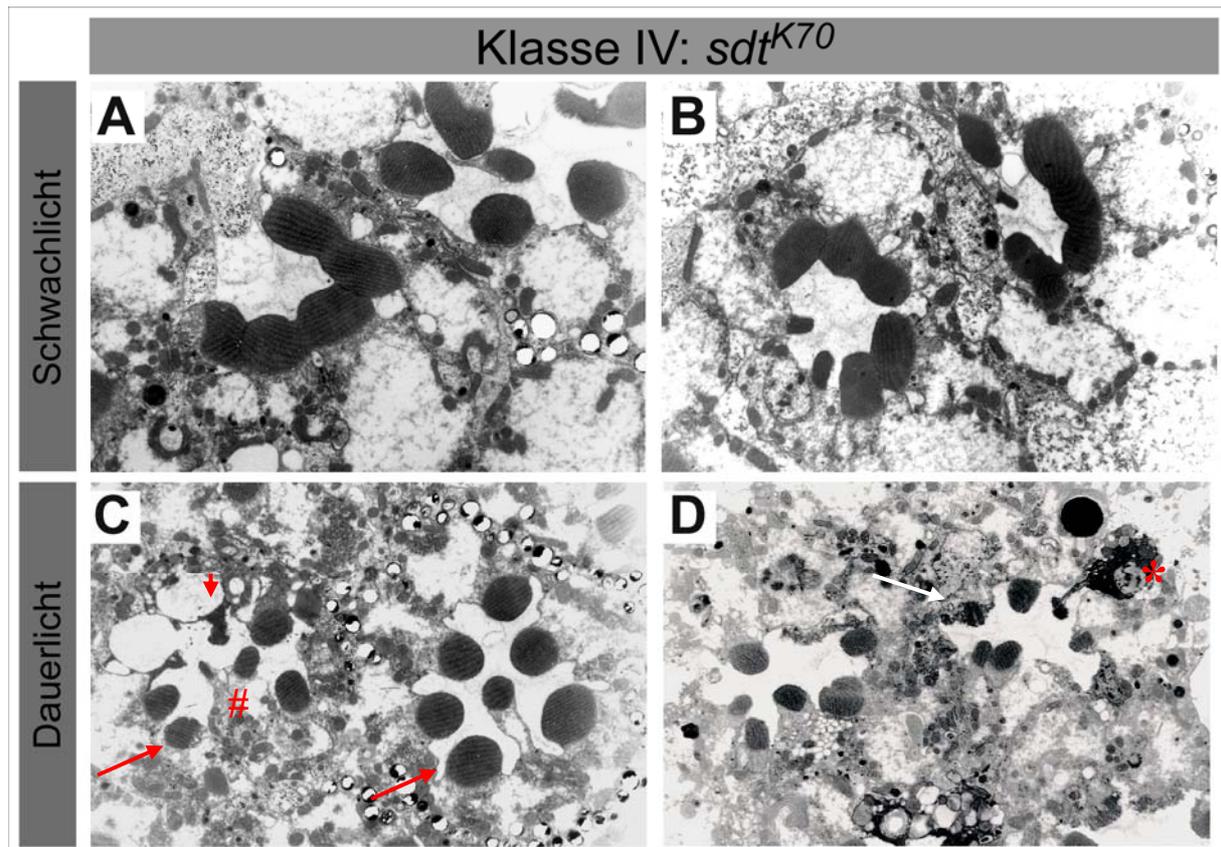


Abb. 3.14: Elektronenmikroskopische Analyse von *sdt*^{K70} (Klasse IV).

Tangentialschnitte von *sdt*^{K70} mutanten Augen, die für sieben Tage unter Schwachlicht (A und B) oder für sieben Tage im konstanten Licht gehalten wurden (C - D). Die mutanten *sdt*^{K70} Ommatidien zeigen die lichtunabhängigen morphologischen Defekte (A, B), während sie bei konstanter Lichteinwirkung starke Zeichen von Degeneration aufweisen (C - D, Details siehe Text).

Roter Pfeil weist auf eine in zwei Rhabdomere gesplante R7 hin. Roter Pfeilkopf deutet auf R3 und R4 mit starken Degenerationserscheinungen; weißer Pfeil weist auf ein in Auflösung befindliches Rhabdomer. Asterisk markiert eine Zelle, die die typischen Anzeichen für programmierten Zelltod zeigt (s. Text für Details).

3.3 Sdt wird in den mutanten Allelen unterschiedlich exprimiert

Um festzustellen, ob die beobachteten phänotypischen Unterschiede der vier Klassen auf eine mögliche Restfunktion des Sdt-Proteins zurückzuführen sind, wurde in den adulten Augen der einzelnen Allele mittels immunhistochemischer Färbungen die Sdt Expression mit den beiden Sdt-Antikörpern (PDZ/GUK) untersucht. Dazu wurden große *sdt* mutante Augenklone erzeugt.

Es kann angenommen werden, dass, je nach Lokalisation der Mutation, z. B. in einem nicht kodierenden Exon, einige der Allele noch in der Lage sind, Sdt zu exprimieren. Ebenso könnte bei einer Lokalisation der Mutation in einem der kodierenden Bereiche das mutante Sdt Protein (z. B. ein verkürztes Protein) noch eine Restfunktion übernehmen, die zu keinem oder einem schwach mutanten Phänotyp führt.

Neben der Frage nach der Sdt Expression ist es bei diesen Analysen auch von Interesse, inwieweit die Lokalisation der Sdt Interaktionspartner (DPatj, Crb) und der ZA betroffen sind.

3.3.1 Klasse I: *sdt^{EH681}* zeigt Sdt Expression im Auge

Antikörperfärbungen an *sdt^{EH681}* (Abb. 3.15) und *sdt^{XN05}* (Daten nicht gezeigt) zeigen, dass Sdt in beiden Allelen noch exprimiert wird. Die Färbungen wurden mit anti-Sdt-PDZ und anti-Sdt-GUK durchgeführt und anti-Rhodopsin wurde als Marker für die Rhabdomere verwendet. Beide Antikörper detektieren eine wildtypische Lokalisation von Sdt (Abb. 3.15). Die Sdt Expression erstreckt sich im longitudinalen Schnitt an *sdt^{EH681}* mutanten Augen (Abb. 3.15, A in rot) über die gesamte Länge des Ommatidiums von distal (oben) bis proximal (unten). Anhand der Rhodopsin Färbung (Abb. 3.15, B in grün), die die Rhabdomere markiert, kann gezeigt werden, dass es keinerlei Verkürzungen der Rhabdomere im proximalen Bereich gibt (Abb. 3.15, B: s. Pfeil). Die optischen Querschnitte (Abb. 3.15, D–F) zeigen die exakte Lokalisation von Sdt im Rhabdomerstiel, benachbart zum Rhabdomer auf. In den homozygot mutanten Augenklonen der Klasse I ist somit eine Sdt Expression im Rhabdomerstiel nachweisbar. Diese vorhandene Expression von Sdt kann zumindest erklären, weshalb kein morphologischer und auch kein lichtinduzierter Phänotyp in den Semidünnschnitten und elektronenmikroskopischen Analysen zu finden war (Abb. 3.7 und 3.6).

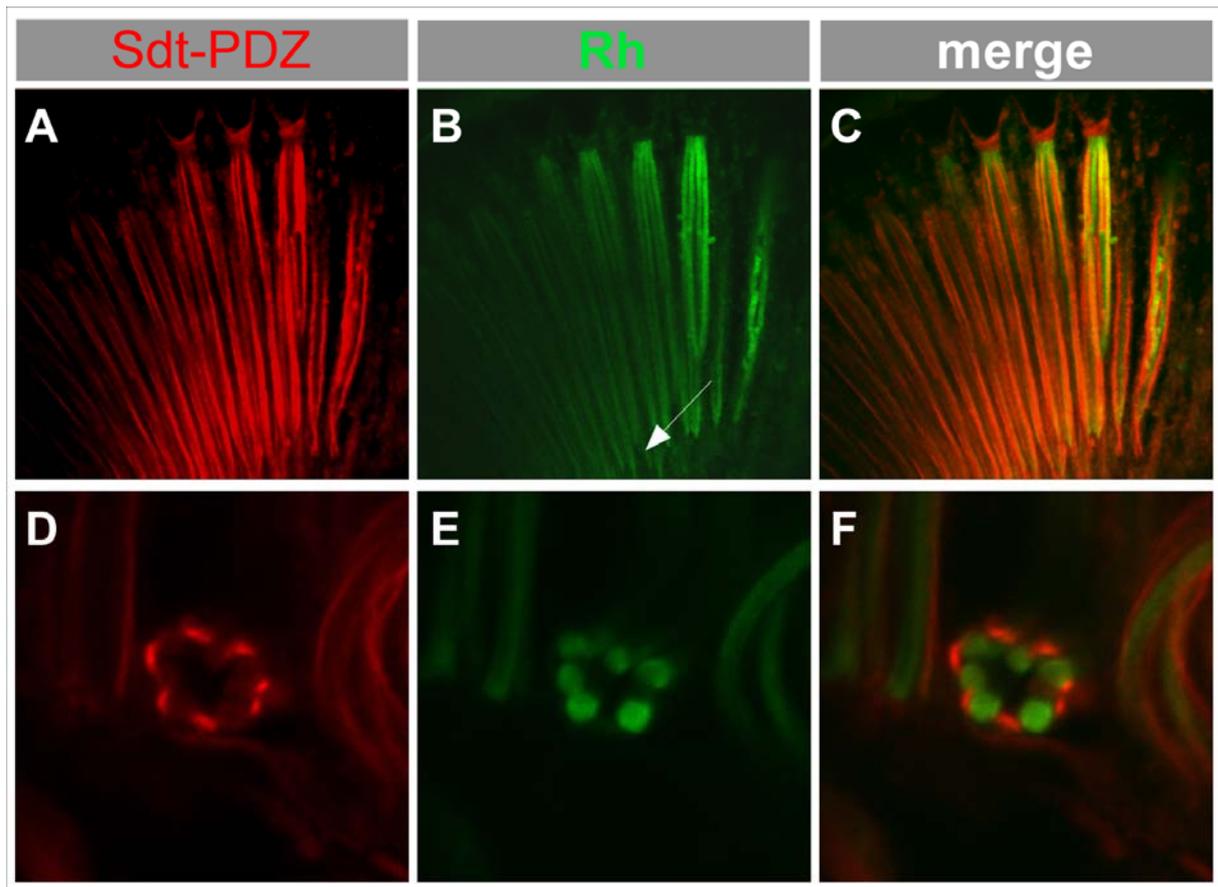


Abb. 3.15 Expression von Sdt in sdt^{EH681} adulten großen Klonen.

Optische Längsschnitte (A, B, C) von sdt^{EH681} adulten Klonen gefärbt mit anti-Sdt-PDZ (rot) und anti-Rhodopsin (grün). Die optischen Querschnitte (D, E, F) der sdt^{EH681} adulten Klone zeigen die Lokalisation von Sdt innerhalb des Rhabdomerstiels.

3.3.2 Klasse II: sdt^{XP96} zeigt keine Sdt Expression in den Photorezeptoren

Das Allel sdt^{XP96} , das einen morphologischen Phänotyp zeigt wurde hier auf seine Sdt Expression hin näher untersucht.

Während in den wildtypischen Ommatidien (Abb. 3.16, A, B, C, G, H, I) im optischen Querschnitt eine in dem Rhabdomerstiels lokalisierte Sdt Färbung sowohl mit Sdt-PDZ (Abb. 3.16, A-C), als auch mit dem Sdt-GUK Antikörper (Abb. 3.16, G-I) detektiert wird, kann unter gleichen Bedingungen keine Färbung in dem Rhabdomerstiel in den mutanten sdt^{XP96} Ommatidien detektiert werden. Durch Verwendung von Fluoreszenz gekoppelten Phalloidin werden mit Aktin angereicherte Strukturen wie die Rhabdomere markiert. Dadurch kann die Form der Rhabdomere sichtbar gemacht werden und das Darstellen der morphologischen Defekte in den mutanten Rhabdomeren wird ermöglicht (Abb. 3.16: vergleiche B mit E oder H mit K): Verlust der runden Rhabdomerform, Fehlen von Rhabdomeren, enger Kontakt von benachbarten Rhabdomeren, Verlust der spezifischen Ommatidienstruktur (Trapez). Eine Schwierigkeit bei der Analyse von mutanten Geweben ist es, zu erkennen, ob gar kein Protein

exprimiert wird oder ob das Protein fehllokalisiert ist. Um das Risiko der Fehlinterpretation möglichst gering zu halten, wurden parallel wildtypische Augen (*w*) als Kontrollen mitgefärbt und am konfokalen Mikroskop analysiert. Bei dieser Analyse wurden die für die wildtypischen Augen verwendeten Einstellungen (Verstärkung des Signals, Laserintensität etc.) auch für die Analyse der mutanten Ommatidien verwendet. Hierdurch sollte ein Verstärken eines unspezifischen Hintergrundes verhindert werden.

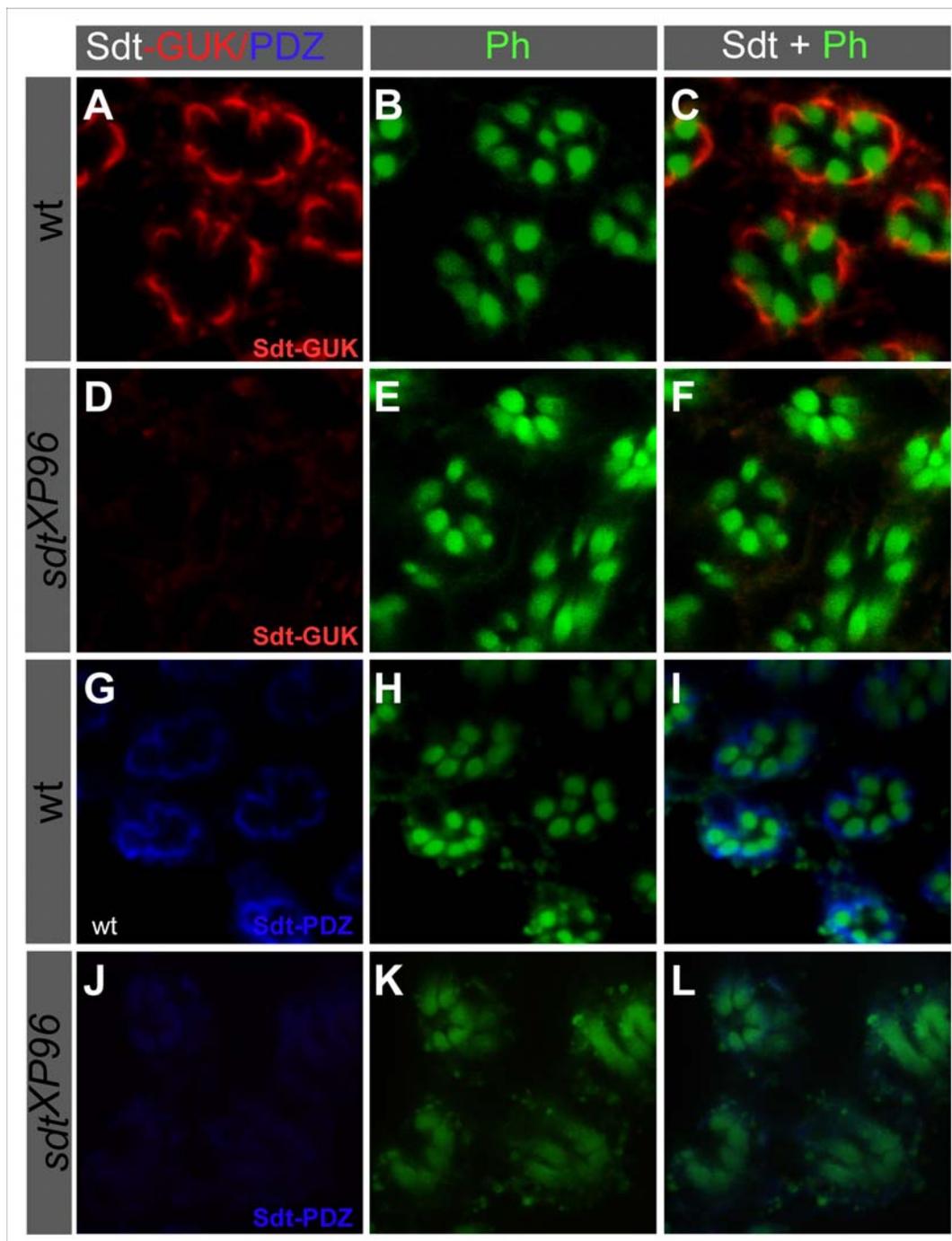


Abb. 3.16 Expression von Sdt in Klasse II Allel: *sdt^{XP96}*.

Optische Querschnitte von wildtypischen (A-C, G-H) und *sdt* mutanten (D-F, J-L) großen Augenklonen. (A-F) Färbungen wurden mit dem Sdt-PDZ Antikörper oder (G-L) mit dem Sdt-GUK Antikörper und mit Phalloidin als Marker für die Rhabdomere durchgeführt. Es kann keine Sdt

Expression in den mutanten Augenklonen gezeigt werden, während die wildtypischen Photorezeptorzellen eine Expression im Rhabdomerstiel zeigen.

Um zu überprüfen, ob noch ein mögliches Sdt Restprotein vorhanden ist, das evtl. delokalisiert ist, wurden Sdt Färbungen an kleinen, pupalen Augenklonen durchgeführt. Der Vorteil in der Analyse der kleinen Augenklone besteht darin, dass es wildtypische und mutante Klonbereiche direkt nebeneinander gibt, und diese Effekte sogar in ein und demselben Ommatidium auftreten können. In solchen „Mosaik-Ommatidien“ können mutante und wildtypische Zellen direkt miteinander verglichen werden. Adulte kleine Klone konnten wegen des Pigmentes in den Pigmentzellen, was eine starke Autofluoreszenz auslöst, nicht mittels *whole mount* Immunhistochemie analysiert werden.

Auch in den kleinen Augenklonen bestätigt sich (Abb. 3.17), dass die mutanten Bereiche der pupalen Ommatidien (Abb. 3.17, A, Pfeil) keine Sdt Expression (rot) zeigen. Die Arm Färbung (grün) als Marker für die ZA schließt sich im wildtypischen Ommatidium punktförmig an den Rhabdomerstiel an, während sie in mutanten Ommatidien unregelmäßiger erscheint und teils basolateral expandiert ist. Die drei benachbarten Ommatidien (Abb. 3.17, A) zeigen deutliche Unterschiede in der Sdt Expression: Das wildtypische Ommatidium (oben links), zeigt eine Sdt Lokalisation in dem Rhabdomerstiel; ein mutantes Ommatidium (mitte rechts) zeigt keine Sdt Expression mehr; das Mosaik-Ommatidium (unten links) zeigt in einigen Rhabdomerstielen noch eine Expression, während es in anderen, mutanten PRZ keine Expression mehr besitzt. In der Detailansicht (Abb. 3.17, B) ist ein „Mosaik-Ommatidium“ vergrößert dargestellt, und auch hier kann nur ein vollständiges Fehlen des Proteins nachgewiesen werden. Ein Längsschnitt durch diese pupalen Augenklone unterstützt dieses Ergebnis, da auch hier nur im wildtypischen (rechten) Ommatidium eine Sdt Färbung von proximal nach distal, die parallel zur Arm Färbung (ZA) verläuft, nachzuweisen ist. Das mutante Ommatidium (links) zeigt eine etwas schwächere Arm Expression, aber keine Sdt Expression.

Die Ergebnisse der pupalen Augenklone können nicht zwangsläufig auf die adulten Augenklone übertragen werden. Jedoch untermauert der vollständige Sdt Verlust das Ergebnis aus den adulten Klonen, die auch kein Protein mehr aufweisen.

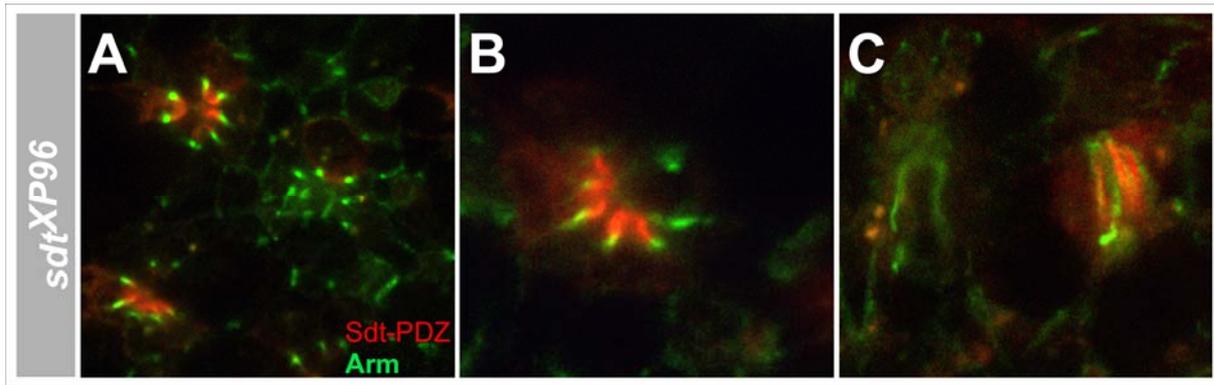


Abb. 3.17 Expression von Sdt und Arm in pupalen kleinen Klonen von sdt^{XP96} .

(A und B) Optische Querschnitte durch kleine Augenklone (ca. 55% Pupalentwicklung): A zeigt je ein wildtypisches (oben links), ein vollständig mutantes (mitte rechts) sowie ein Mosaik-Ommatidium. B zeigt ein Mosaik-Ommatidium. In den mutanten Bereichen ist keine Sdt Expression mehr erkennbar. (C) Optischer Längsschnitt durch zwei Ommatidien: ein mutantes Ommatidium (links, ohne Sdt Färbung) mit Arm Färbung sowie ein wildtypisches Ommatidium (rechts, mit Sdt und Arm Färbung).

3.3.3 Klasse III: sdt^{N5} ist kein sdt Null Allel im Auge

Das sdt^{N5} Allel der Klasse III weist eine weitere Variante der Sdt Expression auf. Sowohl mit dem Sdt-GUK (Abb. 3.18, A, C), als auch mit dem Sdt-PDZ Antikörper (Abb. 3.18, D, F) kann Protein im Bereich des Rhabdomerstiels nachgewiesen werden. Diese Sdt Expression erscheint schwächer als im wildtypischen Auge und auf einen kleineren Bereich des Rhabdomerstiels begrenzt (vgl. Abb. 3.16 A, G). In der Doppelfärbung mit dem Arm Antikörper (Abb. 3.18, C) ist jedoch zu erkennen, dass Sdt immer noch benachbart zu Arm in der ZA lokalisiert ist, diese Veränderung also nicht auf eine Überlappung oder Kolo-kalisation mit der ZA zurückzuführen ist. Da die mutanten sdt^{N5} Ommatidien keine morphologischen Defekte zeigten (s. Abb. 3.12) konnte die Veränderung der Sdt Expression auch nicht auf eine Verkürzung des Rhabdomerstiels zurückgeführt werden.

Die beiden aus dem Embryo bekannten Sdt Interaktionspartner Crb und DPatj zeigen in den sdt^{N5} mutanten Augen die gleiche veränderte Lokalisation wie Sdt (Abb. 3.18, J, K, L). Beide Proteine werden noch exprimiert und sind auch in dem Rhabdomerstiel lokalisiert, jedoch ist die Expression im Rhabdomerstiel schwächer und auf einen kleineren Bereich begrenzt, als das im wildtypischen Ommatidium zu beobachten ist (Abb. 3.18, G, H und J). Daraus kann geschlossen werden, dass eine veränderte Lokalisation von Sdt die Lokalisation von Crb und DPatj im gleichen Maße beeinflusst.

Als Fazit kann aus diesen Ergebnissen geschlossen werden, dass die Expression von Sdt in den mutanten sdt^{N5} Augenklonen auf einen kürzeren Bereich des Rhabdomerstiels reduziert ist. Diese beeinträchtigte Sdt Lokalisation hat aber keine morphologischen Defekte zur Konsequenz, jedoch ermöglicht die Veränderung in der Sdt Lokalisation bzw. Funktion die

Licht induzierte Degeneration. Die Mutation in diesem Allel ist noch nicht identifiziert worden. So wird es interessant sein, zu erfahren, welche Mutation in den *sdt^{N5}* Allelen diesen lichtinduzierten Phänotyp hervorruft, so dass ein nur teilweise funktionelles Protein gebildet wird.

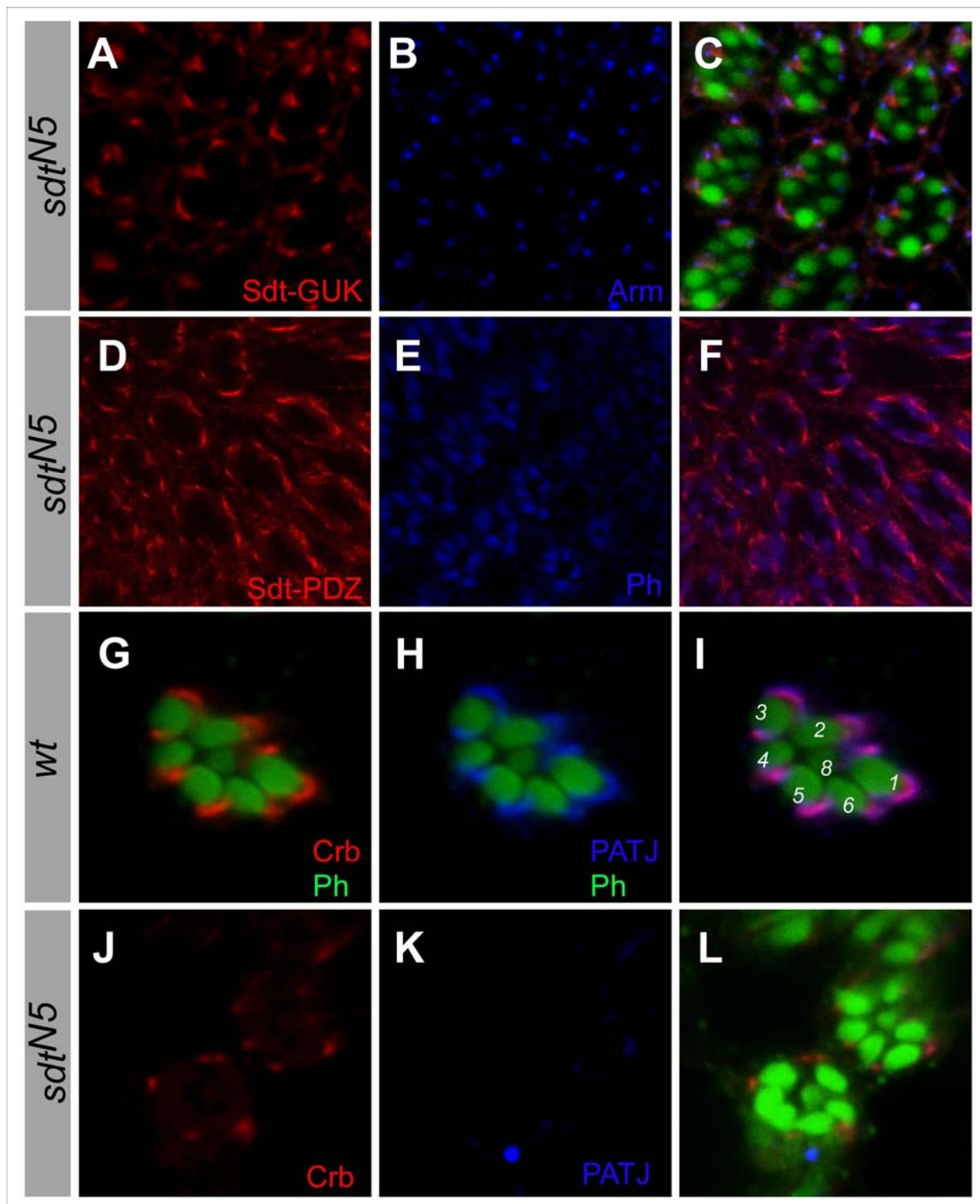


Abb. 3.18 Sdt wird in *sdt^{N5}* mutanten großen Augenklonen exprimiert.

Abb. 3.18 Sdt wird in sdt^{N5} mutanten großen Augenklonen exprimiert. (s. vorherige Seite.)

Optische Querschnitte von sdt mutanten (**A-G, J-L**) und wildtypischen (**G-I**) großen Augenklonen. (**A-C**) Färbungen wurden mit dem Sdt-GUK Antikörper oder (**D-F**) mit dem Sdt-PDZ Antikörper und mit Phalloidin als Marker für die Rhabdomere durchgeführt. Es kann eine Sdt Expression in den mutanten Augenklonen gezeigt werden, die jedoch von der wildtypischen Expression in Intensität und Lokalisation abweicht.

(**G-L**) Antikörperfärbung mit α Crb- und α DPatj-Antikörpern in wildtypischen (**G-I**) und sdt^{N5} -mutanten (**J-L**) Augenklonen. Die Interaktionspartner von Sdt sind noch im Rhabdomerstiell lokalisiert, jedoch ähnlich gering wie das mutante Sdt Protein.

3.3.4 Die Klasse IV Allele sdt^{K70} und sdt^{K85} zeigen keine Sdt Expression

Die Augenklone der Allele der vierten Klasse wurden sowohl mit dem Sdt-PDZ Antikörper (Abb. 3.19, D und G), als auch mit dem Sdt-GUK Antikörper (Daten nicht gezeigt) gefärbt. Im Gegensatz zu den wildtypischen Ommatidien (Abb. 3.19, A, B, C) findet man in den Augenklonen von sdt^{K70} (Abb. 3.19, D, E, F) und sdt^{K85} (Abb. 3.19, G, H, I) keine Sdt Expression. Auch hier kann wie im Abschnitt 3.6.2 bereits angesprochen, nicht ausgeschlossen werden, dass eine Fehllokalisierung des Proteins vorliegt, die aufgrund der geringen Konzentration mittels konfokaler Mikroskopie nicht detektiert werden kann. Die Rhabdomere wurden durch ein mit einem Farbstoff gekoppeltes Phalloidin markiert, so dass die Form und Anordnung der Rhabdomere hervorgehoben wird. Die ungleichmäßige Form und Anordnung der mutanten Rhabdomere (Abb. 3.19, F und I) entspricht dem in Abschnitt 3.5.4 beschriebenen morphologischen Phänotyp (vgl. mit wildtypischen Rhabdomeren in Abb. 3.19, C). Mittels einer anti-Crb Färbung (Abb. 3.19, E und H) sollte eine weitere Komponente des subapikalen Komplexes auf ihre korrekte Lokalisation überprüft werden. Die Crb Expression ist in beiden Allelen sdt^{K70} und sdt^{K85} betroffen: es ist kein Protein mehr nachweisbar.

Damit ergibt sich für die Allele der Klasse IV ein ähnliches Bild wie für die der Klasse II. Sie zeigen beide den morphologischen Phänotyp, weisen keine Sdt Proteinexpression mehr auf und auch für Crb als direkter Interaktionspartner kann mittels Immunhistochemie keine Lokalisation mehr nachgewiesen werden. Der Unterschied zwischen ihnen liegt in der lichtinduzierten Degeneration, die nur in den Klasse IV Allelen (sdt^{K70} , sdt^{K85} und sdt^{E195}) auftritt.

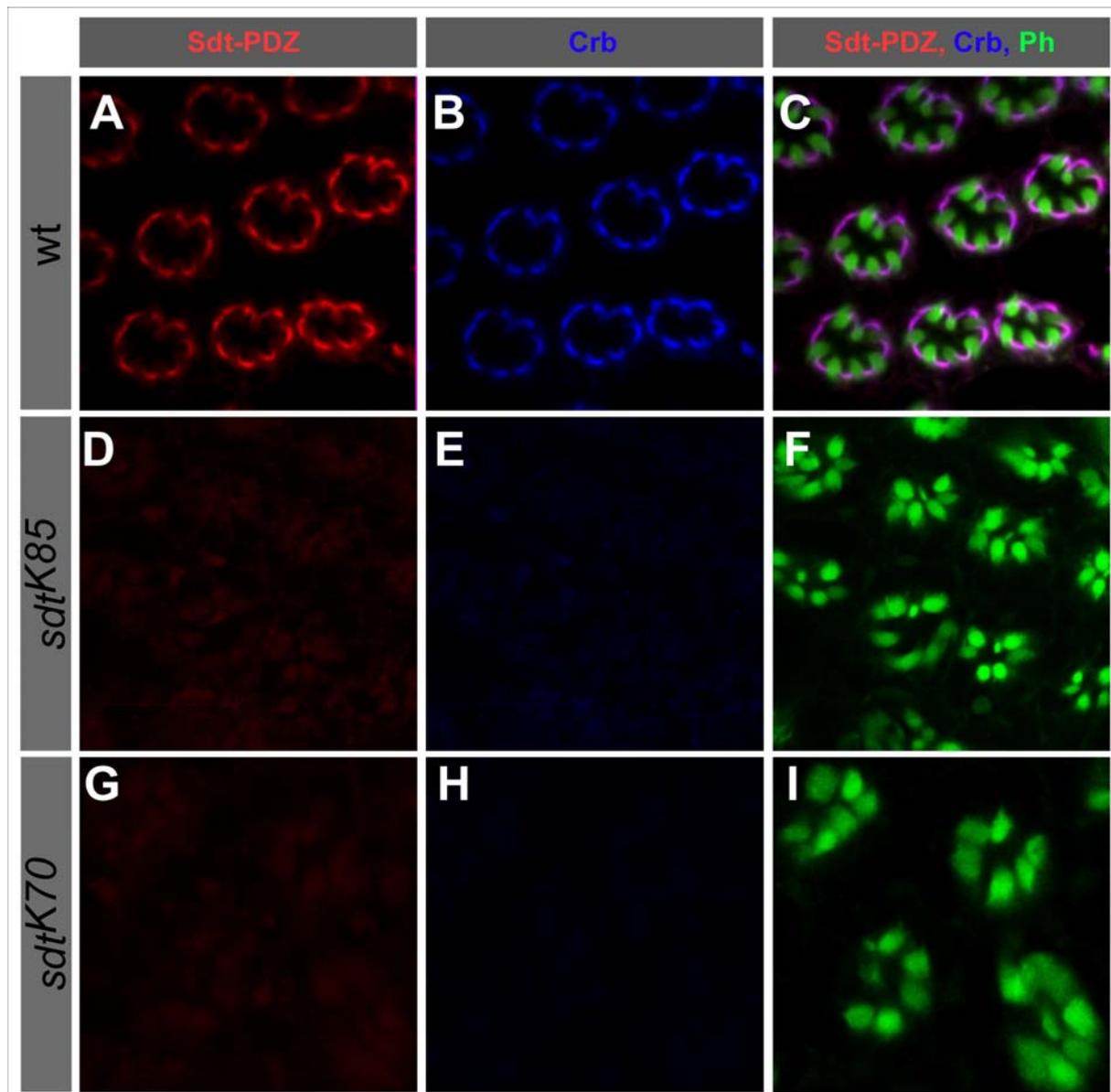


Abb. 3.19 Expression von Sdt und Crb in Klasse IV mutanten Augenklonen (sdt^{K70} und sdt^{K85}). Dreifachfärbungen mit Sdt-PDZ, Crb und Phalloidin an wildtypischen Augen (A - C), sowie sdt^{K85} (D - F) und sdt^{K70} (G - I) mutanten großen Augenklonen. Es konnte keine Sdt und Crb Expression in den mutanten Augenklonen nachgewiesen werden, während die wildtypischen Photorezeptorzellen eine Expression im Rhabdomerstiel (A - C) zeigen.

3.3.5 Die lichtabhängige Degeneration in *sdt* mutanten Klonen kann über ein Vitamin A Mangelmedium abgeschwächt werden

Die *sdt* mutanten Augenklone der Klasse III und IV zeigen lichtinduzierte Degeneration. Sdt lokalisiert zusammen mit Crb und anderen Komponenten des subapikalen Komplexes im Rhabdomerstiel, benachbart zu den Rhabdomeren, wodurch eine direkte Beteiligung an der lichtinduzierten Signaltransduktion im Rhabdomer ausgeschlossen ist. Die Mechanismen, in die Sdt involviert ist, um den Zelltod zu verhindern, sind unklar. Es konnte für Crb gezeigt

werden, dass eine Vitamin A Mangelnahrung die Degeneration verhindert (Johnson et al., 2002).

In einem Modell von Alloway *et al.* wird die retinale Degeneration in verschiedenen Degenerationsmutanten aufgrund von stabilen, lichtinduzierbaren Metarhodopsin/Arrestin Komplexen erklärt (Alloway et al., 2000).

In den mutanten Augen würde ein solcher Komplex durch Clathrin vermittelte Endozytose internalisiert. Die Anhäufung dieser Komplexe induziere den programmierten Zelltod. Dieser kann verhindert werden, wenn die Bildung dieser stabilen Komplexe unterbunden wird. Eine Aufzucht der Larven und der Fliegen auf einem Vitamin A Mangelmedium, bewirkt eine Reduktion der Menge an Rhodopsin auf ca. 3 % des normalen Gehaltes. Vitamin A ist das Vorläuferprotein für das Chromophore (*11-cis retinal*) des Rhodopsins. Durch eine Vitamin A Mangeldiät wird somit das Rhodopsin auf 3% seiner normalen Menge reduziert (Larrivee et al., 1981). Dadurch entstehen normale, aber wesentlich kleinere Rhabdomere, so dass die Menge an Komplexen, die internalisiert werden kann, deutlich reduziert ist und keine Zelldegeneration hervorgerufen wird.

Um heraus zu finden, ob der lichtinduzierten Degeneration im Auge ein ähnlicher Mechanismus der stabilen Rh-Arr2 Komplexe unterliegt, wurden die *sdt* mutanten Larven und Fliegen (*sdt*^{K70}, *sdt*^{K85} und *sdt*^{N5}) auf Vitamin A Mangelmedium aufgezogen und dann auf diesem Futter für sieben Tage unter konstantem Licht gehalten. Parallel dazu wurden *sdt*^{K70} mutante Larven und Fliegen als Kontrolle für die lichtinduzierte Degeneration auf normalem Futter für sieben Tage unter konstantem Licht gehalten (Abb. 3.20, A und B). Diese mutanten Augen zeigen die bereits beschriebene lichtinduzierte Degeneration (Abschnitt 3.2.5), durch die in jedem Ommatidium mehrere Photorezeptoren sterben.

Die mutanten Augen, der auf dem Vitamin A Mangelmedium aufgezogenen Fliegen der Allele *sdt*^{K70}, *sdt*^{K85} und *sdt*^{N5} zeigen bedingt durch den reduzierten Gehalt an Rhodopsin kleinere und dünnere Rhabdomere (Abb. 3.20, C-H). Die mutanten Augen der Klasse IV Allele *sdt*^{K70} (Abb. 3.20, C und D) und *sdt*^{K85} (Abb. 3.20, E und F) zeigen auch weiterhin die morphologischen Defekte, die für diese Klasse zuvor beschrieben wurden (Abb. 3.13). Jedoch konnten nur geringe Zeichen von lichtinduzierter Degeneration in den Photorezeptorzellen gefunden werden (Abb. 3.20, C, D, E und F), die in keiner Weise mit den starken Degenerationserscheinungen der Kontrolle auf Normalmedium zu vergleichen sind (Abb. 3.20, A und B). Somit kann die in den mutanten Augen der Klasse IV Allele auftretende lichtinduzierte Degeneration mit einem Vitamin A Mangelfutter gerettet werden, die morphologischen Defekte bleiben davon unberührt bestehen.

Die parallel dazu untersuchten *sdt^{N5}* mutanten Augen der Klasse III (Abb. 3.20, G und H) zeigen unter diesen Bedingungen (Vitamin A Mangelfutter) keine lichtinduzierte Degeneration, so dass auch in dem Klasse III Allel eine Rettung erreicht wird.

Dieses Ergebnis deutet an, dass der programmierte Zelltod in den *sdt* mutanten Ommatidien durch eine Anhäufung von internalisierten Metarhodopsin/Arrestin Komplexen hervorgerufen werden könnte. Ein endgültiger Beweis erfordert eine genaue Analyse dieser stabilen Rh/Arr2 Komplexe, ihrer Lokalisation und ihrer Menge sowie die Verbindung von Endozytose und Degeneration.

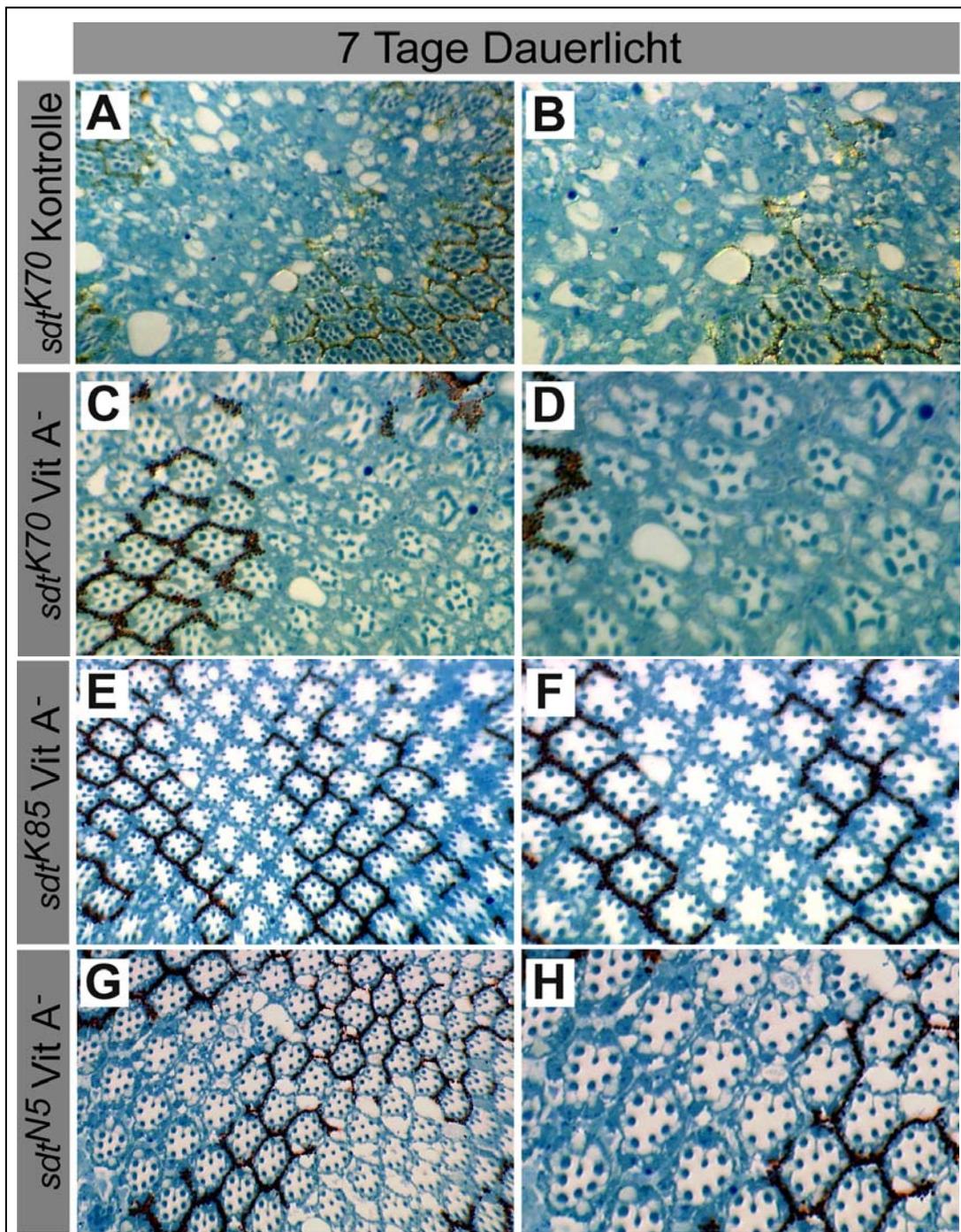


Abb. 3.20 Eine Vitamin A Diät schwächt die Licht induzierte Degeneration der *sdt* mutanten Ommatidien ab. (s. vorherige Seite)

Semidünnschnitte von *sdt*^{K70} kleinen Augenklonen. Die Fliegen wurden für sieben Tage unter konstantem Dauerlicht gehalten. (A und B) Tangentiale Schnitte von *sdt*^{K70} mutanten Augen von Fliegen, die auf normalem Futter als Kontrolle für die Degeneration gehalten wurden (parallel zu C - D). (C bis H) Tangentiale Schnitte von *sdt* Augen von Fliegen, die auf Vitamin A defizientem Medium gehalten wurden. (C und D) *sdt*^{K70}, (E und F) *sdt*^{K85} und (G und H) *sdt*^{N5}. Die Bereiche ohne Pigment entsprechen den *sdt* homozygot mutanten Augenklonen, mit Pigment entspricht den wildtypischen Ommatidien.

3.4 Molekulare Analyse der Mutationen der verschiedenen *sdt* Allele

Die beobachteten Sdt Phänotypen erforderten eine weitergehende Analyse, um auf molekularer Ebene nach den Ursachen für diese Unterschiede zu forschen. Zu diesem Zweck wurde damit begonnen, die Allele molekular zu charakterisieren und sodann Aufschluss über daraus resultierende Sdt Proteine zu erhalten.

Der gesamte *sdt* Locus umschließt eine genomische Region von über 50000 bp (Berkeley *Drosophila* genome project, BDGP), in denen bisher maximal 13 Exons (10 kodierende und drei UTR Bereiche) für Sdt kodieren (s. Einleitung: 1.3). Frühere Untersuchungen identifizierten vier verschiedene *sdt* cDNAs aus embryonalen cDNA Bibliotheken (Bachmann et al., 2001; Hong et al., 2001), die sich durch alternatives Spleissen und alternative Starts unterscheiden (Abb. 1.3 und 1.4).

Für die molekulare Analyse der ausgewerteten Allele wurden für die Amplifikation der genomischen Bereiche Primerpaare konstruiert, die alle bisher bekannten Exons inklusive der Exon-Intron Übergänge von Sdt umfassten. Mittels dieser Primer wurden die DNA Regionen der *sdt* Allele amplifiziert (PCR) und sequenziert. Da die Allele der Klasse IV sowohl den morphologischen Phänotyp als auch die lichtinduzierte Degeneration zeigten und keines dieser Allele bisher molekular charakterisiert ist, wurde mit der Analyse der Allele *sdt*^{K70}, *sdt*^{K85} und *sdt*^{E195} begonnen.

Sequenzvergleiche zwischen so erhaltenen Sequenzen und den veröffentlichten Sequenzen (Bachmann et al., 2001, GenBank accession number AF414118 und AF 141117; Hong et al., 2001) ergeben für *sdt*^{K85} und *sdt*^{E195} Punktmutationen (Abb. 3.21, in roter Schrift), für *sdt*^{K70} konnte keine Mutation identifiziert werden.

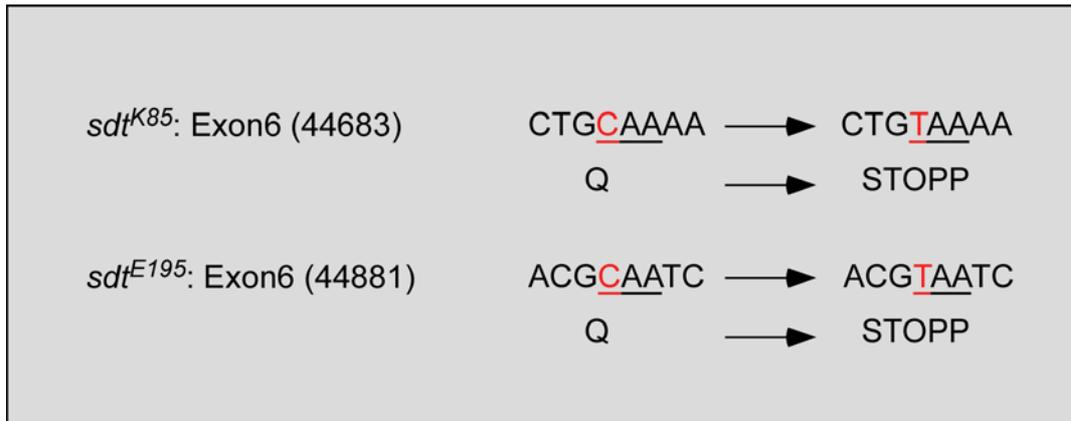


Abb. 3.21 Charakterisierte Mutationen der *sdt* Allele führen zu vorzeitigen Stoppcodonen.

Beide identifizierten Mutationen liegen im Exon 6, innerhalb der für die L27 Domänen kodierenden Regionen (s. Abb. 3.22). Die Mutation des Allels *sdt*^{K85} lokalisiert im Sdt Protein im Bereich der N-terminalen L27 Domäne, die des Allels *sdt*^{E195} 66 Aminosäuren entfernt in der C-terminalen L27 Domäne. Alle bekannten Isoformen (s. Abb. 3.22) wären von diesen zwei Mutationen gleichermaßen betroffen. Diese Mutationen führen zu frühzeitigen Translationsstopps, bei dem in den Proteinen Teile der ersten L27 Domäne und alle darauf folgenden Motive fehlten. Es ist fraglich, ob ein mögliches Restprotein stabil bzw. funktionsfähig wäre. Die beiden Sdt Antikörper können jedoch nur die PDZ oder die GUK Domäne detektieren, was ein Erkennen eines Restproteins ohne diese Domänen ausschließt. Da kein Sdt Protein in den immunohistochemischen Färbungen detektierbar ist (Abb. 3.19), ist zumindest davon auszugehen, dass kein funktionelles Protein mehr exprimiert wird. Das Fehlen von L27, PDZ, SH3 und GUK wäre somit für einen vollständigen Funktionsverlust ausreichend.

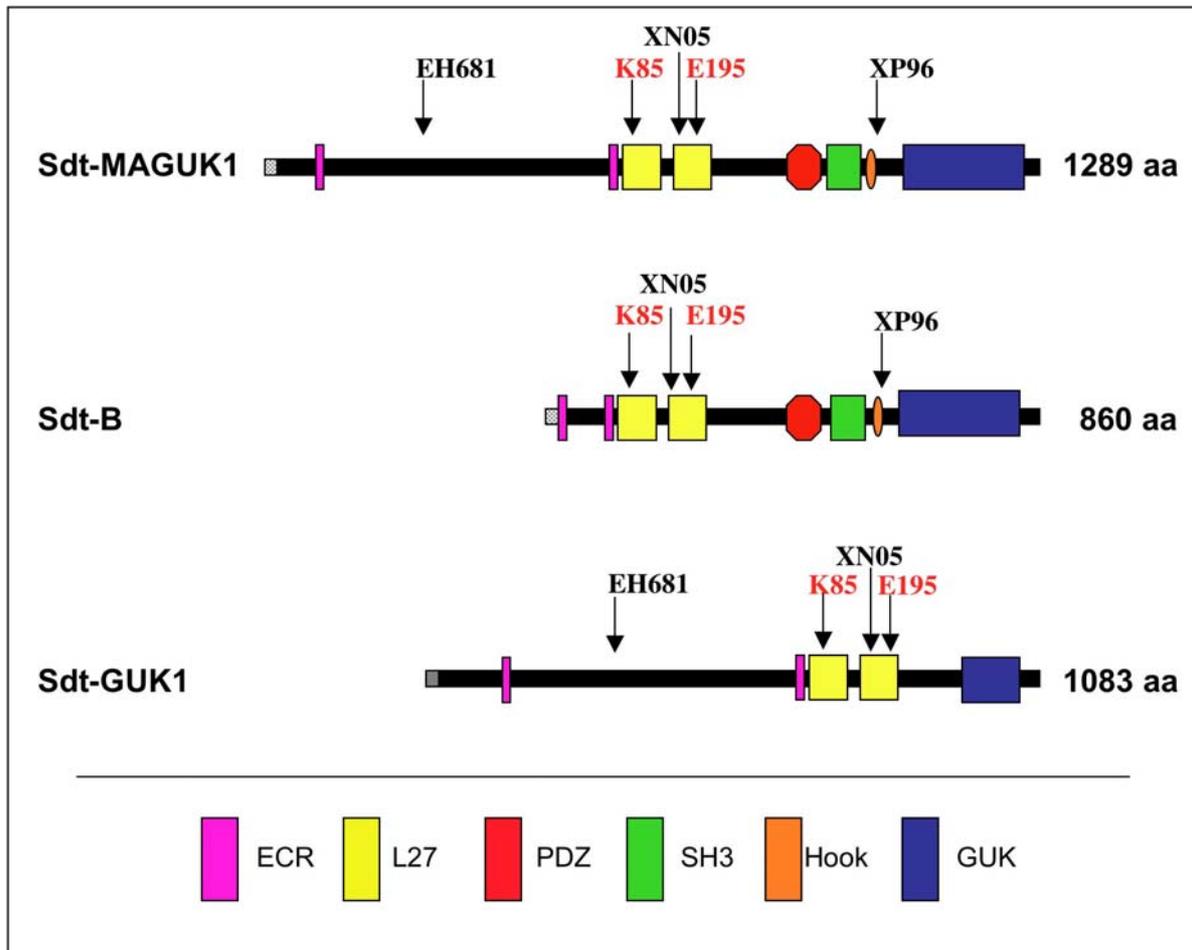


Abb. 3.22 Übersicht über die molekular charakterisierten Mutationen der verschiedenen *sdt* Allele auf Proteinebene.

Die rot markierten Mutationen wurden in dieser Arbeit charakterisiert, die schwarz markierten Mutationen wurden bereits veröffentlicht (Hong et al., 2001) und in dieser Arbeit nochmals überprüft. Die verschiedenen Domänen sind im unteren Teil der Abbildung erläutert.

Für das Allel *sdt*^{K70} fand sich in keinem der sequenzierten Bereiche eine Mutation. Dies könnte darauf deuten, dass die Mutation in einem regulatorischen Element liegt oder es könnte weitere, noch unbekannte Exons geben, die bei der Analyse nicht erfasst wurden.

In der Übersicht der Sdt Mutationen (Abb. 3.22) sind zur einfacheren Orientierung die bereits veröffentlichten Mutationen (in schwarzer Schrift) mit abgebildet (Hong et al., 2001). Diese Mutationen wurden in dieser Arbeit nochmals überprüft und konnten bestätigt werden. Die Mutation von Klasse I Allel *sdt*^{EH681} ist im Exon 3 lokalisiert und stellt eine *nonsense* Mutation dar, mit einem frühzeitigen Stopp. Da im Auge kein Phänotyp und auch kein Verlust des Sdt-Proteins zu finden ist, kann daraus geschlossen werden, dass diese Mutation für ein Transkript im Auge keine Bedeutung besitzt.

Die Mutation von *sdt*^{XN05} lokalisiert exakt zwischen den beiden neuen Mutationen *sdt*^{K85} und *sdt*^{E195} in Exon 6 (s. Abb. 3.22) und stellt ebenfalls ein *nonsense* Mutation dar (Stopp). Da

auch *sdt*^{XN05} keine morphologischen Defekte und auch keine lichtinduzierte Degeneration zeigt, weicht es deutlich von dem Phänotyp der beiden Klasse IV Allele ab. Außerdem zeigt es noch Sdt Expression in den immunohistochemischen Färbungen.

Die *missense* Mutation von *sdt*^{XP96} ist im Exon 6 an dessen 3'-Ende in der Spleissregion lokalisiert. So wird ein korrektes Spleissen an dieser Stelle verhindert und ein Stopp im Intron ist die Folge (Hong et al., 2001). Bei dieser Mutation ist es durchaus denkbar, dass ein verkürztes Protein gebildet wird. Diese Mutation betrifft alle MAGUK Isoformen, da die GUK1 Isoform diesen Bereich von Exon 6 alternativ herausspleisst.

3.5 EST-Klon Analysen identifizieren eine weitere embryonale Sdt Isoform

EST-Klone sind cDNA Sequenzen (Exprimierte Sequenz Tags), die von dem Berkeley *Drosophila* Genome Project (BDGP) aus verschiedenen gewebespezifischen cDNA Banken in Expressionsvektoren kloniert wurden. Sie geben einen Überblick über mögliche exprimierte mRNAs in den jeweiligen Geweben. Zumeist sind die 5'- und 3'- Bereiche ansequenziert, womit eine Genzuordnung möglich ist. Die Analyse dieser EST-Klone kann Hinweise auf exprimierte Transkripte eines Gens liefern, was uns veranlasste, die zur Verfügung stehenden EST-Klone vollständig zu sequenzieren.

Drei der analysierten Klone stammen aus einer Kopf spezifischen cDNA Bank, die anderen drei sind aus embryonalen cDNA Banken gewonnen worden.

Zwei der embryonalen EST-Klone (RE14379 und RE05272) besaßen nahezu vollständige Homologien zu der *cMAGUK1* (Tab. 3.3). Ihnen fehlte nur das Exon 3, was bereits für die embryonale Isoform SdtB beschrieben wurde (Hong et al., 2001). Jedoch besitzt der EST-Klon einen anderen 5'-UTR Bereich, der jedoch mit dem von *cMAGUK1* (Bachmann et al., 2001) übereinstimmt (also eine *cMAGUK1* ohne Exon3).

Die weiteren analysierten Klone (RH44007, RH17915, GH10588, RE70031, Tab. 3.3) entsprechen kürzeren *cMAGUK1* Transkripten, die erst in Exon 5 oder 6 beginnen und dort kein direktes Startkodon besitzen, was darauf hindeutet, dass sie unvollständig im 5'-Bereich sind. Es konnte somit kein Kopf spezifisches Transkript identifiziert werden. Stattdessen gibt es für eine weitere embryonale cDNA Indizien: ein Transkript entsprechend der *cMAGUK1* ohne das Exon 3, mit einem anderen UTR Bereich als *csdtB*.

Klon	Gewebe	Länge (bp)	ORF (bp)	Motive	Homologien zu cMAGUK1
RH44007	adulter Kopf	2.584	153-2.513= 2.360	ab Ex6: vor PDZ, SH3,GUK ohne C-L27	3.381-5.742 bp
RH17915	adulter Kopf	2.590	153-2551= 1.421	ab Ex6: PDZ-SH3-GUK ohne C-L27	3.381-5.758 bp
GH10588	adulter Kopf	5.878	4021-5.875= 1.814	ab Ende EX6: GUK Hybrid-cDNA	3.926-5.740 bp
RE70031	Embryo	3.361	130-3.282= 3.152	ab EX5: vor N-L27, C-27,PDZ,SH3,Guk ohne ECR1+2, anderer 5'-UTR Bereich	2.588-5.740 bp
RE05272	Embryo	4.659	160-4.580= 4.420	ECR1+2,N+C-L27, PDZ,SH3,GUK Ex3 fehlt, anderer 5'- UTR Bereich	21-5.739 bp
RE14379	Embryo	4.647	157-4.576= 4.419	L27-PDZ,SH3,GUK Ex3 fehlt	21-5.740 bp

Tab. 3.3 Übersicht der analysierten *sdt* EST-Klone.

3.6 Nachweis spezifischer *sdt* Transkripte im Kopf mittels Northern Blot Analyse

Mittels einer Northern Blot Analyse sollten mögliche weitere *sdt* Transkripte aus dem Kopf und dem Embryo nachgewiesen werden. Dazu wurde aus Kopf oder Embryo isolierte poly(A)⁺mRNA eingesetzt. Als Sonde diente ein 3'-*sdt* Fragment, das bereits in Bachmann *et al.* zum Nachweis der embryonalen Transkripte in Northern Blot Analyse diente. Es umfasst die kodierende Region für die C-terminalen L27 Domäne bis zum 3'-UTR (inkl. PDZ, SH3, GUK).

In der Northern Blot Analyse (Abb. 3.23) konnten in der kopfspezifischen poly(A)⁺-mRNA vier Transkripte mit der 3'-Sdt-Sonde detektiert werden mit einer ungefähren Größe von 9 kb, 8 kb (sehr schwach), 6,7 kb und 5,9 kb. Nur zwei dieser Transkripte konnten auch im Embryo detektiert werden (Abb. 3.23): Die 8 kb und die 6,7 kb Bande. Daraus kann geschlossen

werden, dass mindestens zwei zusätzliche mRNAs im Kopf existieren. Eines davon ist größer (9 kb), das andere ist kleiner (5.9 kb) als die embryonalen Transkripte.

Die hier ermittelten Größen sind deutlich größer als die beschriebenen embryonalen *sdt* Transkripte (Bachmann, 2000), die eine Größe von 5 und 6 kb in 0-12 h alten Embryonen zeigten und eine 5 und 7 kb in 12-24 h alten Embryonen zeigten. Ein Vergleich zwischen den ermittelten Größen ist insofern schwierig, da je nach verwendetem Marker und Länge der Auftrennung im Gel starke Unterschiede in den Größen entstehen können.

Für die Bestimmung der absoluten Größen müsste eine weitere Northern Blot Analyse durchgeführt werden, bei dem der Marker und die Auftrennung möglichst optimal auf die erwarteten Größen der mRNAs abgestimmt sind.

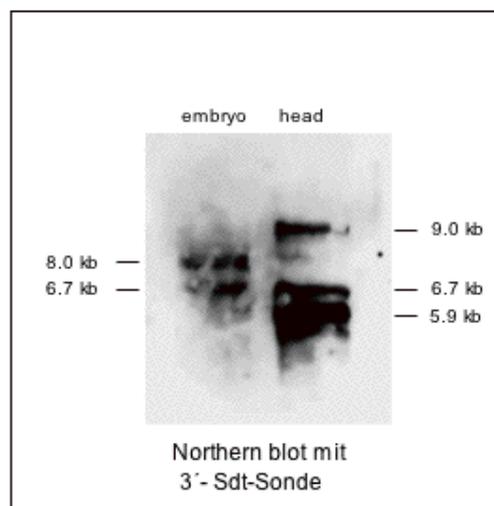


Abb. 3.23 Detektion von Kopf spezifischen mRNA Transkripten mittels Northern Blot Analyse. Northern Blot Analyse mit embryonaler (0-24 h) und Kopf spezifischer poly(A)⁺RNA hybridisiert mit einer Sonde gegen die 3'-Sdt-MAGUK Region (s. Text für Details).

3.7 Nachweis von gewebespezifischen Splicevarianten von Stardust

Die bisher zusammengetragenen Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass es nicht nur ein funktionelles Sdt Protein gibt. Das unterschiedliche Verhalten der analysierten Sdt Allele im Auge und im Embryo kann nicht mit einer einzigen Sdt Isoform erklärt werden.

Es wurde für verschiedene Proteine in *Drosophila* gezeigt, dass unterschiedliche Transkripte eines Gens spezifisch in verschiedenen Geweben exprimiert werden. Als Beispiel sei hier auf ein weiteres MAGUK kodierendes Gen *discs large (dlg)* verwiesen (Woods und Bryant, 1989), für das gezeigt werden konnte, dass es fünf verschiedene Transkripte gibt. Um herauszufinden, ob eines der bereits veröffentlichten *sdt* Transkripte (Bachmann et al., 2001;

Hong et al., 2001) spezifisch im Auge exprimiert wird, oder ob es gegebenenfalls noch weitere Spleissvarianten gibt, wurden RT-PCR Analysen durchgeführt.

Der Grundgedanke dabei war, möglichst mehrere verschiedene Primerkombinationen, die die bisher bekannten Regionen einschlossen, auszuwählen. Mit diesen wurden dann parallel RT-PCRs mit embryonaler und kopfspezifischer poly(A)⁺-mRNA durchgeführt, um so mögliche Unterschiede in der Expression zwischen Embryo und Kopf aufzudecken.

Die Primer für die RT-PCRs wurden in den bekannten Exons bzw. in den UTR Bereichen der cDNAs ausgewählt. Unbekannte Exons werden somit nur erfasst, wenn sie innerhalb dieser Region liegen und nicht am 5'- oder 3'- Ende. Eine willkürliche Primerwahl im Intron Bereich wäre aufgrund der Größe des *Sdt* Locus (50000 bp) wenig erfolgsversprechend. Eine Schwierigkeit liegt in der Größe der erwarteten Fragmente, die bis zu 6 kb lang sein können und häufig unvollständig sind. Deshalb wurden auch Primerpaare verwendet, die kleinere Teilbereiche amplifizieren (<2 kb).

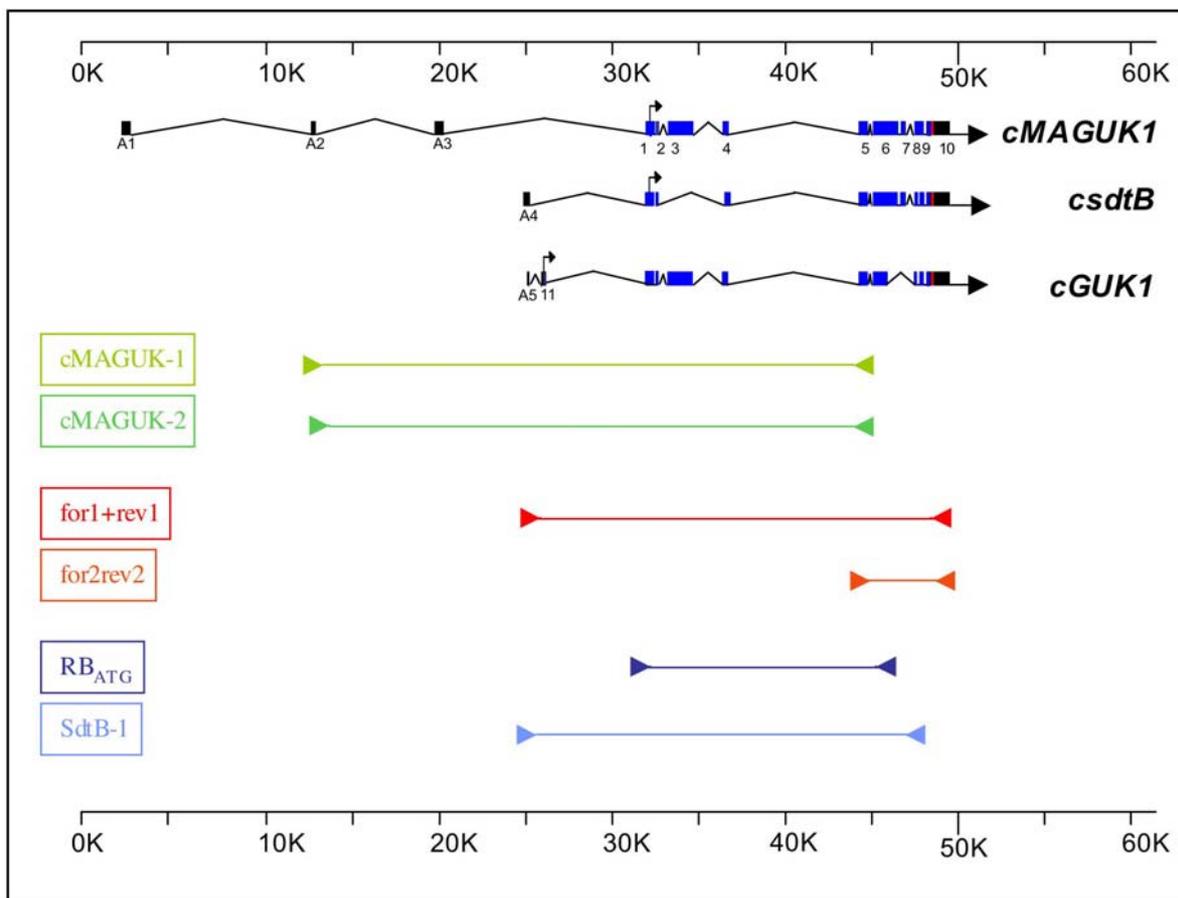


Abb. 3.24 Übersicht über die genomische *sdt* Region mit den verwendeten Primern für die RT-PCR.

Der 5'-Primer MAGUK-1 bindet spezifisch in Exon A2 (5'-UTR) der *cMAGUK1* (Abb. 3.24). Dieser Primer könnte in allen bisher bekannten embryonalen Transkripten binden. Der

dazugehörige 3'-Primer bindet im Exon 6 (vor der PDZ Domäne), so dass zumindest ein Transkript mit einer Größe von 2.618 bp entstehen könnte (Tab. 3.4), sowie mögliche weitere noch nicht bekannte Transkripte.

Die MAGUK-2 Primer stellen ein inneres (*nested*) Primerpaar zum ersten da, so dass eine weitere PCR auf der ersten Reversen Transkription Reaktion durchgeführt werden konnte (sie liegen 20-30 bp in das mögliche Transkript hinein verlagert).

Der 5'-Primer for1 bindet spezifisch im 5'-UTR der *cGUK1* (A5), der 3'-Primer ist komplementär zu einem Bereich im 3'-UTR (Exon10) in allen bekannten cDNAs (Abb. 3.24). Dabei sollte das bekannte *cGUK1* Transkript mit einer Größe von 4.435 bp amplifiziert werden sowie weitere, noch nicht bekannte Transkripte (Tab. 3.4).

Die Primer for2 und rev2 amplifizieren ein Fragment, das vom Exon 6 (vor der für das PDZ Motiv kodierenden Region) bis in den 3'-UTR (Exon10) amplifiziert wird (und somit die kodierende Region für PDZ, SH3, Hook und Guk enthält). Dieses Primerpaar ist komplementär mit Regionen in allen bekannten Transkripten und es können Größen zwischen 600 bp (*cGUK1*) und 1.300 bp (*cMAGUK1/csdB*) entstehen (Tab. 3.4).

Primerpaar	<i>cGUK</i> [bp]	<i>cMAGUK</i> [bp]	<i>cSdtB</i> [bp]	RT-PCR [bp]			RT-PCR [bp]		
				Embryo			Kopf		
MAGUK-1	-	4.527	3.228	-	1,3	-	2,2	1,3	-
MAGUK-2	-	4.494	-	1,8	1,3	0,5	-	1,3	0,5
for1+rev1	3.372	-	-	1,3	0,75	0,5	3	1,3	0,5
for2+rev2	465	1.247	1.247	1,3	-	0,6	1,3	0,9	0,6
RB_{ATG}	1.966	1.966	667	1,7	0,6	-	-	0,6	
SdtB-1	-	-	2.234	0,75	0,4	0,3	0,75	0,4	0,3

Tab. 3.4 Übersicht über die erwarteten und die bisher erhaltenen Produktgrößen mit den eingesetzten RT-PCR Primern. (Nähere Details siehe Text.)

Der 5'-RB_{ATG} Primer bindet spezifisch im Exon 2, das in allen bekannten cDNAs enthalten ist. Der 3'-Primer ist komplementär zu einer Region im Exon 6, die den Bereich hinter der ersten L27 Domäne kodiert. Es werden Transkripte mit unterschiedlichen Längen erwartet (Tabelle 3.4). Der Primer 5'-SdtB-1 bindet spezifisch im 5'-UTR (A6) des *sdtB* Transkriptes. Der 3'-B Primer ist komplementär zu einem Bereich in Exon 7, so dass wenigstens ein Produkt mit einer Größe von 2.234 bp entstehen kann. Die angegebenen Größen beziehen sich nur auf die bereits bekannten Isoformen. So ist es durchaus denkbar und gewünscht, wenn durch die RT-PCRs weitere Fragmente mit anderen Größen erhalten werden. Die so

amplifizierten Fragmente können eine Übersicht über mögliche Unterschiede zwischen Kopf und Körper in den jeweiligen Regionen geben.

Für die verwendeten Primerkombinationen wurden meist mehrere DNA Amplifikate aus Kopf und Embryo poly(A)⁺RNA erhalten (Tab. 3.4). Diese Transkripte waren zumeist kleiner als die aufgrund der schon bekannten Isoformen vorhersehbaren Größen. Es ergaben sich nur für die Primerpaare MAGUK-1 und for1+rev1 deutliche Unterschiede zwischen Embryo und Kopf, wobei jeweils ein größeres kopfspezifisches Transkript auftrat. In der Primerkombination RB_{ATG} wurde ein größeres Transkript im Embryo detektiert. Es wurde begonnen, diese Transkripte zu klonieren und zu sequenzieren. Abschließende Ergebnisse liegen nur für die Primerkombination for1 und rev1 vor.

3.8 Identifizierung eines kopfspezifischen MAGUK-Transkriptes

Die RT-PCR mit den Primern for1 und rev1 (Abb. 3.25, A) (Bachmann et al., 2001) zeigte die ersten eindeutigen Unterschiede zwischen den embryonalen Transkripten und den aus Kopf amplifizierten Transkripten. Der 5'-Primer ist komplementär zu einer Region im 5'-UTR des *cGUK1* Transkriptes, während der 3'-Primer komplementär ist zu einer Region im 3'-UTR, der auch in den anderen bekannten Transkripten vorhanden ist. Aus Abb. 3.25, A wird ersichtlich, dass mit den beiden Primern zumindest ein Fragment mit einer Größe von 3.374 kb amplifiziert werden sollte, das der *cGUK1* entsprechen sollte. Die amplifizierten PCR-Fragmente (Abb. 3.25, B) aus Embryo und Kopf sind alle kürzer als die erwarteten 3.3 kb. Im Gegensatz zum Embryo findet sich im Kopf ein Fragment mit einer Größe von 2.9 kb, das im Embryo wiederholt nicht amplifiziert werden konnte. Außerdem gibt es noch zwei weitere Fragmente, die sowohl im Kopf als auch im Embryo vorkommen (1.3 kb und 0.5 kb). Eine nähere Analyse dieser Amplifikate zeigte, dass die kleinste Bande zwar eine *sdt* Region enthielt, jedoch konnte der 3'-Primer nicht identifiziert werden, was darauf hindeutet, dass es sich um eine unspezifische Bindung des 3'-Primers handelt (das Amplifikat endet in Exon 3). Das 1.3 kb Produkt (*sdt-k*), konnte sowohl im Embryo als auch im Kopf amplifiziert werden. Es entspricht einem weiteren *cGUK*-Transkript (Abb. 3.25, C), die beiden verwendeten Primer konnten am 5'- und 3'-Ende identifiziert werden. In diesem Transkript enthalten ist nur eine kodierende Region für die ECR1 und die GUK Domäne; die Exons 3, 5, 6 und 7 fehlen vollständig.

Das nur aus der kopfspezifischen cDNA amplifizierte *sdt-k* Fragment (2,9 kb) entspricht einem MAGUK-Transkript. Es beinhaltet alle kodierenden Regionen für die bisher

identifizierten Motive und Domänen. Durch das Fehlen des Exons 3 (1300 bp) entspricht die kodierende Region eher der des *csdtB* (Abb. 3.22). Die Abweichung zur *csdtB* liegt zum einen im putativen Translationsstart (in Exon 11 anstatt in Exon 1), zum anderen im 5'-UTR (Exon A5), der in *sdtB* nicht vorkommt.

Die Identifizierung eines spezifisch im Kopf amplifizierten Fragmentes weist auf die Existenz einer spezifischen Isoform im Kopf hin. Es bleibt aber zunächst noch unklar, wieso keine exakte *cGUK1* amplifiziert werden konnte, obwohl diese als einziges mit der Primerkombination amplifiziert werden sollte. Eine weitere offene Frage bleibt auch, inwieweit die RT-PCR mit den hier amplifizierten Fragmenten an ihre Grenzen stößt: Konnten größere Fragmente nicht gefunden werden, da aufgrund der Methode keine größeren Fragmente als 2.9 kb transkribiert werden konnten?

Die bisher durchgeführten RT-PCRs schließen nicht aus, dass es noch weitere kopfspezifische Isoformen gibt, so dass keine endgültigen Schlussfolgerungen gezogen werden können.

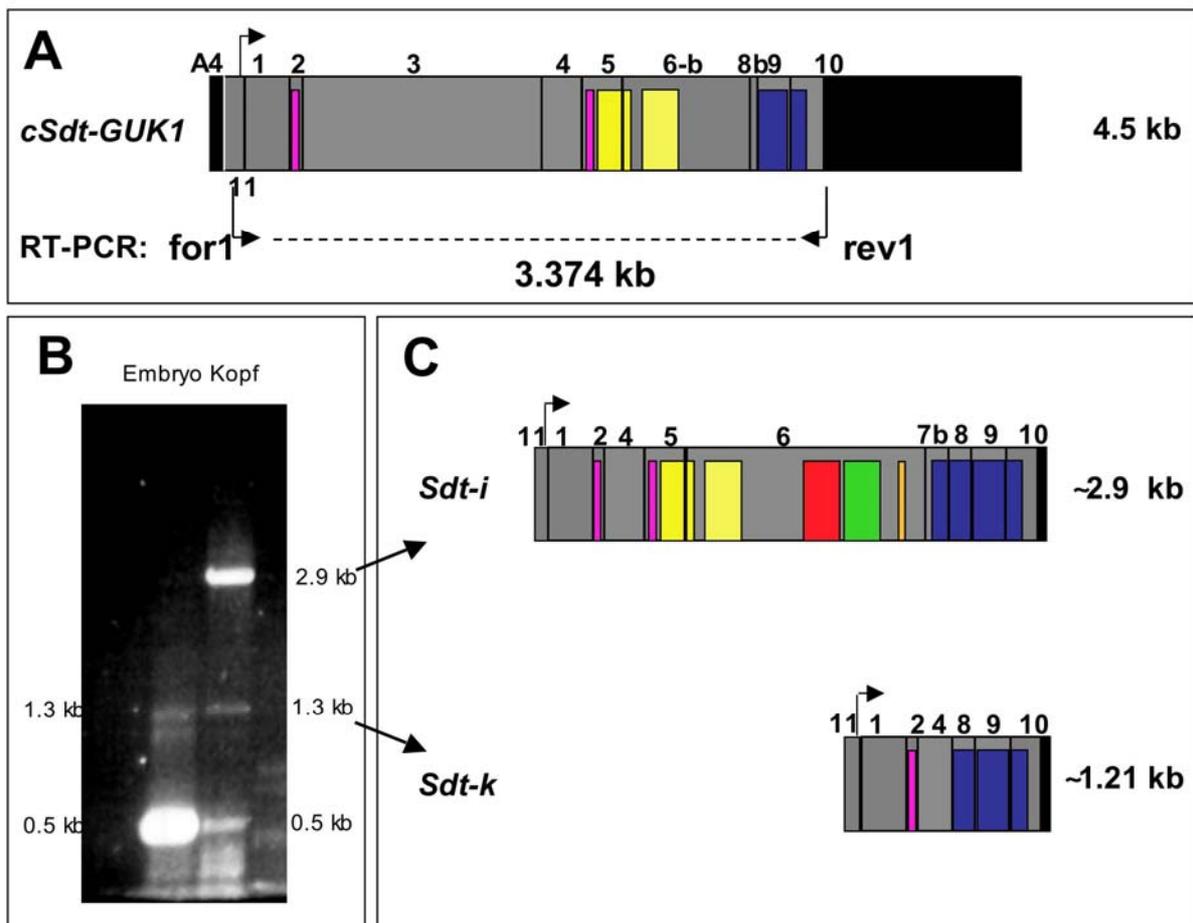


Abb. 3.25

Abb. 3.25 Schematische Übersicht der RT-PCR mit den Primern for1 und rev1, die spezifisch in der UTR Region von *cGUK1* binden. (s. vorherige Seite)

(A) Lokalisation der verwendeten Primer in *cGUK1* bei der RT-PCR. Der 5'- for1 Primer bindet im Exon A5, welches spezifisch in der *cGUK1* vorkommt. Der 3'-Primer rev1 liegt im UTR-Bereich des Exon 10, das auch in allen anderen bisher bekannten Transkripten existiert. Aufgrund der Spezifität der Primer für die bekannte *cGUK1*, wird zumindest ein Fragment mit einer Größe von 3.374 bp erwartet.

(B) Agarosegelaufreinigung der amplifizierten Fragmente der RT-PCR. Es werden andere als die erwarteten Fragmente amplifiziert. Ein 2.9 kb großes Transkript (i) konnte nur im Kopf gefunden werden, während das Sdt-k Fragment (1.3 kb) sowohl im Kopf als auch im Embryo vorkommt.

(C) Die Sequenzierung der drei verschiedenen Fragmente zeigt, dass sie alle *sdt* Amplifikate sind. Die 0.5 kb Bande ist jedoch eine unspezifische Amplifikation, da der 3'- Primer unspezifisch gebunden hat. Das in beiden Geweben amplifizierte 1.3 kb Fragment (cSdt K) entspricht einem sehr kurzen Transkript mit einer GUK Domäne und der ECR1.

Das nur im Kopf amplifizierte Fragment *cSdt-i* mit einer Größe von 2.9 kb stellt ein MAGUK Transkript dar, das im Prinzip dem *sdtB* (3) Transkript entspricht. Es besitzt ebenso wie *sdtB* (3) kein Exon 3, jedoch besitzt es einen anderen 5'- UTR Bereich, der in *sdtB* (3) nicht vorkommt.

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wird die Rolle des Gens *sdt* in den Photorezeptorzellen des Komplexauges von *Drosophila melanogaster* untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass Sdt im Rhabdomerstiel mit Crb und DPatj kolokalisiert und der Crb Komplex somit im adulten Komplexauge konserviert ist.

Die Analyse von Sdt im Auge zeigt, inwieweit auch Sdt in ähnliche oder weitere Prozesse wie Crb involviert ist. Dabei ist auch von Interesse, ob die unterschiedlichen Phänotypen von unabhängigen oder miteinander gekoppelten Prozessen gesteuert werden. Durch die Verwendung verschiedener *sdt* Allele sollte eine Struktur-/Funktionsanalyse ermöglicht werden. Dabei können die unterschiedlich lokalisierten Mutationen, die die Struktur des mutanten Proteins betreffen, zu verschiedenen Phänotypen im Auge führen und Rückschlüsse auf die Bedeutung der einzelnen Proteindomänen erlauben.

Eine Analyse der spezifisch im Auge exprimierten *sdt* mRNA mittels RT-PCR soll über Sdt Isoformen im Auge Aufschluss geben. Die funktionelle Bedeutung dieser *Sdt Isoformen* im Auge könnte durch eine Rettung mit den jeweiligen Transgenen in den mutanten Augen oder über RNAi getestet werden.

4.1 Die analysierten *sdt* Allele bewirken unterschiedliche mutante Phänotypen im Komplexauge von *Drosophila*

Die untersuchten EMS induzierten *sdt* Allele zeigen in homozygot mutanten Embryonen einen typischen *sdt* Kutikulaphänotyp, der in den untersuchten mutanten Embryonen mit dem Verlust des Sdt Proteins einhergeht. In den Augen hingegen zeigen die gleichen *sdt* Allele vier unterschiedliche Phänotypen. Es gibt mutante Augen mit einem wildtypischen Phänotyp (Klasse I), mit einem morphologischen Phänotyp (Klasse II), mit einem lichtinduzierten Degenerationsphänotyp (Klasse III) oder mit dem morphologischen und dem lichtinduzierten Phänotyp (Klasse IV). Die verschiedenen *sdt* Phänotypen weisen auf strukturelle Unterschiede in den mutanten Sdt Proteinen hin, die von den jeweiligen Mutationen verursacht werden. Die molekulare Charakterisierung dieser Mutationen ermöglicht Rückschlüsse auf die Funktion der verschiedenen Motive und/oder Proteine. Die bisher charakterisierten Mutationen können jedoch noch kein eindeutiges Bild von einem oder mehreren funktionellen Sdt Proteinen im Auge vermitteln. Die mutanten Augen der Klasse IV Allele zeigen als einzige alle bisher bekannten Defekte, woraus geschlossen werden kann,

dass kein funktionelles Sdt Protein mehr vorhanden ist. Damit sind die Klasse IV Allele im Auge als amorph einzustufen.

Die beobachteten *sdt* Defekte spiegeln die für *crb* gezeigten Defekte wider und zeigen, dass Sdt innerhalb des Crb Komplexes ein weiterer wichtiger Faktor zur Aufrechterhaltung der Morphologie der Photorezeptoren ist und auch an Prozessen zur Unterdrückung der lichtinduzierten Degeneration beteiligt ist.

4.1.1 Klasse I Allele: Sdt-MAGUK1 und Sdt-GUK1 sind im Komplexauge funktionslos

Homozygot mutante Augenklone dieser Klasse zeigen keinerlei morphologische Defekte und auch keine lichtinduzierte Degeneration. Sdt Antikörperfärbungen können eine wildtypische Lokalisation des Proteins detektieren. Diese Ergebnisse des *sdt^{EH681}* Allels (Klasse I) im Komplexauge stehen im direkten Gegensatz zu den Ergebnissen im Embryo. In *sdt^{EH681}* mutanten Embryonen kann mit den beiden Sdt-Antikörpern keine Proteinexpression mehr nachgewiesen werden. Die Embryonen zeigen den typischen amorphen *sdt* Kutikulaphänotyp und sterben. Während die meisten Allele der Klasse I nicht molekular charakterisiert sind, sind die Mutationen der *sdt^{EH681}* und *sdt^{XN05}* Allele identifiziert worden, die ein vorzeitiges Stopp-Codon einfügen (Hong et al., 2001). Die nonsense Mutation von *sdt^{EH681}* befindet sich in Exon 3 und verändert die Transkripte *MAGUK1* und *GUK1*. In *cSdtB* führt diese Mutation zu keinem Defekt, da in diesem das Exon 3 alternativ herausgespleisst wird (Abb. 4.3). Damit stellt die *cSdtB* das einzige bekannte Transkript dar, das trotz der Mutation noch für ein vollständiges Sdt Protein im Auge kodieren und die wildtypische Funktion von Sdt im Auge erklären könnte. Das Exon 3 kodiert für einen großen Bereich des langen N-Terminus im Sdt Protein, für den bisher keine bekannten Motive vorhergesagt werden konnten (SMART-Analyse). Auch Sdt Homologe in anderen Spezies (Maus, *C. elegans*) weisen mit dieser Region des Sdt N-Terminus keine Homologien auf (Bachmann et al., 2001).

Die nonsense Mutation von *sdt^{XN05}* ist in der L27C Domäne des Exons 6 identifiziert worden (Hong et al., 2001). Diese Mutation betrifft alle bekannten embryonalen Transkripte, und führt zu Proteinen, denen nahezu die gesamten bekannten Domänen fehlten (Abb. 4.1). Im Auge kann jedoch wildtypisch lokalisiertes Sdt Protein detektiert werden, was darauf hindeutet, dass ein funktionelles Sdt Protein in den Augen von dieser Mutation nicht betroffen ist. Dieser Widerspruch zwischen beobachtetem wildtypischen Phänotyp, Sdt Expression und charakterisierten Mutationen kann hier nicht aufgelöst werden. Das *sdt^{XN05}* Allel wird aus diesen und weiteren Gründen, die im Abschnitt 2.7 näher erörtert werden, für die weiteren Funktionsbetrachtungen außer Acht gelassen.

Über die biologische Bedeutung der bisher veröffentlichten *sdt* Transkripte aus dem Embryo ist nicht viel bekannt. In Rettungsexperimenten im Embryo konnte gezeigt werden, dass das *MAGUK1* Transkript eine teilweise Rettung des mutanten Phänotyps ermöglichte, während dies mit dem *GUK1* Transkript nicht gelang (Bachmann et al., 2004). Das deutet auf eine Funktion des Sdt-MAGUK1 Proteins während der Embryogenese hin, schließt jedoch für GUK1 und Sdt B (Abb. 4.1) eine spätere Funktion im Embryo nicht aus. Eine Northern Blot-Analyse an embryonaler poly(A)⁺mRNA detektierte während der frühen Embryogenese zwei *sdt* Transkripte (6 + 7 kb), von denen in späteren embryonalen Stadien eines (7 kb) nicht mehr exprimiert wird (Bachmann et al., 2001). Das könnte auf eine biologische Funktion des 7 kb Transkriptes in der frühen Embryogenese hindeuten, während in späteren Stadien andere Transkripte exprimiert werden. Diese Daten lassen leider keine Rückschlüsse auf spezifische Transkripte zu.

Für das zweite identifizierte MAGUK Protein im Embryo SdtB wurde bisher gezeigt, dass es in einem *in vitro*-Pulldown Experiment mit Crb interagiert (Hong et al., 2001). Eine funktionelle Analyse (Überexpression, RNAi-Experimente) ist bisher nicht durchgeführt worden.

Klasse	<i>sdt</i> Allele	Embryo				Auge			
		Sdt Expr.	Kutikula	letal	Crb Lokalisation	Sdt Expr.	Morphol. Phänotyp	Lichtind. Degen.	Crb Lokalisation
I	<i>sdt</i> ^{EH681} <i>sdt</i> ^{XNO5}	nein	amorph hypomorph	ja	fehllokalisiert	ja	nein	nein	normal
II	<i>sdt</i> ^{XP96}	nein	amorph	ja	fehllokalisiert	nein	ja	nein	fehlt/ fehllokalisiert
III	<i>sdt</i> ^{N5}	nein	amorph	ja	n. b.	ja, aber reduzierter	nein	ja	mit Sdt umverteilt
IV	<i>sdt</i> ^{K85} <i>sdt</i> ^{K70} <i>sdt</i> ^{E195}	nein	amorph	ja	fehllokalisiert	nein	ja	ja	fehlt/ fehllokalisiert

Tab. 4.1 Zusammenfassung der beobachteten *sdt* mutanten Phänotypen im Embryo und im Auge von *Drosophila*. n. b. = nicht bestimmt. Expr.= Expression, Degen.= Degeneration.

4.1.2 Klasse II Allel: Sdt zeigt eine Funktion in der Morphologie der PRZ

Aufgrund der morphologischen Defekte der *sdt* mutanten Augen, wird das *sdt*^{XP96} Allel in eine zweite phänotypische Klasse eingeordnet. Die Analysen unter konstantem Licht für 7 und auch für 14 Tage zeigen keine Degeneration, vereinzelt finden sich Ommatidien in denen einzelne Photorezeptorzellen von Zelltod betroffen sind.

Charakteristisch für den morphologischen Phänotyp ist die proximo-distale Verkürzung der Rhabdomere, die Formveränderung der Rhabdomere sowie die Verkürzung der Rhabdomerstiele (Abb. 3. 9). Außerdem zeigen die Ommatidien insgesamt einen sehr variablen Phänotyp, was bedeutet, dass nicht alle Ommatidien gleich starke Defekte aufweisen. Es werden keine Defekte in den ZAs beobachtet. Mit Hilfe der beiden Sdt-Antikörper kann kein Sdt Protein mehr detektiert werden. Das kann einerseits auf den Verlust des Proteins, andererseits auf eine starke Delokalisation des Proteins hindeuten. Der Ausfall oder die Delokalisation des betroffenen Sdt Proteins führt somit zu einem ähnlichen morphologischen Phänotyp wie für *crb* mutante Augen beschrieben, jedoch nicht zu dem lichtinduzierten Zelltod. In einer kürzlich veröffentlichten Arbeit über das *sdt^{XP96}* Allel wurde der Verlust von Sdt in pupalen Augenklonen sowie die Morphologie der adulten Augenklone analysiert (Hong et al., 2003). Die *sdt* mutanten Photorezeptoren besaßen deutlich (40%) verkürzte Rhabdomerstiele und die Rhabdomere zeigten morphologische Defekte, wie sie auch in dieser Arbeit gefunden wurden. Die Autoren schlossen aus ihren Analysen der pupalen Augen, dass Sdt keine Funktion in der Etablierung der apiko-basalen Polarität besitzt, sondern in die Spezialisierung des apikalen Rhabdomerstiels involviert ist (Hong et al., 2003). Die missense Mutation von *sdt^{XP96}* ist in Exon 6 identifiziert worden (Hong et al., 2001) und betrifft alle bekannten MAGUK Isoformen, jedoch nicht die GUK1 Isoform (Abb. 3.22). Daraus ergeben sich zwei mögliche Erklärungen für die morphologischen Defekte in diesen *sdt^{XP96}* Augenklonen: Zum einen könnten zwei Sdt Proteine für die verschiedenen Funktionen verantwortlich sein. Ein noch vorhandenes GUK1 Protein könnte die lichtabhängige Degeneration abwenden, während das Fehlen des MAGUK Proteins zu den morphologischen Defekten führt. Mittels Immunhistochemie kann aber kein Sdt Protein mehr detektiert werden. Dies lässt eine biologische Bedeutung des GUK1 Proteins zumindest fraglich erscheinen, kann sie aber nicht ausschließen.

Eine zweite Erklärung bietet die von Hong *et al.* publizierte Hypothese, dass in *sdt^{XP96}* mutanten Embryonen noch ein verkürztes Protein ohne GUK Domäne gebildet wird. Daraus könnte dann ein anderer funktioneller Schluss gezogen werden: Die noch vorhandenen Motive des MAGUK1-Proteins wären ausreichend, um eine lichtinduzierte Degeneration, nicht aber das Auftreten der morphologischen Defekte zu verhindern. Das Fehlen der GUK Domäne führte somit zu einer Fehllokalisierung des verbleibenden Sdt Proteins, was die beschriebenen morphologischen Defekte verursachte. Aufgrund der immunhistochemischen Ergebnisse der Klasse II Allele können keine eindeutigen Aussagen für oder gegen die Existenz und Funktion dieser Sdt Proteine gemacht werden.

4.1.3 Klasse III Allel: Sdt zeigt eine Funktion in der lichtinduzierten Degeneration

Das *sdt*^{N5} Allel kann einer dritten phänotypischen Klasse zugeordnet werden, da nur der lichtinduzierte Degenerationsphänotyp in den mutanten Augenklonen beobachtet wird, aber keine morphologischen Defekte. Das Sdt Protein ist in den mutanten Augenklonen lokalisiert (mit beiden Antikörpern). Das Signal erscheint jedoch schwächer, auf einen kleineren Bereich des Rhabdomerstiels begrenzt. Da die Mutation dieses Allels bislang noch nicht molekular charakterisiert werden konnte, kann noch keine Aussage zu einer möglichen Veränderung in der Proteinstruktur gemacht werden. Die bisherigen Ergebnisse lassen jedoch den Schluss zu, dass das verbleibende Sdt Protein ausreicht, um morphologische Defekte zu verhindern. Außerdem ist dieses Restprotein in der Lage, die wildtypische Lokalisation seiner beiden Interaktionspartner Crb und DPatj zu beeinflussen. Das würde auf ein Sdt Protein mit funktionellen PDZ und L27N Motiven hindeuten, da gezeigt wurde, dass Sdt über seine PDZ Domäne mit Crb interagiert (Bachmann et al., 2001) und über seine L27C mit DPatj (Ö. Kempkens, persönl. Mitteilung).

In *crb* mutanten Embryonen (Bachmann et al., 2001) und auch in *crb* mutanten Augen bewirkt der Verlust von Crb auch einen Verlust von Sdt (M. Richard, persönl. Mitteilung). In der Überexpression von Crb im Embryo konnte gezeigt werden, dass Sdt durch eine weitere Verteilung an der apikalen Membran verringert wird (Bachmann, 2000). Diese Ergebnisse weisen auf eine gegenseitige Beeinflussung von Crb und Sdt in ihrer Lokalisation hin, was den hier gezeigten Ergebnissen in *sdt* mutanten Augen entspricht. Welcher weitere Faktor jedoch für die Bindung dieses Komplexes aus Sdt und Crb an die apikale Membran benötigt wird, bleibt bislang unklar.

4.1.4 Klasse IV Allele: Der völlige Verlust von Sdt bewirkt einen *crb* ähnlichen Phänotyp in *sdt* mutanten Augen

In die vierte phänotypische Klasse können drei *sdt* Allele (*sdt*^{K70}, *sdt*^{K85} und *sdt*^{E195}) eingeordnet werden. Die mutanten Augenklone zeigen sowohl den morphologischen als auch den lichtinduzierten Phänotyp und somit den stärksten aufgetretenen *sdt* mutanten Phänotyp der untersuchten Klassen. Dieser Phänotyp entspricht dem für *crb* mutante Augen beschriebenen (Johnson et al., 2002; Pellikka et al., 2002) und weist auf einen völligen Funktionsverlust von Sdt in diesen Allelen hin.

Die morphologischen Defekte sind ähnlich mit denen der Klasse II. Mittels der beiden Sdt-Antikörper kann in dieser Klasse kein Sdt Protein mehr detektiert werden, was auch den

Beobachtungen von Klasse II entspricht. Crb und DPatj sind nicht mehr nachweisbar, so dass Sdt für die korrekte Lokalisation von diesen Proteinen des Crb Komplexes benötigt wird. Die Zonula adherens weist auch in der vierten Klasse mutanter Augenklone keine erkennbaren Defekte auf.

Die *nonsense* Mutationen von *sdt*^{K85} und *sdt*^{E195} konnten jeweils in Exon 6 (in L27N und L27C) gefunden werden und führen zu einem frühzeitigen Stopp. Von diesen Mutationen wären alle bisher bekannten *sdt* Isoformen betroffen. Die Mutationen könnten zum völligen Verlust des Proteins oder aber zu einem verkürzten Sdt Protein, dem nahezu alle konservierten Domänen fehlen (ohne L27C, PDZ, SH3, Hook und GUK Domäne), führen (Abb. 3.22). In beiden Fällen könnte kein Sdt Protein mehr mit den verwendeten Sdt-Antikörper detektiert werden, da die GUK und PDZ Domänen, gegen die die Antikörper gerichtet sind, fehlen. Eine Antikörperfärbung mit einem weiteren Sdt-Antikörper, der gegen den N-terminalen Bereich gerichtet ist, weist jedoch auch kein Sdt-Protein in *sdt*^{K85} mutanten Augen nach (N. Bulgakova, persönl. Mitteilung). Aufgrund dieser Ergebnisse muss von einem vollständigen Verlust des Sdt Proteins in den *sdt* mutanten Augen der Klasse IV ausgegangen werden. Damit sind diese Allele als genetisch amorphe Allele anzusehen, die in den mutanten Augen den völligen Funktionsverlust (*loss of function*) verursachen.

Für das *sdt*^{K70} Allel konnte keine Mutation identifiziert werden, obwohl alle bekannten Exon-Intron Übergänge und Exons sequenziert wurden. Dies kann unterschiedliche Ursachen haben: Die Mutation könnte in einer regulatorischen Region außerhalb der Exons liegen; es gibt noch weitere, nicht identifizierte Exons; die Mutation liegt in einer der GC-reichen Regionen, die nur schlecht zu analysieren sind.

4.1.5 Sdt Isoformen besitzen unterschiedliche Funktion im Auge und im Embryo

Die bisher beschriebenen *sdt* Phänotypen und die Charakterisierung einzelner Mutationen aus den *sdt* mutanten Augen lassen in Kombination mit den Kenntnissen aus dem Embryo Rückschlüsse auf die funktionelle Bedeutung der bisher bekannten drei Sdt Proteine zu (s. Abb. 3.22).

Das Sdt-MAGUK1 und das Sdt-GUK1 Protein besitzen aufgrund der in *sdt*^{EH681} identifizierten Mutation in Exon 3 keine Funktion im Auge, da diese Mutation weder zu einem Phänotyp noch zu einem Proteinverlust im Auge führt (s. 4.1.1). Das Sdt B Protein ist jedoch von dieser Mutation nicht betroffen und könnte daher ein im Auge funktionell bedeutendes Protein sein (Abb.3.22). Dagegen führt das gleiche Allel *sdt*^{EH681} im Embryo zu einem völligen Funktionsverlust von Sdt, der zum frühen Tod der Embryonen führt. Dies

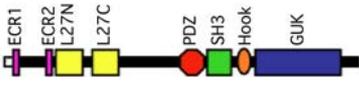
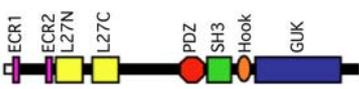
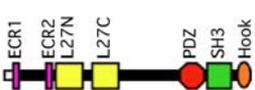
weist den von der Mutation betroffenen Proteinen Sdt-MAGUK1 und Sdt-GUK1 eine funktionelle Rolle in der frühen Embryogenese zu, während sie im Auge nicht von Bedeutung für die beobachteten Sdt Funktionen sind. Damit könnten den unterschiedlichen Isoformen gewebespezifische Funktionen zugeordnet werden: Sdt-MAGUK1 und Sdt-GUK1 besitzen eine Funktion in der frühen Embryogenese, während Sdt B eine Funktion in den Augen besitzt. Für Sdt B kann eine Funktion während der späten Embryogenese aufgrund dieser Daten nicht ausgeschlossen werden, sie ist sogar wahrscheinlich, da das Transkript aus einer embryonalen cDNA Bank isoliert wurde (Hong et al., 2001).

Aus den phänotypischen Analysen und der Charakterisierung der Mutationen wird deutlich, dass nur dem Sdt B Protein eine funktionelle Bedeutung im Auge zukommt. Daher wird im folgenden die Struktur und Funktion des Sdt B Proteins genauer analysiert (Tab. 4.1).

Die wildtypische Funktion des Sdt B Proteins besteht in der Erhaltung der wildtypischen Morphologie der Rhabdomere und der Inhibition des lichtinduzierten Zelltods (Tab. 4.1, wt). Das Klasse I Allel *sdt*^{EH681} zeigt keine Defekte im Auge, so dass auch hier ein wildtypisches Sdt B Protein exprimiert wird (Tab. 4.1, Klasse I).

Für das Klasse II Allel *sdt*^{XP96} ist die Mutation am Ende des Exons 6 identifiziert worden, so dass ein verkürztes Protein ohne GUK Domäne entstehen könnte. Die *sdt*^{XP96} mutanten Augen zeigen zwar morphologische Defekte, jedoch keine lichtinduzierte Degeneration. Damit müsste das verkürzte Sdt Protein in den *sdt*^{XP96} mutanten Augen ausreichend sein, um die Degeneration zu verhindern. Der Verlust der GUK Domäne führte somit zu den morphologischen Defekten (Tab. 4.1, Klasse II).

Die Klasse III Allele zeigen nur den Phänotyp der lichtinduzierten Degeneration. Da bisher keine Mutation identifiziert werden konnte, bleibt das veränderte Sdt Protein unbekannt (Tab. 4.1, Klasse III). In den Klasse IV Allelen *sdt*^{K85} und *sdt*^{E195} sind die beiden Mutationen zu Beginn des Exons 6 identifiziert worden, wodurch nahezu alle bekannten Motive in einem Sdt B Protein betroffen sind. Die mutanten Augen dieser Allele zeigen einen vollständigen Sdt Funktionsverlust. Im Vergleich zur Klasse II ist das durch den zusätzlichen Verlust der L27C, PDZ und SH3 Domäne zu erklären (Tab. 4.1, Klasse IV). Damit käme diesen Domänen eine Funktion in der Erhaltung der Morphologie der Photorezeptorzellen zu.

Augenklone	Allel/ Mutation	Proteinstruktur der verschiedenen Allele	Funktionalität
wt Auge	<i>wt</i> keine		- Erhaltung der wildtypischen Morphologie der Rhabdomere - Inhibition des lichtinduzierten Zelltods
Klasse I	<i>sdt^{EH681}</i> in Exon3*		- Erhaltung der wildtypischen Morphologie der Rhabdomere - Inhibition des lichtinduzierten Zelltods
Klasse II	<i>sdt^{XP96}</i> in Exon6*		- Verlust der Morphologie der Rhabdomere - Inhibition des lichtinduzierten Zelltods
Klasse III	<i>sdt^{N5}</i> n. b.	keine Rückschlüsse möglich	- wildtypische Morphologie der Rhabdomere - lichtinduzierter programmierter Zelltod
Klasse IV	<i>sdt^{K85}</i> in Exon6# <i>sdt^{E195}</i> in Exon6#		- Verlust der wildtypischen Morphologie der Rhabdomere - lichtinduzierter programmierter Zelltod

Tab. 2 Struktur/Funktionsanalyse der verschiedenen putativen Sdt Proteinformen im Auge.

Die möglichen Veränderungen der Proteinstruktur des SdtB Proteins durch die Mutationen werden schematisch dargestellt. Die identifizierten Mutationen können zu verkürzten Sdt B Proteinen im Auge führen und ggf. noch unterschiedliche Restfunktionen im Auge erfüllen. Abkürzungen: n. b. = nicht bekannt, * = identifiziert von Hong *et al.* (Hong *et al.*, 2001) und in dieser Arbeit überprüft, # = identifiziert in dieser Arbeit.

4.2 Spezifische *sdt* Transkripte existieren im Komplexauge von *Drosophila*

Alternatives Spleissen ist eine häufig genutzte Möglichkeit der differentiellen Genexpression in Eukaryonten. Dabei werden aus einem gebildeten Primärtranskript durch Kombination unterschiedlicher Exons verschiedene mRNAs gebildet. Ein Gen kann für mehrere Transkripte und somit für verschiedene Proteine kodieren (Janning und Knust, 2004). Durch gewebespezifische oder geschlechtsspezifische Modulation dieser Transkripte wird für funktionelle Diversität gesorgt (Sierralta und Mendoza, 2004). Für das *Drosophila* Gen *discs large (dlg)* wurden fünf verschiedene Isoformen beschrieben, die sich in ihren transkriptionellen Startstellen und alternativ gespleissten Exons unterscheiden. Während Dlg-A, ein MAGUK Protein wie Sdt, während der Embryogenese für die Etablierung der Zellpolarität von Bedeutung ist, zeigt eine weitere Isoform Dlg-S97, mit zusätzlichen Exons im 5'-Bereich, eine Funktion in der neuronalen Entwicklung (Mendoza et al., 2003). Diese unterschiedlichen Proteinprodukte können die verschiedenen Auswirkungen der *dlg* Mutanten und die unterschiedlichen Funktionen erklären.

Die Northern Blot Analyse der poly(A)⁺-Transkripte aus Kopf und Embryo zeigt die Existenz verschiedener *sdt* Transkripte (Abb. 3.23). Während im Embryo zwei Isoformen (8 kb und 6.7 kb) vorhanden sind, konnten im Auge vier verschiedene Transkripte (9 kb, 8 kb (sehr klein), 6.7 kb und 5.9 kb) detektiert werden. Diese verschiedenen Transkripte können auf die Verwendung unterschiedlicher Promotoren, verschiedene 3' Enden und alternatives Spleissen eines Primärtranskriptes hindeuten. In den bisher bekannten cDNAs gibt es drei identifizierte und unterschiedlich gespleisste Isoformen von Sdt und zwei mögliche Promotoren (Bachmann et al., 2001; Hong et al., 2001). Diese cDNAs zeigen keinen Unterschied im 3'-UTR Bereich. Die 5'-UTR Bereiche sind als Regionen für die Regulation der Translation von Bedeutung. So konnte gezeigt werden, dass mRNAs von Wachstumsfaktoren häufig einen untypischen 5'-UTR Bereich besitzen, der sehr lang und GC-reich ist (z. B. Transforming growth factor (TGF- β 1)) (Allison et al., 1998; Kozak, 1987). Solche Eigenschaften ermöglichen stabile Sekundärstrukturen, die die Initiation der Translation inhibieren oder steigern können. Ferner konnten auch verschiedene strukturelle Elemente in den 5'-UTR Bereichen identifiziert werden, an die trans-regulatorische Proteine binden können und somit die Translation regulieren können (Pickering und Willis, 2005). So könnten unterschiedliche 5'-UTR Bereiche in den *sdt* Transkripten auch auf eine Regulation der Translation deuten, die eine Expression verschiedener Sdt Isoformen in unterschiedlichen Geweben und zu spezifischen Zeiträumen kontrolliert.

4.3 Besitzt das identifizierte kopfspezifische MAGUK Transkript eine funktionelle Bedeutung?

Um die gewebespezifischen Unterschiede in den *sdt* Transkripten von Embryo und Kopf nachzuweisen, wurden eine Reihe von RT-PCRs durchgeführt (Abb. 3.24). Dabei konnte ein kopfspezifisches Amplifikat (*sdt-i*, 2.9 kb) charakterisiert werden (Abb. 3.25).

Dieses Transkript weist einen zur *sdt B* cDNA nahezu identischen kodierenden Bereich auf. Es unterscheidet sich von diesem in seinem 5'-UTR und im ersten Exon (Exon 11) durch einen alternativen Translationsstart. Ein spezifischer 5'-UTR weist auf gewebespezifische Promotoren zur Regulation der Expression hin. Auch die bereits identifizierten embryonalen Transkripte weisen verschiedene 5'-UTRs auf (Bachmann et al., 2001; Hong et al., 2001).

Bedingt durch das Identifizieren dieses *sdt-i* Amplifikats mittels RT-PCR ist es in der 5' und 3'- Region nicht vollständig. Eine Zuordnung zu den in der Northern Blot Analyse gefundenen kopfspezifischen Transkripten kann daher nicht vorgenommen werden. Aufgrund der Northern Blot Analyse kann jedoch mindestens ein weiteres augenspezifisches Transkript erwartet werden, das bisher noch nicht identifiziert werden konnte.

Die Frage nach der Funktionalität eines Sdt-i Proteins lässt sich nicht abschließend beantworten, da noch keine funktionellen Analysen (Transgene, RNAi) durchgeführt wurden. Jedoch genügt dieses mögliche Sdt-i Protein der in dieser Arbeit aufgestellten Hypothese (4.1.5), dass im Kopf ein Sdt B Protein von Bedeutung ist. Es besitzt zwar einen anderen (früheren) putativen Translationsstart (Abb. 4.1), entspricht aber ansonsten dem Sdt B Protein (Abb. 4.1). Damit ist mit dem *sdt-i* Amplifikat durchaus ein möglicher funktioneller Kandidat für ein kopfspezifisches Transkript identifiziert worden.

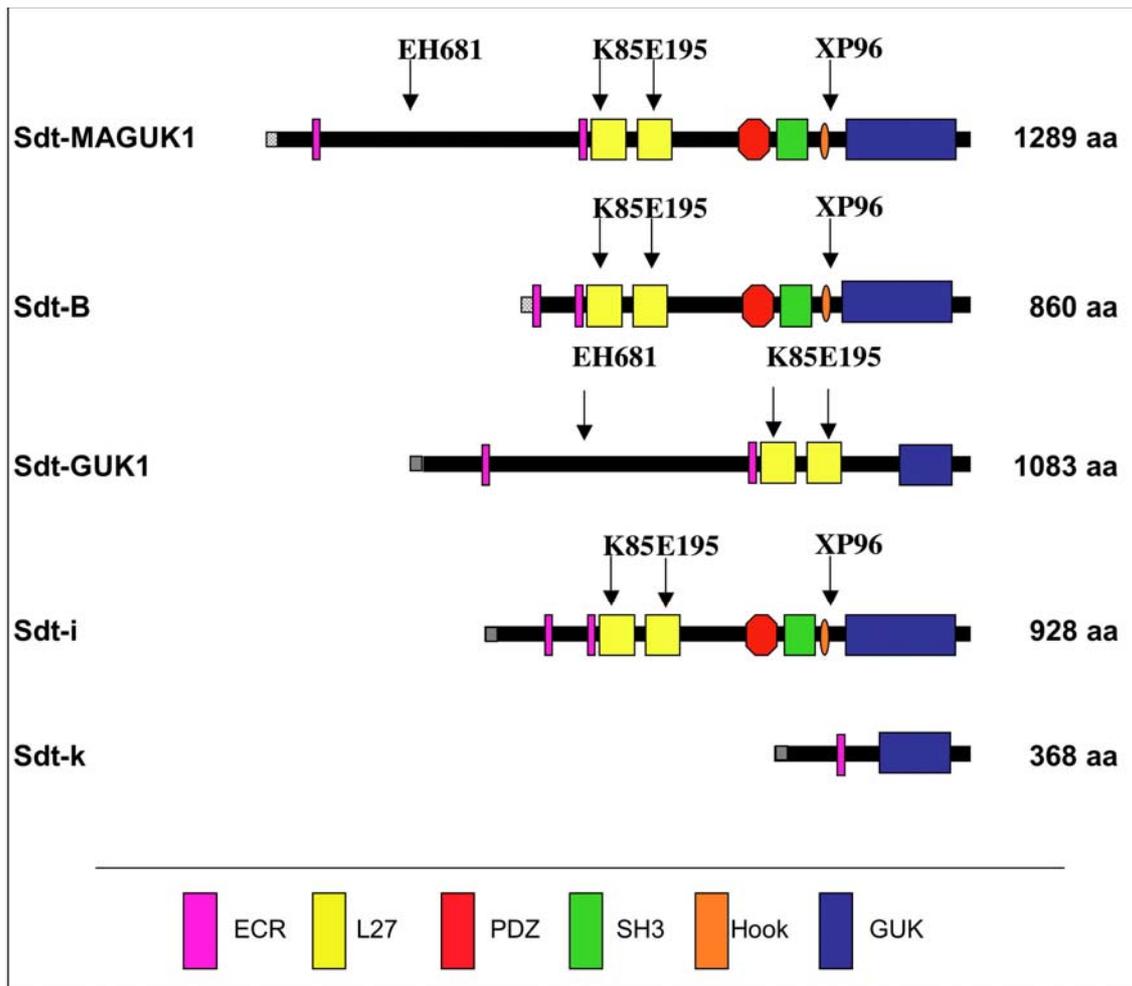


Abb. 4.1 Übersicht der bisher veröffentlichten und neu identifizierten putativen Sdt Proteine. Die verschiedenen Sdt Proteine und ihre Domänen. Sdt-i und Sdt-k sind die in dieser Arbeit durch RT-PCR gewonnenen Amplifikate. Sdt-i kodiert ein MAGUK-Protein und konnte nur aus Kopf mRNA gewonnen werden, während Sdt-K ein GUK-Protein kodiert, dass sowohl aus Kopf als auch aus Embryo mRNA amplifiziert werden konnte. Die bisher identifizierten Mutationen sind nochmals für jedes Protein mit einem Pfeil eingezeichnet.

4.4 Die lichtinduzierte Degeneration in *sdt* mutanten Augen weist auf eine Beteiligung von stabilen Rh1-Arr2 Komplexen hin

Mittels einer Vitamin A Mangel-Diät kann gezeigt werden, dass die lichtabhängige Degeneration in Augenklonen der Allele der Klasse IV (*sdt*^{K70} und *sdt*^{K85}) sowie der Klasse III (*sdt*^{N5}) aufgehoben wird. Damit könnte der lichtabhängigen Degeneration in *sdt* und *crb* mutanten Photorezeptoren der gleiche postulierte zellbiologische Mechanismus zu Grunde liegen.

Die Aktivierung der Signaltransduktionskaskade im Auge von *Drosophila* erfolgt über den lichtsensitiven G-Proteingekoppelten-Rezeptor Rhodopsin. Die Aktivierung löst eine Kaskade aus, an deren Ende die Öffnung von Kationenkanälen steht, durch die eine Depolarisation der

Membran ausgelöst wird. Parallel dazu muss der so aktivierte Rezeptor wieder deaktiviert werden, damit die Signaltransduktionskaskade beendet wird und der inaktivierte Rezeptor wiederverwendet werden kann (Hardie, 2001).

Die Bindung von Arrestin2 an Rhodopsin ist der entscheidende Schritt in der Inaktivierung des durch Licht aktivierten Rhodopsin Rezeptors. Der Rh1-Arr2 Komplex wird nach weiteren Modifikationen (Phosphorylierung des Arr2) wieder dissoziiert, um einen neuen Licht abhängigen Aktivierungszyklus zu ermöglichen. Außerdem ist Arrestin in der Lage, als Adapterprotein für die Clathrin abhängige Endozytose von aktivierten G-Protein-gekoppelten Rezeptoren zu fungieren (Laporte et al., 2000). In den Mutanten *norpA* (Phospholipase C) (Bloomquist et al., 1988) und *rdgC* (Serin/Threonin Protein Phosphatase) (Steele und O'Tousa, 1990), die in der visuellen Signalkaskade eine wichtige Rolle einnehmen, konnte gezeigt werden, dass die lichtinduzierte Degeneration mit einer Anhäufung von stabilen Rh1-Arr2 Komplexen korreliert (Alloway et al., 2000; Kiselev et al., 2000). So wurde postuliert, dass diese stabilen Komplexe durch Clathrin vermittelte Endozytose in den Zellkörper transportiert werden und durch noch unbekannte Mechanismen den Zelltod auslösen (Alloway et al., 2000; Kiselev et al., 2000). Eine Reduktion dieser stabilen Rh1-Arr2 Komplexe (durch eine hypomorphe Rhodopsin1 Mutante oder durch Vitamin A Mangeldiät) führt zur Aufhebung des lichtinduzierten Degenerationsphänotyps (Alloway et al., 2000) (Kiselev et al., 2000). Vitamin A ist das Vorläuferprotein für das Chromophore (11-cis retinal) des Rhodopsins. Durch eine Vitamin A Mangel-Diät wird das Rhodopsin auf 3% seiner normalen Menge reduziert (Larrivee et al., 1981).

Die lichtinduzierte Degeneration in *crb* mutanten Augen konnte durch eine Reduktion des Rhodopsins aufgehoben werden, so dass auch hier vermutlich ein Mechanismus zugrunde liegt, der auf der Endozytose der stabilen Rh1-Arr2 Komplexe beruhen könnte (Johnson et al., 2002).

Das Aufheben des *sdt* lichtinduzierten Degenerationsphänotyps mittels einer Vitamin A Mangel-Diät (Reduktion des Rhodopsins) weist ebenso darauf hin, dass die *sdt* Degeneration auch auf der Bildung von stabilen Rh1-Arr2 Komplexen beruhen könnte. Da Sdt (und auch Crb) jedoch im Rhabdomerstiel exprimiert werden, kann eine **direkte** Beteiligung an der Signaltransduktionskaskade im Rhabdomer ausgeschlossen werden (s. Abb. 4.2). In welche mit der Signaltransduktionskaskade verbundenen Mechanismen Sdt jedoch involviert ist, bleibt völlig unklar. Denkbar wäre zum Beispiel, dass Sdt den Transportprozess des Rhodopsins zum Rhabdomer beeinflusst. Die Daten über *crb*, *norpA* und *rdgC* legen einen Einfluss auf die Endozytose nahe (s. Abb. 4.2). Für Crb wurde ein funktioneller

Zusammenhang zum Spektrinzytoskelett in der Photorezeptorzelle gezeigt (Pellikka et al., 2002). Dabei zeigten β_H -Spektrin (*karst*) mutante Augen genau wie *crb* mutante Augen eine Verkürzung des Rhabdomerstiels. Aus diesen Resultaten schlussfolgerten Pellikka *et al.*, dass der Rhabdomerstielfortsatz der Ort der Endozytose in den Photorezeptorzellen sein könnte. Die Verringerung von β_H -Spektrin würde somit zu einer Erhöhung der Endozytoserate führen, was die Länge des Rhabdomerstiels verkürzte (Pellikka et al., 2002).

Um zu verstehen, in welche Mechanismen Sdt zur Unterdrückung von lichtinduzierter Degeneration involviert ist, müsste untersucht werden, welche weiteren Faktoren den *sdt* mutanten Degenerationsphänotyp abschwächen oder verstärken können. Von Interesse könnten dabei Moleküle zur Regulation der Endozytose und zur Regulation von Überlebensfaktoren und proapoptotischen Genen sein.

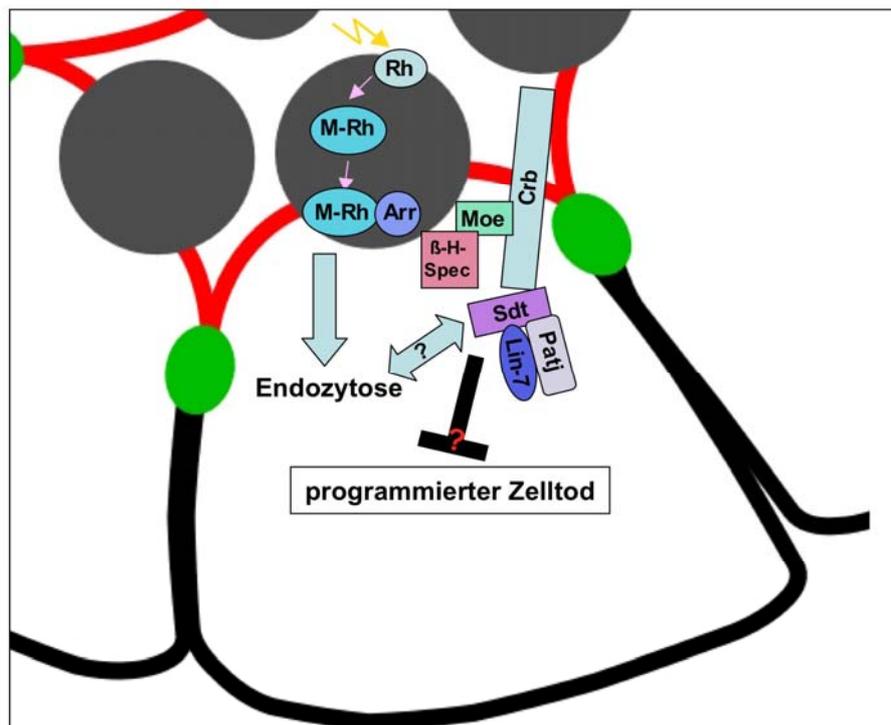


Abb. 4.2 Modell zur möglichen Funktion von Sdt in den Photorezeptorzellen von *Drosophila*.

In der schematischen Darstellung einer Photorezeptorzelle lokalisiert Sdt mit den Proteinen des Crb Komplexes (Crb, DPatj, DLin7) am apikalen Rhabdomerstielfortsatz (rote Linie) benachbart zur *Zonula adherens* (grün). Crb ist über die Bindung an Moesin (Moe) mit dem Spektrinzytoskelett (β -H-Spec) verbunden. Durch Lichteinfall (gelber Blitz) wird das photosensitive Rhodopsin1 (Rh) im Rhabdomer (dunkelgrau) aktiviert (M-Rh). Zur Inaktivierung bindet es an Arrestin2 (Arr), wodurch das M-Rh über Endozytose aufgenommen und zurück in das Rhabdomer transportiert wird. Der Verlust von Sdt führt zu lichtinduziertem Zelltod. Durch Reduktion der Rhodopsinmenge kann die lichtinduzierte Degeneration verhindert werden, was auf die Bildung von möglichen stabilen Arrestin2-Rhodopsin Komplexen deutet (Alloway et al., 2000). Dies lässt auf einen Einfluss von Sdt auf die Endozytose schließen, ähnlich wie es für mutante Crb Augen postuliert wurde (Johnson et al., 2002) (s. Text für detailliertere Erklärungen).

4.5 Welchen Einfluss besitzt das Pigment auf die lichtinduzierte Degeneration?

Die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen zur lichtabhängigen Degeneration sind nahezu alle in einem pigmentlosen (*w⁻* mutanten) Hintergrund durchgeführt worden, was der Unterscheidung zwischen homozygot-mutanten und wildtypischen Augenklonen diene. Es sind sowohl kleine als auch große homozygot mutante *sdt* Augen durch FLP/FRT induzierte mitotische Rekombination erzeugt worden (s.: 2.4.5). Während in den kleinen Augenklonen von *sdt^{K70}* nach 7 Tagen Dauerlicht starke Degenerationserscheinungen auftreten (s.: 3.2.5), tritt in den mutanten großen Klone kaum Degeneration auf (eigene Beobachtung). Die morphologischen Defekte sind von diesen Unterschieden nicht betroffen. Die erzeugten großen *sdt* mutanten Augenklone besitzen (aufgrund von genetischen Faktoren im Hintergrund) noch rotes Pigment in den Pigmentzellen der mutanten Augenklone. Durch Reduktion des Pigments (andere GAL4-Treiber, Balancer), kann unter gleichen Lichtbedingungen eine leichte Degeneration beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Aufgrund des genetischen Hintergrundes dieser Transgene können jedoch keine pigmentlosen mutanten Augen erzeugt werden. Das heißt, bei den hier verwendeten Lichtbedingungen reicht das vorhandene Pigment aus, um den lichtinduzierten Degenerationsphänotyp zu unterdrücken. Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass die Mutation in *white* Gen einen Einfluss auf die Degeneration besitzt. Das *white* Gen kodiert für einen ABCG-Transporter, der die Pigmentvorläufer in die Photorezeptorzellen transportiert (Schmitz et al., 2001). Das Pigment in den Pigmentzellen besitzt eine lichtabschirmende Funktion (sheilding pigment), indem es die einzelnen Ommatidien voneinander isoliert.

Dafür, dass das schützende Pigment der variable Faktor in der lichtinduzierten Degeneration ist, spricht die Tatsache, dass die Intensität des Lichtes und die Belichtungsdauer (und auch die Temperatur) entscheidende Faktoren in der lichtinduzierten Degeneration sind (Lee und Montell, 2004). Beides würde die auf die Photorezeptorzellen einwirkende Lichtmenge variieren, wodurch sich die Stärke der Degeneration verändert. Das könnte bedeuten, dass für Augen, die noch Pigmente tragen, andere Lichtbedingungen zur lichtinduzierten Degeneration führen, als in nicht pigmentierten Augen. Damit sind Defekte in unterschiedlich pigmentierten Augen nicht miteinander vergleichbar, obwohl sie unter gleichen experimentellen Bedingungen erzeugt wurden. Grundsätzlich kann die lichtinduzierte Degeneration in pigmentierten Augen nicht verhindert werden, was in Experimenten mit pigmentierten *crb* mutanten Augen und durch RNAi erzeugte *Lin-7* mutante Augen gezeigt werden konnte (K. Johnson, A. Bachmann, persönl. Mitteilung).

Diese Beobachtungen sind insbesondere für die *sdt* Allele, die noch das w^+ Gen tragen und somit Pigmente exprimieren, von Bedeutung. Zwei der Klasse I Allele, *sdt*^{XN05} und *sdt*^{G463}, tragen noch ein wildtypisches w Gen und wurden somit im pigmentierten Hintergrund analysiert. Es konnten weder morphologische Defekte, noch ein lichtinduzierter Degenerationsphänotyp beobachtet werden. Für diese zwei Allele kann nicht ausgeschlossen werden, dass sie im w^- mutanten Hintergrund doch Anzeichen von Degeneration zeigen und somit in Klasse III umgruppiert werden müssten. Aus diesem Grund ist die Mutation von *sdt*^{XN05} auch nicht in die weiteren Funktionsanalysen miteinbezogen worden, um keine falschen Schlussfolgerungen zu ziehen.

Ein Problem stellt diese Beobachtung für weitere Analysen dar, die speziell die Rettung des *sdt* mutanten Degenerationsphänotyps betreffen (z. B. *p35* Überexpression, *norpA*). Viele der vorhandenen und bisher verwendeten Transgene der mutierten oder überexprimierten Gene tragen ein w^+ Gen. Wenn aber das Pigment alleine schon ausreichend ist, um den lichtinduzierten Degenerationsphänotyp abzuschwächen, ist es schwierig bzw. unmöglich, Rückschlüsse auf mögliche Funktionen zu ziehen. Bei einigen dieser Allele ist es möglich, die Mutation in einen w^- mutanten Hintergrund zu bringen, bei anderen z. B. P-Element Insertionen ist dies aus genetischen Gründen nicht möglich, da die Transgene das *white*⁺-Gen tragen.

4.6 Crb Homologe im Auge von Vertebraten

Das humane *CRUMBS1 homolog (CRB1)* wurde als eines von verschiedenen mutanten Genen identifiziert, die im Menschen eine progressive, degenerative Augenkrankheit (Dystrophie) auslösen können (den Hollander et al., 2001b; den Hollander et al., 1999). Dabei konnten unterschiedlich starke Krankheitsbilder für verschiedene *CRB1* Mutationen identifiziert werden. Diese können zu einer Erblindung innerhalb der ersten dreißig Lebensjahre bei der sog. Retinitis pigmentosa 12 (RP12) führen, während das stärkste Krankheitsbild bereits innerhalb des ersten Lebensjahres zur vollständigen Erblindung führt (Leber congenital amaurosis (LCA)). Dabei korrelieren Deletionen und *nonsense* Mutationen, die zu vorzeitigen Stoppkodons führen, mit LCA, wohingegen *missense* Mutationen häufiger mit RP12 assoziiert sind (Cremers et al., 2002; den Hollander et al., 2001a; Lotery et al., 2001). Es konnten drei verschiedene *CRB* Gene (1, 2, 3) im Menschen und der Maus identifiziert werden, deren zytoplasmatische Domänen stark konserviert sind, die sich aber in ihren

extrazellulären Domänen unterscheiden (den Hollander et al., 1999; Katoh und Katoh, 2004; Makarova et al., 2003; Pellikka et al., 2002).

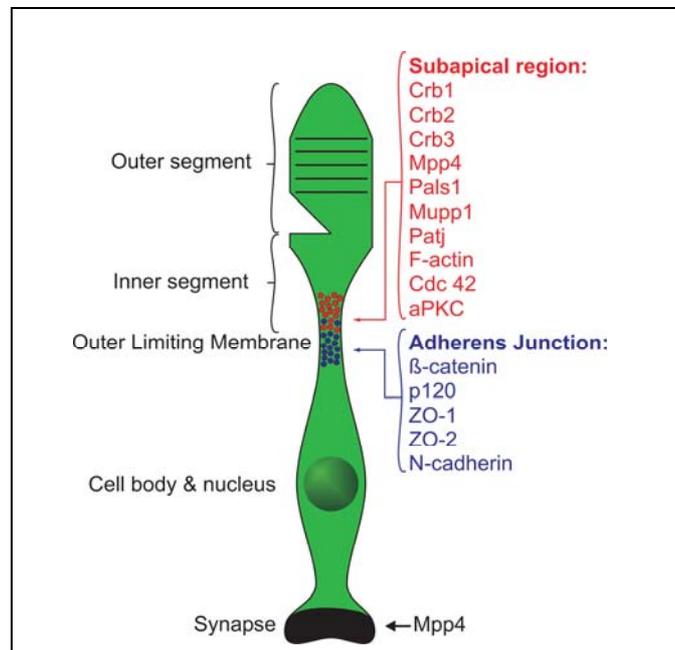


Abb. 4.3 Schematische Darstellung einer Säuger Photorezeptorzelle (entnommen aus: van de Pavert et al., 2004).

Die Proteine des CRB1 Komplexes lokalisieren an der äußeren "Limiting" Membran (s. Text für Details).

Die Photorezeptoren in der Retina der Säuger lassen sich in zwei Klassen unterteilen, die Zäpfchen (Farbsehen) und Stäbchen (Hell-Dunkel Sehen). Beide besitzen Synapsen, die sie mit den neuronalen Zellen verbinden, einen Zellkörper, indem sich der Zellkern befindet, ein inneres und ein äußeres Segment (Abb. 4.3). Das äußere Segment beinhaltet das licht-sensitive Rhodopsin in den Stäbchen und die verschiedenen Opsine in den Zäpfchen. Alle drei CRB Proteine (1, 2, 3) lokalisieren an der äußeren "limiting Membran" des inneren Segmentes ("Gürtel"), die benachbart zu den *Adherens junctions* liegen (Abb. 4.3) (van de Pavert et al., 2004). Diese Lokalisation ist vergleichbar mit der von *Drosophila* Crb im Rhabdomerstiel. CRB1 und CRB3 liegen in der Retina in einem Komplex mit Komponenten vor, die aus dem *Drosophila* Crb-Komplex bekannt sind: Pals-1 oder MPP-5 (Protein associated with Lin7, homolog zu Sdt), Patj (Pals1 associated tight junction protein, homolog zu DPatj) sowie weiteren MAGUK-Proteinen (MUPP1) (van de Pavert et al., 2004). Dieser Komplex ist in Säugern konserviert und findet sich auch in den TJs von polarisierten Epithelzellen (MDCK-Zellen), in denen jedoch nur CRB3 lokalisiert ist, aber kein CRB1 (Hurd et al., 2003; Lemmers et al., 2002; Makarova et al., 2003; Roh et al., 2002). Crb3 unterscheidet sich von

CRB1 vor allem in seiner kleineren und völlig anderen extrazellulären Domäne (Makarova et al., 2003)

Die Analyse von homozygot mutanten *CRB1* Augen in der Maus zeigte, dass CRB1 eine zentrale Rolle in dem subapikalen Komplex in der Retina besitzt. Das Fehlen von CRB1 führt zu einem Verlust der Zellpolarität und zu lichtinduzierter Degeneration (van de Pavert et al., 2004). Dabei zeigt sich, dass CRB1 während der Lichtinkubation für den Erhalt der einschichtigen Photorezeptorschicht verantwortlich ist, jedoch keine Rolle bei der Etablierung der subapikalen Region und der ZAs spielt.

Im Gegensatz zu *Drosophila* bleiben die interagierenden Proteine von CRB1 weiterhin apikal lokalisiert (van de Pavert et al., 2004). Während *Drosophila* Crb eine regulatorische Funktion in der Ausbildung der Länge des Rhabdomerstiels zugeordnet werden konnte (Pellikka et al., 2002), besitzt CRB1 eine derartige Funktion in dem inneren Segment der Retina der Maus nicht, da keine derartige Verkürzung beobachtet wurde (van de Pavert et al., 2004). Der Verlust von Zellpolarität und Adhäsion in *CRB1* mutanten Augen ist transient, da sich neue Photorezeptorschichten bilden können (van de Pavert et al., 2004), was in *Drosophila* Photorezeptorzellen nicht geschieht.

Obwohl es eine Reihe von funktionellen Gemeinsamkeiten zwischen *Drosophila* und Säugern gibt, zeigen diese Ergebnisse jedoch viele Unterschiede zwischen Crb und CRB1 auf. Dennoch weist das *Drosophila* Modell mit seinen vielfältigen genetischen Möglichkeiten gerade bei der Aufdeckung der zugrunde liegenden Mechanismen für die lichtinduzierte Degeneration, vielfältige Vorteile gegenüber dem Mausmodell auf.

4.7 MPP5: ein Sdt Homolog in Säugern

In Säugern konnten bisher sieben verschiedene *membrane palmitoylated Proteine* (MPP) identifiziert werden, die große Sequenzhomologien zu *Drosophila* Sdt besitzen. Sie gehören zu der MAGUK Familie und zwei von ihnen, MPP5 und MPP4, zeigen eine Expression in der Retina (Stöhr et al., 2005; Stöhr et al., 2001; van de Pavert et al., 2004).

MPP5 wurde zuerst in Säugern als Pals-1 (*protein associated with mammalian homologs of lin7-1*) identifiziert (Kamberov et al., 2000) und weist die zu Sdt größten Homologien auf. Es konnte gezeigt werden, dass MPP5 (Pals1) mit CRB1 sowohl in Epithelzellen von Säugern (Lemmers et al., 2004; Roh et al., 2002), als auch in der Retina (Mensch und Maus) kolokalisiert und interagiert (van de Pavert et al., 2004). Außerdem konnte eine direkte Interaktion mit Lin-7 und Par-6 nachgewiesen werden (Hurd et al., 2003; Stöhr et al., 2005). Eine funktionelle Bedeutung von Pals-1 konnte in Zellkultur (MDCKII Zellen) gezeigt

werden (Straight et al., 2004). Dort zeigt der Verlust von PALS-1, der in einem Komplex mit CRB-3 und PATJ vorliegt, Defekte in der Polarisierung. Diese Defekte führen die Autoren auf den Verlust von aPKC an den *Tight junctions* zurück.

Humanes MPP4 wird in der Retina und im Gehirn exprimiert (Conte et al., 2002; Stöhr et al., 2005; Stöhr et al., 2001), jedoch kolokalisiert es dort nicht mit CRB1 in der subapikalen Region, sondern u. a. in der Synapse der Photorezeptorzellen (van de Pavert et al., 2004), wo es mit Veli3, einem Vertebraten Homolog zu Lin-7, interagiert (Stöhr et al., 2005). Es konnte gezeigt werden, dass die chromosomale Lokalisation von *MPP4* mit einem Locus assoziiert ist, der für Retinitis pigmentosa 26 kartiert wurde (Conte et al., 2002; Stöhr et al., 2001). Bisher konnte jedoch noch keine Mutation innerhalb des *MPP4* Gens identifiziert werden.

4.8 Ausblick

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente führten zur Aufklärung des Sdt Phänotyps im adulten Komplexauge. Die Funktion und der Zusammenhang zwischen Sdt, der lichtinduzierten Degeneration und der Erhaltung der Morphologie sind noch unklar und werfen zudem neue Fragestellungen auf.

Als eines der nächsten Ziele sollte das Allel *sdt*^{N5} molekular auf seine Mutation charakterisiert werden. Dies sollte Aufschluss auf die Domänen geben, die für die Unterdrückung der lichtabhängigen Degeneration verantwortlich sind. Des Weiteren müssten die begonnenen RT-PCR Analysen mit den noch ausstehenden Primern abgeschlossen werden. Dadurch sollten eindeutige Belege auf die im Kopf vorhandenen *sdt* Spleiss-Varianten gewonnen werden. Um diese Ergebnisse zu verifizieren und auch eine funktionelle Bedeutung der Isoformen zu zeigen, könnten RNAi Experimente mit den spezifischen Regionen der neuen Isoformen durchgeführt werden. Außerdem könnten diese Isoformen spezifisch im mutanten *sdt* Auge exprimiert werden und somit getestet werden, ob sie die durch *sdt* erzeugten Defekte aufheben können.

Eine Struktur/Funktionsanalyse von Sdt, bei der verschiedene Domänen des Proteins deletiert und dann im Embryo und Auge überexprimiert werden, ist bereits Thema von zwei weiteren Doktorarbeiten im Labor von Prof. Knust (Ö. Kempkens, N. Bulgakova). Mit Hilfe dieser Funktionsanalyse sollte es möglich sein, die Regionen des Proteins zu ermitteln, die für die verschiedenen Funktionen essentiell sind. Die so gewonnenen Erkenntnisse könnten überprüft

werden, indem getestet wird, ob die einzelnen Konstrukte die Defekte in den *sdt* homozygoten Embryonen oder Augen aufheben können.

Ein weiteres großes Projekt ist die Aufklärung (oder zumindest Einsicht) in die Verbindung von Sdt zur Apoptose. Es müsste für *sdt* mutante Augen gezeigt werden, dass die Endozytose ursächlich mit dem Degenerationsphänotyp verknüpft ist (Testen verschiedener Mutationen, die die Endozytose unterbrechen, z. B. durch eine Mutation (*sh^{ts}*) in Dynamin). Außerdem sollte nachgewiesen werden, dass die lichtabhängige Degeneration über die stabilen Rh1/Arr2 Komplexe induziert wird (direkter Nachweis der Komplexe oder Aufheben der Degeneration durch Verlust einer der Komponenten, wie Rh1, Arr2).

Ferner müsste geklärt werden, welchen Einfluss das Pigment auf die lichtinduzierte Degeneration hat. Dies ist bereits Thema weiterer Untersuchungen von Dr. M. Richard in unserem Labor.

Das Sdt Protein kann durch seine vielfältigen Protein-Protein Interaktionsdomänen eine ganze Reihe anderer Proteine binden, die dadurch in einem Multifunktionskomplex lokalisiert werden. Diese vielfältigen Proteine können an unterschiedlichen Mechanismen oder Kaskaden beteiligt sein. Der Verlust von Sdt führt somit zu einer Delokalisation von verschiedenen Faktoren. Daher muss Sdt nicht an all diesen Prozessen aktiv beteiligt sein, sondern seine jeweiligen Bindungspartner stellen den Bezug zu dem einen oder anderen Protein bzw. Kaskade dar. Aus diesem Grund ist auch eine Identifizierung und Analyse weiterer Komponenten des Sdt-Crb Komplexes bzw. der damit interagierenden Kaskaden von großer Bedeutung, da damit ein Einblick in die funktionellen Zusammenhänge gewonnen werden könnte.

5 Zusammenfassung

Das zur Familie der MAGUK Proteine gehörende Stardust von *Drosophila* ist als direkter Bindungspartner des Transmembranproteins Crumbs (Crb) identifiziert worden. Der Komplex besitzt eine essentielle Funktion in der Aufrechterhaltung der Zellpolarität in vielen vom Ektoderm abstammenden Epithelien im Embryo. Für Crb ist außerdem gezeigt worden, dass es neben einer Rolle im Embryo auch eine essentielle Funktion im Auge besitzt. Crb ist dabei an der korrekten Ausbildung der Rhabdomere der Photorezeptoren, dem Aufbau der *Adherens Junctions*, der Entwicklung des Rhabdomerstiels und der Unterdrückung von lichtinduziertem programmierten Zelltod beteiligt. Mutationen in *CRB1*, dem menschlichen Homolog des *Drosophila* Gens *Crumbs*, konnten mit den degenerativen Augenkrankheiten Retinitis Pigmentosa 12 und Leber Congenital Amaurosis assoziiert werden. Kürzlich konnte außerdem gezeigt werden, dass *CRB1* knock out Mäuse retinale Degeneration aufweisen, die sich bei anhaltender Belichtung verstärken.

Um Einblick in die Funktion von Sdt im Komplexauge von *Drosophila* zu erhalten, wurden zwölf verschiedene, EMS induzierte *sdt* Allele ausgewählt. Alle untersuchten *sdt* Allele zeigten in homozygot mutanten Embryonen einen typischen *sdt* Kutikulaphänotyp und den Verlust von Sdt Protein. Die in *sdt* mutanten Augen beobachteten Phänotypen lassen sich, in Abhängigkeit vom Allel, in vier Klassen einteilen. Klasse I Allele wiesen keine identifizierbaren morphologischen Veränderungen auf. Klasse II Allele wiesen einen *crb*-ähnlichen morphologischen Phänotyp auf. Klasse III Allele wiesen lichtinduzierbare Degeneration auf. Klasse IV Allele wiesen einen *crb*-ähnlichen morphologischen Phänotyp und lichtinduzierbare Degeneration auf. In Ommatidien der Klasse II- und IV-Allele ließ sich kein Sdt Protein mehr nachweisen. Zwei Allele der Klasse IV weisen Punktmutationen auf, die zu frühzeitigen Stop Codonen und damit zur Verkürzung des jeweiligen Proteins führten.

Es konnten bisher drei verschiedene Sdt Isoformen im Embryo identifiziert werden. Aus der Analyse von embryonalen und kopfspezifischen EST-Klonen sowie vergleichender Northern Blot Analyse in dieser Arbeit ergaben sich mindestens 2 weitere *sdt* Transkripte, die durch gewebe-spezifisches Spleissen entstehen. Dazu passt, dass man mit der Northern Blot Analyse zwei zusätzliche Transkripte im Kopf von adulten *Drosophilas* nachweisen konnte. Außerdem wurde ein kopfspezifisches Transkript (*sdt-i*) mittels RT-PCR identifiziert. Die gewebespezifische Expression von *sdt* Transkripten könnte die Unterschiede zwischen den *sdt* Phänotypen im Auge und in den Embryonen erklären.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass *sdt* essentiell für die Erhaltung der Morphologie und das Überleben der Photorezeptorzellen im Licht ist. Inwieweit Mutationen im humanen *sdt* Homolog MPP5 mit degenerativen Augenkrankheiten (wie Retinitis pigmentosa) korreliert werden können, wird zurzeit in anderen Arbeitsgruppen anhand von Sequenzanalysen erkrankter Patienten untersucht.

6 Literatur

- Allison, R. S. H., Mumy, M. L. und Wakefield, L. M. (1998). Translational control elements in the major human transforming growth factor-beta-1 mRNA. *Growth factors*, 89-100.
- Alloway, P. G., Howard, L. und Dolph, P. J. (2000). The formation of stable rhodopsin-arrestin complexes induces apoptosis and photoreceptor cell degeneration. *Neuron* **28**, 129-38.
- Ashburner, M. L. (1989). "Drosophila, A laboratory handbook." New York.
- Bachmann, A. (2000). Die Kontrolle von Morphogenese und Zellpolarität in Epithelien von *Drosophila melanogaster*. In "Institut für Genetik". Heinrich Heine Universität. Inaugural-Dissertation. Düsseldorf.
- Bachmann, A., Schneider, M., Theilenberg, E., Grawe, F. und Knust, E. (2001). Drosophila Stardust is a partner of Crumbs in the control of epithelial cell polarity. *Nature* **414**, 638-643.
- Bachmann, A., Timmer, M., Sierralta, J., Pietrini, G., Gundelfinger, E. D., Knust, E. und Thomas, U. (2004). Cell type-specific recruitment of Drosophila Lin-7 to distinct MAGUK-based protein complexes defines novel roles for Sdt and Dlg-S97. *J Cell Sci* **117**, 1899-909.
- Bilder, D., Li, M. und Perrimon, N. (2000). Cooperative regulation of cell polarity and growth by Drosophila tumor suppressors. *Science* **289**, 113-116.
- Bloomquist, B. T., Shortridge, R. D., Schneuwly, S., Perdew, M., Montell, C., Steller, H., Rubin, G. und Pak, W. L. (1988). Isolation of a putative phospholipase C gene of Drosophila, norpA, and its role in phototransduction. *Cell* **54**, 723-33.
- Brand, A. H. und Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* **118**, 401-15.
- Bryant, P. J. (1997). Junction genetics. *Dev Genet* **20**, 75-90.
- Cagan, R. L. und Ready, D. F. (1989). The emergence of order in the Drosophila pupal retina. *Dev Biol* **136**, 346-62.
- Caruana, G. (2002). Genetic studies define MAGUK proteins as regulators of epithelial cell polarity. *Int. J. Dev. Biol.* **46**, 511-518.
- Chishti, A. H., Kim, A. C., Marfatia, S. M., Lutchman, M., Hanspal, M., Jindal, H., Liu, S. C., Low, P. S., Rouleau, G. A., Mohandas, N., Chasis, J. A., Conboy, J. G., Gascard, P., Takakuwa, Y., Huang, S. C., Benz, E. J., Jr., Bretscher, A., Fehon, R. G., Gusella, J. F., Ramesh, V., Solomon, F., Marchesi, V. T., Tsukita, S., Hoover, K. B. und et al. (1998). The FERM domain: a unique module involved in the linkage of cytoplasmic proteins to the membrane. *Trends Biochem Sci* **23**, 281-2.
- Chou, W. H., Hall, K. J., Wilson, D. B., Wideman, C. L., Townson, S. M., Chadwell, L. V. und Britt, S. G. (1996). Identification of a novel Drosophila opsin reveals specific patterning of the R7 and R8 photoreceptor cells. *Neuron* **17**, 1101-15.
- Conte, I., Lestingi, M., den Hollander, A. I., Miano, M. G., Alfano, G., Circolo, D., Pugliese, M., Testa, F., Simonelli, F., Rinaldi, E., Baiget, M., Banfi, S. und A., C. (2002). Characterization of MPP4, a gene highly expressed in photoreceptor cells, and mutation analysis in retinitis pigmentosa. *Gene. Gene.* **297**, 33-38.
- Cook, T. und Desplan, C. (2001). Photoreceptor subtype specification: from flies to humans. *Semin Cell Dev Biol* **12**, 509-18.
- Cremers, F. P., van den Hurk, J. A. und den Hollander, A. I. (2002). Molecular genetics of Leber congenital amaurosis. *Human Mol. Genet.* **11**, 1169-1176.
- den Hollander, A. I., Heckenlively, J. R., van den Born, L. I., de Kok, Y. I., van de Velde-Visser, S. D., Kellner, U., Jurklics, B., van Schooneveld, M. J., Blankenagel, A. und

- Rohrschneider, K. e. a. (2001a). Leber congenital amaurosis and retinitis pigmentosa with coats-like exudative vasculopathy are associated with mutations in the crumbs homologue 1 (Crb1) gene. *Am. J. Hum. Genet.* **69**, 198-203.
- den Hollander, A. I., Johnson, K., de Kok, Y. J., Klebes, A., Brunner, H. G., Knust, E. und Cremers, F. P. (2001b). CRB1 has a cytoplasmic domain that is functionally conserved between human and Drosophila. *Hum Mol Genet* **10**, 2767-2773.
- den Hollander, A. I., ten Brink, J. B., de Kok, Y. J., van Soest, S., van den Born, L. I., van Driel, M. A., van de Pol, D. J., Payne, A. M., Bhattacharya, S. S., Kellner, U., Hoyng, C. B., Westerveld, A., Brunner, H. G., Bleeker-Wagemakers, E. M., Deutman, A. F., Heckenlively, J. R., Cremers, F. P. und Bergen, A. A. (1999). Mutations in a human homologue of Drosophila crumbs cause retinitis pigmentosa (RP12). *Nat Genet* **23**, 217-21.
- Dimitratos, S. D., Woods, D. F., Stathakis, D. G. und Bryant, P. J. (1999). Signaling pathways are focused at specialized regions of the plasma membrane by scaffolding proteins of the MAGUK family. *Bioessays* **21**, 912-21.
- Dubreuil, R. R. und Yu, J. (1994). Ankyrin and β -spectrin accumulate independently of α -spectrin in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 10285-10289.
- Eaton, S. und Simons, K. (1995). Apical, basal, and lateral cues for epithelial polarization. *Cell* **82**, 5-8.
- Eberl, D. F., Perkins, L. A., Engelstein, M., Hilliker, A. J. und Perrimon, N. (1992). Genetic and developmental analysis of polytene section 17 of the X chromosome of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **130**, 569-83.
- Fortini, M. E. und Rubin, G. M. (1990). Analysis of cis-acting requirements of the Rh3 and Rh4 genes reveals a bipartite organization to rhodopsin promoters in *Drosophila melanogaster*. *Genes Dev* **4**, 444-63.
- Gotta, M., Abraham, M. C. und Ahringer, J. (2001). CDC-42 controls early cell polarity and spindle orientation in *C. elegans*. *Curr Biol* **11**, 482-8.
- Grawe, F., Wodarz, A., Lee, B., Knust, E. und Skaer, H. (1996). The *Drosophila* genes crumbs and stardust are involved in the biogenesis of adherens junctions. *Development* **122**, 951-9.
- Gumbiner, B. M. (1993). Breaking through the tight junction barrier [comment]. *J Cell Biol*, 1631-3.
- Hardie, R. (1985). "Functional organization of the fly retina." Springer, New York.
- Hardie, R. C. (2001). Phototransduction in *Drosophila melanogaster*. *J Exp Biol* **204**, 3403-9.
- Harris TJ, P. M. (2004). Adherens junction-dependent and -independent steps in the establishment of epithelial cell polarity in *Drosophila*. *J Cell Biol.* **167(1)**, 135-47.
- Hay, B. A., Wolff, T. und Rubin, G. M. (1994). Expression of baculovirus P35 prevents cell death in *Drosophila*. *Development* **120**, 2121-9.
- Hong, Y., Ackerman, L., Jan, L. Y. und Jan, Y. N. (2003). Distinct roles of Bazooka and Stardust in the specification of *Drosophila* photoreceptor membrane architecture. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 12712-7.
- Hong, Y., Stronach, B., Perrimon, N., Jan, L. Y. und Jan, Y. N. (2001). *Drosophila* Stardust interacts with Crumbs to control polarity of epithelia but not neuroblasts. *Nature* **414**, 634-638.
- Hurd, T. W., Gao, L., Roh, M. H., Macara, I. G. und Margolis, B. (2003). Direct interaction of two polarity complexes implicated in epithelial tight junction assembly. *Nat Cell Biol* **5**, 137-142.
- Izaddoost, S., Nam, S. C., Bhat, M. A., Bellen, H. J. und Choi, K. W. (2002). *Drosophila* Crumbs is a positional cue in photoreceptor adherens junctions and rhabdomeres. *Nature* **416**, 178-83.
- Janning, W. und Knust, E. (2004). "Genetik." Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

- Joberty, G., Petersen, C., Gao, L. und Macara, I. G. (2000). The cell-polarity protein Par6 links Par3 and atypical protein kinase C to Cdc42. *Nat Cell Biol* **2**, 531-9.
- Johnson, K., Grawe, F., Grzeschik, N. und Knust, E. (2002). Drosophila crumbs is required to inhibit light-induced photoreceptor degeneration. *Curr Biol* **12**, 1675.
- Jürgens, G., Wieschaus, E., Nüsslein-Volhard, C. und Kluding, H. (1984). Mutations affecting the pattern of the larval cuticle of *Drosophila melanogaster*. II. Zygotic loci on the third chromosome. *Wilhelm Roux's Arch* **193**, 283-295.
- Kamberov, E., Makarova, O., Roh, M., Liu, A., Karnak, D., Straight, S. und Margolis, B. (2000). Molecular cloning and characterization of Pals, proteins associated with mLin-7. *J Biol Chem* **275**, 11425-31.
- Katoh, M. und Katoh, M. (2004). Identification and characterization of Crumbs homolog 2 gene at human chromosome 9q33.3. *Int J Oncol*. **24**, 743-9.
- Kiselev, A., Socolich, M., Vinos, J., Hardy, R. W., Zuker, C. S. und Ranganathan, R. (2000). A molecular pathway for light-dependent photoreceptor apoptosis in *Drosophila*. *Neuron* **28**, 139-52.
- Knust, E. und Bachmann, A. (2003). Crumbs und Co. Zellpolarität in *Drosophila*. *Zellbiologie aktuell* **29**, 17-20.
- Knust, E., Tepass, U. und Wodarz, A. (1993). crumbs and stardust, two genes of *Drosophila* required for the development of epithelial cell polarity. *Dev Suppl* **1993**, 261-8.
- Kozak, M. (1987). An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Res* **15**, 8125-48.
- Kuchinke, U., Grawe, F. und Knust, E. (1998). Control of spindle orientation in *Drosophila* by the Par-3-related PDZ- domain protein Bazooka. *Curr Biol* **8**, 1357-65.
- Laporte, S. A., Oakley, R. H., Holt, J. A., Barak, L. S. und Caron, M. G. (2000). The Interaction of Arrestin with the AP-2 Adaptor Is Required for the Clustering of 2-Adrenergic Receptor into Clathrin-coated Pits. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* **275**, 23120–23126.
- Larrivee, D. C., Conrad, S. K., Stephenson, R. S. und Pak, W. L. (1981). Mutation that selectively affects rhodopsin concentration in the peripheral photoreceptors of *Drosophila melanogaster*. *J Gen Physiol*. **78**, 521-545.
- Lee, S.-J. und Montell, C. (2004). Suppression of constant-light-induced blindness but not retinal degeneration by inhibition of the rhodopsin degradation pathway. *Curr Biol*. **14**, 2076-85.
- Lemmers, C., Medina, E., Delgrossi, M. H., Michel, D., Arsanto, J. P. und Le Bivic, A. (2002). hINAD1/PATJ, a homolog of discs lost, interacts with crumbs and localizes to tight junctions in human epithelial cells. *J Biol Chem* **277**, 25408-15.
- Lemmers, C., Michel, D., Lane-Guermonprez, L., Delgrossi, M. H., Medina, E., Arsanto, J., P. und Le Bivic, A. (2004). CRB3 binds directly to Par6 and regulates the morphogenesis of the tight junctions in mammalian epithelial cells. *Mol Biol Cell*. **1**, 1324-33.
- Lotery, A. J., Jacobson, S. G., Fishman, G. A., Weleber, R. G., Fulton, A. B., Namperumalsamy, P., Heon, E., Levin, A. V., Grover, S., Rosenow, J. R., Kopp, K. K., Sheffield, V. C. und Stone, E. M. (2001). Mutations in the CRB1 gene cause Leber congenital amaurosis. *Arch Ophthalmol* **119**, 415-20.
- Makarova, O., Roh, M. H., Liu, C. J., Laurinec, S. und Margolis, B. (2003). Mammalian Crumbs3 is a small transmembrane protein linked to protein associated with Lin-7 (Pals1). *Gene* **302**, 21-9.
- Matter, K., Hunziker, W. und Mellman, I. (1992). Basolateral sorting of LDL receptor in MDCK cells: the cytoplasmic domain contains two tyrosine-dependent targeting determinants. *Cell* **71**, 741-53.

- Mays, R. W., Nelson, W. J. und Marris, J. A. (1995). Generation of epithelial cell polarity: roles for protein trafficking, membrane-cytoskeleton, and E-cadherin-mediated cell adhesion. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **60**, 763-73.
- Medina, E., Williams, J., Klipfell, E., Zarnescu, D., Thomas, G. und Le Bivic, A. (2002). Crumbs interacts with moesin and beta(Heavy)-spectrin in the apical membrane skeleton of *Drosophila*. *J Cell Biol* **158**, 941-51.
- Mendoza, C., Olguin, P., Lafferte, G., Thomas, U., Ebitsch, S., Gundelfinger, E. D., Kukuljan, M. und Sierralta, J. (2003). Novel isoforms of Dlg are fundamental for neuronal development in *Drosophila*. *J Neurosci* **23**, 2093-101.
- Meulemann, J., van de Pavert, S. A. und Wijnholds, J. (2004). Crumbs homologue 1 in polarity and blindness. *Biochemical Society Transactions* **32**, 828-830.
- Montell, C., Jones, K., Zuker, C. und Rubin, G. (1987). A second opsin gene expressed in the ultraviolet-sensitive R7 photoreceptor cells of *Drosophila melanogaster*. *J Neurosci* **7**, 1558-66.
- Müller, H. A. und Wieschaus, E. (1996). armadillo, bazooka, and stardust are critical for early stages in formation of the zonula adherens and maintenance of the polarized blastoderm epithelium in *Drosophila*. *J Cell Biol* **134**, 149-63.
- Nelson, W. J. (2003). Adaptation of core mechanisms to generate cell polarity. *Nature* **422**, 766-74.
- Nelson, W. J., Yeaman, C. und Grindstaff, K. K. (2000). "Spatial cues for cellular asymmetry in polarized epithelia." Oxford University Press, Oxford/New York.
- Newsome, T. P., Asling, B. und Dickson, B. J. (2000). Analysis of *Drosophila* photoreceptor axon guidance in eye-specific mosaics. *Development* **127**, 851-60.
- Nichols, R. und Pak, W. L. (1985). Characterization of *Drosophila melanogaster* rhodopsin. *J Biol Chem* **260**, 12670-4.
- Nüsslein-Volhard, C., Wieschaus, E. und Kluding, H. (1984). Mutations affecting the pattern of the larval cuticle in *Drosophila melanogaster*. I. Zygotic loci on the second chromosome. *Wilhelm Roux's Arch* **193**, 267-282.
- Orem, N. R. und Dolph, P. J. (2002). Epitope masking of rhabdomeric rhodopsin during endocytosis-induced retinal degeneration. *Mol Vis* **8**, 455-61.
- Pellikka, M., Tanentzapf, G., Pinto, M., Smith, C., McGlade, C. J., Ready, D. F. und Tepass, U. (2002). Crumbs, the *Drosophila* homologue of human CRB1/RP12, is essential for photoreceptor morphogenesis. *Nature* **416**, 143-9.
- Petronczki, M. und Knoblich, J. A. (2001). DmPAR-6 directs epithelial polarity and asymmetric cell division of neuroblasts in *Drosophila*. *Nat Cell Biol* **3**, 43-49.
- Pickering, B. M. und Willis, A. E. (2005). The implications of structured 5' untranslated regions on translation and disease. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 39-47.
- Pielage, J., Stork, T., Bunse, I. und Klambt, C. (2003). The *Drosophila* cell survival gene discs lost encodes a cytoplasmic Codanin-1-like protein, not a homolog of tight junction PDZ protein Patj. *Dev Cell* **5**, 841-51.
- Riggleman, B., Schedl, P. und Wieschaus, E. (1990). Spatial expression of the *Drosophila* segment polarity gene armadillo is posttranscriptionally regulated by wingless. *Cell* **63**, 549-60.
- Rodriguez-Boulan, E. und Nelson, W. J. (1989). Morphogenesis of the polarized epithelial cell phenotype. *Science* **245**, 718-25.
- Roh, M. H., Makarova, O., Liu, C. J., Shin, K., Lee, S., Laurinec, S., Goyal, M., Wiggins, R. und Margolis, B. (2002). The Maguk protein, Pals1, functions as an adapter, linking mammalian homologues of Crumbs and Discs Lost. *J Cell Biol* **157**, 161-72.
- Rubin, G. M. (1989). Development of the *Drosophila* retina: inductive events studied at single cell resolution. *Cell* **57**, 519-20.

- Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989). "Molecular cloning. A laboratory manual." Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Schmitz, G., Langmann, T. und Heimerl, S. (2001). Role of ABCG1 and other ABCG family members in lipid metabolism. *Journal of Lipid Research* **42**, 1513-1520.
- Schneider, M. (1996). Molekulare und genetische Charakterisierung des Gens *stardust* von *Drosophila melanogaster*. In "Institut für Entwicklungsbiologie". Universität zu Köln. Inaugural-Dissertation. Köln.
- Sierralta, J. und Mendoza, C. (2004). PDZ-containing proteins: alternative splicing as a source of functional diversity. *Brain Res Brain Res Rev* **47**, 105-15.
- Skaer, H. B., Maddrell, S. H. und Harrison, J. B. (1987). The permeability properties of septate junctions in Malpighian tubules of *Rhodnius*. *J Cell Sci* **88**, 251-65.
- Smith, D. B. und Johnson, K. S. (1988). Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* **67**, 31-40.
- Steele, F. und O'Tousa, J. E. (1990). Rhodopsin activation causes retinal degeneration in *Drosophila* *rdgC* mutant. *Neuron* **4**, 883-890.
- Stöhr, H., Molday, L. L., Molday, R. S., Weber, B. H., Biedermann, B., Reichenbach, A. und Kramer, F. (2005). Membrane-associated guanylate kinase proteins MPP4 and MPP5 associate with Veli3 at distinct intercellular junctions of the neurosensory retina. *J Comp Neurol.* **481**, 31-41.
- Stöhr, H., Stojic, J. und Weber, B. (2001). Cellular localization of the MPP4 protein in the mammalian retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* **44**, 5067-74.
- Straight, S. W., Shin, K., Fogg, V. C., Fan, S., Liu, C.-J., Roh, M. und Margolis, B. (2004). Loss of PALS1 Expression Leads to Tight Junction and Polarity Defects. *Molecular Biology of the Cell* **15**, 1981-1990.
- Tepass, U. (1996). Crumbs, a component of the apical membrane, is required for zonula adherens formation in primary epithelia of *Drosophila*. *Dev Biol* **177**, 217-25.
- Tepass, U. (1997). Epithelial differentiation in *Drosophila*. *Bioessays* **19**, 673-82.
- Tepass, U. (2002). Adherens junctions: new insight into assembly, modulation and function. *Bioessays* **24**, 690-5.
- Tepass, U., Gruszynski, D. E., Haag, T. A., Omatyar, L., Török, T. und Hartenstein, V. (1996). *shotgun* encodes *Drosophila* E-cadherin and is preferentially required during cell rearrangement in the neuroectoderm and other morphogenetically active epithelia. *Genes Dev* **10**, 672-85.
- Tepass, U. und Knust, E. (1990). Phenotypic and developmental analysis of mutations at the crumbs locus, a gene required for the development of epithelia in *Drosophila melanogaster*. *Roux's Arch Dev Biol* **199**, 189-206.
- Tepass, U., Tanentzapf, G., Ward, R. und Fehon, R. (2001). Epithelial cell polarity and cell junctions in *Drosophila*. *Annu Rev Genet* **35**, 747-84.
- Tepass, U., Theres, C. und Knust, E. (1990). *crumbs* encodes an EGF-like protein expressed on apical membranes of *Drosophila* epithelial cells and required for organization of epithelia. *Cell* **61**, 787-99.
- Thomas, U., Kim, E., Kuhlendahl, S., Koh, Y.-H., Gundelfinger, E. D., Sheng, M., Garner, C. C. und Budnik, V. (1997). Synaptic clustering of the cell adhesion molecule fasciclin II by discs-large and its role in the regulation of presynaptic structure. *Neuron* **19**, 787-799.
- van de Pavert, S. A., Kantardzhieva, A., Malysheva, A., Meuleman, J., Versteeg, I., Levelt, C., Klooster, J., Geiger, S., Seeliger, M. W., Rashbass, P., Le Bivic, A. und Wijnholds, J. (2004). Crumbs homologue 1 is required for maintenance of photoreceptor cell polarization and adhesion during light exposure. *Journal of Cell Science* **117**, 4169-4177.

- Wang, Q., Hurd, T. W. und Margolis, B. (2004). Tight junction protein Par6 interacts with an evolutionarily conserved region in the amino terminus of PALS1/stardust. *J Biol Chem* **279**, 30715-21.
- Wieschaus, E. und Nüsslein-Volhard, C. (1986). Looking at embryos. In "*Drosophila*, a practical approach" (D. B. Roberts, Ed.), pp. 199-227. IRL Press, Oxford.
- Wieschaus, E., Nüsslein-Volhard, C. und Jürgens, G. (1984). Mutations affecting the pattern of the larval cuticle in *Drosophila melanogaster*. III. Zygotic loci on the X chromosome and fourth chromosome. *Wilhelm Roux's Arch* **193**, 296-307.
- Wodarz, A., Hinz, U., Engelbert, M. und Knust, E. (1995). Expression of Crumbs confers apical character on plasma membrane domains of ectodermal epithelia of *Drosophila*. *Cell* **82**, 67-76.
- Wolff, T. und Ready, D. F. (1991). The beginning of pattern formation in the *Drosophila* compound eye: the morphogenetic furrow and the second mitotic wave. *Development* **113**, 841-50.
- Wolff, T. und Ready, D. F. (1993). "The Development of *Drosophila melanogaster*." Cold Spring Harbor Laboratory Press,
- Woods, D. F. und Bryant, P. J. (1989). Molecular cloning of the lethal(1)discs large-1 oncogene of *Drosophila*. *Dev Biol* **134**, 222-35.
- Xu, T. und Rubin, G. M. (1993). Analysis of genetic mosaics in developing and adult *Drosophila* tissues. *Development* **117**, 1223-37.
- Yeaman, C., Grindstaff, K. K. und Nelson, W. J. (1999). New perspectives on mechanisms involved in generating epithelial cell polarity. *Physiol Rev* **79**, 73-98.

7 Anhang

7.1 Abkürzungen

Abkürzung	Bedeutung	Abkürzung	Bedeutung
α	anti-		
μ	Mikro...(10 ⁻⁶)	mRNA	Messenger-RNA
Abb.	Abbildung	n...	nano...(10 ⁻⁹)
Ähnl.	Ähnlich	NGS	Natives Ziegenserum
AP	Alkalische Phosphatase	OD	Optische Dichte
Bal.	Balancer Chromosom	PBS	phosphatgepufferte NaCl Lösung
Bzw.	beziehungsweise	pBSc	Bluescript Vektor
cDNA	kodierende DNA	PCR	Polymerase Kettenreaktion
EMS	Ethylmethansulofonat	PRZ	Photorezeptorzellen
EST	Exprimierte Sequenz Tags	rpm	Rounds per minute
Ex	Extinktion bei xx nm wellenlänge	RT	Raumtemperatur
GST	Glutathion-S-Transferase	RT-PCR	Reverse Transkription-Polymerase Kettenreaktion
h	Stunden	s. o.	siehe oben
HRP	Meerrettich-Peroxidase	Tab.	Tabelle
kb	Kilo-Basenpaare	U	Unit
kDa	Kilo-Dalton	ü. N.	über Nacht
Konz.	konzentriert	z. B.	zum Beispiel
LB-Medium	Luria Bertani Broth-Medium		
Lsg.	Lösung		
M	Molarität		
m...	Milli...(10 ⁻³)		
MCS	Multi-cloning-site		
min	Minuten		

7.2 RT-PCR-Sequenzen

7.2.1 *sdt-i* (2.902 bp)

ACCTCGAGAGGGAAAGACGCAGAAAAAGTGAGAAAGGGCGACAGAGATCGAAC
GGATTACAGATATGCGCATCCTAAAGCAATGGAATCGCCGGCGCTCCGGATCGAG
CATTGTTGTGCTGGATGGCGACGATTTGAAGCCATGTCTGCCGGATGACTACATA
AGCGGTCAGCATCATTTGAACCACCAGCAGCAGCTGCAACTGCAGCAGCAGCTGC
AGCAGCAACATCCGCTCCAGCAGCAACACTATCGCACGCACTCGGGCGACATCA
GGGAGATTGACCAGGAAATGTTGACCATGTTGTCCGTGAACCAAGATAACGGTCC
ACACCGTGAGATGGCCGTCGATTGTCCGGACACGTTTCATCGCACGCAACAAGACG
CCACCCCGATATCCGCCACCCCGTCCACCACAGCTCAATGGGAATGCGAAGCCCG
TACCGCCGCCACGTGATCATCTGCGGGTGGAGAAGGATGGTCGGCTGGTCAATTG
CTCACCCGCACCACAGCTGCCGGATCGCAGGGCGCCGGGAAATGCGAGCAGCGG
CAGCAGCGGCGCCACAACGCATCCGCTGCAGCATCAGCAGATCGCCAGATTGTT
GAGCCACATTGGAGCAGCTGGACAGCATCAAGAAATACCAGGAGCAACTGCGC
CGACGACGCGAGAAGGAGGAGCGCATAGCGCAGCAAAATGAATTCCTGCGGAAC
AGTCTTCGTGGCTCCAGGAAGCTGAAGGCGCTTCAGGATACGGCTACGCCCGGTA
AAGCGGTTGCCAGCAGCAGCAGCGGGCAACGCTGGCCACCCAGGTGGTTGGCG
TGGAGAATGAGGCATATCTGCCCCGACGAAGACCAGCCGCAGGCGGAACAGATCG
ATGGCTATGGCGAACTGATAGCGGCCCTTACCCGCCTGCAAACCAGCTGAGCAA
GAGCGGACTGAGCACGCTGGCGGGTCGCGTTTCGGCCGCCACAGTGTCTGGCC
AGCGCCAGTGTGGCCCATGTCTGGCCGCTCGCACCCGAGTACTGCAGCGACGAC
GTTCCCGCGTCTCTGGTCCACTGCATCACAGTTCCTCGGATTGCAGAAGGACATT
GTGGAGCTGCTAACGCAATCGAATACGGCGGGCGGCCATCGAGCTGGGCAACCTG
CTGACCAGCCATGAAATGGAGGGTCTGCTACTGGCCCACGATCGCATTGCCAATC
ACACGGATGGCACGCCCTCGCCAACGCCACGCCACTCCGGCAATTGGAGCGGC
GACGGGATCGACACTCAGCAGTCCGGTGGCTGGACCCAAGAGAAATCTAGGTAT
GGTGGTGCCACCGCCCGTGGTACCACCGCCACTGGCGCAACGCGGAGCAATGCC
ACTGCCTCGCGGGGAGTCGCCACCGCCGGTTCCCATGCCACCCTGGCTACAATG
CCCATGTCCATGCCCGTTAATCTGCCGATGAGTGCGTGCTTTGGCACGCTAGACG
ATCAGAACGACAACATTCGTATCATCCAGATCGAGAAGTCAACGGAGCCGCTGG
GCGCCACAGTGCGCAACGAGGGTGGAGGCGGTGGTTCATCGGTAGGATTGTGCGTG
GTGGAGCGGCGGAGAAGTCCGGACTGTTGCACGAAGGTGATGAGATACTGGAGG
TCAACGGTCAGGAGTTGCGTGGCAAGACGGTGAACGAAGTGTGCGCCCTGTTGG
GCGCCATGCAAGGCACCCTGACCTTCCTGATCGTCCAGCGGGTAGTCCACCGTC
CGTCGGCGTGATGGGCGGAACAACGGGCAGTCAACTGGCCGGGTTGGGTGGAGC
ACATCGTGACACCGCCGTGTTGCACGTACGGGCGCATTTCGACTACGATCCAGAG
GACGATCTGTATATAACCCTGCCGGGAGCTGGGCATCAGCTTCCAGAAGGGCGATG
TACTGCACGTGATTAGCCGCGAGGATCCCAACTGGTGGCAGGCGTATCGCGAGGG
CGAGGAGGACCAGACGCTGGCCGGTCTTATTCCCTAGTCAGTCGTTCCAGCATCAG
CGCGAGACCATGAAGCTGGCCATTGCGGAGGAGGCGGGTCTGGCGCGATCCCGC
GGTAAGGACGGATCGGGCAGCAAAGGAGCCACGCTCCTGTGTGCGCGCAAGGGT
CGAAAAAGAAGAAGAAGGCCAGCTCCGAGGCGGGATATCCTTTATACGCCACC
ACGGCGCCGGATGAAACGGATCCGGAGGAGATACTCACCTACGAGGAGGTGGCC
TTGTACTATCCCCGCGCTACCCACAAGCGGCCCATCGTCCTCATCGGCCCGCCCA
ACATTGGAAGACATGAGTTGCGCCAACGTCTGATGGCCGACTCGGAGCGTTTCTC
CGCCGCAGTGCCACACACATCACGAGCCCGCAGGGAGGGCGAAGTGCCCGGAGT
GGACTACCACTTCATCACGCGACAGGCCTTTGAGGCGGATATTTTGGCGCGCCGC
TTTGTGGAGCACGGTGAATATGAGAAGGCCTACTACGGCACATCACTGGAGGCCA

TACGCACGGTGGTGGCCAGCGGCAAGATCTGTGTGCTCAACCTGCATCCGCAGAG
CCTTAAGCTGCTGCGCGCCTCTGACCTCAAGCCGTACGTGGTGGTGGCGCCG
CCCAGCTTGGACAAGCTGCGCCAAAAGAAGCTGCGCAACGGCGAACCCCTTCAAG
GAGGAAGAGCTCAAAGACATCATTGCCACGGCCAGGGATATGGAGGCCCGTTGG
GGTCACCTATTCGACATGATCATAATCAACAACGACACGGAGCGCGCCTACCACC
AACTGCTGGCCGAGATCAACTCGCTGGAACGCGAGCCCCAATGGGTGCCCGCCCA
GTGGGTGCACAACAATCGCGACGAGTCATAATGGGTTCTAAAGCACCCGCAACC
ACCACACTA.

7.2.2 *sdt-k* (1.211 bp)

AGACCTCGAGAGGGAAAGACGCAGAAAAAGTGAGAAAGGGGCGACAGAGATCG
AACGGATTACAGATATGCGCATCCTAAAGCAATGGAATCGCCGGCGCTCCGGAT
CGAGCATTGTTGTGCTGGATGGCGACGATTTGAAGCCATGTCTGCCGGATGACT
ACATAAGCGGTTCAGCATCATTTGAACCACCAGCAGCAGCTGCAACTGCAGCAGC
AGCTGCAGCAGCAACATCCGCTCCAGCAGCAAACTATCGCACGCACTCCGGGCG
ACATCAGGGAGATTGACCAGGAAATGTTGACCATGTTGTCCGTGAACCAAGATA
ACGGTCCACACCGTGAGATGGCCGTCGATTGTCCGGACACGTTTCATCGCACGCA
ACAAGACGCCACCCCGATATCCGCCACCCCGTCCACCACAGCTCAATGGGAATG
CGAAGCCCGTACCGCCGCCACGTGATCATCTGCGGGTGGAGAAGGATGGTCCGGC
TGGTCAATTGCTCACCCGCACCACAGCTGCCGGATCGCAGGGCGCCGGGAAATG
CGAGCAGCGGCAGCAGCGGCGCCACAACGCATCCGCTGCAGCATCAGCAGATC
GCCCAGATTGTTGAGCCACATTGGAGCAGCTGGACAGCATCAAGAAATACCCA
GACACATCACGAGCCCCGCAGGGAGGGCGAAGTGCCCGGAGTGGACTACCACT
TCATCACGCGACAGGCCTTCGAGGCGGATATTTTGGCGCGCCGCTTTGTGGAGC
ACGGTGAATATGAGAAGGCCTACTACGGCACATCACTGGAGGCCATACGCACG
GTGGTGGCCAGCGGCAAGATCTGTGTGCTCAACCTGCATCCGCAGAGCCTTAAG
CTGCTGCGCGCCTCTGACCTCAAGCCGTACGTGGTGGTGGTGGCGCCGCCAGC
TTGGACAAGCTGCGCCAAAAGAAGCTGCGCAACGGCGAACCCCTTCAAGGAGGA
AGAGCTCAAAGACATCATTGCCACGGCCAGGGATATGGAGGCCCGTTGGGGTC
ACCTATTCGACATGATCATAATCAACAACGACACGGAGCGCGCCTACACCAACT
GCTGGCCGAGATCAACTCGCTGGAACGCGAGCCCCAATGGGTGCCCGCCAGTG
GGTGCACAACAATCGCGACGAGTCATAATGGGTTCTAAAGCACCCGCAACCACC
ACACTACCATCTTCCCTAGGATCCATCAAC.

7.3 Vergleich der verschiedenen *sdt* Transkripte auf genomischer Ebene

<i>Motiv</i>	<i>cMAGUK</i>	<i>cGUK</i>	<i>csdtB</i>	<i>csdt2</i>	<i>i-sdt</i>	<i>k-sdt</i>	Translationsst art	<i>Motiv</i>
UTR: A1	2003-2272							UTR: A1
UTR: A2	12939-13069							UTR: A2
UTR: A3	19169-19447							UTR: A3
UTR: A4		24895-24916						UTR: A4
UTR:A5			24912--25182	24912-				UTR: A5/A5b
Ex11		25670-25841		25841	*25752-25841	*25762-25841	25820	Ex11
Ex1	32395-32634	32395-32634	32395-32634	32395-32634	32395-32634	32395-32634	32599	Ex1
Ex2: ECR1 (32724)	32724-32813	32724-32813	32724-32813	32724-32813	32724-32813	32724-32813		Ex2: ECR1 (32724)
Ex3	33551-34849	33551-34849	fehlt	33551-34849				Ex3
Ex4	36637-36865	36637-36865	36637-36865	36637-36865	36637-36865	36637-36865		Ex4
Ex5: ECR2 (44358) N-L27 (44433)	44356-44587	44356-44587	44356-44587	44356-44587	44356-44587			Ex5: ECR2 (44358) N-L27 (44433)
Ex6: N-L27 (44649), C-L27 (44796), PDZ (45294), SH3 (45595)	44649-45935	44649-45358	44649-45935	44649-45935	44649-45935			Ex6: N-L27 (44649), C-L27 (44796), PDZ (45294), SH3 (45595)
Ex7: GUK (46096)	45998-46194	fehlt	45998-46194	45998-46194	45998-46116			Ex7: GUK (46096)
Ex8: GUK (46578)	46576-46708	46654-46708	46576-46708	46576-46708	46576-46707	46588-46708		Ex8: GUK (46578)
Ex9: GUK (46773)	46774-46955	46774-46955	46774-46955	46774-46955	46775-46955	46744-46955		Ex9: GUK (46773)
Ex10: GUK (47018) 3'-UTR (47213)	47019-48169	47019-48207	47019-48079	47019-48404	47019-47268* * Primer limitiert	47019-47268*		Ex10: GUK (47018) 3'-UTR (47213)

Danksagung

Diese Arbeit wurde am Institut für Genetik im Labor von Frau Prof. Elisabeth Knust durchgeführt. Für die Bereitstellung des Themas, den Freiraum im wissenschaftlichen Arbeiten und die konstruktive Zusammenarbeit möchte ich mich bei Frau Prof. Knust herzlich bedanken. Ihr Entgegenkommen und Ihre Flexibilität gerade zu Beginn meiner Doktorarbeit hat mir diese Promotion in ihrer Arbeitsgruppe erst ermöglicht.

Herrn Prof. Dr. J. Hegemann danke ich für die Übernahme des Gutachtens.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Genetik, möchte ich für ihre Hilfsbereitschaft und die angenehme Arbeitsatmosphäre danken.

Spezieller Dank gilt dabei folgenden Personen:

Ferdi Grawe, der Seele des „Knust Labors“, und meinem jahrelangen „Benchnachbar“, für seine stete Hilfsbereitschaft, viele Stunden am ELMI und dass er meine quirlige Art stets ausgehalten hat. *André Bachmann* danke ich für seine unermüdliche Hilfsbereitschaft, viele fachliche Diskussionen, Hilfen und Tricks, und vor allem für seinen scheinbar unendlich großen Vorrat an nahezu jedem Puffer.

Kevin Johnson möchte ich für die Begleitung und seinem Interesse an diesem Projekt danken, für viele Diskussionen und seine aufmunternden Worte.

Özlem Kempkens, Susann Fornacon, Isabell Wasserscheid, Wiebke Reinken, Nicola Grzeschik danke ich für stete Hilfsbereitschaft, vor allem auch in der Schlussphase meiner Arbeit. *Eva Theilenberg und Diane Egger-Adams* danke ich für die anregende Zusammenarbeit - vor allem während des leider fruchtlosen Y2H Screens. *Britta Busse* möchte ich als teilhabende *sdt* Seele für ungezählte PCRs und Fliegenarbeiten sowie ihre stets unerschütterliche, fröhliche Art danken. *Tanja Gryzik* danke ich für ihren unerschütterlichen Einsatz, auch in scheinbar ausweglosen Situationen noch einen Weg zu finden. *Olaf Bossinger* möchte ich für seine beständigen Versuche, mich in die Geheimnisse der MAC Welt einzuführen und für viele Computerproblemlösungen danken.

Nicht zuletzt möchte ich meinen Eltern und Eugen für unzählige Babysittstunden und ihrer Offenheit gegenüber meiner Lebensplanung danken. Ihre Frage: „Wann wirst Du denn endlich fertig?“ hoffe ich nun abschließend beantworten zu können.

Markus möchte ich für sehr schöne, wenn auch nicht immer leichte Zeiten an meiner Seite danken, für seine Abmeldedrohungen (wie gerne hätte ich das manchmal wahr genommen) und sehr vieles mehr.

Erklärung

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