

**Die intrazelluläre Domäne von *Drosophila*-Crumbs:
Identifizierung von Interaktionspartnern und
Analyse posttranslationaler Modifikation**

Inaugural-Dissertation

zur

**Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf**

vorgelegt von

Susann Özüyaman

aus Halle (Saale)

März 2006

**Gedruckt mit Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf**

Tag der mündlichen Prüfung 9.Mai 2006

Aus dem Institut für Genetik
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Elisabeth Knust

Korreferent: Prof. Dr. Joachim Ernst

I. EINLEITUNG	1
1. Epithelien	1
1.1. Etablierung der Zellpolarität in Epithelzellen	1
2. Epithelien in <i>Drosophila</i>	3
2.1. Die Entstehung des primären Epitheliums und der <i>Zonula adherens</i>	3
3. Zellkontakte.....	4
3.1. Zellverbindungen in <i>Drosophila</i>	4
3.2. Proteine der subapikalen Region (SAR)	5
3.2.1. Der Crb/Sdt/DPatj-Komplex.....	6
3.2.2. Der Baz/DmPar-6/DaPKC-Komplex.....	8
4. Crumbs im Flügelepithel.....	10
5. Biochemische Methoden basierend auf der Affinitätschromatographie zur Isolierung von Proteinkomplexen	11
6. Identifizierung der Proteine mittels Massenspektrometrie	12
7. Themenstellung	14
II. MATERIAL UND METHODEN	15
1. Arbeiten mit Fliegen	15
1.1. Allgemeines	15
1.2. Fliegenstämme	15
1.3. Das GAL4- UAS – System	17
2. Zellbiologische und histologische Techniken	18
2.1. Kutikulapräparation	18
2.2. Immunohistochemische Präparate.....	18
2.2.1. Standardprotokoll für Färbungen an Embryonen	18
2.2.2. Hitzefixierung	19
2.2.3. Antikörperfärbungen an Imaginalscheiben des dritten Larvalstadiums ...	19
3. Mikroskopie.....	20
4. Molekularbiologische und biochemische Arbeiten	20
4.1. Arbeiten mit DNA	20
4.1.1. DNA-Transformation und Aufreinigung	20
4.1.2. Klonierung	22
4.1.2.1. Herstellung der Konstrukte 39.1-AMB und 39.1-Y10A/E16A	24
4.1.2.2. <i>in vitro</i> Mutagenese der intrazellulären Domäne mittels des Stratagene QuikChange® II Site-Directed Mutagenesis Kits.....	25

4.1.2.3. Herstellung der Konstrukte für das Hefe-2-Hybridsystem	27
5. Mikromanipulation von <i>Drosophila melanogaster</i>	28
6. Arbeiten mit Proteinen	32
6.1. Co-Immunopräzipitation	32
6.2. SDS-PAGE	34
6.2.1. 2D-Gelelektrophorese	35
6.2.2. Western Blot	37
6.3. In-Gel-Verdau Coomassiefärbung (BMFZ)	39
6.4. Vorbereitung der Proben für den ‚in-Lösungsverdau‘	40
7. Hefe-2-Hybrid System	41
7.1. LiAc vermittelte Transformation von Plasmid DNA in <i>S. cerevisiae</i>	41
7.2. Qualitative Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität mit Hilfe des <i>colony-lift filter assay</i>	43
7.3. Quantitative Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität	44
III. ERGEBNISSE	45
1. Suche nach neuen Interaktionspartnern des Crb-Komplexes mittels Co-Immunopräzipitation und anschließender Identifikation durch Massenspektrometrie	45
1.1. Sdt, <i>DPatj</i> und <i>DLin-7</i> , bekannte Komponenten des Crb-Komplexes, können präzipitiert werden	45
1.2. Auftrennung der Co-Immunopräzipitate mittels SDS-PAGE	46
1.2.1. 2D-SDS-PAGE.....	46
1.2.2. Eindimensionale SDS-PAGE	50
1.2.3. Auftrennung auf Gradientengelen	53
1.3. Auftrennung der Co-Immunopräzipitate mittels small scale HPLC	55
1.4. Auftrennung der Co-Immunopräzipitate mittels nanoHPLC	58
2. Das überexprimierte Crumbs Protein ist phosphoryliert.....	62
2.1. Mittels Massenspektrometrie kann eine Phosphorylierung eines Peptids der intrazellulären Domäne nachgewiesen werden.....	62
2.2. Eine partielle Rettung des <i>crumbs</i> mutanten Phänotyps ist vorwiegend abhängig vom ERLI-Motiv	65
2.3. Ektopische Expression von verschiedenen Transgen-kodierten Proteinen der intrazellulären Domäne von Crb im <i>Drosophila</i> Embryo	73
2.4. Überexpression von verschiedenen Transgen-kodierten Crb-intra Proteinen im Flügel von <i>Drosophila melanogaster</i> führen zu starken Defekten in Abhängig-keit vom ERLI-Motiv	78
3. Suche nach neuen Interaktionspartnern der intrazellulären Domäne von Crb durch Modulation der Bindung aller bekannten PDZ Domänen von <i>Drosophila melanogaster</i> mit dem ERLI-Motiv und Berechnung der Bindungsaffinitäten	86
3.1. Test der Interaktion der Kandidaten mit Hilfe des Hefe-2-Hybridsystems ...	88

IV. DISKUSSION	90
1. Präzipitierte Proteine des Crb-Komplexes können mittels Western Blot nachgewiesen werden, aber nicht anhand der Massenspektrometrie.....	90
1.1. Optimierung der Co-Immunopräzipitation	91
1.2. Optimierung der Identifizierung der präzipitierten Proteine mittels Massenspektrometrie	92
1.3. Für einige putative Kandidaten ist eine Interaktion mit dem Crb-Komplex möglich	94
2. Das präzipitierte Transgen-kodierte Crumbs Protein ist phosphoryliert.....	95
2.1. Der Einfluß der Phosphorylierung auf die Abschwächung des <i>crb</i> mutanten Kutikulaphänotyps	96
2.2. Überexpressionsexperimente im <i>Drosophila</i> Embryo zeigen eine Abhängigkeit der Lokalisation des <i>DPatj</i> Proteins ausschließlich vom ERLI-Motiv.....	97
2.3. Überexpression der Transgen-kodierten Crumbs Protein führt zu diversen Flügeldefekten.....	99
2.4. Die Funktion der intrazellulären Domäne im Flügelepithel	100
3. Identifikation weiterer putativer Bindungspartner des Crumbs-Proteins durch ‚homology modelling‘	103
4. Ausblick.....	104
V. ZUSAMMENFASSUNG	106
VI. LITERATURVERZEICHNIS	107
VII. ANHANG	118
1. Abkürzungen.....	118
2. Sequenzdaten	119
3. Massenspektrometrische Daten.....	125

I. Einleitung

1. Epithelien

Epithelien sind Abschlussgewebe, die im Organismus Kompartimente voneinander trennen und zur Aussenwelt hin abschließen. Dies gelingt aufgrund ihres polaren Aufbaus und Kontakten zwischen den Zellen. Durch enge Zellkontakte entstehen Diffusionsbarrieren zwischen den Zellen und der Stofftransport kann selbst für sehr kleine Moleküle nur gerichtet durch die Zelle erfolgen. Die Polarität manifestiert sich z.B. in der Gestalt und dem Aufbau der Zellen. Apikal befinden sich oft Mikrovilli und auf der basalen Seite bestehen Kontakte zur extrazellulären Matrix. Die apikale Seite steht mit der Außenwelt (z.B. Hautepidermis) oder Hohlräumen (z.B. Darmlumen) in Verbindung. Epithelien sind funktionell stark spezialisiert, so dient die Hautepidermis u.a. dem Schutz gegen Umwelteinflüsse, das Darmepithel der Resorption von Nährstoffen, das Sinnesepithel zur Aufnahme von Reizen und das Drüsenepithel zur Sekretion.

Um diese unterschiedlichen Funktionen erfüllen zu können, ist die Plasmamembran in zwei verschiedene Domänen eingeteilt, in die apikale und die basolaterale Domäne. Diese unterscheiden sich deutlich in ihrer Protein- und Lipidzusammensetzung. So sind z.B. in Säugern apikal mehr Glykosphingolipide und Cholesterol und basolateral mehr Phosphatidylcholine zu finden (Eaton und Simons, 1995; Simons, 1995)

1.1. Etablierung der Zellpolarität in Epithelzellen

Die Manifestierung und Aufrechterhaltung der Zellpolarität durch die polare Expression von Plasmamembranproteinen wird hauptsächlich durch drei Mechanismen bewirkt, dem zielorientierten Transport, der selektiven Stabilisierung an der Membran und durch selektives Recycling (Transzytose) (zusammengefasst in Yeaman et al., 1999; Matter et al., 2000 und Mostov et al., 2003).

Im Falle des zielorientierten Transportes bedeutet dies, dass neusynthetisierte Membranproteine mittels des Trans-Golgi-Netzwerks (TGN) bzw. in Endosomen internalisierte Proteine selektiv zu spezifischen Plasmamembran-Domänen sortiert werden. Typische Marker für die apikale Sortierung von Membranproteinen sind z.B. bestimmte Transmembrandomänen oder GPI (Glykosylphosphatidylinositol) – Anker (Brown et al., 1989 und Lisanti et al., 1989) und die N-bzw.O-Glykosylierung der

extrazellulären Domäne (Scheiffele et al., 1995; Yeaman et al., 1997; Gut et al., 1998 und Spodsberg et al., 2001). Für eine spezifische basolaterale Sortierung sorgen dagegen Tyrosin-basierte und Dileuzinmotive der zytoplasmatischen Domäne (Matter und Mellman, 1994). An allen Arten der Sortierung sind wahrscheinlich kleine Motorproteine (Kinesine und Dyneine), beteiligt.

Bei der selektiven Stabilisierung dagegen werden die Proteine zu allen Membranregionen transportiert, aber nur bestimmte zeigen eine Interaktion und dadurch eine Stabilisierung bzw. Rekrutierung der Proteine an die entsprechende Subdomäne. Diese Stabilisierung kann z.B. durch eine spezifische Protein-Protein Interaktion erfolgen, an der ebenfalls PDZ (Postsynaptic density 95/Discs Large/Zonula occludens1)-Domänen beteiligt sein können. Für die apikale Membrandomäne ist jedoch bekannt, dass hauptsächlich Lipid-Lipid Interaktionen bzw. Lipid-Protein Interaktionen für eine Sortierung sorgen. Diese werden hauptsächlich durch Rafts vermittelt, die in Epithelzellen apikal stark angereichert sind (Simons and Ikonen, 1997). Es handelt sich hierbei um Lipidmikrodomänen bestehend aus Glykosphingolipiden und Cholesterol, in denen sich verstärkt Membranproteine anreichern.

Alle nicht stabilisierten Proteine werden schnell durch Endozytose entfernt und zu frühen Endosomen gebracht. Von dort werden sie entweder wiederaufbereitet und noch einmal zu dieser Membrandomäne geliefert, zu den späten Endosomen gebracht und abgebaut oder zur entgegengesetzten Membrandomäne geliefert (Transzytose) (zusammengefasst von Matter, K., 2000; Mostov et al., 2003; Schuck und Simons, 2004).

Nicht nur die Bestandteile der Plasmamembran sind polar organisiert, sondern auch das Zytoskelett und die zytoplasmatischen Organellen sind charakteristisch verteilt.

Die Filamente besitzen eine apiko-basale Polarität, wobei sich das (-)-Ende im apikalen Zytoplasma und das (+)-Ende im basalen Zytoplasma befindet. Weitere Proteine des Zytoskeletts sind u.a. die Aktinfilamente und das β_{Heavy} -Spektrin, die beide apikal lokalisiert sind. (zusammengefasst von Rodriguez-Boulan, E. und Nelson, W.J., 1989 und Drubin, D.G. und Nelson, W.J., 1996)

2. Epithelien in *Drosophila*

In *Drosophila melanogaster* werden epitheliale Zellen erstmals während der Zellularisierung gebildet. Dabei handelt es sich um eine sehr einfache Form von Epithelzellen, die als Kontaktstruktur nur sogenannte *Spot adherens junctions* ausbilden.

Es können primäre und sekundäre Epithelien unterschieden werden (Tepass und Hartenstein, 1994), wobei erstere das Ektoderm und seine Derivate, wie z.B. die Epidermis, das Vorderdarmepithelium, das Hinterdarmepithelium, die Tracheen, die Speicheldrüsen und die Malpighischen Gefäße umfassen. Die sekundären Epithelien dagegen entstehen erst später in der Entwicklung durch eine mesenchymal-epitheliale Transition, wie z.B. das Mitteldarmepithelium oder Teile des Proventrikulus. Ein weiterer großer Unterschied zwischen beiden ist, dass im Gegensatz zu primären Epithelien, in sekundären Epithelien keine *Zonula adherens* gebildet wird.

Das Follikelepithel, welches den Embryo im Germarium umgibt, repräsentiert eine dritte Epithelienart, da es von epithelialen Stammzellen gebildet wird und nicht wie die anderen beiden Arten *de novo* oder durch mesenchymal-epitheliale Transition entsteht.

2.1. Die Entstehung des primären Epitheliums und der *Zonula adherens*

Nach der Befruchtung durchläuft der *Drosophila* Embryo eine superfizielle Furchung, d.h. es finden nur Kernteilungen und keine Zellteilungen statt. Die Entstehung des Epithels beginnt mit der Zellularisierung, nachdem sich ein synzytiales Blastoderm herausgebildet hat. Während der Zellularisierung umwächst die Plasmamembran den Zellkern, wobei neue Membran vom Endoplasmatischen Retikulum und dem Golgiapparat geliefert wird und sich an bestimmten Stellen der wachsenden Membran einlagert (Lecuit und Wieschaus, 2000). Die *Zonula adherens* entsteht aus den *Spot adherens junctions*, welche in kleinen 'patches' organisiert sind (Tepass und Hartenstein, 1994). Nachdem sich die Bestandteile der *Zonula adherens* apikal konzentriert haben, kommt es zur Ausbildung eines Gürtels rund um den Zellapex. Die Bildung der *Zonula adherens* beginnt mit der Zellularisierung und endet, wenn der Keimstreif vollständig ausgestreckt ist.

Es sind einige Mutationen bekannt, in denen die korrekte Etablierung der *Zonula adherens* gestört ist. Dies hat zur Folge, dass sowohl die epitheliale Polarität

verlorengeht, als auch der epitheliale Gewebeverband zerfällt. So wurde gezeigt, dass Bazooka (Baz) verantwortlich für die Rekrutierung von DE-Cadherin in die *Spot adherens junctions* in Embryonen ist, die weder maternales (Genprodukt, welches von der Mutter in den Nährzellen eingelagert wird und für die frühe Entwicklung des Embryos wichtig ist), noch zygotisches (vom Embryo selbst produziertes Genprodukt) Baz besitzen (Harris und Peifer, 2004). Eine apikale Akkumulierung der *Spot adherens junctions* findet nicht statt (Müller und Wieschaus, 1996).

Dagegen ist in Embryonen, welche mutant für *crumbs* oder *stardust* sind (Tepass, 1996 und Grawe et al., 1996), die Transformation der *Spot adherens junctions* in die reife *Zonula adherens* gestört.

3. Zellkontakte

Im allgemeinen unterscheidet man Verschlusskontakte, Adhäsionskontakte und Kommunikationskontakte. Erstere, die *Tight junctions* in Vertebraten, bilden apikal sehr enge Zellkontakte aus und dienen z.B. als Diffusionsbarriere für wasserlösliche Moleküle zwischen den Zellen. Die Adhäsionskontakte bestehen aus zwei Untergruppen, den Zell-Zelladhäsionskontakten (*Zonula adherens*, *Septate junctions* und Desmosomen) und den Zell-Matrixadhäsionskontakten (fokale Kontakte und Hemidesmosomen). Zur letzten Gruppe den Kommunikationskontakten zählen in Tieren *Gap junctions* und chemische Synapsen, sowie Plasmodesmata in Pflanzen.

3.1. Zellverbindungen in *Drosophila*

In *Drosophila melanogaster* sind drei Arten von Zell-Zellkontakten zu finden: die *Zonula adherens* die *Septate junctions* und die *Gap junctions* (Tepass und Hartenstein, 1994).

Sowohl *Tight junctions* als auch Desmosomen wurden bisher nicht gefunden. Das Fehlen letzterer ist vermutlich durch die Abwesenheit von Intermediärfilamenten in Arthropoden zu erklären, die für die Etablierung der Desmosomen wichtig sind.

Der Komplex von Zellkontakten in *Drosophila melanogaster* ist zwischen der apikalen und der basolateralen Domäne lokalisiert und trennt diese räumlich und funktionell voneinander. Die *Zonula adherens* befindet sich mehr apikal und die *Septate junctions*, welche mit den *Gap junctions* durchsetzt sind, mehr basal.

Die voll ausgebildete *Zonula adherens* enthält in *Drosophila* u.a. DE-Cadherin, D α -Catenin, β_{Heavy} – Spektrin und Armadillo (β -Catenin Homolog). Außerdem sind Phosphotyrosinreiche Epitope hier angereichert (Oda et al., 1993, 1994; Müller und Wieschaus, 1996; Thomas und Williams, 1999).

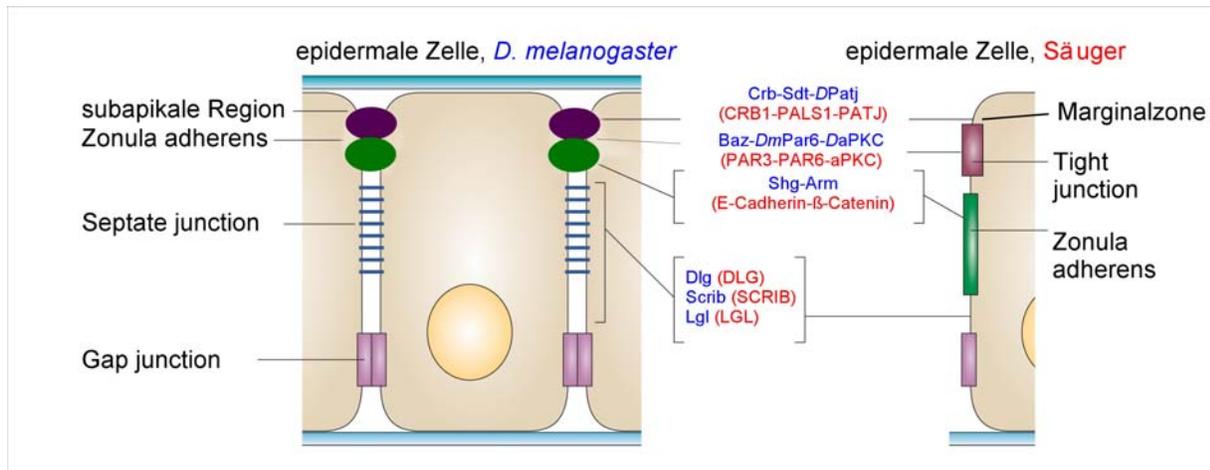


Abb.I.1. Vergleich der Lokalisation der an der Ausprägung der Polarität beteiligten Proteinkomplexe in epidermalen Zellen von *Drosophila melanogaster* und Säugern

Die Abb. zeigt schematisch jeweils eine epidermale Zelle von *D. melanogaster* und von Säugern mit den jeweiligen Zellkontaktstrukturen. Assoziiert mit diesen sind verschiedene Proteinkomplexe, welche sowohl in ihrer Zusammensetzung als auch in ihrer Anordnung entlang der apiko-basalen Achse konserviert sind. In beiden ist der Cadherin/Cateninkomplex an der *Zonula adherens* lokalisiert. Der Baz/DmPar-6/DaPKC-Komplex ist in *Drosophila* in der subapikalen Region zu finden, wobei partiell eine Kollokalisierung mit der *Zonula adherens* zu beobachten ist. In Säugern ist dieser dagegen auf die *Tight junctions* begrenzt. Der Crb/Sdt/DPatj Komplex befindet sich in *Drosophila* ebenfalls in der subapikalen Region und in Säugern apikal zur *Tight junctions*. In beiden epidermalen Zellen ist der Scribble/Dlg/Lgl Komplex basal zur *Zonula adherens* lokalisiert. Die Proteine aus *Drosophila melanogaster* sind blau und die jeweiligen Säugerhomologe rot gekennzeichnet. (Abb. modifiziert nach Macara, 2004b und Wasserscheid, 2005)

3.2. Proteine der subapikalen Region (SAR)

Apikal zur *Zonula adherens* befindet sich die sogenannte subapikale Region (SAR, siehe Abb. I.1.) bestehend aus zwei Proteinkomplexen, dem Bazooka(Baz)/DmPar-6/DaPKC (Kuchinke et al., 1998; Petronczki und Knoblich et al., 2001 und Wodarz et al., 2000)-Komplex und dem Crumbs(Crb)/Stardust(Sdt)/DPatj(*Drosophila* Protein associated with *Tight junctions*)-Komplex (Tepass et al., 1990; Bachmann et al., 2001; Hong et al., 2001; Bhat et al., 1999; Pielage et al., 2003). Ersterer ist hierbei vermutlich

für die Initialisierung der Bildung der *Zonula adherens* verantwortlich und letzterer für deren Aufrechterhaltung (Tanentzapf et al., 2003; Bilder et al., 2003).

3.2.1. Der Crb/Sdt/DPatj-Komplex

Bei Crumbs handelt es sich um ein großes Transmembranprotein aus 2139 Aminosäuren. Der größte Teil des Proteins ist extrazellulär zu finden. Die zytoplasmatische Domäne besteht dagegen nur aus 37 Aminosäuren (Abb.I.2.), deren Sequenz in Vertebraten stark konserviert ist (Wodarz, 1993, Klebes, 1999, denHollander et al., 2001).

Die kleine zytoplasmatische Domäne allein ist für die beobachtete Funktion von Crumbs im Embryo, die Etablierung und Aufrechterhaltung der *Zonula adherens* und somit der Polarität der Epithelzelle verantwortlich ist.

Crumbs mutante Embryonen besitzen einen Kutikulaphänotyp, der durch krümelähnliche Reste der Kutikula im Embryo charakterisiert ist (Jürgens et al., 1984). Die Kutikula wird im Embryo von Zellen ektodermalen Ursprungs sezerniert und gibt Hinweise auf mögliche Defekte der Gewebe ektodermalen Ursprungs. In Embryonen, die kein funktionelles Crumbs-Protein exprimieren können, wie die Allele *crb*^{8F105} und *crb*^{11A22} ist eine partielle Rettung des Kutikulaphänotyps durch Expression der wildtypischen, zytoplasmatischen Domäne von Crumbs möglich. Diese ist vergleichbar mit der, die mittels des gesamten Crumbs-Protein erreicht werden kann (Wodarz, 1993).

Ein weiterer Hinweis für die Wichtigkeit der intrazellulären Domäne ist, dass es bei Überexpression der zytoplasmatischen Domäne in Wildtypembryonen zu dominanten Effekten kommt. Das überexprimierte Crumbs wird fehlverteilt, d.h. es ist nicht mehr subapikal lokalisiert, sondern in 'spots' über die gesamte Zellmembran. Zusätzlich wird aus dem vormals einschichtigen Epithel ein mehrschichtiges (Klebes, 1999).

In der zytoplasmatischen Domäne von Crumbs gibt es einige sehr konservierte Regionen, die mit Hilfe von Punktmutationen bzw. Deletionen mutiert wurden (Klebes, 1999). Das C-terminale ERLI-Motiv, welches ein PDZ-Bindemotiv ist, kann sowohl an die PDZ-Domäne von Stardust (Bachmann et al., 2001) als auch an die PDZ-Domäne von *DmPar-6* binden (Kempkens, 2006). Außerdem werden über Stardust *DPatj* (Bhat et al., 1999, Klebes 1999) und *DLin-7* (Bachmann et al., 2004) in den Crumbs Komplex rekrutiert. Am N-Terminus der intrazellulären Domäne von Crb befindet sich ein weiteres

Bindemotiv, die FERM-Domäne. Für diese Domäne ist bekannt, dass hier ERM-Proteine binden können, welche für eine Verbindung zwischen Zelloberflächenrezeptoren und dem Aktin/Spektrin Zytoskelett sorgen. In *Drosophila* konnte gezeigt werden, dass die Verbindung von Crumbs zum Aktinzytoskelett über *DMoesin* und β_{Heavy} -Spektrin vermittelt wird (Medina et al., 2002). Weiterhin ist bekannt, dass die intrazelluläre Domäne von Crumbs *in vitro* von humaner $\alpha\text{PKC}\zeta$ an zwei N-terminal gelegenen Threoninen phosphoryliert werden kann (Abb.1.2.). Desweiteren kommt es *in vivo* zu einer partiellen Rettung des Überexpressionsphänotyps der intrazellulären Domäne im Flügel bei gleichzeitiger Expression einer dominant negativen Form von *DaPKC*. Sind die beiden Threonine durch phosphomimetische Aminosäuren ersetzt findet keine Rettung statt (Sotillos et al., 2004). Dies spricht für eine Phosphorylierung dieser beiden Threonine durch *DaPKC*.

Für die große extrazelluläre Domäne konnte im Embryo bisher keine spezifische Funktion beobachtet werden, aber im Auge führt eine fehlende extrazelluläre Domäne zur lichtinduzierten Degeneration (Johnson et al., 2002). Die Bedeutung der extrazellulären Domäne im Auge wird außerdem durch die im Menschen mit Crumbs assoziierten Krankheiten, Retinitis pigmentosa und Leber's congenital amaurosis verdeutlicht. Bei Patienten mit diesen Krankheiten konnten bisher nur Mutationen in der extrazellulären Domäne identifiziert werden (denHollander et al., 2001). Kürzlich wurde außerdem eine Rolle der extrazellulären Domäne von Crumbs bei der Regulation der Notchaktivität an der dorso-ventralen Grenze von Flügelimaginalscheiben von *Drosophila melanogaster* beschrieben (Herranz et al., 2006).

Das Stardust Protein (Bachmann et al, 2001; Hong et al., 2001) gehört zur Familie der MAGUK Proteine (Membrane-Associated-Guanylate-Kinase) und besitzt mehrere Protein-Proteininteraktionsdomänen: 2 ECR-Domänen (Evolutionary Conserved Region); 2 L27-Domänen (Lin2-Lin7-Bindedomäne); und jeweils eine PDZ, SH3 (Sarc Homology-Domäne), HOOK und Guk-Domäne (Guanylate kinase-Domäne). Die Bindung zu Crb wird über die PDZ-Domäne vermittelt (s.o.), *DmPar-6* bindet an die beiden ECR-Domänen (Wang et al., 2004; Kempkens, 2006), *DLin-7* an die N-terminale L27 Domäne (Bachmann et al., 2004) und *DPatj* an die C-terminale L27-Domäne (Roh et al., 2002; Kempkens, 2006) (Abb.1.3.).

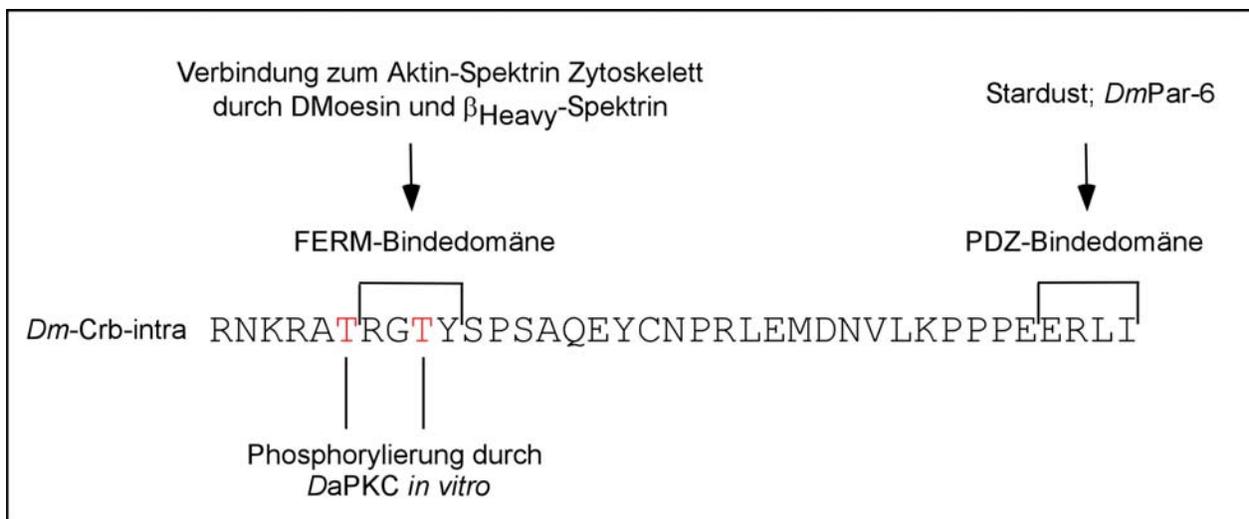


Abb.I.2. Aminosäuresequenz der intrazellulären Domäne von Crumbs und deren Interaktionen mit anderen Proteinen

Hinsichtlich der Funktion von Stardust ist bekannt, dass es im *Drosophila* Embryo ebenso wie Crumbs für die Aufrechterhaltung und Integrität des epithelialen Gewebeverbandes notwendig ist (Tepass und Knust, 1993).

Für *DPatj*, einem Protein mit einer L27 und 4 PDZ-Domänen ist bisher im *Drosophila* Embryo keine Funktion bekannt und für *DLin-7*, einem Protein mit einer L27-Domäne und einer PDZ-Domäne kann eine Funktion im Embryo ausgeschlossen werden, da ‚loss of function‘ Mutanten keinen sichtbaren Phänotyp verursachen (Bachmann, A. unveröffentlichte Daten).

3.2.2. Der Baz/*DmPar-6*/*DaPKC*-Komplex

Dieser Proteinkomplex ist ähnlich wie der *Crb/Sdt/DPatj* Komplex in *Drosophila* in der subapikalen Region lokalisiert, wobei allerdings auch eine partielle Kolo-kalisation mit der *Zonula adherens* zu beobachten ist (Harris und Peifer, 2005). Bestandteile sind das PDZ-Protein Bazooka, welches im dimerisierten Zustand zusammen mit *DmPar-6* und *DaPKC* in einem Komplex vorliegt und durch aktiviertes Cdc-42 an die Membran rekrutiert wird (Joberty et al., 2000). Lange war eine direkte Interaktion der beiden Komplexe auf Proteinebene unbekannt und nur eine genetische und funktionelle Abhängigkeit konnte nachgewiesen werden. In Säugerzelllinien konnte eine direkte Interaktion zwischen dem C-Terminus von Crumbs 3 und Par-6 bzw. zwischen Pals1

(humanes Stardust-Homolog) und Par-6 nachgewiesen werden (Lemmers et al., 2004; Wang et al., 2004).

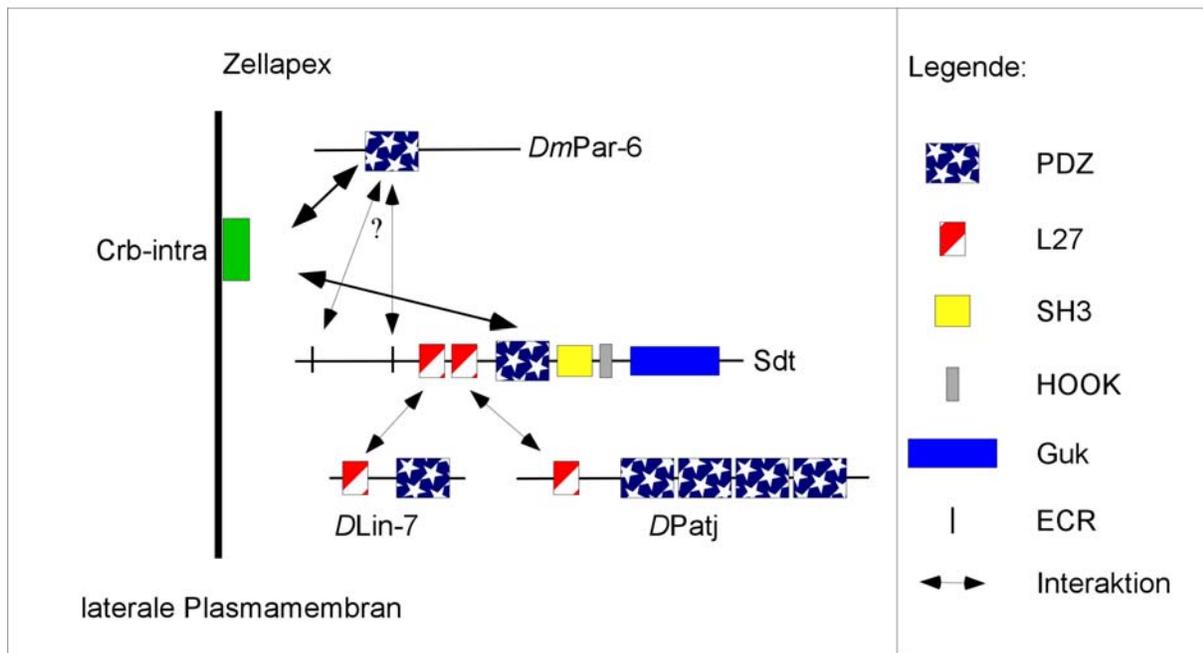


Abb.1.3. Schematische Übersicht über die Interaktionen der Proteine des Crumbs Komplexes in der Zelle von *Drosophila*

Dargestellt sind die bekannten Interaktionen der verschiedenen Domänen der Proteine des Crumbs-Komplexes. Die Bezeichnungen der Domänen stehen für PDZ: Postsynaptic density protein/Discs large/ZO1; L27: Lin2/Lin7; SH3: Sarc Homology; HOOK; Guk-Guanylate kinase und ECR für Evolutionary Conserved Region. Das Fragezeichen bei der Interaktion zwischen *DmPar-6* und *Sdt* soll andeuten, dass die Interaktion in *Drosophila* nur *in vitro* nachgewiesen werden konnte, diese *in vivo* allerdings nicht bestätigt werden konnte.

Beide Interaktionen konnten auch in *Drosophila* bestätigt werden, wobei nur die Interaktion von Crumbs und *DmPar-6* auch *in vivo* nachweisbar war. Crb ist in *DmPar-6* mutanten Keimbahnklonen fehllokalisiert und *DmPar-6* in *crb* mutanten Embryonen. Außerdem ist eine Rekrutierung von *DmPar6* durch ektopisch exprimiertes Crb zu beobachten. Die Bindung von Stardust an *DmPar-6* dagegen konnte nur *in vitro* mittels des Hefe-2-Hybridsystems gezeigt werden (Kempkens, 2006), was für eine Bindung von *Dm-Par-6* an Crb und nicht an *Sdt* im *Drosophila* Embryo spricht.

Eine weitere Interaktion der beiden Komplexe könnte durch die *DaPKC* vermittelt werden, die die intrazelluläre Domäne *in vitro* phosphoryliert (Sotillos et al., 2004), wobei nicht geklärt ist, ob die Interaktion dauerhaft ist oder nur für den Zeitpunkt der Phosphorylierung besteht.

Zusätzlich zu den beiden bisher beschriebenen Komplexen, dem Crb/Sdt/DPatj Komplex und dem Baz/DmPar-6/DaPKC Komplex gibt es noch einen weiteren Proteinkomplex der an der Etablierung und Aufrechterhaltung der Polarität in der Epithelzelle beteiligt ist, den Scribble Komplex. Dieser Komplex bestehend aus dem PDZ-Proteinen Scribble, Discs-large und dem Tumorsuppressor Lgl und definiert die basolaterale Identität (Bilder und Perrimon, 2000; Jacob et al., 1987 und Woods und Bryant, 1991). Die Etablierung der Polarität beginnt mit der Initiierung durch den Baz/DmPar-6/DaPKC Komplex in Stadium 6/7 der Embryonalentwicklung. Dieser ist zum Einen essentiell für die Bildung der *Zonula adherens* (Harris und Peifer, 2004) und zum Anderen wichtig für die Rekrutierung des Crb/Sdt/DPatj Komplexes nach apikal. Letzterer hat dort die Aufgabe der Aufrechterhaltung der Zonula adherens und der Restriktion des Scribble Komplexes nach basolateral. Umgekehrt verhindert der Scribble Komplex, dass Komponenten der apikalen Membrandomäne nach basolateral gelangen. Die Ausbildung epithelialer Polarität ist somit stark abhängig von einer Definition einzelner Membrandomänen durch bestimmte Proteinkomplexe und deren Gleichgewicht (Bilder et al., 2003, Tanentzapf und Tepass, 2003).

4. Crumbs im Flügelepitel

In *Drosophila* gibt es außer den embryonalen noch weitere Epithelien, in denen der Crb/Sdt/DPatj und Baz/DmPar-6/DaPKC-Komplex exprimiert ist. Dazu gehört z.B. das Flügelepitel, welches aus Imaginalscheiben entsteht und später eine zweischichtige Epidermis bildet. Imaginalscheiben sind die Anlagen der äusseren Strukturen der Imago. Während der Embryonalentwicklung in Stadium 11 invaginieren einige ektodermale Zellen und bleiben als sackartige Einstülpungen, undifferenzierter aber proliferierender Zellen bis zur Metamorphose im pupalen Stadium erhalten. Hier beginnen sich die Zellen zu differenzieren und das Epithel stülpt sich aus, so dass z.B. im Falle des Flügelepithels die dorsale auf der ventralen Seite zu liegen kommt. (Abb.I.4) So entsteht aus dem zweidimensionalen Flügelepitel ein dreidimensionaler Flügel.

Für Crumbs ist bekannt, dass es in allen Zellen der Imaginalscheiben exprimiert ist, aber an der dorso-ventralen Grenze akkumuliert. (Herranz et al., 2006). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression der intrazellulären Domäne von Crumbs zu

Flügeldefekten (Wodarz, 1993; Klebes 1999) bzw. zu einer Überproliferation der Flügelimaginalscheibe (Lu und Bilder, 2005) führt. Allerdings ist das Crumbs Protein im Flügel nicht maßgeblich an der Ausbildung der apiko-basalen Polarität beteiligt, da diese in *crb*^{11A22} Klonen nicht betroffen ist (Herranz et al., 2006).

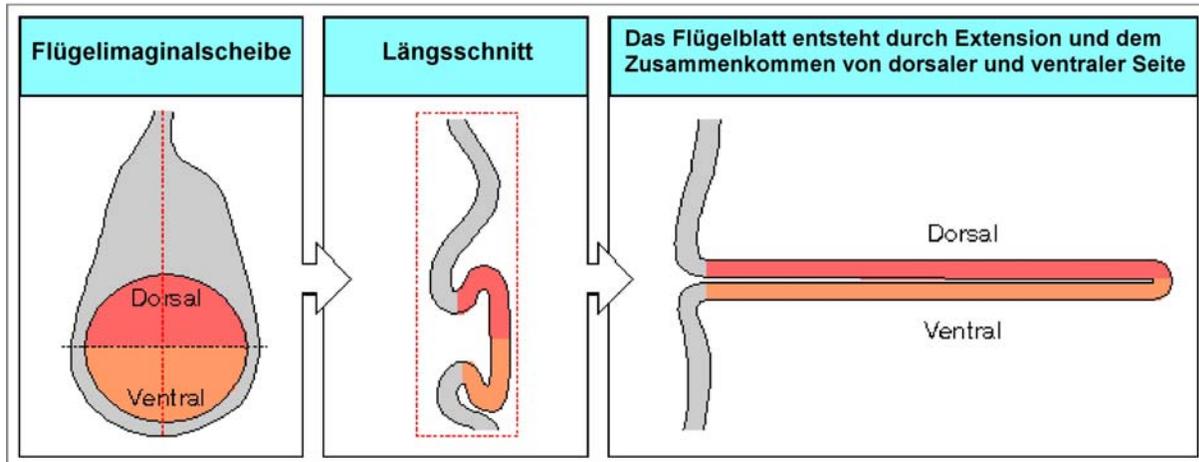


Abb.I.4. Schematische Übersicht der Entwicklung des Flügels aus der Imaginalscheibe (aus Wolpert, 1998) Das rechte und mittlere Bild zeigen jeweils eine Flügelimaginalscheibe als Aufsicht bzw. als Querschnitt. Die dorsale und ventrale Oberfläche sind dabei in der gleichen Ebene. Das linke Bild zeigt einen Flügel nach der Metamorphose, wo die dorsale und ventrale Seite nach der Ausstülpung aufeinander zu liegen gekommen sind.

5. Biochemische Methoden basierend auf der Affinitätschromatographie zur Isolierung von Proteinkomplexen

Zur Ausbildung und Aufrechterhaltung epithelialer Polarität sind mehrere Proteinkomplexe notwendig. Um die Zusammensetzung derartiger Multi-Protein Komplexe aufzuklären, wurden in den letzten Jahren zahlreiche biochemische Methoden etabliert, von denen hier nur auf die Zusammenfassung affinitätschromatographischer Aufreinigungen mit anschließender massenspektrometrischer Analyse eingegangen werden soll, da diese Techniken in dieser Arbeit hauptsächlich angewendet wurden.

Laut einer Zusammenfassung von Bauer und Kuster, 2003 gibt es vier Standardmethoden der affinitätschromatographischen Aufreinigung, die klassische Co-Immunopräzipitation, die Co-Immunopräzipitation mittels eines ektopisch exprimierten mit einem Epitop versehenen Proteins, den GST-Pulldown und die Tandem-

Affinitätsaufreinigung, bei der ein Proteinkomplex durch zwei separate Aufreinigungsschritte isoliert wird.

6. Identifizierung der Proteine mittels Massenspektrometrie

Nach Aufreinigung eines Proteinkomplexes mit einer der genannten Methoden ist nun eine Identifizierung der angereicherten Proteine notwendig. Dafür hat sich die Massenspektrometrie aufgrund ihrer Schnelligkeit, Sensitivität und Vielseitigkeit als Methode der Wahl etabliert. Bevor die eigentliche Identifizierung im Massenspektrometer stattfindet, wird die Komplexität der Probe durch Auftrennung mittels ein- oder zweidimensionaler SDS-Pages oder Flüssigchromatographischer Methoden reduziert und das oder die Proteine proteolytisch z.B. mittels Trypsin in Peptide gespalten.

In der Massenspektrometrie gibt es zwei unterschiedliche Ansätze, Proteine zu identifizieren. Beide Methoden wurden in dieser Arbeit angewandt. Die erste ist das ‚peptide mass fingerprinting‘ (PMF) (Henzel et al., 1993), wobei mit Hilfe des MALDI TOF MS (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry) die Masse der Peptide bestimmt wird, ohne diese zu sequenzieren. Diese Massen werden mit Datenbanken verglichen und schon drei Peptide eines Proteins reichen meist, um es sicher zu identifizieren. Vorteile sind die relativ einfache Handhabung und Interpretation der Ergebnisse, sowie die Sensitivität. Nachteile dieser Methode sind, dass immer genügend Peptide eines Proteins identifiziert werden müssen, was zu Problemen bei kleineren Proteinen führen kann und dass Proteine zu mind. 80% in der Datenbank vorhanden sein müssen. Außerdem können Probleme bei der Identifizierung von einzelner Proteine aus Proteingemischen auftreten, wenn sich mehr als 2-5 Proteine in der Mischung befinden.

Der zweite Ansatz ist die Tandem Massenspektrometrie, bei der zuerst die Masse des Peptids gemessen wird. Diese wird oft mit einer ‚elektrospray ionization‘ (Esi) (Wilm et al., 1996) oder ‚on-line nano-LC peptide separation‘ (McCormack et al., 1997) gekoppelt, wodurch eine wesentlich höhere Sensitivität in Bezug auf unterrepräsentierte Proteine erreicht wird. Dabei wird die Probe zusammen mit einem flüchtigen Lösungsmittel durch eine Kapillare in das Gerät gesprüht und letztendlich gelangen einzelne sogenannte Vorläuferionen in das Massenspektrometer.

Das Vorläuferion wird dann im Massenspektrometer isoliert und durch Kollision mit Gasmolekülen weiter fragmentiert (siehe Abb. I.5.) Alle entstehenden Massen werden gemessen und sowohl die Masse des Peptids als auch die entstandenen Teilmassen werden mit einer Datenbank abgeglichen und können zur Identifizierung des Proteins nur durch ein Peptid beitragen.

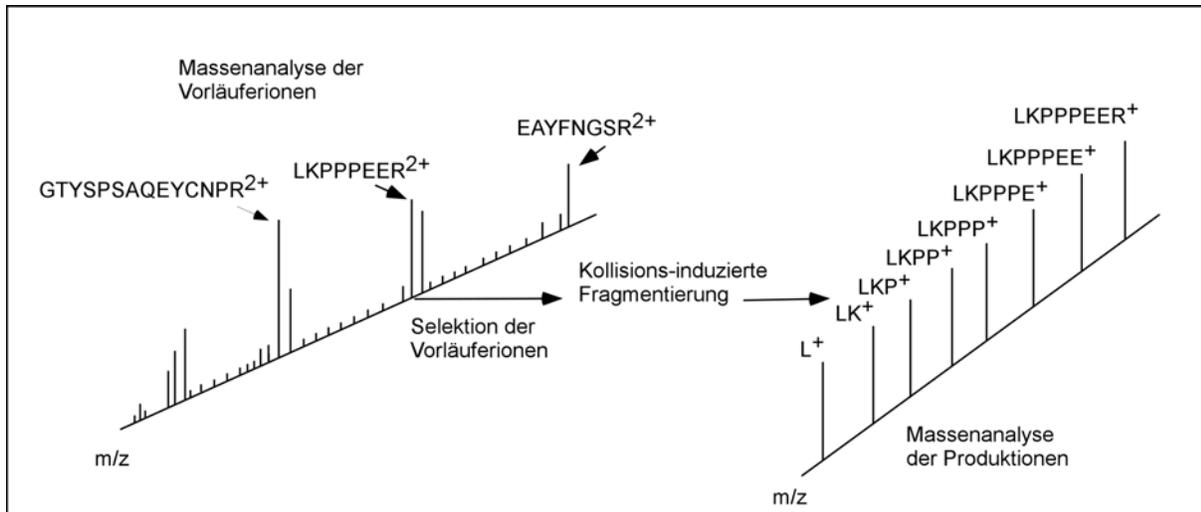


Abb.I.5. Schematische Darstellung der Fragmentierung eines Vorläuferions

Die Abbildung zeigt die Selektion eines Vorläuferions am Bsp. der identifizierten Crumbs Peptide und die entstehenden Produktionen nach der Kollisions-induzierten Fragmentierung. Gezeigt sind hier nur die möglichen Produktionen eines Crumbs Peptids, entstanden durch Fragmentierung am C-Terminus beginnend. (Abb. adaptiert nach Kinter und Sherman, 2000)

7. Themenstellung

In dieser Arbeit sollten mit Hilfe eines biochemischen Ansatzes, der Co-Immunopräzipitation und anschließender massenspektrometrischer Analyse neue Bindungspartner des Crumbs Komplexes identifiziert werden.

Der Crumbs-Komplex spielt eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Zellpolarität und des Gewebeverbandes (Tepass et al., 1990), und definiert die apikale Identität (Bilder et al., 2003; Tanentzapf et al., 2003), aber der genaue Mechanismus und die Funktion der einzelnen Proteine sind noch nicht vollständig aufgeklärt. Bei den bekannten Proteinen des Crb-Komplexes wie Sdt, *DPatj* und *DLin-7* handelt es sich um Gerüst-Proteine. Effektoren des Crb-Komplexes, die wichtig für die Funktion, der Aufrechterhaltung der Zellpolarität und des Gewebeverbandes sind wie z.B. Proteine die an Signaltransduktionskaskaden mitwirken sind weitestgehend unbekannt und sollten anhand dieser Methode isoliert und identifiziert werden.

Desweiteren sollte eine durch Sotillos et al., 2004 und diese Arbeit postulierte post-translationalen Modifikation, die Phosphorylierung der intrazellulären Domäne von Crb, näher charakterisiert und deren Funktion *in vivo* analysiert werden.

II. Material und Methoden

1. Arbeiten mit Fliegen

1.1. Allgemeines

Die in der Doktorarbeit durchgeführten Experimente wurden größtenteils am Modellorganismus *Drosophila melanogaster* durchgeführt. Bei *Drosophila melanogaster* handelt es sich um ein homometaboles Insekt, welches mit einer ca. 24 stündigen Embryonalentwicklung beginnt. Dieser folgen 3 larvale Stadien, denen sich die Bildung einer Puppe anschließt, aus der dann letztendlich die Imago schlüpft.

Die Haltung der Fliegen erfolgt wie in Ashburner (1989) beschrieben auf Maisstandardmedium. Die Stämme wurden bei Raumtemperatur oder 18°C gehalten, Kreuzungen bei Raumtemperatur oder 25°C angesetzt.

Eiablagen wurden auf Apfelsaftplatten angesetzt, auf die etwas Hefe zur Stimulation der Fliegen gestrichen wurde.

1.2. Fliegenstämme

Tabelle II.1: „Verwendete Fliegenstämme“

Bezeichnung	Bemerkung	Referenz
1. Chromosom		
w ¹¹¹⁸	white, Empfängerstamm bei Keimbahntransformation	Hazelrigg et al., 1984
2. Chromosom		
UAS-MYC-INTRA _{WT} [38.14a]	Effektor der zytoplasmatischen Domäne von Crb, starke Expression	Wodarz et al., 1995
CyO	Balancerchromosom	Lindsley und Zimm, 1992
GAL4 ^{385.3}	Aktivierung in ektodermalen Derivaten	Wodarz et al., 1995
GAL4 ^{en}	Aktivierung im engrailed Muster	Bloomington, #1973 (N. Perrimon)
GAL4 ^{MS1096}	Aktivierung in Flügelblatt	Capdevila J, Guerrero I., 1994
39.1-1a	Effektor der zytoplasmatischen Domäne von Crb mit FLAG-Epitop	Fornaçon, 2001
Crbi-T6AT9A	Effektor der zytoplasmatischen Domäne von Crb mit T6A und T9A Austausch	Sotillos et al., 2004

Crbi-T6DT9D	Effektor der zytoplasmatischen Domäne von Crb mit T6D und T9D Austausch	Sotillos et al., 2004
Crbi-T6AT9AS11AS13A	Effektor der zytoplasmatischen Domäne von Crb mit T6A, T9A, S11A und S13A Austausch	Sotillos et al., 2004
UAS-MYC-INTRA _{Y10A/E16A}	Effektor der zytoplasmatischen Domäne von Crb mit Y10A und E16 Austausch	Klebes, 1999
UAS-MYC-INTRA _{ΔERLI}	Effektor der zytoplasmatischen Domäne von Crb mit Deletion des C-Terminus (1-32)	Klebes, 1999
UAS-MYC-INTRA _{Y10A}	Effektor der zytoplasmatischen Domäne von Crb mit Y10A Austausch	Klebes, 1999
UAS-MYC-INTRA _{E16A}	Effektor der zytoplasmatischen Domäne von Crb mit E16A Austausch	Klebes, 1999
UAS-MYC-IN-TRA _{EY10A/E16AΔERLI}	Effektor der zytoplasmatischen Domäne von Crb mit Y10A und E16A Austausch, Deletion des C-Terminus (1-32)	Klebes, 1999
<i>3. Chromosom</i>		
GAL4 ^{daG32}	Aktivierung im <i>daughterless</i> Muster	M. Wasser, B. Giebel, U. Hinz
TM3 ^{ftz::lacZ}	Balancer-Chromosom mit P{ftz::lacZ} Insertion	Y. Hiromi
TM6b	Balancerchromosom	Lindsley und Zimm, 1992
<i>crb</i> ^{11A22}	<i>crumbs</i> Nullallel, EMS induziert	Jürgens et al., 1984
<i>crb</i> ^{8F105}	<i>crumbs</i> Nullallel, EMS induziert	Jürgens et al. 1984; Wodarz et al. 1993
<i>Sonstige Stämme</i>		
Oregon R	Wildtyp	Lindsley und Zimm, 1992

1.3. Das GAL4- UAS – System

Hierbei handelt es sich um ein System (nach Brand and Perimon, 1993) mit dessen Hilfe die Funktion eines Gens näher untersucht werden kann. Dazu werden die Gene ektopisch anhand eines spezifischen Enhancers exprimiert.

Hierzu werden zwei Fliegenstämme genutzt, ein Aktivator- oder Treiberstamm und ein Effektorstamm. Ersterer besitzt eine Sequenz, welche für das GAL4 Protein, einen transkriptionellen Aktivator aus der Hefe, kodiert und von einem spezifischen Enhancer reguliert wird.

Der Effektorstamm dagegen hat das Gen X oder ein Reporter gen (*lacZ*), welches am 5' Ende eine UAS-Sequenz (upstream activating sequence) besitzt. Werden nun diese beiden Stämme miteinander gekreuzt, so wird das GAL4 Protein enhancerspezifisch exprimiert und dementsprechend auch das Gen mit der vorgeschalteten UAS-Sequenz. Das Gen kann somit in einem bestimmten zeitlichen und räumlichen Muster exprimiert werden. Die zeitliche Expression kann etwas verschoben sein, da zuerst das GAL4 Protein transkribiert und translatiert werden muß. Zusätzlich zu dieser zeitlichen Verzögerung kann es bei Verwendung des Reporter gens *lacZ* noch zu einer weiteren Änderung im zeitlichen Expressionsmuster kommen, da die β -Galaktosidase sehr stabil ist und somit evtl. noch nachweisbar ist, obwohl GAL4 schon nicht mehr exprimiert wird.

GAL4^{daG32}-Expressionsmuster

Die Expression beginnt ca. ab Stadium 8 (individuelle Schwankungen sind möglich), nimmt ab Stadium 11/12 stark zu und ist bis zum Ende der Embryogenese stark ubiquitär exprimiert.

GAL4^{en}-Expressionsmuster

Die Aktivierung erfolgt im engrailed Muster. Dieses umfasst die Expression in den posterioren Segmentgrenzen, im Hinterdarm, dem Labialsegment und im Bauchmark.

GAL4^{385.3}-Expressionsmuster

Die anhand dieser Linie vermittelte Expression beginnt im Ektoderm von Embryonen ab Stadium 10. Hierbei gibt es einige besonders stark exprimierende Zellen, die 14

unterbrochene Streifen bilden. Die Expression nimmt bis Stadium 11 stark zu und bleibt bis zum Ende der Embryogenese erhalten. Das Signal ist hauptsächlich auf Derivate des Ektoderms beschränkt, wobei die Expressionstärke innerhalb dieser variiert.

2. Zellbiologische und histologische Techniken

2.1. Kutikulapräparation

Dazu werden Embryonen von Eiablagen in einem 1:1 Gemisch aus NaOCl und Wasser für ca. 4 min. dechorionisiert und danach in Hoyers-Medium/Lactat auf einem Objektträger eingebettet und über Nacht bei 65°C geklärt.

Hoyers-Medium/Lactat: - 50 ml ddH₂O mit 30 g Gummi arabicum ü/N rühren
- 200 g Chloralhydrat und 16 ml Glycerin zugeben, rühren
- mindestens 3 h bei 12000 g zentrifugieren und Überstand verwerfen
- als Gebrauchslösung 1:1 mit Lactat mischen

2.2. Immunohistochemische Präparate

2.2.1. Standardprotokoll für Färbungen an Embryonen

- Fliegen werden auf Ablagen gesetzt (Apfelsaftplatten mit Hefe) ü/N-Ablage dechorionisieren mit NaOCl/H₂O 1:1 für 4 min.
- Fixierung für 20 min. in 4% Formaldehyd (FA) – Rollrandglas: 1,92 ml Heptan; 1,82 ml PBS; 0,26 ml 37% FA
- untere, wässrige Phase abnehmen
- 2 Volumen Methanol dazugeben und 30 sec. kräftig schütteln ⇒ devitellinisieren
- Überstand abnehmen und 2x mit Methanol waschen (Lagerung in Methanol bei -20°C möglich)
- 3x 20 min. in PBT waschen und 3x 20 min. blocken in PBT mit 5% Pferdeserum
- 1. Antikörper in PBT mit 5% Pferdeserum bei 4°C ü./N. auf dem Taumler inkubieren
- 3x 20 min. waschen in PBT
- 2. Antikörper in PBT mit 5% Pferdeserum (2 h bei RT)
- 3x 20 min. waschen in PBT

- einbetten in Mowiol/Dabco oder in Glycerinpropylgallat (bei 4°C lagern)
dies gilt für fluoreszenzgekoppelte Antikörper

10x PBS: 1,3 M NaCl; 0,07 M Na₂HPO₄; 0,03 M NaH₂PO₄

PBT: 1x PBS mit 0,1% Tween

Abweichungen vom Standardprotokoll:

- **11% FA** Rollrandglas: 1,5 ml Heptan; 1,0 ml PBS; 0,635 ml 37% FA

2.2.2. Hitzefixierung

Zur Hitzefixierung von Embryonen werden 1-2 ml 1x Triton-salzlösung (10x Tritonsalzlösung: 40 g NaCl, 3 ml Triton X-100 auf 1 l dH₂O) in ein Scintillationsröhrchen gefüllt und mit halb geschlossenem Deckel in ein kochendes Wasserbad gestellt. Die Embryonen werden in einem 1:1 NaOCl/H₂O Gemisch für 4 min. dechorionisiert, mit Leitungswasser gespült und in die heisse 1x Tritonsalzlösung überführt. Der Deckel wird geschlossen, das Röhrchen kurz geschüttelt und mit 10-15 ml eiskalter 1x Tritonsalzlösung aufgefüllt und auf Eis mind. 1 min. abgekühlt. Es folgt die Devitellinisierung durch fast vollständiges Abgiessen der Tritonsalzlösung und Zugabe von 2 ml Heptan und anschließend von 2 ml Methanol. Der Deckel wird gut verschlossen und die Mischung kurz gevortext. Die obere Heptanphase wird verworfen und die Embryonen mehrmals mit Methanol gewaschen. Die Embryonen können nun in Methanol bei -20°C gelagert werden oder sofort für Antikörperfärbungen verwendet werden.

2.2.3. Antikörperfärbungen an Imaginalscheiben des dritten Larvalstadiums

- Larven des gewünschten Stadiums in eiskaltem 1x PBS sammeln
- Imaginalscheiben in 1x PBS präparieren und in 3er Blockschälchen sammeln
- die Fixierung erfolgt in 4% Paraformaldehyd für 20 min. und anschließend wird mindestens 3x 20 min. in PBT gewaschen
- Inkubation mit dem primären Antikörper in PBT/5% Pferdeserum ü.N. bei 4°C
- es wird wiederum mindestens 3 x 20min in PBT gewaschen
- Inkubation mit dem sekundären Antikörper in PBT/5% Pferdeserum für 2 h bei RT

- 3x 20 min. in PBT waschen
- Imaginalscheiben in Glycerin/Propylgallat eindeckeln (Präparate dunkel und kühl aufbewahren)

Tabelle II.2 „Verwendete Primärantikörper“

Epitop	Organismus	Bezeichnung	Verdünnung	Hersteller/Zitat
DPatj	Kaninchen	-	1:500	Richard, 2005
FLAG-M2	Maus	M2	1:1000	Sigma-Aldrich
Myc	Maus	9E10	1:50	Evan et al., 1985
Discs large	Kaninchen	-	1 :500	P. Bryant et al., 1991

Tabelle II.3: „Verwendete Sekundärantikörper“

Name	Konjugat	Verdünnung	Hersteller
Ziege-anti-Maus	Cy3	1:200	Dianova
Ziege-anti-Maus	Cy2	1:200	Dianova
Ziege-anti-Kaninchen	Cy3	1:200	Dianova
Esel-anti-Kaninchen	Cy2	1:200	Dianova

3. Mikroskopie

Die lichtmikroskopischen Untersuchungen der Kutikulapräparate wurden an einem Zeiss Axiophot (Zeiss, Jena) durchgeführt.

Die fluoreszenzmarkierten Präparate (Embryonen und S2-Zellen) wurden an einem Leica TCS NT konfokalen Mikroskop (Leica, Bentzheim) analysiert und die erhaltenen Bilder mit Canvas (Deneba, Miami, Florida) und Adobe Photoshop (Adobe, San Jose, Ca) bearbeitet.

4. Molekularbiologische und biochemische Arbeiten

4.1. Arbeiten mit DNA

4.1.1. DNA-Transformation und Aufreinigung

Plasmide wurden in *E.coli* Bakterien (XL1-blue, Stratagene, Amsterdam, NL) amplifiziert. Diese wurden zuvor für die Elektroporation nach Hanahan et al., 1991 kompetent gemacht. Die Elektroporation erfolgte mit dem „Gene Pulser II“ von BioRad (München).

- Aufnahme der elektroporierten *E.coli* Bakterien in 1 ml LB-Medium und Inkubation für 1h bei 37°C
- kurz abzentrifugieren und Überstand bis auf ca. 100 µl abnehmen
- resuspendieren und auf LB-amp-Platten ausstreichen
- Inkubation ü/N bei 37°C.

⇒ aus den erhaltenen Kolonien wurden Plasmide in kleinem Maßstab präpariert (Alkali-Lyse-Methode nach Birnboim und Doly, 1979) und anschließend die Klonierung durch Restriktionsverdau und Sequenzierung überprüft.

Minipräparation

- pro Mini 1,5 ml in ein Eppendorfreaktionsgefäß füllen, 1 min. bei RT und 13000 rpm zentrifugieren
- Überstand vollständig abnehmen
- 300 µl E₁- Lösung (50 mM Tris; 10 mM EDTA pH 8,0; 100 µg/ml Rnase A) hinzufügen und die Bakterien resuspendieren
- 300 µl E₂ – Lösung (0,2 M NaOH, 1% SDS (m/v)) hinzufügen, mischen und 5 min. bei RT inkubieren
- 300 µl E₃ (147,25 g KAc add 250 ml H₂O (3M), pH mit 100 ml Eisessig auf 5,5 einstellen und auf 500 ml auffüllen) hinzugeben, mischen und 10 min. bei RT zentrifugieren, 13000 rpm
- Überstand in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß überführen (~900 µl)
- 0,7 Vol. Isopropanol hinzugeben und 30 min. zentrifugieren, 13000 rpm
- Pellet in 70% Ethanol waschen und 10 min. zentrifugieren, 13000 rpm
- 10 min. unter einer Lampe trocknen und in 30 µl ddH₂O aufnehmen

⇒ der Standardansatz für den Kontrollrestriktionsverdau sieht folgendermaßen aus:

5 µl Plasmid-DNA

1 µl 10x Puffer (Enzymspezifisch)

2 Units Enzym

2 µl ddH₂O

10 µl Gesamtansatz

Es wurden größtenteils Enzyme von MBI Fermentas und Roche, Mannheim verwendet. (Doppolverdau siehe Herstellerangabe)

Danach wurden die entstehenden Fragmente auf 0,7%igen Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Ethidiumbromid (2 µl einer 10 mg/ml Stammlösung in 100 ml) sichtbar gemacht. Dieses interkaliert in die Doppelhelix der DNA und fluoresziert unter UV-Licht stark orange. Auf diese Art und Weise konnten die korrekt klonierten Plasmide identifiziert und anschließend in größerem Maßstab präpariert werden.

- 50 ml LB-Amp-Medium wurden mit 10 µl der Mini-Kultur ü./N. bei 37°C geschüttelt
- Aufreinigung der daraus erhaltenen DNA (Midipräparation) mittels NUCLEOBOND® applications (siehe Herstellerangabe)

4.1.2. Klonierung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit folgenden Vektoren gearbeitet:

Tabelle II.4: „Verwendete Vektoren“

Vektor	Beschreibung	Herkunft
pBs Ks II+	Standardvektor für Subklonierungen	Stratagene, Amsterdam, NL
pUAST	Herstellung von UAS-Effektorlinien	Brand und Perrimon, 1993
pUChs $\pi\Delta$ 2-3	‘Turbo-Helper’ Plasmid zur Transformation von <i>Drosophila</i> , Transposasequelle	Laski et al., 1986
pGBKT7	Hefeexpressionsvektor zur Herstellung von Fusionsproteinen mit der DNA-Bindedomäne von GAL4	CLONTECH Laboratories, Heidelberg
pACT2	Hefeexpressionsvektor zur Herstellung von Fusionsproteinen mit der DNA-Aktivierungsdomäne von GAL4	CLONTECH Laboratories, Heidelberg

Alle Vektoren wurden nach dem Restriktionsverdau dephosphoryliert, damit bei der Ligation ein Religation des Vektors weitestgehend verhindert wird. Dazu wurden zu einem 20 µl Ansatz ca. 2,5 µl 10x Puffer und 1 µl Kalb-Alkalische Phosphatase hin-

zugegeben und für 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Phosphatase für 15 min. bei 65°C inaktiviert.

Tabelle II.5: “Verwendete Primer und Oligonukleotide”

Bezeichnung	Sequenz (ektopisch eingeführte Schnittstellen für Restriktionsenzyme sind unterstrichen)
Oligos FLAG 1	5'-GAT CCG ATT ACA AGG ATG ATG ATG ATA AGG-3'
Oligos FLAG 2	5'-GAT CCC TTA TCA TCA TCA TCC TTG TAA TCG-3'
CG1976-2-up	5'-CAT <u>GCC ATG</u> GGT TGC ATG GGC AGC AAA C-3'
CG1976-2-low	5'- <u>CGG</u> GAT <u>CCG</u> CAT CCG GTC CGT CTC GTC C-3'
CG9326-2-up	5'-CAT <u>GCC ATG</u> <u>GAA</u> CGC CAA ACG GGA GGC TAC C-3'
CG9326-2-low	5'- <u>CGG</u> GAT <u>CCT</u> GCA TGG CAG CAA GGA ATC-3'
InaD-2-up	5'-CAT <u>GCC ATG</u> <u>GTG</u> GTT CAG TTC CTG GGC AAA C-3'
InaD-3-low	5'- <u>CGG</u> GAT <u>CCG</u> ACG CAT TGT TGT TGG TGG TC-3'
InaDfull-up	5'-CAT GCC ATG GAA CAA GCA GCG AGG ATG GTT CAG-3'
InaD-full-low	5'-GGG GTC GAC ATC GTC TCT AGG CCT TGG GTG-3'
T6A-up	5'-GAA CAA GCG AGC AGC CAG GGG CAC CTA TA-3'
T6A-low	5'-TAT AGG TGC CCC TGG CTG CTC GCT TGT TC-3'
T9A-up	5'-AAC CAG GGG CGC CTA TAG CCC GAG C-3'
T9A-low	5'-GCT CGG GCT ATA GGC GCC CCT GGT T-3'
S11A-up	5'-CAG GGG CAC CTA TGC CCC GAG CGC GCA-3'
S11A-low	5'-TGC GCG CTC GGG GCA TAG GTG CCC CTG-3'
S13A-up	5'-GCA CCT ATA GCC CGG CCG CGC AAG AGT ACT G-3'
S13A-low	5'-CAG TAC TCT TGC GCG GCC GGG CTA TAG GTG C-3'
T6D-up	5'-CCA GGA ACA AGC GAG CAG ATA GGG GCA CCT ATA GCC C-3'
T6D-low	5'-GGG CTA TAG GTG CCC CTA TCT GCT CGC TTG TTC CTG G-3'
T9D-up	5'-GCA ACC AGG GGC GAC TAT AGC CCG AGC GC-3'
T9D-low	5'-GCG CTC GGG CTA TAG TCG CCC CTG GTT GC-3'
DD-for	5'-GGA ACA AGC GAG CAG ATA GGG GCG ATT ATA GCC CGA

	GCG-3'
DD-rev	5'-CGC TCG GGC TAT AAT CGC CCC TAT CTG CTC GCT TGT TCC-3'
AA-for	5'-GGA ACA AGC GAG CAG CCA GGG GCG CCT ATA GCC CGA GCG-3'
AA-rev	5'-CGC TCG GGC TAT AGG CGC CCC TGG CTG CTC GCT TGT TCC-3'

Alle Primer wurden von BioTeZ Berlin-Buch GmbH bezogen.

4.1.2.1. Herstellung der Konstrukte 39.1-AMB und 39.1-Y10A/E16A

Für die Klonierung der Konstrukte 39.1-AMB (Deletion des C-Terminus) und 39.1-Y10A/E16A (Austausch der 10. und 16. Aminosäure jeweils gegen Alanin) wurde auf Vorarbeiten aus meiner Diplomarbeit (Fornacon, 2001) zurückgegriffen. Hier wurde das Myc-Epitop aus den Konstrukten AMB, 10+16, A10 und 16 (Klebes, 1999) herausgeschnitten, das Insert religiert und in den pUAST Vektor umklont. Zwischen Transmembran- und zytoplasmatischer Domäne wurde von A. Wodarz (Wodarz, 1993) im ursprünglichen Plasmid 37.1 eine *Bgl* II-Schnittstelle eingeführt, die in der Wildtypsequenz nicht vorhanden ist. Diese *Bgl* II-Schnittstelle wurde genutzt um ein FLAG-Epitop (Hopp et al., 1988) einzuführen. Dazu wurden die entsprechenden Oligonukleotide, deren überhängende Enden zu den entstehenden *Bgl* II Enden passten, hybridisiert und kinasiert und über die *Bgl* II-Schnittstelle in die Plasmide kloniert.

Hybridisierung: jeweils 10 µg Oligonukleotide einsetzen

FLAG-1 ⇒ 20,5 µl

FLAG-2 ⇒ 21 µl ⇒ ergibt zusammen ca. 40 µl

- Oligonukleotidpaare zusammengeben und für 5 min. auf 95°C erhitzen, danach langsam auf RT abkühlen lassen ⇒ kurz herunterzentrifugieren

Kinasierung: 1 µg hybridisierte Oligos (hier 8 µl bzw. 4 µl)
 + 4 µl Kinasepuffer 10x
 + 2 µl ATP (0,1 mM)
 + 1 µl T4-Polynukleotidkinase (10 U/µl)
 mit ddH₂O auf 40 µl auffüllen

- für 15 min. auf 37°C, dann für 15 min. auf 70°C und dann auf Eis

Ligation Standardprotokoll: Zur Ligation der einzelnen Fragmente wurde ein Vektor zu Insert-Verhältnis von 1:3-5 verwendet (Abschätzung visuell durch ein Agarosegel oder durch Mengenbestimmung mit Hilfe des Biophotometers), wobei ungefähr 100 ng Vektor eingesetzt wurden. Standardmäßig wurden Ligationen bei 16°C ü.N. oder bei 25°C für 1 h (hier Deaktivierung der Ligase durch Inkubation für 15 min. auf 65°C) durchgeführt. Einem 16 µl Ansatz werden 2 µl Ligasepuffer und 2 µl T4-DNA-Ligase zugefügt.

Bei erfolgreicher Ligation war die *Bgl* II-Schnittstelle nicht mehr vorhanden, so dass der Vektor mit diesem Enzym nicht mehr linearisiert werden konnte. Als Kontrolle wurde der Vektor mit *Eco* RI geschnitten, welches den Vektor linearisieren sollte, damit sichergestellt werden konnte, dass der Vektor in Ordnung war.

Auf diese Art und Weise konnte allerdings nicht festgestellt werden, ob das Epitop in der richtigen Orientierung integriert wurde. Zu diesem Zweck wurde das Insert durch die MWG Biotech AG, Ebersberg sequenziert.

4.1.2.2. *in vitro* Mutagenese der intrazellulären Domäne mittels des Stratagene QuikChange® II Site-Directed Mutagenesis Kits

Zur Charakterisierung der Funktion der Phosphorylation der intrazellulären Domäne wurden folgende Konstrukte (Tab.II.6) kloniert und mittels der Mikromanipulation in *Drosophila*-Embryonen injiziert.

Tabelle II.6: "Charakterisierung der Konstrukte "

Bezeichnung des Konstruktes	Epitop	Beschreibung
8Myc-Crbi	8x Myc	Intrazelluläre Domäne von Crb

FLAG-Crbi-T6A	FLAG	Intrazelluläre Domäne von Crb mit Austausch des Threonins an Position 6 gegen Alanin
8Myc-Crbi-T9A	8x Myc	Intrazelluläre Domäne von Crb mit Austausch des Threonins an Position 9 gegen Alanin
FLAG-Crbi-T9A	FLAG	Intrazelluläre Domäne von Crb mit Austausch des Threonins an Position 9 gegen Alanin
8Myc-Crbi-T6D	8x Myc	Intrazelluläre Domäne von Crb mit Austausch des Threonins an Position 6 gegen Asparaginsäure
8Myc-Crbi-T9D	8x Myc	Intrazelluläre Domäne von Crb mit Austausch des Threonins an Position 9 gegen Asparaginsäure
FLAG-Crbi-S11A	FLAG	Intrazelluläre Domäne von Crb mit Austausch des Serins an Position 11 gegen Alanin
FLAG-Crbi-S13A	FLAG	Intrazelluläre Domäne von Crb mit Austausch des Serins an Position 13 gegen Alanin
FLAG-Crbi-T6AT9A	FLAG	Intrazelluläre Domäne von Crb mit Austausch der Threonine an Position 6 und 9 gegen Alanin
8Myc-Crbi- Δ ERLI	8x Myc	Intrazelluläre Domäne von Crb mit Deletion des C-Terminus
8Myc-Crbi-T6A- Δ ERLI	8x Myc	Intrazelluläre Domäne mit Deletion des C-Terminus von Crb mit Austausch des Threonins an Position 6 gegen Alanin
8Myc-Crbi-T9A- Δ ERLI	8x Myc	Intrazelluläre Domäne mit Deletion des C-Terminus von Crb mit Austausch des Threonins an Position 9 gegen Alanin
8Myc-Crbi-T6D- Δ ERLI	8x Myc	Intrazelluläre Domäne mit Deletion des C-Terminus von Crb mit Austausch des Threonins an Position 6 gegen Asparaginsäure
8Myc-Crbi-T9D- Δ ERLI	8x Myc	Intrazelluläre Domäne mit Deletion des C-Terminus von Crb mit Austausch des Threonins an Position 9 gegen Asparaginsäure
8Myc-Crbi-T6DT9D- Δ ERLI	8x Myc	Intrazelluläre Domäne mit Deletion des C-Terminus von Crb mit Austausch der Threonine an Position 6 und 9 gegen Asparaginsäure

Zur Klonierung der Konstrukte mit der gesamten intrazellulären Domäne und dem 8 Myc-Epitop wurde wiederum auf das Plasmid 37.1 von Wodarz, 1993 zurückgegriffen. Zuerst wurde dieses mittels *Bgl* II linearisiert und ein mit *Bgl* II und *Bam* HI restringiertes 8Myc-Epitop inseriert.

Zur Mutagenese der Konstrukte mit der gesamten intrazellulären Domäne und dem FLAG Epitop wurde das Konstrukt 39.1 (Fornacon, 2001) verwendet.

Um die Konstrukte mit der intrazellulären Domäne, denen der C-Terminus fehlt zu klonieren wurde das Konstrukt 39.1-AMB s.o. eingesetzt. Das FLAG-Epitop wurde mit Hilfe eines Restriktionsverdau mit *Xho* II entfernt und das 8Myc-Epitop ebenfalls mit *Bgl* II und *Bam* HI überhängenden Enden hineinligiert.

Nun wurde die *in vitro* Mutagenese mittels des Quik-Change XL® Kits von Stratagene durchgeführt. Die Methode beruht darauf, dass Primer synthetisiert werden, die die gewünschte Mutation enthalten und an das Plasmid hybridisieren können. Der parentale nicht mutagenisierte Strang ist im Gegensatz zum Tochterstrang methyliert und wird anschließend mit Hilfe der Restriktionsendonuklease *Dpn* I abgebaut. Die verbleibenden Tochterstränge werden in superkompetente XL1-Blue Zellen transformiert und die Ligation und Amplifikation erfolgt in den Wirtszellen.

Für die Synthese der mutagenisierten Tochterstränge wurden Primer verwendet die in Tab.II.5 aufgeführt sind und die Mutagenese erfolgte nach Protokoll des Herstellers.

Da eine Mutagenese im pUAST-Vektor trotz Verwendung des QuikChange® XL Kits nicht erfolgreich war wurden die jeweiligen Inserts über die *Eco* RI/*Xba* I Schnittstellen in den pBluescript und nach erfolgreicher Mutagenese zurück in den pUAST-Vektor kloniert. Nun konnte eine Injektion in *Drosophila*-Embryonen erfolgen.

4.1.2.3. Herstellung der Konstrukte für das Hefe-2-Hybridsystem

Zur Klonierung der PDZ-Domänen der Proteine CG1976, CG9326 und InaD (Sequenzen siehe Anhang) wurden Primer erstellt, die die für die PDZ-Domänen kodierende Sequenz amplifizieren können (siehe Tabelle II.5). Anschließend wurde eine RT-PCR mittels des QIAGEN® One Step RT-PCR Kits auf poly A+ mRNA aus Wildtypembryonen von *Drosophila melanogaster* von ü.N. Ablagen durchgeführt. Die mRNA wurde aus ca. 30 mg Embryonen mit dem µMACS™ mRNA Isolations Kit, *Miltenyi* nach Angaben des Herstellers isoliert und hatte eine Endkonzentration von ~10 ng/µl. Nach Überprüfung der Größe des amplifizierten Produktes wurden die Amplicons mit *Nco* I und *Bam* HI restringiert, so dass sie über die entsprechenden überhängenden Enden sowohl in den pACT2 als auch in den pGBKT7 Vektor kloniert werden konnten. Eine Überprüfung der Klonierung erfolgte durch eine Sequenzierung der Plasmide durch die Firma Agowa, Berlin.

Außerdem wurden verwendet Crbi-pGBKT7 und Crbi- Δ ERLI-pGBKT7 (Kempkens, 2006), *DmPar-6* full length-pACT2 (Ramrath, 2002), Sdt-PDZ-pACT2 von Berger, S. unveröffentlicht und MPP4 (PDZ + Guk)-pACT2 von Bachmann, A. unveröffentlicht.

5. Mikromanipulation von *Drosophila melanogaster*

Die Konstrukte aus Kapitel 4.1.2.1 und 4.1.2.2. wurden in *Drosophila* Embryonen injiziert, um transgene Fliegenstämme zu erzeugen (Spradling, 1986). Für den Gentransfer werden P-Elemente genutzt. Diese besitzen an beiden Enden 'inverted repeats', die als Erkennungssequenz für eine Transposase dienen und somit im Genom integriert werden. Das P-Element und die Transposase sind bei dieser Technik der Keimbahntransformation auf zwei unterschiedlichen Plasmiden lokalisiert. Bei dem P-Element-Vektor handelt es sich um den pUAST-Vektor, in dem die zu transformierende DNA zwischen die 'inverted repeats' hinter eine UAS-Sequenz kloniert wurde, damit das Konstrukt später mit Hilfe des UAS-GAL4-Systems exprimiert werden kann. Dagegen stellt ein sogenanntes Helfer-Plasmid (pUChs π Δ 2-3, Laski et al., 1986) die Transposase zur Verfügung, die in trans für eine Integration der DNA ins Fliegen-genom sorgt.

Injektionsmix: 4 μ g P-Element-Vektor (39.1)

1 μ g Helferplasmid (pUChs π Δ 2-3)

1 μ l 10xInjektionspuffer (5mM KCl, 0,1mM Na-Phosphatpuffer pH 6,8)

1 μ l 2% Phenolrot

mit ddH₂O auf 10 μ l auffüllen und 5' bei 13000 rpm zentrifugieren,

Schwebeteilchen pelletiert werden

Injektionskapillaren: Glaskapillaren aus Sodaklarglas (*Hilgenberg*, Malsfeld)

- werden mit dem Mikroelektrodenpuller PUL-1 (*W-P Instruments Inc.*, New Haven, USA) bei der Einstellung Delay 2, heat 10 gezogen und danach 5 min. unter einem Anstellwinkel von ca. 30° geschliffen (*Bachofer*, Reutlingen)
- werden dann in den Mikromanipulator (*Narishige*, Tokyo Japan) eingespannt und von hinten mit 3S Voltalef-Fluorocarbon-Öl (*Lehmann und Voss*, Hamburg) befüllt

- aus dem Überstand des Injektionsmixes 1 μ l auf ein silikonisiertes Deckglas pipettieren und nun unter mikroskopischer Kontrolle von vorn in die Kapillare aufziehen

Für die Injektionen werden w^- - Embryonen (w^{1118}) benutzt. Transgene Fliegen können nun anhand ihrer Augenfarbe identifiziert werden, da der P-Element-Transformationsvektor ein w^+ - Gen trägt und bei Integration in das Genom haben die Fliegen je nach Integrationsort eine Augenfarbe von schwach gelb bis dunkelrot.

Die Injektion in den posterioren Teil der w^- - Embryonen erfolgt vor Bildung der Polzellen, welche die spätere Keimbahn der Fliege bilden. Auf diese Art und Weise wird die DNA bei der Zellbildung internalisiert und ins Genom der Polzellen integriert. Dies ist etwa bis 1,5 h nach der Befruchtung möglich, weil der Embryo bis dahin ein Synzytium von sich teilenden Zellen darstellt und erst jetzt der Prozess der Zellularisierung einsetzt. (Campos-Ortega und Hartenstein, 1997)

Zwei Tage vor Beginn der Mikroinjektion werden die w^- - Fliegen auf Apfelsaftplatten zur Eiablage gesetzt und die Platten häufiger gewechselt, weil dadurch mehr Eier gelegt werden und die Embryonen einer Ablage vom Alter her synchronisiert sind.

w^- - Fliegen werden für ca. 30 min. auf Apfelsaftplatten gesetzt und die abgelegten Eier von Hand oder chemisch (2 min. in einem 1:1 Gemisch von Natriumhypochlorid und H_2O) dechoronisiert. Anschließend werden die Embryonen in gleicher Orientierung auf einem Apfelsaft-Agarblöckchen aufgereiht und auf ein vorher mit Kleber (tesa-Pak Paketklebeband, *Beiersdorf* Hamburg \Rightarrow einige Tage in Heptan einweichen, dann abzentrifugieren und den Überstand verwenden) bestrichenes Deckglas übertragen. Nun lässt man die Embryonen unter optischer Kontrolle trocknen, bis sich bei Berührung mit einer Präpariernadel Falten bilden. Das Deckglas wird auf einem Objektträger fixiert und die Embryonen mit 3S Voltalef-Öl überschichtet. Die Injektionen erfolgen unter dem Mikroskop mit dem vorbereiteten Mikromanipulator. Der Injektionsdruck kann über eine Mikrometerschraube variiert werden und sollte so eingestellt sein, dass der Injektionsmix erst beim Eindringen in einen Embryo ausfließt. Dies kann durch den Phenolrot-Zusatz gut kontrolliert werden. Fertig injizierte Embryonen werden mit 3S-Voltalef-Öl überschichtet und bis zum Schlüpfen in einer feuchten Kammer bei 18°C aufbewahrt. Geschlüpfte L1-Larven werden zu 50 Individuen in ein vorbereitetes frisches

Fliegenröhrchen (Brei wird aufgelockert und einem Klecks Hefe versehen) gesammelt und bis zum Schlüpfen der adulten Fliegen ebenfalls bei 18°C gehalten.

Die geschlüpften Fliegen werden einzeln mit w; Gla/CyO Fliegen gekreuzt. Bei den daraus entstehenden Fliegen ist nun die Änderung der Augenfarbe bei Integration des P-Element-Transformationsvektors sichtbar. Von den Linien, in denen die DNA in die Keimbahn integriert wurde, werden 5-10 Fliegen wiederum in Einzelkreuzungen mit w; Gla/CyO Fliegen angesetzt, um den Integrationsort aufgrund des entstehenden Aufspaltungsverhältnisses des Phänotyps zu bestimmen.

Danach werden Stämme etabliert, indem Männchen und Weibchen einer Linie mit einem Balancer (z.B. CyO) miteinander gekreuzt werden und aus der Folgegeneration nur die Fliegen ohne Balancer weitergekreuzt werden. Für erstchromosomale und drittchromosomale Insertionen müssen die entsprechenden Balancer eingekreuzt werden.

Tabelle II.7 Etablierte transgene Fliegenlinien

Konstrukt	Linie	Insertionsort	Bemerkung
39.1-AMB	41.2 67.4 67.14	II.Chr. II.Chr. II.Chr.	verwendet für Rettungsexperimente und Co-Immunopräzipitation
39.1-Y10A/E16A	18.9 61.5 61.7 74.2 77.1	II.Chr. I.Chr. III.Chr. II.Chr. II.Chr.	verwendet für Rettungsexperimente und Co-Immunopräzipitation
39.1-E16A	4.1 4.3 72.1 81.2 88.2 184.1 184.2	I.Chr. II.Chr. II.Chr. II.Chr. II.Chr. II.Chr. II.Chr.	
8Myc-Crbi	16.1 16.2 16.5 16.6	II. Chr. II. Chr. III. Chr. III. Chr.	verwendet für Überexpression
FLAG-Crbi-T6A	38.3 38.4 52.1	III. Chr. III. Chr. II. Chr.	verwendet für Rettungsexperimente und Überexpression
FLAG-Crbi-T9A	36.1 36.3	III.Chr. III.Chr.	
8Myc-Crbi-T9A	4.2	III.Chr.	

Material und Methoden

	4.5 17.1 19.2 54.2 59.1 60.1 60.3 66.1 70.2	III.Chr. III.Chr. III.Chr. III.Chr. III.Chr. II.Chr. III.Chr. II.Chr. III.Chr.	verwendet für Rettungsexperimente und Überexpression
FLAG-Crbi-T6AT9A	8.2 8.3 25.1 28.1 41.1 65.3	III.Chr. III.Chr. III.Chr. III.Chr. III.Chr. III.Chr.	
8Myc-Crbi-T6D	25.1 25.2 41.1 41.2 43.3	III.Chr. III.Chr. III.Chr. III.Chr. II.Chr.	verwendet für Rettungsexperimente und Überexpression
8Myc-Crbi-T9D	10.1 10.2 17.2 35.1 40.1 48.3 50.1 50.3 56.1 56.3 57.1 65.1 79.1	II.Chr. III.Chr. III.Chr. III.Chr. II.Chr. III.Chr. II.Chr. II.Chr. II.Chr. II.Chr. III.Chr. II.Chr. II.Chr.	verwendet für Rettungsexperimente und Überexpression
FLAG-Crbi-S13A	11.1 11.3	III.Chr. II.Chr.	
8Myc-Crbi- Δ ERLI	8.2 8.3 9.1	III.Chr. III.Chr. III.Chr.	verwendet für Überexpression
8Myc-Crbi-T6A- Δ ERLI	12.1 12.2 12.3 15.1 15.2 20.2 20.3	III.Chr. III.Chr. III.Chr. III.Chr. III.Chr. II.Chr. III.Chr.	verwendet für Rettungsexperimente und Überexpression
8Myc-Crbi-T9A- Δ ERLI	14.1 14.2 16.1 16.2 16.5 20.2 20.3 27.1	III.Chr. III.Chr. III.Chr. II.Chr. II.Chr. III.Chr. III.Chr. III.Chr.	

	27.2	II.Chr.	verwendet für Rettungsexperimente und Überexpression
	27.3	III.Chr.	
8Myc-Crbi-T6D- Δ ERLI	40.1 40.3 98.1 98.2 106.3	II.Chr. III.Chr. II.Chr. II.Chr. III.Chr.	verwendet für Rettungsexperimente und Überexpression
8Myc-Crbi-T9D- Δ ERLI	15.1 15.2 37.1 37.3 59.1 59.2 64.1 86.2 86.3 89.2 105.2	III.Chr. III.Chr. II.Chr. II.Chr. III.Chr. III.Chr. III.Chr. II.Chr. III.Chr. III.Chr. III.Chr.	verwendet für Rettungsexperimente und Überexpression
8Myc-Crbi-T6DT9D- Δ ERLI	5.3 5.4 6.1 6.2 6.3 8.2 15.1 15.6 15.7 37.1	III.Chr. III.Chr. II.Chr. III.Chr. II.Chr. III.Chr. II.Chr. II.Chr. III.Chr. II.Chr.	verwendet für Rettungsexperimente und Überexpression

6. Arbeiten mit Proteinen

6.1. Co-Immunopräzipitation

Hierbei handelt es sich um eine Methode, mit der das untersuchte Protein zusammen mit seinen Interaktionspartnern aus einer *in vivo* Situation isoliert wird. Dazu wurde die wildtypische zytoplasmatische Domäne von Crumbs mit einem FLAG-Epitop versehen und überexprimiert. Dieses überexprimierte Protein wird aus dem Proteinextrakt der Embryonen mit Hilfe eines Antikörpers gegen das FLAG-Epitop (M2-FLAG®-Agarose) nach Herstellerangaben isoliert und der Größe nach in einem SDS-Gel aufgetrennt. Als Kontrolle wurde die Co-Immunopräzipitation mit FLAG-Crb-intra- Δ ERLI, FLAG-Crb-intra-Y10A/E16A bzw. Wildtyplysate durchgeführt. Der Vergleich mit der Kontrolle führt nun zur Isolierung spezifischer putativer Interaktionspartner von Crumbs. Die Identifikation der Peptide erfolgt mittels der Massenspektrometrie.

Für die Co-Immunopräzipitation wurden die Embryonen der Kreuzung :

39.1-1a x GAL4^{daG32}

39.1-AMB x GAL4^{daG32}

39.1-Y10A/E16A x GAL4^{daG32} verwendet.

- Embryonen dechorionisieren und in Lysispuffer mit einem Dounce Homogenisator homogenisieren

Lysispuffer: Hepes-Lysispuffer: 25 mM Hepes pH 7,5; 100 mM NaCl; 1 mM CaCl₂; 1 mM MgCl₂; 1% Triton X-100 (erst nach dem autoklavieren hinzufügen); ⇒ frisch dazugeben 1 µM Pefablock, 5 µM Leupeptin, 1 µM Pepstatin und 0,3 µM Aprotinin

RIPA-Lysispuffer: 50 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl; 1% NP-40; 0,5% Natriumdeoxycholat; 0,1% SDS

Chaps-Lysispuffer: 20 mM Tris-HCl pH 8,0; 150 mM NaCl; 10% Glycerin; 2 mM EDTA; 10 mM Chaps

- 30 min. auf Eis inkubieren
- 30 min. bei 13000 rpm und 4°C zentrifugieren
- Überstand in ein neues Gefäß überführen (Lipidschicht – nicht überführen) und erneut zentrifugieren ⇒ evtl. noch ein drittes Mal wiederholen
- Proteinbestimmung nach Bradford – 200 µl RotiQuant (*Roth*, Karlsruhe) + 800 µl ddH₂O + 2 µl Embryonenlysat Vgl. mit Eichreihe OD₅₉₅ (OD₅₉₅ von 0,1 entspricht ca. 1 mg/ml Gesamtprotein)

Diese Methode beruht darauf, daß sich das Absorptionsmaximum von Coomassie Brilliant Blau (ein blauer Säurefarbstoff) in Gegenwart von Proteinen und in saurem Milieu von 465 nm nach 595 nm verschiebt. Der Grund ist vermutlich die Stabilisierung des Farbstoffs in seiner unprotonierten, anionischen Sulfonatform durch Komplexbildung zwischen Farbstoff und Protein. Der Farbstoff bindet dabei unspezifisch an kationische, nichtpolare, hydrophobe Seitenketten der Proteine.

6.2. SDS-PAGE

Proteine können der Größe nach mit Hilfe eines SDS-Gels aufgetrennt werden. Diese Methode wird auch diskontinuierliche Elektrophorese nach Laemmli genannt. Durch die Diskontinuität (Auftrennung in Sammelgel pH 6,8 und Trenngel pH 8,8) wird das Aggregieren von Proteinen beim Eintritt in das Gel verhindert und man erhält schärfere Banden.

Für Standard-SDS-Gele wurde die Mini-Protean-Apparatur von *BioRad*, München genutzt und folgende Rezeptur nach Sambrook et al., 2001 verwendet.

Lower, separating gel (10%): 2,5 ml 30% Acrylamid/BIS (29:1); 2,8 ml 1 M Tris pH 8,8; 38 µl 20% SDS; 2,1 ml H₂O; 30 µl 10% APS; 8 µl TEMED
für ein 7,5%-Gel–1,9 ml Acrylamid/BIS und 2,7 ml H₂O
für ein 12,5%-Gel–3,1 ml -“- und 1,5 ml H₂O
für ein 15%-Gel–3,75 ml -“- und 0,85 ml H₂O

Upper, stacking gel: 310 µl Acrylamid/BIS (29:1); 235 µl 1 M Tris pH 6,8 ; 10 µl 20% SDS; 1,3 ml H₂O; 10 µl 10% APS; 5 µl TEMED

Zum Gellauf wird SDS-Elektrophoresepuffer verwendet. (Stammlösung 10x: 0,25 M TRIZMA; 1,92 M Glycin; 1% SDS)

Die Proben werden standardmäßig mit 2x SDS-Probenpuffer (4% SDS; 100 mM Tris-HCl pH 6,8; 200mM DTT, 20% Glycerin) versetzt, für 5-10 min. im Wasserbad gekocht und sofort auf Eis gekühlt.

Die Gele werden bei 200 V für ca. 1 h gefahren.

Für große SDS-Gele (14 x 15 cm) wurde das System Hoefer™ SE 600 verwendet und Trenn- bzw. Sammelgel nach Sambrook et al., 2001 hergestellt. Der Gellauf erfolgte ebenfalls bei 200 V für ca. 4 h.

Gradientengele wurden ebenfalls mit dem System Hoefer™ SE 600 durchgeführt.

Dazu wurden folgende Stammlösungen angesetzt:

Trenngel 5%: 10 ml 1,5 M Tris, pH 8,8; 6,7 ml Acrylamid/Bis 19:1 30%ig; 28,3 ml dH₂O; 0,4 ml SDS 10%

Trenngel 15%: 10 ml 1,5 M Tris, pH 8,8; 20 ml Acrylamid/Bis 19:1 30%; 15 ml dH₂O; 0,4 ml SDS 10%

Für ein Trenngel werden jeweils 9 ml 5%iges und 9 ml 15 %iges mit je 90 µl APS 10% und 9 µl TEMED versetzt und in die Gradientengelgiessapparatur eingefüllt, so dass zuerst das 15 %ige Gel einläuft und sich langsam mit dem 5 %igen mischt. Das Gelgemisch wird mit Isopropanol bedeckt und nach erfolgter Auspolymerisation wird das Sammelgel daraufgegeben. Für das Sammelgel wird folgende Stammlösung angesetzt:

Sammelgel 5%: 12,5 ml 0,5 M Tris-HCl pH 6,8; 8,4 ml Acrylamid/Bis 19:1 30%: 28,3 ml dH₂O; 0,5 ml SDS 10%

Für ein Sammelgel werden 10 ml der Stammlösung mit 100 µl APS 10% und 10 µl TEMED versetzt und auf das Trenngel aufpolymerisiert.

Der Gellauf erfolgt für 15,5 h bei 60V und 30-40mA.

6.2.1. 2D-Gelelektrophorese

Die 2D-Gelelektrophorese ist eine Methode (O`Farell, 1975 und Klose,1975), bei der die Proteine in der ersten Dimension aufgrund ihres isoelektrischen Punktes und in der zweiten Dimension nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Dadurch ist eine wesentliche feinere Auflösung im Gegensatz zur normalen SDS-Gelelektrophorese möglich, da jeder sichtbare ‚Spot‘ eine einzelnes Protein reflektiert.

Für die 2D-Gelelektrophorese in dieser Arbeit wurde für die erste Dimension das IPGphor™ Isoelectric Focusing System von *Amersham Pharmacia Biotech* und für die zweite Dimension die Hoefer™ SE 600 Kammer für 14 x 15 cm Gele verwendet.

Die Proben aus der Co-Immunopräzipitation wurden wie folgt zur Auftragung auf die Immobiline DryStrip Gele (pH 3-10 L, *Amersham Pharmacia Biotech*) vorbereitet:

- Proben werden mit 3 Volumen 100% eiskaltem Aceton versetzt, für 15 min. auf Eis inkubiert und 30 min. bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert

- der Überstand wird vorsichtig abgenommen und das Pellet auf Eis luftgetrocknet
- das Pellet wird in 250 µl Rehydratationspuffer, Hoving et al., 2002 (7 M Harnstoff; 2 M Thioharnstoff; 4% Chaps; 2,5% DTT – frisch dazugeben; 10% Isopropanol; 5% Glycerin, 2% IPG-Puffer 3-10, *Amersham Pharmacia Biotech*; Bromphenolblau) gelöst und in die Keramik IPGphor Strip Halter pipettiert
- dann wird das Immobiline DryStrip Gel mit der Gelseite nach unten eingelegt und mit IPG Cover Fluid überschichtet.

Die Fokussierung im IPGphor™ Isoelectric Focusing System erfolgte nach folgendem Protokoll:

Schritt	Spannung	Dauer	Voltage-hour (Vh)	Gradiententyp
1	Rehydrierung	14 h		
2	500	1 h	500	Step-n-hold
3	1000	1 h	1000	Step-n-hold
4	8000	2 h	16000	Step-n-hold

Nach abgeschlossener Fokussierung der Proteine entsprechend ihres isoelektrischen Punktes werden die Immobiline DryStrip Gele vor dem Auftragen auf die zweite Dimension für 10 min. in SDS-Äquilibriumspuffer (50 mM Tris-HCL pH 8,8; 6 M Harnstoff; 30% Glycerin; 2% SDS; ein paar Körnchen Bromphenolblau) mit 100 mg DTT pro 10 ml Puffer und anschließend für 20 min. in SDS- Äquilibriumspuffer mit 250 mg Jodacetamid pro 10 ml Puffer äquilibriert. Sowohl DTT als auch Jodacetamid müssen frisch hinzugegeben werden.

SDS-PAGE's wurden nach erfolgter Auftrennung der Proteine mit Coomassie oder Silber zum Nachweis aller Proteine gefärbt bzw. werden einzelne Proteine spezifisch mit Hilfe des Western-Blot nachgewiesen.

Standard-Coomassiefärbung: (Sambrook et al., 2001)

- 0,25 g Coomassie Brilliant Blau R250 in 100 ml 45% Methanol; 10% Eisessig lösen und durch einen Whatmanfilter Nr.1 geben.
- das Gel wird für mind. 4 h im fünffachen Gelvolumen geschüttelt und anschließend in 45% Methanol; 10% Eisessig 4-24 h entfärbt (Entfärber mehrfach wechseln)

- eine Lagerung des Gels kann eingeschweißt bei 4°C in dH₂O oder in 20% Glyzerin erfolgen

Kolloidal-Coomassiefärbung: (Kang et al., 2002)

- 0,02% Coomassie Brilliant Blau G250; 2% (w/v) Phosphorsäure; 5% Aluminiumsulfat, 10% Ethanol
- das Gel wird für mind. 4 h im fünffachen Gelvolumen geschüttelt und anschließend mit dH₂O oder mit 0,2% Phosphorsäure, 0,5% Aluminiumsulfat, 1% Ethanol 2-12 h entfärbt. (Lagerung siehe oben)

MS kompatible Silberfärbung:

- das Gel wird 20 min. in Fixierer I (5% Essigsäure, 50% Methanol) fixiert
- danach wird das Gel 2x für 10 min. in Fixierer II (50% Essigsäure) fixiert und für 10 min. in dH₂O gewaschen
- es folgt eine Inkubation mit 0,02% Natriumthiosulfat für 1 min. und anschließend wird 3x 20 min. mit dH₂O gewaschen
- das Gel wird nun für 20 min. in 0,2% Silbernitrat + 200 µl Formaldehyd pro Liter inkubiert und wiederum 3x 20 min. mit dH₂O gewaschen
- das Gel wird für 5-10 min. mit dem Entwickler (3% Natriumcarbonat; 0,0005% Natriumthiosulfat + 500 µl Formaldehyd pro Liter) inkubiert – die Lösung sollte farblos bleiben, falls eine Gelbfärbung eintritt den Entwickler wechseln
- nach ausreichender Färbung wird die Reaktion mit 5%iger Essigsäure abgestoppt
- eine Lagerung des Gels kann in 1%iger Essigsäure erfolgen

6.2.2. Western Blot

- Nitrozellulosemembran und Whatmanpapier in Gelgröße zurechtschneiden
- weiße Pads in Western Transferpuffer einweichen
- Nitrozellulosemembran kurz in ddH₂O einweichen
- Apparatur in folgender Reihenfolge zusammensetzen:
- (-)-Pol (schwarz) ⇒ weißes Pad ⇒ Whatmanpapier ⇒ SDS-Gel ⇒ Nitrozellulose-

membran ⇒ Whatmanpapier ⇒ weißes Pad ⇒ (+)-Pol (rot) Sandwich in entsprechend der Polung in Gelhalter in die mit Western Transferpuffer gefüllte Kammer stecken

- Proteintransfer erfolgt für 1 h bei 100 V bei 4°C
- danach die Nitrozellulosemembran in eine Wanne überführen und Ponceau S für 1 min. hinzufügen ⇒ mit dH₂O kurz entfärben ⇒ Kontrolle des Transfers
- mit Blocking-Reagenz (3% Milchpulver; 1% BSA in TBST) bedecken und für 30 min. bei RT inkubieren
- dann den ersten Antikörper in der gewünschten Konzentration in 2-3 ml Blocking-Reagenz geben und zusammen mit dem Gel in Plastikfolie einschweißen und ü.N. bei 4°C schwenken
- dann 3-4x für 10 min. in TBST waschen
- den zweiten AK in entsprechender Konzentration in 20-30 ml Blocking-Reagenz lösen und für 1-2 h bei RT (oder bei 4°C ü.N.) schwenken
- wiederum 4x mit TBST waschen
- während des Waschens die ECL-Reagenz (Boehringer) ansetzen ⇒ pro Blot 3 ml
- den Filter mit dem ECL-Reagenz für 1 min. inkubieren, in Frischhaltefolie wickeln und anschließend sofort einen Röntgenfilm (10 sec. oder länger) exponieren
(10x TBS: 0,2 M Tris-Cl pH 8,0 ; 1,5 M NaCl; TBST: 1x TBS + 0,2% Tween20)

Tabelle II.8: „Verwendete Primäre Antikörper für den Western Blot“

Epitop	Organismus	Verdünnung	Hersteller
DLin-7	Kaninchen	1:2000	Bachmann,2004
FLAG-M2	Maus	1:2000	Sigma
DPatj	Kaninchen	1:2000	Richard et al., 2005
Sdt-MPDZ	Kaninchen	1:500	Berger, 2005

Tabelle II.9: „Verwendete Sekundärantikörper für den Western-Blot“

Name	Konjugat	Verdünnung	Hersteller
Ziege-anti-Kaninchen	HRP	1:10.000	Dianova
Ziege-anti-Maus	HRP	1:10.000	Dianova

Für die Identifizierung der Proteine anhand der Massenspektrometrie wurden die Kandidatenproteine aus den Silber gefärbten oder Coomassie gefärbten Gelen isoliert bzw. die präzipitierten Proteine in Lösung tryptisch verdaut.

6.3. In-Gel-Verdau Coomassiefärbung (BMFZ)

- Proteinbanden werden ausgeschnitten, in $\sim 1 \text{ mm}^3$ große Stücke geschnitten und in ein silikonisiertes Eppendorfreaktionsgefäß überführt.
- mit dH_2O waschen und anschließend 1x 10 min. und 3x 30 min. mit 100 μl 25 mM NH_4HCO_3 /50% AcN entfärben.
- 1x 30 min. mit 50 μl 100% AcN zur Dehydrierung der Gelstücke inkubieren, diese schrumpfen und werden weiß. AcN vorsichtig abnehmen und die Gelstücke mit Hilfe der Speedvac 30 – 60 min. trocknen.
- die Gelstücke werden nun in 10-20 μl Trypsin (0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ in 25 mM NH_4HCO_3) rehydriert und bei RT inkubiert, anschließend wird überschüssiges Trypsin vorsichtig entfernt, die Gelstücke mit 25 mM NH_4HCO_3 und über Nacht bei 37°C im Heizblock inkubiert.
- nun erfolgt die Extraktion der Peptide: nach Zentrifugation wird der Überstand abgenommen und zwei Teile dH_2O hinzugegeben. Danach wird 5 min. gevortext und die Probe 5 min. Ultraschall ausgesetzt, der Überstand wird abgenommen und mit dem vorherigen vereinigt.
- jetzt wird 3x 30 min. mit dem gleichen Volumen 5% HCOOH / 50% AcN, wie vorher dH_2O gevortext und die Überstände mit den vorherigen vereinigt
- zum Schluß werden die Gelstücke noch einmal mit 100% AcN dehydriert und der Überstand wiederum mit den vorherigen vereinigt.
- die Peptide werden an der Speedvac getrocknet und anschließend in 10 μl 1% HCOOH / 4% MeOH resuspendiert.
- nun erfolgt eine Entsalzung mittels ZIPTIP's: zur Vorbereitung werden die ZIPTIP's 3x mit 100% MeOH, 3x mit 1% HCOOH / 60% MeOH gewaschen und 3x mit 1% HCOOH / 4% MeOH äquilibriert. Die Peptide werden 10x hoch- und runterpipettiert und wiederum 3x mit 1% HCOOH / 60% MeOH gewaschen.

- die Elution der Peptide von der ZIPTIP-Säule erfolgt indem 10x mit 5 µl 1% HCOOH/ 60% MeOH hoch- und runterpipettiert wird und anschließend noch einmal mit 5 µl gespült wird.

6.4. Vorbereitung der Proben für den ‚in-Lösungsverdau‘

- Dialyse des Co-IP Eluats (Reduzierung der Chapskonzentration, da diese die MS-Messung beeinflusst): Chapspuffer (s.o.) enthält 10 mM Chaps – Zugabe von 3 Vol. dH₂O, so dass eine Konzentration von 2,5 mM Chaps vorliegt.
- die Probe wird in ein Dialyserähmchen von *Perbio Science* eingefüllt und 1 h gegen dH₂O und weitere 36 h mit regelmäßigen dH₂O Wechsel dialysiert.
- das Dialysat wird bei –80°C eingefroren und anschließend in silikonisierten Eppendorfreaktionsgefäßen (No-Stick Rnase free, *Ambion*) gefriergetrocknet.
- für den tryptischen Verdau wird das Dialysat in 100 µl 25 mM NH₄HCO₃ aufgenommen und gut gemischt (Vortexer und Ultraschallbad).
- anschließend werden 25 µl Trypsinlösung hinzugegeben (0,1 µg/µl gelöst in 25 mM NH₄HCO₃), für 3 h bei 37°C inkubiert und die Peptide an der Speedvac getrocknet.
- die Peptide werden mittels ZIPTIPs (10 µl Pipettenspitzen gefüllt mit C₁₈-Säulenmaterial) der Firma Millipore entsalzen. Dazu werden diese aktiviert durch aufziehen von 3x 10 µl 100% MeOH und 3x 10 µl 60% MeOH/1% HCOOH.
- die in 10 µl 4% MeOH/1% HCOOH gelöste Probe wird durch 10 maliges aufziehen auf das Säulenmaterial geladen und die Salze durch 3 maliges aufziehen von jeweils 10 µl 4% MeOH/1% HCOOH gewaschen.
- die Peptide werden fraktioniert eluiert, um die Komplexität der Probe zu reduzieren.
 - 1x 10 µl 10% MeOH/1% HCOOH, 10x auf- und abpipettieren
 - 1x 10 µl 20% MeOH/1% HCOOH, 10x auf- und abpipettieren
 - 1x 10 µl 30% MeOH/1% HCOOH, 10x auf- und abpipettieren
 - 1x 10 µl 40% MeOH/1% HCOOH, 10x auf- und abpipettieren
 - 1x 10 µl 50% MeOH/1% HCOOH, 10x auf- und abpipettieren
 - 1x 10 µl 60% MeOH/1% HCOOH, 10x auf- und abpipettieren

Zur Identifizierung von Proteinen mit Hilfe der Massenspektrometrie wurde im Zmbl in Köln (Tab.III.1 und 2) die MALDI TOF MS genutzt.

Im BMFZ, wo die Proben der Ergebnisse aus Tab.III.3 und 4 analysiert wurden, wurde eine Analyse der Proben mittels Esi-MS/MS durchgeführt. Dazu wurde ein Q-TOF Hybrid Massenspektrometer der Firma Applied Biosystems verwendet und die Ergebnisse mittels des Mascot Servers ausgewertet.

Die Firma Proteomics, Berlin verwendete zur Analyse ein Bruker Esquire Massenspektrometer und die Ergebnisse wurden ebenfalls mittels des Mascot Servers ausgewertet.

7. Hefe-2-Hybrid System

Durch die Zwei-Hybrid-Analyse können Interaktionen zwischen zwei Proteinen nachgewiesen werden. Ein Protein wird an eine spezifische DNA-Bindedomäne, das andere an eine Aktivierungsdomäne fusioniert. Im Falle einer Interaktion beider Proteine wird durch die Bindung an den Promotor ein Reportergen transkribiert, dessen Aktivität auf die Interaktion rückschließen lässt. Diese Methode (James et al., 1996) verwendet die Gal4-Aktivierungs- und -Bindedomäne aus *S. cerevisiae*. Als Reportergene dienen genomische *GAL1p*-HIS3, und *GAL1p*-MEL1 sowie *GAL1p-lacZ*, die im Falle von HIS3 Aminosäureprototrophie vermittelt, während mit Hilfe des lacZ-Gens und MEL1 Gens die Interaktion über eine enzymatische Umsetzung von synthetischen Substraten der β -Galaktosidase bzw. α -Galaktosidase gemessen werden kann.

Zum Nachweis einer möglichen Interaktion wurden die DNA-Konstrukte die für die Hybridproteine kodieren in den Hefestamm Y190 transformiert und auf synthetischen Minimalmedien, denen ein Gemisch aus Aminosäuren ohne den entsprechenden Auxotrophiemarker zugesetzt wurde, ausplattiert. Alternativ wurde eine Bestimmung der β -Galaktosidaseaktivität durchgeführt.

7.1. LiAc vermittelte Transformation von Plasmid DNA in *S. cerevisiae*

(Modifiziert nach dem Protokoll (PT3024-1) der Firma Clontech, Palo Alto, USA)

Für 6 Transformationen werden je 20 ml YPDA mit einer Einzelkolonie Hefe (Stamm Y190) inokkuliert und ü.N. bei 30°C und 200 rpm inkubiert und am nächsten Morgen auf eine OD₆₀₀ von 0,2 verdünnt. Nachdem die Hefekultur wieder eine OD₆₀₀ zwischen 0,6-

0,8 erreicht hat, wird mit der Transformation begonnen. Die Hefen werden für 5 min. bei 5000 rpm und RT abzentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig verworfen und das Pellet in 10 ml dH₂O resuspendiert. Es wird wiederum s.o. zentrifugiert und das Pellet in 10 ml 1x LiAc resuspendiert. Nach nochmaliger Zentrifugation s.o. wird das Pellet in 150 µl 1x TE/LiAc resuspendiert.

Jetzt werden 5 ml PEG/LiAc Lösung angesetzt (4 ml PEG; 0,5 ml 1 M LiAc und 0,5 ml dH₂O). Man gibt 1-2 µg der jeweiligen Plasmid-DNA's (Maximalvolumen je 3 µl) zusammen mit 2 µl denaturierter (5 min. gekocht) Herings-Sperma-DNA in ein Eppendorfreaktionsgefäß. Dann werden dazu je 50 µl der Hefezellen hinzugegeben und gut gemischt. Anschließend werden 300 µl der PEG/LiAc Lösung dazupipettiert, gevortext und das Gemisch bei 30°C für 30 min. bei 200 rpm inkubiert. Nun erfolgt ein Hitzeschock für 20 min. bei 42°C im Wasserbad und danach werden die Zellen sofort auf Eis gekühlt und durch kurze Zentrifugation bei 7000 rpm pelletiert. Das Pellet wird in 1 ml YPDA resuspendiert und für 1 h bei 30°C und 200 rpm inkubiert.

Die Zellen werden kurz herunterzentrifugiert und das Pellet in 100 µl dH₂O resuspendiert. Davon werden nun je 50 µl auf selektiven SD-Medium Platten ausgestrichen und 3-4 Tage bei 30°C inkubiert.

Die Interaktionsanalysen wurden in drei unabhängigen Versuchen wiederholt. Es wurden bei jedem Testansatz Positivkontrollen sowie Negativkontrollen durchgeführt.

YPD (Voll-) Medium: 20 g/l Difco Pepton; 10 g/l Hefe-Extrakt; 20 g/l Agar (nur für Platten), auf 50 ml mit dH₂O auffüllen, autoklavieren, nach dem Abkühlen auf ca. 55°C 2% Dextrose (Glukose) (50 ml einer sterilen 40% Stocklösung) zugeben

10x LiAc: 1 M Lithiumacetat, auf pH 7,5 einstellen, autoklavieren

50% PEG 3350: 50% PEG (Polyethylene glycol, MW: 3,350) in sterilem warmem dH₂O auflösen

10x TE Puffer: 0.1 M Tris-HCl, 10 mM EDTA, auf pH 7,5 autoklavieren

PEG/LiAc/TE-Lösung: 40% PEG 4000; 1x TE buffer ; 1x LiAc

SD (Selektiv-) Medium: 0,67% „Yeast nitrogen base w/o amino acids“, 20 g/l (nur für Platten) auf 850 ml auffüllen, nach dem Abkühlen auf ca. 55°C, 2% Dextrose (Glukose)

(50 ml einer sterilen 40% Stocklösung) und 100 ml einer sterilen 10x DO-Lösung zugeben.

10x DO (Dropout) Lösung: L-Adenine Hemisulfat Salz: 200 mg/l

L-Arginine HCl 200 mg/l

L-Histidine HCl Monohydrat 200 mg/l

L-Isoleucin 300 mg/l

L-Leucin 1000 mg/l

L-Lysin HCl 300 mg/l

L-Methionin 200 mg/l

L-Phenylalanin 500 mg/l

L-Threonin 2000 mg/l

L-Tryptophan 200 mg/l

L-Tyrosin 300 mg/l

L-Uracil 200 mg/l

L-Valin 1500 mg/l

auf 1l mit dH₂O auffüllen und autoklavieren

7.2. Qualitative Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität mit Hilfe des *colony-lift filter assay*

- 2 ml der Z-Puffer/X-Gal-Lösung werden luftblasenfrei auf ein Whatman-Filterpapier in einer Petrischale pipettiert
- danach wird eine sterile, verstärkte Nitrozellulose-Membranscheibe auf eine Platte mit mind. 30 Hefe-kolonien pro Transformation gelegt
- die Nitrozellulosemembran mit den übertragenen Hefekolonien wird für ca. 15 sec. in flüssigen Stickstoff gehalten
- nach dem Auftauen wird die Membran mit den Kolonien nach oben auf das mit Z-Puffer/X-Gal getränkte Whatmanpapier gelegt und bei 30°C ein bis vier Stunden inkubiert und die Blaufärbung dokumentiert

Z-Puffer/X-Gal-Lösung: 100 ml Z-Puffer; 0,27 ml β -Mercaptoethanol; 1,67ml X-Gal-Lösung

<u>Z-Puffer:</u>	62 mM Na ₂ HPO ₄ x 7H ₂ O; 40 mM NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O; 10 mM KCl; 1 mM MgSO ₄ x 7 H ₂ O pH 7.0 auf 1 l auffüllen, autoklavieren
<u>X-Gal-Lösung:</u>	20 mg/ml 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-Galactopyranosid in N,N-dimethylformamid (DMF), im Dunkeln bei-20°C aufbewahren

7.3. Quantitative Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität

Die genaue Bestimmung der β-Galaktosidase-Aktivität der Zellen, die in der Zwei-Hybrid-Analyse verwendet wurden, erfolgte mittels einer Endpunktbestimmung. Die OD₆₀₀ einer Übernachtskultur wurde gemessen und 1 ml dieser Kultur für 2 min. bei 13000 rpm abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 100 µl Lysis-Puffer (0,1 M Tris-HCl pH 7,5; 0,05 % Triton X-100) aufgenommen und mindestens zwei Stunden bei -70°C gefroren. Die Proben wurden bei 30°C aufgetaut und mit 750 µl Z-Puffer mit frischem ONPG (60 mM Na₂HPO₄; 40 mM NaH₂PO₄; 10mM KCl; 1 mM MgSO₄; 1 mg/ml O-Nitrophenyl-β-D-Galactopyranosid, pH 7,0) bis zur Gelbfärbung inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 500 µl 1 M Natriumcarbonat-Lösung gestoppt und die Inkubationszeit (t) ermittelt. Nach kurzem Abzentrifugieren wurde die Extinktion bei 420 nm photometrisch bestimmt, wobei die Extinktion 1,0 nicht überschritten werden sollte. Die Enzymaktivität wurde mit der folgenden Formel ermittelt (Golemis und Khazak, 1994; Miller, 1972):

$$(1000/t) \times (OD_{420}/OD_{600}) = y \text{ Miller-Units.}$$

Für den Test wurden jeweils doppelte Übernachtskulturen angesetzt, von denen wiederum Doppelproben untersucht wurden. Für jede untersuchte Protein-Interaktion wurden Positivkontrollen sowie Negativkontrollen durchgeführt.

III. Ergebnisse

1. Suche nach neuen Interaktionspartnern des Crb-Komplexes mittels Co-Immunopräzipitation und anschließender Identifikation durch Massenspektrometrie

Ziel dieser Arbeit war es, mit Hilfe des biochemischen Ansatzes der Co-Immunopräzipitation und durch anschließende Identifizierung der präzipitierten Proteine neue Komponenten des Crb-Komplexes zu finden und gegebenenfalls deren Einbindung und Funktion im Crb-Komplex näher zu analysieren. Dazu wurden transgene Fliegenlinien etabliert, in denen mit Hilfe des UAS/GAL4 Systems verschiedene, Transgen-kodierte Varianten der intrazellulären Domäne von Crumbs (FLAG-Crb-intra, S.Fornaçon, 2001, FLAG-Crb-intra- Δ ERLI und FLAG-Crb-intra-Y10A/E16A, beide diese Arbeit) überexprimiert werden können. Diese Proteine sind zur Detektion jeweils mit einem FLAG-Epitop zwischen dem Signalpeptid und der Transmembrandomäne versehen. FLAG-Crb-intra repräsentiert die wildtypische intrazelluläre Domäne von Crumbs. In FLAG-Crb-intra- Δ ERLI wurde das ERLI-Motiv (PDZ-Bindedomäne) deletiert und in FLAG-Crb-intra-Y10A/E16A wurden Aminosäureaustausche in zwei konservierten Aminosäuren vorgenommen, die u.a. die FERM-Bindedomäne betreffen. Mittels FLAG-Crb-intra- Δ ERLI und FLAG-Crb-intra-Y10A/E16A sollten die mit den in diesen Transgen-kodierten Varianten veränderten Domänen interagierenden Proteine nicht mehr präzipitiert werden können. Das sollte als Kontrolle der Spezifität der Co-Immunopräzipitation dienen. Die Co-Immunopräzipitation wurde mit Embryolysaten durchgeführt. Anschließend wurden die Präzipitate mittels SDS-PAGE's oder HPLC-Verfahren aufgetrennt und darin enthaltene Proteine mit massenspektrometrischen Verfahren identifiziert. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind im Folgenden dargestellt.

1.1. Sdt, DPatj und DLin-7, bekannte Komponenten des Crb-Komplexes, können präzipitiert werden

Nach Etablierung der transgenen Fliegenlinien (S. Fornaçon, 2001; diese Arbeit Tab.II.7) und Überprüfung der Expression der Konstrukte (S. Fornaçon, 2001; Daten nicht gezeigt) wurde die Co-Immunopräzipitation durchgeführt und mit Western Blots getestet, ob bekannte Proteine des Crb-Komplexes präzipitiert werden können. In Abb.

III.1. sind diese Western Blots von Co-Immunopräzipitationen dargestellt. Sowohl die exprimierten Crb Proteine (Abb.III.1.A), als auch Proteine des Crb-Komplexes wie *DPatj* (Abb.III.1.C) und *DLin-7* (Abb.III.1.D) konnten co-immunopräzipitiert werden. Dies ist, wie erwartet, nicht der Fall bei einer Co-Immunopräzipitation mit FLAG-Crb-intra- Δ ERLI, da *DPatj* und *DLin-7* an Stardust binden, welches über das ERLI-Motiv mit Crb interagiert. *DPatj* wurde allerdings auch mit FLAG-Crb-intra-Y10A/E16A nicht co-immunopräzipitiert (Abb.III.1.C), obwohl das ERLI-Motiv in diesem Protein vorhanden ist.

Eine Co-Immunopräzipitation der MAGUK-Isoform von Sdt (Bachmann et al., 2001) mit FLAG-Crb-intra (Abb.III.1.B) konnte dagegen nicht gezeigt werden. Allerdings konnte diese Sdt-Isoform bisher nur in der Überexpression und nicht endogen im Western-Blot nachgewiesen werden (Bachmann et al., 2001). Für Sdt sind sowohl im Input als auch bei der Co-Immunopräzipitation mehrere Banden sichtbar, wobei die Größe ≤ 100 kDa groß ist. Es könnte sich hierbei um die Stardust B-Isoform (Hong et al., 2001) handeln, welche alle bekannten Domänen von Stardust besitzt, aber durch eine Verkürzung der Sequenz vor und zwischen den beiden ECR-Domänen charakterisiert ist.

1.2. Auftrennung der Co-Immunopräzipitate mittels SDS-PAGE

1.2.1. 2D-SDS-PAGE

Nach Etablierung der Methode der Co-Immunopräzipitation mit den Transgen-kodierten Crb Proteinen wurde damit begonnen, diese in größerem Maßstab durchzuführen, da für die Identifizierung mittels Massenspektrometrie größere Proteinmengen benötigt werden. Die jeweils mit FLAG-Crb-intra, FLAG-Crb-intra- Δ ERLI und FLAG-Crb-intra-Y10A/E16A präzipitierten Komplexe wurden auf SDS-PAGE's aufgetrennt. Proteine, welche nur mit FLAG-Crb-intra präzipitieren, wurden als putative direkte oder indirekte Bindungspartner der PDZ-Bindedomäne bzw. N-terminalen Bindedomäne isoliert und mittels Massenspektrometrie identifiziert. In Abb.III.2. sind drei 2D-Gele abgebildet, wobei in Abb.III.2.A der mit FLAG-Crb-intra präzipitierte Komplex aufgetrennt wurde, in Abb.III.2.B der mit FLAG-Crb-intra- Δ ERLI und in Abb.III.2.C der mit FLAG-Crb-intra-Y10A/E16A. Anschließend wurden Spots ausgeschnitten, die nur mit FLAG-Crb-intra präzipitiert werden konnten (1, 2, 4, 7, 8 und 9), sowie Spots, die sehr markant in allen drei Gelen zu beobachten waren (Spots 3, 5 und 6). Die Ergebnisse der Identifizierung

sind in Tab.III.1 dargestellt und man kann feststellen, dass es sich bei den eindeutig identifizierten Spots, d.h. wo genügend Peptide für eine Identifizierung gefunden wurden, um Bestandteile des Aktinzytoskeletts und um ein Heatschock Protein handelt.

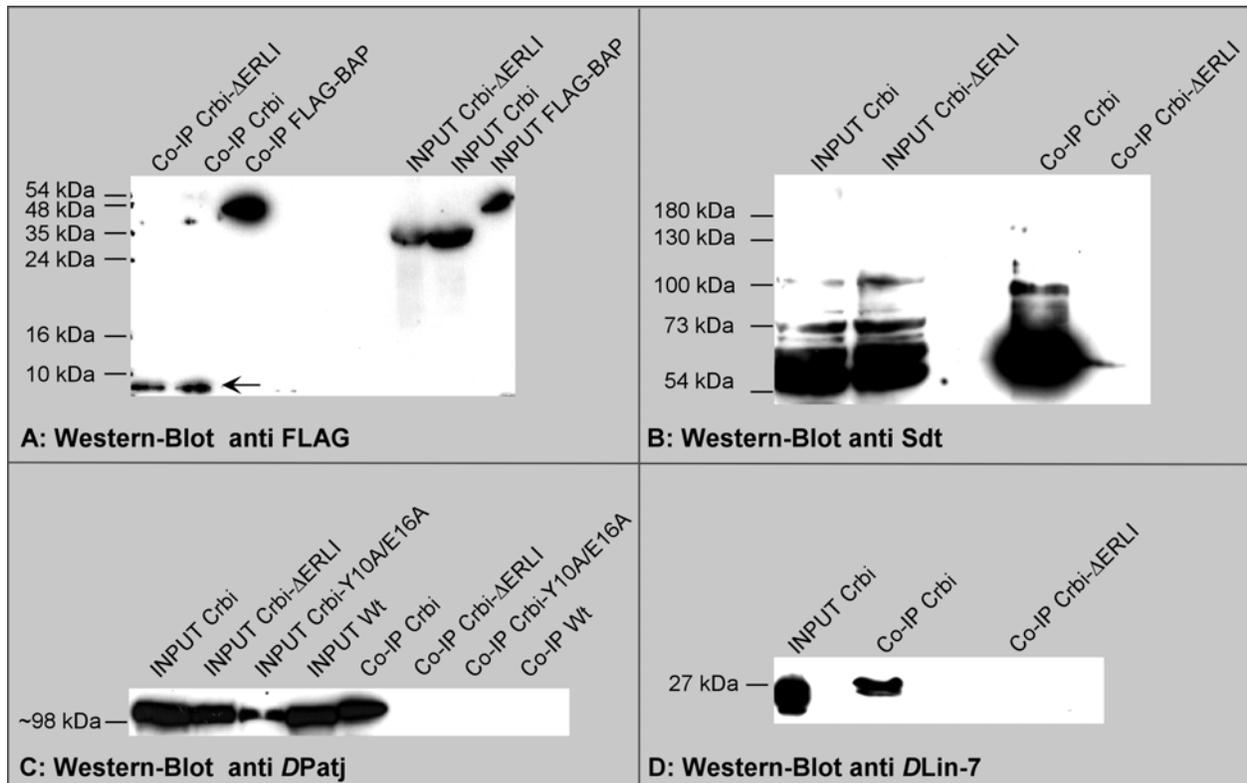
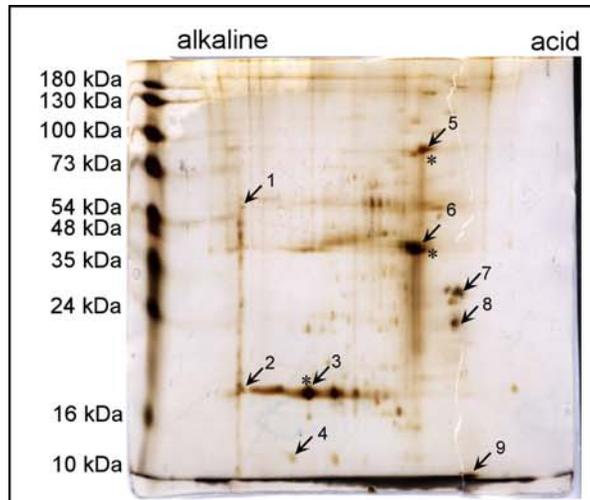
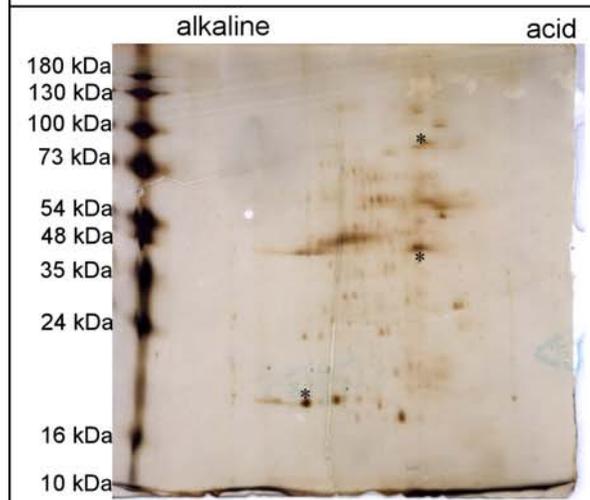


Abb. III.1. Co-Immunopräzipitation bekannter Proteine des Crb Komplexes

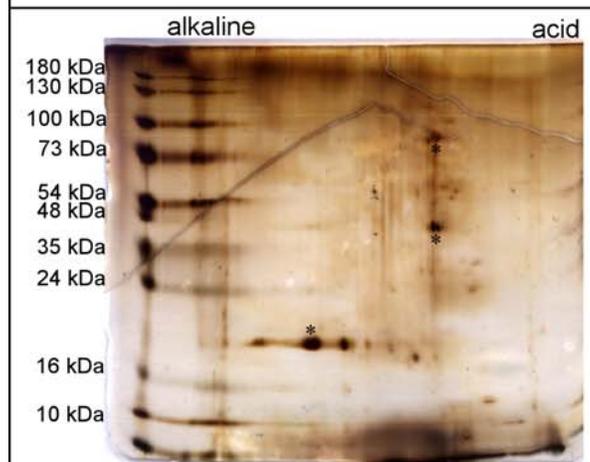
Auf den Western Blots wurden die Immunpräzipitate aus je 1mg (A und B) bzw. 2 mg (C und D) Proteinextrakt von FLAG-Crb-intra, Crb-intra-ΔERLI bzw. Crb-intra-Y10A/E16A aufgetragen. Die Überexpression erfolgte mittels des Gal4^{daG32} Aktivators. Als Ladekontrolle (INPUT) wurden je 30-50 µg Protein aufgetragen. **A** Reaktion mit anti FLAG-Antiserum zeigt ein Signal bei der erwarteten Größe von 5,9 kDa des FLAG-Crb-intra bzw. FLAG-Crb-intra-ΔERLI Proteins nur nach der Co-Immunopräzipitationsreaktion. Für eine Kontroll-Co-Immunopräzipitation mit einem rekombinanten FLAG-Protein (FLAG-BAP, Sigma) ist sowohl im INPUT als auch nach der Co-Immunopräzipitation bei der erwarteten Größe von 50 kDa ein Signal zu erkennen. **B** Reaktion mit anti Sdt-Antiserum (MPDZ) zeigt sowohl im Input als auch nach der Co-Immunopräzipitation kein Signal in der erwarteten Größe von 140 kDa für die MAGUK-Isoform. Sowohl im INPUT als auch bei der Co-IP mit FLAG-Crb-intra wurden kleinere Banden detektiert, wobei es sich um die Sdt-B Isoform handeln könnte **C** Reaktion mit anti DPatj-Antiserum zeigt sowohl im INPUT als auch in der Spur mit der Co-Immunopräzipitation mit FLAG-Crb-intra ein Signal bei ca. 98 kDa, welches der erwarteten Größe des DPatj Proteins entspricht. In den Spuren der Co-Immunopräzipitationen mit FLAG-Crb-intra-ΔERLI, FLAG-Crb-intra-Y10A/E16A und einer Wt Kontrolle (kein FLAG Epitop) ist kein DPatj Protein detektierbar. **D** Reaktion mit DLin-7-Antiserum zeigt ein Signal im INPUT und in der Spur der Co-Immunopräzipitation mit FLAG-Crb-intra aber nicht mit FLAG-Crb-intra-ΔERLI



A: 2D-gel Co-IP Crb-intra



B: 2D-gel Co-IP Crb-intra- Δ ERLI



C: 2D-gel Co-IP Crb-intra-Y10A/E16A

Abb.III.2. Auftrennung der verschiedenen Co-Immunpräzipitate mittels 2D-Gelen (vorherige Seite)

Alle Bilder zeigen silbergefärbte 2D-Gele, wobei in **A** der mit FLAG-Crb-intra, in **B** der mit FLAG-Crb-intra- Δ ERL1 und in **C** der mit FLAG-Crb-intra-Y10A/E16A präzipitierte Komplex dargestellt ist. Die Spots, die zur MALDI-TOF MS Analyse ausgeschnitten wurden, sind in **A** markiert und die Ergebnisse der Identifikation sind in Tab.III.1 aufgelistet

Tab.III.1. Identifizierte Proteine des 2D-Gels

Die markierten Spots aus Abb.III.2 wurden ausgeschnitten und die Identifizierung der Proteine erfolgte mittels MALDI-TOF MS Analyse am ZMBL, Universität zu Köln.

Spot	Signifikant identifiziert?	Protein	Funktion
1	nein	Ubiquitin	Proteinbiosynthese
2	nein	Rec Q	Transkriptionsfaktor
3	nein	Transferrin	Eisentransport
4	nein	CG18419	ATPase
5	ja	Hsc70-3	Heat shock Protein
6	ja	Aktin 5C	Aktinzytoskelett
7	ja	Tropomyosin	Aktinzytoskelett
8	ja	Tropomyosin	Aktinzytoskelett
9	ja	Spaghetti squash	Aktinzytoskelett

Proteine, die eindeutig identifiziert und nur mittels FLAG-Crb-intra präzipitiert werden konnten sind Tropomyosin und Spaghetti squash, die regulatorische leichte Kette von Myosin. Die Spots, aus denen Aktin5C und Hsc70-3 isoliert und identifiziert wurden sind dagegen in allen drei SDS-PAGE sichtbar (Abb.III.2. A, B und C, Sternchen). Der Crb-Komplex ist über *DMoesin* und β_{heavy} -Spektrin eng mit dem Aktinzytoskelett verknüpft, so dass man erwartet, dass Komponenten des Aktinzytoskeletts co-immunopräzipitiert werden. Da diese in großer Menge in der Zelle vorliegen, sind diese auf den Gelen immer zu finden. Proteine des Aktinzytoskeletts spielen aber in der Zelle in fast allen Prozessen eine Rolle, so dass eine Analyse der Funktion speziell im Hinblick auf die Etablierung und Aufrechterhaltung der Zellpolarität durch den Crb-Komplex sehr schwierig ist. Aus diesem Grunde wurde der Schwerpunkt in diesem Teil der Arbeit auf die Identifikation von Bindungspartnern gelegt, die uns Aufschlüsse über den Mechanismus der Einflussnahme des Crumbs Komplexes auf die *Zonula adherens* geben.

Wie die Vorexperimente zeigen, werden auch spezifischere Komponenten des Crb-Komplexes präzipitiert, die massenspektrometrisch bisher nicht nachgewiesen werden konnten, da sie vermutlich nur in sehr geringer Konzentration vorliegen. Deshalb wurde

nun versucht, durch Aufkonzentrierung des Präzipitates und Optimierung der 2D-SDS-PAGE auch diese massenspektrometrisch zu identifizieren. Dazu wurde z.B. die dreifache Menge an Probe auf das 2D-Gel aufgetragen, indem die präzipitierten Proteine mittels Aceton gefällt wurden und in einem optimierten Auftragpuffer gelöst wurden. Dieser verbessert u.a. die Auftrennung der Proteine mit einem isoelektrischen Punkt über 7, wie z.B. das ‚Köder‘-Protein FLAG-Crb-intra (~9,5) hat (Hoving et al., 2002). Diese Veränderungen führten allerdings nicht dazu, dass Proteine des Crb-Komplexes, welche im Präzipitat mittels Western-Blot detektiert auch massenspektrometrisch identifiziert werden konnten.

1.2.2. Eindimensionale SDS-PAGE

Die Auftrennung von Proteinkomplexen auf 2D-Gelen ist nicht immer unproblematisch, da bekannt ist, dass z.B. Transmembranproteine schlecht von der ersten in die zweite Dimension übergehen oder sehr basische Proteine trotz des optimierten Auftragpuffers (s.o.) im Gel nicht gut aufgetrennt werden können.

Aus diesen Gründen wurde versucht die Komplexe eindimensional aufzutrennen, obwohl die Proteine mittels 2D-SDS-PAGE's besser voneinander zu trennen sind. Bei eindimensionaler Auftrennung können mehrere Proteine in einer Bande vorhanden sein, was eine eindeutige Identifizierung mittels Massenspektrometrie unter Umständen erschwert.

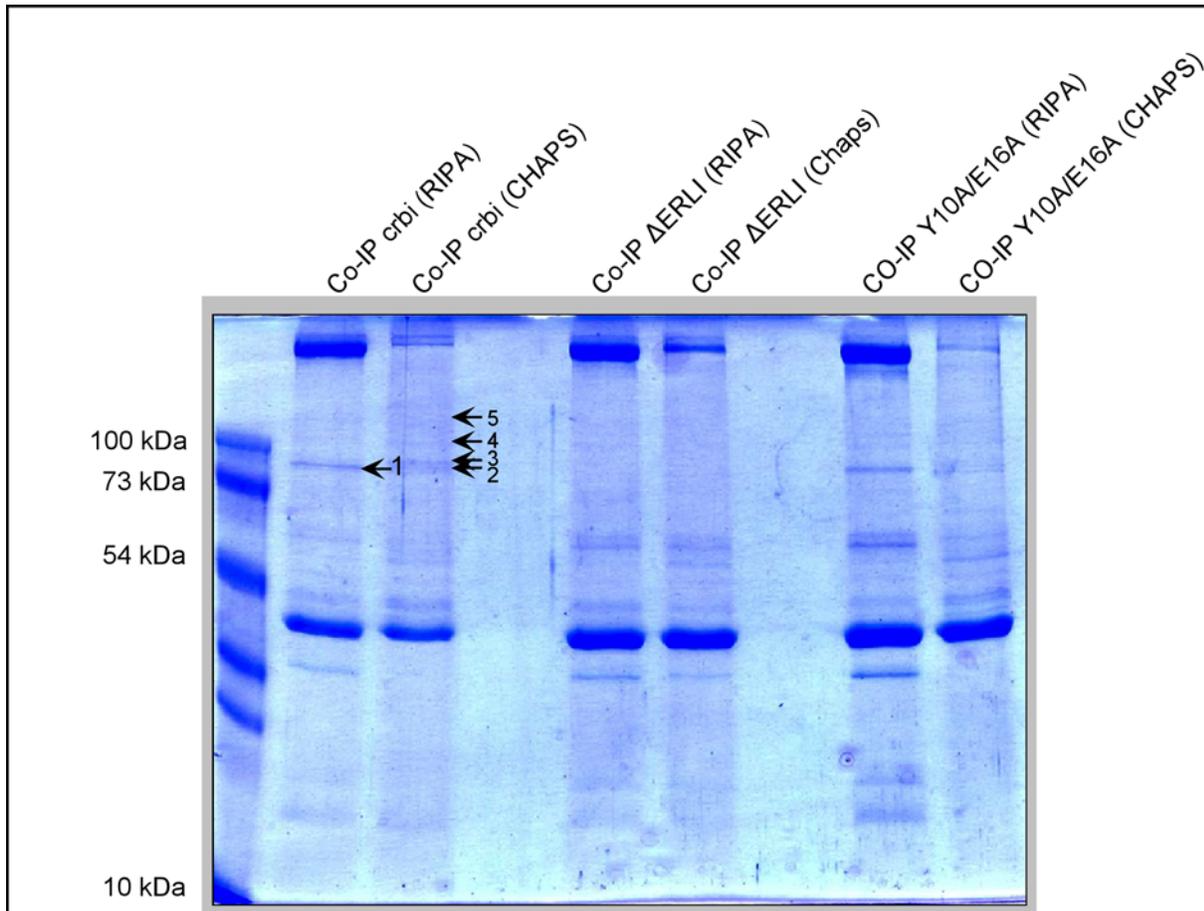
In Abb.III.3 ist in A eine Coomassie gefärbte eindimensionale SDS-Page abgebildet. Hier wurden Co-Immunpräzipitate von FLAG-Crb-intra, FLAG-Crb-intra- Δ ERLI und FLAG-Crb-intra-Y10A/E16A aufgetragen, wobei zwei verschiedene Lysispuffer (Chaps und RIPA) verwendet wurden. Diese wurden getestet, um herauszufinden ob z.B. unterschiedliche Detergenzien zur Erhöhung der Menge an aufgereinigtem Crb-Komplex führten. Sowohl bei Verwendung des RIPA-Lysispuffers als auch bei Verwendung des Chaps-Lysispuffers wurden im Co-Immunpräzipitat FLAG-Crb-intra und auch FLAG-Crb-intra- Δ ERLI bei einer Größe von ~5,9 kDa detektiert. Die Mengen der Proteine, die mittels der beiden Lysispuffer präzipitiert wurden waren fast gleich, evtl. führte der RIPA-Lysispuffer zu einer leicht erhöhten Menge an präzipitiertem FLAG-Crb-intra und FLAG-Crb-intra- Δ ERLI (Abb.III.3.B).

Die gekennzeichneten Banden wurden ausgewählt und ausgeschnitten, da sie nur auf der Coomassie gefärbten SDS-PAGE der Co-Immunopräzipitation mit FLAG-Crb-intra und FLAG-Crb-intra-Y10A/E16A zu sehen waren und nicht mit FLAG-Crb-intra- Δ ERLI. Die darin enthaltenen Proteine wurden mittels MALDI-TOF MS ermittelt und die identifizierten Proteine der ausgeschnittenen Banden (Abb.III.3.A) sind in Tab.III.2 aufgelistet. Die Präzipitation der exprimierten Crb Proteine wurde in einem Western Blot nachgewiesen (Abb.III.3.B).

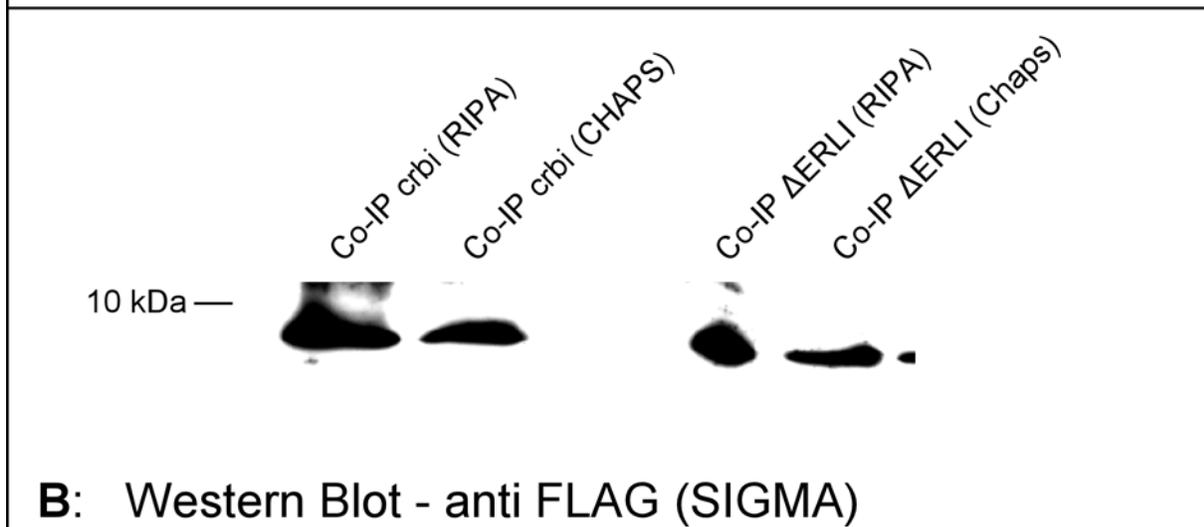
Aus den fünf ausgeschnittenen Banden konnten vier Proteine identifiziert werden, wobei es sich bei zwei wiederum um hochabundantes Heatschock Protein handelt. Das dritte ist ein unbekanntes Protein mit einer Zinkfingerstruktur und bei dem vierten handelt es sich um Gliolectin, ein Transmembranprotein von dem bekannt ist, dass es ausschließlich im Nervensystem exprimiert ist, einem Gewebe, in dem Crumbs nicht exprimiert ist.

Abb.III.3 SDS PAGE Co-Immunopräzipitation mit verschiedenen Puffern (nächste Seite)

A. Coomassie gefärbte SDS-PAGE (10% Acrylamid). Es wurden jeweils die Co-Immunopräzipitate von FLAG-Crb-intra, FLAG-Crb-intra- Δ ERLI und FLAG-Crb-intra-Y10A/E16A aufgetragen, wobei entweder der Chaps Puffer oder der RIPA Puffer verwendet wurde. Die mit Pfeilen markierten Banden (1-5) wurden ausgeschnitten und massenspektrometrisch untersucht. Die Ergebnisse sind in Tab.III.3 aufgelistet. **B** Western Blot - Reaktion mit anti FLAG-Antiserum. Bei der erwarteten Größe von ~5,9 kDa kann ein Signal für die exprimierten Crb Proteine, FLAG-Crb-intra und FLAG-Crb-intra- Δ ERLI beobachtet werden



A: SDS Page - Coomassie gefärbt



B: Western Blot - anti FLAG (SIGMA)

Tab.III.2. Identifizierte Proteine des 1D-Gels

Die markierten Banden aus Abb.III.3 wurden ausgeschnitten und die Identifizierung der Proteine erfolgte mittels MALDI-TOF MS Analyse am ZMBL, Universität zu Köln.

Spot	Signifikant identifiziert?	Protein	Funktion
1	ja	Hsc70-3	Heatschock Protein
2	ja	Hsc70-3	Heatschock Protein
3	ja	CG31224	Putatives Zinkfingerprotein
4	nein	-	-
5	ja	Gliolectin	Transmembranprotein (Lektin)

1.2.3. Auftrennung auf Gradientengelen

Die zuvor beschriebene Auftrennung der Co-Immunopräzipitation auf eindimensionalen SDS-PAGE zeigte vor allem im Bereich der großen Proteine eine schlechte Auftrennung und so wurde eine weitere Optimierung durchgeführt, indem die Auftrennung der Co-Immunopräzipitate auf Gradientengelen vorgenommen wurde. Hierbei handelt es sich um Acrylamidgele, die einen Konzentrationsgradienten von z.B. 5–15% haben und somit eine optimale Auftrennung von Proteinen verschiedener Größen ermöglichen. Abb.III.4 zeigt die Auftrennung von Proteinkomplexen präzipitiert mit FLAG-Crb-intra, FLAG-Crb-intra- Δ ERLI und FLAG-Crb-intra-Y10A/E16A, sowie eine Kontroll Co-Immunopräzipitation mit Wildtyplysat auf einem Gradientengel (5-15% Acrylamid). Alle gut sichtbaren Banden der Co-Immunopräzipitation mit FLAG-Crb-intra wurden ausgeschnitten, um herauszufinden welche Proteine alles präzipitiert werden und mittels Esi-MS/MS identifiziert. Die Ergebnisse sind in Tab.III.3 aufgelistet.

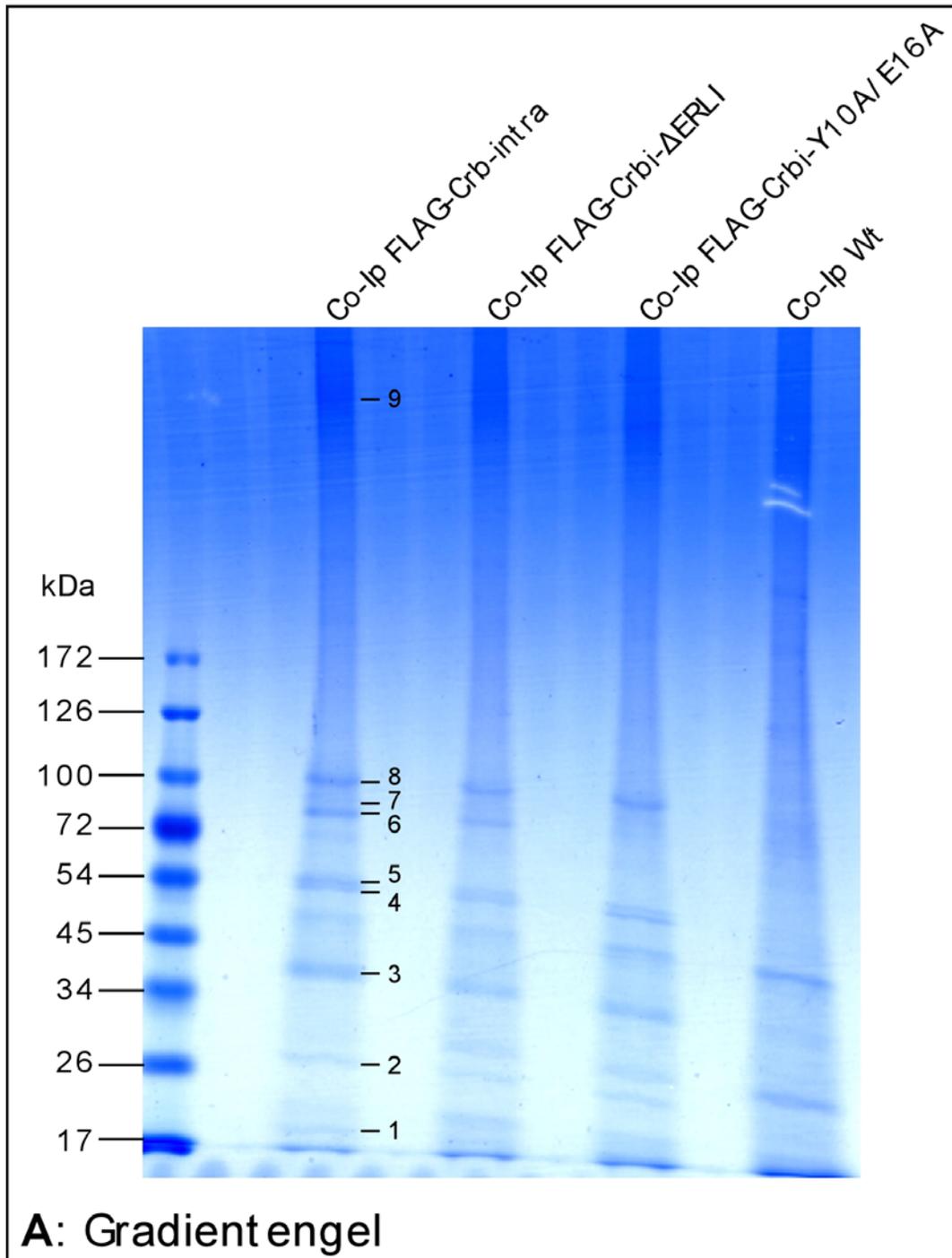


Abb.III.4 Gradientengel Co-Immunopräzipitation

Das Gradientengel besitzt einen Gradienten von 5-15% Acrylamid und wurde Coomassie gefärbt. Es wurden jeweils Co-Immunopräzipitate aus ~6 mg Gesamtprotein aufgetragen, die mit 6x Probenpuffer versetzt wurden. Die markierten Banden wurden ausgeschnitten und mittels Esi-MS/MS im BMFZ, HHU Düsseldorf analysiert. Die Ergebnisse sind in Tab.III.3 aufgelistet.

Tab.III.3 Identifizierte Proteine des Gradientengels

Die markierten Banden aus Abb.III.4 wurden ausgeschnitten und die Identifizierung der Proteine erfolgte mittels Esi-MS/MS am BMFZ, HHU Düsseldorf.

Bande	Signifikant identifiziert?	Protein	Funktion
1	ja	Spaghetti squash	Aktinzytoskelett
2	ja	Troponin	Aktinzytoskelett
3	ja	Aktin/Tropomyosin	Aktinzytoskelett
4	ja	Troponin T	Aktinzytoskelett
5	ja	Troponin T	Aktinzytoskelett
6	ja	Zipper (Myosin)	Aktinzytoskelett
7	ja	Aktin/Tropomyosin	Aktinzytoskelett
8	ja	Aktin/Tropomyosin	Aktinzytoskelett
9	ja	Zipper (Myosin)	Aktinzytoskelett

Bei den Proteinen, die aus dem Gradientengel isoliert wurden, handelt es sich wiederum um Proteine des Aktinzytoskeletts. Die meisten der Proteinbanden sind in allen drei Co-Immunopräzipitaten (FLAG-Crb-intra, FLAG-Crb-intra- Δ ERLI und FLAG-Crb-intra-Y10A/E16A) zu sehen, aber keine der Banden ausser 2 ist in der Kontrolle der Co-Immunopräzipitation mit M2-FLAG-Agarose® Affinity Gel und Wildtyplysat (Abb.III.4 Co-IP Wt) zu beobachten. In der Kontrolle werden nur unspezifisch bindende Proteine präzipitiert, da hier die mit dem FLAG Epitop versehenen Crb Proteine nicht exprimiert sind. Das spricht für eine spezifische Präzipitation von Komponenten des Aktinzytoskeletts mittels der exprimierten Crb Proteine, unabhängig vom ERLI-Motiv und dem Austausch des Tyrosins an Position 10 bzw. der Glutaminsäure an Position 16 der intrazellulären Domäne gegen Alanin.

1.3. Auftrennung der Co-Immunopräzipitate mittels small scale HPLC

Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass es möglich ist, mittels Co-Immunopräzipitation mit überexprimiertem FLAG-Crb-intra den Crb-Komplex aus Embryonenlysate zu präzipitieren und die Komponenten anhand von Western Blots nachzuweisen. Die anschließende Auftrennung der Co-Immunopräzipitate mit verschiedenen Protein-Auftrennungstechniken ergab, dass größtenteils nur Bestandteile des Aktinzytoskeletts und Heatschock Proteine identifiziert werden konnten. Da es sich dabei um Proteine handelt, die in der Zelle in großer Menge vorkommen, könnte es sein, dass die Menge

der Proteine des präzipitierten Crumbs Komplexes zu klein ist um auf den Gelen nachgewiesen zu werden oder durch Proteine des Aktinzytoskeletts verdeckt wurden.

Aufgrund dieser Tatsachen wurde in enger Zusammenarbeit mit Nicola Wiethölter, BMFZ HHU Düsseldorf versucht eine Methode zu entwickeln, bei der eine Auftrennung des Co-Immunopräzipitats nicht mehr notwendig ist, sondern die proteolytische Spaltung direkt im Präzipitat stattfindet. Hierbei werden die Proteine durch eine Protease (meist Trypsin) in Peptide fragmentiert und anschließend versucht, alle sich in der Lösung befindlichen Peptide mittels Esi-MS/MS zu identifizieren.

Die mit Hilfe dieser Methode identifizierten Proteine sind in Tab.III.4 aufgelistet.

Tab.III.4 Identifizierte Proteine ,In-Lösungs' Spaltung mit anschließender Esi-MS/MS

Probe	Protein	Funktion
50 µl Lysat Co-IP Crb-intra-FLAG	Myosin	Aktinzytoskelett
	Tropomyosin	Aktinzytoskelett
	Troponin T	Aktinzytoskelett
	Aktin	Aktinzytoskelett
	Calmodulin	Calciumbindung, Signaltransduktion
	Crumbs (1 Peptid)	Zelladhäsion
500 µl Lysat Co-IP Crb-intra-FLAG	RafbP (Lipophorin)	Lipidtransport
	Hsc70-3	Heatschock Protein
	Crumbs (3 Peptide)	Zelladhäsion
	FYB-120/130	Aktinzytoskelett
	Myelin oligodentocyte Glycoprotein	-
	Beta-1-Tubulin	Aktinzytoskelett
	RE54950p	RNA-Bindeprotein
900 µl Lysat Co-IP Crb-intra-FLAG	Hsc70-3	Heatschock Protein
	Myosin light chain	Aktinzytoskelett
	Myosin heavy chain	Aktinzytoskelett
	Troponin T	Aktinzytoskelett
	RE54950p	RNA-Bindeprotein
	Calmodulin	Calciumbindung, Signaltransduktion
	Beta-1-Tubulin	Aktinzytoskelett
	Tropomyosin	Aktinzytoskelett
	Rafbp (Lipophorin)	Lipidtransport

	Aktin	Aktinzytoskelett
	Crumbs (3 Peptide)	Zelladhäsion
900 µl Lysat Co-IP Crb-intra-ΔERLI	Beta-Tubulin	Aktinzytoskelett
	Calmodulin	Calciumbindung, Signaltransduktion
	Myosin light chain, zytoplasmatisch	Aktinzytoskelett
	Spaghetti squash	Aktinzytoskelett
	Myosin heavy chain (Muskel)	Aktinzytoskelett
	Zipper	Aktinzytoskelett
	Troponin T	Aktinzytoskelett
	Tropomyosin	Aktinzytoskelett
	Aktin	Aktinzytoskelett

Durch diese Methode konnten zusätzlich zu den bisher identifizierten Komponenten des Aktinzytoskeletts weitere Peptide identifiziert werden. Dazu gehören z.B. drei Peptide des Transgen-kodierten Crb ‚Köder‘-Proteins mit dem der Crb-Komplex präzipitiert wurde, Rfabp, ein putatives Lipophorin, und ein RNA-bindendes Protein. Die Erhöhung der Menge des für die tryptische ‚in-Lösungs‘-Spaltung eingesetzten Präzipitats von 50 µl auf 500 µl führte dazu, dass mehr Peptide identifiziert werden konnten, wohingegen die nochmalige Erhöhung der Menge des Präzipitats auf 900 µl keine wesentliche Verbesserung zeigte.

Vergleicht man die identifizierten Proteine aus den Präzipitaten von FLAG-Crb-intra und FLAG-Crb-intra-ΔERLI, so kann man feststellen, dass auch durch das FLAG-Crb-intra-ΔERLI Protein Komponenten des Aktinzytoskeletts präzipitiert werden. In diesen Präzipitaten konnten allerdings weder Peptide des ‚Köder‘-Proteins FLAG-Crb-intra-ΔERLI noch Rfabp oder das RNA-bindende Protein identifiziert werden. Dass keine Peptide des ‚Köder‘-Proteins FLAG-Crb-intra-ΔERLI gefunden wurden, könnte auf eine zu geringe Konzentration dieses im Präzipitat zurückzuführen sein.

Es sollte allerdings vorhanden sein, da es in Western Blot Experimenten und immunhistochemischen Färbungen mit einem anti FLAG Antiserum nachweisbar ist und auch vergleichbare Mengen detektierbar waren (Abb.III.1.A. und Abb.III.3.B.).

1.4. Auftrennung der Co-Immunopräzipitate mittels nanoHPLC

Die direkte tryptische Spaltung des Co-Immunopräzipitats führte dazu, dass mehr Peptide und erstmals auch Peptide des überexprimierten Crb ‚Köder‘-Proteins mit welchem der Crb-Komplex präzipitiert wurde, identifiziert werden konnten. Nach mehrmaliger Erhöhung der Menge des zur tryptischen Spaltung eingesetzten Präzipitats trat auch hier keine weitere Verbesserung ein, d.h. bekannte Komponenten des Komplexes, die zuvor in den Präzipitaten durch Kontroll - Western Blots nachgewiesen wurden, konnten nicht massenspektrometrisch identifiziert werden. Deshalb wurde eine weitere Optimierung der Methode vorgenommen, indem vor der Massenspektrometrie eine Auftrennung der ‚in Lösung‘ befindlichen Peptide entsprechend ihrer Hydrophobizität mittels nanoHPLC durchgeführt wurde. Dadurch sollte eine Reduzierung der Komplexität der Signale, die im Massenspektrometer ankommen, erreicht werden und eine eventuelle Überdeckung schwacher Signale durch die starken Signale von sehr abundanten Peptiden wie denen des Aktinzytoskeletts vermindert werden.

Die anhand dieser Methode identifizierten Proteine sind in Tab.III.5 aufgelistet. Es sind Proteine zweier unabhängiger massenspektrometrischer Analysen, die nach einer Co-Immunopräzipitation mit FLAG-Crb-intra identifiziert werden konnten und mit FLAG-Crb-intra- Δ ERLI aufgelistet. Bei den Proben von FLAG-Crb-intra handelt sich um Proben desselben Präzipitats. Dieses wurde geteilt und mittels Zentricons unterschiedlich stark aufkonzentriert (500 μ l \Rightarrow 100 μ l (FLAG-Crb-intra (100 μ l); 500 μ l \Rightarrow 50 μ l (FLAG-Crb-intra (50 μ l)). Dies sind Zentrifugenröhrchen mit einer Membran bestimmter Porengröße, die alle Proteine bei Zentrifugation zurückhält, die eine Größe haben, die nicht durch diese Porengröße passen (z.B. hier verwendet \leq 3 kDa).

Betrachtet man die identifizierten Proteine so kann man sagen, dass allen drei Proben wieder Proteine des Aktinzytoskeletts und Heatschockproteine gefunden wurden, wobei diese durch die Aufkonzentrierung angereichert wurden. Es wurden allerdings im Vergleich zu den bisher durchgeführten Co-Immunopräzipitationen zusätzliche Proteine gefunden. Für diese muss allerdings nun geklärt werden, ob es sich hierbei um unspezifisch präzipitierte Proteine handelt oder ein Zusammenhang mit dem Crb-Komplex besteht.

Ein weiterer Punkt, der angemerkt werden sollte, ist, dass eine Identifikation von Peptiden des Crb Proteins nur in der Messung erfolgte, in der die Probe nicht so stark aufkonzentriert wurde. Dies spricht für eine Überdeckung von schwächeren Signalen durch Signale von sehr abundanten Proteinen wie Aktin, da es sich um dieselbe Probe nur unterschiedlich stark konzentriert handelte. Außerdem konnten auch hier keine Peptide von Proteinen wie *DPatj*, *DLin-7* oder Stardust identifiziert werden.

Tab.III.5 Identifizierte Proteine nanoHPLC Esi-MS/MS

Die farbliche Markierung kennzeichnet Proteine, die in den Präzipitaten von FLAG-Crb-intra (100 µl) + FLAG-Crb-intra (50 µl) + FLAG-Crb-intra-ΔERLI, FLAG-Crb-intra (100 µl) + FLAG-Crb-intra (50 µl); FLAG-Crb-intra (100 µl); FLAG-Crb-intra (100 µl) + FLAG-Crb-intra-ΔERLI; FLAG-Crb-intra (50 µl); FLAG-Crb-intra (50 µl) + FLAG-Crb-intra-ΔERLI; FLAG-Crb-intra-ΔERLI gefunden wurden.

Protein	Funktion
Aktin-5C	Aktinzytoskelett
Aktin 57B	Aktinzytoskelett
Tropomyosin 2	Aktinzytoskelett
Tropomyosin 1	Aktinzytoskelett
Vitellogenin 1	Phospholipidmetabolismus, Vitellogenese
Beta-1-Tubulin	Aktinzytoskelett
Hsc68	Heatschockprotein
Aktin 87E	Aktinzytoskelett
Hsc70-3	Heatschockprotein
Vermilion Protein	Tryptophanpyrrolase
Hsc70-2	Heatschock Protein
Guanin-nukleotid-Bindeprotein	GTPase
Arp 2	Aktinzytoskelett
Alien	COP9-Komplex
Geschmacksrezeptor 58B	Geschmacksrezeptor
Tudor Protein	RNA Lokalisation, rRNA Transport
Inositol 1,4,5 Triphosphatrezeptor	Calciumkanal
GSA Dehydrogenase	Prolinbiosynthese
KBF1	Transkriptionsfaktor
ATRX	Transkriptioneller Regulator
Calphotin	Calciumbindeprotein
Otefin	Motorprotein
HDH	Metallabhängige Phosphohydrolase
Cyp6d2	Steroidmetabolismus
Cyp6t3	Elektronentransporter
RafbP (Lipophorin)	Lipidtransport
Aktin 8	Aktinzytoskelett
CG10837	RNA-bindendes Protein
Crumbs (1 Peptid)	Zelladhäsion

NK7.1	Transkriptionsfaktor
Pk92B	Serin/Threoninkinase
Tiggrin	ECM
Pipsqueak	DNA-bindendes Protein
Narrow abdomen	Kationenkanal
Beta'-COP	COP1-Komplex
Ovarian tumor locus Protein	Oogenese
Aktin 88F	Aktinzytoskelett
Aktin-like Protein 53D	Aktinzytoskelett
Myosin (schwere Kette) muskelspez.	Aktinzytoskelett
Myosin (Zipper-Protein) (schwere Kette) nichtmuskelspez.	Aktinzytoskelett
Troponin T	Aktinzytoskelett
Spaghetti squash	Aktinzytoskelett
Hsp70Aa	Heatschock Protein
Hsp70Ba	Heatschock Protein
Calmodulin	Calciumbindung, Signaltransduktion
Pyk	Pyruvatkinase, Glykolyse
Myosin II, essentielle leichte Kette	Aktinzytoskelett
Myosin, leichte Kette alkali	Aktinzytoskelett
Troponin C	Aktinzytoskelett
Jaguar (Myosin 95F)	Aktinzytoskelett, Motorprotein
ATP Synthase, beta Kette	ATPase, Zytoskelettorganisation
RLA 1	Ribosomales Protein 1
Geschmacksrezeptor 39a	Geschmacksrezeptor
RS8	Ribosomales Protein S8
Pol Polyprotein (Transposon 17.6)	Protease, reverse Transkriptase
ATP Synthase, alpha Kette	ATPase, Zytoskelettorganisation
FAT2	Zelladhäsion, Cadherinrezeptor
Pol Polyprotein (Transposon 412)	Protease, reverse Transkriptase
Sec6	Exozytose, Intrazellulärer Proteintransport
RM62	RNA Helikase
Suppressor of hairy wing Protein	DNA-bindendes Protein, Transkriptionsregulator
Integrin, alpha PS2	Zell-Matrixadhäsion, Rezeptoraktivität
Laminin, gamma 1 Kette	Zell-Zell bzw. Zell-Matrix Adhäsion
Trifunktionales Purinbiosyntheseprotein	Ligase, Transferase, Purinbiosynthese
Laminin, alpha Kette	Zell-Zell bzw. Zell-Matrix Adhäsion
Lava Lamp Protein	Spektrinbindung, Golgikomponente
FAT Protein	Zelladhäsion, Cadherinrezeptor
Breathless Protein	FGF Rezeptor
Dynein, zytosolische schwere Kette	MT Motoraktivität, intrazellulärer Proteintransport
DDX1	ATP abhängige Helikase
Diaphanous Protein	Aktinassoziertes Protein

Kinesin like Protein NOD	MT Bindung, Motorprotein
Anon 60Da,	Ca ²⁺ bindend, mitochondrial
PCNA, Cyclin	DNA Replikation
Nipped-B Protein	Transkriptionsregulation
Still life Protein, type 1	Guanyl nucleotide exchange Factor Aktivität
Suppressor of white apricot	mRNA Splicing Faktor Aktivität
Zinkfingerprotein 2	RNA/DNA Bindung
Trehalose	Trehalosemetabolismus
Hsc70-4	Heatschock Protein
Alpha-1-Tubulin	Aktinzytoskelett
Hsc70-1	Heatschock Protein
Vitellogenin III	Vitellogenese
Chaperon Dank	Heatschock Protein
RLA 2	Ribosomales Protein 2
RL14	Ribosomales Protein 1L4
Vitellogenin II	Vitellogenese
Aktin 79B	Aktinzytoskelett
RP21C	Ribosomales Protein
RS3	Ribosomales Protein
RLA0	Ribosomales Protein
Pk	Pyruvatkinase
RS3A	Ribosomales Protein
Hsc26	Heatschock Protein
Hsc27	Heatschock Protein
Hsc83	Heatschock Protein
Arsenite resistance Protein 2	Immunantwort auf Toxine
Surfeit locus Protein 6	Ribosombiogenese, Hämtransporter
ATRX	Transkriptionsfaktor
C190	Microtubuli bindendes Protein
Xmas-2 Protein	RNA- bindendes Protein, intrazellulärer Proteintransport
ADT	ADP/ATP Translokase
Speicheldrüsen spez. Peptid	Hormon
Mal1	Maltase

Vergleicht man die Proteine, die durch nanoHPLC Esi-MS/MS von Co-Immunopräzipitaten von FLAG-Crb-intra und FLAG-Crb-intra- Δ ERLI identifiziert wurden, so kann man sagen, dass in beiden Fällen Proteine des Aktinzytoskeletts, Heatschockproteine, ribosomale Proteine und RNA bzw. DNA-bindende Proteine gefunden wurden.

Bei der Co-Immunopräzipitation mit FLAG-Crb-intra dagegen gibt es auch Proteine, bei denen eine Interaktion mit dem Crumbs Komplex möglich wäre, wie z.B. Fat und Fat2,

die als Moleküle bekannt sind, die in der Zelladhäsion eine Rolle spielen, oder Proteine, die am Transport von Proteinen beteiligt sind, wie Beta'-Cop, Lava Lamp, Sec6, Dynein oder das Kinesin like Protein NOD.

Faßt man die bisher beschriebenen Ergebnisse zusammen, so kann man feststellen, dass eine Methode etabliert werden konnte mit der man den Crb-Komplex präzipitieren kann. Bekannte Bindungspartner konnten mit Antiseren nachgewiesen werden, aber die Mengen der präzipitierten bekannten Bindungspartner reichten für eine Identifizierung mittels Massenspektrometrie nicht aus.

In den Präzipitaten konnten allerdings zahlreiche andere Proteine identifiziert werden, deren mögliche Interaktion mit dem Crumbs-Komplex mittels zusätzlicher Experimente geklärt werden muss.

2. Das überexprimierte Crumbs Protein ist phosphoryliert

2.1. Mittels Massenspektrometrie kann eine Phosphorylierung eines Peptids der intrazellulären Domäne nachgewiesen werden

Bei der Analyse der Peptide der Co-Immunopräzipitation von FLAG-Crb-intra mittels ESI-MS/MS im BMFZ, HHU Uni Düsseldorf, konnten auch drei Peptide des überexprimierten ‚Köder‘-Proteins FLAG-Crb-intra identifiziert werden. Die entsprechenden MS/MS – Spektren sind in Abb.III.5 dargestellt und in der Sequenz des Transgen-kodierten Crb Proteins rot gekennzeichnet.

Dabei ergab die Sequenzierung des Peptids der intrazellulären Domäne von Crumbs, welches N-terminal liegt, dass dieses Peptid phosphoryliert ist. Erkennbar ist diese Phosphorylierung daran, dass ein Peptid mit dieser Sequenz gefunden wurde, welches aber um eine für eine Phosphorylierung spezifische Masse (40) erhöht war. Das MS/MS – Spektrum der Phosphorylierung dieses Peptids ist in Abb.III.6 dokumentiert.

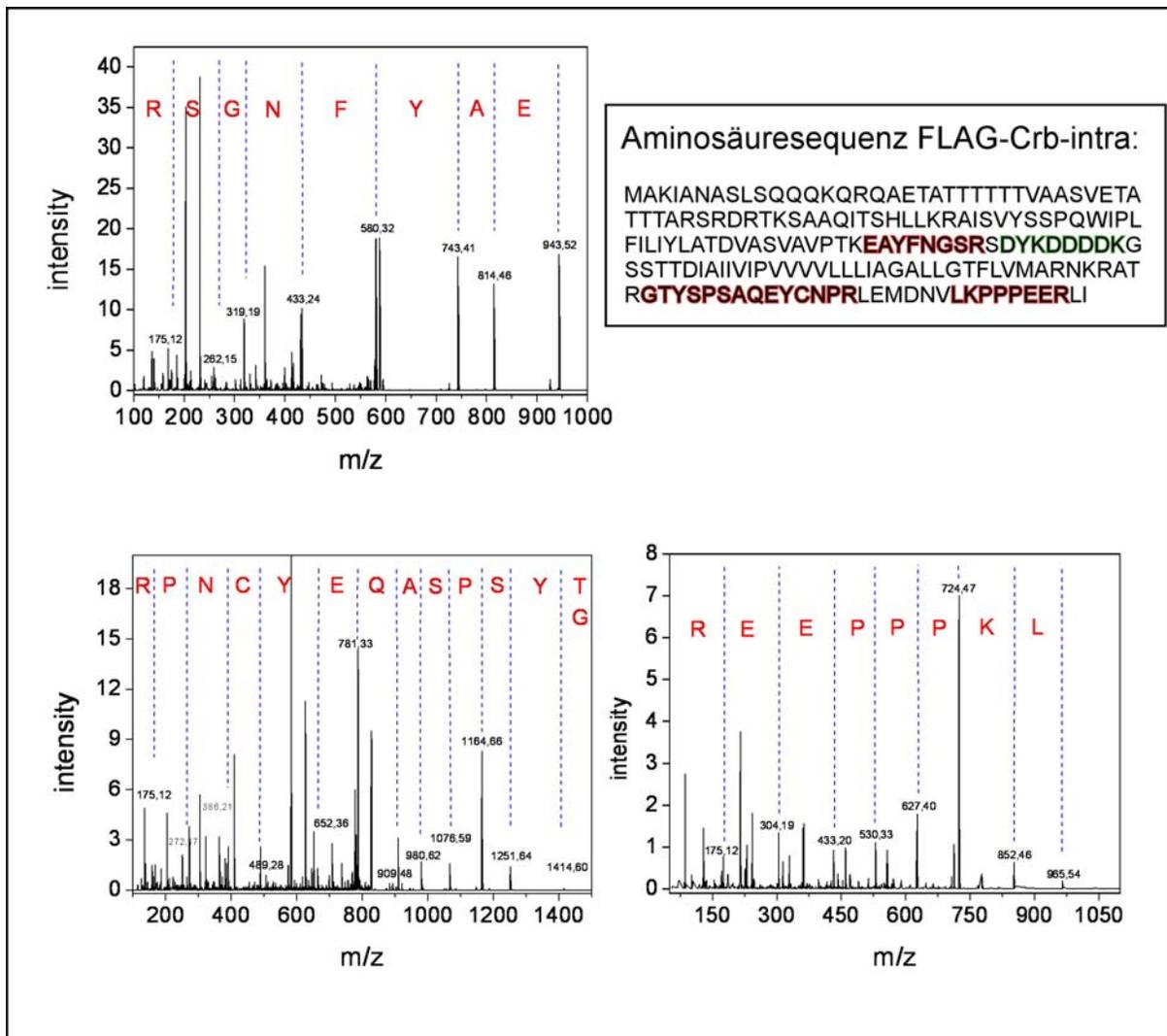


Abb.III.5 ESI-MS/MS Spektren der identifizierten Crumbs Peptide

Die Abbildung stellt die MS/MS Spektren der identifizierten Crumbs Peptide dar und darunter ist die Aminosäuresequenz des exprimierten Crumbs Proteins, Crb-intra-FLAG aufgeführt. Die identifizierten Peptide sind darin rot markiert und das FLAG Epitop ist grün markiert.

Phosphorylierte Aminosäuren in *Drosophila melanogaster* können Serine, Threonine oder Tyrosine sein. In diesem Fall ist die Phosphorylierung eines Tyrosins unwahrscheinlich aber nicht ausgeschlossen, da im MS/MS-Spektrum eine Abspaltung von Phosphorsäure zu sehen ist. Dies ist für ein phosphoryliertes Tyrosin untypisch, da die Abspaltung von Phosphorsäure energetisch sehr ungünstig für den aromatischen Benzenring des Tyrosins ist und es deshalb nur zu einer Abspaltung von Phosphat kommt. Die im Spektrum beobachtete Phosphorsäure könnte aber auch auf die Abspaltung der notwendigen Protonen von anderen Aminosäuren des Peptids

zurückzuführen sein, so dass die Phosphorylierung eines der beiden Tyrosine des Peptids nicht ausgeschlossen werden kann.

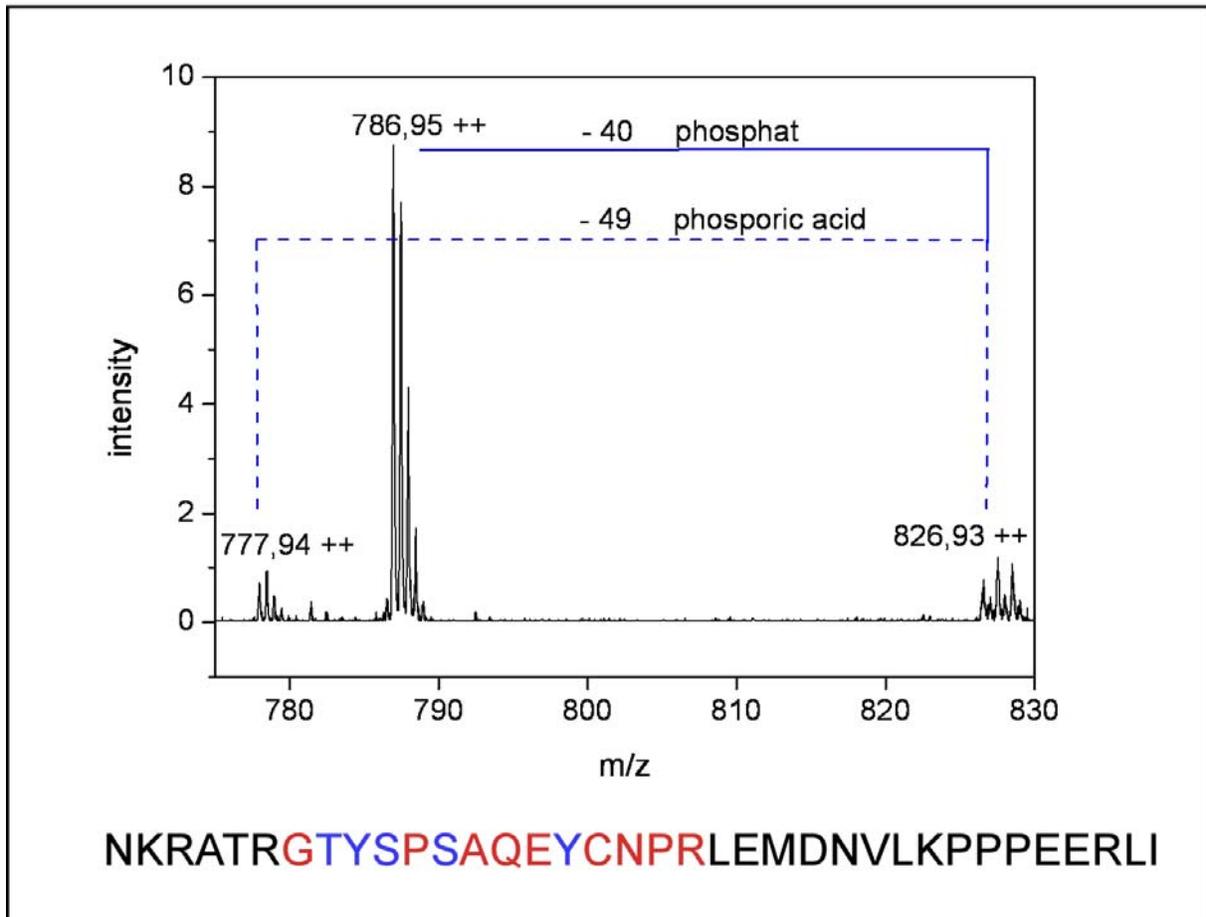


Abb.III.6. ESI-MS/MS Übersichtsspektrum des phosphorylierten Crumbs Peptids

Die Abbildung zeigt ein MS/MS Übersichtsspektrum des phosphorylierten Crumbs Peptids mit Abspaltung von Phosphorsäure und Phosphat. Darunter ist die Aminosäuresequenz der intrazellulären Domäne von Crumbs dargestellt, wobei das phosphorylierte Peptid rot markiert ist und die fünf möglichen phosphorylierten Aminosäuren blau.

In dem phosphorylierten Peptid gibt es fünf mögliche phosphorylierbare Aminosäuren. Diese sind in Abb.III.6 blau gekennzeichnet.

Bei der Sequenzierung eines Peptids wird das Ausgangspeptid in immer kleinere Peptide bis hin zu einzelnen Aminosäuren fragmentiert und für jedes dieser Teilstücke kann eine spezifische Masse im Massenspektrometer gemessen werden. Somit ist es auch möglich die Aminosäure zu ermitteln, die phosphoryliert ist. In diesem Fall war das aber nicht möglich, da aufgrund von zu wenig Probenmaterial oder Überdeckung von Signalen nicht alle Teilmassen im Spektrometer gemessen werden konnten, was eine

Zuordnung der Phosphorylierung zu einer der fünf Aminosäuren unmöglich machte. Zur Kontrolle wurden auch synthetische Peptide gleicher Sequenz, welche jeweils an den verschiedenen Aminosäuren phosphoryliert waren, gemessen und hier war es möglich, die phosphorylierte Aminosäure in der jeweiligen Probe genau zu bestimmen (Nicola Wiethölter, persönliche Mitteilung). Eine Verzehnfachung der Probenmenge führte nicht zu einer sicheren Identifizierung der phosphorylierten Aminosäure und auch der Versuch der spezifischen Anreicherung der phosphorylierten Peptide mittels des ‚phosphopeptide isolation Kits‘, Pierce blieb erfolglos (Nicola Wiethölter, persönliche Mitteilung). Ein weiterer Ansatz zur Ermittlung der phosphorylierten Aminosäure ist, mit Hilfe von spezifischen Antikörper gegen phosphoryliertes Threonin, Serin bzw. Tyrosin zu ermitteln, ob im Fall von Crb-intra ein Serin, Threonin oder Tyrosin phosphoryliert ist. Die erhältlichen Antikörper konnten allerdings am synthetisch hergestellten Crumbs Peptid nicht sicher zwischen Serin und Threonin unterscheiden, nur der Antikörper gegen Tyrosin erkennt spezifisch phosphoryliertes Tyrosin (Nicola Wiethölter, persönliche Mitteilung).

Da die phosphorylierte Aminosäure auf biochemischen Weg nicht eindeutig identifiziert werden konnte, wurden die putativ phosphorylierbaren Aminosäuren des Crumbs-Peptids gegen nicht phosphorylierbare bzw. gegen phosphomimetische Aminosäuren ausgetauscht. Anschließend wurde durch Überexpressionsstudien und Rettungsexperimente versucht Hinweise zu bekommen, welche Aminosäure für die Funktion im *Drosophila* Embryo und im *Drosophila* Flügelepitel eine Rolle spielt.

2.2. Eine partielle Rettung des *crumbs* mutanten Phänotyps ist vorwiegend abhängig vom ERLI-Motiv

Aufschlüsse über die funktionelle Bedeutung einer Proteindomäne bzw. einzelner Aminosäuren eines Proteins können Rettungsexperimente geben. Hierbei wird mit Hilfe des UAS/GAL4-Systems das veränderte Protein im jeweils mutanten Hintergrund des Proteins exprimiert. Ist das Protein bzw. die Domäne funktionell bedeutsam, kann es zu einer partiellen bis vollständigen Rettung des mutanten Phänotyps kommen. Für Crumbs ist bereits bekannt, dass sowohl das gesamte Crb Protein als auch die intrazelluläre Domäne in gleichem Maße zu einer partiellen Rettung des *crb* mutanten Phänotyps führen. Die Kutikula *crb* mutanter Embryonen zeigt nur noch krümelartige

Reste dieser, wohingegen bei der partiellen Rettung durch Crb^{Wt} und Crbi^{intra-Myc} ein zusammenhängendes Kutikulaschild mit Zähnchenbändern zu sehen ist (Wodarz, 1993; Wodarz et al., 1995). Bei Deletion des ERLI-Motivs der intrazellulären Domäne, sowie beim Aminosäureaustausch des Tyrosins an Position 10 oder der Glutaminsäure an Position 16 der intrazellulären Domäne kann keine Abschwächung des *crb* mutanten Phänotyps beobachtet werden (Klebes, 1999).

Um zu klären, ob die Expression verschieden modifizierter Varianten der putativen Phosphorylierungsstellen des Crb Proteins ebenfalls einen Einfluß auf den *crb* mutanten Kutikulaphänotyp ausüben, wurden Rettungsexperimente durchgeführt (Abb. III.7, 8 und 9). In Abb.III.7 sind Kutikulapräparationen von *crb* mutanten Embryonen gezeigt, in denen verschiedene Transgen-kodierte Proteine der intrazellulären Domäne von Crb mit intakter ERLI-Domäne exprimiert wurden.

Zur Expression der verschiedenen Varianten der intrazellulären Domäne des Crumbs Proteins wurde der GAL4^{385.3} Aktivator verwendet, welcher in Geweben ektodermalen Ursprungs exprimiert ist, so dass hauptsächlich eine Expression in Geweben, in denen auch Crb exprimiert ist, stattfand. Außerdem kann der Grad der Rettung im Vergleich zu früheren Rettungsexperimenten (s.o.) mit Crb (Wodarz, 1993; Wodarz et al., 1995; Klebes, 1999) besser eingeschätzt werden.

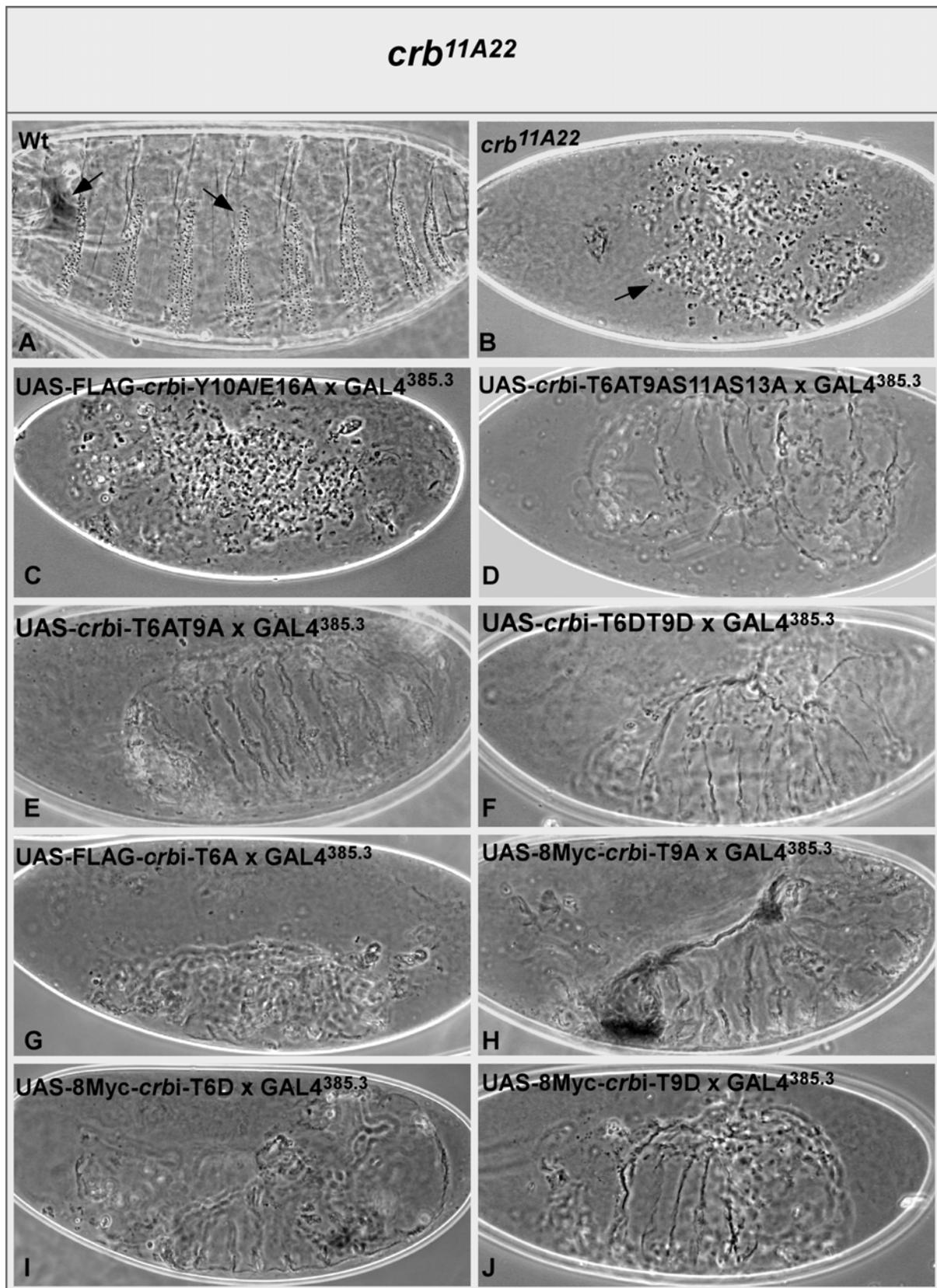
Der *crb* mutante Phänotyp, in dem nur noch Reste von Kutikula vorhanden sind (Abb.III.7.B), weist durch die Abschwächung ein zusammenhängendes Kutikulaschild mit sichtbaren Zähnchenbändern auf (Abb.III.7.D, E, F, H, I und J). Anzumerken ist, dass die Abschwächung im Fall von FLAG-Crb-intra-T6A (III.7.G) etwas schwächer erscheint, da hier nicht wie bei den anderen ein Kutikulaschild mit Zähnchenbändern zu sehen ist, sondern nur ein kleineres Schild ohne sichtbare Zähnchenbänder. Es wurde allerdings nur eine transgene Fliegenlinie von FLAG-Crb-intra-T6A für die Rettungsexperimente verwendet, da nur eine zweitchromosomale Insertion des Transgens stattgefunden hat. Es gibt außerdem noch zwei Linien mit einer drittchromosomalen Insertion. Diese müssen erst mit der *crb* Mutation rekombiniert werden, sollen aber in der Zukunft noch getestet werden. Die Überexpression des Konstruktes Crb-intra-Y10A/E16A ist als einziges nicht in der Lage, den *crb* mutanten Kutikulaphänotyp abzuschwächen, wie schon von A. Klebes, 1999, gezeigt werden konnte. Alle Crb-intra Proteine ausser Crb-intra-Y10A/E16A und FLAG-Crb-intra-T6A

erreichen eine ähnlich starke Abschwächung wie die beschriebenen Crb^{Wt} und Crbi^{intra-Myc} Proteine (Wodarz et al., 1995).

Bei Expression verschiedener Crb-intra-ΔERLI Proteine kommt es zu keiner im Kutikulaphänotyp sichtbaren Abschwächung (Abb.III.8.A-F). Wie schon früher für Crb-intra-ΔERLI beobachtet wurde (Klebes, 1999), führt der Verlust des ERLI-Motivs zu einem Verlust der Funktion der intrazellulären Domäne von Crumbs im *Drosophila* Embryo. Der *crb* mutante Phänotyp, der sich durch krümelartige Reste der Kutikula auszeichnet (Abb.III.7.B), kann durch Überexpression der intrazellulären Domäne von Crb ohne ERLI-Motiv nicht gerettet werden. Im Fall der Phosphorylierung bedeutet dies, dass auch eine scheinbar konstitutive Phosphorylierung eines der beiden oder beider Threonine (Abb.III. F, I und J) bei Verlust des ERLI-Motivs keine Rettung herbeiführt. Zur Kontrolle, dass die hier gezeigten Kutikulaphänotypen die putativ geretteten Embryonen zeigen und nicht die Expression der Effektorstrukture im *crb* heterozygoten Hintergrund widerspiegeln, wurden diese mit dem GAL4^{385.3} Aktivator im wildtypischen Hintergrund getrieben. Dabei ergab sich nur durch die Expression der Effektor-Konstrukte FLAG-Crb-intra (39.1-1a) (Abb.III.9.A und B) und 8Myc-Crb-intra-T9A (Abb.III.9.C und D) eine Letalität von 25 bzw. 15%. Die hier zu beobachtenden Kutikulaphänotypen unterschieden sich allerdings stark von den abgeschwächten Phänotypen im *crb* mutanten Hintergrund. Es fehlten die Zähnchenbänder bzw. gab es zusätzlich oder ausschließlich Kopfdefekte. Die Überexpression aller anderen Effektorstrukture führten zu keiner embryonalen Letalität.

Abb. III.7 Kutikulaphänotyp von abgeschwächten *crb*^{11A22} mutanten Embryonen nach Expression verschiedener Varianten der intrazellulären Domäne von Crb (nächste Seite)

A stellt eine wildtypische Kutikula mit Kopfskelett (linker Pfeil) und ventralen Zähnchenbändern (rechter Pfeil) dar. **B** zeigt den Kutikulaphänotyp eines *crb*^{11A22} mutanten Embryos. Nur noch krümelartige Reste von Kutikula sind vorhanden (siehe Pfeil). **C – J** zeigen Kutikulaphänotypen von Embryonen, in denen verschiedene Varianten der intrazellulären Domäne von Crb im *crb*^{11A22} mutanten Hintergrund mittels des GAL4^{385.3} Aktivators exprimiert wurden. Es konnte fast überall eine Abschwächung erreicht werden, welche sich in der Wiederherstellung eines zusammenhängenden Kutikulaschildes widerspiegelt. Anzumerken ist, dass in **C** keine Abschwächung des *crb* mutanten Kutikulaphänotyps stattgefunden hat und dass in **G** die Rettung etwas schwächer als bei den übrigen erscheint, da nur ein Stück zusammenhängende Kutikula vorhanden ist, aber nicht wie bei den anderen auch Zähnchenbänder. Anterior ist in allen Bildern links und posterior rechts.



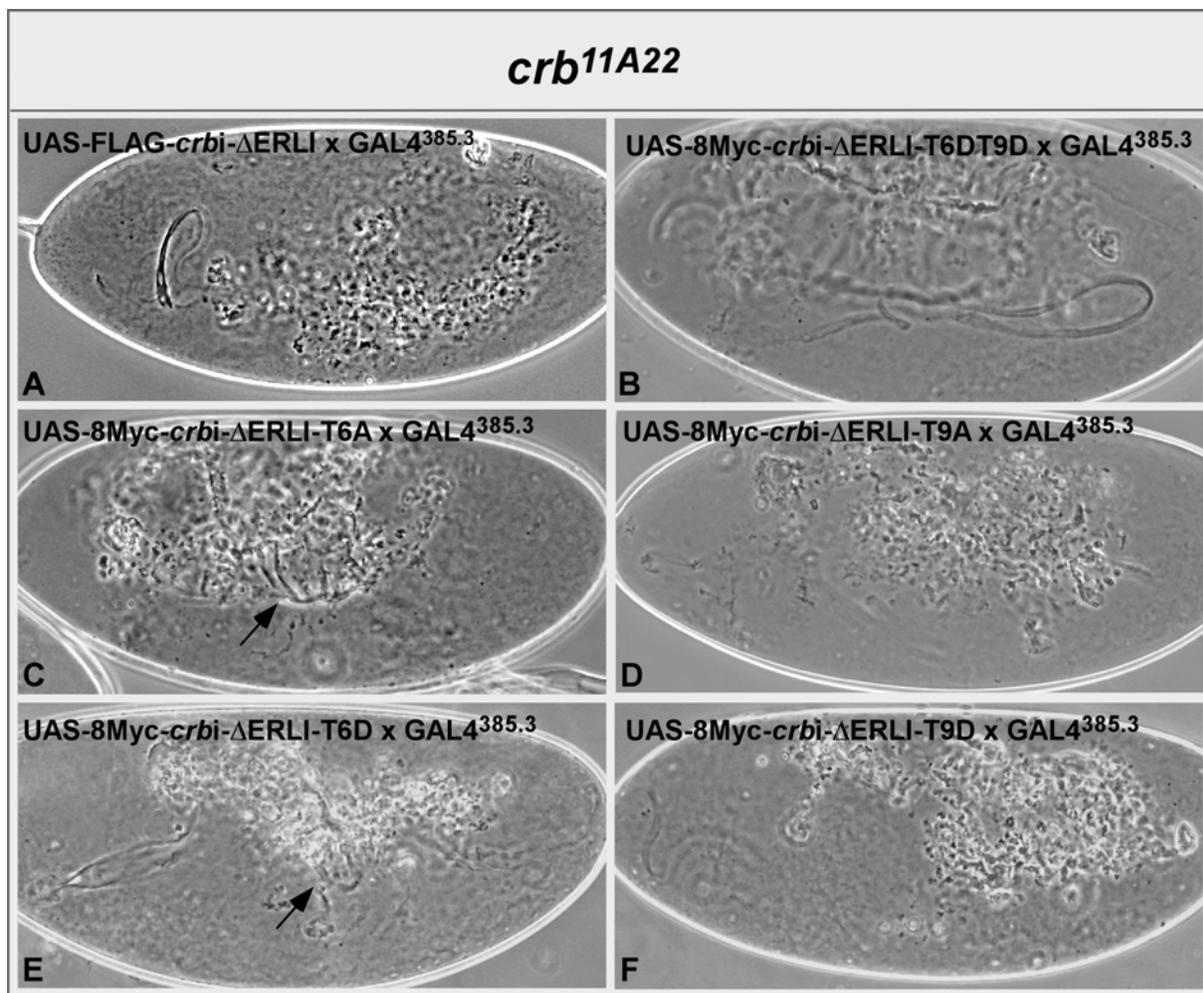


Abb. III.8. Kutikulaphänotyp von *crb*^{11A22} Embryonen nach Expression verschiedener Crb-intra-ΔERLI Proteine

A-F zeigen Kutikulaphänotypen von Embryonen, in denen verschiedene Crb-intra-ΔERLI Proteine im *crb*^{11A22} mutanten Hintergrund mittels des GAL4^{385.3} Aktivators exprimiert wurden. In allen Fällen ist kein zusammenhängendes Kutikulaschild mit Zähnenbändern zu sehen. Es sind meist nur Reste der Kutikula sichtbar und manchmal auch Reste der Tracheen, welche ebenfalls eine Kutikula sezernieren (siehe Pfeile). Anterior ist in allen Bildern links und posterior rechts.

Der Kutikulaphänotyp von *Drosophila*-Embryonen spiegelt nur den terminalen Phänotyp einer Mutation eines Proteins, welches an der Bildung von Geweben ektodermalen Ursprungs beteiligt ist, wider, da die Kutikula erst am Ende der Embryonalentwicklung von einigen ektodermalen Epithelien sezerniert wird. Der Kutikulaphänotyp kann Aufschlüsse über eine Fehlentwicklung in diesen Geweben geben. Aussagen über Zeitpunkt und Verlauf der Fehlentwicklung können allerdings nicht gemacht werden und in Rettungsexperimenten kann es sein, dass zu einem frühen Zeitpunkt in der Entwicklung eine Rettung vorhanden ist. Diese sind später im Kutikulaphänotyp evtl.

nicht mehr erkennbar, da die Defekte in der Epidermis trotzdem so stark sind, dass z.B. im Falle von *crumbs* nur krümelartige Reste von Kutikula übrigbleiben.

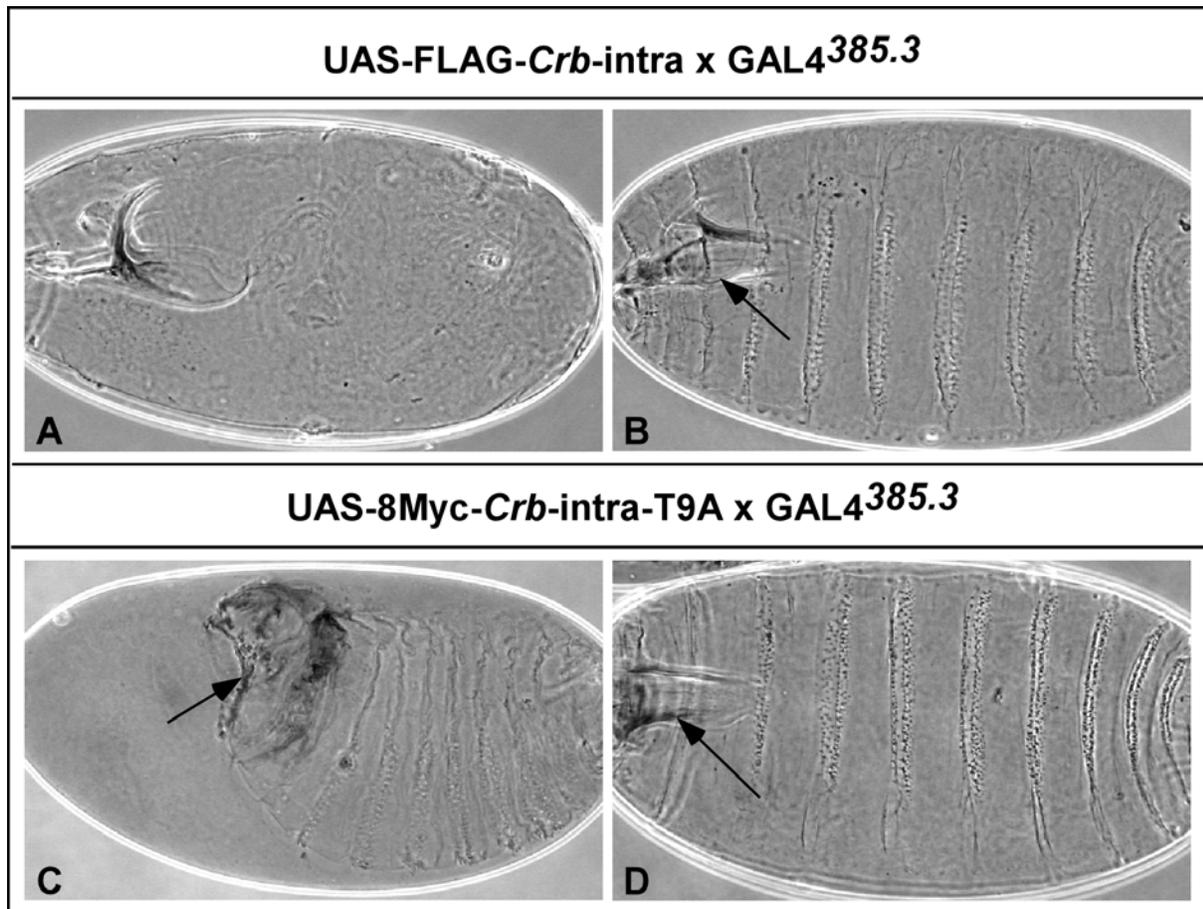


Abb.III.9. Kutikulaphänotypen der Transgen-kodierten Crb Proteine mittels des GAL4^{385.3} Aktivators
A und **B** zeigen zwei Klassen von Kutikulaphänotypen nach Expression von UAS-FLAG-*Crb*-intra mittels des GAL4^{385.3} Aktivators. Der Embryo in **A** hat keine Zähnchenbänder mehr. 2/3 der letalen Embryonen zeigen einen ähnlichen Phänotyp. 1/3 der Embryonen wird durch den Embryo aus Bild **B** repräsentiert. Es sind Zähnchenbänder vorhanden, aber das Kopfskelett (Pfeil) weist leichte Defekte auf.
C und **D** zeigen zwei Klassen von Kutikulaphänotypen nach Expression von UAS-8Myc-*Crb*-intra-T9A mittels des GAL4^{385.3} Aktivators. Der Embryo in **C** hat ein anteriores Loch (Pfeil). Ca. 1/3 der Embryonen zeigen einen ähnlichen Phänotyp, wohingegen ca. 2/3 der Embryonen, wie der Embryo in **D** aussehen und nur leichte Defekte des Kopfskeletts (Pfeil) aufweisen. Anterior ist in allen Bildern links und posterior rechts.

Immunohistochemische Färbungen an frühen Stadien (7-12) dieser geretteten Embryonen können Hinweise auf eine eventuell vorhandene frühe rettende Funktion der verschiedenen Crbi- Δ ERLI Proteine geben. In Antikörperfärbungen, dargestellt in Abb.III.9. wurde diese Möglichkeit untersucht. Alle abgebildeten Embryonen befinden sich im Stadium 11/12 (ausgestreckter Keimstreif). Es wurde auf die *Zonula adherens* fokussiert, markiert durch Expression von Canoe an der Membran im Wildtyp

(Abb.III.10. A,A') In diesem Stadium bilden die Epidermiszellen des Wildtyp Embryos einen Gewebeverband mit hexagonalen Zellen, in denen die *Zonula adherens* bereits vollständig etabliert und auch das Crumbs Protein schon in der SAR lokalisiert ist.

Betrachtet man *crb* mutante Embryonen dieses Stadiums (Abb.III.10.B-B'') so scheint der regelmäßige Gewebeverband der Epidermis sich bereits aufzulösen, gekennzeichnet durch einen teilweisen Verlust des Canoe Proteins von der Membran. Außerdem wirken die Epidermiszellen kleiner und die hexagonale regelmäßige Struktur ist verlorengegangen.

Abb.III.10.C-C'' zeigt Embryonen in denen die wildtypische intrazelluläre Domäne im *crb* mutanten Hintergrund exprimiert ist. Bei diesen Embryonen ist im Kutikulaphänotyp eine Rettung erkennbar (Abb.III.7.C), die zu einem zusammenhängenden Kutikulaschild führt. Diese Rettung manifestiert sich auch schon in dem hier gezeigten Embryo, wo markiert durch die Canoe Färbung ein einheitlicher regelmäßiger Gewebeverband erkennbar ist. Die Zellen sind kleiner als im Wildtyp, aber die Rettung ist auch nur partiell, da die meisten Embryonen bei Rückzug des Keimstreifs oder kurz danach sterben. Von der Kutikula bleibt meist nur ein Schild, welches den Keimstreifrückzug noch nicht vollständig abgeschlossen hat, übrig.

Vergleichbare Phänotypen sind auch in Embryonen zu finden, in denen *Crbi-ΔERLI* (Abb.III.10.D-D'') und *Crbi-ΔERLI-T9D* (Abb.III.10.F-F'') im *crb* mutanten Hintergrund exprimiert sind. Bei Expression von *Crbi-ΔERLI-T6A* (Abb.III.10.E-E'') dagegen ist der Verlust des Gewebeverbandes schon soweit fortgeschritten, dass kaum noch Zellen erkennbar sind. Es sind nur noch Reste der Canoe-Färbung erkennbar. Diese Defekte erscheinen stärker als im *crb* mutanten Embryo und sind wahrscheinlich auf die Expression des Transgen-kodierten *Crb-intra-T6A-ΔERLI* Proteins zurückzuführen.

Aus diesen Beobachtungen kann man schliessen, dass bei Expression dieser verschiedenen *Crbi-ΔERLI* Proteine keine frühe Rettung erkennbar ist, die eine Verbesserung zur Situation in *crb* mutanten Embryonen gleichen Stadiums darstellt.

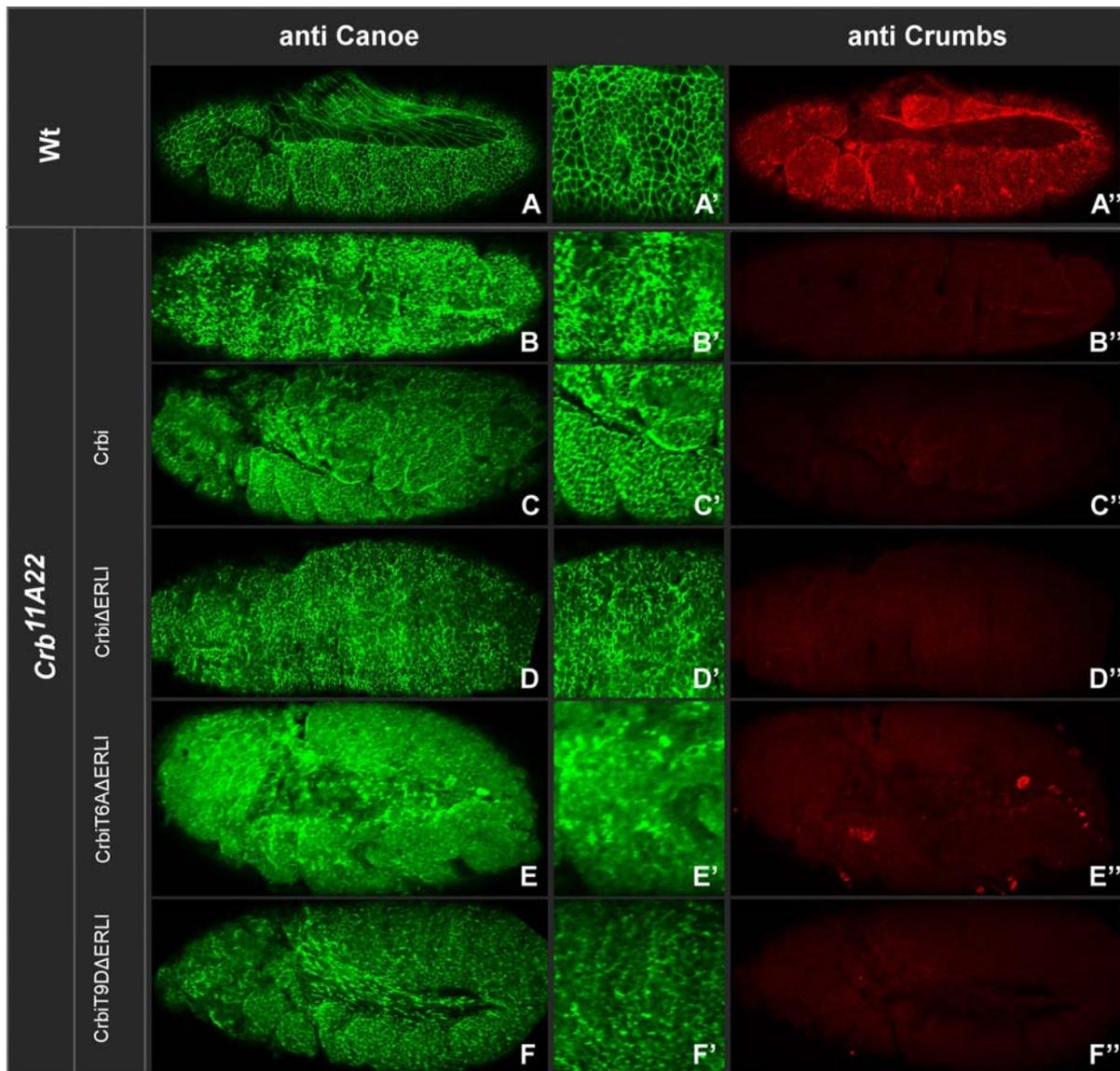


Abb. III.10. Antikörperfärbungen von crb^{11A22} Embryonen nach Expression verschiedener *Crb*-intra- Δ ERLI Proteine

A, A' und A'' zeigt einen Wildtyp Embryonen. Hier kann man sehr gut in **A und A'** die hexagonalen Zellen des zusammenhängenden Gewebeverbandes der Epidermis sehen. **A''** lässt deutlich das positive Crb Signal erkennen. **B-F und B'-F'** stellen crb^{11A22} Embryonen dar, die eine Antikörperfärbung mit einem anti Canoe Antiserum zeigen, wobei es sich bei letzteren um die jeweiligen Vergrößerungen aus **A-E** handelt. Das Canoe Protein ist Bestandteil der *Zonula adherens* und dient hier als Marker für die Etablierung der zusammenhängenden Epidermis. **B und B'** zeigen einen crb^{11A22} Embryo. Die Epidermiszellen zeigen nicht mehr die typische hexagonale Struktur und das Gewebe ist bereits von der Auflösung betroffen. **C und C'** zeigen einen crb^{11A22} Embryo der durch Expression von UAS*Crb*-intra mittels des GAL4^{385.3} Aktivators partiell gerettet wurde. Hierbei ist vor allem in **C** ventral eine relativ gut zusammenhängende Epidermis sichtbar und auch in **C'** ist ein Gewebe erkennbar, welches aus hexagonalen Zellen besteht. **D-F, D'-F' und D''-F''** stellen Embryonen dar, die im crb^{11A22} mutanten Hintergrund verschiedene *Crb*-intra- Δ ERLI Proteine exprimieren. In keinem dieser Embryonen ist eine Rettung erkennbar, d.h. eine zusammenhängende Epidermis ist nicht zu beobachten. **B''-F''** stellen diese crb^{11A22} Embryonen mit einer immunhistochemischen Färbung gegen das Crumbs Protein (Cq4) dar. In allen Bildern ist nur eine leichte Hintergrundfärbung zu beobachten. Diese Färbung diente der Kontrolle, dass es sich hier um homozygot mutante crb^{11A22} Embryonen handelt, in denen kein Crumbs Protein mehr nachweisbar ist. Alle Embryonen befinden sich im ausgestreckten Keimstreifstadium 11/12, anterior ist links.

2.3. Ektopische Expression von verschiedenen Transgen-kodierten Proteinen der intrazellulären Domäne von Crb im *Drosophila* Embryo

Um die Frage zu beantworten, ob eine putative Phosphorylierung Einfluß auf die Lokalisation des Transgen-kodierten Crb-Proteins hat und die Interaktion mit bekannten Komponenten des Crb-Komplexes hat, wurden Überexpressionsexperimente im *Drosophila* Embryo durchgeführt. Hierbei wurde wiederum das UAS/GAL4-System benutzt, um das Effektor-Konstrukt zeitlich und räumlich definiert zu exprimieren. Es wurden die folgenden Effektor-Konstrukte: UAS-Crbi, UAS-Crbi-T6A, UAS-Crbi-T6D, UAS-Crbi-T9A, UAS-Crbi-T9D, UAS-Crbi- Δ ERLI-T6A, UAS-Crbi- Δ ERLI-T6D, UAS-Crbi- Δ ERLI-T9A, UAS-Crbi- Δ ERLI-T9D und UAS-Crbi- Δ ERLI-T6DT9D mit Hilfe des Aktivatorstammes GAL4^{en} im wildtypischen Hintergrund exprimiert. Die Aktivierung mittels GAL4^{en} ist hauptsächlich an den posterioren Segmentgrenzen zu finden, so dass ein direkter Vergleich mit der wildtypischen Situation an den anterioren Segmentgrenzen möglich ist.

Die Überexpression der Effektor-Konstrukte, die das ERLI-Motiv besitzen, führen zu einem teilweisen Verlust von *DPatj* apikal an der Membran (Abb.III.11.A Bereich zwischen den Pfeilen). Das *DPatj* Protein wird entlang der gesamten Plasmamembran umverteilt (Abb.III.11.B linker Pfeil bzw. Abb.III.13). Diese Umverteilung von *DPatj* bei Überexpression von Crb^{intra-Myc} wurde schon früher von A. Klebes gezeigt (Klebes, 1999). Die Modifizierung der beiden Threonine zu nicht phosphorylierbaren (T6A und T9A) bzw. phosphomimetischen Aminosäuren (T6D und T9D) hat keinen Einfluss auf die Umverteilung von *DPatj*.

Ein weiterer Aspekt, der untersucht wurde, ist die Lokalisation der verschiedenen Transgen-kodierten Proteine der intrazellulären Domäne in der Zelle. Abb.III.11.A-A'' zeigt einen optischen Schnitt durch einen Embryo im Stadium 11/12 in Höhe der SAR. Hier kann man sehen, dass die Transgen-kodierten Crb-intra Proteine teilweise an der Membran aber hauptsächlich diffus im Zytoplasma bzw. in Vesikeln lokalisiert sind. Dies wird auch durch die Abb.III.11.B'' bestätigt, welche einen saggitalen Schnitt durch einen Embryo zeigt. Eine detaillierte Aufschlüsselung der Lokalisation der einzelnen Varianten der intrazellulären Domäne von Crb ist in Tab.III.6 zu finden.

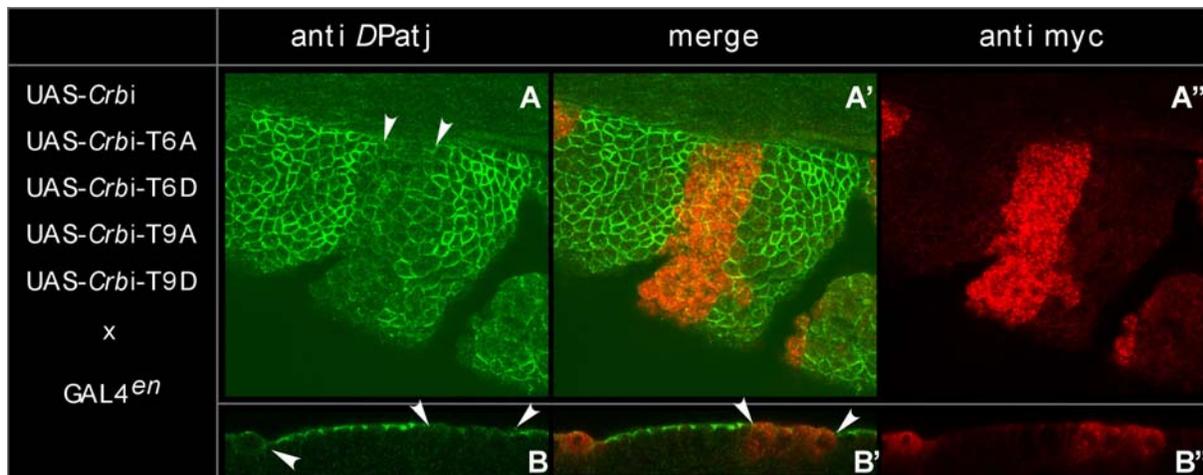


Abb.III.11. Lokalisation der ektopisch exprimierten transgen kodierten Crb-intra Proteine und deren Einfluß auf die Lokalisation des *DPatj* Proteins

Abb.III.10. **A, A' und A''** zeigen einen optischen Schnitt entlang der dorso-lateralen Seite im Bereich der SAR eines Teils eines Embryos im Stadium 11/12. Als Bsp. wurde die Überexpression des transgen kodierten Crb-intra-T9A Proteins mittels des Gal4^{en} Aktivatorsstammes dargestellt. Das ektopisch exprimierte transgen kodierte Crb-intra-T9A Protein wurde mittels des Myc Antiserums sichtbar gemacht (**A'' und B''**), da es ein 8Myc Epitop enthält und in **A und B** wurde gegen *DPatj*, einem weiteren Protein der SAR, gefärbt. *DPatj* ist in den Bereichen, in denen das Crb-intra-T9A Protein exprimiert ist, an der Membran der Epidermiszellen lokalisiert. Dort, wo das Crb-intra-T9A Protein überexprimiert ist (**A** Bereich zwischen den Pfeilen), kommt es zu einer Abschwächung des *DPatj*-Signals an der Membran bis hin zum völligen Verlust. Das stark überexprimierte Crb-intra-T9A Protein ist in dieser Schnittebene hauptsächlich im Zytoplasma zu finden. **B, B' und B''** zeigen einen Querschnitt eines Embryos, in dem als Bsp. das Transgen kodierte Crb-intra-T6D Protein über-exprimiert wurde. Man kann auch hier beobachten, dass in den Bereichen wo das Crb-intra-T6D Protein exprimiert wurde (**B und B'** Bereich zwischen den Pfeilen), die apikale Lokalisation des *DPatj* Proteins abgeschwächt wird. In **B** linker Pfeil ist bei der Crb-intra-T6D exprimierenden Zelle eine Umverteilung des *DPatj* Proteins entlang der gesamten Membran festzustellen.

Abb.III.13. macht noch einmal am Beispiel der Expression des Effektor-Konstruktes UAS-*Crbi*-T9D deutlich, dass *DPatj* hier nicht mehr nur apikal, sondern entlang der gesamten Plasmamembran zu finden ist. Gezeigt sind verschiedene Schnittebenen eines Embryos, wobei apikal auf Höhe der SAR begonnen wurde (Abb.III.12. A-A''). Hier sieht man, dass das *DPatj* Protein nur in dem Bereich, in dem kein Crbi-T9D Protein ektopisch exprimiert wurde apikal an der Membran lokalisiert ist. Dort hingegen, wo auch Crbi-T9D exprimiert ist, ist das *DPatj* Protein apikal deutlich reduziert, aber noch vorhanden. In den Fokusebenen, welche mehr basal in der Zelle liegen (Abb.III.12. B-D) kann man eine Lokalisation von *DPatj* an der Membran in den Bereichen mit ektopischer Expression von Crbi-T9D beobachten, wohingegen das *DPatj* Signal im wildtypischen Bereich basal nicht mehr zu sehen ist. *DPatj* und Crbi-T9D scheinen an der Plasmamembran zu kolokalisieren (Abb.III.13 A'-D', gelbe Färbung), wobei dies basal Abb.III.13B'-D') stärker erscheint.

Exprimiert man dagegen die Effektorstrukture, welchen das ERLI-Motiv fehlt, hat dies keinen Einfluss auf die Lokalisation von *DPatj*. Es bleibt apikal an der Membran lokalisiert, wie aus der Abb.III.12. A und A' bzw. B und B' hervorgeht. Die verschiedenen Varianten der Transgen-kodierten *Crb-intra-ΔERLI* Proteine sind hauptsächlich zytoplasmatisch und in Vesikeln exprimiert, aber auch an der Membran zu finden. (Tab.III.6)

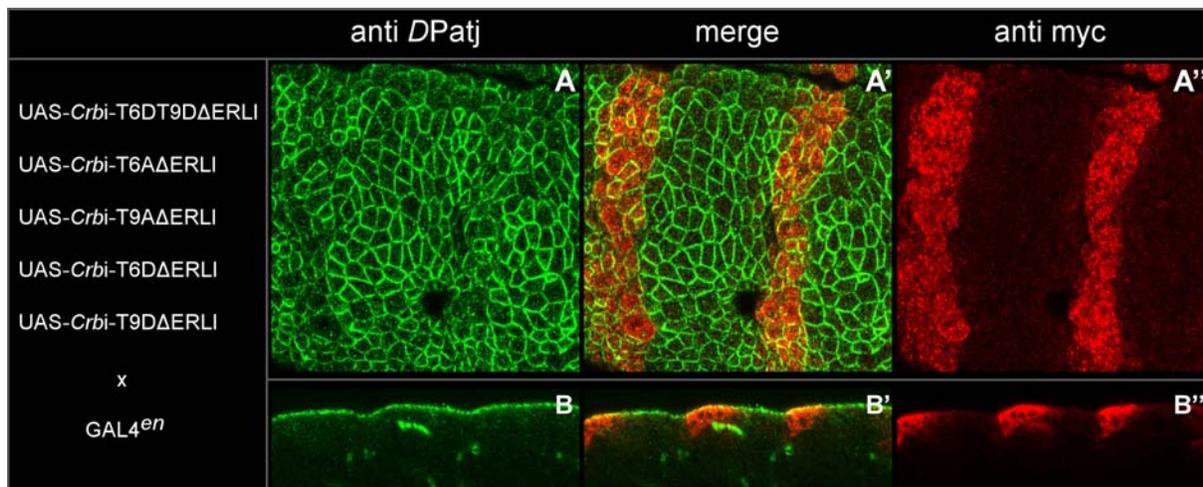
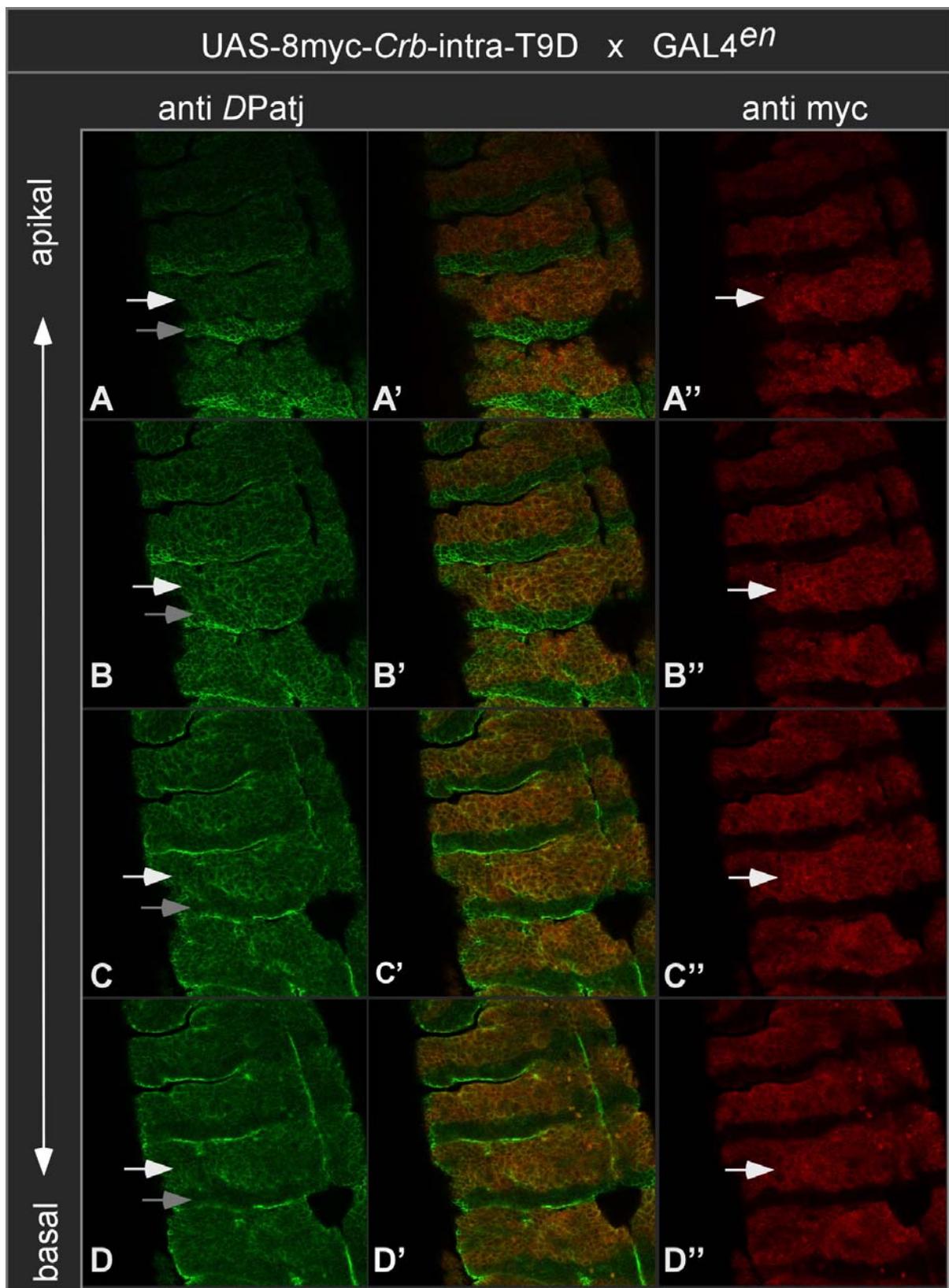


Abb.III.12. Lokalisation der ektopisch exprimierten Transgen-kodierten *Crb-intra-ΔERLI* Proteine und deren Einfluß auf die Lokalisation des *DPatj* Proteins

Abb.III.11. **A, A' und A''** zeigen eine ventral-laterale Ansicht eines Embryos im Stadium 11/12 im Bereich der SAR, in dem das transgen kodierte *Crb-intra-T6DT9DΔERLI* Protein ektopisch exprimiert wurde. Das ektopisch exprimierte *Crb-intra-T6DT9DΔERLI* Protein wurde mittels des Myc Antiserums sichtbar gemacht (**A'' und B''**), da es ein 8Myc Epitop enthält und in **A und B** wurde gegen *DPatj*, einem weiteren Protein der SAR gefärbt. **B, B' und B''** zeigen einen Querschnitt eines Embryos in Stadium 13/14. *DPatj* ist in allen Bereichen unabhängig von der ektopischen Expression des Transgen-kodierten *Crb-intra-T6DT9DΔERLI* Proteins apikal an der Zellmembran zu finden (**A, B**). Das ektopisch exprimierte *Crb-intra-T6DT9DΔERLI* Protein ist hauptsächlich im Zytoplasma lokalisiert, aber auch an der Membran zu finden (**A'', B''**).

Abb.III.13. Die ektopische Expression von *Crb-intra* Proteinen führt zu einer Umverteilung von *DPatj* an der Membran (nächste Seite)

Es werden verschiedene Schnittebenen eines Embryos, wo 8Myc-*Crb-intra-T9D* mit Hilfe des *GAL4^{en}* Aktivators ektopisch exprimiert wurde, gezeigt. Die Schnitte beginnen apikal auf Ebene der SAR markiert durch die Lokalisation von *DPatj* an der Membran (**A**, grauer Pfeil) und gehen nach basal. **A-D** stellen die Lokalisation des *DPatj*-Proteins, **A''-D''** die Lokalisation des ektopisch exprimierten *Crb-intra-T9D* Proteins, welches mittels des anti-Myc Serums detektiert wurde und **A'-D'** die Überlagerung beider dar. Apikal (**A-A''**) ist zu beobachten, dass dort wo das *Crb-intra-T9D* Protein ektopisch exprimiert ist (**A''**, Pfeil) eine deutliche Reduzierung des *DPatj* Proteins an der Membran stattgefunden hat (**A**, weißer Pfeil). In **B** ist *DPatj* in beiden Bereichen an der Membran zu finden, wobei die *DPatj* Expression im wildtypischen Bereich schwächer ist als in **A**. Mehr basal dagegen ist das *DPatj* Protein in den Zellen in denen *Crb-intra-T9D* exprimiert ist an der Membran lokalisiert (**C-D**, weiße Pfeile). Im wildtypischen Bereich ist basal kein *DPatj* mehr nachweisbar (**C-D**, graue Pfeile). Das ektopisch exprimierte *Crb-intra-T9D* Protein ist apikal teils an der Membran teils im Zytoplasma lokalisiert (**A''**). Mehr basal ist es immer mehr an der Membran zu finden (**B''-D''**, weiße Pfeile).



Tab.III.6. Zusammenfassung der Daten der Überexpressionsstudien der verschiedenen Effektorstrukture mittels des GAL4^{en} Aktivators

Effektorkonstrukt	Lokalisation	Lokalisation von DPatj	Bemerkungen
Crb-intra			
UAS-FLAG-Crbi-T6A	- zytoplasmatisch - membranassoziiert	-nicht mehr nur apikal, umverteilt	-
UAS-8Myc-Crbi-T6D	- zytoplasmatisch - membranassoziiert	-nicht mehr nur apikal, umverteilt	-apikal vesikelartige Strukturen
UAS-8Myc-Crbi-T9A	- zytoplasmatisch - membranassoziiert	-nicht mehr nur apikal, umverteilt	-
UAS-8Myc-Crbi-T9D	- zytoplasmatisch -membranassoziiert	-nicht mehr nur apikal, umverteilt -siehe Abb.III.11.	-apikal vesikelartige Strukturen
Crb-intra-ΔERLI			
UAS-8Myc-Crbi-ΔERLI-T6A	- zytoplasmatisch	- keine Umverteilung von DPatj	-sehr viele vesikelartige strukturen -dominanter Phänotyp
UAS-8Myc-Crbi-ΔERLI-T6D	-membranassoziiert - zytoplasmatisch	-keine Umverteilung von DPatj	-vesikelartige Strukturen
UAS-8Myc-Crbi-ΔERLI-T9A	- membranassoziiert -zytoplasmatisch	- keine Umverteilung von DPatj	-vesikelartige Strukturen
UAS-8Myc-Crbi-ΔERLI-T9D	-membranassoziiert - zytoplasmatisch	- keine Umverteilung von DPatj	-apikal vesikelartige Strukturen
UAS-8Myc-Crbi-ΔERLI-T6DT9D	-membranassoziiert - zytoplasmatisch	- keine Umverteilung von DPatj	-apikal vesikelartige Strukturen

Fasst man die Ergebnisse der Überexpressionstudien der verschiedenen Effektorstrukture zusammen, so kann man sagen, dass eine Umverteilung von DPatj entlang der Plasmamembran nur in Abhängigkeit vom ERLI-Motiv stattfindet und die Modifikation der beiden putativen Phosphorylierungsstellen keinen Einfluss auf diese hat. Die Lokalisation der verschiedenen Crb-intra Proteine selbst ist sowohl membranständig als auch zytoplasmatisch und es sind vesikelartige Strukturen zu beobachten. Markante Unterschiede sind zwischen den einzelnen Crb-intra Proteinen

nicht festzustellen, da die Überexpression sehr stark erscheint und die Zellen teilweise mit Protein überladen sind.

2.4. Überexpression von verschiedenen Transgen-kodierten Crb-intra Proteinen im Flügel von *Drosophila melanogaster* führen zu starken Defekten in Abhängigkeit vom ERLI-Motiv

Der Crb-Komplex ist nicht nur in Epithelien im *Drosophila* Embryo exprimiert, sondern z.B. auch im Flügelepithel. Überexpression von Transgen-kodierten Crb-intra Proteinen führt hier zu Defekten im Flügelepithel, welches sich z.B. in Löchern und nekrotischen Zellen (Wodarz, 1993; Sotillos et al., 2004) oder bei Überexpression von Transgen-kodierten Crb-intra- Δ ERLI in einer Vergrößerung des Flügels und veränderten Quervernen (Klebes, 1999) widerspiegelt.

Aufgrund obiger Beobachtungen wurde getestet, ob die Phosphorylierung einen Einfluß auf die Funktion von *crb* im Flügelepithel hat. Dazu wurden die verschiedenen Varianten der Transgen-kodierten Crb Proteine mittels des Gal4^{en} Aktivators im posterioren Kompartiment der Flügel überexprimiert (Abb.III.14, B blaue Färbung). Die daraus resultierenden Flügelphänotypen sind in Abb.III.15 und 16 dargestellt. Fast alle diese Flügel zeigen eine Vergrößerung des Flügels im posterioren Kompartiment und Veränderungen der Quervernen. Der adulte Flügel besitzt 2 Quervernen, welche die 3. und 4. bzw. 4. und 5. Längsvene miteinander verbinden (Abb.III.14.A). Durch die Vergrößerung des Flügels können die Quervernen die beiden Längsvenen nicht mehr verbinden und werden teilweise reduziert (Abb.III.15 E, F, G und I, Pfeile).

Einzige Ausnahme ist die Überexpression des Transgen-kodierten Crb-intra-Y10A/E16A- Δ ERLI Proteins (Abb. III.15. H), bei dem keine Defekte sichtbar sind und der Abstand der 4. Längsvene zum Flügelrand im Vergleich zum Wildtyp kaum vergrößert ist (Abb.III.16; Wildtyp; Crbi-Y10A/E16A- Δ ERLI; Abb.III.17).

Die Vergrößerung der Flügel ist auf mehr Zellen und nicht auf eine Vergrößerung der Zellen im posterioren Kompartiment zurückzuführen. Dazu wurden die Zellen entlang der posterioren Querverne bzw. senkrecht zwischen der 4. und der 5. Längsvene an der Stelle der Reste der posterioren Querverne gezählt (Daten nicht gezeigt). Die Vergrößerung der Flügel könnte deshalb entweder auf eine Überproliferation oder auf die Unterdrückung von Zelltod zurückzuführen sein.

Nach Überexpression einiger Transgen-kodierter Crb Proteine mit intaktem ERLI-Motiv zeigen die Flügel Nekrotisierungen und Löcher (Abb.III.15 A, D, E, F, G und I) und die Expression von Transgen-kodiertem Crb-intra_{-myc-intra} (Klebes, 1999) und Crb-intra-T6AT9AS11AS13 (Sotillos et al., 2004) mittels des Gal4^{en} Aktivators führt zu pupaler Letalität, wodurch Aussagen über eine evtl. Vergrößerung der Flügel im posterioren Kompartiment nicht getroffen werden können.

Die hier gezeigten Überexpressionsphänotypen im Flügelepithel wurden nach Experimenten erhalten, die bei 18°C durchgeführt wurden. Führt man dasselbe Experiment bei 25°C durch, was die Expression der Transgen-kodierten Crb Proteine verstärkt, dann zeigen die Flügel aller Überexpressionen mit Transgen-kodierten Crb Proteinen, die ein intaktes ERLI-Motiv haben, stärkere Defekte. Diese äussern sich derart, dass aufgrund pupaler Letalität keine adulten Fliegen mehr schlüpfen oder die Flügel sehr starke Nekrotisierungen aufweisen. Die Überexpression der Varianten der Crb-intra-ΔERLI Proteine zeigen dagegen auch hier nur den Überwachstumsphänotyp und Venendefekte (Daten nicht gezeigt).

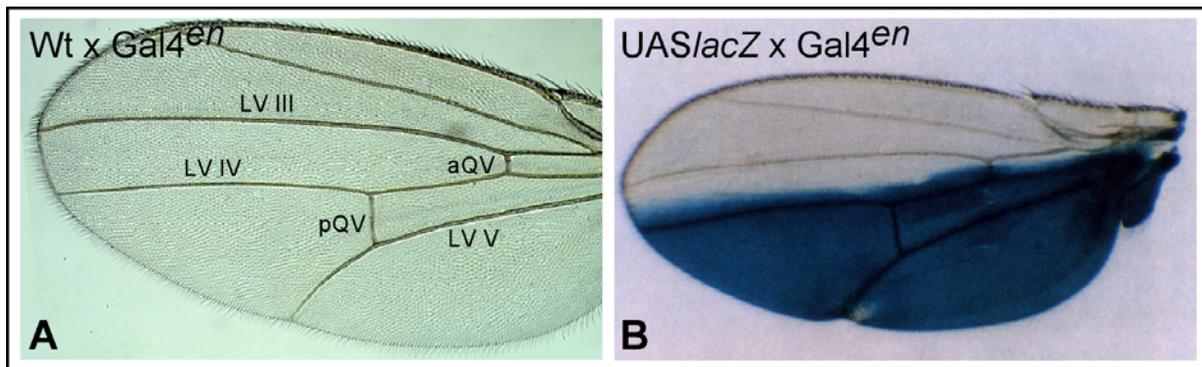


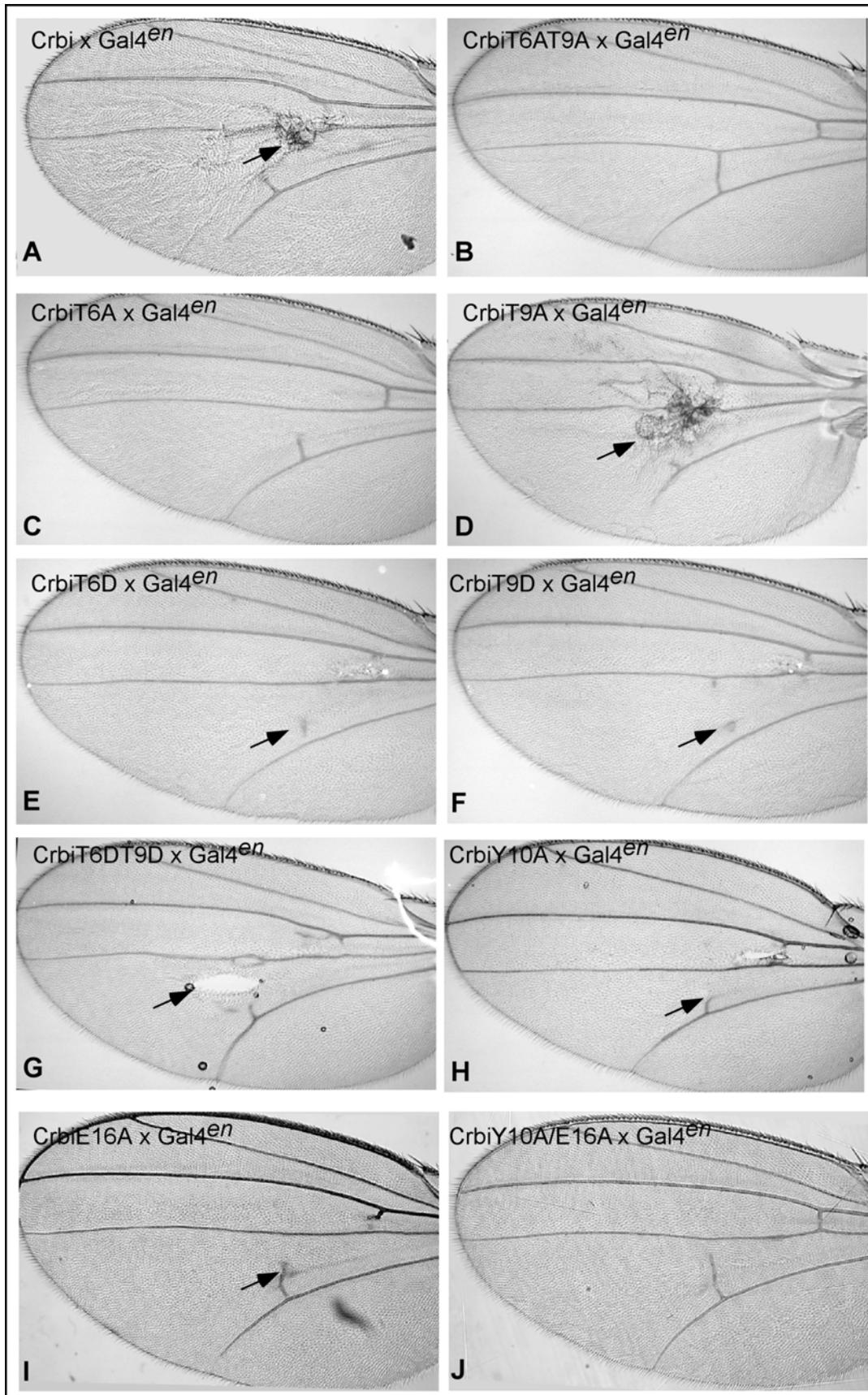
Abb.III.14. Wildtypischer Flügel und Expressionsort des Gal4^{en} Aktivators

A stellt einen wildtypischen Flügel dar. Gekennzeichnet sind LV III (3. Längsvene), LV IV (4. Längsvene), LV V (5. Längsvene), aQV (anteriore Quervene) und pQV (posteriore Quervene).

B zeigt eine anti β-Galaktosidasefärbung eines adulten Flügels nach Aktivierung eines UAS/*lacZ*-Transgenes mittels des Gal4^{en} Aktivators. Durch die Färbung ist das posteriore Kompartiment des Flügels markiert, was den Expressionsort des Gal4^{en} Aktivators im Flügel widerspiegelt. (Cohen, 1993)

Abb.III.15. Überexpression der Varianten der Crb-intra Proteine im Flügelepithel (nächste Seite)

Dargestellt sind die Überexpressionsphänotypen im Flügel der verschiedenen Transgen-kodierten Crb Proteine, welche ein intaktes ERLI-Motiv besitzen. Die Überexpression wurde mittels des Gal4^{en} Aktivators bei 18°C durchgeführt. Die Flügel in **A** und **D** zeigen Nekrotisierungen und in **G** und **I** Löcher. Die Quervenen der Flügel in **A**, **C-H** sind defekt, so dass die Längsvenen nicht mehr miteinander verbunden sind. Allen gemeinsam ist eine Vergrößerung des Flügels im posterioren Kompartiment.



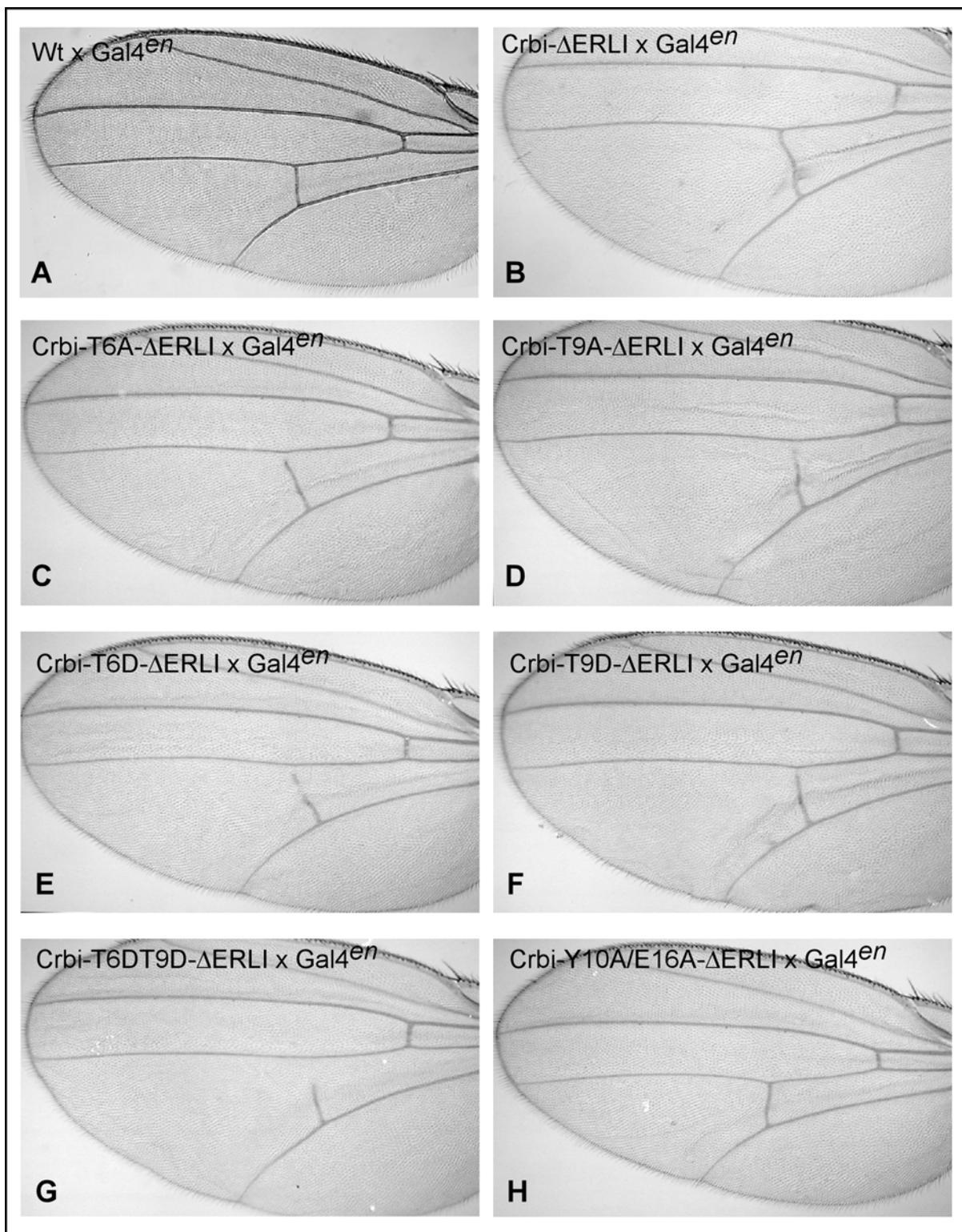


Abb.III.16. Überexpression der Varianten der Crb-intra-ΔERLI Proteine im Flügelepithel

Dargestellt sind die Überexpressionsphänotypen der verschiedenen Transgen-kodierten Crb Proteine im Flügel, welche kein ERLI-Motiv besitzen. Die Überexpression wurde mittels des Gal4^{en} Aktivators bei 18°C durchgeführt. Die Flügel in B-G zeigen eine Vergrößerung im posterioren Kompartiment und die zweite Quervene verbindet die 4. und die 5. Längsvene nicht mehr. Die Größe des in H abgebildeten Flügels der Überexpression von Crbi-Y10A/E16A-ΔERLI ist vergleichbar mit der des Wildtyps in A.

Um die Vergrößerung der Flügel durch die Überexpression der verschiedenen Varianten der Transgen-kodierten Crb Proteine zu quantifizieren, wurden die Abstände vom Schnittpunkt der vierten Längsvene mit der posterioren Quervene bis zum Flügelrand vermessen. Die erhaltenen Mittelwerte sind in Abb.III.17 grafisch dargestellt.

Bei Überexpression der Transgen-kodierten Proteine Crb-intra (mit einem Myc, FLAG oder 8Myc Epitop versehen), Crb-intra-T6AT9AS11AS13A und Crb-intra-T9A war eine Messung des Abstandes zwischen der 4. Längsvene und dem Flügelrand nicht möglich, da die Expression dieser Crb Proteine entweder pupal letal waren oder eine genaue Messung aufgrund vieler nekrotischer Zellen oder Löcher unmöglich war (Abb.III.15 A und D).

Vergleicht man die relativen Flügelgrößen der Transgen-kodierten Crb Proteine dargestellt in Abb.III.17, so ist festzustellen, dass nur bei Expression von Crbi-Y10A/E16A- Δ ERLI eine deutlich reduzierte Vergrößerung des Flügels zu beobachten ist. Dies trifft zwar auch für die Überexpression von Crbi-T6DT9D und Crbi-Y10A zu, aber hier kommt die Reduktion der Flügelgröße wahrscheinlich durch die Löcher und Nekrotisierungen zustande, die die Flügelgröße verkleinern.

Die Fragestellung, ob der dominante Flügelphänotyp auch schon in den Imaginalscheiben ausgeprägt ist, sollte durch Überexpression der Transgen-kodierten Crb-intra in der Flügelgröße (Abb.III.18.B mit gestrichelter Linie gekennzeichnete Fläche) beantwortet werden. Bereits hier kommt es zu einem sehr starken Überwachstum. Dieses ist im Falle der Überexpression von Crb-intra-T9D- Δ ERLI wesentlich schwächer (Abb.III.18.E mit gestrichelter Linie gekennzeichnete Fläche), aber noch vorhanden. Die apiko-basale Polarität scheint aber nicht betroffen zu sein, da *DPatj* als apikaler und *Discs large* als basolateraler Marker keine Kolokalisation zeigen (Abb.III.18.B' und E' Pfeile).

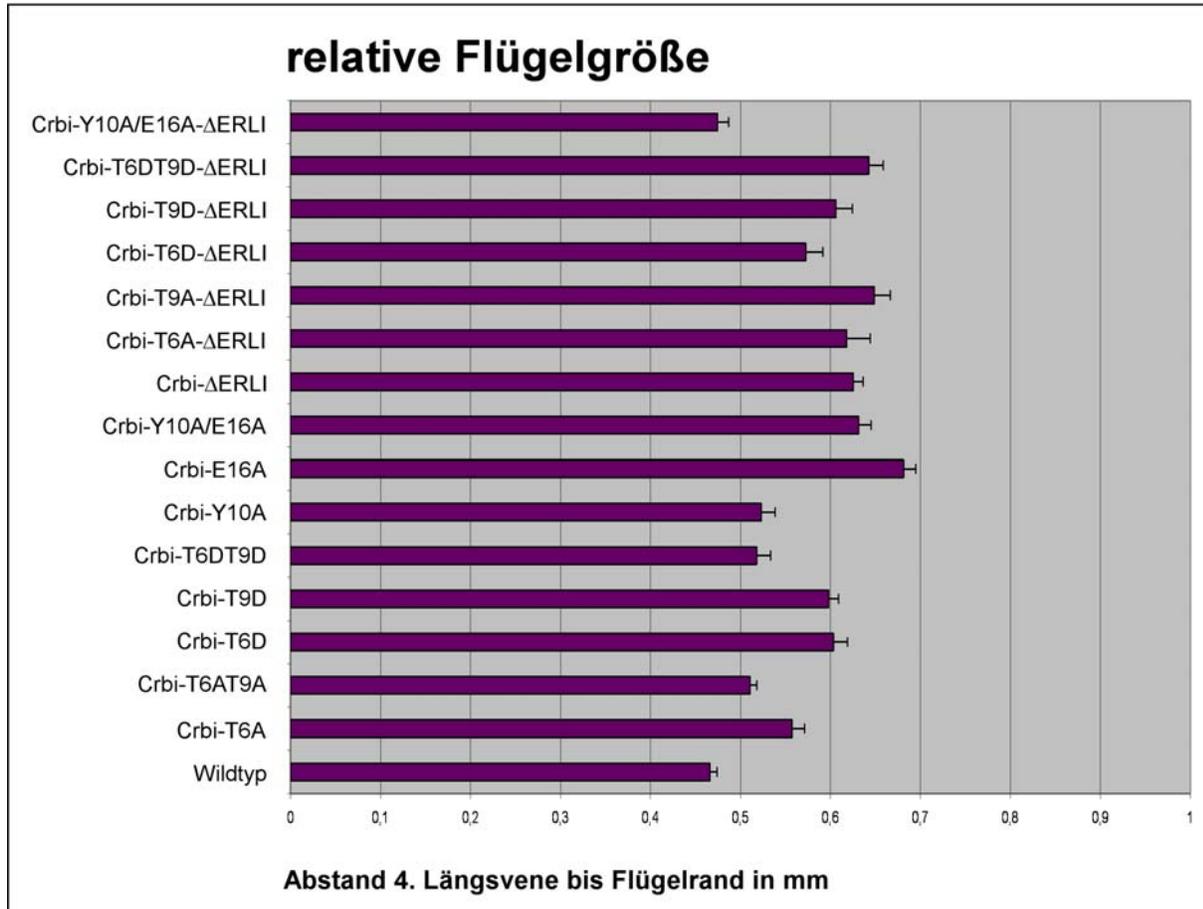
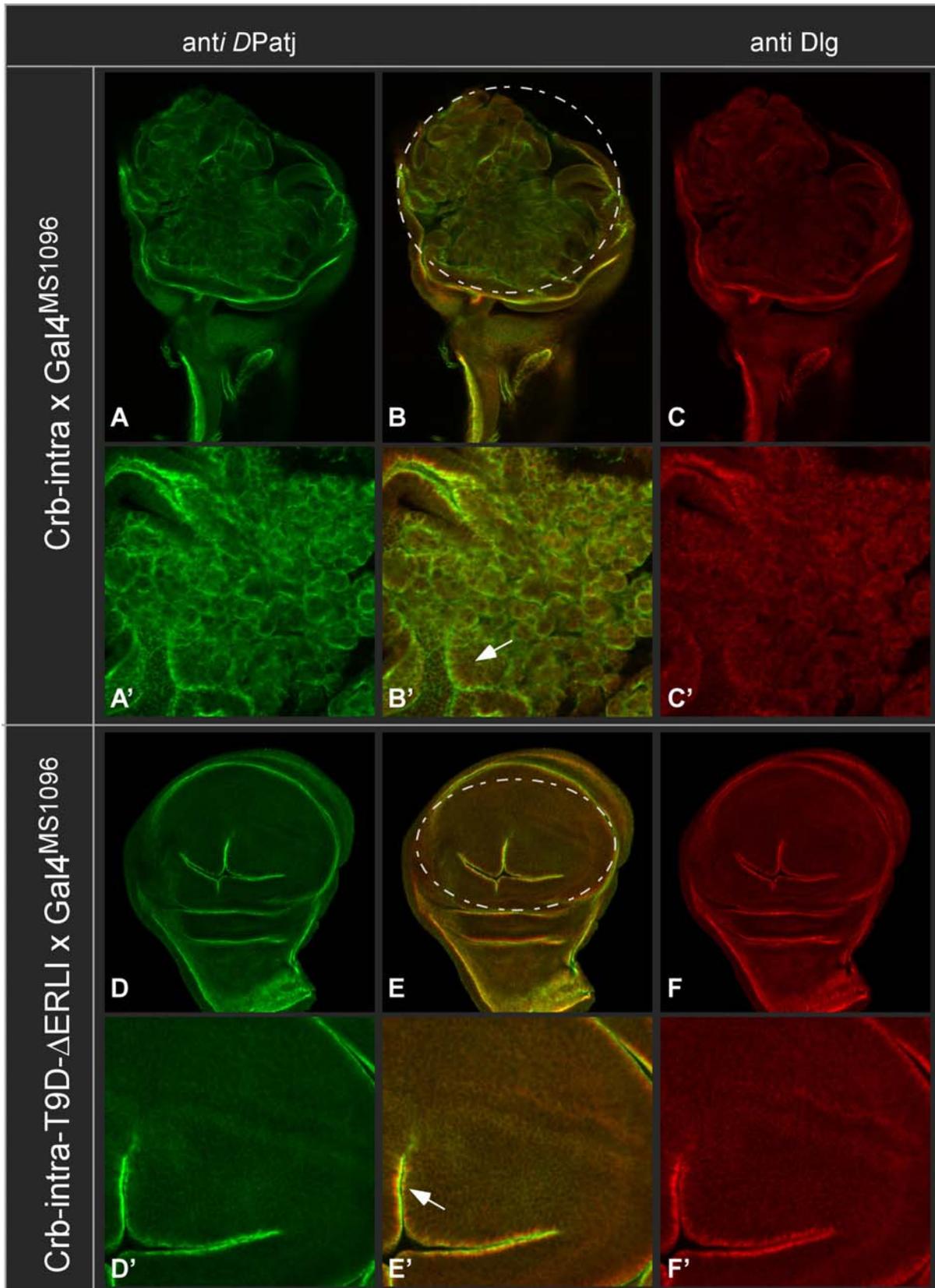


Abb.III.17. Vergleich der relativen Flügelgrößen nach Überexpression der verschiedenen Varianten der Transgen-kodierten Crb Proteine

Das Diagramm stellt die relativen Flügelgrößen nach Überexpression der verschiedenen Varianten der transgen kodierten Crb Proteine in mm dar. Gemessen wurde vom Schnittpunkt der 4.Längsvene mit der posterioren Querverne zum Flügelrand. Die Fliegen wurden bei 18°C aufgezogen und Messdaten von n=15 männlichen Flügeln erhoben.

Abb.III.18. Überexpression von Transgen-kodierten Crb Proteinen in Imaginalscheiben (nächste Seite)

Dargestellt sind Imaginalscheiben in denen Crb-intra (A-C, A'-C') und Crb-intra-T9D-ΔERLI (D-F, D'-F') mittels des Gal4^{MS1096} Aktivators überexprimiert wurden. Das DPatj Protein und das Discs large Protein wurden mittels Antikörperfärbungen detektiert. Der Expressionsort der Transgen-kodierten Crb Proteine ist anhand einer gestrichelten Fläche gekennzeichnet (B', E'). DPatj und Discs large kolokalisieren nicht (Pfeile in B' und E').



Die Überexpression der verschiedenen Varianten der Transgen-kodierten Crb Proteine zeigen verschieden starke Phänotypen. Im adulten Flügel führen diese zu Löchern und Nekrotisierungen und einem Überwachstumsphänotyp, welcher wahrscheinlich auch die Quervenendefekte zu Folge hat. In den Imaginalscheiben ist ebenfalls schon ein Überwachstum des Flügelblattes zu sehen. Die apiko-basale Polarität, deren Etablierung und Aufrechterhaltung die Aufgabe des Crb-Komplexes im Embryo ist, scheint hier nicht gestört zu sein.

Die Expression der Transgen-kodierten Crb Proteine führt zu einen mehr oder weniger stark ausgeprägten Flügelphänotyp. Der Aminosäureaustausch gegen nicht phosphorylierbare Aminosäuren (T6A, T9A, T6AT9A, T6AT9AS11AS13A und Y10A), gegen phosphomimetische Aminosäuren (T6D, T9D und T6DT9D), von Glutaminsäure zu Alanin (E16A), sowie die Deletion des ERLI-Motivs scheint jedoch keinen Einfluss auf diesen Phänotyp zu zeigen.

Eine deutliche Reduzierung des dominanten Flügelphänotyps ist nur nach Expression einer Kombination von Veränderungen der intrazellulären Domäne von Crb (Crb-Y10A/E16-ΔERLI) zu beobachten. In diesem Protein wurde ein Austausch von Tyrosin an Position 10 und von Glutaminsäure an Position 16 zu einem Alanin, sowie die Deletion des ERLI-Motivs vorgenommen.

Tab.III.7. Zusammenfassung der Überexpressionseffekte der Varianten der intrazellulären Domäne von Crumbs

§ - Wodarz, 1993; # - Sotillos et al., 2004; * - Klebes, 1999

Varianten des Transgen kodierten Crb Proteins	Rettung im Embryo	Umverteilung von DPatj	Flügel-phänotyp
RNKRATRGTYSPSAQEYCNPRLEMDNVLKPPPEERLI	ja [§]	ja	ja [§]
RNKRAARGTYSPSAQEYCNPRLEMDNVLKPPPEERLI	ja (schwächer)	ja	ja
RNKRATRGAYSPSAQEYCNPRLEMDNVLKPPPEERLI	ja	ja	ja
RNKRATRGTASPSAQEYCNPRLEMDNVLKPPPEERLI	nein	n.e.	ja
RNKRATRGTYSPSAQAYCNPRLEMDNVLKPPPEERLI	nein	n.e.	ja
RNKRADRGTYSPSAQEYCNPRLEMDNVLKPPPEERLI	ja	ja	ja
RNKRATRGDYSPSAQEYCNPRLEMDNVLKPPPEERLI	ja	ja	ja
RNKRAARGAYSPSAQEYCNPRLEMDNVLKPPPEERLI	ja	n.e.	ja
RNKRADRGDYSPSAQEYCNPRLEMDNVLKPPPEERLI	ja	n.e.	ja [#]
RNKRATRGTASPSAQAYCNPRLEMDNVLKPPPEERLI	nein*	n.e.	ja*
RNKRAARGAYAPAAQEYCNPRLEMDNVLKPPPEERLI	ja	n.e.	ja
RNKRATRGTYSPSAQEYCNPRLEMDNVLKPPPE	nein*	nein	ja*

RNKRAARGTYSPSAQEYCNPRLEMDNVLKPPPE	nein	nein	ja
RNKRATRGAYSPSAQEYCNPRLEMDNVLKPPPE	nein	nein	ja
RNKRDTRGTYSPSAQEYCNPRLEMDNVLKPPPE	nein	nein	ja
RNKRATRGDYSPSAQEYCNPRLEMDNVLKPPPE	nein	nein	ja
RNKRDTRGDYSPSAQEYCNPRLEMDNVLKPPPE	nein	nein	ja
RNKRATRGTASPSAQAYCNPRLEMDNVLKPPPE	nein*	n.e.	nein*

Eine Zusammenfassung der durch die Überexpression der Varianten der intrazellulären Domäne erhaltenen Daten ist in Tabelle III.7 dargestellt. Es wird deutlich, dass für die partielle Rettung des *crb* mutanten Phänotyps im Embryo hauptsächlich das ERLI-Motiv, das Tyrosin an Position 10, die Glutaminsäure an Position 16 und das Threonin an Position 6 der intrazellulären Domäne wichtig sind.

Die Umverteilung von *DPatj* ist dagegen nur abhängig vom ERLI-Motiv. Die anderen Aminosäuren der intrazellulären Domäne scheinen darauf keinen Einfluß zu haben. Dies muß allerdings noch für das Tyrosin an Position 10 und die Glutaminsäure an Position 16 überprüft werden. Eine Reduzierung des dominanten Flügelphänotyps kann nur bei Expression eines Transgen-kodierten *Crb* Proteins mit einer Kombination von Mutationen in der intrazellulären Domäne beobachtet werden.

3. Suche nach neuen Interaktionspartnern der intrazellulären Domäne von *Crb* durch Modulation der Bindung aller bekannten PDZ Domänen von *Drosophila melanogaster* mit dem ERLI-Motiv und Berechnung der Bindungsaffinitäten

Eine weitere Möglichkeit, neue Bindungspartner eines Proteins zu identifizieren ist mittels des ‚homology modellings‘. Hierbei werden mit Hilfe von bekannten NMR Strukturen Modelle für die Bindung eines Liganden an eine Bindetasche erstellt. Für die Modellierung der Bindung und die Berechnung der Bindungsaffinität wurde eine Version des Algorithmus FoldX (<http://foldx.embl.de>) (Guerois et al., 2002; Kiel et al., 2005; Reumers et al., 2005) verwendet. Zuerst wurde die Bindung der PDZ-Domänen der beiden bekannten Bindungspartner des ERLI-Motivs, *Sdt* und *DmPar-6*, modelliert und deren Bindungsaffinitäten berechnet.

Stardust Bindungsenergie = -9,1kcal/mol

DmPar-6 Bindungsenergie = -11,49 kcal/mol

Beide PDZ-Domänen zeigen ähnlich starke Bindungsaffinitäten, aber die von *DmPar-6* ist etwas höher. Unter Bedingungen, wo nicht alle möglichen Bindungsstellen besetzt sind, würde wahrscheinlich eine Bindung der intrazellulären Domäne von Crumbs an *DmPar-6* bevorzugt.

Um weitere Proteine zu identifizieren, welche an das ERLI-Motiv von Crumbs binden können, wurden zunächst phylogenetische Stammbäume der Aminosäuresequenzen gesamter PDZ-Domänen und von Teilen der Sequenz, welche für die Bindung relevante Aminosäuren enthalten, erstellt. Anschließend wurde für PDZ-Domänen, welche als sehr eng verwandt mit Sdt und *DmPar-6* ermittelt wurden, das oben beschriebene ‚homology modelling‘ durchgeführt und 4 weitere wahrscheinliche Bindungspartner des ERLI-Motivs identifiziert. Hierbei handelt es um folgende Proteine:

MPP4 Bindungsenergie = -3,21 kcal/mol

InaD Bindungsenergie = - 1,57 kcal/mol

CG1976 (RhoGAP100F) Bindungsenergie = -0,41 kcal/mol

CG9326 Bindungsenergie = +0,97 kcal/mol

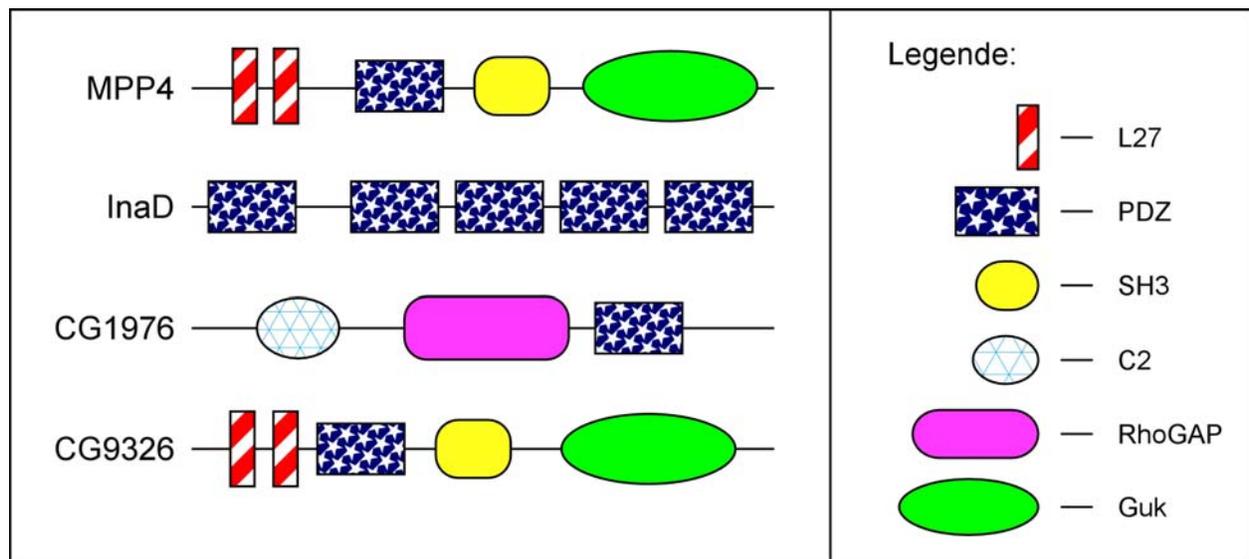


Abb.III.19. Schema der Proteinstruktur der potentiellen Bindungspartner des ERLI-Motivs

Dargestellt sind die verschiedenen Protein-Proteininteraktionsdomänen, der Proteine, welche mittels ‚homology modelling‘ als potentielle Bindungspartner des ERLI-Motivs identifiziert wurden. (L27-Lin2/Lin7-Bindedomäne; PDZ-Postsynaptic; SH3-Sarc Homology-Domäne; C2-Calcium/Lipid-Binderegion; RhoGAP-RhoGTPase activating Protein; Guk-Guanylatkinase)

Vergleicht man die Bindungsaffinitäten dieser Proteine mit denen von Sdt und *DmPar-6*, so kann man feststellen, dass eine Bindung dieser PDZ-Domänen an das ERLI-Motiv wesentlich unwahrscheinlicher ist und in *Drosophila melanogaster* eventuell gar nicht stattfindet. Die Bindung *in vivo* muss erst durch zusätzliche Experimente nachgewiesen werden.

Alle Berechnungen des ‚homology modellings‘ und der Bindungsaffinitäten wurden von Gregorio Fernandez-Ballester (Instituto de Biología Molecular y Celular, Alicante, Spain) und Luis Serrano (EMBL, Heidelberg) durchgeführt.

3.1. Test der Interaktion der Kandidaten mit Hilfe des Hefe-2-Hybridsystems

Da es sich bei den oben ermittelten potentiellen Bindungspartnern des ERLI-Motivs der intrazellulären Domäne von Crumbs um berechnete Bindungsaffinitäten der PDZ-domäne und des ERLI-Motivs handelt, wurden diese potentiellen Bindungen experimentell durch Interaktionsstudien mit Hilfe des Hefe- 2- Hybrid Systems überprüft. Dazu wurde die Interaktion der PDZ-Domänen der oben genannten Proteine jeweils mit der gesamten intrazellulären Domäne (Crbi) und der intrazellulären Domäne ohne das ERLI-Motiv (Crbi- Δ ERLI) getestet. Die Interaktionen wurden mit Hilfe des ONPG-Liquid-Assays (Miller, 1972) ermittelt, wodurch die Stärke der Interaktion im Hefe-2-Hybridsystem quantifiziert werden kann. Diese Daten sind in Abb.III.20 dargestellt.

Das Diagramm in Abb. III.20. zeigt, dass im Hefe-2-Hybridsystem die PDZ-Domänen von CG1976, CG9326 und Sdt, sowie *DmPar-6* (full length) und MPP4 (SH3+Guk) mit der intrazellulären Domäne von Crb interagieren. Bei der Negativkontrolle, der Interaktion mit der intrazellulären Domäne von Crumbs mit deletiertem C-Terminus (Crbi- Δ ERLI) war in keinem Fall eine messbare Interaktion nachweisbar. Nur die PDZ-Domäne (1.) von InaD zeigte sowohl mit der intrazellulären Domäne von Crumbs (Crbi) als auch Crbi- Δ ERLI keine Interaktion. Um zu überprüfen, ob die PDZ-Domäne allein, wie im Fall von Mpp4, nicht ausreichend für eine erfolgreiche Interaktion ist, wurde das gesamte InaD Protein auf eine Interaktion mit der intrazellulären Domäne von Crb getestet. Aber auch hier konnte keine Interaktion im Hefe-2-Hybridsystem festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

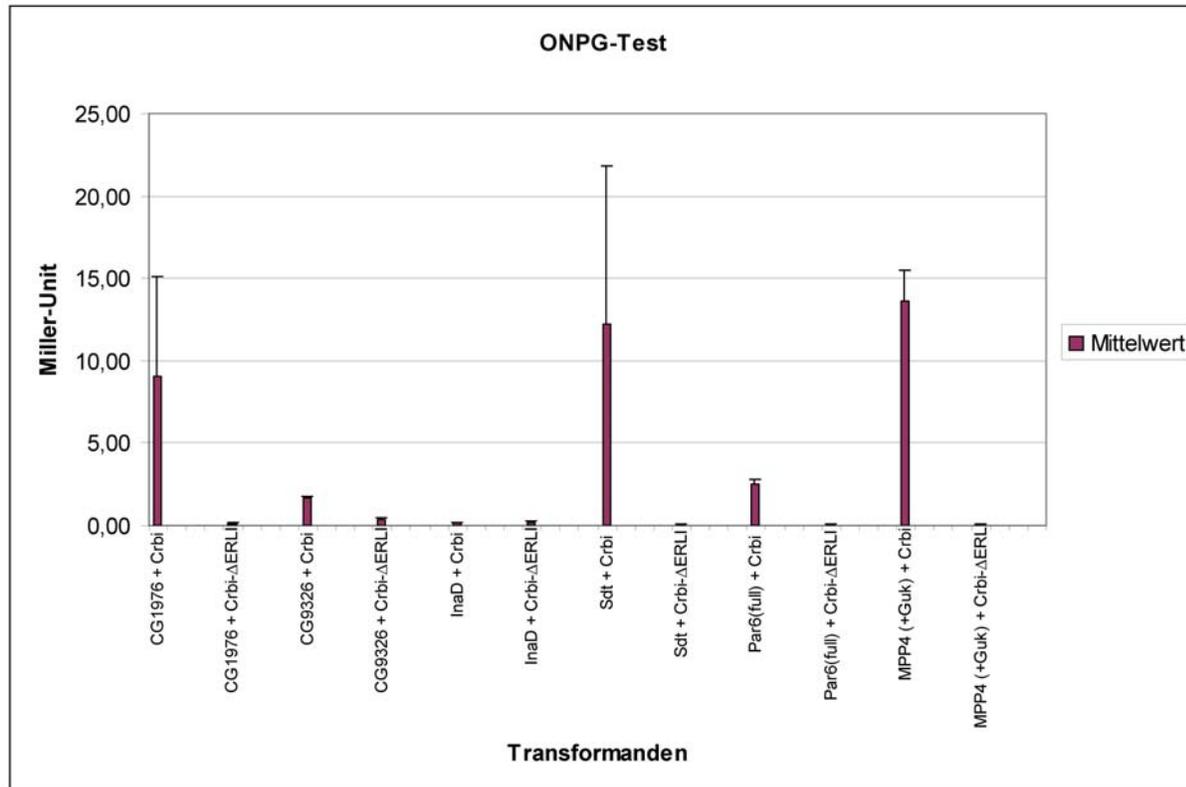


Abb.III.20. Quantifizierung der Bindungsstärke von Crb-intra bzw. Crb-intra-ΔERLI und den jeweiligen PDZ-Domänen mittels eines ONPG-Liquid-Assays

Die Enzymaktivität der β -Galaktosidase wurde anhand zweier unabhängiger Transformanden bestimmt. Die PDZ-Domänen von CG1976, CG9326, Sdt, Par-6(full length) und MPP4(+SH3+Guk) interagieren mit der intrazellulären Domäne von Crb (Crb) im Gegensatz zur Negativkontrolle, in der das ERLI-Motiv deletiert wurde (Crb-ΔERLI). Für die 1. PDZ-Domäne von InaD konnte keine Bindung an Crb-intra festgestellt werden.

Sowohl bei der Interaktion der PDZ-Domäne des Proteines kodiert durch den CG1976, als auch der PDZ-Domäne von Sdt mit der intrazellulären Domäne von Crb ist eine große Standardabweichung aufgetreten. Dies ist darauf zurückzuführen, dass in den zwei unabhängig durchgeführten Experimenten jeweils eine Interaktion nachgewiesen werden konnte, welche aber unterschiedlich stark war. Um Aussagen über die Stärke einer möglichen Bindung treffen zu können, müssten noch weitere ONPG-Tests durchgeführt werden.

Diese Untersuchungen zeigen, dass eine Interaktion des ERLI-Motivs (PDZ-Bindedomäne) der intrazellulären Domäne von Crumbs mit den PDZ-Domänen von CG1976 und CG9326, sowie MPP4 (SH3+Guk) auch im Hefe-2-Hybridsystem möglich sind. Experimente, die diese Interaktion auch im *Drosophila* Embryo bestätigen, müssen nun durchgeführt werden.

IV. Diskussion

Der Mechanismus zur Aufrechterhaltung der Polarität von Epithelzellen und der Integrität des Gewebeverbandes u.a. durch den Crb-Komplex ist in *Drosophila* noch weitestgehend ungeklärt. Bei den Komponenten des Crb-Komplex wie Sdt, DPatj und DLin-7 handelt es sich um Gerüstproteine mit mehreren Protein-Protein-Interaktionsdomänen. Für viele dieser Protein-Protein-Interaktionsdomänen der Proteine des Crb-Komplexes sind noch kein Bindungspartner bekannt. Dies veranlasste uns zur Suche nach diesen mit Hilfe einer biochemischen Methode: der Aufreinigung des Protein-Komplexes mittels affinitätschromatographischer Methoden und anschließender Identifizierung aller Komponenten mittels Massenspektrometrie.

Aufbauend auf einem Experiment von Klebes, A. 1999, der durch Co-Immuno-präzipitation mit einem Transgen-kodierten Protein, bestehend aus dem Signalpeptid, einem Myc-Epitop, der Transmembrandomäne und der intrazellulären Domäne von Crumbs das DPatj Protein präzipitieren konnte, wurden korrespondierende Transgen-kodierende Proteine mit einem FLAG-Epitop versehen. Die Verwendung des FLAG-Epitops erfolgte, da ein immunhistochemischer Nachweis des Myc-Epitops im Crb-intra Protein schwierig ist (Klebes, A. mündliche Mitteilung) und das FLAG-Epitop sehr klein ist (8 Aa), wodurch sterische Behinderungen z.B. bei der Einlagerung in die Membran möglicherweise vermieden werden können. Außerdem ist ein monoklonaler Antikörper gegen das FLAG-Epitop erhältlich, der sehr gut für Co-Immuno-präzipitationsexperimente geeignet ist.

Für den Versuchsansatz wurde eine Co-Immuno-präzipitation mit überexprimierten, mit einem Epitop versehenen, Transgen-kodierten Crb-intra Proteinen gewählt, da hierdurch die Menge an ‚Köder‘-Protein erhöht wird, wodurch eventuell auch eine Erhöhung der Menge der anderen mit dem Crb-Komplex assoziierten Proteine erreicht werden kann.

1. Präzipitierte Proteine des Crb-Komplexes können mittels Western Blot nachgewiesen werden, aber nicht anhand der Massenspektrometrie

Der gewählte Versuchsansatz führte insoweit zum Ziel, dass bekannte Bindungspartner des Crb-Komplexes wie DPatj, Sdt und DLin-7 präzipitiert und mittels Western Blot nachgewiesen werden konnten. Dies diente als Kontrolle des Co-

Immunopräzipitationsexperimentes. Lediglich das verwendete ‚Köder‘-Protein FLAG-Crb-intra, aber nicht *DPatj*, *Sdt* und *DLin-7*, konnte massenspektrometrisch bei Analyse des Gesamtpräzipitats ohne vorherige Auftrennung mittels SDS-PAGE's identifiziert werden.

1.1. Optimierung der Co-Immunopräzipitation

Die Tatsache, dass ein Nachweis der bekannten Proteine des Crb-Komplexes nur mittels Western Blot, aber nicht mittels Massenspektrometrie möglich war, spricht für ein Problem mit der Menge der präzipitierten Proteine des Komplexes. Gründe dafür könnten z.B. sein, dass nicht genügend Protein der anderen Komponenten des Komplexes in der Zelle vorhanden ist, um an das überexprimierte Crb-intra zu binden bzw. diese schon an das endogene Crumbs Protein gebunden sind. Ein weiterer Punkt ist die Überexpression der Transgen-kodierten Crb-intra-Proteine auch in nicht epithelialen Zellen, in denen die bekannten Bindungspartner von Crb wie *DPatj*, *Sdt* und *DLin-7* nicht exprimiert sind. Das Aktinzytoskelett, welches über *DMoesin* und β_{Heavy} -Spektrin (Medina et al., 2002) ebenfalls mit dem Crb-Komplex assoziiert ist, kommt dagegen in allen Zellen des *Drosophila* Embryos vor und wird deshalb wahrscheinlich in größeren Mengen als die bekannten Komponenten des Crb-Komplexes präzipitiert. Diese Hypothese wird unterstützt durch die Tatsache, dass in den Präzipitaten sehr viele Proteine des Aktinzytoskeletts bzw. damit assoziierte Proteine gefunden wurden. In diesem Zusammenhang sollte aber auch beachtet werden, dass bei Co-Immunopräzipitationsexperimenten Proteine des Aktinzytoskeletts unspezifisch an die verwendeten Agarose-Beads binden können. Versuche, die beschriebenen Probleme durch Erhöhung der Salzkonzentration im Waschpuffer auf bis zu 1 M (Kuai et al., 2003), durch Verwendung eines Sucrosegradienten und durch Verwendung von BSA im Puffer (A. LeBivic, mündliche Mitteilung) zur Reduzierung der unspezifischen Bindung von Proteinen an die Agarose-Beads zu lösen, brachten keine Verbesserung oder führten auch zum Verlust der spezifischen Bindungspartner. Eine weitere Erklärung für die geringen Mengen an aufgereinigtem Crb-Komplex könnte sein, dass FLAG-Crb-intra, welches als ‚Köder‘-Protein verwendet wurde, eine Transmembrandomäne besitzt. Transmembranproteine lassen sich oft schlecht aus der Membran lösen. Dagegen spricht aber, dass der Nachweis des FLAG-Crb-intra ‚Köder‘-Proteins sowohl

massenspektrometrisch als auch mittels Western Blot möglich war. Veraksa et al., 2005, konnten ebenfalls einen Proteinkomplex mit Hilfe des Transmembranproteins Notch aus stabil transfizierten Schneiderzellen und *Drosophila* Embryonenlysaten aufreinigen und bekannte Bindungspartner massenspektrometrisch identifizieren.

Aufgrund obiger Überlegungen wurde versucht, eine Methode zu etablieren, bei der der native Crb-Komplex aus wildtypischen Proteinextrakten mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers, der gegen die extrazelluläre Domäne von Crb gerichtet ist, präzipitiert wird. Es konnte jedoch keine reproduzierbare Präzipitation des Komplexes in ausreichenden Mengen erreicht werden, was eventuell mit der Qualität bzw. der Eignung des Crb-Antikörpers für die Co-Immunopräzipitation zusammenhängt.

Ein weiterer Punkt, der zur Unterrepräsentation bekannter Bindungspartner des Komplexes im Präzipitat führen kann, ist eine schwache Bindung der Proteine untereinander. Um den Verlust so gering wie möglich zu halten, können z.B. zum Waschen nur geringe Salzkonzentrationen verwendet werden, was jedoch die unspezifischen Bindungen erhöht. Desweiteren könnte der Komplex chemisch mittels ‚cross linkern‘ quervernetzt werden. Von letzterem wurde abgesehen, da die erfolgreiche Präzipitation der bekannten Bindungspartner im Western Blot nachgewiesen werden konnte. Die Quervernetzung mittels chemischer ‚cross linker‘ ist abhängig von der Aminosäuresequenz eines Proteins, die für neue Bindungspartner unbekannt ist. Dadurch ist der Einsatz eines chemischen ‚cross linkers‘ für diese Fragestellung ungeeignet.

Der Schwerpunkt der weiteren Optimierung lag aufgrund dieser Ergebnisse auf der Detektion der in geringen Mengen vorhandenen bekannten und neuen putativen Interaktionspartner des Crb-Komplexes mittels Massenspektrometrie.

1.2. Optimierung der Identifizierung der präzipitierten Proteine mittels Massenspektrometrie

Weitere Optimierungen wurden hinsichtlich der Auftrennung der Präzipitate im Anschluß an die Co-Immunopräzipitation durchgeführt. Weder aus ein- und zweidimensionalen SDS-PAGE's noch aus Gradientengelen konnten das Transgen-kodierte ‚Köder‘-Protein

Crb-intra oder bekannte Komponenten des Komplexes identifiziert werden. Deshalb wurde auf eine Auftrennung mittels SDS-PAGE verzichtet und versucht, alle Proteine des Präzipitats direkt massenspektrometrisch zu identifizieren. Eine Reduzierung der Komplexität der Probe erfolgte nur durch fraktionierte Elution der Peptide von einer ZIPTIP-Säule oder der Auftrennung der Peptide mittels einer nanoHPLC-Säule. Mit diesen Methoden konnte eine Verbesserung dahingehend erreicht werden, dass nun das ‚Köder‘-Protein FLAG-Crb-intra mit drei Peptiden reproduzierbar nachgewiesen werden konnte. Peptide der anderen bekannten Proteine des Komplexes konnten aber nicht eindeutig identifiziert werden.

In allen Versuchsansätzen wurden außerdem hauptsächlich Proteine des Aktinzytoskeletts detektiert, nur bei Verwendung der nanoHPLC zur Reduktion der Komplexität der Probe wurden zusätzliche Proteine identifiziert.

Die Diskrepanz zwischen dem Nachweis der erfolgreichen Präzipitation des Crb-Komplexes mit allen bekannten Bindungspartnern im Western Blot, aber nicht mittels Massenspektrometrie liegt einerseits möglicherweise in der unterschiedlichen Sensitivität der Methoden. Andererseits kommt es wahrscheinlich auch zur Überdeckung von Signalen unterrepräsentierter Proteine durch die von hochabundanten Proteinen. Dafür spricht die Beobachtung, dass es sich bei den gemessenen Proben aus Tab.III.5, FLAG-Crb-intra (100 µl) und FLAG-Crb-intra (50 µl) um exakt dieselbe Ausgangsprobe und Proteinmenge handelt, welche lediglich unterschiedlich stark aufkonzentriert wurden. Im Fall der Höherkonzentrierung sind wesentlich mehr Proteine des Aktinzytoskeletts und damit assoziierte Proteine zu finden, da diese wahrscheinlich durch ihren hohen Anteil in der Probe die Signale der Peptide der unterrepräsentierten Proteine überdecken.

Diese Untersuchungen zeigen, dass die verwendeten Methoden für die Fragestellung der Aufreinigung des Crb-Komplexes und damit assoziierter Bindungspartner nur zu Teilerfolgen führten. Eine Isolierung des Crb-Komplexes in für eine massenspektrometrische Analyse ausreichenden Menge konnte nicht erreicht werden. Beispiele aus der Literatur zeigen, dass diese Methode der affinitätschromatographischen Aufreinigung von Multiproteinkomplexen und die anschließende massenspektrometrische Identifizierung neuer Bindungspartner

hauptsächlich mittels stabil transfizierter Zellkulturen (Veraksa et al., 2005) oder Hefen (Gavin et al., 2002) durchgeführt wurden. Aus komplexen Organismen gibt es bisher nur wenige Beispiele, in denen diese Methode erfolgreich angewendet wurde (Schaefer et al., 2000; Veraksa et al., 2005). Im Unterschied zu dem in dieser Arbeit verwendeten FLAG-Epitop wurde von Veraksa et al. ein Tap-Epitop verwendet, wobei durch zwei separate Aufreinigungsschritte die unspezifischen Bindungspartner sehr stark reduziert werden können. Die Anwendung dieser Technik könnte auch im Hinblick auf die Isolierung des Crb-Komplexes eine spezifischere Aufreinigung ermöglichen. Die Menge des Crb-Komplexes wird dadurch zwar nicht erhöht, aber eine Identifizierung der bekannten Komponenten des Crb-Komplexes wird evtl. erleichtert, da weniger unspezifische Proteine präzipitiert werden.

1.3. Für einige putative Kandidaten ist eine Interaktion mit dem Crb-Komplex möglich

In den präzipitierten Komplexen wurden sehr viele Proteine des Aktinzytoskeletts und damit assoziierte Proteine identifiziert. Eine Interaktion mit dem Crb-Komplex ist aufgrund seiner engen Verbindung mit dem Aktin/Spektrinzytoskelett wahrscheinlich. Da diese Proteine aber an vielen grundsätzlichen Prozessen in der Zelle beteiligt sind, ist eine Untersuchung der Funktion im Zusammenhang mit dem Crb-Komplex sehr schwierig. Ob es sich um eine spezifische oder unspezifische Aufreinigung handelt, konnte durch die Co-Immunopräzipitationsexperimente nicht vollständig aufgeklärt werden. Ein Hinweis, dass die identifizierten Proteine des Aktinzytoskeletts spezifisch für den Crb-Komplex sind, gibt das Gradientengel (Abb.III.4). Hier waren in der Kontrolle der Co-Immunopräzipitation mit wildtypischem Embryonenlysat (Abb.III.4 Co-IP Wt) diejenigen Banden nicht zu sehen, welche aus der Co-Immunopräzipitation mit FLAG-Crb-intra als Proteine des Aktinzytoskelett identifiziert wurden.

Für Proteine im Präzipitat, die primär nicht mit dem Aktinzytoskelett assoziiert sind, muss nun geklärt werden, ob die Präzipitation spezifisch für den Crb-Komplex ist oder diese eventuell mit dem Aktinzytoskelett ko-präzipitiert wurden.

Daher wurden einige der identifizierten Proteine auf Grund schon vorhandener Informationen über Lokalisation und Funktion ausgewählt und im Rahmen einer Diplomarbeit (Volkmar, 2005) für sieben dieser Kandidaten weitere Untersuchungen

durchgeführt. Es handelt sich hierbei um Narrow abdomen, G-Protein- α 60A, Alien, Retinoid- and fatty acid bindendes Protein, Calphotin, den Inositol 1,4,5-tris-phosphat-Rezeptor und die Proteinkinase at 92B (Pk92B). Ergebnisse dieser Diplomarbeit und Literaturrecherchen zeigen, dass Narrow abdomen, das G-Protein- α 60A, Alien und das Retinoid- and fatty acid bindende Protein wahrscheinlich keine Interaktion mit dem Crb-Komplex zeigen, da sie zumindest im *Drosophila* Embryo nicht in den gleichen Geweben exprimiert sind und damit eine Interaktion unwahrscheinlich ist. Für Calphotin, der Inositol 1,4,5-tris-phosphat Rezeptor und die Pk92B konnte jeweils eine Expression bzw. Proteinlokalisierung in primären Epithelien nachgewiesen werden, Geweben, in denen auch Crumbs exprimiert ist. Die Expression einer dominant negativen Form der Pk92B im Flügelepitel führte zu einer Abschwächung des dominanten Flügelphänotyps hervorgerufen durch Expression von FLAG-Crb-intra (Volkmar, 2005). Diese Serin/Threoninkinase ist außerdem interessant als putativer Interaktionspartner von Crb, da gezeigt wurde, dass sie im *Drosophila* Auge den DJNK-Signaltransduktionsweg aktiviert (Kuranaga et al., 2002). Dadurch wird der programmierte Zelltod aktiviert und bei der Regulation dieses scheint Crumbs beteiligt zu sein (Klebes, 1999; Grzeschik und Knust, 2005; diese Arbeit). Weitere Analysen z.B. an Mutanten und biochemische Interaktionsstudien müssen nun folgen, um diese zu bestätigen.

Desweiteren wurden Proteine gefunden, die eine Rolle beim Proteintransport oder der Exo- bzw. Endozytose spielen, wie z.B. β '-Cop, Sec6, Lava Lamp, Dynein und das Kinesin-like Protein NOD. Es gibt einige Hinweise darauf, dass Crb in diesen Prozessen, sowohl in *Drosophila* Ovarien und Imaginalscheiben als auch im adulten Flügel und Auge, eine Rolle spielt (Lu und Bilder, 2005; Johnson, K. und Richard, M. unveröffentlichte Daten).

2. Das präzipitierte Transgen-kodierte Crumbs Protein ist phosphoryliert

Bei der massenspektrometrischen Analyse der Peptide des ‚Köder‘-Proteins FLAG-Crb-intra konnte eine Phosphorylierung eines der Peptide nachgewiesen werden. Aus den bisherigen Messungen konnte jedoch bislang nicht eindeutig ermittelt werden, welche der fünf möglichen Aminosäuren phosphoryliert ist (Abb. V.1., blau gekennzeichnet).

FLAG-Crb-intra	MAKIANASLSQQQKQRQAETATTTTTVAASVETATTTARSRDRTKSAAQITSHLLKRAISVYSSPQWI PLFILIYLATDVASVAVPTK EAYFN GRS DYK DDDDK GSSTTDIAIIVIPVVVVLLLIAGALLGTFLVMARN KRATR G T Y S P S A Q E Y C N P R L EMDNV L K P P E E R L I
----------------	--

Abb.V.1. Aminosäuresequenz des Transgen-kodierten FLAG-Crb-intra Proteins

Die drei mittels Massenspektrometrie identifizierte Peptide sind rot gekennzeichnet, das FLAG-Epitop grün und die fünf Aminosäuren, von denen eine phosphoryliert ist, blau markiert.

Es konnte gezeigt werden, dass mittels humaner α PKC ζ zwei Threonine der intrazellulären Domäne von Crb *in vitro* phosphoryliert werden (Sotillos et al., 2004). Eines davon befindet sich in dem Peptid, bei welchem die Phosphorylierung massenspektrometrisch identifiziert wurde, das andere ist in der intrazellulären Domäne von Crb N-terminal lokalisiert (Abb.V.1. gelb gekennzeichnet). Letzteres Threonin würde sich bei einer Proteolyse mit Trypsin in einem Peptid befinden, welches aus nur 3 Aminosäuren besteht und dieses kann möglicherweise aufgrund seiner geringen Größe im Massenspektrum nicht gefunden werden.

Dies würde bedeuten, dass in dem massenspektrometrisch identifizierten Peptid das Threonin phosphoryliert wäre, was mit den bisher durchgeführten massenspektrometrischen Analysen nicht bestätigt werden konnte, da nicht alle Fragmente des Peptids im Massenspektrum gefunden wurden. Um zu überprüfen, ob z.B. diese beiden Threonine wichtig für die Funktion der intrazellulären Domäne sind, wurden Transgen-kodierte Proteine der intrazellulären Domäne von Crb mit Aminosäureaustauschen in den putativ phosphorylierten Aminosäuren in Embryonen oder Fliegen überexprimiert. Die Aminosäureaustausche führten entweder dazu, dass diese nicht mehr phosphorylierbar (Austausch gegen Alanin) oder konstitutiv phosphoryliert (Austausch gegen phosphomimetische Aminosäuren wie Asparaginsäure) erscheinen.

2.1. Der Einfluß der Phosphorylierung auf die Abschwächung des *crb* mutanten Kutikulaphänotyps

Ergebnisse dieser Rettungsexperimente zeigen, dass im *Drosophila* Embryo das Threonin an Position 6 der intrazellulären Domäne bzw. dessen putative Phosphorylierung einen schwachen Einfluß auf die Funktion der intrazellulären Domäne ausübt. Frühere Experimente zeigten hingegen einen wesentlich stärkeren Einfluß des

Tyrosins an Position 10 oder der Glutaminsäure an Position 16, welche jeweils gegen Alanin getauscht wurden, auf die Funktion der intrazellulären Domäne von Crb. Die Expression der Transgen-kodierten Myc-intra-^{-Y10A}, Myc-intra-^{-E16A} oder Myc-intra-^{-Y10A/E16A} Proteine führt zu keiner Rettung des *crb* mutanten Phänotyps (Klebes, 1999). Dies spricht eher für eine mögliche Phosphorylierung dieses Tyrosins und nicht des Threonins an Position 9. Allerdings muss auch beachtet werden, dass sich das Tyrosin innerhalb der FERM-Domäne befindet (Klebes und Knust, 2000; Medina et al., 2002) und ein Austausch könnte unabhängig von einer Phosphorylierung zum Verlust der Bindung an *DMoesin* führen. Die Verbindung zum Aktin/ Spektrinzytoskelett würde verloren gehen, was die Funktion der intrazellulären Domäne von Crb stark beeinflussen könnte. Die Glutaminsäure an Position 16 der intrazellulären Domäne von Crb ist wie das Tyrosin an Position 10 in Vertebraten hochkonserviert (Klebes, 1999). Bei Durchführung einer Vorhersage von kurzen Sequenzmotiven (Obenauer et al., 2003) innerhalb der intrazellulären Domäne von Crb, welche z.B. von Proteinkinasen erkannt werden, wurde die Glutaminsäure als putative Bindungsstelle für PDK1 (3-Phosphoinositide abhängige Proteinkinase 1) identifiziert. Das *Drosophila* Homolog dieser Kinase ist die Proteinkinase at 61C, welche u.a. eine Rolle bei der Regulation der Apoptose spielt (Cho et al., 2001). Die Glutaminsäure scheint aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit ebenfalls in diesen Prozeß involviert zu sein.

Sotillos et al., 2004 konnten die Phosphorylierung der beiden Threonine an Position 6 und 9 der intrazellulären Domäne nur *in vitro* zeigen, aber keinen Beweis für diese Phosphorylierung *in vivo* im *Drosophila* Embryo erbringen. Die hier gezeigten Daten können eine Phosphorylierung der beiden Threonine an Position 6 und 9 nicht ausschliessen. Auf die Funktion der intrazellulären Domäne von Crb hat eine putative Phosphorylierung des Threonins an Position 9 keine Auswirkung. Eine putative Phosphorylierung des Threonins an Position 6 übt dagegen einen geringen Einfluß im *Drosophila* Embryo aus.

2.2. Überexpressionsexperimente im *Drosophila* Embryo zeigen eine Abhängigkeit der Lokalisation des DPatj Proteins ausschließlich vom ERLI-Motiv

Im Gegensatz zu den Rettungsexperimenten im *Drosophila* Embryo konnte bei der Überexpression der verschiedenen Varianten der intrazellulären Domäne von Crumbs

eine Fehlverteilung eines der Proteine des Crb-Komplexes, *DPatj*, nur in Abhängigkeit vom ERLI-Motiv beobachtet werden. Entgegen bisheriger Beobachtungen (Klebes, 1999), wird die Menge des *DPatj* Proteins in diesen Zellen aber nicht erhöht. Das vormals apikal lokalisierte *DPatj* wird auf die gesamte Plasmamembran umverteilt und die Expression erscheint dadurch wesentlich schwächer, vergleichbar mit Beobachtungen, die für das Sdt Protein gemacht wurden (Bachmann et al., 2001).

Eine putative Phosphorylierung der beiden Threonine scheint keinen Einfluß auf Rekrutierung von *DPatj* mittels des ERLI-Motivs zu haben. Dies unterstützt auch ein GST-Pulldown Experiment von Sotillos et al., 2004, bei dem *DPatj* an GST-Fusionsproteine der intrazellulären Domäne von Crb binden konnte, in denen die beiden Threonine gegen Alanin (nicht mehr phosphorylierbar) ersetzt waren.

Mit dem Transgen-kodierten FLAG-Crb-intra-Y10A/E16A dagegen konnte eine Präzipitation von *DPatj* im Western Blot nicht nachgewiesen werden. Das spricht wiederum für die Wichtigkeit dieser beiden Aminosäuren innerhalb der intrazellulären Domäne von Crb. Aussagen, ob diese Beobachtung auf eine fehlende Phosphorylierung des Tyrosins oder auf die Beeinflussung der FERM-Domäne, hervorgerufen durch eine nicht korrekte Faltung zurückzuführen ist, können anhand der vorliegenden Daten nicht getroffen werden.

Ein weiterer Punkt ist der Einfluß einer eventuellen Phosphorylierung auf die Lokalisation der Transgen-kodierten Crb-intra Proteine in der Zelle. Darüber können anhand der bisher durchgeführten Experimente kaum Aussagen gemacht werden, da die Expression der Transgen-kodierten Proteine so stark war, dass der Eindruck entsteht, dass sie sowohl im Zytoplasma als auch an der Plasmamembran lokalisiert sind, unabhängig vom Aminosäureaustausch. Um diesen Aspekt näher zu untersuchen, müsste ein schwächerer Aktivator verwendet und bestimmte Zellbestandteile, z.B. die apikale oder basolaterale Membran, spezifisch markiert werden.

Auffällig waren aber die stark gefärbten vesikelartigen Strukturen in den Zellen in denen die Varianten der Transgen-kodierten Proteine der intrazellulären Domäne von Crb überexprimiert worden waren. Ob und um welche Art von Vesikeln es sich handelt, müsste mittels Doppelfärbungen mit entsprechenden Markern untersucht werden. Es könnte sich hierbei aber auch um Artefakte, hervorgerufen durch die starke Überexpression, handeln.

2.3. Überexpression der Transgen-kodierten Crumbs Protein führt zu diversen Flügeldefekten

In Anlehnung an die Studien von Wodarz, 1993; Klebes, 1999 und Sotillos et al., 2004 wurden die dominanten Flügelphänotypen, hervorgerufen durch die Überexpression der Varianten der Transgen-kodierten Crb Proteine, analysiert. Im Flügelepithel zeigten sich starke Defekte, die sich als Löcher und Nekrotisierungen, sowie als Vergrößerungen der Flügel äußerten. Eine deutliche Abschwächung dieser Phänotypen kann nur bei Expression des Transgen-kodierten Proteins Myc-intra_{Y10A/E16A-ΔERLI} (Klebes, 1999) beobachtet werden. Die Einzelmutationen zeigen jedoch die beschriebenen dominanten Phänotypen, so dass man vermuten kann, dass nur die Kombination aller drei Mutationen zum Verlust des dominanten Flügelphänotyps der intrazellulären Domäne im Flügelepithel führt.

Die Überexpression der Transgen-kodierten Varianten der intrazellulären Domäne von Crb zeigen keinen Einfluß der Phosphorylierung der Threonine oder Serine der intrazellulären Domäne von Crumbs auf den dominanten Phänotyp im Flügelepithel. Dies steht im Widerspruch zu einem Experiment von Sotillos et al., 2004, in dem ein Einfluß der Phosphorylierung der beiden Threonine durch *DaPKC* auf die Funktion der intrazellulären Domäne von Crb im Flügel gezeigt werden konnte. Es wurde eine partielle Rettung des dominanten Flügelphänotyps, hervorgerufen durch Expression der wildtypischen intrazellulären Domäne, bei gleichzeitiger Expression einer dominant negativen Form von *DaPKC* erreicht. Bei Überexpression eines Transgen-kodierten Proteins der intrazellulären Domäne, in dem die beiden Threonine an Position 6 und 9 gegen Asparaginsäure (Crb-intra-T6DT9D) ausgetauscht wurden, konnte dagegen keine Abschwächung des dominanten Flügelphänotyps durch die dominant negative Form der *DaPKC* beobachtet werden. Aufgrund der Ergebnisse dieses Experimentes, würde man vermuten, dass die Überexpression des Transgen-kodierten Crb-intra-T6AT9A Proteins keinen dominanten Flügelphänotyp verursacht, da die beiden Threonine nicht mehr phosphorylierbar sind. Das ist aber nicht der Fall, sondern die Überexpression von Crb-intra-T6AT9A zeigt dominante Flügelphänotypen, welche in verschiedenen transgenen Fliegenlinien von schwachen Vergrößerungen der Flügel bis hin zu Nekrotisierungen und Löchern in der Flügelfläche reichen. Dies spricht wiederum gegen eine Funktion der Phosphorylierung dieser beiden Threonine im Flügelepithel.

Ein weiterer Aspekt des Experimentes von Sotillos et al., ist die Rolle der *DaPKC* bei der Phosphorylierung der intrazellulären Domäne von *Crb*. Die *in vitro* Phosphorylierung von GST-*Crb*-intra durch humane *aPKC ζ* und das beschriebene Rettungsexperiment im Flügel sprechen für eine Phosphorylierung der beiden Threonine an Position 6 und 9 der intrazellulären Domäne von *Crb* durch *DaPKC*. Unterstützt wird diese These außerdem durch die Tatsache, dass der *Crb*-Komplex und der *Baz/DmPar-6/DaPKC*-Komplex im *Drosophila* Embryo (Wang et al., 2004 und Kempkens, 2006) und auch im *Drosophila* Auge (Dijane et al., 2005) miteinander interagieren können. Durch die in dieser Arbeit beschriebenen Co-Immunopräzipitationsexperimente konnte eine weitere Serin/Threoninkinase, Proteinkinase at 92B (*Pk92B*), als potentieller Interaktionspartner des *Crb*-Komplexes identifiziert werden. Eine *in-situ* Hybridisierung zeigte eine Expression der mRNA in primären Epithelien, so dass eine Interaktion mit dem *Crb*-Komplex möglich ist. Außerdem konnte eine partielle Rettung des dominanten Flügelphänotyps verursacht durch Expression von *Crb*-intra durch gleichzeitige Expression einer dominant negativen Form von *Pk92B* beobachtet werden (Volkmar, 2005). Welche der beiden Proteinkinasen tatsächlich für die Phosphorylierung der intrazellulären Domäne von *Crb* verantwortlich ist, müssen z.B. Analysen von Mutanten oder mutanten Flügelklonen zeigen. Da aber z.B. *DaPKC* auch andere Proteine in der supapikalen Region phosphoryliert, ist der direkte Einfluß auf die Funktion von *Crb* schwer einschätzbar.

2.4. Die Funktion der intrazellulären Domäne im Flügelepithel

Über die Funktion der intrazellulären Domäne von *Crb* im Flügelepithel ist bisher wenig bekannt. Anders als im *Drosophila* Embryo spielt diese im Flügelepithel (Herranz et al., 2006) und auch im *Drosophila* Auge (Pellika et al., 2002; Izaddoost et al., 2002) keine Rolle bei der Etablierung und der Aufrechterhaltung apiko-basaler Polarität, denn z.B. in *crb*^{11A22} mutanten Flügelklonen ist diese nicht betroffen (Herranz et al., 2006).

Eine Erklärung für die beobachtete Vergrößerung der Flügelfläche könnte sein, dass die Überexpression von *Crb* zu einer Störung des Proteingleichgewichtes führt und es deshalb zum beobachteten dominanten Flügelphänotyp kommt. Ein von Lu und Bilder, 2005, postuliertes Gleichgewicht bestimmter ‚steady state level‘ von Proteinen ist wichtig für die richtige Zellform und die Kontrolle der Proliferation. Ein ähnlicher Effekt, wie bei

der Überexpression von Crb in den Imaginalscheiben (Lu und Bilder, 2005; diese Arbeit) ist bei einer Mutation in *Avalanche* zu beobachten, einem Syntaxin, welches an der Endozytose beteiligt ist. In diesen Mutanten sind erhöhte Expressionslevels von Crb zu sehen, welche auf gestörte Endozytose zurückzuführen sind und zum Überwachstum der Imaginalscheiben führt (Lu und Bilder, 2005). Bei der Überexpression der Transgen-kodierten Crb Proteine könnte es sein, dass das ‚überschüssige‘ Crb Protein durch die normale Endozytose nicht ausreichend abgebaut werden kann und es deshalb zum Überwachstum kommt.

Desweiteren könnte aber auch eine Unterdrückung des programmierten Zelltodes verantwortlich für die Vergrößerung der Flügelgröße sein. Bei Überexpression der intrazellulären Domäne von Crb in der Augenimaginalscheibe findet weniger Apoptose als in wildtypischen Augenimaginalscheiben statt (Grzeschik und Knust, 2005) und bei Expression der intrazellulären Domäne von Crb in *crb* mutanten Embryonen wird der durch den *crb* Funktionsverlust induzierte ektopische Zelltod ebenfalls abgeschwächt (Klebes, 1999).

Die beobachteten Defekte der Überexpression der verschiedenen Varianten der Transgen-kodierten Crb Proteine beschränken sich nicht nur auf Überwachstum, sondern es sind auch Löcher im Flügel und Nekrotisierungen zu sehen. Hipfner et al., 2004, zeigen eine Regulation der Aktivität von *D*Moesin durch die Sterile-20 Kinase (*Slik*), wodurch die epitheliale Integrität des Gewebes während des Wachstums aufrechterhalten wird. In *slik* mutanten Flügeln kommt es zu ähnlichen Nekrotisierungen, welche mit einer verstärkten Apoptose einhergehen (Hipfner und Cohen, 2003). *Slik* reguliert auch die Proliferation, aber diese Funktion ist unabhängig von der Aktivierung von *D*Moesin, so dass zunächst ein direkter Zusammenhang nicht hergestellt werden kann.

Sollten die beobachteten dominanten Flügelphänotypen, tatsächlich durch unterdrückte Apoptose (Flügelüberwachstum) einerseits und verstärkte Apoptose (Nekrotisierungen) andererseits verursacht werden, so scheint das ERLI-Motiv im Flügelepithel eine Rolle bei der Regulation der Apoptose zu spielen. Bei Expression Transgen-kodierter Crb Proteine mit intaktem ERLI-Motiv sind Nekrotisierungen und Löcher zu beobachten, wohingegen die Expression Transgen-kodierter Crb Proteine mit deletiertem ERLI-Motiv

nur zu Vergrößerungen der Flügelfläche führt. Lediglich die Expression von Crb-intra-Y10A/16A-ΔERLI zeigt keinen dominanten Flügelphänotyp, da wahrscheinlich beide funktionellen Bereiche der intrazellulären Domäne von Crb, die FERM- und die PDZ-Bindedomäne betroffen sind. Diese Beobachtung steht im Gegensatz zu Experimenten im *Drosophila* Embryo, in denen nur für die FERM-Domäne eine anti-apoptotische Wirkung postuliert wird (Klebes, 1999).

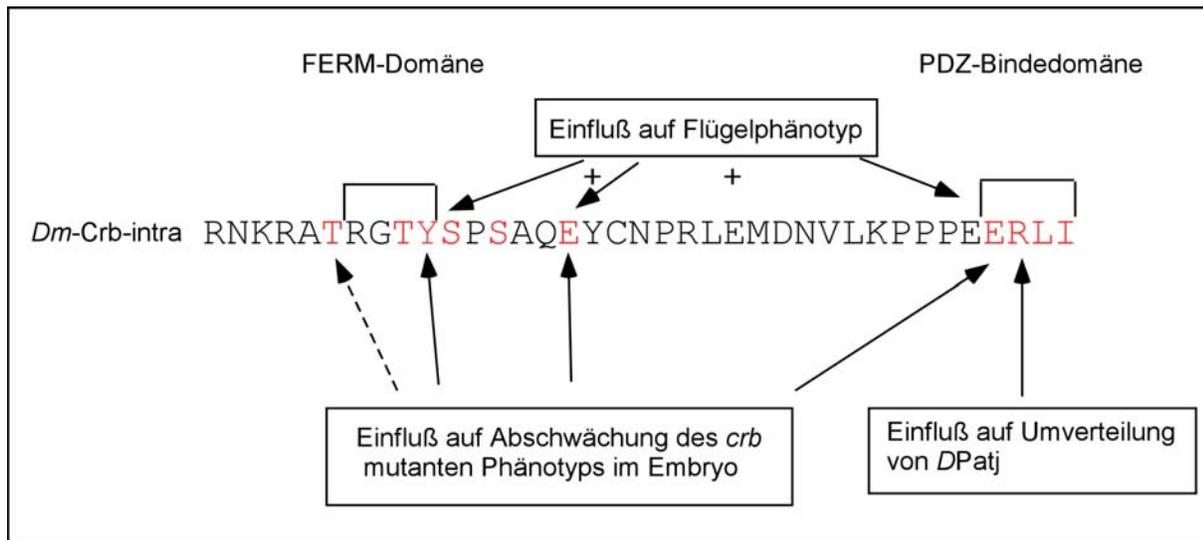


Abb.IV.2. Schematische Zusammenfassung der funktionellen Bereiche der intrazellulären Domäne von Crumbs

Abgebildet ist die Aminosäuresequenz der intrazellulären Domäne von Crumbs. Die in dieser Arbeit analysierten Aminosäuren sind rot gekennzeichnet.

Die Abb. IV.2 fasst noch einmal die Ergebnisse dieser Arbeit und früherer Arbeiten (Klebes, 1999) zu den funktionellen Bereichen der intrazellulären Domäne von Crumbs zusammen. Diese beschränken sich auf das ERLI-Motiv, das Tyrosin an Position 10 und die Glutaminsäure an Position 16 der intrazellulären Domäne von Crb, sowohl im *Drosophila* Embryo und als auch im Flügelepithel. Eine schwache Funktion ist auch für das Threonin an Position 6 im *Drosophila* Embryo, aber nicht im Flügelepithel zu beobachten.

3. Identifikation weiterer putativer Bindungspartner des Crumbs-Proteins durch ‚homology modelling‘

Mit Hilfe einer weiteren Methode zur Identifikation putativer Bindungspartner einer Protein-Protein-Interaktionsdomäne, des ‚homology modellings,‘ konnten vier zusätzliche putative Bindungspartner des ERLI-Motivs der intrazellulären Domäne von Crumbs gefunden werden. Im Hefe-2-Hybridsystem konnten drei dieser Interaktionen verifiziert werden. Es handelt sich hierbei um die Proteine kodiert von CG1976, CG 9326 und um MPP4.

Die Interaktion mit MPP4 war im ONPG-Liquid-Assay am stärksten, allerdings war für die Interaktion die PDZ Domäne allein nicht ausreichend, sondern PDZ, SH3 und Guk Domäne waren für die Bindung notwendig. Dies könnte z.B. darauf zurückzuführen sein, dass die PDZ-Domäne alleine nicht richtig gefaltet werden konnte und eine Bindung im Hefe-2-Hybridsystem deshalb nicht stattfand. Bei MPP4 handelt es sich um ein Protein aus der Familie der Maguk Proteine, d.h. es besitzt zwei L27-Domänen, eine PDZ, SH3, und Guk-Domäne. Die Lokalisation der mRNA im *Drosophila* Embryo spricht gegen eine Interaktion, da sie hauptsächlich im ZNS exprimiert ist, einem Gewebe, in dem Crb nicht exprimiert ist. (A.Bachmann, unveröffentlichte Daten; BDGB *in-situ* database).

Über das Protein, welches vom CG1976 kodiert wird, sind nur wenig Details bekannt. Die Expression eines doppelsträngigen RNAi-Konstruktes (Billuart et al., 2001) resultierte in keinem offensichtlichen Phänotyp. Daten der ‚Yale developmental expression database‘ zeigen, dass das Expressionsmaximum ungefähr bei Stadium 10/11 der Embryonalentwicklung liegt und danach rapide absinkt. Dies könnte auf eine starke maternale Komponente hinweisen. Die für die RNA-Interferenz verwendeten Aktivatoren, welche im Embryo ubiquitär erst ab Stadium 5 und in larvalen Stadien in den Imaginalscheiben und im ‚Mushroom body‘ exprimiert waren, konnten die Expression der RNA wahrscheinlich nicht mehr ausreichend inhibieren. Strukturell sind drei Proteindomänen vorhergesagt, eine PDZ-Domäne, über die die Bindung an die intrazelluläre Domäne von Crb stattfinden könnte, eine RhoGAP-Domäne und eine C1-Domäne. Funktionell sind RhoGAP-Domänen (Guanine nucleotide Activating Protein) zuständig für die Inaktivierung von RhoGTPasen durch Hydrolyse des gebundenen GTP's. RhoGTPasen sind an diversen biologischen Prozessen beteiligt, wie z.B. der Regulation des Aktinzytoskeletts, der Zellproliferation, Zell-Zell-Interaktionen und der

Apoptose (Hall, 1990). Funktionell ist dieses Protein interessant für eine potentielle Interaktion mit der intrazellulären Domäne von Crb *in vivo*, da zum einen in *crb* Mutanten die Zellproliferation und die Apoptose betroffen zu sein scheint. Zum anderen wird nach Effektoren gesucht, die die Aufrechterhaltung der Zellpolarität durch den Crb-Komplex beeinflussen und Rho-GAP könnte z.B. in diesen Mechanismus über die Regulation des Aktinzytoskletts eingreifen. Ob allerdings eine Expression in den gleichen Geweben erfolgt, muss noch mittels *in-situ* Hybridisierungen oder immunohistochemischer Färbungen geklärt werden.

Auch über das Protein, kodiert durch den CG9326, sind nur wenige Details aus der Literatur bekannt. Es handelt sich wie bei Sdt und MPP4 ebenfalls um ein Protein aus der Familie der Maguk Proteine, da es zwei L27-Domänen, eine SH3, PDZ und Guk-Domäne besitzt. Die mRNA zeigt im Embryo eine sehr ähnliche Expression wie Crumbs (Bachmann, A. unveröffentlichte Daten, BDGB *in-situ* database), aber eine Interaktion mit der intrazellulären Domäne von Crumbs in diesen Zellen ist trotzdem relativ unwahrscheinlich, da das Protein in der Zelle mit den *Septate junctions* kolokalisiert (Bachmann, A. und Draga, M. unveröffentlichte Daten). Diese befinden sich basal zur SAR, in der Crb lokalisiert ist. Eine direkte Interaktion mit Crumbs in anderen Geweben, in der Larve oder der adulten Fliege kann aber nicht ausgeschlossen werden.

Die Bindung der PDZ-Domänen von MPP4 und der Proteine kodiert durch den CG1976 und CG9326 an das ERLI-Motiv der intrazellulären Domäne von Crb ist im *Drosophila* Embryo für MPP4 und das Protein kodiert durch den CG9326 aufgrund obiger Ausführungen unwahrscheinlich. Für die Bindung des Proteins kodiert durch den CG1976 müssen erst weitere Experimente wie Lokalisationsstudien der mRNA bzw. des Proteins durchgeführt werden, um diesbezüglich Aussagen machen zu können.

4. Ausblick

Die in dieser Arbeit verwendete Methode der Affinitätschromatographischen Aufreinigung von Proteinkomplexen und anschließende Identifizierung der präzipitierten Proteine mittels Massenspektrometrie könnte noch durch die Verwendung der Tandem Affinitätsaufreinigung verbessert werden. Es würden weniger unspezifische Bindungspartner präzipitiert und die Identifizierung der spezifischen Bindungspartner des Crb-Komplexes könnte dadurch erhöht werden. Desweiteren könnte die Co-Immuno-

präzipitation des Crb-Komplexes mit einem Transgen-kodierten FLAG-Crb-intra Protein durchgeführt werden, welches den endogenen *crb* Promotor besitzt (Leube, 2002). Somit würde nur in den Zellen denen auch endogenes Crumbs zu finden ist, das Transgen-kodierte FLAG-Crb-intra exprimiert. Die unspezifische Bindung von Proteinen an das ‚Köder‘-Protein in Zellen, die nicht die endogenen Proteine des Crb-Komplexes exprimieren, kann dadurch vermieden werden.

In dieser Arbeit konnten potentielle Bindungspartner des Crb-Komplexes isoliert und identifiziert werden. Für einige Kandidaten wurden im Rahmen einer Diplomarbeit weitere Analysen durchgeführt (Volkmar, 2005), welche eine potentielle Interaktion für Calphotin, den Inositol 1,4,5-tris-phosphat Rezeptor und die Pk92B und mit dem Crb-Komplex bestätigen konnten. Analyse von Mutanten dieser Proteine und weitere biochemische Interaktionsstudien sollten erfolgen.

Sehr wichtig für die weitere Analyse der Funktion der Phosphorylierung der intrazellulären Domäne von Crumbs ist die eindeutige massenspektrometrische Identifizierung dieser Phosphorylierung. Da sowohl im Embryo als auch im Flügelepithel das Tyrosin an Position 10 und die Glutaminsäure an Position 16 eine wichtige Rolle spielen, sollte deren Einfluß auf die Lokalisation der bekannten Komponenten des Crb-Komplexes, wie *DPatj* oder *DMoesin* getestet werden. Hinsichtlich des durch die Expression der Varianten der Transgen-kodierten Crb Proteine verursachten dominanten Flügelphänotyps sollte geklärt werden, ob und wie die einzelnen funktionellen Bereiche der intrazellulären Domäne von Crb in die Regulation des Zelltodes eingreifen. Ein weiterer Aspekt ist der Zeitpunkt dieser Regulation, über den Tunnel-Färbungen (Nachweis apoptotischer Zellen) an L3-Imagininalscheiben und pupalen Scheiben sowie genauere Analysen der adulten Flügel Auskunft geben könnten.

Eine weitere Frage, die hinsichtlich der Phosphorylierung beantwortet werden muss, lautet, ob *DaPKC*, *Pk92B* oder eine andere Kinase verantwortlich für die Phosphorylierung im *Drosophila* Embryo ist. Dazu könnten Mutanten oder mutante Flügelklone dieser Kinasen analysiert werden bzw. genaue biochemische Interaktionsstudien durchgeführt werden.

Die potentielle Interaktion des Proteins, kodiert durch den CG1976, mit dem ERLI-Motiv der intrazellulären Domäne von Crb sollte durch Ko-Lokalisationsstudien, Analyse von Mutanten und weitere biochemische Experimente überprüft werden.

V. Zusammenfassung

Der Crumbs(Crb)-Komplex spielt eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Zellpolarität und des Gewebeverbandes von Epithelien in *Drosophila* und Säugern. Der genaue Mechanismus und die Funktion der einzelnen Proteine sind noch nicht vollständig aufgeklärt. Bei den bekannten Proteinen des Crb-Komplexes wie Stardust, DPatj und DLin-7 handelt es sich um Gerüstproteine. Effektoren wie Proteine von Signaltransduktionskaskaden als Komponenten des Crb-Komplexes sind bisher nicht bekannt. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit versucht, neue Bindungspartner des Crb-Komplexes zu identifizieren. Dazu wurde mittels affinitätschromatographischer Methoden der Crb-Komplex aufgereinigt und potentielle Bindungspartner mittels Massenspektrometrie identifiziert und Bindungspartner des C-Terminus der intrazellulären Domäne von Crb anhand des ‚homology modellings‘ ermittelt. Mittels Massenspektrometrie konnten putative Bindungspartner der intrazellulären Domäne identifiziert werden. Die mögliche Interaktion mit dem Crb-Komplex konnte durch weiterführende Studien für einige Kandidaten bestätigt werden (Volkmar, 2005). Die Verifizierung der Bindung der durch ‚homology modelling‘ ermittelten Kandidaten an das ERLI-Motiv der intrazellulären Domäne mit Hilfe des Hefe-2-Hybridsystems konnte MPP4, und die Proteine kodiert durch den CG1976 und den CG9326 als putative Bindungspartner bestätigen.

Bei der massenspektrometrischen Analyse des ‚Köder‘-Proteins FLAG-Crb-intra konnte eine Phosphorylierung der intrazellulären Domäne an einer von fünf putativen Aminosäuren (einem Threonin, zwei Serinen oder zwei Tyrosinen) festgestellt werden. Die Überexpression von Varianten der Transgen-kodierten Crb Proteine, zeigten eine funktionelle Bedeutung des Threonins an Position 6, des Tyrosins an Position 10, der Glutaminsäure an Position 16 und des ERLI-Motivs der intrazellulären Domäne von Crb im *Drosophila* Embryo. In *Drosophila* sind bei Expression der Varianten der Transgen-kodierten Crb Proteine dominante Phänotypen im adulten Flügel und in den Imaginalscheiben zu beobachten. Diese Phänotypen sind abhängig vom ERLI-Motiv, dem Tyrosin an Position 10 und der Glutaminsäure an Position 16 der intrazellulären Domäne von Crb. Innerhalb der intrazellulären Domäne von Crb sind oben genanntes Tyrosin, die Glutaminsäure und das ERLI-Motiv wichtig für die Funktion im *Drosophila* Embryo und im Flügel, wohingegen das Threonin nur im *Drosophila* Embryo eine Rolle zu spielen scheint.

VI. Literaturverzeichnis

Ashburner, M. (1989). *Drosophila*, A laboratory Handbook (Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Bachmann A, Schneider M, Theilenberg E, Grawe F, Knust E. (2001) *Drosophila* Stardust is a partner of Crumbs in the control of epithelial cell polarity. *Nature*. **414(6864)**:638-43.

Bachmann A, Timmer M, Sierralta J, Pietrini G, Gundelfinger ED, Knust E, 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(Pt 10)**:1899-909.

Bauer A, Kuster B. (2003) Affinity purification-mass spectrometry. Powerful tools for the characterization of protein complexes. *Eur J Biochem*. **270(4)**:570-8.

Baumgartner, S., Littleton, J.T., Broadie, K., Bhat, M.A., Harbecke, R., Lengyel, J.A., Chiquet-Ehrismann, R., Prokop, A. und Bellen H.J. (1996) A *Drosophila* Neurexin is required for septate junction and blood-nerve barrier formation and function. *Cell* **87**, 1059-1068

Berger, S. (2005) Charakterisierung der Funktion von Stardust im Komplexauge von *Drosophila melanogaster*. Dissertation an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Bhat, M.A., Izaddoost, S., Lu, Y., Cho, K.-O., Choi, K.-W. und Bellen, H.J. (1999) Discs lost, a novel multi-PDZ domain protein, establishes and maintains epithelial polarity. *Cell* **96**, 833-845

Bilder, D. und Perrimon, N. (2000) Localization of apical epithelial determinants by the basolateral PDZ protein Scribble. *Nature* **403**, 676-680

Bilder, D., Schober, M. und Perrimon, N. (2003). Integrated activity of PDZ protein complexes regulates epithelial polarity. *Nat. Cell Biol.* **5**, 53-58

Billuart P, Winter CG, Maresh A, Zhao X, Luo L. (2001) Regulating axon branch stability: the role of p190 RhoGAP in repressing a retraction signaling pathway. *Cell*. **107(2)**:195-207.

Birnboim, H.C. und Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for Screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**, 1513-1523

- Brand, A.H. und Perrimon, N.** (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Develop.* **118**, 401-415
- Brown DA, Crise B, Rose JK.** (1989) Mechanism of membrane anchoring affects polarized expression of two proteins in MDCK cells. *Science.* **245**(4925):1499-501
- Campos-Ortega, J.A, Hartenstein, V.** (1997). The Embryonic Development of *Drosophila melanogaster*, 2nd edition *Springer*
- Capdevila J, Guerrero I.** (1994) Targeted expression of the signaling molecule decapentaplegic induces pattern duplications and growth alterations in *Drosophila* wings. *EMBO J.* **13**(19):4459-68.
- Cho, K. S. , Lee, J.L., Kim, S. , Kim, D., Koh, H., Lee, J., Kim, Ch. Kim, J. and Chung, J.** (2001) *Drosophila* phosphoinositide-dependent kinase-1 regulates apoptosis and growth via the phosphoinositide 3-kinase-dependent signaling pathway. *PNAS*, **98**: 6144 - 6149
- Cohen, S. M.** (1993). Imaginal Disc Development. In *The Development of Drosophila melanogaster*, vol. 2 (ed. M. Bate and A. Martinez Arias), pp. 747-841: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- 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 DePol, 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**, 217-221
- den Hollander, A.I., Johnson, K., de Kok, Y.J., Klebes A., Brunner H.G., Knust.E. und Cremers, F.P.** (2001). CRB1 has a cytoplasmic domain that is functionally conserved between human and *Drosophila*. *Hum. Mol. Genet.* **10**(24), 2767-2773
- Djiane A, Yogev S, Mlodzik M.** (2005) The apical determinants aPKC and dPatj regulate Frizzled-dependent planar cell polarity in the *Drosophila* eye. *Cell.* **121**(4):621-31.
- Drubin, D.G. und Nelson, W.J.** (1996) Origins of cell polarity. *Cell* **84**, 335-344
- Eaton, S. und Simons, K.** (1995). Apical, basal and lateral cues for epithelial polarization. *Cell* **82**, 5-8

- Evan, G. I., Lewis, G.K., Ramsay, G. und Bishop, J.M.** (1985) Isolation of monoclonal antibodies specific for human c-myc proto-oncogene product. *Mol. Cell. Biol.* **5**:3610-16
- Fornaçon, S.** (2001) Suche nach neuen Interaktionspartnern des *Drosophila* Proteins Crumbs. Diplomarbeit an der Mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine Universität, Düsseldorf
- Gavin AC, Bosche M, Krause R, Grandi P, Marzioch M, Bauer A, Schultz J, Rick JM, Michon AM, Cruciat CM, Remor M, Hofert C, Schelder M, Brajenovic M, Ruffner H, Merino A, Klein K, Hudak M, Dickson D, Rudi T, Gnau V, Bauch A, Bastuck S, Huhse B, Leutwein C, Heurtier MA, Copley RR, Edelman A, Querfurth E, Rybin V, Drewes G, Raida M, Bouwmeester T, Bork P, Seraphin B, Kuster B, Neubauer G, Superti-Furga G.** (2002) Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature.* 415(6868):141-7.
- Guerois, R., Nielsen, J. E. and Serrano, L.** (2002). Predicting changes in the stability of proteins and protein complexes: a study of more than 1000 mutations. *J. Mol. Biol.* **320**,369-387.
- Golemis, E.A. und Khazak, X.** (1984) Alternative yeast two-hybrid system: The interaction trap and interaction mating. *Methods in Molecular Biology*, Kapitel 60
- 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**, 951-959
- Grzeschik NA, Knust E.** (2005) IrreC/rst-mediated cell sorting during *Drosophila* pupal eye development depends on proper localisation of DE-cadherin. *Development.* **132(9)**:2035-45.
- Gumbiner, B.M.** (1996). Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and Morphogenesis. *Cell* **84**, 345-357
- Gut A, Kappeler F, Hyka N, Balda MS, Hauri HP, Matter K.** (1998) Carbohydrate-mediated Golgi to cell surface transport and apical targeting of membrane proteins. *EMBO J.* **17(7)**:1919-29.
- Hall, A.** (1990) The cellular functions of small GTP-binding proteins. *Science.* **249(4969)**:635-40. Review.
- Hanahan, D., Jessee, J. und Bloom, F.R.** (1991). Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria. *Methods Enzymol.* **204**, 63-113

-
- Harris, T.J. und Peifer, M.** (2004). Adherens junction-dependent and –independent steps in the establishment of epithelial polarity in *Drosophila*. *J Cell Biol.* **167**, 135-47
- Harris, T.J. und Peifer, M.** (2004). The positioning and segregation of apical cues during epithelial polarity establishment in *Drosophila*. *J Cell Biol.* **170(5)**:813-23.
- Hazelrigg, T., Levis, R. und Rubin, G.M.** (1984). Transformation of white locus DNA in *Drosophila*: dosage compensation, zeste interaction, and position effects. *Cell* **36**, 469-481
- Henzel WJ, Billeci TM, Stults JT, Wong SC, Grimley C, Watanabe C.** (1993) Identifying proteins from two-dimensional gels by molecular mass searching of peptide fragments in protein sequence databases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **90(11)**:5011-5.
- Herranz H, Stamatakis E, Feiguin F, Milan M.** (2006) Self-refinement of Notch activity through the transmembrane protein Crumbs: modulation of gamma-Secretase activity. *EMBO Rep.* Epub ahead of print
- Hipfner DR, Keller N, Cohen SM.** (2004) Slik Sterile-20 kinase regulates Moesin activity to promote epithelial integrity during tissue growth. *Genes Dev.* **18(18)**:2243-8.
- Hipfner DR, Cohen SM.** (2003) The *Drosophila* sterile-20 kinase slik controls cell proliferation and apoptosis during imaginal disc development. *PLoS Biol.* **1(2)**:E35.
- 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**, 634-38
- Hopp, T.P., Prickett, K.S., Price, C., Libby, R.T., March, C.J., Cerretti, D.P., Urdal, D.L. und Conlon, P.J.** (1988). A short polypeptide marker sequence useful for recombinant protein identification and purification. *Biotech.* **6**, 1204-1210
- Hortsch, M., Ratel, N.H., Bieber, A.J. Tarquina, Z.R. und Goodman, C.S.** (1990). *Drosophila* Neurotactin, a surface glycoprotein with homology to serine esterases, is dynamically expressed during embryogenesis. *Develop.* **110**, 1327-1340
- Hoving S, Gerrits B, Voshol H, Muller D, Roberts RC, van Oostrum J.** (2002) Preparative two-dimensional gel electrophoresis at alkaline pH using narrow range immobilized pH gradients. *Proteomics.* **2(2)**:127-34.

-
- Izaddoost S, Nam SC, Bhat MA, Bellen HJ, Choi KW.** (2002) *Drosophila* Crumbs is a positional cue in photoreceptor adherens junctions and rhabdomeres. *Nature*. **416(6877)**:178-83.
- Jacob, L., Opper, M., Metzroth, B., Phannavong, B., und Mechler, B.M.** (1987) Structure of the *l(2)gl* gene of *Drosophila* and delimitation of its tumor suppressor domain. *Cell* **50**, 215-25
- James. P., Halladay, J. und Craig, E.A.** (1996) Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient Two-Hybrid selection in yeast. *Genetics* **144**: 1425-36
- Joberty G, Petersen C, Gao L, Macara IG.** (2000) The cell-polarity protein Par6 links Par3 and atypical protein kinase C to Cdc42. *Nat Cell Biol.* **2(8)**:531-9.
- Johnson K, Grawe F, Grzeschik N, Knust E.** (2002) *Drosophila* crumbs is required to inhibit light-induced photoreceptor degeneration. *Curr Biol.***12(19)**:1675-80.
- Jürgens, G., Wieschaus, E., Nüsslein-Volhard, C. und Kluding, H.** (1984). Mutations affecting the pattern of the larval cuticle in *Drosophila melanogaster*, II. Zygotic loci on the third chromosome. *Roux's Arch. Dev. Biol.* **193**, 283-295
- Kamberov, E. et al.,** (2000) Molecular cloning and characterization of Pals, proteins Associated with mLin-7. *J.Biol.Chem.* **275**, 11425-11431
- Kang, D., Gho, Y.S., Suh, M. und Kang, C.** (2002) Highly Sensitive and Fast Protein Detection with coomassie Brilliant Blue in Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *Bull. Korean Chem. Soc.* **23(11)**:1511-12
- Kempkens, Ö.** (2006) Funktion und Wechselwirkungen der Crumbs und Bazooka Komplexe in Epithelien von *Drosophila melanogaster*. Dissertation an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- Kiel, C., Wohlgemuth, S., Rousseau, F., Schymkowitz, J., Ferkinghoff-Borg, J., Wittinghofer, F. and Serrano, L.** (2005). Recognizing and defining true Ras binding domains II: In silico prediction based on homology modelling and energy calculations. *J. Mol. Biol.* **348**, 759-775.
- Kinter, M. und Sherman, N. E.** (2000). Protein Sequencing and Identification Using Tandem Mass Spectrometry. Wiley-Interscience, 1.Auflage, Series on Mass Spectrometry

- Klebes, A. und Knust, E.** (2000) A conserved motif in Crumbs is required for E-cadherin localisation and zonula adherens formation in *Drosophila*. *Curr. Biol.* **10**, 76-85
- Klebes, A.** (1999). Funktionsanalyse der zytoplasmatischen Domäne des *Drosophila* Crumbs Proteins. Dissertation an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- Klose, J.** (1975) Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. *Humangenetik.* **26(3)**:231-43.
- Kuai J, Nickbarg E, Wooters J, Qiu Y, Wang J, Lin LL.** (2003) Endogenous association of TRAF2, TRAF3, cIAP1, and Smac with lymphotoxin beta receptor reveals a novel mechanism of apoptosis. *J Biol Chem.* **278(16)**:14363-9.
- 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
- Kuranaga E, Kanuka H, Igaki T, Sawamoto K, Ichijo H, Okano H, Miura M.** (2002) Reaper-mediated inhibition of DIAP1-induced DTRAF1 degradation results in activation of JNK in *Drosophila*. *Nat Cell Biol.* **4(9)**:705-10.
- Laski, F.A., Rio, D.C. und Rubin, G.M.** (1986). Tissue specificity of *Drosophila* P element transposition is regulated at the level of mRNA splicing. *Cell* **44**,7-19
- Lecuit T, Wieschaus E.** (2000) Polarized insertion of new membrane from a cytoplasmic reservoir during cleavage of the *Drosophila* embryo. *J Cell Biol.* **150(4)**:849-60.
- Lemmers C, Michel D, Lane-Guermonprez L, Delgrossi MH, Medina E, Arsanto JP, Le Bivic A.** (2004) CRB3 binds directly to Par6 and regulates the morphogenesis of the tight junctions in mammalian epithelial cells. *Mol Biol Cell.* **15(3)**:1324-33.
- Leube, K.** (2002) Analyse regulatorischer Sequenzen des *Drosophila*-Gens *crumbs*. Diplomarbeit an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine Universität, Düsseldorf
- Lindsley, D.L. und Zimm, G.G.** (1992). The Genome of *Drosophila melanogaster* (San Diego: Academic Press, Inc.)
- Lisanti MP, Caras IW, Davitz MA, Rodriguez-Boulan E.** (1989) A glycopospholipid membrane anchor acts as an apical targeting signal in polarized epithelial cells. *J Cell Biol.* **109(5)**:2145-56.

-
- Lu H, Bilder D.** (2005) Endocytic control of epithelial polarity and proliferation in *Drosophila*. *Nat Cell Biol.* 7(12):1132-9.
- Macara, I.G.** (2004) Parsing the polarity code. *Nat. Rev. Mol. Biol.* 5, 220-31
- Mangeat, P., Roy, C. und Martin, M.**(1999). ERM proteins in cell adhesion and membrane dynamics. *Trends Cell. Biol.* 9, 187-192
- Marfatia Sh. M., Lue, R.A., Branton, D. und Chishti, A.H.** (1995) Identification of the Protein 4.1 Binding Interface on Glycophorin C and p55, a Homologue of the *Drosophila discs-large* Tumor Suppressor Protein. *J. Biol. Chem.* 270(2), 715-719
- Matter K, Mellman I.** (1994) Mechanisms of cell polarity: sorting and transport in epithelial cells. *Curr Opin Cell Biol.* 6(4):545-54.
- Matter, K.** (2000) Epithelial polarity: Sorting out the sorters. *Curr. Biol.* 10:R39-R42
- McCormack A.L., Schieltz D.M., Goode B., Yang S., Barnes G., Drubin D., Yates JR 3rd.** (1997) Direct analysis and identification of proteins in mixtures by LC/MS/MS and database searching at the low-femtomole level. *Anal Chem.* 69(4):767-76.
- Medina E., Williams J., Klipfell E., Zarnescu D., Thomas G., Le Bivic A.** (2002) Crumbs interacts with moesin and beta(Heavy)-spectrin in the apical membrane skeleton of *Drosophila*. *J Cell Biol.* 158(5):941-51.
- Miller, J.** (1972) Experiments in Molecular Genetics. Cold spring harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1, 1-11
- Mostov K., Su T. und ter Beest M.** (2003) Polarized epithelial membrane traffic: conservation and plasticity. *Nat.C.Biol.* 5,287-293
- 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.* 134,149-163
- Obenauer JC, Cantley LC, Yaffe MB.** (2003) Scansite 2.0: Proteome-wide prediction of cell signaling interactions using short sequence motifs. *Nucleic Acids Res.* 31(13):3635-41.
- Oda, H., Uemura, T., Shiomi, T., Nagafuchi, A., Tsukita, S. and Takeichi, M.** (1993) identification of a *Drosophila* homologue of α -catenin and its association with the armadillo protein. *J Cell Biol.* 121, 1133-1140

- Oda, H., Uemura, T., Harada, Y., Iwai, Y. and Takeichi, M.** (1994). A *Drosophila* homolog of cadherin associated with Armadillo and essential for embryonic cell-cell adhesion. *Dev. Biol.* **165**, 716-799
- O`Farrell, PH** (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* **250**: 4007-4021
- Patel, N.H., Snow, P.M. und Goodman, C.S.** (1987). Characterization and cloning of fasciclin III: a glycoprotein expressed on a subset of neurons and Axon pathways in *Drosophila*. *Cell* **48**, 975-088
- Pellikka M, Tanentzapf G, Pinto M, Smith C, McGlade CJ, Ready DF, Tepass U.** (2002) Crumbs, the *Drosophila* homologue of human CRB1/RP12, is essential for photoreceptor morphogenesis. *Nature.* **416(6877)**:143-9.
- Petronzcki, 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
- Pfeifer, M.** (1993). The product of the *Drosophila* segment polarity gene armadillo is part of a protein complex resembling the vertebrate adherens junctions. *J. Cell Sci.* **105**, 993-100
- Pielage J, Stork T, Bunse I, 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(6)**:841-51.
- Ramrath, A.** (2002) Isolierung und Charakterisierung des PDZ-Domänen-Proteins Bazooka aus *Drosophila melanogaster*. Dissertation an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- Reumers, J., Schymkowitz, J., Ferkinghoff-borg, J., Stricher, F., Serrano, L. and Rousseau, F.** (2005). SNPeffect: a database mapping molecular phenotypic effects of human non-synonymous coding SNPs. *Nucl. Acids Res.* **33**, D527-532.
- Richard M, Grawe F, Knust E.** (2005) DPATJ plays a role in retinal morphogenesis and protects against light-dependent degeneration of photoreceptor cells in the *Drosophila* eye. *Dev Dyn.* **235(4)**:895-907
- Rodriguez-Boulan, E. und Nelson, W.J.** (1989). Morphogenesis of the polarized epithelial cell phenotype. *Science* **245**, 718-725

- Roh MH, Makarova O, Liu CJ, Shin K, Lee S, Laurinec S, Goyal M, Wiggins R, Margolis B.** (2002) The Maguk protein, Pals1, functions as an adapter, linking mammalian homologues of Crumbs and Discs Lost. *J Cell Biol.* **157(1)**:161-72.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T.** (2001). Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Vol. 1-3 (Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press)
- Schaefer, M., Shevchenko, Anna, Shevchenko Andrej und Knoblich, J.A.** (2000) A protein complex containing Inscutable and the G α -binding protein Pins orients asymmetric cell divisions in *Drosophila*. *Cur.Biol.* **10(7)**, 353-362
- Scheiffele P, Peranen J, Simons K.** (1995) N-glycans as apical sorting signals in epithelial cells. *Nature.* **378(6552)**:96-8.
- Schneider, I.** (1972). Cell lines derived from late embryonic stages of *Drosophila melanogaster*. *J. Embryol. Exp.Morph.* **27(2)**, 353-365
- Schuck, S. und Simons, K.** (2004). Polarized sorting in epithelial cells: raft clustering and the biogenesis of the apical membrane. *J. Cell Sci.* **117**, 5955-5964
- Simons, K.** (1995). Biogenesis of epithelial cell surface polarity. *Harvey Lect* **89**, 125-146
- Simons K, Ikonen E.** (1997) Functional rafts in cell membranes. *Nature.* **387(6633)**:569-72.
- Sotillos S, Diaz-Meco MT, Caminero E, Moscat J, Campuzano S.** (2004) DaPKC-dependent phosphorylation of Crumbs is required for epithelial cell polarity in *Drosophila*. *J Cell Biol.* **166(4)**:549-57.
- Spradling, A.C.** (1986). P-element mediated transformation. In: *Drosophila a practical approach.* (ed) Roberts, D.B. (Oxford, IRL Press), 175-197
- Spodsberg N, Alfalah M, Naim HY.** (2001) Characteristics and structural requirements of apical sorting of the rat growth hormone through the O-glycosylated stalk region of intestinal sucrase-isomaltase. *J Biol Chem.* **276(49)**:46597-604
- Tanentzapf, G. und Tepass, U.** (2003). Interactions between the *crumbs*, *lethal giant larvae* and *bazooka* pathways in epithelial polarization. *Nat. Cell Biol.* **5**, 46-52

- Tepass U, Theres C, 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(5)**:787-99.
- Tepass, U. und Hartenstein, V.** (1994). Development of intercellular junctions in the *Drosophila* embryo. *Dev. Biol.* **161**, 563-596
- Tepass, U.** (1996). Crumbs a component of the apical membrane , is required for Zonula adherens formation in primary epithelia of *Drosophila*. *Dev. Biol.* **177**, 217-225
- Veraksa, A., Bauer A. und Artavanis-Tsakonas, S.** (2005) Analyzing Protein Complexes in *Drosophila* with Tandem Affinity Purification–Mass Spectrometry. *Dev.Dyn.* **232**: 827-34
- Volkmar, V.** (2005) Analyse von putativen Interaktionspartnern des *Drosophila* Crumbs-Komplexes. Diplomarbeit an der Mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine Universität, Düsseldorf
- Wang Q, Hurd TW, Margolis B.** (2004) Tight junction protein Par6 interacts with an evolutionarily conserved region in the amino terminus of PALS1/stardust. *J Biol Chem.* **279(29)**:30715-21
- Warn, R.M., Robert-Nicoud, M.** (1990). F-actin organization during the cellularization of the *Drosophila* embryo as revealed with a confocal laser scanning Microscope. *J. Cell. Sci.* **96**, 35-42
- Wilm M, Shevchenko A, Houthaeve T, Breit S, Schweigerer L, Fotsis T, Mann M.** (1996) Femtomole sequencing of proteins from polyacrylamide gels by nanoelectrospray mass spectrometry. *Nature*. **379(6564)**:466-9.
- Wasserscheid, I.** (2005). Die Funktion des *Drosophila* Gens bazooka bei der Morphogenese epithelialer Gewebe. In "Institut für Genetik". Heinrich Heine Universität. Inaugural-Dissertation Düsseldorf
- Wodarz, A.** (1993). Untersuchung zur Funktion des Gens *crumbs* bei der Entwicklung von Epithelien in *Drosophila melanogaster*. Dissertation an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln
- Wodarz, A., Grawe, F. und Knust, E.** (1993). CRUMBS is involved in the control of apical protein targeting during *Drosophila* epithelial development. *Mech. Dev.* **44**, 175-187

Wodarz, A., Hinz, U., Engelbert, M. und Knust, E. (1995). Expression of crumbs confers apikal character on plasma membrane domains of ectodermal Epithelia of *Drosophila*. *Cell* **82**, 67-76

Wodarz A, Ramrath A, Grimm A, Knust E. (2000) *Drosophila* atypical protein kinase C associates with Bazooka and controls polarity of epithelia and neuroblasts. *J Cell Biol.* **150(6)**:1361-74. Erratum in: *J Cell Biol.* 2004 May 24;165(4):following 589

Wolpert, L., Beddington, R., Brockes, J., Jessell, Th., Lawrence, P., Meyerowitz, E. Principles of Development. 1998, Oxford University Press, Oxford

Woods, D.F. und Bryant P.J. (1991). The *discs large* tumor suppressor gene of *Drosophila* encodes a guanylate kinase homolog localized at septate junctions. *Cell* **66**, 451-464

Yeaman C, Le Gall AH, Baldwin AN, Monlauzeur L, Le Bivic A, Rodriguez-Boulan E. (1997) The O-glycosylated stalk domain is required for apical sorting of neurotrophin receptors in polarized MDCK cells. *J Cell Biol.* **139(4)**:929-40.

Yeaman, C., Grindstaff, K., Nelson, W.J. (1999). New Perspectives on Mechanisms Involved in Generating Epithelial Cell Polarity. *Physiological Reviews* 79 (1), 73-9

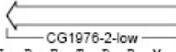
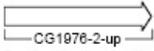
VII. Anhang

1. Abkürzungen

Abb. - Abbildung
ähnl. - Ähnlich
anschl. - anschließend
Anz. - Anzahl
Bal. - Balancer
bp - Basenpaare
bzw. - beziehungsweise
ca. - circa
DNA - Desoxyribonucleinsäure
EDTA - Ethylendiamintetraacetat
EtBr - Ethidiumbromid
EtOH - Ethanol
evtl. - eventuell
g - Gramm
Genom. - Genomisch
HRP- Meerrettich Peroxidase
Lsg – Lösung
l – liter
m... - milli...(10⁻³)
M - Molarität (mol/l)
min - Minuten
μ... - mikro...(10⁻⁶)
MU – Miller Unit
n.e. – nicht erhoben
°C - Grad Celsius
rpm - rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT - Raumtemperatur
s. – siehe
s.o. – siehe oben
St.-Lsg - Stamm-Lösung
Tab. - Tabelle
U - Unit
u.a. - unter anderem
UV-Licht - ultraviolettes Licht
ü.N.- über Nacht
Verd. - Verdünnung
vgl. - vergleiche
Vol. - Volumen
WT - Wildtyp

2. Sequenzdaten

ATGACGGTGCACCCGGCTGAAATGGCGGAAATGGAGATCAGTTCCTGATGTACCCGCAAGCC 64
 M T V Q P A E M A E N G R S V P D V T A S
 CGGGACGGGCCCCCGCAACACTGCCCGCAACCCAGATGCCTGCGATGGGCAACAGCAACA 128
 F G R A P P F G P L P A N Q M P A M G N Q Q H
 CCATGGAAACCAGCAACATCATGGAAACCAGCAGCACCATCATGGCAATCAGCACAGCAACCAT 192
 H G N Q Q H H G N Q Q Q H H G N Q H S N H
 CGAGGTCAGAGCGGAAGTTTGTCAACACCGCCGGGGTCAAGGACCCGGTATGCTACAGGGCG 256
 R G Q S G S L S N A A G V K D P V M L Q G
 ATTTTCGGAAGTCAGCGGAATCAGCTCAGAGATCTTTCGGCAGATAGAAGCCCTCGAGATGA 320
 D F R K V S G I S S E I F R Q I E A V E N D
 CCACGACCCAAACACGGCGGCGCTTGGAGCGGTTGGAGAGACCGGTCAGATGATCGTGCGC 384
 H D P N T A A A L E A V E R R G E M I V R
 GTCTGGAGCCGCTTGCATGGCAGCAACAGCGGTTGGACGCTGCCACAACTGATGAACA 448
 V L E P R C M G S K Q A V D A A H K L M N
 AGCGCGACCGCAGCCACCCCTGCAGCTGGTGAAGATAGTCAAGCGCCCGGGCCAGCGCTGGG 512
 K A D A R H T V Q L V E I V K R P G Q T L G
 CTGTACATCCCGAGGGAATGGGCGCATCGAATGATGGCGCTTTATTTCCGGGATTCGA 576
 L Y I R E G N G A D R T D G V F I S R I A
 CTGGAGTCGGCTGTCTACACACGCGGCTGTCTGGGGTGGGCGACAAATCCTTTCGGTAAATC 640
 L E S A V Y N S G C L R V G D E I L A V N
 TGGTGGACGTGACACACATGCTCTTAGACGATGTCTCATTATTATGTCAATCCGCGCCGCTT 704
 L V D V T H M S L D D V V I I M S I F R R L
 GGTGCTGGCTATACGTACGCGCGGGGCAATAGAGGACACAGGATCTCTGGACCGCCACAGCTC 768
 V L A I R Q R R G N R G T G S P G P P T L
 TCTAGCCAGAACAGAGCCCCCACCAGGTTGTGTGTCATCAAGCGAGATTTGGAGACGAGGATC 832
 S R P E Q K P P F V V I K R D L R D E D
 TGGACGAGACGGACCGGATGCGAGGCGCGCTCATCAGAGATGGTCCGAAATGACGGATC 896
 L D E T D R M P R P R S S R D G R E M T E S
 TCGTTCAGGCTAGGCTGGGCTTTAATAATTACAGCCCGCAGTCCGAGCAGTTGGATATGTAC 960
 R S R L G L G L N N Y S P Q S E Q L D M Y
 TACAAATCCCGCGCGAGGTGGAGGAGCCATGGTGAAGCTCCAACTGGGGCTATAACCCAC 1024
 Y N T R G G G G G A M G E P P N W G Y K P
 CACCGCCACCGTCTTCGGCTATTACGGAGCAACCCAGAAACACATGCTTTGCGCGCTCGCA 1088
 F P P P S S V I T E Q P T K A H A F A P S H
 TGCTTACTACCAAAATGCCGCACTCTTGAAGCTTGGCGGAGAGGTACATGCATTCATCTCT 1152
 A Y Y Q N A G T L E S L A E K V H A F Y P



GGACAGCCTGGTGGTCCGCCAGTGGGTCCCTCGAGAAGATGTCAACGGGAACGGAAACGGTTG 1216
 G Q P G G P P V G G P S R R M S T G T G N V
 GCCTCGCTCAGCAACATGCCAGATTTCCGGGATCTGGCTCAGATCAGCATTACCTCCGGTAGA 1280
 G L A Q Q H A R F P R S G S D Q H L P R V E
 ATATTGGACTATTCRAATTCACATGGGGGGCATTCCCTTCTCGCATCAAGTTTAAACCTGGA 1344
 Y S D Y S N S L G R H S L L R S S L K P G
 ACGACCGGTTGGAGTCCAATGCAGGTAGGAGTGGGAGGCACTTTCGGCCGATACGGCCGTATG 1408
 T T G G A P M Q V G V G G T L G R Y G R Y
 ATCAACAGAGAGCCGGTGTATCCAAGTACGGCCCTCCACTCTGGAGCTCAATCGCTGACCCG 1472
 D Q Q R A G V S K Y G P P S G G A Q S L T R
 TCGTTCAGACCAAAATTTGGACTATTCCAGCGATACGGAGCCCAAAATGGGGCCAGCCCAAGT 1536
 R S R P N L D Y S S D T E A T I G P R P S
 TACTACTATATAACAGACCTGCCATCGGAGTATGTCCAGGGGATCAGGTGGAGCAGCGGGAG 1600
 Y Y Y Y N R P A I G S M S R G S G G A G G
 GAGTGGCGCAGCTTCAACGGTGCCTTGGCTGGGAGTGTGATCTTAACAAATTTAACTC 1664
 G V G A A S T A A L L A G A A D L N K F N S
 GTTCCACAGAGAGCGCCCGGGACGAGCTGCAGGGAATTCGTTCCAGAAATGGGAGATCGTTTG 1728
 L P R E R P G T R L Q G I R S R M G D R L
 GTGGACGAAATGACGGAAATACCTCGGACCCGAGTTCGATGTACGGAGAGGAGGAGCTTAC 1792
 V D E N D G N T S A P E F D V R R G R D L
 GTCAGCGAATACCGCCAGTCCGTCGATATTTACGGCAGATGAATACCGCGCTGGCTCAGAAG 1856
 R Q R I T A S P S I F T A D E Y R A W L R R
 GGCCTTAGCAGTTCGCAATTCGGGAACAAATGGCAATGACCGGGGACATGTTTCCCGAGCCA 1920
 A P S S S A I A E Q M R M T R D M F A Q P
 CGGGCTCAGCGATTTTCGTGTAGCGCTGAGAACATCCATGATGCATCAGAGAAATACGGAAGCA 1984
 R A Q R F S C S A E N I H D A L R N T E S
 TCTACTCAGTAGAAACCATATTCCTGGTACGGCACTCTCGATCGGAACATGGGTCTTACCCG 2048
 I Y S S R N H I L G T G T L D R N M G L T R
 ACCAATTCAGCACTACCCGTCGCTCCATGTCTCACAGACATTTGGAGAGCGGGTTCATT 2112
 P I S A L P V R S M S S Q H I G G A G S I
 CGTTCGCTAGCATAACGGCGCTGCGACAGTACTGGAGCTTTCGCTGGTCCCGCCAGTCCGA 2176
 R S P S I R R M R Q L L E L S A G P A S P
 GCGGAGTATCTTGGACCCGGTGGTATCAGACTCCGGCACCACTCCACGGCGGACCCCTACC 2240
 S G S I L S T G G H Q S P A P T P S A T L P
 ACGCCGCAACCCAAATCGACATCAACCCGGGAGTTTCCCAAGTACAAGCTGGATAGGCC 2304
 R P H R Q I D I N P A E F A K Y K L D K P
 ATCGTTGATATTGGGGGATCTCCGGCATGTTATGGATTCAATTTGCTAGCAGGTCCGGCCCTAA 2368
 I V D I G G I S G M L W I H L L A G R G L
 GAACCGCTCCAGAGGAGCAGGAGAACCGGACACAGGGCCAAACAGAGATCTTACTGCGT 2432
 R T A P E G A A G T A T Q G Q T R D L Y C V
 AATCGAGTGCATCGAGTACATAAGCACGGACTGTGGTACGATCGGGTACCTCGAGTTCGAC 2496
 I E C D R V H K A R T V V R S G D L Q F D
 TGGAGCAGTCCGTTGAGCTCGACTTGGTGGGCAACAAACAGTTAGATGTACTAGTCTACTCAT 2560
 W D E S F E L D L V G N K Q L D V L V Y S
 GGGACCCGACAGACACAAAGCTGTGTACCGAGGCGCAATTCGTTATCGTCGATCCCTCCG 2624
 W D P Q H R H K L C Y R G A I S L S I L R
 TCAGTCTCCACTTCATCAACTGGCCTTGAAGGTGAAACCAAGAGTACGATATACATCCGATG 2688
 Q S P L H Q L A L K V E P R G T I Y I R M

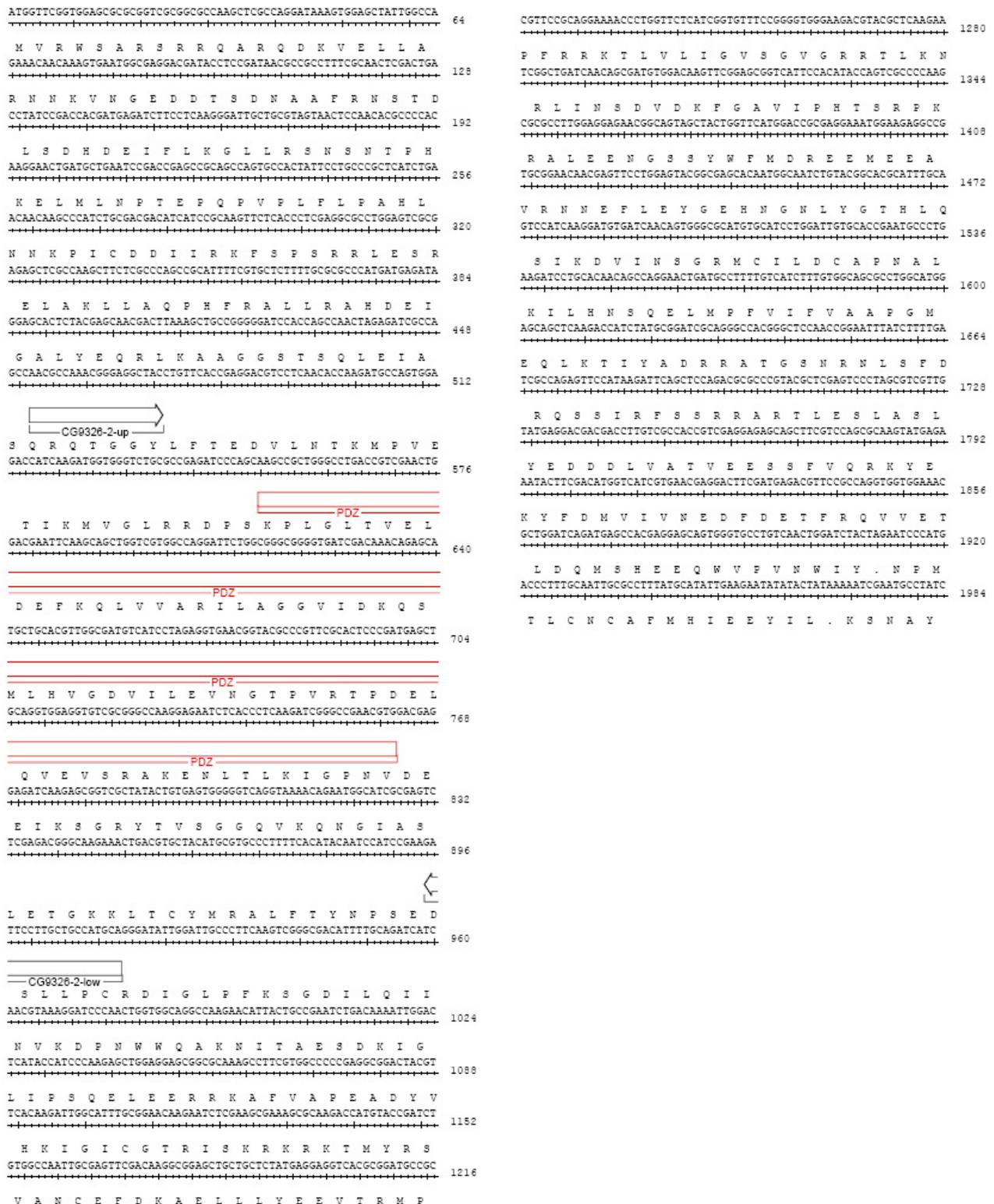


Abb.VII. 2. DNA und Proteinsequenz der B-Isoform des CG9326

Die PDZ-Domäne (Postsynaptic density 95/ Discs large/Zonula occludens1) und die zur Klonierung verwendeten Primersequenzen sind markiert



Abb.VII. 4. DNA und Proteinsequenz der D-Isoform des CG9326
 Die PDZ-Domäne (Postsynaptic density 95/ Discs large/Zonula occludens1) und die zur Klonierung verwendeten Primersequenzen sind markiert



Abb.VII. 5. DNA und Proteinsequenz von InaD
 Die PDZ-Domäne (Postsynaptic density 95/ Discs large/Zonula occludens1) und die zur Klonierung verwendeten Primersequenzen sind markiert

3. Massenspektrometrische Daten

Tabelle VII.1. Massenspektrometrische Daten zu Tab.III.5

Protein	Acc.-Nr.	# der Peptide	% identifiziert	sequenzierte Peptide
Crb-intra 50µl				
Myosin	NP_524586	1	6	TFDNDGLIDGDKFR
Tropomyosin	A28449	1	6	IQLLEEDLERSEER
Troponin T	S02708 S13251 NP_727718 NP_525088 NP_727719 AAR24583 AAR24584 AAR24585 AAR24586 AAR24587	1	n.e.	IKPLAIEGFGEAK
Aktin	ATFF8 A03000 A28258	11	n.e.	DSYVGDEAQSQR ASGVKVIIGLSGTPFSP GYSFTTTAER VAPEEHPVLLTEAPLN AVFPSIVGRPR DERGGDAEK DLTDYLMK EITALAPSTMK SYELPDGQVITIGNER KDLYANTVLSGGTTMY TTGIVLDSGDGVSHTV
Calmodulin	NP_523710	1	11	VFDKDGNGFISAAELR
Crumbs (1 Peptid)	AAA28428	1	n.e.	LEMDNVLKPPEER
Crb-intra 500 µl				
RafbP (Lipophorin)	T13812 AAM17994 AAM18001 NP_524634	21	n.e.	NIDFSLK ISLDHQTFLIK GLVKNKDFDEIVK FDGALIHLIAPVK IVVNAAEGVTHEFK IPADGSLFGR TILSDLVDSTG LNGNLVEYPQH EQINSGLVSGK YFSNNEVSYK AIGEIVKPIND IVNHLEIENVQ ELYIAVGNLVAK QSDSETLLELA AFQLALDYPPFR NVQDLNLDVSLK TKEFSANSNLVYTA FN SSVDKETLNQAASQLLF AGSLVENVEIQYK VQILDKNPIEITSEVC SQNGFNIAIITTVK
Hsc70-3	P29844 NP_727563	6	n.e.	NQLTTNPENTVFDAK ITPSYVAFTAD LYQGAGGAPPP

				NELESYAYSLK VTHAVVTVPAYFNDAC AKFEELNLDLFR
Crumbs Peptide)	(3 AAA28428			LEMDNVLKPPPEER
FYB-120/130	XP_161350	1	2	ATGAQTLPPQSHSMAQR
Myelin oligodentocyte Glyco-protein	NP_996532.2	1	3	MEVGWYR
Beta-1-Tubulin	NP_523795 NP_725896 AAA28989	1	2	INVYYNEASGG
RE54950p	AAL49096	1	4	QGGTSSLNVFGSAKF
Crb-intra 900 µl				
Hsc70-3	JN0666	3	5	AKFEELNLDLFR ITPSYVAFTADGER NQLTTNPENTVFDK
Myosin light chain	NP_511049	2	15	SGDTADDFIEGLR FTDEDVDEMYR
Myosin heavy chain	AAA28713	3	2	GVADFAIVHYAGR ALESQLAELK ELDEAFDKIEDLENK
Troponin T	S02708	2	5	LFEGGWDEISK IKPLAIEGFGEAK
RE54950p	AAL49096.1	1	5	QGGTSSLNVFGSAKR
Calmodulin	CAB51566	1	13	LTDEEVDEMIR
Beta-1-Tubulin	NP_52379	1	3	AVLVDLEPGTMDSVR
Tropomyosin	A28449 C25242 AAA28971 AAL48709	8	n.e.	IQLLEEDLER IVELEEEELR MDALENQLK EVDRLIEDDLLNVR EVDRLIEDDLVLEK LLEATQSADENNR MDQLTNQLK LLTATESEVATQNR
Rafbp (Lipophorin)	T13812 AAM17994	15	n.e.	SSTSLSEVQAGNGNVAER NP I E I T S E V Q P N S A K SVDKETLNQAASQLLPNAPK AFQLALDYPPFR QSDSETLLELAAPHPNK LIEVGNNGVAAGGR ELYIAVGNLVAK AIGEIVKPINDAAQEVK YSFNNEVSYK TILSDLVDSTGDYVK ILDIYNSLK IPADGSLFGR FDGALIHLIAPVK ISLDHQTFLIK SEISYQIK
Aktin	ATFF7 ATFF8 A03000 A28258 S14851 AAL90273	20	n.e.	SYELPDGQVITIGNER VAPEEHPVLLTEAPLNPK DLTDYLMK AGFAGDDVPK GYSFTTTAER SYELPDGQVITIGNER

				QEYDESGPSIVHR VAPEEHPVLLTEAPLNPK DLTDYLMK AGFAGDDVPK SYELPDGQVITIGNER QEYDESGPSIVHR VAPEEHPVLLTEAPLNPK AGFAGDDVPK QEYDESGPSIVHR AGFAGDDVPK QEYDESGPSIVHR EITALAPSTMK YPIEHGIITNWDDMEK
Crumbs	AAA28428	3	17	EAYFNISR GTYSPPSAQEYCNPR LKPPPEER
Crb-intra- ΔERLI 900μl				
Beta-Tubulin	NP_725897 NP_725896 NP_523795	1	2	SGPFGKLFRRPD
Calmodulin	NP_523710 CAB51566	1 1	7 14	EAFSLFDKGD LTDEEVDEMIR
Myosin light chain, zytoplasmatisch	NP_511049	1	7	SGDTADDFIE
Spaghetti squash	NP_511057	3	18	LQGTDPEDVIK EAFNMIDQNR FTDEDVDEMYR
Myosin heavy chain (Muskel)	A35815	1	1	LTQEAVADLER
Non muscle Myosin heavy chain; Zipper	AAA28713 AAB09051 AAB09048 AAB09049 AAB09050 S61477 NP_523860 NP_726506 Q99323	13	7	GVADFAIVHYA AGVLAHLEER ALESQLAELK AKGTLEAENAD ELDEAFDKIED DLETELDEER IDAPLVLDQLR LVWVPHENQGF SLEETVNHEG VQVDEMQAQLA AAETERDELAE NNDQATLPDNT NQFNDPATQA
Troponin T	S02708	4	10	IKPLAIEGFGE LETEKYDLEER GLPDEALTGKY EYITEWR
Tropomyosin	A25242 A28449 B25242 C25242	3	10	ALQNAESEVA IVELEELR IQLLEEDLER
Aktin	ATFF7 ATFF8 A03000 A28258	12	n.e.	HQGVVMGMGQK DSYVGDEAQSK AGFAGDDAPR VAPEEHPVLLT DLTDYLMK QEYDESGPSIV FPSIVGRPR EITALAPSTIK

				SYELPDGQVIT YPIEHGIITNW GDGVSHTVPIY TTGIVLDSGD
--	--	--	--	---

Tabelle VII.2. Massenspektrometrische Daten zu Tab.III.5 FLAG-Crb-intra (100µl)

Protein	Acc.-Nr.	# der Peptide	%identifiziert	sequenzierte Peptide
Aktin-5C	P10987	13	44	LDLAGR GILTLK IIAPPER AGFAGDDAPR DLTDYLMK GYSFTTTAER DSYVGDEAQSK AVFPSIVGRPR QEYDESGPSIVHR SYELPDGQVITIGNER VAPEEHPVLLTEAPLNPK DLYANTVLSGGTTMYPGIADR TTGIVLDSGDGVSHTVPIYEGYALPHAILR
Aktin 57B	P53501	16	46	LDLAGR GILTLK IIAPPER AGFAGDDAPR DLTDYLMK GYSFTTTAER EITSLAPSTIK DSYVGDEAQSK EEYDESGPGIVHR AVFPSIVGRPR QEYDESGPSIVHR SYELPDGQVITIGNER VAPEEHPVLLTEAPLNPK YPIEHGIITNWDDMEK DLYANTVLSGGTTMYPGIADR TTGIVLDSGDGVSHTVPIYEGYALPHAILR
Aktin 87E	P10981	13	43	LDLAGR GILTLK IIAPPER AGFAGDDAPR DLTDYLMK GYSFTTTAER DSYVGDEAQSK AVFPSIVGRPR QEYDESGPSIVHR SYELPDGQVITIGNER VAPEEHPVLLTEAPLNPK YPIEHGIITNWDDMEK TTGIVLDSGDGVSHTVPIYEGYALPHAILR
Hsc70-3	P29844	7	14	LTPEIDIR VEIIANDQGNR DLEAIVQPVIK VFAPPEISAMVLGK NSKPHISVDTSQGAK NQLTTNPENTVFDK VTHAVVTVPAYFNDAQR
Tropomyosin 2	P09491	6	15	SLEVSEEK VQQIEEDLEK LLEATQSADENNR

				LLTATESEVATQNR MLAEDADTKSDEVSR IMELEELKVVGNLSLK
Tropomyosin 1	P06754	3	10	SLEVSEEK IVELEELR LSEASQAADSESR
Hsc70-2	P11146	2	2	LIGDPAK VEIIANDQGNR
Ovarian tumor locus Protein	P10383	1	0	FNVEFDDK
Vitellogenin 1	P02843	1	3	TQSGDIIVIDLGSK
Guanin-nukleotid-Bindeprotein	P20354	2	2	DIIQR YFLDR
Arp 2	P45888	1	1	LDIAGR
Beta-1-Tubulin	Q24560	1	3	ALTVPELTQQMFDK
Alien	Q94899	2	2	LYFDR AALASFQK
Geschmacksrezeptor 58B	Q9W2B1	2	2	LAR QLSDLPK
Tudor Protein	P25823	4	1	QAIK LVQAELK LLDAEQDLPAFSDLK ITDQFEMLAESNIR
Inositol 1,4,5 Triphosphat-rezeptor	P29993	2	0	LAR DHMTEQR
GSA Dehydrogenase	P54903	2	2	LALNGK RPNGLR
KBF1	Q94527	3	2	QTHLK FIYDR LAIQTIQVMNYFNLK
Vermilion Protein	P20351	3	6	EVYR LGVLTEQR EAIPPLDETIR
ATRX	Q9GQN5	1	0	EYMNR
Calphotin	Q02910	1	0	ITPLLR
Otefin	P20240	1	1	VVEPLR
HDH	P62460	1	1	IVGPGNR
Cyp6d2	Q9W223	1	1	HCIALR
Cyp6t3	Q9V676	2	3	WTGVLKPK MVCLEALR
RafbP (Lipophorin)	T13812	22	8	MYGVK LVATVDGK VVGNSLR AQLTGSITK VGNANIITK LQKPDDVAR MDASLGYGAEK AKQELSSFEEK YSFNNEVSYK FSAIVDVTGTER HAQDYSLEASAK LIEVGNGVAAGGR NVQDLNLDVSLK EGSYFEVADNLALK TILSDLVDSTGDYVK MLNQITSSSLADTLFK YQFTANVQPTSSTIK QTYVLNAQYGAQYVK SSTSLSEVQAGNGNVAER

				VDIAYVIDSSVDSVK + P AIGEIVKPINDAAQEVK VQILDKNPIEITSEVQPNSAK
Aktin 8	ATFF8	13	37	LDLAGR GILTTLK IIAPPER RGILTTLK AGFAGDDAPR DLTDYLMK DSYVGDEAQS AVFPSIVGRPR DSYVGDEAQS QEYDESGPSIVHR SYELPDGQVITIGNER VAPEEHPVLLTEAPLNPK YPIEHGIITNWDDMEK
CG10837	AAL49096	6	18	TIEFEK TLPLPDVK ELEIEQR IELSNENDQQSR SLPDRDDVNTPQSWR QGGTSSLNVFGSAKPVDTAAR
Crumbs (1 Peptid)	AAM49878	1		LEMNDVNLKPPPEER
NK7.1	gi 24646820	2	2	LDIKR QMQPEKR
Pk92B	gi 27374347	3	1	LAR QILEGLK VVPTLQSRK + Phospho (ST)
Tiggrin	T13169	2	0	LAR EQLLEQR
Pipsqueak	CAA62475	3	4	IAR MGIETPK SWNEDALQNALEALR + P
Narrow abdomen	NP_727772	5	2	LAR ANSGR + P GWLDVR GTALLTVDQRR EQSAEIKETLPFR
Beta'-COP	CAA07085	3	2	LAR LDIKR CPFATK + P

Tabelle VII.3. Massenspektrometrische Daten zu Tab.III.5 FLAG-Crb-intra (50 µl)

Protein	Acc.- Nr.	# der Peptide	% identifiziert	sequenzierte Peptide
Aktin-5C	P10987	16	55	GILTTLK IIAPPER RGILTTLK AGFAGDDAPR DLTDYLMK GYSFTTTAER EITALAPSTMK HQGVMVGMGQK GYSFTTTAER + P QEYDESGPSIVHR IWHHTFYNELR SYELPDGQVITIGNER VAPEEHPVLLTEAPLNPK

				DLYANTVLSGGTTMYPGIADR AVFPSIVGRPRHQVMVGMGQK DLYANTVLSGGTTMYPGIADR + P YSVWIGGSILASLSTFQQMWISK TTGIVLDSGDGVSHTVPIYEGYALPHAILR
Aktin 57B	P53501	18	59	GILTLK IIAPPER RGILTLK AGFAGDDAPR DLTDYLMK GYSFTTTAER EITSLAPSTIK HQGVMVGMGQK EEYDESGPGIVHR IWHHTFYNELR SYELPDGQVITIGNER VAPEEHPVLLTEAPLNPK YPIEHGIITNWDDMEK DLYANIVMSGGTTMYPGIADR AVFPSIVGRPRHQVMVGMGQK KDLYANIVMSGGTTMYPGIADR DLYANIVMSGGTTMYPGIADR + P YSVWIGGSILASLSTFQQMWISK TTGIVLDSGDGVSHTVPIYEGYALPHAILR
Aktin-87E	P10981	18	59	GILTLK IIAPPER RGILTLK AGFAGDDAPR DLTDYLMK GYSFTTTAER EITALSLAPSTIK HQGVMVGMGQK GYSFTTTAER + P QEYDESGPGIVHR IWHHTFYNELR SYELPDGQVITIGNER VAPEEHPVLLTEAPLNPK YPIEHGIITNWDDMEK DLYANIVMSGGTTMYPGIADR AVFPSIVGRPRHQVMVGMGQK KDLYANIVMSGGTTMYPGIADR DLYANIVMSGGTTMYPGIADR + P YSVWIGGSILASLSTFQQMWISK TTGIVLDSGDGVSHTVPIYEGYALPHAILR
Aktin 88F	P83967	15	51	GILTLK IIAPPER RGILTLK AGFAGDDAPR DLTDYLMK GYSFTTTAER EITALAPSTIK GYSFTTTAER + P QEYDESGPGIVHR IWHHTFYNELR SYELPDGQVITIGNER VAPEEHPVLLTEAPLNPK YPIEHGIITNWDDMEK AVFPSIVGRPRHQVMVGMGQK DLYANSVLSGGTTMYPGIADR + P YSVWIGGSILASLSTFQQMWISK
Aktin-like Protein 53D	P45891	3	4	GILTLK RGILTLK GVTMG TSAER + P
Myosin (schwere Kette) muskelspez.	P05661	29	20	LTNTHLGK ELSSITAK + P AQLELSQVR VISQQSLER LDEAEANALK

				EGYLLGEIK + P STQPHFVR + P LTQEAVADLER DIQTALEEEQR ELENELDGEQR AQQELEEEAER IKVGNFVVTQGR KGGGFATVSSAYK + P ISLTTQLEDTKR LAGADIETYLLEK IEEEEEEVEAER ELSFQSEEDRK + P LAEAEETIESLNQK QLEEAESQVSQLSK LEEAGGATSAQIELNK QIEEAEIEAALNLAK AKLEQTLDELEDSLER QLEEAESQVSQLSKIK + P KLEADINELEIALDHANK DICLLTDNIYDYHIVSQGK + P GSLEDQVVQTNPVLEAFGNAK + P AQQELEEEAERADLAEQAIK KLESELQTLHSDLDELLEAK FEKIEDMADMTVLNTPCVLHNLK
Tropomyosin 1	P49455	10	38	MDALENQLK LEDDLVLEK IVELEEEELR IQLLEEDLER KLAMVEADLER LSEASQAADSEER ALQNAESEVAALNR EVDRLEDDLVLEK IQTVENELDQTQEALTLVTGK KIQTVENELDQTQEALTLVTGK
Hsc70-3	P29844	17	35	NTVIPTKK + P ETAEAYLGK + P FDLTGIPPAPR VEIANDQGNR DAGVIAGLQVMR DLEAIVQPVIK FEELNLDLFR DVHEIVLVGGSTR EWSDTNVQHDIK VFAPEEISAMVLGK ITPSYVAFTADGER IINEPTAAAIAYGLDK NQLTTNPENTVFDK IINEPTAAAIAYGLDKK VTHAVVTVPAYFNDAQR IEIESFFEGDDFSETLTR ELGTVIGIDLGTTYSCVGVYK + P
Myosin (schwere Kette) nichtmuskelspez. (Zipper-Protein)	Q99323	27	19	ELEEGKK QKLQLEK LEVNMQALR ALESQLAELK KIETEVA DLK VMILRDDIQK RTGGIGLSSSR + P DLETELDEER IDAPLVLDQLR QAESQIAELQVK NLDETEEELQK EIETTMEMHNK

				IAKVEEQLENEGK RVQVDEMQAQLAK IAHLLGLSVTDMTR ANDLSQTLAEEEEK GTLEAENADLATELR NLDETEEELQKEK NNDQATLPDNTVAQK TFVDKLVSAHSMHPK + P SLEEEETVNHEGV LADMR AAETERDELAEEIANNANK DAEIVGMAQQALTDTQFGAR VKALEAEVLQLTEDLASSER + P IAHLLGLSVTDMTRAFLTPR + P DRYYSGLIYTYSGLFCVVVNPYK + P DLSEELEALKNELLDLDTTAAQQELR
Tropomyosin 2	P09491	6	24	MDQLTNQLK IMELEEEELK VQQIEEDLEK LLEATQSADENNR LLTATESEVATQNR LAFVEDELEVAEDR
Troponin T	P19351	9	28	QAMLQAMK GPNFTIARK GLDPEALTGK AQELWELIVK LFEGGWDEISK DAGVLGLSSAAMER AGEPETPEGEEDAK SDLDDQLKEYITEWR EETKPPQTPAEGEGDPEFIK
Beta-1-Tubulin	Q24560	8	23	ISEQFTAMFR INVYYNEASGGK IMNTYSVVPSPK EVDEQMLNIQNK AVLVDLEPGTMDSVR ALTVPELTQQMFDK NSSYFVEWIPNNVK MSATFIGNSTAIQELFK
Spaghetti squash	P40423	6	44	ELLTTMGDR LQGTDPEDVIK NGLFDYLEFTR FTDEDVDEMYR DGFVEKEDLHDM LASLGK ATSNVFAMFDQAQIAEFK
Hsc70-4	P11147	8	14	ETAAYLGGK + P FELSGIPPAPR VEIIANDQGNR TFFPEEISSMVLTK IINEPTAAAIAYGLDK NQVAMNPTQTIFDAK IINEPTAAAIAYGLDKK NGLESYCFNMKATLDEDNLK + P
Alpha-1-Tubulin	P06603	6	23	FDLMYAK AVFVDLEPTVVDEVR VGINYQPPTVVPGGDLAK AFVHWYVGEEMEEGEFSEAR FDGALNVDLTFEQTNLVPYPR TVGGGDDSFNTFFSETGAGKHVPR + P
Hsc68	O97125	7	19	ALKDAK ISVEFKGANK + P VEIIANDQGNR IINEPTAAALAYGLDK PAIGIDLGTYSVGVGFQYQK

				DAGAIAGINVLRIINEPTAAALAYGLDK GERNVLIFDLGGGTFDVSILTIDEGSLFEVR + P
HSP-70Aa	P82910	7	16	NSVLDK NQVAMNPR VVSDGGKPKIGVEYK + P VEIIANDQGNR IINEPTAAALAYGLDK QAVEQAPAGKLDEADK GERNVLIFDLGGGTFDVSILTIDEGSLFEVR + P
HSP-70Ba	Q8INI8	6	15	NSVLDK VEIIANDQGNR VVSDGGKPKIGVEYK + P IINEPTAAALAYGLDK TFSTYSDNQPGVSIQVYEGER + P GERNVLIFDLGGGTFDVSILTIDEGSLFEVR + P
Hsc70-1	P29843	4	11	VEIIANDQGNR IINEPTAAAIAYGLDK DAGAIAGLNVLRIINEPTAAAIAYGLDK SFYPEEVSSMVLTKMR + P
Calmodulin	P62152	3	26	LTDEEVDEMIR MKDTESEEEIR EAFSLFDKDGDTITTK
Pyk	O62619	4	12	NAAALTEIR TGLIGSGTAEIELK KGVNLPGVVVDLPAVSEK IENQQGMHNLDEIIEAGDGIMVAR
Myosin II, essentielle leichte Kette	P54357	2	17	ALGQNPTESDVKK SGDTADDFIEGLR
Myosin, leichte Kette alkali	P06742	2	16	ALNLTPTLALIEK LDEFLLPIYSQVK
Troponin C	P47949	3	23	TGSIPTMVDILR ILEELIEEVDEDK AFNSFDHQKTGSIPTMVDILR
Vitellogenin III	P06607	4	19	NFPVPANSLK + P SAKAASGDLIIIDLGSTLTNFK + P GVPQEIIHLIGQGISAHVAGAAGNK YAMLDVLTNTGAMIGQTLIDLTK
Jaguar (Myosin 95F)	Q01989	9	9	IIYRNK ANAPDNTKR IQEALAEAR LEDTQLVWVR SVLPPELVSLPAR LSQSIIIVSGESGAGK ILDANPVLEAFGNAK YLLKYLCSHDSAGPIETK + P EGLNVPEITFTDNQDIIEELIEAK
ATP Synthase, beta Kette	Q05825	9	24	KIQR SHAAKAAK GQKVLDTGYPIR FTQAGSEVSALLGR + P VALVYQMNEPPGAR LVLEVAQHLGENTVR FLSQPFQVAEVFTGHAGK ARVALTGLTVAEYFR + P SLQDIIAILGMDELSEEDKLTVAR
RPA1	P05389	4	53	LTKVIK ILSSVGVEVDAER RYVAAYLLAVLGKK + P LSSMPVGGGGAVAAADAAPAAAAGGDKK
RPA2	P08570	2	19	INTILK AANVEVEPYWPGLFAK

RL14	P55841	2	12	FPYTAPTR + P VLVDGPLTGVPR
Geschmacksrezeptor 39a	P58959	4	13	IYLR TAKMLTK EMENSTKSINK LLHIMGMMCWHFSDSDHCQLVATSGSER
RS8	Q8MLY8	1	7	LETGNFAWASEGVAR
Pol Polyprotein (Transposon 17.6)	P04323	6	7	INKINDR LENPFKPTK ELILTAHEK + P TSDDEETKLSK + P EIKAFGLGTGYR + P LNEITVGDRHIPNMDEILGK
ATP Synthase, alpha Kette	P35381	5	14	VGSAAQTKAMK + P HALIIYDDLK TGAIVDVVPVGDPELLGR ADLEETGRVLSIGDGIAR TSEQALLDTIAKDGAISEASDAK + P
FAT2	Q9VW71	23	7	DEDK TTER LAGLR VSDGGGK VSISVK QFYTVSVK + P QLDAEKK ILCRFISYK EETQDEELFR ASDGIFSAILIVK VSDGGGKFGFASLK + P SASPSVFSDDLSTPSR DVILITLQSDYQK + P SMPVFEEKQFYTVSVK + P TFSSVTPTSNIPLIYGIVR + P IDSISGNVIVTQRLDFEK + P MDSTTGDLVLNATLDYEMSK + P YTGIIITRNFEILNNENDR + P YDELNFSLVSGPDDMYQSSK + P CSNESCDMGLFTAVSFGGKSYAHYK + P IIESTPPGTVLTKLHMIGNYTFK + P QNEYVLNITVYDLGNPTKSTSK + P FDNTFYASVAENSEKVISLVK + P
Pol Polyprotein (Transposon 412)	P10394	14	24	ITIK EYVR NMSKYIK NMGNKILK KIFEHVSIDK + P LELQAGIYDISQIK CSFFMHEVTFLGHK ENSDKFSNIQITNK + P TPMTITETPEHAFAFDR + P NYRSPHSQVEEIQAVQK + P EAILSTLHDDPIQGGHTGITK + P GQTFIEIQTGKYVIPHDFHLVDK YTGPKIESIGDNNNITLLTNK + P AKYFSCLDLMSGFHQIELDEGSR + P
Vitellogenin I	P02843	5	18	KNQR SFPVAVPANSLQQYK NGNQDYQDQSNEQRK AYMGIDTAHDLEGDYILQVNP NTLTGLARGDAEFVDAIHTSVYGMGTPIR + P
Sec6	Q9V8K2	4	3	ITLK EKVQDAMK VEQYRHR

				QHASKITLKTEEEK
RM62	P19109	4	5	TEEEK KGSLSNR SNILVATDVAAR TLLSDIYDTSESPGK
Suppressor of hairy wing Protein	P08970	5	4	LDNLR VQSLKK + P ADMLKNLEK GGENYAELDYGSR + P ILNEEILGTPKTEK
Vermilion	P20351	3	8	EVYR LGVLTQR MIGSQQLGTGGSSGYQLR + P
Vitellogenin II	P02844	3	11	IEFNLNLTVEK LQEMSLEEGATLLDK LTGLARGDADFVDAIHTSAYGMGTSQR
Integrin, alpha PS2	P12080	8	6	IAHFK RSNDK GNNRNVDK WNMANIFNITGR + P YQQGVTEAGGVFK LISLDDRSCQLVR GVLVSNSTDAGDKLSPK + P DSDLVVACAPRYVFHTMTPSR + P
Laminin, gamma 1 Kette	P15215	4	2	HSPAR ANADLTAIK ANETKVAAR VGQAKADTQEAQK
Trifunktionales Purinbiosyntheseprotein	P16340	4	2	EAPKDIK EALTNGGR GTQRPVGLGGLGGFGGLFR IKPLSRGTQRPVGLGGLGGFGGLFR
Laminin, alpha Kette	Q00174	6	1	LDNLR KKPVTGLR QLGQEIENLK TEVPYFNGCLK TEVPYFNGCLKNIK DTYKPIRDDDICTTEYSK
Lava Lamp Protein	Q8MSS1	12	4	LAELQTVK NIEITELR ERSTLSR + P LEKDAEITALR NDEQMAQLQEK LNSELEAYR + P QKLAELQTVK + P LRNATIQSLQR + P DAEITALRQEILK QSCQGQQLSVDMSR + P VEQLQQQVSKLNEDLK LLSERTQQLADIQTANEER + P
FAT Protein	P33450	17	4	APLDR YSTSK + P EAAGLRK NLADGGWHK YELVVRATDR YHGKIESGCR + P NLNYERLSR + P SSSSSPSGEMQSR + P SSYLLNITARDR + P YSTSKSLLDGR + P SYATTYEQYAAFPR FFALAATDIDLGDNGR ANSHIEYDIIQGDR + P NTGIITFTPGPQFKQEV + P WFSMDPLTGLIVTTGPLDR + P

Anhang

				EYHCYIPENKPVGTFVFAQAHAADK + P ASVPPVSAYTHHKHQNSGSQQQQQHR + P
Breathless Protein	Q09147	2	1	ATLLR SNPTQLEVISRK
Dynein, zytosolische schwehre Kette	P37276	23	6	TLLK SIALLK SIAAYK EVTSGSR + P SDALKER + P EAYDINQK SVLISAGNVK + P AATSPALFNR + P IVAEDKAVETR INEWLSLVEK LRMYESYEYVK + P FQSISSEFLGLMCK + P VSEVRNYVDEWLR + P GAIREYQTQLIQR FHATVSFDTDTGLK + P LQAGIQAWTEALTGNKK QTEVLQQLTIHMANAR GTSESNLDAEFNFFLR + P EQVTYQISNDVHFTNSR + P QVRESWQNYELDLINYQNK IFVGLCQVGAWGCFDEFNRLEER QPYSLDAADANAIEEVNLAYENVK + P AHQANQIYPYAIISLIESVRTYER + P
DDX1	Q24731	3	7	LTLK MAER NLNMGTYEDHVEQLGPTVRK
Diaphanous Protein	P48608	3	3	IEFEAIRCLK FLEIIEDMNIPK FSEVMGKFAEECR
Kinesin like Protein NOD	P18105	5	8	LAGIR SNAANHNSIVVPK YSTTKPLSAVLHR + P SKYSTTKPLSAVLHR + P QASSQNSTLMGIVEETEPKESSK + P
Anon 60Da,	P91927	7	9	QLQR TLLETSSSK TSHLAQNVYK TSHLAQNVYK + P LLFIDVAICSKLLWR EELADYKEDVEELR + P HLHTRSRTLLETSSSK + P
PCNA, Cyclin	P17917	5	22	KILDAIK LAQTGSVDK EGVKFSASGDVGTANIK + P FSASGDVGTANIKLAQTGSVDK + P AQDNADTVTIMFESANQEKVSDYEMK + P
Nipped-B Protein	Q7PLI2	9	6	ADALLKDIDK HFYLAQWYR ISRYSPSEQK + P VNIIDSMIQSIK + P YVSDKGIEQSIR + P KIDSTDDETSDAEYA + P GIEQSIRLVSLDYLGIVAAR SQVIQGNNSVDNIYTPSFRR + P SSTYQTNQNVSTTTTSTSTSSSGKSQVR + P
Still life Protein, type 1	P91621	4	1	TDPR ADSLEQR + P DRDGYSDR + P AKATGTAASSFNCTGAVR
Suppressor of white apricot	P12297	7	7	THR SSRLSR

				LIGSTQK EPSSNPPRK + P HTHTATYPPMSCPVR YKPSANCAYTQLISK + P RTGQSGTGSTILGNNGNSPGALGAGK
Zinkfingerprotein 2	P28167	13	5	QNKR KVNLIK HDTMR LNSGVQMSTR + P DIEHPSQYHR + P MAAPSAYIPLSSPK DELTQNSNAIEK + P EQEPESDQHTSSSK + P DLASQATDFGAPESPK + P EKQYLEDHLTSVHSVTR + P SEPQDDMIGATDFAYQTK + P LQTATEGSDATLPSSQPVFR + P VSSTSSPPSTYASGEVLSPTDNISNHK + P
Trehalose	Q9W2M2	4	10	KVTEYETK SQPPLLTGMVK ELHYSELKAGAESGMDFSSR + P DYTPTNLSPLWVKAFNISESEK + P

Tabelle VII.4. Massenspektrometrische Daten zu Tab.III.5 FLAG-Crb-intra- Δ ERLI

Protein	Acc.- Nr.	# der Peptide	% iden- tifiziert	sequenzierte Peptide
Beta-1-Tubulin	Q24560	8	28	FPGQLNADLR LAVNMVFPFR INVYYNEASGGK IMNTYSVVPSPK EVDEQMLNIQNK AVLVDLEPGTMDSVR NSSYFVEWIPNNVK SGPFGQIFRPDNFVFGQSGAGNNWAK
Aktin-5C	P10987	9	31	IIAPPER AGFAGDDAPR GYSFTTTAER EITALAPSTMK HQGVMVGMGQK SYELPDGQVITIGNER GYSFTTTAEREIVR + P CDEEVAALVVDNNGSMCK VAPEEHPVLLTEAPLNPK
Aktin 57B	P53501	9	27	IIAPPER AGFAGDDAPR GYSFTTTAER EITSLAPSTIK HQGVMVGMGQK SYELPDGQVITIGNER GYSFTTTAEREIVR + P VAPEEHPVLLTEAPLNPK YPIEHGLIITNWDDMEK
Alpha-1-Tubulin	P06603	7	23	LSVDYGK DVNAAIATIK AVFVDLEPTVVDEVR NLDIERPTYTNLNR VGINYQPPTVVPGGDLAK TVGGGDDSFNTFFSETGAGK FDGALNVDLTEFQTNLVPYPR

Aktin 79B	P02574	9	27	IIAPPER AGFAGDDAPR GYSFTTTAER HQGVMVGMGQK EITALAPSTIK + P SYELPDGQVITIGNER GYSFTTTAEREIVR + P VAPEEHPVLLTEAPLNPK YPIEHGIITNWDDMEK
Vitellogenin II	P02844	7	24	GYIVGER IEFNLNLTVEK YFAESVRPGNER NFPSVAASSYQEYK + P LQEMSLEEGATLLDK GDADFVDIHTSAYGMGTSQR LANVDFFPNGPSTGVPGADNVVEATMR
Hsc70-4	P29844	8	13	ETA EAYLGK VEI IANDQGNR DLEAIVQPVIK FEELNLDLFR VFAPEEISAMVLGK IINEPTAAAIA YGLDK NQLTTNPENTVFDK IINEPTAAAIA YGLDKK + P
Vitellogenin I	P02843		439	YFAESVRPGNER TQSGDIIVIDLGSK SFPVAVPANSLOQYK NGNQDYQDQSNEQRK GDAEFVDIHTSVYGMGTPIR + P GDAEFVDIHTSVYGMGTPIR SGDVDFYPNGPAAGVPGASNVVEAMR
Hsc70-4	P11147	5	11	ETA EAYLGK VEI IANDQGNR IINEPTAAAIA YGLDK NQVAMNPTQTIFDK IINEPTAAAIA YGLDKK + P SINPDEAVAYGAAVQAAILHGDK
Tropomyosin 1	P06754	5	11	IQLLEEDLER LSEASQAADSEK ALQNAESEVAALNR IQTVENELDQTQEALTLVTGK + P KIQTVENELDQTQEALTLVTGK
RP21C	P08570	4	70	ALEGINVK AANVEVEPYWPLFAK AELACVYASLILVDDDDVAVTGEK + P DLITNIGSGVGAAPAGGAAPAAAAA PAAESK
Hsc70-1	P29843	5	15	VEI IANDQGNR IINEPTAAAIA YGLDK LPAVGIDLGTTYSCVGVFQHGK SINPDEAVAYGAAVQAAILHGDK ETA EAYLGGTVTDVVTVPAYFNDSQR + P
Hsc68	O97125	4	8	VEI IANDQGNR ETA EAYLGTTVK EQGTGNAKNITIK IINEPTAAALAYGLDK
RS3	Q06559	2	9	IYETPETEYK ELAEDGYSGVEVR
RLA0	P19889	3	13	VVELFDEFPK NLLAIAATTEVEFK FAAASASAA PAAAGGATEK
Pk	O62619	3	10	TGLIGSGTAEIELK GVNLPVVPVLDLPAVSEK

				IENQQGMHNLDEIIEAGDGIMVAR
RLA2	P05389	2	36	ILSSVGVVEVDAER LSSMPVGGGGAVAAADAAPAAAAGGDKK
RS3A	P55830	3	15	VFEVSLADLQK MTDIIITNEVSGADLKFVSKLLELHGDGGGK + P
Hsc26	P02517	3	12	EMANR VVDDSIILVEGK YVLPLGTQQR
Vitellogenin III	P06607	3	12	LENQPLEQGAK AASGDLIIIDLGSTLTNFKR + P HDLTPSFVSPSPSNVPVWIIK
Hsc27	P02518	2	12	APPPPSK GFDPNEVVSTVSSDGVLTLLK
Hsc83	O02192	5	9	ADNSEPLGRGTK EDQTDYLEESK RTPFDLFFENQK + P GVVDSIDLPLNISR TAGTLTIIDTGIGMTK GVVDSIDLPLNISRREMLQQNK + P
Ovarian tumor locus Protein	P10383	2	1	LECVR FNVEFDDK
Tropomyosin 2	P09491	3	12	VQQIEEDLEK SEERSTTAQQK + P LLTATESEVATQNR
Arsenite resistance Protein 2	Q9V9K7	7	9	DGQPR IALNLDEK NKYHPEDSVK VVETETIDLDK LRDCEMGAIVNR GPPPVVRVTNNDVQEYIK NSSDDSSSSSESSSSSDEEK + P
Surfeit locus Protein 6	Q9VDS6	2	3	SKDK QENLEKR
RL14	P55841	3	13	RQR VSPWSVK + P LVAIVDVIDQNR
ATRX	Q9GQN5	3	1	LVLPAR KALLQVDK NDIEVYDISR
C190	Q9VJE5	12	8	SPGIGGK QISDLK + P YGVFVPIAK LAEKSVEVLR RQLESLELEK SSSSALHTKLSK + P QLEAANGSLEEEAKK + P QANDAQKTAYLETK + P TENLELSTGTQTTIK + P LTRLTTYPLAGAQTPTSPLAK + P TGSRESLTSIGTMNSIATTATSR + P LTTYPLAGAQTPTSPLAKSSPDR + P
Xmas-2 Protein	Q9U3V9	5	3	RQR ALKQYSR LQLEKER EITQQELCSLGAVK FVDGGYIRGFSQIGLSVMK
ADT	Q26365	1	4	DFAAGGISAAVSK
Chaperon Dnak	O05700	2	5	IINEPTAAALAYGLDK STNGDTFLGGEDFDMR + P
Speicheldrüsen spez. Peptid	P10333	4	12	ALQQR STKPCK + P

				SASLKNVAPK YLTLKELSQK
Mal1	O16098	3	6	ANQLGIK DSDGDGIGDLK + P DISWNDTVDQPACDAGLDNYK + P

Die vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den 30.03.2006

Susann Özüyaman

Danksagung

Diese Arbeit ist am Institut für Genetik der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf unter der Leitung von Prof. Dr. Elisabeth Knust angefertigt worden.

Ihr möchte ich für ich für die Unterstützung und die Überlassung des Themas danken, die immer offene Tür für Fragen, Diskussionen und Probleme, sowie die ansteckende Begeisterung und Motivierung zur Forschung.

Herrn Prof. Dr. Ernst danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens, die Betreuung meiner Arbeit während des gesamten Zeitraumes und dass ich zusammen mit Ö.Kempkens die ONPG-Tests bei ihm durchführen konnte.

Mein besonderer Dank gilt Dr.Nicola Wiethölter und und Dr. Sabine Metzger vom BMFZ der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, die unermüdlich versucht haben in zahlreichen Stunden Methoden zu optimieren, Peptide zu identifizieren und die phosphorylierte Aminosäure zu finden!

Unvergesslich wird mir vor allem die schöne Zeit im ‚Fliegenlädchen‘ zusammen mit Özlem, Isa, Wiebi, Nico und Kevin bleiben, aber auch mit den anderen Mitgliedern der AG Knust bleiben. André möchte ich für die Beantwortung vieler Fragen und für die stetige Hilfe danken.

Özlem, çok teşekkür ederim, für die gute Teamarbeit, die Einführung in die Geheimnisse der Hefen, die Mittagspausen auf der Terrasse und die vielen aufbauenden Stunden am Rhein.

Nannette, jetzt ist es doch vollbracht. Dankeschön für die schönen Zeiten zusammen und das Zuhören in allen Lebenslagen.

Mutti, Papa, Caro vielen Dank für Eure Liebe und immerwährende Unterstützung, die vieles leichter macht. Annem, babam ve yengem sizinle bir aile olduğuma mutluluk duyuyorum.

Burçin, danke, dass Du mich immer wieder motiviert und mir den Rücken gestärkt hast. Vielen Dank für die viele Liebe. Hayatim, seni çok seviyorum.