

Die Funktion des Gap junction Proteins Innexin 2  
im larvalen Proventrikulus  
von *Drosophila melanogaster*

Dissertation  
zur  
Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)  
der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der  
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität  
zu  
BONN

vorgelegt von  
JULIA MARTINI  
aus  
BONN

Bonn, im Juli 2007

Diese Arbeit entstand in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Michael Hoch am LIMES Institute, Program Unit Development & Genetics, Laboratory of Molecular Developmental Biology mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn  
[http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss\\_online](http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online) elektronisch publiziert.

Erscheinungsjahr 2007

Gutachter:

Prof. Dr. Michael Hoch  
Prof. Dr. Waldemar Kolanus  
PD Dr. Hella Lichtenberg-Fraté  
Prof. Dr. Stephan Baader

Tag der Promotion: 12.10.2007

Teilergebnisse dieser Arbeit wurden vorab veröffentlicht:

**Bauer, R., Martini, J., Lehmann, C., Hoch, M.** (2003) Cellular distribution of innexin 1 and 2 gap junctional channel proteins in epithelia of the *Drosophila* embryo. *Cell Commun Adhes* 10(4-6), 221-5

**Bauer, R., Lehmann, C., Martini, J., Eckardt, F., Hoch, M.** (2004) Gap junction channel protein innexin 2 is essential for epithelial morphogenesis in the *Drosophila* embryo. *Mol Biol Cell* 15(6), 2992-30

**Bauer, R., Loer, B., Ostrowski, K., Martini, J., Weimbs, A., Lechner, H., Hoch, M.** (2005) Intercellular communication: the *Drosophila* innexin multiprotein family of gap junction proteins. *Chem Biol* 12(5),515-26

# I Inhaltsverzeichnis

<b>I INHALTSVERZEICHNIS</b>	<b>I</b>
<b>II ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>IV</b>
<b>1 EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Aufbau von Epithelien</b>	<b>2</b>
1.1.1 Epithelien in <i>D. melanogaster</i>	2
1.1.2 Zelluläre Verbindungen in Epithelien	3
1.1.3 Ausbildung der Zellpolarität in Epithelien	6
<b>1.2 Gap junctions</b>	<b>8</b>
1.2.1 Connexine	9
1.2.2 Innexine	11
1.2.2.1 Expressionsmuster der Innexine	13
1.2.2.2 Phänotypen verschiedener Innexinmutanten in <i>D. melanogaster</i>	13
1.2.3 Biosynthese von Gap junction Kanälen	15
<b>1.3 Der Proventrikulus</b>	<b>16</b>
<b>1.4 Die Elektronenmikroskopie: Eine Methode zur Charakterisierung zellulärer Strukturen</b>	<b>18</b>
<b>1.5 Ziel der Arbeit</b>	<b>20</b>
<b>2 MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>21</b>
<b>2.1 Material</b>	<b>21</b>
2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	21
2.1.2 Geräte und Software	22
2.1.3 Lösungen und Puffer	22
2.1.4 Organismen	26
2.1.5 Antikörper	27
<b>2.2 Methoden</b>	<b>28</b>
2.2.1 Molekularbiologische Methoden	28
2.2.1.1 DNA-Gelelektrophorese	28
2.2.1.2 Herstellung kompetenter Zellen und Transformation	28
2.2.1.3 Präperative Plasmidisolierung	29
2.2.1.4 Transiente Transfektion von S2 Zellen	30
2.2.1.5 Herstellung von <i>in-situ</i> -Sonden durch <i>in-vitro</i> -Transkription	30
2.2.1.6 Quantitative RT-PCR	31
2.2.2 Proteinbiochemische Methoden	33
2.2.2.1 Herstellung von Proteinextrakten	33
2.2.2.2 Immunpräzipitation	33
2.2.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen (SDS-PAGE)	34

2.2.2.4 Western-Blot-Analyse	34
2.2.3 Arbeiten mit der Fruchtfliege <i>D. melanogaster</i>	35
2.2.3.1 Haltung und Züchtung	35
2.2.3.2 Genotypisierung der P(x)16 Fliegen	35
2.2.3.3 Das UAS/GAL4-System	36
2.2.3.4 Herstellung transgener Fliegen	37
2.2.3.5 Farbkopplungs-Experiment	38
2.2.4 Histologische Methoden	38
2.2.4.1 Fixierung von <i>D. melanogaster</i> Embryonen	38
2.2.4.2 Präparation und Fixierung des larvalen Proventrikulus	39
2.2.4.3 Immunhistochemische Färbung	40
2.2.4.4 <i>In-situ</i> -Hybridisierung (ISH)	42
2.2.5 Elektronenmikroskopie	43
2.2.5.1 Fixierung und Einbettung für ultrastrukturelle Untersuchungen	43
2.2.5.2 Herstellung von Semidünnschnitten	45
2.2.5.3 Herstellung von Ultradünnschnitten für die elektronenmikroskopische Analyse	45
<b>3. ERGEBNISSE</b>	<b>47</b>
<b>3.1 Verteilung und Funktion von Innexin 2 in embryonalen Geweben</b>	<b>47</b>
3.1.1 Charakterisierung der Proteinexpression von Innexin 2 in embryonalen Geweben	47
3.1.2 Der embryonale <i>kropf</i> Phänotyp	49
3.1.2.1 Innexin 2 ist notwendig für die epitheliale Morphogenese.	49
3.1.2.2 Innexin 2 ist notwendig für die Ausbildung der Zonula adhaerens.	50
<b>3.2 Der Proventrikulus, ein System für die Analyse der Innexin 2 Funktion</b>	<b>52</b>
3.2.1 Charakterisierung der <i>kropf</i> Mutanten	53
3.2.2 Der Invaginationsdefekt des <i>kropf</i> Proventrikulus	53
<b>3.3 Umlagerungsprozess der Zellverbindungen in den Zellen der OLP während der Embryonalentwicklung</b>	<b>55</b>
<b>3.4 Analyse der Verteilung von Innexine 1, 2 und 3 im wildtypischen larvalen Proventrikulus</b>	<b>58</b>
3.4.1 Expressionsmuster der mRNA von <i>innexin 1, 2 und 3</i>	58
3.4.2 Die Charakterisierung der Proteinexpression von Innexin 1, 2 und 3	60
3.4.3 Innexin 1, 2 und 3 bilden möglicherweise heteromere Kanäle im Proventrikulus.	60
<b>3.5 Untersuchung der Gap junctions im larvalen <i>kropf</i> Proventrikulus</b>	<b>62</b>
3.5.1 Die Zell-Zell-Kommunikation in den Proventrikuluszellen von <i>kropf</i> Mutanten ist beeinträchtigt.	62
3.5.2 In <i>innexin 2</i> Mutanten sind <i>innexin 1</i> und <i>3</i> auf transkriptioneller Ebene herunterreguliert.	63
<b>3.6 Der larvale <i>kropf</i> Phänotyp auf zellulärer Ebene</b>	<b>66</b>
3.6.1 Ultrastrukturelle Untersuchungen des Proventrikulus von Wildtyp und <i>kropf</i> Mutante	66
3.6.1.1 Der wildtypische Proventrikulus	66
3.6.1.2 Der <i>kropf</i> Proventrikulus	67

3.6.2 In der <i>kropf</i> Mutante findet der Umlagerungsprozess der Zellverbindungen während der Embryogenese statt.	69
3.6.3 In der <i>kropf</i> Mutante gibt es keine eindeutigen Hinweise auf eine veränderte Endozytose.	70
<b>3.7 Untersuchung des subapikalen Komplexes in der <i>kropf</i> Mutante</b>	<b>72</b>
3.7.1 Die Lokalisation von <i>DPatj</i> ist in der <i>kropf</i> Mutante nicht verändert.	73
3.7.2 <i>Bazooka</i> und <i>DaPKC</i> sind im Proventrikulus der <i>kropf</i> Mutante misslokalisiert.	74
<b>3.8 Untersuchung von einzelnen Komponenten des Zytoskeletts in der <i>kropf</i> Mutante.</b>	<b>76</b>
3.8.1 <i>Innexin 2</i> begrenzt die Rekrutierung von F-actin an den lateralen Kortex	76
3.8.2 In <i>kropf</i> Mutanten sind Struktur und Polarität der Mikrotubuli verändert.	77
<b>3.9 <i>Innexin 2</i> beeinflusst direkt die Lokalisation von <i>Bazooka</i>.</b>	<b>80</b>
3.9.1 <i>Innexin 2</i> interagiert direkt oder indirekt mit <i>Bazooka</i> .	80
3.9.2 Die <i>Bazooka</i> Lokalisation ist von dem C-Terminus des <i>Innexin 2</i> abhängig.	82
<b>4 DISKUSSION</b>	<b>87</b>
<b>4.1 Der Proventrikulus, ein Organ zwischen Vorder- und Mitteldarm</b>	<b>87</b>
<b>4.2 Die Verteilung von <i>Innexin 1, 2</i> und <i>3</i> in epithelialen Zellen</b>	<b>88</b>
<b>4.3 <i>Innexin 1, 2</i> und <i>3</i> bilden heteromere Kanäle in den Zellen des Proventrikulus.</b>	<b>90</b>
<b>4.4 Transkriptionelle Kreuz-Regulation von <i>innexinen</i> im larvalen Proventrikulus</b>	<b>91</b>
<b>4.5 Gap junctions interagieren mit anderen Zellverbindungen:</b>	<b>93</b>
4.5.1 <i>Innexin 2</i> ist für die Ausbildung der Zonula adhaerens in ektodermalen Geweben notwendig.	93
4.5.2 Zellkontaktdefekte im Bereich der Septate junctions	95
<b>4.6 Gap junctions sind an der Etablierung der Zellpolarität beteiligt.</b>	<b>96</b>
4.6.1 Die Morphologie des apikalen Bereiches ist in <i>kropf</i> Proventrikuli missgebildet.	96
4.6.2 In <i>kropf</i> Proventrikuli ist spezifisch der <i>Bazooka</i> Komplex misslokalisiert.	97
<b>4.7 Die Lokalisation von <i>Bazooka</i> ist direkt von <i>Innexin 2</i> abhängig.</b>	<b>99</b>
<b>5 ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>102</b>
<b>6 LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>103</b>
<b>A ANHANG</b>	<b>112</b>
<b>A.1 Embryonalentwicklung von <i>Drosophila melanogaster</i></b>	<b>112</b>

## II Abkürzungsverzeichnis

$\lambda$	Wellenlänge
$\mu\text{g}$	Mikrogramm
$\mu\text{l}$	Mikroliter
$\mu\text{m}$	Mikrometer
$\mu\text{M}$	Mikromolar
Abb.	Abbildung
A.bidest	zweifach destilliertes Wasser
abs.	absolut
Amp	Ampicillin
As	Aminosäure
BCIP	5-Brom-4-chloro-3-indolylphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserum Albumin
C	Celsius
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMFA	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure
EM	Elektronenmikroskop
EtOH	Ethanol
g	Gramm
h	Stunde
IHC	Immunhistochemie
ISH	<i>in-situ</i> Hybridisation
kb	Kilobasen
Konz.	Konzentration
l	Liter
M	molar (mol/l)
mg	Milligramm
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	Boten-RNA
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
RNA	Ribonukleinsäure
Rnase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
U/ min	Umdrehungen pro Minute
v/v	Volumen / Volumen
Vol.	Volumen
w/v	Gewicht / Volumen
WT	Wildtyp

# 1 Einleitung

Der Fokus der modernen Entwicklungsbiologie liegt auf der Untersuchung der Mechanismen, welche die Entwicklung multizellulärer Organismen steuern.

Diese Fragestellungen werden an verschiedenen Modellorganismen untersucht. Untersuchungen an Wirbeltieren werden dafür bei *Mus musculus* (Maus), *Gallus gallus* (Haushuhn), *Xenopus laevis* (glatter Krallenfrosch) und *Brachydanio rerio* (Zebrafisch) durchgeführt, bei den Wirbellosen steht *Caenorhabditis elegans* (Fadenwurm) und *Drosophila melanogaster* (Fruchtfliege) im Zentrum des Interesses. Auch wenn zum Teil deutliche Unterschiede in der Architektur der Zellen zwischen diesen verschiedenen Arten zu erkennen sind und es teilweise nicht möglich ist, Homologien zu zeigen, führen die Untersuchungen an verschiedenen Organismen zum besseren Verständnis allgemeingültiger Entwicklungsprozesse.

Bei diesen Entwicklungsprozessen geht es um Fragen der Zelldeterminierung, Zelldifferenzierung sowie Gewebe- und Organbildung. Grundlage dieser entwicklungsbiologischen Prozesse ist die einzelne Zelle. Eine Voraussetzung für Zelldiversität und Gestaltbildung der Organe ist die Fähigkeit der Zellen in Kontakt mit den Nachbarzellen zu treten. Wenn dieser Kontakt nicht besteht, kommt es zu schweren Defekten in der Embryogenese bis zur Letalität. Beim Menschen sind einige Krankheiten und Entwicklungsdefekte auf diese gestörten Zellkontakte zurückzuführen (Willecke *et al.*, 2002).

Die Untersuchungen dieser Arbeit wurden an *D. melanogaster* durchgeführt. Die Entwicklung von *D. melanogaster*, insbesondere die Entwicklung der Epithelien ist gut beschrieben. Als weiteres existieren im Modellsystem *D. melanogaster* eine Vielzahl von genetischen Möglichkeiten. Somit stellt *D. melanogaster* ein gutes Modellsystem dar, um Aspekte des Zellkontaktes in verschiedenen Geweben zu untersuchen.

### 1.1 Aufbau von Epithelien

In multizellulären Organismen sind die meisten Zellen in Geweben organisiert. In epithelialen Geweben, welche auch als Abschlussgewebe bezeichnet werden, sind die Zellen fest miteinander verbunden. Durch ihren intrazellulären Aufbau, zu dem ein gut ausgebildetes Zytoskelett gehört, und ihre Zell-Zellverbindungen besitzen Epithelien eine hohe mechanische Festigkeit und stellen eine Permeabilitätsgrenze für Flüssigkeiten dar.

Ein wichtiger Aspekt in allen Epithelien ist die Ausprägung einer Polarität. Diese Zellpolarität ist eine Asymmetrie in der Zellform und Zellstruktur, welche nicht nur für die Zellfunktion sondern auch für die Entwicklung und Erhaltung von Geweben notwendig ist. Der polare Aufbau einer Epithelzelle zeigt sich unter anderem in der Organisation des Zytoskeletts, der Verteilung und dem Transport von Membranproteinen und Membran-assoziierten Komponenten. Die verschiedenen Membrandomänen unterscheiden sich dabei aber nicht nur in Protein- und Lipidzusammensetzung, sondern auch funktionell. Der apikale Bereich ist dabei stets der Außenwelt oder dem Lumen zugewandt, die basolaterale Domäne ist mit den benachbarten Zellen und dem Interzellularraum verbunden (Eaton und Simons, 1995; Ohno, 2001).

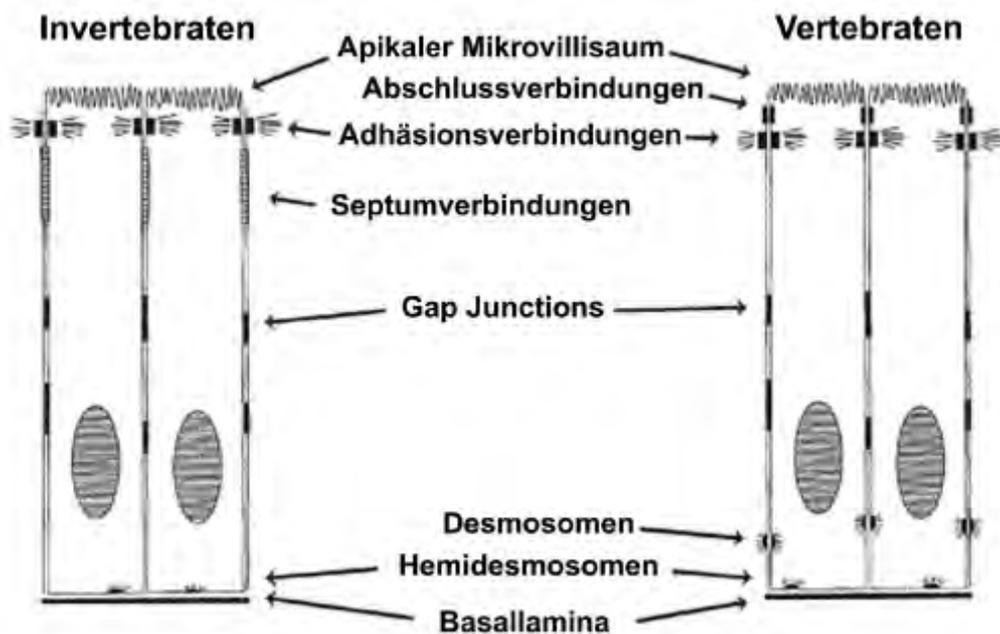
#### 1.1.1 Epithelien in *D. melanogaster*

In *D. melanogaster* lassen sich zwei Mechanismen der Entstehung epithelialer Gewebe unterscheiden: Zum einen die *de novo* Bildung des Blastodermepithels und ektodermaler Gewebe während der Zellularisierung. Epithelien ektodermalen Ursprungs sind die larvale und adulte Epidermis, Vorder- und Hinterdarm, Malpighische Gefäße, Tracheen und Speicheldrüsen. Zum anderen die mesenchymalepitheliale Umwandlung der anterioren und posterioren Mitteldarmanlagen, der Herz-Vorläufer-Zellen und der Gliazellen, die an der Bildung der Blut-Nerven-Schranke beteiligt sind. Sie unterscheiden sich von den primären Geweben nicht nur durch ihre Entstehung, sondern auch durch ihre Struktur und die Mechanismen, die die Zellpolarisierung steuern (Tepass, 1997; Müller, 2000; Tepass *et al.*, 1999; Tepass *et al.*, 2001).

### 1.1.2 Zelluläre Verbindungen in Epithelien

Epithelien besitzen entlang ihrer basolateralen Zelloberfläche verschiedene Zell-Zell-Kontaktstrukturen mit jeweils unterschiedlichen Funktionen. Bevor aber die Funktionen oder gar die Proteine identifiziert wurden, die an dem Aufbau der Strukturen beteiligt sind, wurden diese Strukturen morphologisch beschrieben. Nach dieser mikroskopischen Klassifizierung wurden dann die Proteine identifiziert, welche die einzelnen Strukturen bilden.

Die zellulären Verbindungen unterscheiden sich zwischen den Protostomia und Deuterostomia. In beiden Reichen können aber Zellverbindung in drei funktionelle Gruppen unterteilt werden: (1.) Abschlussverbindungen, die den interzellulären Raum gegen das Lumen oder die Außenwelt abdichten, (2.) Adhärenzverbindungen, welche die mechanische Verbindung der Zellen gewährleisten und (3.) Kommunikationsverbindungen, die den Austausch chemischer und elektrischer Signale zwischen Zellen erlauben.



**Abb. 1.1:** Schematische Abbildung der verschiedenen Zell-Zell Kontakte in Vertebraten und Invertebraten (nach Bryant *et al.*, 1997).

Die Abschlussverbindungen (engl.: Tight junctions (TJ)) auch Zonula<sup>1</sup> occludens<sup>2</sup> genannt, sind generell die Verbindungen, welche im apikalen Bereich der Vertebraten-Epithelzellen lokalisiert sind. Im Elektronenmikroskop erkennt man in diesen Bereich, dass die Membranen zweier Zellen punktuell sehr eng beieinander liegen. Als essentielle Proteine der Tight junctions wurden die Proteine Claudin-1 und Claudin-2 identifiziert (Tsukita und Furuse, 2002).

Bei Invertebraten wurden keine Tight junctions gefunden. Es konnte aber gezeigt werden, dass die Aufgabe der Barrierefunktion von den lateral lokalisierten Scheidewandverbindungen (engl.: Septate junctions) übernommen wird (Lane, 1994). Septate junctions sind durch einen konstanten interzellulären Spalt mit einer Weite von 15-20 nm, welcher in regelmäßigen Abständen von Querstreifen (lat.: Septa) durchzogen ist, charakterisiert. Diese Querstreifen geben den Septate junctions eine leiterähnliche Struktur (Furuse und Tsukita, 2006). Interessanterweise konnten in *D. melanogaster* zwei Claudin-ähnliche Proteine identifiziert werden, welche in den Septate junctions lokalisiert sind und auch eine ähnliche Funktion zeigen (Behr *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2004).

Die Adhärenzverbindung (engl.: Adherens junctions) vermitteln sowohl bei Vertebraten wie auch bei Invertebraten die Zelladhäsion. Im gesamten Tierreich gehören Proteine, welche in Adherens junctions den Kontakt zwischen den Zellen vermitteln, zu der Klasse der Cadherine.

Bei den Vertebraten sind die Adherens junctions, welche die Zelle gürtelartig umschließen basal zu den Tight junctions lokalisiert. In Invertebraten stellt sich die Situation etwas anders dar: In ektodermalen Geweben liegen nicht die Abschlussverbindung im apikalen Bereich der Zelle sondern die Adherens junctions (Abb. 1.1). In diesen Epithelien bilden sich die Adherens junctions zu einer kompakten Struktur aus, welche die Zelle ebenfalls gürtelartig umschließt. Diese so ausgebildete Struktur wird Zonula adhaerens genannt. In dieser Zonula adhaerens liegen die Zellmembranen nicht dicht aufeinander, sondern sind durch einen 20-25 nm breiten Interzellularspalt getrennt. Deutlich erkennbar ist die Zonula adhaerens im Elektronenmikroskop durch die filzartige Auflagerung auf der zytoplasmatischen Seite der Membranen, bei dem es sich um Bündel von Actinfilamenten handelt (Knust und Blossinger, 2002; Ude und Koch, 2002).

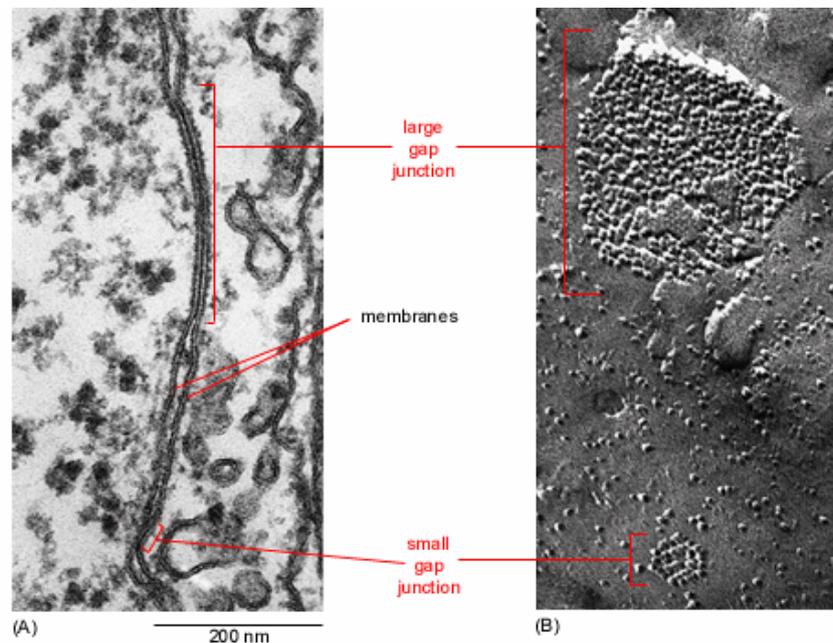
---

<sup>1</sup> zonula (gr.)= kleiner Gürtel

<sup>2</sup> occludere (lat.)= verschließen

In endodermalen Geweben von *D. melanogaster* fehlt die Zonula adhaerens. Hier sind die Adhäsionsverbindungen in einer fleckenartigen Struktur an der lateralen Seite der Zelle lokalisiert, die sogenannten *spot*<sup>3</sup>-Adherens junctions. In beiden Strukturen der Adhäsionsverbindungen sind aber die Transmembranproteine *DE-cadherin* und *Armadillo* lokalisiert (Bryant, 1997).

Ein weiterer, nur im Vertebratenfeld zu findender Kontaktbereich, ist die punktartige *Macula*<sup>4</sup> adhaerens, das Desmosom. Es ist auch ein Zellkontakt, der die mechanische Festigkeit einer Zelle unterstützt, da die Kontaktzone auf der zytoplasmatischen Seite mit den Intermediärfilamenten des Zytoskeletts verbunden ist. Die typische Plaquestruktur besteht aus dem Protein Desmoplakin.



**Abb. 1.2: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Gap junctions.**

In Abbildung (A) ist ein Dünnschnitt zu sehen und in (B) ein Gefrierbruch. Einzelne Gap junction-Kanäle können an der Membran zu verschieden großen Plaques zusammenkommen (Abb. aus Alberts *et al.* 2004).

An der lateralen Seite der Invertebraten und Vertebraten Zellen findet man die Kommunikationsverbindungen oder auch *Macula communicans*. Der englische Name *Gap junctions* (*gap* = Spalt Verbindung) geht auf das elektronenmikroskopische Erscheinungsbild

<sup>3</sup> spot (engl.) = Fleck, Tupfen

<sup>4</sup> macula (lat.) = Punkt

zurück und zeigt bei den Protostomia und Deuterostomia jeweils eine sehr ähnliche Struktur: Im Bereich der Kommunikationskanäle verringert sich der Abstand zwischen zwei benachbarte Zellen bis auf einen 2-3 nm breiten Spalt, in dem eine Querstrukturierung zu erkennen ist. Es ist mit verschiedenen Präparationsmethoden möglich, eine Aufsicht auf diese Struktur zu bekommen. Auf elektronenmikroskopischen Bildern erkennt man, dass es sich um einen Plaque mit vielen einzelnen Kanälen handelt. Bei einer höheren Auflösung konnte gezeigt werden, dass es sich bei diesen Kanälen um einen Einheit aus 6 radial angeordneten Transmembranproteinen handelt (Revel *et al.*, 1967; Peracchia, 1973). Trotz dieser morphologischen Ähnlichkeit der Gap junctions bei Protostomia und Deuterostomia erwiesen sich die jeweiligen Kanalproteine der beiden Tiergruppen als zueinander nicht homolog (Phelan und Starich, 2001).

### 1.1.3 Ausbildung der Zellpolarität in Epithelien

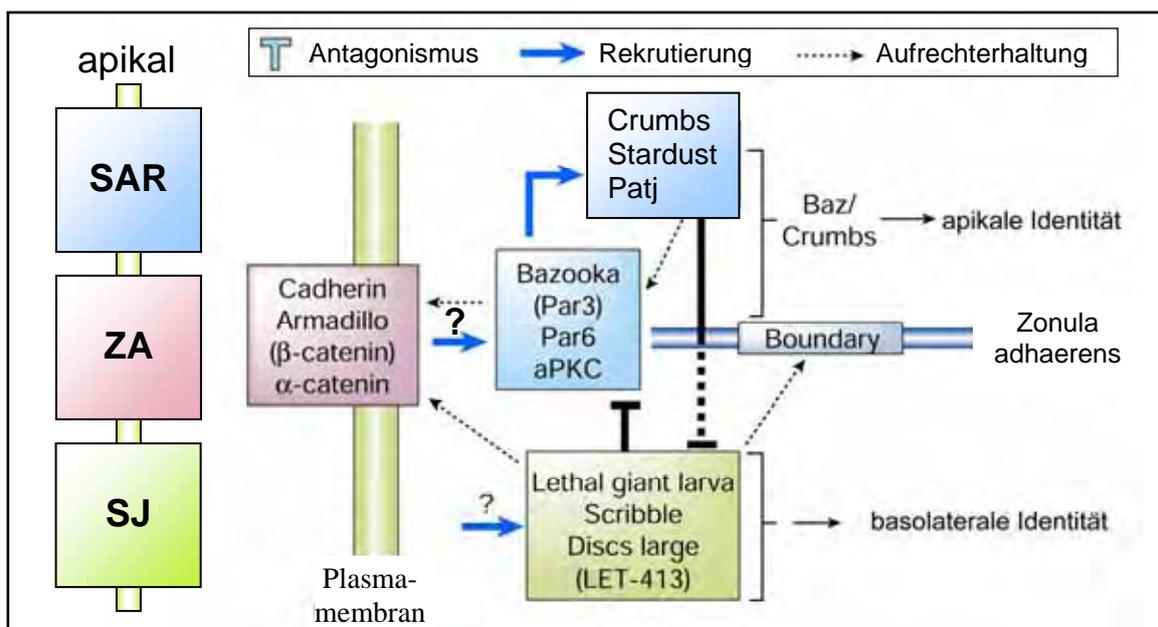
Die Untersuchung der epithelialen Differenzierung in *D. melanogaster* führte zur Charakterisierung von verschiedenen Proteinkomplexen, die an der Regulierung der Polarität und Ausbildung der Zell-Zell-Verbindungen beteiligt sind. Die Proteine Crumbs (Crb), Scribble (Scrib), Bazooka (Baz), Armadillo (Arm), Lethal giant larvae (Lgl) und Stardust (Sdt) zeigen eine asymmetrische Verteilung in den sich bildenden lateralen Membranen und liegen in Komplexen vor, die mit der Plasmamembran assoziiert sind (Tepass, 2001; Bilder *et al.*, 2003).

Die laterale Membran wird in drei distinkte Domänen unterteilt: Die apikale Membrandomäne, die sich in die apikale und subapikale Region gliedern lässt, die Region der Zonula adhaerens und die basolaterale Region, die basal der Zonula adhaerens liegt (Bachmann *et al.*, 2001).

In der subapikalen Region befinden sich zwei Proteinkomplexe: Der Crumbs-Komplex mit den Proteinen Crumbs, Stardust (Sdt) und *Drosophila* Pals-associated tight junction protein (DPatj) sowie der Bazooka-Komplex mit Bazooka, *Drosophila* atypische Proteinkinase C (DaPKc) und Par-6 (Bachmann *et al.*, 2001; Johnson und Wodarz, 2003; Pielage *et al.*, 2003). Ein weiterer Komplex, der auch für die Aufrechterhaltung der Polarität wichtig ist, wurde an der lateralen Membran, kolokalisiert mit den Septate junctions, identifiziert: Der Discs large-

Komplex mit Discs-large (Dlg), Scribble und Lethal giant larvae (Bilder *et al.*, 2000; Knust, 2002).

Es wurde gezeigt, dass alle diese Proteine wichtige Funktionen bei der Bildung und Aufrechterhaltung der Polarität haben, aber es ist immer noch nicht endgültig geklärt, wie diese interagieren. So zeigt die Abb. 1.3 ein vereinfachtes Schema, wie die oben genannten Komplexe die Identitäten der verschiedenen Membranbereiche bilden und die Zell-Zell-Adhäsion regulieren. Dabei wird den Adherens junctions eine Schlüsselrolle bei der Etablierung und Erhaltung epithelialer Strukturen zugeschrieben (Nelson, 2003). In einer Studie von Harris und Peifer (2004) konnte aber gezeigt werden, dass Bazooka die initiale Rolle in der Etablierung der apikalen Membrandomäne und dem Aufbau der Zonula adhaerens spielt.



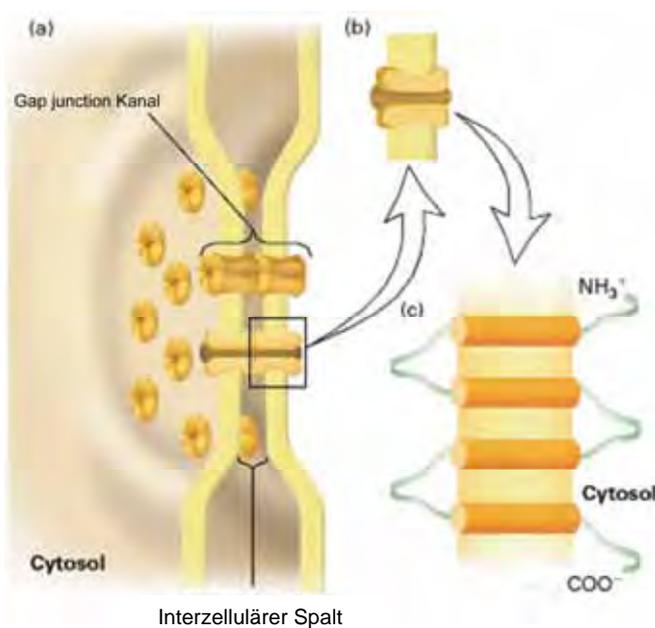
**Abb. 1.3: Die Mitglieder der Bazooka-, Crumbs- und Discs large-Komplexe regulieren zusammen die Etablierung der apikobasalen Polarität von Epithelzellen.** SAR (subapikale Region), ZA (Zonula adhaerens), SJ (Septate junctions) (modifiziert nach Nelson, 2003).

## 1.2 Gap junctions

Gap junctions sind wichtige Zellverbindungen, welche in nahezu allen Geweben vorkommen. Eine Ausnahme bildet die ausdifferenzierte Skelettmuskulatur. Zudem findet man nur in wenigen Zelltypen keine Gap junctions. Hierzu zählen die Erythrocyten und Spermien (Alberts *et al.*, 2004).

Gap junctions bilden Kanäle mit einem Durchmesser von ca. 1,5 nm, durch die Ionen und Moleküle bis zu einer Größe von 1000 Da frei diffundieren können. Dadurch sind die Zellen direkt metabolisch und elektrisch miteinander gekoppelt (Loewenstein, 1981).

Es konnte gezeigt werden, dass die Struktur der Gap junctions durch drei nicht verwandte Proteinfamilien gebildet wird. Bei den Deuterostomia wurden die Connexine und kürzlich die Pannexine gefunden, bei den Protostomia, d.h. auch bei *D. melanogaster*, die Innexine (Bauer *et al.*, 2005; Phelan, 2005). Doch obwohl bei diesen Proteinen kaum Ähnlichkeit in der Sequenz besteht, weisen sie eine hohe Ähnlichkeit in ihrer Struktur auf. Alle drei Genfamilien bilden Transmembranproteine. Sie bestehen aus vier  $\alpha$ -helikalen Transmembrandomänen, zwei dem Extrazellularraum zugewandten Schleifen, einer intrazellulären Schleife, sowie intrazellulären Amino- und Carboxytermini (Unger *et al.*, 1999).



**Abb. 1.4: Schematische Darstellung eines Gap junction Kanals.**

Gap junction Kanalproteine sind Transmembranproteine, mit jeweils vier Transmembrandomänen (c). Je ein aus sechs Proteinuntereinheiten aufgebauter Halbkanal befindet sich in der Plasmamembran einer Zelle (b). Durch die Aneinanderlagerung zweier Halbkanäle entsteht ein Gap junction Kanal (a). Die Plasmamembranen der Zellen sind durch einen interzellulären Spalt (engl. „gap“) voneinander getrennt (modifiziert nach Lodish *et al.*, 2000).

Für die Bildung eines Kanals lagern sich zunächst 6 Transmembranproteine zu einem Halbkanal zusammen. Dieser Halbkanal besteht somit bei den Deuterostomia aus 6 Connexinen und wird Connexon genannt. Bei den Protostomia besteht er aus 6 Innexinen und heißt Innexon. Für die Bildung eines funktionsfähigen Kanals lagern sich zwei Halbkanäle, jeweils von einer benachbarten Zelle, Kopf an Kopf über den extrazellulären Spalt hinweg zusammen (Abb. 1.4; Segretain und Falk, 2004; Martin und Evans, 2004).

Neben diesen interzellulären Kanälen aus zwei Halbkanälen gibt es auch Evidenzen für eine Funktion einzelner Halbkanäle: Sie stellen eine mögliche Kommunikationsverbindung zum Extrazellulärraum dar (Goodenough *et al.*, 2003).

### 1.2.1 Connexine

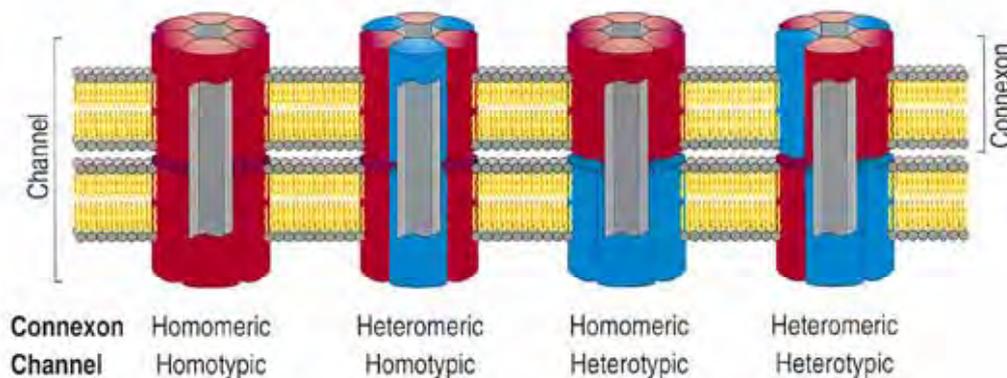
Vor ca. 20 Jahren wurden die Connexine als die molekularen Komponenten der Gap junctions bei den Vertebraten identifiziert. In der Zwischenzeit wurden im Mausgenom 20 und im Humangenom 21 verschiedene Connexingene charakterisiert. Die Mitglieder der Connexin-Proteinfamilie weisen große Ähnlichkeiten auf. Sie unterscheiden sich allerdings in ihrer Größe. Es gibt zur Zeit zwei verschiedene Nomenklaturen; in dieser Arbeit wird jene verwendet, bei der dem Kürzel Cx die Spezies, von der das Connexin abstammt, vorgestellt und das relative Gewicht in kDa nachgestellt wird (Söhl und Willecke, 2004).

Alle Connexine haben jeweils vier hydrophobe Transmembran-Domänen, zwei hoch konservierte extrazelluläre Schleifen und drei sehr variable zytoplasmatische Domänen. Die Amino- und Carboxyl-Termini sind intrazellulär lokalisiert. Die beiden extrazellulären Schleifen weisen bei allen Connexinen übereinstimmend drei typische Cysteinreste (C) auf. Auch der Abstand zwischen den drei Cysteinen ist konserviert: 1. Schleife (C X<sub>6</sub> C X<sub>3</sub> C) und 2. Schleife (C X<sub>4</sub> C X<sub>5</sub> C). Eine Ausnahme bildet hierbei Cx 31, bei dem die Abstände zwischen den Cysteinen in der 2. Schleife verändert sind (C X<sub>5</sub> C X<sub>5</sub> C).

Diese sechs Cysteine spielen eine entscheidende Rolle. So konnte gezeigt werden, dass schon bei einer Mutation eines der Cysteine zu Serin das Connexin seine Funktion verliert (Dahl *et al.*, 1992). Es wird vermutet, dass die Ausprägung von Disulfid-Brücken zwischen den Cysteinen die Schleife während des Anlagerungsprozesses zweier Connexone stabilisieren (Söhl und Willecke, 2004). Der Carboxyl-Terminus weist die größte Variabilität auf. Hier

unterscheiden sich die einzelnen Connexine in Bezug auf ihre Länge und Aminosäure-Zusammensetzung (Willecke *et al.*, 2002; Saez *et al.*, 2003).

Verschiedene Connexine werden in überlappenden Bereichen exprimiert, so dass in einer Zelle mehrere Connexintypen vorkommen können. Dieses ermöglicht *in vivo* die Bildung heteromerer Connexone. Verschiedene Experimente haben inzwischen gezeigt, dass sich unterschiedliche Connexine zu einem heteromeren Halbkanal zusammenlagern können. Connexone, welche nur von einem Connexintyp gebildet werden, werden als homomere Halbkanäle bezeichnet. Weiterhin unterscheidet man zwischen homotypischen und heterotypischen interzellulären Kanälen. Bei homotypischen Kanälen bestehen beide Halbkanäle aus identischen Connexinen, bei heterotypischen Kanälen sind beide Hälften unterschiedlich (Abb. 1.5). Dies ermöglicht eine hohe kombinatorische Komplexität. Diese ist deshalb so erwähnenswert, da Kanäle, die aus unterschiedlichen Connexinen gebildet werden, eine unterschiedliche Ionen- und Signalmolekülselektivität, bedingt durch eine unterschiedliche Permeabilität, aufweisen (Kumar und Gilula, 1996).



**Abb. 1.5: Schematische Darstellung der möglichen Kanaltypen**

Ist ein Halbkanal aus identischen Proteinuntereinheiten aufgebaut, bezeichnet man ihn als homomer. Kommen innerhalb eines Halbkanals verschiedene Proteinuntereinheiten vor, bezeichnet man ihn als heteromer. Besteht der sich bildende Gap junction-Kanal aus identischen Halbkanälen, ist er homotypisch, besteht er dagegen aus unterschiedlichen Halbkanälen, ist es ein heterotypischer Kanal (aus Kumar und Gilula, 1996).

Die Durchlässigkeit von Gap junction-Kanälen kann aber auch reguliert werden. Abhängig von pH-Wert,  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration oder Potentialdifferenz zwischen den Zytoplasmata zweier benachbarter Zellen, können die Kanäle durch eine Konformationsänderung geöffnet und geschlossen werden. Der Mechanismus wird mit dem Blendenmodell erklärt, indem durch

eine gleichgerichtete Drehung die Pore verengt wird (Unwin und Enis, 1983; Perkins *et al.*, 1998; Saez *et al.*, 2000). Des Weiteren konnte demonstriert werden, dass durch Phosphorylierung von verschiedenen Aminosäure-Reste im C-Terminus durch die Proteinkinase C (PKC) und die cAMP abhängige Proteinkinase (PKA) die Durchlässigkeit der Kanäle verringert werden kann (Lampe *et al.*, 2000; TenBroek *et al.*, 2001; Willecke, 2002). Der C-Terminus bietet aber noch eine weitere Möglichkeit zur Regulation der Kanaldurchlässigkeit: Durch die Interaktion mit der intrazellulären Schleife kann er, beschrieben als das „Ball an der Kette“ Modell, die Kanalpore verschließen (Delmar *et al.*, 2000).

### 1.2.2 Innexine

In Invertebraten wurde in elektronenmikroskopischen Untersuchungen die typische Struktur der Gap junctions gefunden (Tepass und Hartenstein, 1994). Mit der kompletten Sequenzierung der Genome von *D. melanogaster* (Adams *et al.*, 2000) und auch *C. elegans* ("*C. elegans Sequenzierung Consortium*", 1998) wurde aber deutlich, dass keine den Connexinen homologen Gene identifiziert werden können. Schon vor der Genomsequenzierung wurde aber durch konventionelle Mutantanalysen bei *D. melanogaster* und *C. elegans* eine Genfamilie identifiziert, welche eine Rolle bei der Gap junction-Kommunikation spielt. Aufgrund der zuerst identifizierten Gene wurde die Proteinfamilie OPUS (ogre, passover, uncoordinated, shaking-B) genannt (Barnes, 1994). Diese Namensgebung stellte sich aber als nicht eindeutig heraus und somit wurde diese Proteinfamilie in Innexine (Invertebraten Connexin Analog) umbenannt (Phelan *et al.*, 1998a).

Durch Sequenzanalysen wurden bei *D. melanogaster* 8 und bei *C. elegans* 25 *innexin*-Gene identifiziert. Die Benennung der Innexine erfolgte zuerst aufgrund ihres mutanten Phänotyps. Später wurden die Gene *innexine* genannt, wobei die Abkürzung für die Spezies vorgestellt wurde. Die Durchnummerierung erfolgte unabhängig von der Größe. Dabei ist jedoch zu beachten, dass die Nummerierung der Innexine bei den Organismen unabhängig voneinander durchgeführt wurde, so dass z.B. keine Orthologie zwischen *Ce-innexinx 3* aus dem Wurm und *Dm-innexin 3* aus der Fliege besteht (Phelan und Starich, 2001).

Es konnte gezeigt werden, dass vermutlich im ganzen Reich der Protostomia die Gap junction bildenden Proteine Innexine sind. So konnte neben *D. melanogaster* und *C. elegans* auch in der Molluske *Clione limacine*, dem Plattwurm *Giardia tigrina*, dem Polychäten *Chaetopterus*

*variopedatus*, dem Protochordaten *Ciona intestinalis*, dem Nesseltier *Hydra vulgaris* und dem Blutegel *Hirudo medicinalis innexin* Gene nachgewiesen werden (Bauer *et al.*, 2005).

Die Proteinsequenzen von Innexinen besitzen, wie schon erwähnt, keine Ähnlichkeit zu der von Connexinen. Dagegen ist die Struktur und die Funktion ähnlich der von Connexinen. So haben alle Innexine auch vier hydrophobe Transmembrandomänen, zwei extrazelluläre und eine intrazelluläre Schleife und intrazellulär liegende C- und N-Termini. Ein besonderes Charakteristikum der Connexine sind die drei konservierten Cystein-Reste in den extrazellulären Schleifen (siehe oben). Auffälligerweise findet man auch bei den Innexinen konservierte Cystein-Reste. Allerdings weist nur ein *D. melanogaster* Innexin, Innexin 4, jeweils drei Cysteine auf, die übrigen 7 *D. melanogaster* Innexine haben nur zwei konservierte Cysteine. Der Abstand zwischen diesen ist in der ersten Schleife C X<sub>13/14</sub> C und in der zweiten Schleife C X<sub>17</sub> C. Die Existenz dieser Cysteinreste lässt auf ein ähnliches Verhalten beim Aneinanderlagern zweier Halbkanäle schließen. So konnte in gepaarten *Xenopus* Oocyten gezeigt werden, dass Innexine wie Connexine auch homomerische und heteromerische Halbkanäle bilden können, die sich dann zu homo- und heterotypischen Kanälen zusammenlagern können (Phelan *et al.*, 1998b; Stebbings *et al.*, 2000; Lehmann *et al.*, 2006). Im Gegensatz zu den Connexinen konnte aber gezeigt werden, dass sich Innexine eher selten zu homomerischen homotypischen Kanälen zusammenlagern (Phelan und Starich, 2001).

Die Größe der *D. melanogaster* Innexine verhält sich aber vergleichbar zu der der Connexine. Das molekulare Gewicht variiert zwischen den einzelnen Innexinen von 42 kDa bis 55 kDa. Dies ist hauptsächlich auf die zytoplasmatischen Domänen zurückzuführen, welche die größte Variabilität aufweisen.

Gen	<i>innexin 1</i>	<i>innexin 2</i>	<i>innexin 3</i>	<i>innexin 4</i>	<i>innexin 5</i>	<i>innexin 6</i>	<i>innexin 7</i>	<i>innexin 8</i>
Protein	Innexin 1	Innexin 2	Innexin 3	Innexin 4	Innexin 5	Innexin 6	Innexin 7	Innexin 8
Chromosom	I	I	III	III	I	I	I	I
Mutante	<i>optic ganglion reduced (ogre)</i>	<i>kropf</i>		<i>zero population growth (zpg)</i>				<i>shak-B lethal</i>
molekulares Gewicht	42,58	42,48	45,35	42,78	48,97	55,66	50,66	44,35

**Tabelle 1:** Darstellung der *D. melanogaster* Innexin-Proteingrößen und die Auflistung der bekannten Mutanten.

### 1.2.2.1 Expressionsmuster der Innexine

Die Genexpression der Innexine zeigt während der Embryonalentwicklung und in verschiedenen Geweben der adulten Fruchtfliege ein komplexes, zum Teil überlappendes Muster. Während der Oogenese findet Expression von *innexin 1*, *innexin 2*, *innexin 3*, *innexin 4* und *innexin 7* in den Follikelzellen statt. Es konnte für *innexin 2* gezeigt werden, dass es in die Oocyte transportiert wird. (Bauer *et al.*, 2005). Während der Embryogenese findet man eine Expression der Innexine *innexin 1*, *innexin 2* und *innexin 3* im Vorder- und Hinterdarm sowie in der Epidermis. *innexin 2* und *3* sind ebenfalls im Nervensystem des Embryos zu finden.

Die Expression von *innexin 4* ist auf die männlichen und weiblichen Keimbahnzellen beschränkt und *innexin 5* und *6* scheinen während der Embryogenese nur schwach exprimiert zu sein (Stebbing *et al.*, 2002).

Der *shak-B* Genlokus (*innexin 8*) weist alternative Spleißvarianten auf und es sind drei verschiedene Proteinprodukte beschrieben: *shaking-B (lethal)*, *shaking-B (neural)* und *shaking-B (neural+16)* (Phelan, 2004). Die drei *innexin 8*-Transkripte zeigen sehr unterschiedliche Expressionsmuster während der Embryogenese. So findet man *shaking-B (lethal)* im visceralen Mesoderm und anderen mesodermalen Geweben. *shaking-B (neural)* und *shaking-B (neural+16)* wird dagegen hauptsächlich im zentralen und peripheren Nervensystem exprimiert (Stebbing *et al.*, 2002).

### 1.2.2.2 Phänotypen verschiedener Innexinmutanten in *D. melanogaster*

Die verschiedenen bis jetzt bekannten Mutanten zeigen ganz unterschiedliche Phänotypen, welche unterschiedliche Gewebe in unterschiedlichen Entwicklungsstadien betreffen. Ein genereller Phänotyp konnte aber an verschiedenen Mutanten gezeigt werden, nämlich dass eine Reduktion von Innexinen zu einem Verlust von interzellulärer Kopplung und einer Reduktion von Gap junction Kanälen in der Membran führt (Phelan, 2004).

Die Mutante von *innexin 1 ogre* (optic ganglion reduced) wurde aufgrund ihres Defekts der visuellen Mustererkennung entdeckt. Embryonen der *ogre* Mutante zeigen, obwohl *innexin 1* während der Embryogenese ubiquitär exprimiert ist, keinen offensichtlichen Phänotyp (Lipshitz *et al.*, 1985; Bauer *et al.*, 2001). Es konnte aber gezeigt werden, dass *ogre* für die

postembryonale Entwicklung des Zentralen Nervensystems notwendig ist. So ist in der Mutante die Anzahl der postembryonischen Neuroblasten in den Primordien der optischen Loben deutlich reduziert und das Nervensystem viel kleiner im Vergleich zum wildtypischen. (Watanabe und Kankel, 1990).

*innexin 2*-Mutanten wurden ursprünglich in einer P-Element-Mutagenesestudie gefunden, bei der nach Genen gesucht wurde, die eine essentielle Rolle bei der Darmentwicklung spielen. Die Mutante wurde *kropf* genannt in Anlehnung an den Phänotyp, bei dem der Weitertransport des Futters in den larvalen Mitteldarm betroffen ist (Bauer *et al.*, 2002). Die Ursache liegt dabei in einer Fehlbildung des Proventrikulus. Neben diesem sehr deutlichen Phänotyp in der Larve zeigte die Mutante während der Embryogenese eine hohe Variabilität von Phänotypen. Es konnte gezeigt werden, dass nur 1/3 der homozygoten Mutanten das 1. Larvenstadium erreichen; der Rest ist während der Embryogenese letal. Dabei sind in den meisten Mutanten die Segmente normal angelegt, zeigen aber morphogenetische Defekte während der Keimstreifenverkürzung und späteren Stadien. In extremen Fällen wurde ein vollständiger Verlust des Vorderdarms und eine starke Reduktion des Hinterdarms beobachtet (Bauer *et al.*, 2004).

Die Mutanten des Keimbahn-spezifischen Gap junction-Proteins *innexin 4* werden als *zpg* (*zero population growth*) bezeichnet. Die lebensfähigen Tiere mit einer Nullmutation im *zpg* Locus sind steril und haben kleine Gonaden. Es konnte gezeigt werden, dass *innexin 4* für das Überleben von differenzierenden Keimbahnzellen während der Gametogenese beiderlei Geschlechts benötigt wird (Tazuke *et al.*, 2002).

Die lebensfähigen Mutanten *shaking-B (neural)* und *shaking-B (neural+16)* wurden durch ein Ausbleiben der Fluchtreaktion charakterisiert, die durch eine fehlende synaptische Verbindung zwischen dem "giant fiber system" und den anschließenden Motoneuronen entsteht (Thomas *et al.*, 1984). Es konnte dabei spezifisch gezeigt werden, dass in der Nullmutation von *shaking-B (neural)* die elektrischen Synapsen betroffen sind und nicht die chemischen (Blagburn *et al.*, 1999). Neben diesen neuronalen Defekten ist auch in diesen Mutanten die Kommunikation und Entwicklung einiger Muskeln betroffen (Todman *et al.*, 1999). *shaking-B (lethal)* ist für das Überleben während der Embryogenese essentiell. Fliegen mit Mutationen in diesem Genlokus sterben noch im ersten Larvenstadium (Crompton *et al.*, 1995). Der genaue Grund für die Letalität ist nicht bekannt. Da *shaking-B (lethal)* aber im

sich entwickelnden Darm und im Herzmuskel exprimiert wird, ist der mutante Phänotyp wahrscheinlich auf einen Darm- und Herzmuskeldefekt zurückzuführen (Phelan und Starich, 2001).

### 1.2.3 Biosynthese von Gap junction Kanälen

In der Biosynthese von Gap junction-Kanäle sind die Synthese und Zusammenlagerung, der intrazelluläre Transport, die Kanalbildung und schließlich der Abbau wichtige Schritte, welche alle präzise koordiniert und reguliert werden müssen (Falk, 2000).

Über die Biosynthese von Innexinen ist noch nicht viel bekannt. Aufgrund der Ähnlichkeit zu den Connexinen werden Rückschlüsse gezogen, die aber noch geprüft werden müssen.

Für viele Connexine konnte gezeigt werden, dass sie innerhalb der Zelle den allgemein bekannten sekretorischen Weg durchlaufen. Sie werden an den membrangebundenen Ribosomen des ER<sup>5</sup> synthetisiert. Dafür lagert sich an die Signalsequenz des naszierenden Polypeptides ein Signalerkennungspartikel<sup>6</sup> (SRP) an, welches diesen Komplex zu einem Translokator in der ER-Membran dirigiert. Das Connexin-Polypeptid wird dann kotranslational in die ER-Membran integriert (Falk *et al.*, 1994; Zhang *et al.*, 1996; Falk und Gilula, 1998).

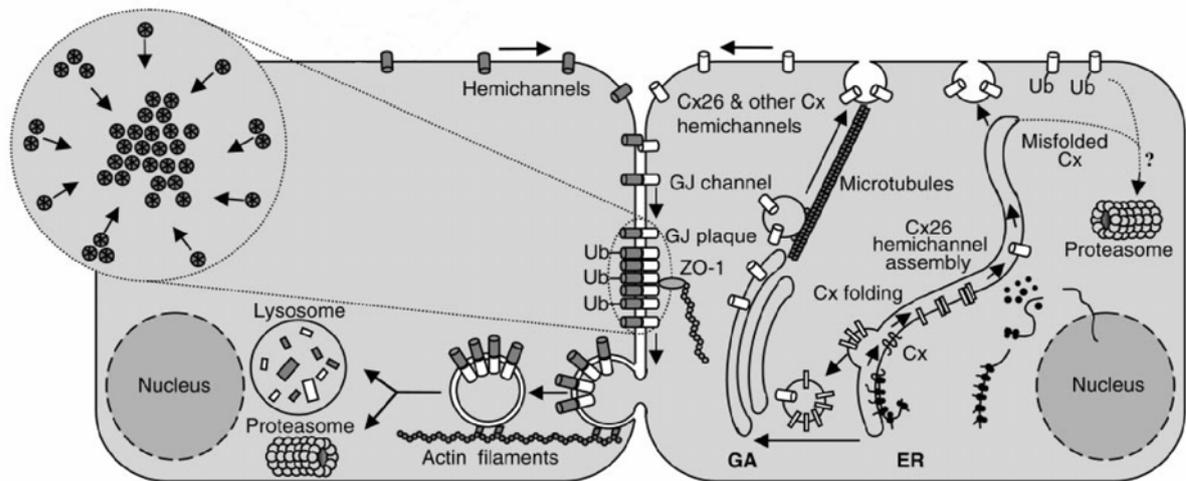
Im nächsten Schritt müssen sich die einzelnen Connexine zu einem Halbkanal zusammenlagern. In verschiedenen Publikationen wurde gezeigt, dass dieser funktionelle Zusammenbau im ER stattfindet (Falk *et al.*, 1997; Ahmad *et al.*, 1999). Allerdings ist diese Festlegung des Ortes für den Zusammenbau der Connexone noch umstritten. So konnten andere Autoren zeigen, dass die Oligomerisierung in einem bestimmten Kompartiment des ERs stattfindet, dem ERGIC<sup>7</sup> (George *et al.*, 1999). Weitere Studien haben sogar Hinweise erbracht, dass der Zusammenbau erst nach dem Verlassen des ERs, im *trans*-Golgi-Netzwerk geschieht (Musil und Goodenough, 1993). Es wird nun vermutet, dass der Ort des Zusammenbaus abhängig vom Connexin-Typ ist, aber es konnte auch eine Zelltyp-Spezifität gezeigt werden (Saez *et al.*, 2003; vanSlyke und Musil, 2000).

---

<sup>5</sup> Endoplasmatischen Retikulums

<sup>6</sup> engl.: signal recognition particle

<sup>7</sup> engl.: ER-Golgi-intermediate compartment



**Abb. 1.6: Schematische Abbildung der Synthese, der Oligomerisierung und der Degradation von Connexinmolekülen.**

Die Connexine werden am endoplasmatischen Retikulum (ER) synthetisiert und oligomerisieren zu Connexonen. Die meisten Halbkanäle folgen dann dem sekretorischen Weg und werden über den Golgi-Apparat in Vesikeln zu der Plasmamembran transportiert. Halbkanäle können entweder frei an der Zelloberfläche bleiben oder bilden durch Kopplung zweier Halbkanäle an der lateralen Seite Gap junction-Kanäle. Der Abbau der Gap junctions erfolgt durch Vesikeleinschnürung und dem nachfolgenden proteosomalen und/oder lysosomalen Abbauweg (nach Saez *et al.*, 2003).

Bei den Untersuchungen, wie die neu synthetisierten Connexine zur Plasmamembran transportiert werden, wurden alternativ zu dem sekretorischen Weg, bei dem Connexine in Vesikeln vom ER über den Golgi-Apparat zur Plasmamembran weitergeleitet werden, ein Tubulin-abhängiger Weg entdeckt. Dieser alternative Weg konnte nicht durch Brefeldin A (eine Substanz, die den Golgi-Apparat ummantelt) inhibiert werden. Dagegen war dieser Weg sensitiv gegenüber Nocodazole (eine Mikrotubuli zerstörende Substanz). Es liegt die Vermutung nahe, dass bei diesem Weg die Connexine direkt von rauhen ER über Vesikel zur Plasmamembran geleitet werden (Martin *et al.*, 2001; Saez *et al.*, 2003).

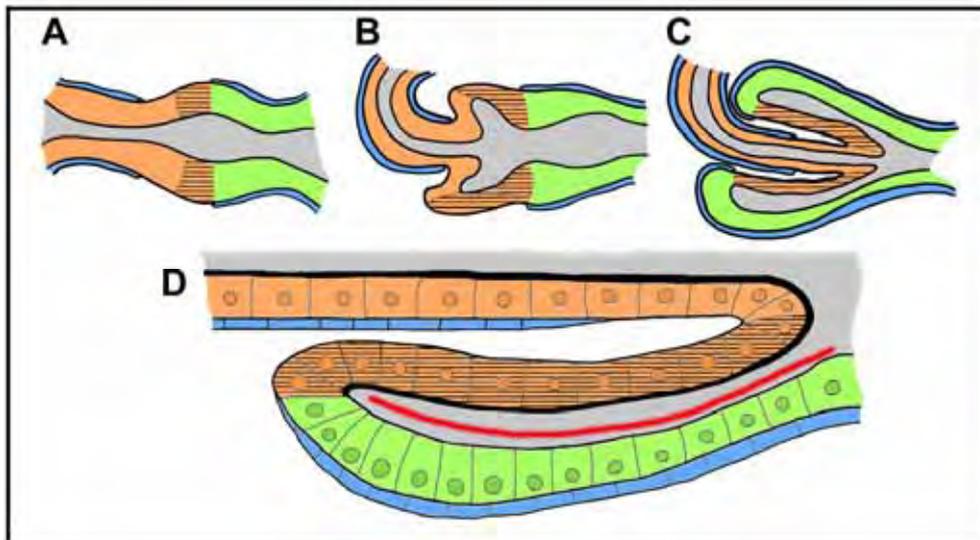
### 1.3 Der Proventrikulus

An der Grenze zwischen Vorder- und Mitteldarm ist der Proventrikulus lokalisiert. Der Proventrikulus ist ein außergewöhnlicher Abschnitt des Darmsystems in *D. melanogaster*.

Vorder- und Mitteldarm sind einschichtige Epithelien, welche von viszerale Muskelzellen ummantelt sind (Tepass und Hartenstein, 1994). Der Proventrikulus ist dagegen ein mehrschichtiges, kräftiges, herzförmiges Organ, welches als Schleuse die Passage des Futters in den Mitteldarm reguliert (Strasburger, 1932; King, 1988).

Bei der Ausbildung des Organs werden unterschiedliche morphogenetische Mechanismen (Zellbewegung, Zellform-Veränderung) benötigt. Es konnte gezeigt werden, dass diese durch eine ganze Reihe konservierte Signalwege wie unter anderem Notch-, Jak/Stat- und Hedgehog-Signalweg kontrolliert werden (Josten *et al.*, 2004; Fuss *et al.*, 2004).

Der Verdauungstrakt von *D. melanogaster* besteht aus dem Vorder-, Mittel- und Hinterdarm. Vorder- und Hinterdarm sind ektodermalen Ursprungs. Beide entstehen durch die Invagination der Mitteldarmprimordien. Der posteriore Teil des Mitteldarmprimordiums ist mit dem Proktodäum verbunden, das ebenfalls während der Gastrulation in den Embryos invaginiert. Aus dem Proktodäum entwickelt sich der Hinterdarm. Der anteriore Teil des Mitteldarmprimordiums ist mit dem Stomodäum verbunden. Aus diesem entsteht der Vorderdarm (Skaer, 1993; Campos Ortega und Hartenstein, 1997; Myat, 2005).



**Abb. 1.7: Die Entwicklung des Proventrikulus**

A: Bis zum Stadium 11 besitzt der Darm an der Gewebegrenze eine Röhrenstruktur. B: Während des Stadiums 11-12 bildet sich die Pre-Keyholestruktur aus. C: In Stadium 13-14 entwickelt sich das Keyhole. D: Bis zum Stadium 17 invaginieren die ektodermalen Zellen (markiert in orange) des Keyholes in einen von endodermalen Zellen (markiert in grün) gebildeten Kelch (Cardia) und formen zusammen den Proventrikulus. Die aufliegende viszerale Muskelschicht ist in blau und die peritrophische Membran ist in rot gekennzeichnet. (modifiziert nach Fuss *et al.*, 2004)

Die Entwicklung des Proventrikulus beginnt im Stadium 12 an der posterioren Grenze des Vorderdarms an einer schmalen Stelle, welche nicht mit einer Mesodermis bedeckt ist.

Hier weitet sich das Rohr und bildet eine blasenartige Struktur. Diese Evagination wird durch eine örtliche Konstriktion der apikalen Membran, welche die Zellform ändert, hervorgerufen.

Weitere Zellformveränderungen an der Grenze der ektodermalen Vorderdarmzellen und

endodermalen Mitteldarmzellen bilden die Form der keyhole<sup>8</sup>-Struktur. Diese unterschiedliche Herkunft der Zellen ist durch die Expression unterschiedlicher Transkriptionsfaktoren gekennzeichnet, Fork head für den ektodermalen Teil und Defective proventriculus für den endodermalen Bereich (Fuss und Hoch, 1998).

In der weiteren Entwicklung beginnen die Zellen des ektodermalen Abschnittes der keyhol-Struktur in den Innenraum des endodermalen Abschnittes der Struktur einzuwandern. Es bildet sich das typische mehrschichtige Epithel des Proventrikulus, das auch Cardia genannt wird.

Im späten Embryonalstadium ist die Entwicklung des Proventrikulus abgeschlossen. Er besteht nun aus drei Epithelschichten und zwei viszerale Muskelzellschichten (Fuss *et al.*, 2004; Josten *et al.*, 2004; Tepass und Hartenstein, 1994):

- Die Innere Schicht (ILP<sup>9</sup>): Ektodermale Zellen, deren Verband die röhrenförmige Struktur behalten hat und die von Mesodermzellen umschlossen sind.
- Die zurückführende Schicht (RLP<sup>10</sup>). Ektodermale Zellen, die aus dem Keyhole hervorgegangen sind und an die keine Mesodermschicht anliegt.
- Die äußere Schicht (OLP<sup>11</sup>), welche den endodermalen Kelch des Proventrikulus bildet. An diese Schicht ist die zweite viszerale Muskelzellschicht aufgelagert.

### 1.4 Die Elektronenmikroskopie: Eine Methode zur Charakterisierung zellulärer Strukturen

Die Charakterisierung zellulärer Strukturen war in hohem Maße abhängig von den technischen Möglichkeiten, die in der zellbiologischen Forschung zur Verfügung standen. Unter Verwendung von klassischen Lichtmikroskopen mit einer maximalen Auflösung von ca. 200 nm ist die Differenzierung subzellulärer Strukturen nur in begrenztem Maße möglich. Erst durch die Entwicklung von Elektronenmikroskopen mit ihrer höheren Auflösung von bis zu 0,2 nm konnten auch diese Strukturen untersucht werden. Neben der höheren Auflösung,

---

<sup>8</sup> engl.: Schlüsselloch

<sup>9</sup> engl.: inner layer of Proventrikulus

<sup>10</sup> engl.: recurrent layer of Proventrikulus

<sup>11</sup> engl.: outer layer of Proventrikulus

die es ermöglicht, selbst bei niedrigen Vergrößerungen viele Details sichtbar zu machen, besitzen Elektronenmikroskope außerdem einen viel höheren Vergrößerungsbereich.

Es existieren zwei Grundtypen von Elektronenmikroskopen, das Transmissions- und das Rasterelektronenmikroskop. Während das Rasterelektronenmikroskop (REM) besonders für die plastische Abbildung von Oberflächen geeignet ist, können im Transmissions-elektronenmikroskop (TEM) Gewebeschnitte analysiert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde dieser zweite Typ verwendet.

Im Aufbau ist das TEM einem Lichtmikroskop nachempfunden, d.h. es besteht aus hintereinander geschalteten, vergrößernden Linsen und erzeugt ein Durchlicht-Elektronenbild mit einer 100 bis 200000 fachen Vergrößerung (Lang, 1981; Flegler, 1995).

Die makromolekulare Untersuchung biologischer Proben war aber nicht nur von der Entwicklung des Elektronenmikroskops abhängig. Um Zellen aufzunehmen, ist es notwendig, Ultradünnschnitte der Präparate herzustellen. Dies war der Grund, dass, obwohl schon seit 1937 Elektronenmikroskope kommerziell hergestellt wurden, es erst mit der Entwicklung leistungsfähiger Ultramikrotome in den 50iger Jahren gelang, den makromolekularen Aufbau von Zellen routinemäßig zu untersuchen (Ude und Koch, 2002).

Neben diesen technischen Voraussetzungen ist ein wichtiger Bestandteil bei der Untersuchung biologischer Proben die aufwendige Präparation: So muss die Probe chemisch fixiert und entwässert werden, in Kunstharz getränkt und eingebettet werden.

Ein Problem stellte in dieser Arbeit die Fixierung der präparierten Proventrikuli dar. Da dieses filigrane Organ die vielen notwendigen Fixierungsschritte (siehe Kapitel Material und Methoden) nicht unbeschadet überstand, wurde in dieser Arbeit eine Methode entwickelt, die es ermöglicht, das gesamte Gewebe artefaktfrei zu erhalten. Dazu wurde das Gewebe nach der Präparation und dem ersten kurzen Fixierungsschritt in 2 % Agarose eingebettet. Dies schützt die Struktur, aber alle weiteren verwendeten Lösungen können das Gewebe gut erreichen.

Ein weiterer wichtiger Schritt bei der Fixierung biologischer Strukturen ist die sogenannte Kontrastierung: Biologische Strukturen haben im elektronenmikroskopischen Bild kaum Kontrast, da die Probe hauptsächlich aus Kohlenstoff besteht und die Elektronen nur schwach bei dem Durchtritt durch die Probe gestreut werden. Um Membranen besser darstellen zu können, wird das Organ nach den typischen Fixierungsschritten mit verschiedenen Aldehyden mit Osmiumtetroxid behandelt. Durch diesen Schritt werden besonders die Lipide fixiert. In

dieser Reaktion wird Osmiumtetroxid reduziert und bindet an positiv geladene Gruppen, z.B. polare Gruppen von Phospholipiden in Membranen. Neben der Fixierung der Lipide, was das Auswaschen bei den Entwässerungsschritten mit Aceton verhindert, wird so der Kontrast deutlich erhöht, da die Elektronen stärker gestreut werden (Robinson und Schürmann, 1985; Plattner und Zingsheim, 1987).

### 1.5 Ziel der Arbeit

Diese vorliegende Arbeit schließt sich an die von unserem Labor geführte Charakterisierung der *innexin 2* Mutante *kropf* an. Dabei war das Ziel der Arbeit, den Einfluss von Innexin 2 auf die Zellmorphologie und die Zellkontakte auf zellulärer Ebene erstmalig auf ultrastruktureller Ebene zu untersuchen. Ein wichtiger Bestandteil dieses Projekts war dabei die Etablierung der Methodik der Elektronenmikroskopie in unserer Abteilung. Weitere Fragestellungen dieser Arbeit beschäftigten sich mit dem Effekt, den der Verluste eines Innexins auf die interzelluläre Kommunikation hat, und wie sich dieser Verlust auf koexprimierte Innexine auswirkt. Als geeignetes System für diese Fragestellungen stellte sich der larvale Proventrikulus heraus.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

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

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

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

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

#### Gekaufte Reagenssätze

Plasmid Kit, Quiagen  
Gel Extractions Kit, Macherey und Nagel

RNA *in situ* and detection Kit, La Roche  
ECL Detection Kit, Amersham

Aufreinigung von Plasmid DNS  
Extraktion und Aufreinigung von DNS aus  
Agarosegelen  
Präparation von RNA *in situ* Sonden  
Detektion von HRP-gekoppelten Antikörpern auf  
Westernblot Membranen

#### Verbrauchsmaterialien

Allgemeiner Laborbedarf  
1,5 ml und 2 ml Reaktionsgefäße  
PCR-Reaktionsgefäße  
Röntgenfilme  
EM-Zubehör  
Palstikwaren  
Plastikwaren für Zellkultur  
Medien für Zellkultur

Faust, Meckenheim; Schütt, Göttingen  
Eppendorf, Hamburg  
Eppendorf, Hamburg  
Fuji Medical X-Ray Film Super RX  
Plano, Giessen  
Greiner, Solingen; Roth, Karlsruhe  
Nunc, Wiesbaden; Greiner, Solingen  
PAA Laboratories, Pasching (Österreich)

### 2.1.2 Geräte und Software

Autoklav, H+P Varioklav; Bildverarbeitungsprogramm, Adobe Photoshop 7.0.1 Adobe System, Edinburgh, UK; Blottingapparatur, Semi dry Blotter, Biorad; Drehrad, Snijders test-tube-rotator; Elektronenmikroskop, Libra 120, Zeiss; Elektrophoreseapparaturen, BioRad; Entwickler, Curix 60, Agfa; Fliegenbrutschränke, Rumed; Inkubator Zellkultur, Binder Zellkulturschrank; Konfocales Laserscanmikroskop, DM Ibre, Leica; Lichtmikroskop, AX 70, Olympus; Mikrotom, UCT Ultramicrotome, Leica; OD-Meßgerät, Smart Spec 3000, Bio Rad; pH-Meter, Beckmann Instruments, Fullerton, USA; Photometer, Pharmacia Biotech; RT-PCR Maschine, IQ5 Real-Time PCR Detection System, Bio Rad; Spannungsquelle, Power pac, Bio Rad; Stereolupe, SZX 12, Olympus; Thermocycler, GeneAmp<sup>®</sup> PCR System 2400, Perkin Elmer, Langen; Thermomixer, Thermomixer S436, Eppendorf, Hamburg; Tischschüttler, Scientific Industries; Ultraschallgerät, Sonopuls, Bandelin; Waagen, Satorius; Wirbelstrommischer, Vortex Genie 2, scientific industries; Zentrifugen, Hettich Zentrifuge Typ 4610; eppendorf centrifuge 5415 R; eppendorf centrifuge 54115 D, Heraeus Megafuge.

### 2.1.3 Lösungen und Puffer

#### Allgemeine Lösungen

Aqua bidest.	2 x destilliertes Wasser
Blockierlösung	Für eine 2 %ige (w/v) Lösung wurden 2 g Blockierungsreagenz (Roche, Mannheim) in 100 mM MAB-Puffer gelöst und portioniert bei -20 °C gelagert.
Denhardt's (50x )	1 % (w/v) BSA; 11 % (w/v) Ficoll; 0,3 % (w/v) Polyvinylpyrrolidon (PVP)
Diethylpyrocarbonat (DEPC)- Behandlung von H <sub>2</sub> O, PBS und SSC	0,05 % (v/v) DEPC wurde in die Lösungen gegeben und 12 h bei 37 °C inkubiert und anschließend zur Entfernung des DEPC autoklaviert
DNS Ladepuffer	15 % Bromphenolblau; 25 % Ficoll; 5 % SDS; 50 mM Tris-HCl (pH 7,5); 50 mM EDTA
DNTP-Mix	Je 0,25 Vol. 100 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP

## Material und Methoden

---

Fischsperma DNS	10 mg/ml; Die in A. bidest gelöste DNS wird durch mehrfaches Aufkochen fragmentiert, bis die Länge der entstehenden Fragmente durchschnittlich 200-500 bp beträgt, Lagerung bei $-20^{\circ}\text{C}$
Formaldehyd	16 % Methanolfrei
Hoyers' Einbettungsmedium	30 g Gummi arabikum mit A. bidest auf 50 ml auffüllen und über Nacht rühren, 20 g Chloralhydrat und 20 g Glycerin zugeben, Schwerbestandteile durch Zentrifugation (30 min, 15000 U/min) sedimentieren und entfernen.
HYBE Puffer	50 % Formamid (deionisiert); 5x SSC; 200 $\mu\text{g/ml}$ Heringsperma-DNS; 50 $\mu\text{g/ml}$ Heparin; 100 mg/ml tRNS
LiCl	4 M LiCl in A. bidest
Lysozymal-Telt Lösung	Eine Spatelspitze Lysozym auf 25 ml Telt Lösung, mischen und bei $-20^{\circ}\text{C}$ lagern.
Maleinsäurepuffer (MAB):	100 mM Maleinsäure; 150 mM NaCl Der Puffer wurde mit NaOH auf pH 7,5 eingestellt.
Natriumacetat Lösung (3 M)	3 M Natriumacetat in A. bidest, pH 7,0 mit Eisessig einstellen.
Paraformaldehyd	4 %ige Lösung in PBS
PBS (10x)	1,37 M NaCl; 0,02 M KCl; 0,1 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; 0,02 M $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; pH 7,4
PBST	1x PBS mit 0,1 % Triton X-100
PBST/ BSA	PBST mit 2 % BSA (w/v)
PBSTN	PBT mit 2 % Ziegen- oder Eselserum (v/v)
Proteinase K Stammlösung	20 mg/ml Proteinase K in A. bidest.
Proteinstabilisationslösung (7x)	1 Tablette Complete Mini (Roche) wird in 1,5 ml A. bidest. gelöst, Lagerung bei $-20^{\circ}\text{C}$
Ripa Puffer	150 mM NaCl; 1 % IGEPAL Ca-630; 0,5 % Natriumdeoxycholat; 0,1 % SDS; 50 mM Tris (pH 8,0); Lagerung bei $-20^{\circ}\text{C}$
Sammelgelpuffer Stammlösung (4 %)	6 ml 40 % Acrylamid/Bisacralamid; 7,2 ml 1 M Tris-HCl (pH 6,8); 45,56 ml A. bidest.
SDS Elektrophorese-Laufpuffer (1x)	25 mM Tris, 192 mM Glyzerin, 0,1 % SDS
SDS Probenpuffer	100 mM Tris-HCl (pH 6,8); 10 % Glyzerin; 3 % SDS; 2 % $\beta$ -Mercaptoethanol; 0,1 % Bromphenolblau
SSC (20x)	3 M NaCl; 300 mM Na-Citrat

## Material und Methoden

---

TAE Puffer	40 mM Tris-Acetat (pH 8,0); 1 mM EDTA
TBST Puffer (1x)	0,01 M Tris-HCl (pH 7,0); 0,15 M NaCl; 0,05 % Tween 20
TE Puffer	10 mM Tris-HCl (pH 8,0); 1 mM EDTA
Telt	50 mM Tris-HCl (pH 7,5); 62,5 mM EDTA; 2,5 M LiCl; 0,4 % Triton X-100
Transferpuffer	100 ml 10x Transferpuffer Stammlösung; 700 ml A. bidest.; 200 ml Methanol
Transferpuffer Stammlösung (10x)	29 g Tris-HCl; 145 g Glycerin; auf 1 l mit A. bidest auffüllen
Trenngelpuffer Stammlösung (10 %)	40 ml 40 % Acrylamid/Bisacrylamid; 60 ml 1 M Tris-HCl (pH 8,8); 60 ml A. bidest.

### Lösungen und Puffer für die EM-Präparation

Glutaraldehyd (GA)	25 % in A. bidest.
Phosphat Puffer (PB)	36 ml Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O 0,2 M; 14 ml Na H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O 0,2M ; 50 ml A. bidest
Paraformaldehyd (PFA) (10 %)	10 %ige Lösung in PB
Karnovsky-Fixans	1 % PFA und 4 % GA in PB
Osmium Lösung	2 % in H <sub>2</sub> O
Durcupan (Sigma)	28 Teile A/M; 24 Teile B + 2 % 2,3,6Tris (dimethylamonomethyl) phenol
Bleikontrastierungslösung nach Merzer und Birbeck	1,33 g Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ; 1,76g Na <sub>3</sub> (C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> ) x 2H <sub>2</sub> O; 30 ml A. bidest; die Lösung nach dem Ansetzten 1 min <b>kräftig</b> schütteln und unter gelegentlichem Schütteln 30 min stehen lassen, danach 8 ml 1 N NaOH zufügen und mit A. bidest auf 50 ml auffüllen. Lösung bei 4 °C aufbewahren.
Uranyl Kontrastierung, nach Alice Ihmer	Spatelspitze Uranylacetat in Zentrifugenröhrchen geben und mit 70 % Methanol auffüllen und 5 min schütteln. Die gesättigte Lösung abzentrifugieren und sofort verwenden.
Uranyl Kontrastierung, nach Ulla Mettbach	2 % Uranylacetat in A. bidest bei 4 °C aufbewahren. Vor dem Benutzen kurz abzentrifugieren.
Einbettungsmedium für Zellen und empfindliche Organe	Nach dem ersten Fixierungsschritt kann das Gewebe/Zellen in 2 % Agarose in H <sub>2</sub> O oder PB eingebettet werden, um mechanische Belastungen während der nachfolgenden Fixier- und Kontrastierungs-Schritte zu minimieren.

### Kultivierung von *D. melanogaster*

Apfelsaft-Agarplatten	1,5 l VE Wasser mit 85 g Agar aufkochen und auf 65 °C abkühlen lassen. 0,5 l Apfelsaft mit 50 g Zucker mischen und auf 65 °C erhitzen. Gelöster Agar, Apfelsaft-Zucker-Lösung und 40 ml Nipagin-Lösung (15 % Parahydroxybenzoar in 70 % Ethanol) mischen und auf Petrischalen verteilen.
Fliegenfutter	120 g Agar und 1000 g Maisschrot mit 12 l Wasser aufkochen. 140 g Sojamehl, 250 g Trockenhefe, 570 g Rübensirup und 1140 g Roggenmalzextrakt zugeben. Futter unter Rühren auf 65 °C abkühlen lassen. 210 ml Nipagin Lösung (15 % Parahydroxybenzoar in 70 % Ethanol) und 55 ml Propionsäure zum Futter geben und gut mischen. Futter auf Fliegenröhrchen verteilen.

### Medien für die Kultivierung von Zellen

Induktionsmedium	Selektionsmedium, 0,5 mM oder 0,7 mM Kupfersulfat (aus 50 mM Stammlösung)
Kulturmedium	Schneider's <i>Drosophila</i> Medium, 10 % (v/v) hitze-inaktiviertes FCS, 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin (100x)

### Medien für die Kultivierung von Bakterien

Die Bakterienmedien wurden mit A.bidest (ad 1 l) angesetzt und anschließend autoklaviert (121 °C, 20 min). Für das Gießen von Agarplatten wurde LB-Agar aufgeköcht und auf unter 60° C abgekühlt. Dann wurde gegebenenfalls ein entsprechendes Antibiotikum zugegeben.

LB-Medium (Luria-Bertani-Medium):	10 g Trypton; 5 g Hefeextrakt; 10 g NaCl
LB-Agar	10 g NaCl; 10 g Trypton; 5 g Hefeextrakt; 20 g Agar; mit A. bidest auf 1 Liter auffüllen; pH 7,0 mit 5 M NaOH, autoklavieren
LB-Ampicillin-Agar	1 Liter LB Agar autoklavieren, auf 55 °C abkühlen; 1 ml Ampicillin (50 mg/ml, filtersterilisiert)

## 2.1.4 Organismen

### Fliegenstämme

Fliegen des Stammes Oregon R dienen als Wildtypkontrollen. Markermutationen und Balancer-Chromosomen sind in Lindsley & Zimm (1992) beschrieben.

#### Defiziente Fliegenstämme

Bezeichnung in der Arbeit	Offizielle Bezeichnung	Merkmale und Chromosomenlokalisierung	Herkunft
Wildtyp	W <sup>1118</sup>	Amorphes Allel, Chromosom X	Bloomington
<i>kropf</i>	P(x) 16/ FM7, <i>GAL4-Kr::UAS-GFP</i>	Chromosom X	U. Schäfer

#### Effektor Fliegenstämme

Bezeichnung	Merkmale und Chromosomenlokalisierung	Herkunft
UAS <i>inx2</i> ( <i>innexin 2</i> )	Chromosom 2	C. Lehmann
UAS <i>inx2GFP</i>	Chromosom X	diese Arbeit
UAS <i>inx2Myc</i>	Chromosom X	H. Lechner
UAS <i>inx2ΔCTmyc</i>		H. Lechner

#### Treiber Fliegenstamm

Bezeichnung in der Arbeit	Offizielle Bezeichnung	Merkmale und Chromosomenlokalisierung	Herkunft
hs Gal4 (heatshock)			

### Bakterienstämme

<i>E. coli</i> - Stamm	Genotyp
X11-Blue MRF'	$\Delta(mcrA)$ 183, $\Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)$ , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>lac(F)</i> , <i>proAB</i> , <i>lac<sup>q</sup>ZΔM15</i> , TN10 ( <i>tet<sup>r</sup></i> ), <i>recA1</i> , <i>thi-1</i> (Saratgene, Heidelberg)

### Zellen

SL2 Zellen	embryonale <i>D. melanogaster</i> Zellen
------------	--

## 2.1.5 Antikörper

### Primäre Antikörper

Antikörperbezeichnung	Tier	Eingesetzte Konzentration	
		Immun-Blot	Immun-histochemie
$\alpha$ -Armadilo (Arm), DSHB	Maus		1:5
$\alpha$ -Bazooka (Baz), Geschenk von A. Wodarz	Kaninchen		1:500
$\alpha$ -Bazooka (Baz), Geschenk von A. Wodarz	Ratte		1.500
$\alpha$ -Corracle (Cor), Geschenk von R. Fehon	Meer- schweinchen		1:1000
$\alpha$ -Crumbs (Crb) DSHB	Maus		1:10
$\alpha$ -DE-cadherin (DE-cad), Santa Cruz	Ziege		1:20
$\alpha$ -Digoxigenin (Dig), La Roche	Maus		1:2000
$\alpha$ -Discs large (Dlg), DSHB	Maus		1:10
$\alpha$ -Dynamamin (Dyn) Sigma-Aldrich	Maus		1:100
$\alpha$ -Dynein heavy chain (Dhc), Geschenk von T. S. Hays	Maus		1:100
$\alpha$ -GFP, Santa Cruz	Kaninchen		1:100
$\alpha$ -Innexin 1 (Inx1), Davids, Regensburg	Kaninchen		1:75
$\alpha$ -Innexin 1 (Inx1), Davids, Regensburg	Maus		1:50
$\alpha$ -Innexin 2 KLRH (Inx2), Davids, Regensburg	Kaninchen	1:400	1:75
$\alpha$ -Innexin 2 REM (Inx2), Davids, Regensburg	Kaninchen	1:200	1:75
$\alpha$ -Innexin 2 (Inx2), Davids, Regensburg	Meer- schweinchen		1:75
$\alpha$ -Innexin 3 (Inx3), Davids, Regensburg	Meer- schweinchen		1:50
$\alpha$ -Myc9E10, Santa Cruz	Maus	1: 1500	1:20
$\alpha$ -Myc9E10, Santa Cruz	Kaninchen		1:300
$\alpha$ -Patj, Geschenk v. M. Myat	Maus		1:10
$\alpha$ -aPKC, Santa Cruz	Kaninchen		1:100
$\alpha$ -Short stop (Shot), Geschenk von N. Brown	Meer- schweinchen		1:1000

## Material und Methoden

$\alpha$ -Spectrin (Spec), DSHB	Maus	1:10
$\alpha$ - $\alpha$ Tubulin (Tub), DSHB	Maus	1:50

### Sekundäre Antikörper

Antikörperbezeichnung	Antigen	eingesetzte Konzentration	
		Western Blot	IHC
Cy3, Dianova	Kaninchen		1:400
Cy3, Dianova	Maus		1:400
Cy2, Dianova	Kaninchen		1:200
Cy2, Dianova	Maus		1:200
Alexa 488, Dianova	Meerschweinchen		1:200
Cy5, Dianova	Maus		1:200
HRP, Santa Cruz	Maus	1:2000	
HRP, Santa Cruz	Kaninchen	1:2000	

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Molekularbiologische Methoden

#### 2.2.1.1 DNA-Gelelektrophorese

Die DNA wurde elektrophoretisch in einem 1 % (w/v) Agarosegel in 1x TBE-Puffer aufgetrennt. Für die Herstellung des Gels wurde die Agarose in dem 1x TBE Puffer aufgeköcht und gelöst. Für den späteren DNA-Nachweis wurde Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0,5  $\mu$ g/ml zugesetzt.

Die DNA-Proben wurden mit 6x Ladepuffer (allgemeine Lösungen) versetzt und in 1x TBE bei 100 V in der Gelkammer (Biorad) elektrophoretisch aufgetrennt.

#### 2.2.1.2 Herstellung kompetenter Zellen und Transformation

Für die Herstellung kompetenter Bakterien mittels Calciumchlorid wurde zunächst aus einer Glycerinkultur von DH5 $\alpha$ -Bakterien eine Vorkultur hochgezogen. Anschließend wurden 18

ml LB-Medium mit 500  $\mu$ l Vorkultur angeimpft und bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Die Zellen wurden in der späten exponentiellen Wachstumsphase, was einer optischen Dichte bei 600 nm ( $OD_{600}$ ) von 0,5 entsprach, geerntet. Zum Ernten wurde die Kultur schnell auf 4 °C heruntergekühlt und bei 4000 U/min 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde im kalten Tris/CaCl<sub>2</sub> (10 mM Tris und 100 mM CaCl<sub>2</sub>) resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation bei 4000 U/min wurde das Pellet in 0,5 Vol. Tris/CaCl<sub>2</sub> 15 bis 20 Minuten auf Eis inkubiert. Nach dieser Inkubation wurde wiederum zentrifugiert und das Pellet in 1/15 Vol. Tris/CaCl<sub>2</sub> aufgenommen und mindestens drei Stunden auf Eis stehen gelassen. Zu 100  $\mu$ l kompetenten Zellen wurde 1 bis 100 ng DNA gegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Proben 90 Sekunden auf 42 °C erhitzt, auf Eis gestellt und sofort 1 ml LB-Medium hinzugefügt. Die Bakterien wurden nun 1 Stunde bei 37 °C geschüttelt, anschließend 1 ml LB-Medium mit 50 ng/ml Ampicillin hinzugegeben, und 100  $\mu$ l der Suspension auf eine LB-Platte mit Ampicillin ausgestrichen. Wenn die Transformation erfolgreich war, konnte man nach 16 stündiger Inkubation bei 37 °C einzelne Kolonien auf der Platte erkennen.

### 2.2.1.3 Präperative Plasmidisolierung

Für die Präparation der Plasmide wurden je 110 ml LB-Medium<sub>Amp</sub> mit etwa 5-10  $\mu$ l aus dem jeweiligen Glycerinstamm angeimpft und über Nacht bei 37 °C im Schüttler inkubiert. Die Plasmidpräparation erfolgte nach dem Protokoll und mit Lösungen und Säule des Plasmid Maxi Kit, Qiagentip 100, der Firma Qiagen.

Die DNA wurde nach der Zugabe mit 0,7 Vol. Isopropanol bei Raumtemperatur gefällt und nach dem Zentrifugieren mit 5 ml 70 % Ethanol gewaschen und getrocknet. Das Pellet wurde in 200  $\mu$ l TE-Puffer gelöst und der DNA-Gehalt photometrisch bestimmt. Dafür wurde mit dem Photometer die optische Dichte der Probe bei 260 nm ( $OD_{260}$ ) ermittelt, wobei die  $OD_{260}$  von eins ungefähr einer Konzentration von 50  $\mu$ g/ml DNA entspricht. Zusätzlich wurde der Reinheitsgrad der Probe in Bezug auf Protein- und RNA-Verunreinigungen bestimmt. Dazu wurde der Quotient aus der  $OD_{260}$  und der Optischen Dichte bei 280 nm ermittelt, wobei ein Wert zwischen 1,8 und 2,0 optimal ist. Nachdem der DNA-Gehalt der Proben bestimmt worden war, wurde die Konzentration der Lösungen auf 0,5  $\mu$ g DNA/ $\mu$ l eingestellt.

### 2.2.1.4 Transiente Transfektion von S2 Zellen

Für die transiente Transfektion von Schneiderzellen wurde Cellfectin (Invitrogen) verwendet, welches ein Lipidtransfektionssystem darstellt. Hierzu wurden S2-Zellen mit einer Dichte von  $2 \times 10^6$  Zellen /ml in 60 mm Schalen ausgesät und ü.N. kultiviert, so dass eine Konfluenz von 70-80 % erreicht wurde. Zur Vorbereitung der Transfektion wurde 4 µg DNA, 500 µl serumfreies Medium und 35 µl Cellfectin in 1,5 ml Reaktionsgefäße gegeben, gut gemischt und 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wird dem DNA-Medium-Lipofectin-Mix 3 ml 5% iges FCS in serumfreien Medium hinzugefügt. Bevor dieser Transfektionsansatz auf die Zellen gegeben wird, wurden diese einmal kurz mit serumfreien Medium gewaschen. Die Transfektion erfolgte für 5 h bei 25 °C. Im Anschluss wurde 7 ml Nähmedium auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden nach 48 h mit einem Zellschaber vom Boden der Schale gelöst, in ein Zentrifugenröhrchen überführt und bei 800 U/min pelletiert. Die Zellen wurden anschließend für proteinbiochemische Versuche verwendet (siehe 2.2.2).

### 2.2.1.5 Herstellung von *in-situ*-Sonden durch *in-vitro*-Transkription

Eine Voraussetzung für die Herstellung der Sonden ist, dass die DNS-Sequenz des nachzuweisenden Gens als Gesamtes oder Fragment in einen Transkriptionsvektor vorliegt. Diese Vektoren zeichnen sich dadurch aus, dass an den flankierenden Seiten des inklonierten Fragments sich Promotoren befindet, durch die eine *in-vitro*-Translation ermöglicht wird. In der vorliegenden Arbeit wurde zu diesem Zweck der pScript Vektor verwendet, der auf der 5'-Seite der Klonierungsstelle einen T3 Promotor und auf der 3'-Seite der Klonierungsstelle einen T7 Promotor bereitstellt.

Für die ISH wurden Digoxigenin (DIG)-markierte RNA-Sonden eingesetzt, die über *in-vitro*-Transkription der spezifischen, linearisierten DNA-Matrizen als ‚run-off‘-Transkripte gewonnen wurden. Während der RNS-Sythese wurde in jeder 20.-25. Position DIG markiertes Uridintriphosphat (UTP) als Marker eingebaut. Die Wahl der Polymerase, es wurde die T7 und die T3 Polymerase verwendet, richtete sich danach, in welche Richtung die Matrize in den Vektor eingebaut wurde, und ob der kodierende oder der nicht-kodierende Strang für die antisense- oder sense-Sonde abgelesen werden sollte. Die Transkription erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

### Transkriptionsansatz:

linearisierte DNA (1-2 µg)	2,5 µl
NTP	2 µl
Puffer	2 µl
RNase Inhibitor	1 µl
RNA-Polymerase	2 µl
H <sub>2</sub> O <sub>DEPC</sub>	10,5 µl

Dieser Ansatz wurde auf Eis pipettiert und zwei Stunden bei 37 °C inkubiert.

Anschließend wurden die Ansätze auf Eis gestellt und die RNA mit der Zugabe von  $\frac{1}{10}$  Vol. 4 M Lithiumchlorid und drei Vol. 100 %igem, eisgekühltem Ethanol gefällt und durch 30 min Zentrifugieren (13.000 U/min) bei 4 °C pelletiert. Nach dem Waschen in 70 %igem Ethanol und erneuter Zentrifugation wird das Pellet bei Raumtemperatur nach sorgfältiger Abnahme des Überstandes getrocknet. Danach wurden die DIG-RNS-Sonden in HYBE-Puffer aufgenommen und bei -20 °C gelagert.

Die Qualität der hergestellten Sonden wurde mit Hilfe von „DIG Quantification Teststrips“ (Roche) nach Angaben des Herstellers überprüft.

### **2.2.1.6 Quantitative RT-PCR**

Die quantitativen RT (real time (engl.) = Echtzeit) PCR ermöglicht Rückschlüsse auf die Menge der Ausgangs-mRNA und wurde in dieser Arbeit benutzt, um regulatorische Effekte auf die Transkription verschiedener Gap junction Gene in der Mutante gegenüber der wildtypischen Situation zu detektieren. Als externer Standard wurde *β-actin* gewählt, von dem man als ein sogenanntes Haushaltsgen (engl.: housekeeping gene) ausgeht, dass er in den untersuchten Ansätzen konstant exprimiert ist.

Zunächst wurde die gesamte RNA aus den Larven mit dem Qiagen RNAeasy Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben präpariert und die Konzentration im Photometer bestimmt. Im nächsten Schritt wurde durch eine reverse Transkription Reaktion ausgehend von der poly(A)RNA, einzelsträngige DNA mit Oligo-dT-Primern synthetisiert:

---

RT-PCR	
5x i Script Reaktionsmix (BioRad)	4 µl
i script reverse Transkriptase (BioRad)	1 µl
RNA Template; 1 µg RNA	_ µl
Auf 20 µl mit A. bidest auffüllen.	

---

Dieser Ansatz wurde 5 min auf 25 °C erwärmt und dann bei 42 °C die reverse Transkription für 30 min durchgeführt. Nachdem die Reaktion durch das Erhitzen auf 85 °C für 5 min abgestoppt wurde, wurden die Reaktionsansätze auf 100 µl mit H<sub>2</sub>O aufgefüllt und bei 4 °C gelagert.

Die PCR Analyse mit den spezifischen *innexin 1* und *innexin 2* Primern wurde an Aliquots der synthetisierten cDNA durchgeführt. Es wurde das iQ5 Real-Time PCR Detection System (BioRad) verwendet und die Reaktionsansätze nach Angaben des Herstellers in einem Endvolumen von 25 µl angesetzt. In diesem System wird das PCR Produkt durch einen Farbstoff (SYBR<sup>R</sup> Green, BioRad) markiert, welcher in doppelsträngige DNA interkaliert. Für die bessere Quantifizierung wurden alle Reaktionen eines Experimentes in Triplikaten durchgeführt.

Folgende Oligonucleotide wurden in den iQ5 Real-Time PCR Reaktionen verwendet:

*act5C*: 5'-GTGCACCGCAAGTGCTTCTAA-3' ; 5'-TGCTGCACTCCAAACTTCCAC-3'

*innexin 1*: 5'-AATATCACGATCTGCACCCGC- 3'; 5'-CCGAATGGCGTACAGCTTGT-3'

*innexin 3*: 5'-GATCGGTCCAGAAACACGACA-3'; 5'-GAGATGGTGGCCAAGATGAT-3'.

Die Primer wurden auf Primer-Dimer Artefakte getestet und die Effizienz durch das iQ5 Optical System Software (BioRad) bestimmt:

*Innexin 1*: 100 %, ( $R^2$ : 0.998); *innexin 3*: 100 %, ( $R^2$ : 0.998)

Das relative Niveau jeder mRNA Expression wurde nach  $\Delta\Delta C_t$  berechnet, wobei gegen  $\beta$ -actin normalisiert wurde.

## 2.2.2 Proteinbiochemische Methoden

### 2.2.2.1 Herstellung von Proteinextrakten

Die Gewinnung von Proteinextrakten erfolgte in dieser Arbeit aus Schneiderzellen und Larven. Zunächst musste ein Volumen von 200 µl an Zellen oder Larven in einem Reaktionsgefäß gesammelt und dann mit 200–400 µl RIPA überschichtet werden. Die Suspension wurde nun auf Eis mit einem Pastill mechanisch für bis zu 5 min zermörsert und dann für 20 min für die chemische Lyse inkubiert. Das larvale Gewebe wurde im Anschluss an diesen Inkubations-Schritt durch Ultraschallbehandlung weiter aufgeschlossen. In beiden Fällen wurden aber nach dem Aufschluss der Zellen unlösliche Zelltrümmer sedimentiert (10 min, 8000 U/min, 4 °C). Die Proteingehaltsbestimmung des Überstandes wurde mit dem BCA-Test nach Pierce (BCA Protein Assay Kit, Pierce) nach Herstellerangaben durchgeführt.

### 2.2.2.2 Immunpräzipitation

Für die Immunpräzipitation wurde das „Immunoprecipitation Starter Pack (Amersham Pharmacia Biotech) verwendet und nach Herstellerangaben durchgeführt. Das Prinzip beruht dabei auf einer Antikörperinkubation im Proteinextrakt und einer darauf folgenden Inkubation mit Protein A- und/oder Protein G-Sepharose, mit denen die Antikörper und ihre gebundenen Antigene aus der Lösung präzipitiert werden können.

Um unspezifische Bindungen von Proteinen an die G-Sepharose zu unterbinden wurden die Protein-Lysate vor der eigentlichen Reaktion durch einen Inkubationsschritt mit Protein G - Sepharose vorgereinigt (Prozedur nach Herstellerangaben). Dann erfolgte die Inkubation des gereinigten Proteinlysats mit den jeweiligen Antikörpern oder dem Kontroll IgG für 2 h bei 4 °C. Nach der Zugabe von 40 µl Protein G -Sepharose wurde der Ansatz für weitere 3 h inkubiert. Um unspezifisch gebundene Proteine von der Sepharose abzuwaschen wurden sie dreimal mit RIPA-Puffer und zweimal mit PBS gewaschen. Zwischen allen Schritten wurden die Suspensionen für 1 min bei 13000 U/min und 4 °C zentrifugiert. Im letzten Schritt wurde der Überstand abgenommen, die Sepharose mit SDS-Ladepuffer versetzt und mit PBS auf 60 µl aufgefüllt. Die Proben wurden 10 min bei 95 °C im Heizblock gekocht und auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen (siehe 2.2.2.3). Die Proteine wurde im Western Blot auf eine Membran transferiert und mit den gewünschten Antikörpern nachgewiesen (siehe 2.2.2.4).

### 2.2.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen (SDS-PAGE)

In Anwesenheit von SDS, einem denaturierenden Reagenz, lassen sich Proteine in diskontinuierlichen Polyacrylamidgelen nach ihrem Molekulargewicht unabhängig von ihrer Ladung auftrennen. In dem verwendeten diskontinuierlichen Laemmli-System (Laemmli, 1970) besteht dieses Gel aus einem Sammelgel (Tris-Glycin-Puffer pH 6,6; 3-4 % Acrylamid), welches das Trenngel (Tris-Glycin-Puffer pH 8,8; 5-20 % Acrylamid) überschichtet.

In dieser Arbeit wurde ein 12 % Trenngel und ein 5 % Sammelgel benutzt:

Für ein 12 %iges Acrylamidgel (bezogen auf 5 ml) wurden 2 ml 30 % Acrylamid-Mix (Roth), 1,3 ml eines 1,5 M Tris- Puffers (pH 8,8), 1,6 ml A. bidest, 50 µl 10 % SDS, 50 µl 10 % APS und 2 µl TEMED (BioRad) benötigt. Das 5 %ige Sammelgel (bezogen auf 1 ml) bestand aus 170 µl 30 % Acrylamid-Mix, 130 µl eines 1.5 M Tris-Puffers (pH 6,8), 680 µl A. bidest, 10 µl 10 % SDS, 10 µl 10 % APS und 1 µl TEMED.

Die Gelelektrophorese erfolgte in vertikalen Elektrophorese-Apparaturen bei 150-200 V für 1-2 Stunden.

Um das Molekulargewicht der aufgetrennten Proteine bestimmen zu können, wurde ein Protein Standard (Precision Plus Protein<sup>TM</sup> Standard, BioRad) auf jedem Gel mit aufgetragen und aufgetrennt.

### 2.2.2.4 Western-Blot-Analyse

Die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden bei Blotten elektrophoretisch auf eine Membran (Immobilion P-Membran, Millipore, Bedford, USA) übertragen. Als Blotapparat wurde der semi-dry Trans-Blotter der Fa. BioRad verwendet. Vor dem Zusammenbau der Apparatur musste die Membran zunächst in Methanol aktiviert werden und dann zusammen mit dem Gel und den zurecht geschnittenen Filterpapieren kurz in Transferpuffer inkubiert werden. Für den Transfer wurden auf die Pluspolplatte die drei Filterpapiere, dann die Membran, das Gel und erneut drei Filterpapiere geschichtet. Die Apparatur wurde geschlossen und der Transfer erfolgte bei einer Stromstärke von 0,8-1,2 mA pro cm<sup>2</sup> Gel für 1 Stunde. Anschließend wurde der Transfer durch eine 1-3minütige Inkubation in Ponceau S-Lösung (Sigma) und anschließendes Differenzieren mit H<sub>2</sub>O qualitativ kontrolliert.

Nach Beendigung des Blotvorgangs wurde die Membran 10 min in TBS gewaschen und dann für 1 Stunde in TBS/Milchpulver geblockt. Nach weiterem Waschen mit TBSTT (2 mal 10 min) wurde der primäre Antikörper ü.N. in TBS/Milchpulver bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran wiederum gewaschen (2 x 10 min TBSTT; 1 x 10 min TBS) und dann der Meerrettich-Peroxidase-gekoppelte sekundäre Antikörper in TBS für eine Stunde bei RT zugegeben. Nach 4maligem Waschen in TBSTT (je 10 min) wurden die gebundenen Antikörper mit dem ECL<sub>Plus</sub> Western Blot Detection Kit (Amersham) nach Angaben des Herstellers detektiert. Die Membran wurde auf einen Röntgen Film (Expositionszeit 30 sec - 2 h) aufgelegt und der Film dann entwickelt.

### 2.2.3 Arbeiten mit der Fruchtfliege *D. melanogaster*

#### 2.2.3.1 Haltung und Züchtung

Die Fruchtfliege *D. melanogaster* wurde in kleinen Röhrchen mit einem Durchmesser von ca. 3 cm und einer Höhe von ca. 10 cm gehalten. Dieses Röhrchen war im unteren Viertel mit Fliegenfutter aufgefüllt und mit einem Wattestopfen verschlossen. Die Raumtemperatur betrug für die dauerhafte Haltung 16 °C. Diese Temperatur konnte bis auf 25 °C erhöht werden, wenn die Fliegen amplifiziert werden sollen.

Um die Embryonen und Larven sammeln zu können, wurden die Fliegen in zylinderförmige Käfige umgesetzt. Diese Käfige wurden dann auf mit Apfelsaftagar gefüllten Petrischalen gestellt. Auf diesem Apfelsaftagar, der zusätzlich noch mit etwas Trockenhefe bestreut wurde, legte *D. melanogaster* ihre Eier ab.

#### 2.2.3.2 Genotypisierung der P(x)16 Fliegen

In verschiedenen Experimenten dieser Arbeit war es wichtig, den Genotyp der verwendeten Embryonen und Larven der P(x)16/ FM7 Fliegenlinie eindeutig zu bestimmen. Für diese Genotypisierung wurden in dieser Arbeit zwei Methoden verwendet.

### **Sortieren der Embryonen und Larven nach Merkmalen des Balancer-Chromsoms:**

Homozygote *kropf* P(x) 16 Embryonen und Larven konnten durch die Abwesenheit der GFP Expression, welche vom FM7,*GAL4-Kr::UAS-GFP* Balancer vermittelt wurde, identifiziert werden.

Embryonen wurden dafür zunächst von der Apfelsaft-Agarplatte mit einem Pinsel auf ein kleines Sieb überführt und mit A. bidest. gewaschen. Um die Fluoreszenz besser sehen zu können, wurde durch die Inkubation mit 8 % Natriumhypochlorid für drei Minuten die Chorionhülle abgelöst. Danach wurden die Embryonen gut mit Wasser gewaschen und wieder auf eine Apfelsaft-Agarplatte überführt. Durch den Apfelsaftagar wurden die Embryonen vor dem Austrocknen bewahrt und konnten unter der Fluoreszenz-Stereolupe sortiert werden.

### **Sortieren der Larven mit Hilfe des Fütterungstestes (engl.: feeding assay):**

Die homozygoten P(x)16 Larven wiesen als Phänotyp den sogenannten Fütterungsdefekt auf, bei dem das Futter im Pharynx der Larven stecken blieb (Bauer *et al.*, 2002). Diese Larven konnten durch den Fütterungstest (Pankratz und Hoch, 1995) identifiziert werden. Bei diesem Test wird der Transport von Nahrung durch den larvalen Intestinaltrakt durch rot gefärbte Hefe (Farbstoff Carminrot (Roth)) sichtbar gemacht. Diese gefärbte Hefe wurde den schlüpfenden Larven angeboten und nach 6-12 h konnte mit Hilfe einer Stereolupe die Passage der rot-gefärbten Hefe durch den Intestinaltrakt der durchsichtigen Larven verfolgt werden. Die Larven konnten so nach dem gewünschten Merkmal sortiert werden.

#### **2.2.3.3 Das UAS/GAL4-System**

Das UAS/GAL4 System erlaubt die ektopische Expression von Genen zu einem bestimmten Zeitpunkt und in einem bestimmten Gewebe (Brand und Perrimon, 1993). Das System besteht aus einer Aktivator- und einer Effektor-Komponente. Der Aktivator ist der Hefe-Transkriptionsfaktor GAL4. Dieser bindet an die hefespezifische UAS (upstream activating sequence, (engl.) = stromaufwärts Bindungssequenz) Genkontrollsequenz und aktiviert die Transskription des nachgeschalteten Gens.

Für die kontrollierte Fehlexpression von Genen in *D. melanogaster* wurden durch Verwendung *in-vitro* rekombinierter Konstrukte zwei transgene Fliegenlinien erzeugt (siehe unten): Der Aktivatorstamm (= Treiberstamm) und der Effektorstamm. In dem

Aktivatorstamm wurde der Transkriptionsfaktor GAL4 unter ausgewählten regulatorischen Sequenzen der Fliege exprimiert. Die Expression von GAL4 allein hat keine Auswirkungen, da GAL4 nicht als Aktivator für *D. melanogaster* Gene fungieren kann. Im Effektorstamm war in das Genom ein sogenanntes UAS-Konstrukt integriert, indem das zu exprimierende Gen unter der Kontrolle mehrerer UAS-Elemente stand. Nach Kreuzung von Aktivator- und Effektor-Stamm kam es in dem Teil der Nachkommenschaft, der beide Komponenten trug, zur ektopischen Expression des Zielgens. Die regulatorische Sequenz vor dem Aktivator bestimmte Zeitpunkt und Gewebe dieser Expression. In dieser Arbeit wurden als Aktivatorstamm hsGAL4 verwendet, bei dem GAL4 nach einem Hitzschock bei 37 °C ubiquitär im Organismus transkribiert wird.

### 2.2.3.4 Herstellung transgener Fliegen

Für die Herstellung einer pUAS Fliegenlinie wurde das Konstrukt in Embryonen, welche sich im synzytialen Blastoderm-Stadium befanden, injiziert. Das Konstrukt musste dabei in die Keimzellen gelangen. Damit sich das pUAS-Konstrukt stabil in das Fliegen-genom inserieren konnte, wurde das Enzym Transposase mittels eines Helferphagen bei der Injektion zugegeben. Während der nächsten Zellteilungen im Embryo integrierte das pUAS Konstrukt in das Genom, während sich die Transposase nur transient in den Keimzellen befand. Um die stabile Integration des pUAS Konstruktes verfolgen zu können, befand sich auf dem Konstrukt ein *white* Markergen, welches bei Expression eine rote Augenfarbe bewirkte. Injizierte man das Konstrukt in *white* Embryonen, die eine weiße Augenfarbe haben, konnte man nach Rückkreuzung der injizierten Embryonen mit *white* Fliegen, anhand der Augenfarbe erkennen, ob sich das Konstrukt stabil ins Genom integriert hatte.

Für die Injektion wurden 15 µg Vektor DNS zusammen mit 5 µg Helfer-Phagen-DNS mit Natriumacetat und Ethanol gefällt. Das DNS-Sediment wurde in 50 µl Injektionspuffer gelöst und wurde so in die Embryonen injiziert. 30 Minuten alte Embryonen wurden durch fünfminütige Inkubation in 50 %igem Chlorix von ihrer Chorionhülle befreit und mit Hilfe eines Pinsels auf dem Rand eines Agarblöckchen aufgereiht. Die Mikropyle der Embryonen sollte hierbei immer zu selben Seite zeigt.

Anschließend wurden die Embryonen auf einen Objektträger überführt, auf den sie mit doppelseitigem Klebeband aufgeklebt und leicht getrocknet wurden. Im Anschluss beschichtete man die Embryonen mit wenig Halocarbon-Öl (Sigma Aldrich) und platzierte

den Objektträger so unter dem Mikroskop, dass die Embryonen mit ihrem posterioren Ende zur Injektionsnadel mit dem Injektionspuffer gerichtet waren. Mittels der Feinjustierung des Mikromanipulators brachte man die Nadel in die aufgereihten Embryonen ein und applizierte die DNA Lösung. Im Anschluss wurde dann der Objektträger auf eine Apfelsaft-Agarplatte gelegt und bei 18 °C entwickelten sich die Embryonen weiter. Die überlebenden Larven wurden in ein Fliegenröhrchen überführt und als adulte Fliegen mit *white* Fliegen gekreuzt.

### **2.2.3.5 Farbkopplungs-Experiment**

Für die Farbkopplungsexperimente wurden frisch geschlüpfte Larven zunächst genotypisiert. Homozygote *kropf* Larven konnten durch die Abwesenheit der GFP-Expression identifiziert werden (siehe 2.2.3.2), als Kontrolle wurden *white* Larven verwendet.

Aus den L1 Larven wurden die Proventrikuli unter Ringer-Lösung herauspräpariert und mit angespitzten Wolfram-Drähten auf Soelgard-Medium befestigt. Die Injektion von Lucifer Yellow erfolgte an einem inversen Olympus Injektionsmikroskop mit einem Eppendorf Injektor und ultra-dünn ausgezogenen Injektionskapillaren. Die Bilder wurden an einem Leica TSP2 konfokalen Laser-Mikroskop (Leica) nach zwei, vier und 16 Stunden aufgenommen.

## 2.2.4 Histologische Methoden

### **2.2.4.1 Fixierung von *D. melanogaster* Embryonen**

Es gibt verschieden Methoden in der Fixierung von Geweben, grundsätzlich wird zwischen der Hitze- und Chemischen- Fixierung unterschieden. Bei der Hitzefixierung werden die Proteine durch Hitze denaturiert, welches sich aber negativ für den Strukturhalt in der Zelle auswirkt, aber den Vorteil hat, dass die störende Eigenfluoreszenz des Dotters beseitigt ist. Bei der Chemischen-Fixierung wird durch ein Aldehyd, wobei für die IHC Formaldehyd benutzt wird, die Proteine untereinander vernetzt und so das Gewebe fixiert. Diese Methode weist einen besseren Strukturhalt auf. Im Rahmen dieser Arbeit wurde nur die Chemische-Fixierung verwendet:

Im ersten Schritt der Fixierung wurden die Embryonen zunächst von den Apfelsaft-Agarplatten mit Hilfe eines Pinsels und A. bidest. abgenommen und mit einer Pipette in ein

kleines Siebchen überführt. Nachdem die Embryonen mit A. bidest abgewaschen wurden, wurde durch die Inkubation in 50 %igem Chlorix für 2 min deren Chorionhülle abgelöst. Anschließend wurden die Embryonen mit Wasser gewaschen.

Die dechorionierten Embryonen wurden in ein mit 4 ml Heptan gefülltes Fixiergläschen überführt, 4 ml 4 % iges PFA wurden zugegeben, das Gläschen fest verschlossen und auf dem Schüttler inkubiert (20 min, 250 U/min, RT). Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die untere Phase des Gemischs mit Hilfe einer Glaspipette entfernt und zum Überstand 8 ml Methanol gegeben. Das Gemisch wurde für 30 sek geschüttelt, um die Vitellinmembran zu entfernen. Nach der erneuten Phasentrennung sanken die gut fixierten Embryonen auf den Grund des Gefäßes. Die beiden Phasen wurden mit Hilfe einer Glaspipette abgenommen und die verbleibenden Embryonen mit Methanol gewaschen. Die Embryonen wurden in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und bis zu ihrer Verwendung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### **2.2.4.2 Präparation und Fixierung des larvalen Proventrikulus**

Die Präparation des Proventrikulus kann in allen Larvenstadien von *D. melanogaster* durchgeführt werden. Dazu wurden die Larven in Rob's Medium in ein Uhrmachergläschen überführt. Diese Lösung hat den Vorteil, dass sie relativ viskos ist, und damit die Bewegung der Larven verlangsamt ist. Nun wurde mit einer feinen Pinzette (bei Larven des L1 Stadiums: Dumont Nr.5 Biologie) die Mundhaken gefasst und mit einer zweiten (bei allen Stadien reicht hierzu eine Dumont Nr.5) die Mitte des Körpers. Dann wurden vorsichtig die beiden Pinzetten auseinander gezogen und somit der Darm, welcher an den Mundhaken hängt, freigelegt. Der Darm mit den Mundhaken wurde nun in ein zweites Uhrmachergläschen überführt, in dem sich das Fixans (kaltes 4 % PFA) befand.

Die Fixierung fand nun bei  $4^{\circ}\text{C}$  für 1-2 h statt. Anschließend wurde mit PBST das Fixans gründlich aus dem Gewebe herausgewaschen und direkt die immunhistochemische Färbung angeschlossen. Es hatte sich im Rahmen dieser Arbeit bewährt, die Färbung in 2 ml Glasgefäßen durchzuführen, da somit der Verlust des präparierten Gewebes während des Färbeprotokolls minimiert werden konnte.

### **Methanol-Fixierung für die Tubulin Antikörper Färbung:**

Für die immunhistochemische Färbung des Tubulin-Zytoskeletts mussten die Proventrikuli Methanol-fixiert werden (abgewandelt nach Januschke, 2006). Dazu wurden die präparierten Proventrikuli 15 min bei 30 °C in PBST inkubiert und anschließend zügig in gekühltes Methanol überführt und 1 h bei –20 °C inkubiert. Die Rehydrierung wurde langsam in einer absteigenden Methanolreihe durchgeführt und konnten dann für die immunhistochemische Färbung verwendet werden.

#### **2.2.4.3 Immunhistochemische Färbung**

Bei der immunhistochemische Färbung wird mit Hilfe der spezifischen Antigen-Antikörper-Reaktion ein Protein im mikroskopischen Bild sichtbar gemacht: Dabei bindet der primäre Antikörper an das zu untersuchende Protein. Um diese Antikörper-Antigen-Reaktion sichtbar zu machen, wird ein zweiter Antikörper, der gegen ein Epitop des primären Antikörpers gerichtet ist, markiert.

Bei der fluoreszenten immunhistochemische Färbung wurde ein mit einer fluoreszierenden chromophoren Markierung gekoppelter sekundärer Antikörper verwendet. Die Färbung konnte anschließend im Fluoreszenzmikroskop durch die Anregung von Licht- oder Laserenergie sichtbar gemacht werden. In der sogenannten chemischen Färbung wird der sekundäre Antikörper an ein Enzym gekoppelt. Bei der anschließenden Zugabe eines Substrats wird dieses von dem Enzym in ein wasserunlösliches Präzipitat umgesetzt, welches im Hellfeld eines Lichtmikroskops zu sehen ist.

Für die immunhistochemische Färbung an Embryonen und an präparierten Proventrikuli wurde dasselbe Protokoll verwendet. Da die Embryonen aber in Methanol gelagert wurden, mussten diese in einem ersten Schritt durch mehrmaliges Waschen in PBST rehydriert werden.

Ein weiterer Unterschied in der Durchführung war, dass sämtliche Schritte bei der Färbung der Embryonen in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß durchgeführt wurden, welches in Inkubationszeiten auf ein Drehrad gestellt wurde. Die Proventrikuli dagegen wurden in einem 2 ml Rollrand-Gläschen gefärbt, welches in den Inkubationsschritten nur auf eine Wippe gestellt wurde. Bei den Lösungen wurden in den entsprechenden Schritten für die Embryonen

stets mit 0,1 % Triton-X100 versetztes PBS (PBST) verwendet, für Proventrikuli wurde das Triton höher konzentriert eingesetzt, 0,3 % Triton-X100 in PBS.

### **„Fluoreszente“ immunhistochemische Färbung:**

- 30 min Inkubation mit 2 % Serum in PBST (PBSTN)
- Inkubation mit dem primären Antikörper in 2 % PBSTN für 2 h bei RT oder ü. N. bei 4 °C
- Abnehmen des primären Antikörpers
- 3x 15 min waschen mit PBT
- 30 min Inkubation mit 2 % Serum in PBST
- Inkubation mit dem sekundären Antikörper in 2 % PBSTN für 2 h bei RT
- Abnehmen des sekundären Antikörpers
- 4x 15 min Waschen mit PBT
- Einbettung der Embryonen und der Proventrikuli in Gelmount auf einem Objektträger.

### **„Chemische“ immunhistochemische Färbung:**

- 30 min Inkubation mit 2 % Serum in PBST (PBSTN)
- Inkubation mit dem primären Antikörper in 2 % PBSTN für 2 h bei RT oder ü. N. bei 4 °C
- Abnehmen des primären Antikörpers
- 3x 15 min waschen mit PBT
- 30 min Inkubation mit 2 % Serum in PBST
- Inkubation mit dem biotinylierten sekundären Antikörper in 2 % PBSTN für 30 min bei RT
- Abnehmen des sekundären Antikörpers
- 3x 10 min Waschen mit PBT
- Inkubation mit der Streptavidin gekoppelten Meerrettich-Peroxidase (AB Lösung aus dem „Vectastain-ABC-Kit“, Vector-Laboratories, Burlingame, USA) für 30 min, RT
- Abnehmen der AB-Lösung
- 3x 10 min Waschen mit PBT

Die endgültige Färbung erfolgt danach in 500 µl Färbelösung („Peroxidase Substrate Kit“, Vector-Laboratories: 480 µl A. bidest, 10 µl Pufferkonzentrat, 20 µl DAB, 10 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) und wird nachdem man sie unter einer Stereolupe verfolgt hat, durch zweimaliges Waschen mit PBT gestoppt. Um Dauerpräparate zu erhalten werden die Embryonen durch eine

aufsteigende Ethanol/PBST-Reihe dehydriert und dann in Kanadabalsam auf einem Objektträger eingebettet.

### **2.2.4.4 *In-situ*-Hybridisierung (ISH)**

Bei der Methode der *in-situ*-Hybridisierung wird die mRNA eines bestimmten Gens in einem Gewebe oder gesamten Organismus lokalisiert. Dies ist möglich, in dem das Gewebe mit einem komplementären Gegenstück zu der endogenen mRNA inkubiert wird, welche sich dann an die endogene mRNA anlagert. Die Detektion erfolgt über eine bei der Synthese der RNA Sonde eingefügten Digoxigenin (DIG)-Markierung.

#### ***in-situ*-Hybridisierung an laravalen Proventrikuli:**

Die Präparation wurde für die ISH wie oben beschrieben (2.2.4.2) durchgeführt mit der Modifikation, dass das Gewebe direkt im Fixans (4 % PFA) präpariert wurde und anschließend für 3 h fixiert wurde. Alle folgenden Schritte wurden in 2 ml Rollrandgläsern durchgeführt, welche zuvor bei 200 °C sterilisiert wurden.

Im Anschluss an die Fixierung wurde das PFA durch Waschschritte mit PBST entfernt. Um die Zellen zu permeabilisieren, wurde ein Proteinase K-Verdau mit 100 µg/ml Enzym in PBST bei RT für vier Minuten durchgeführt, der anschließend durch 0,2 M HCl abstoppt wurde. Nach dem Waschen in PBST wurde das Gewebe abermals nachfixiert.

Für die Hybridisierung wurden zuerst die Proventrikuli in warmen 2x SSC 10 min äquilibriert. Anschließend wurde die SSC Lösung durch den HYBE-Puffer ersetzt und die Proventrikuli wurden für 1 h bei 65 °C in einem Wasserbad vorhybridisiert. Nach der Zugabe der Sonden erfolgt über Nacht bei 65 °C die spezifische Anlagerung der synthetisierten mRNA an die endogene mRNA in den Zellen.

Für das Posthybridisierungswaschen wurde am nächsten Tag die Sonde abgenommen und die unspezifisch gebundenen Sonden mit folgendem Protokoll gewaschen:

- 2x SSC, 5 min, Temperatur 60 °C.
- 2x SSC, 15 min, Temperatur 60 °C.
- 50 % Formamid in 1x SSC, 15 min, 60 °C.
- 0,1x SSC, 30 min, 65 °C

Hiernach wurde das Gewebe noch 4 mal 10 min mit PBT bei RT gewaschen. Darauf folgte für 2 h die Inkubation mit anti-DIG-Alkalische-Phosphatase-Antikörper-Konjugat, das gegen die eingebaute DIG Markierung gerichtet ist und als Enzymmarkierung eine Phosphatase trägt. Der Antikörper wurde im Anschluss durch vier 20minütige Waschritte mit PBST abgewaschen und die Proventrikuli in AP-Puffer äquilibriert. Danach wurde die Farbreaktion durch die Zugabe des Substrats gestartet (500 µl AP-Puffer, 10 µl NBT/BCIP, Roche). Die Reaktion wurde nach optischer Kontrolle der Signalintensität (nach 5 min bis zu 2 h) durch Waschen in TE-Puffer abgestoppt und mit PBST gewaschen. Im Anschluss wurden dann die Proventrikuli durch eine aufsteigende Ethanol Konzentration in PBST dehydriert, 2 mal für 10 min in 100 %igen Ethanol gewaschen und in Kanadabalsam auf einem Objektträger eingedeckelt.

Das Protokoll für die *in-situ* Hybridisierung an Embryonen unterscheidet sich grundsätzlich nicht von dem oben beschriebenen Protokoll. Die Schritte wurden wie schon für die Antikörper-Färbung beschrieben in 1,5 ml Reaktionsgefäßen durchgeführt. Als einzige Änderung in der Durchführung wurden die Embryonen im ersten Schritt nach dem Rehydrieren für 15 min postfixiert.

### 2.2.5 Elektronenmikroskopie

#### 2.2.5.1 Fixierung und Einbettung für ultrastrukturelle Untersuchungen

Für die ultrasstrukturellen Untersuchungen mussten während der Fixierung einige wichtige Punkte beachtet werden. Zunächst einmal durfte das Gewebe nicht mit Methanol in Kontakt kommen, um die Lipide nicht auszuwaschen. Entsprechend durften Embryonen nicht mit Methanol devitellinisiert werden (siehe Kapitel 2.2.4.1) und wurden für den besseren Strukturerhalt mechanisch (per Hand) devitellinisiert. Ein nächster Punkt waren die verwendeten Puffer. Wegen der osmotischen Empfindlichkeit der Zellen musste für den Erhalt der Zellorganellen und Zellstrukturen darauf geachtet werden, dass die Fixierlösungen isotonisch gepuffert waren.

Bei der Fixierlösung wurde eine Kombination aus Formaldehyd und Glutaraldehyd verwendet. Beide Aldehyde reagieren mit den Aminogruppen und Aminolipiden, und dadurch erfolgt die Quervernetzung der Proteine. Formaldehyd hat den Vorteil, dass es schneller in das Gewebe eindringt und somit schneller die Autolyse des Gewebes unterbindet. Der Strukturerehalt ist aber nicht sehr gut, und somit wird es in der Elektronenmikroskopie nur in Verbindung mit Glutaraldehyd verwendet, welches zwar nicht so schnell das Gewebe fixiert, dafür aber einen höheren Vernetzungsgrad bewirkt und somit zu einem besseren Strukturerehalt führt. Für die Fixierung der Lipide wurde das Gewebe mit Osmiumtetroxid behandelt. In dieser Fixier-Reaktion wird Osmiumtetroxid reduziert und bindet an positiv geladene Gruppen, z.B. polare Gruppen von Phospholipiden in Membranen. Neben der Fixierung der Lipide, die das Auswaschen bei den Entwässerungsschritten mit Aceton verhindert, wird so der Kontrast deutlich erhöht (siehe Kapitel 1.4).

Bei den Entwässerungsschritten war darauf zu achten, dass diese schrittweise und langsam durchgeführt wurden, um Schrumpfungartefakte zu reduzieren.

### **Fixierung von Embryonen:**

Die Embryonen wurden dechorioniert (siehe Kapitel 2.2.4.1) und anschließend mechanisch devitellinisiert: Dafür wurden sie in einem Karnovsky Fixans/Heptan Gemisch (im Verhältnis 1:1) für 20 min fixiert. Anschließend wurden die Embryonen auf einem Apfelsaftagarstück aufgereiht und mit doppelseitigem Klebeband auf einen Objektträger geklebt. Der Objektträger wurde mit der Klebeseite nach unten vorsichtig an die Embryonen gedrückt. Bei den mit PB Puffer (pH 7.2) überschichteten Embryonen wurde mit einer spitzen Glaskanüle die Vitellinmembran gelöst. Über Nacht wurden die Embryonen dann bei 2,5 % GA in PB Puffer bei 4 °C fixiert. Danach erfolgte die Fixierung mit 2 % Osmiumtetroxid in A. bidest für 1 h bei RT. Optional wurde dann das Gewebe mit 1 % Uranylacetat gefärbt. Zwischen allen Schritten wurde stets mit Puffer gründlich gewaschen.

Die Entwässerung wurde in den Schritten 30 % EtOH, 50 % EtOH, 70 % EtOH, 90 % EtOH, 98 % EtOH, 100 % EtOH und zweimal 100 % Aceton durchgeführt. Danach wurde das Gewebe über Nacht in eine 1:1 Aceton/Durcupan-Lösung mit dem Kunstharz infiltriert und anschließend ein bis zwei Tage in reinem Durcupan bei 4 °C inkubiert. Die Embryonen wurden in Förmchen eingebettet und über die Temperaturstufen 40 °C, 50 °C und 60 °C für je einen Tag ausgehärtet.

### **Fixierung von Proventrikuli:**

Für die Fixierung der Proventrikuli wurde das gleiche Protokoll wie oben mit einigen Modifikationen verwendet. Die Präparation des Gewebes, aus den Larven erfolgte in 4 % FA in PB-Puffer. Anschließend wurde das Gewebe um es vor mechanischen Artefakten während der nachfolgenden Schritte zu schützen, in 2 % Agarose (in PB-Puffer) eingebettet. Dazu wurde ein Objektträger mit einer dünnen Schicht gelöster Agarose überzogen, das Organ ausgerichtet und mit einem Tropfen nicht zu heißer Agarose bedeckt. Mit einem Skalpell konnte nun ein Würfel geschnitten werden, der leicht mit einer Pinzette überführt werden kann. Die Proventrikuli wurden anschließend für 2 h in Karnovsky Fixans inkubiert. Alle weiteren Schritte wurden dann wie oben beschrieben durchgeführt.

### **2.2.5.2 Herstellung von Semidünnschnitten**

Nach der Einbettung der Gewebe wurden die Einbettungsformen pyramidenförmig angetrimmt. Die Semidünnschnitte (2 µm) wurden mit einem Glasmesser am Mikrotom REICHERT OM 2 geschnitten, in einen Wassertropfen (auf einen Objektträger) überführt und für 20 min auf einer 50 °C heißen Heizplatte gestreckt. Nach der Trocknung wurden das Gewebe mit dem „Schnellfärber“ für ca. 45 Sekunden gefärbt, mit A. bidest differenziert, getrocknet und in DePex (Serva) eingedeckelt.

### **Schnellfärber für Semidünnschnitte:**

1 g Azur II in 100 ml H<sub>2</sub>O dest

1 g Methyleneblau in 100 ml 1 % Natriumtartrat Borat Lsg. (Borax) Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> x 10 H<sub>2</sub>O

Beides filtrieren und im Verhältniss 1:1 mischen

### **2.2.5.3 Herstellung von Ultradünnschnitten für die elektronenmikroskopische Analyse**

Ultradünnschnitte (ca. 100 nm - golden bis silberfarbig) wurden mit einem Diamantmesser am Mikrotom (Reichert OM 2) geschnitten, auf Kupfernetzchen überführt und getrocknet.

Für die Kontrastierung der Schnitte wurden die Schnitte auf den Netzen mit einer 2% Uranylacetat Lösung für 5 min inkubiert; mit A. bidest gewaschen auf den Netzen mit einer Bleicitratlösung für 10 min im Dunkeln inkubiert. Nach erneutem Waschen in A. bidest wurden die Netzen getrocknet und mit einem Elektronenmikroskop Libra 120 (Zeiss) analysiert.

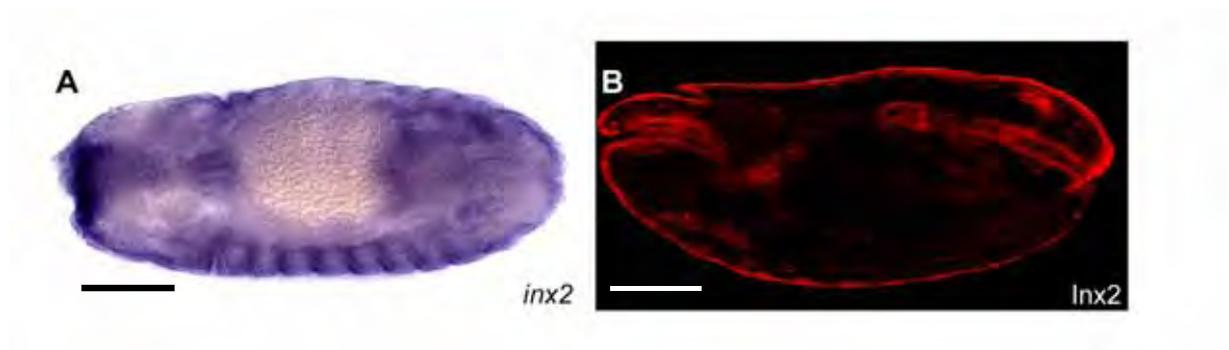
### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Verteilung und Funktion von Innexin 2 in embryonalen Geweben

##### 3.1.1 Charakterisierung der Proteinexpression von Innexin 2 in embryonalen Geweben

Wie vorangegangene Studien gezeigt haben, ist *innexin 2* mRNA in vielen Geweben exprimiert. In frühen Embryonalstadien zeigt *innexin 2* eine ubiquitäre Verteilung, aber mit der beginnenden Gastrulation erkennt man in der Epidermis ein segmentales Muster (Abb. 3.1 A; Curtin *et al.*, 1999; Stebbings *et al.*, 2000; Bauer *et al.*, 2002; Stebbings *et al.*, 2002).

Die Lokalisation des Proteins wurde durch immunhistochemische Färbung mittels konfokaler Laserscannmikroskopie untersucht und bestätigte weitgehend in den frühen Stadien das Verteilungsmuster der mRNA. Während der späteren Embryogenese, konnte die Innexin 2-Expression hauptsächlich in der Epidermis, sowie im Vorder- und Hinterdarmbereich detektiert werden. Aber auch weitere Gewebe, wie zum Beispiel die Speicheldrüse zeigten eine deutliche Färbung (Abb. 3.1 B).

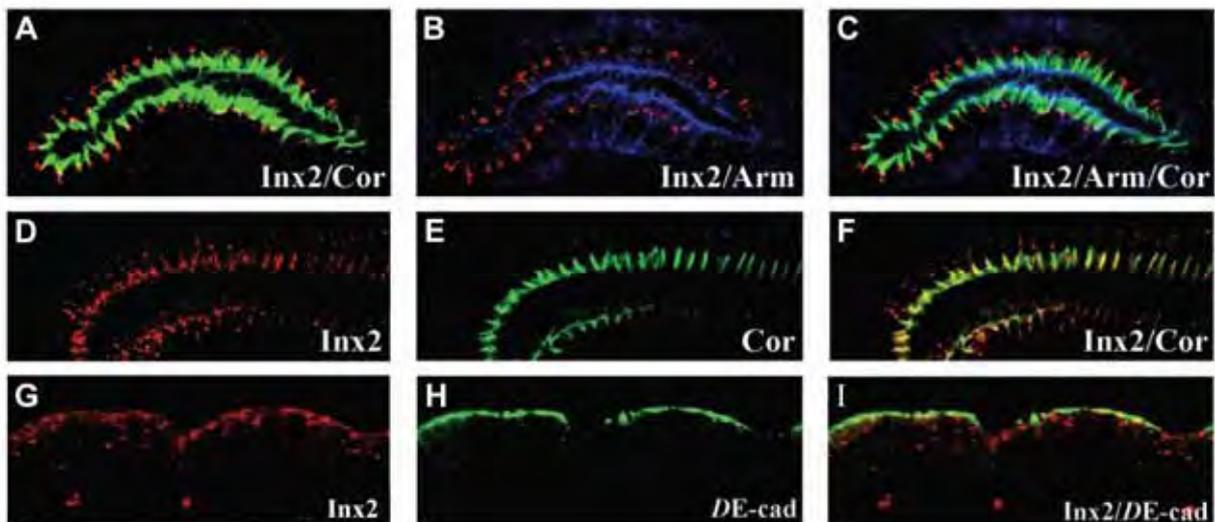


**Abb. 3.1: Die Verteilung von *innexin 2* mRNA und Innexin 2 Protein im *Drosophila* Embryo.** Nachweis der *innexin 2* mRNA (*inx2*) durch *in situ* Hybridisierung in einem Stadium 14 Embryo. (B) Nachweis der Protein Lokalisierung von Innexin 2 (*Inx2*) durch immunhistochemische Färbung in einem Stadium 16 Embryo. Maßbalken entsprechen 0,1mm.

Bei einer detaillierteren Ansicht auf einzelne Organe / Gewebe erkennt man zunächst, dass Innexin 2 in einem punktierten Muster an der lateralen Plasmamembran vorkommt. Ebenso erkennt man teilweise einzelne Punkte im Zytoplasma (Abb. 3.2). Um eine genaue Aussage über die Lokalisation des Innexin 2-Proteins in den einzelnen Geweben machen zu können, wurden Doppel- oder Tripelfärbungen mit Antikörpern gegen verschiedene

Membrandomänen durchgeführt. So wurden die Adherens junctions an der apiko-lateralen Seite der Zellen mit Antikörpern gegen *DE-cadherin* und *Armadillo* markiert. *Armadillo*, das *D. melanogaster* Homologe von  $\beta$ -Catenin, ist in seiner subzellulären Lokalisation auf die *Zonula adhaerens* begrenzt und an deren Zellfunktionen beteiligt (Cox *et al.*, 1996; Tepass *et al.*, 2001). Die *Septate junctions* werden durch das *Septate junctions*-assoziiertes Protein *Coracle* markiert, welches zur *Protein 4.1*-Superfamilie der zytoplasmatischen Proteine gehört (Fehon *et al.*, 1994).

In Abb. 3.2 sind exemplarisch drei verschiedene Gewebearten dargestellt. In den Speicheldrüsen ist *Innexin 2* deutlich an der baso-lateralen Membran unterhalb der *Zonula adhaerens* und der *Septate junctions* akkumuliert (Abb. 3.2 A-C). Im Hinterdarm und in der Epidermis ist *Innexin 2* vermehrt lateral und apiko-lateral lokalisiert (Abb. 3.2 D-I). In beiden Färbungen erkennt man eine Überlappung mit anderen Zellverbindungen: Im Hinterdarm ist *Innexin 2* in der Region der *Septate junctions* akkumuliert, in der Epidermis in der Region der *Zonula adhaerens*.



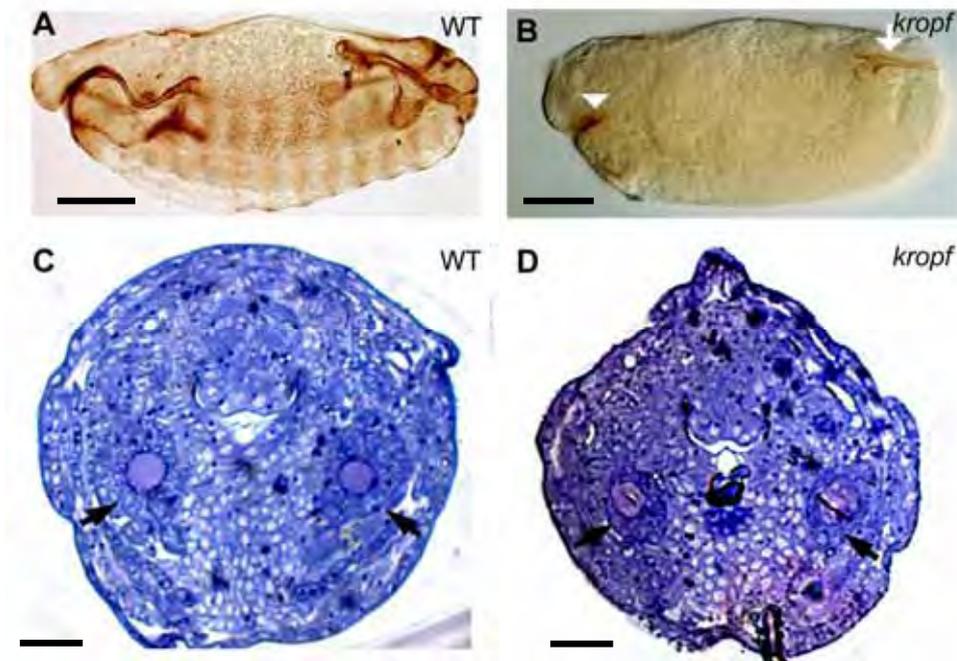
**Abb. 3.2: Zelluläre Verteilung von Innexin 2 in *D. melanogaster* wildtypischen Embryos.**

Immunohistochemische Färbungen der Speicheldrüse (A-C) und des Hinterdarms (D-F) von Stadium 16 Embryonen sowie der Epidermis von einem Stadium 14 Embryo (G-H). Anti-Coracle (Cor in grün) markiert die *Septate junctions* und anti-Armadillo (Arm in blau) die *Adherens junctions*. In G-H ist die Epidermis eines Stadiums 14 Embryos zu sehen. Hier ist wiederum *Innexin 2* in rot, der *Adherens junctions* Marker *DE-cadherin* (*DE-cad*) in grün angefärbt.

### 3.1.2 Der embryonale *kropf* Phänotyp

#### 3.1.2.1 Innexin 2 ist notwendig für die epitheliale Morphogenese.

Vorangegangene Studien haben gezeigt, dass der *kropf* Phänotyp eine große Varianz aufweist: 2/3 der homozygoten *kropf* Mutanten erreichen nicht das Larvenstadium, das restliche Drittel stirbt dann im ersten larvalen Stadium (L1) (Bauer *et al.* 2002).



**Abb. 3.3: Innexin 2 ist notwendig für die epitheliale Morphogenese**

A, B: Immunhistochemische Färbung von Crumbs in Stadium 13 wildtypischen (A) und *kropf* (B) Embryonen. Bei dem Vergleich ist zu erkennen, dass alle Gewebe, welche während der Embryogenese invaginieren, inklusive Vorderdarm (Pfeilkopf) und Hinterdarm (Pfeil), malpighischen Gefäßen, Speicheldrüsen und Tracheensystem in der Größe bei der Mutante stark reduziert sind. In dem Vergleich zu den transversalen Schnitten durch Stadium 15 wildtypischen (C) und *kropf* (D) Embryonen wird aber die Varianz des *kropf* Phänotyps deutlich: Die Zellform ist in der Mutante in D zwar verändert, komplett entwickelt sind im Gegensatz zu B Organe wie die Speicheldrüse. Maßbalken entsprechen 0,1 mm.

Die embryonal letalen Mutanten weisen zum Teil schwere Kutikula-Defekte mit großen Löchern auf (Lehmann, 2003). In dieser starken Ausprägung des *kropf* Phänotyps kann man auch schwere Defekte in der Organogenese feststellen. In Abb. 3.3 A und B sind die ektodermalen Gewebe mit dem apikalen Marker Crumbs angefärbt. Während im Wildtyp Embryo deutlich Vorder- und Hinterdarm zu erkennen sind, ist im *kropf* Embryo der Hinterdarm deutlich verkürzt und der Vorderdarm kaum ausgebildet. Die eingangs erwähnte Varianz des *kropf* Phänotyps wird auch im Vergleich zu Semidünnschnitten deutlich. In den transversalen Schnitten erkennt man in der *kropf* Mutante die gut ausgeprägte Speicheldrüse

und den Vorderdarm. Die Zellen der Gewebe bilden einen festen Zellverband aber die Morphologie der Speicheldrüse erscheint im Vergleich zum Wildtyp unregelmäßig (Abb. 3.3 C, D). Dieser Eindruck der nicht gleichmäßig geformten Zellen verstärkt sich bei der Gesamtübersicht.

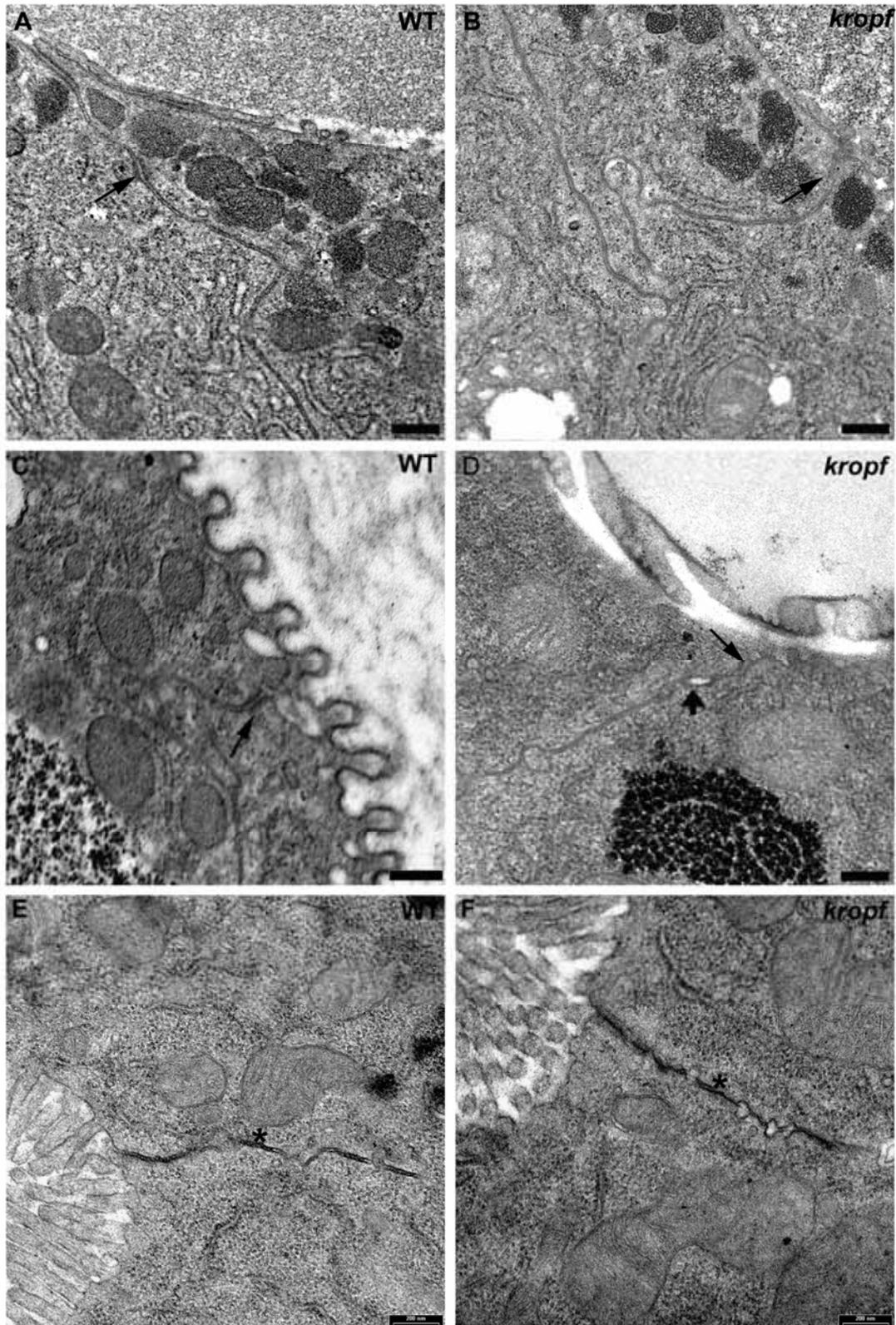
### **3.1.2.2 Innexin 2 ist notwendig für die Ausbildung der Zonula adhaerens.**

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der *kropf* Phänotyp elektronenmikroskopisch untersucht und mit wildtypischen Embryonen verglichen. Für die Untersuchung wurden *kropf* Embryonen ausgesucht, bei denen offensichtlich Organe, wie Vorderdarm und Speicheldrüsen, gut entwickelt waren.

In Abb. 3.4 ist die apikale Zellkontakt-Region in verschiedenen Geweben zu sehen. In den wildtypischen ektodermalen Geweben, Speicheldrüse (Abb. 3.4 A) und Trachee (Abb. 3.4 C) ist deutlich die apikal lokalisierte Zonula adhaerens zu sehen (Pfeilspitzen). Diese weist im Wildtyp eine deutliche filzartige Auflagerung auf, bei der es sich um Actinfilamentbündel handelt.

Diese Struktur war so nicht in der *kropf* Mutante zu sehen. Sowohl in der Speicheldrüse (Abb. 3.4 B) als auch in der Trachee (Abb. 3.4 D) konnte nicht die typische zytoplasmatische Auflagerung erkannt werden. Dabei verändert sich innerhalb der Zonula adhaerens der Abstand der benachbarten Plasmamembranen nicht nennenswert. Für die *kropf* Mutante kann daher keine Aussage getroffen werden kann, ob die gesamte Struktur der Zonula adhaerens fehlt oder vielleicht nur das aufgelagerte Actinfilament betroffen ist.

Ein weiterer Unterschied fiel in dem *kropf* Tracheengewebe auf. Hier ist in der apikalen Kontaktzone ein größerer Spalt zwischen den Plasmamembranen zu sehen. Dies lässt vermuten, dass der Kontakt zwischen den beiden Membranen gelockert wäre (Pfeilkopf in Abb. 3.4 D). Hinweise, dass dies eine tatsächliche Abnormalität und nicht auf die Präparation zurückzuführen ist, konnten im endodermalen Gewebe des anterioren Mitteldarms von L1 Larven gefunden werden. Im Bereich der Septate junctions waren häufig in blasenartiger Struktur Erweiterungen des interzellulären Raums zu finden (Abb. 3.4 E). Zu beachten ist, dass endodermale Zellen eine andere apikale Region als ektodermale Zellen haben. So findet man in diesen Zellen keine Zonula adhaerens.



**Abb. 3.4: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der apikalen Kontaktzone verschiedener Gewebe**  
 In A, C und E sind die wildtypischen Zellen dargestellt und in B, D und F die der *kropf* Mutanten. (A-D) zeigen transversale Schnitte von Stadium 16 Embryonen. In A und B sind Zellen der Speicheldrüse zu sehen und in C und D Zellen der Tracheen dargestellt. In (A-D) ist die apikale Kontaktzone durch die Pfeile markiert. (Fortsetzung auf S. 52)

**Fortsetzung Abb. 3.4:** Im Wildtyp erkennt man deutlich die elektronendichte Struktur der Zonula adhaerens. In beiden Geweben der *kropf* Mutante erscheint diese Struktur verändert.

In E und F sind Querschnitte durch den anterioren Bereich des Mitteldarms von L1 Larven zu sehen. Hier erkennt man, dass die Plasmamembranen zwischen benachbarten Zellen bei *kropf* Mutanten nicht dicht aufeinander liegen, sondern sich Blasen zwischen den Membranen gebildet haben (Pfeilspitzen). Die Maßbalken entsprechen 200 nm.

### 3.2 Der Proventrikulus, ein System für die Analyse der Innexin 2 Funktion

Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Einfluss von Innexin 2 auf die Zellmorphologie und die Zellkontakte untersucht werden. Ein Problem in der Analyse des embryonalen *kropf* Phänotyps war die Varianz des Phänotyps. Wie oben beschrieben treten neben Embryonen, bei denen sich keine Organe ausbilden, auch solche, die sogar schlüpfen können und erst im ersten larvalen Stadium letal sind, auf. Durch diese Varianz war es schwierig, Ergebnisse zu reproduzieren. Für eindeutige Aussagen ist aber eine Reproduzierbarkeit von Ergebnissen einhergehend mit einer hohen Penetranz des Phänotyps unumgänglich. Für weitere Analysen war es somit notwendig, ein System zu finden, in dem Innexin 2 stark exprimiert ist und so vermutlich eine wichtige Funktion hat, welches zudem in der Verlustmutante zu einem definierten Phänotyp führt.

Als ein derartiges System bot sich der Proventrikulus an. Der Proventrikulus ist an der Grenze zwischen Vorder- und Mitteldarm lokalisiert und bildet durch Invaginationsprozesse während der Embryonalentwicklung ein dreilagiges Organ aus (siehe Kapitel 1.3).

Innexin 2 ist während der Embryogenese stark im Proventrikulus exprimiert (Abb. 3.1) und schon in früheren Arbeiten unseres Labors konnte gezeigt werden, dass die *innexin 2* Mutante einen Defekt im Proventrikulus aufweist (Bauer *et al.*, 2002). Diese Missbildung ist erst ab den späten Stadien der Embryogenese eindeutig zu identifizieren. Es konnte gezeigt werden, dass alle homozygoten Mutanten, die das Larvenstadium erreichen, diesen sogenannten Invaginationdefekt des Proventrikulus haben. Durch diese hohe Penetranz im Larvenstadium wurden nahezu alle weiteren Versuche an Larven durchgeführt.

### 3.2.1 Charakterisierung der *kropf* Mutanten

Um die homozygoten Individuen von *kropf* Mutanten zu charakterisieren, wurden die Larven einem Fütterungstest unterzogen (Bauer *et al.*, 2002). Dabei wurden sie mit rotgefärbter Hefe gefüttert. Unter der Lupe konnte dann die Futterpassage in den durchscheinenden Larven verfolgt werden.

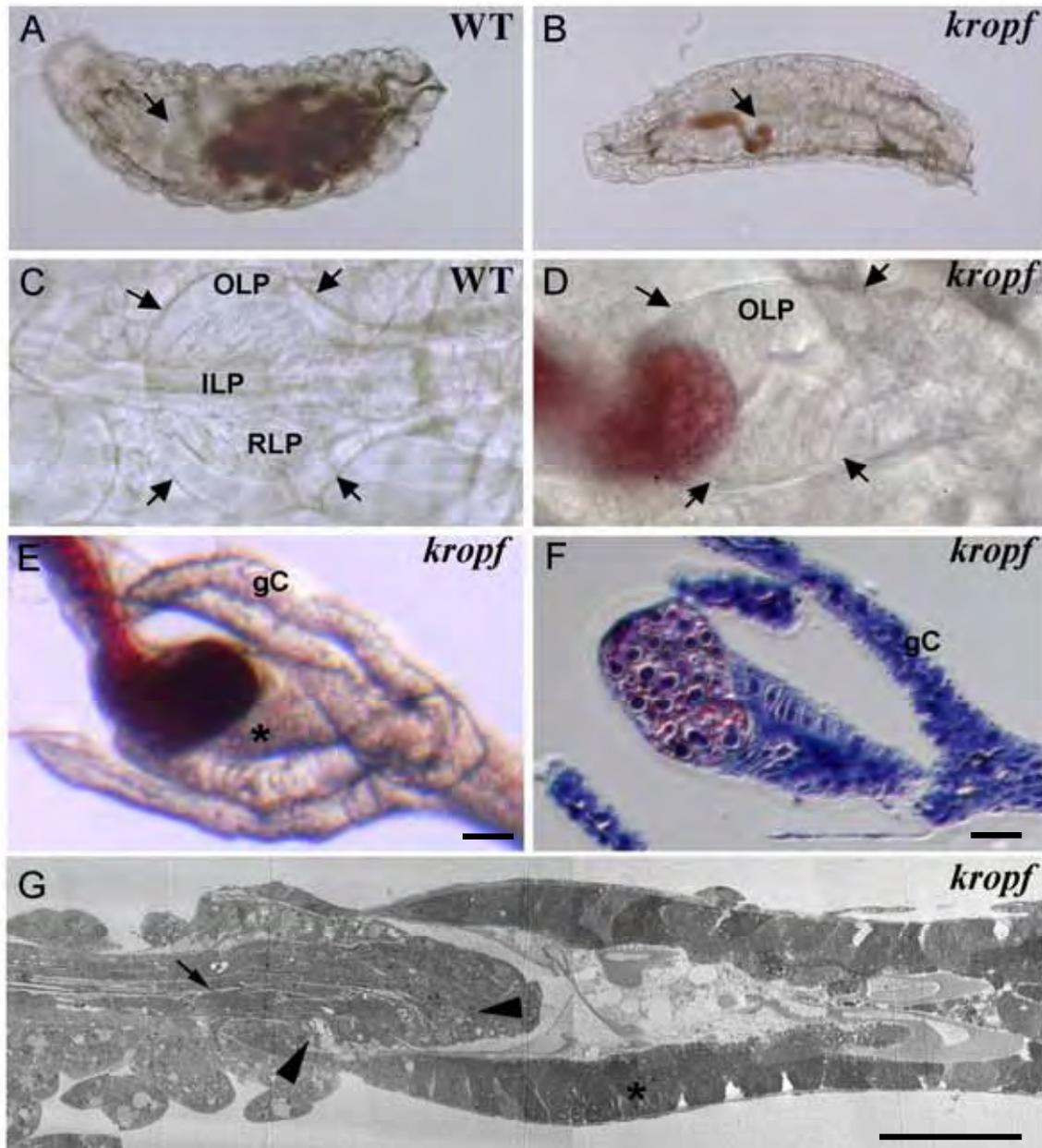
In den homozygoten *kropf* Larven bleibt das Futter im Vorderdarm stecken und erreicht nicht den Mittel- und Hinterdarm wie in den wildtypischen Larven (Abb. 3.5 A und B).

In der Vergrößerung erkennt man, dass das Futter in dem missgebildeten Proventrikulus steckengeblieben ist. In Abb. 3.5 C und D ist der direkte Vergleich zwischen Wildtyp und Mutante zu sehen. Um detaillierte Untersuchungen durchführen zu können, wurde der Proventrikulus freipräpariert. Hier erkennt man sehr gut, wie das Futter im Vorderdarm steckengeblieben ist und nicht durch den Kelch des Proventrikulus gelangen kann (Abb. 3.5 E).

### 3.2.2 Der Invaginationsdefekt des *kropf* Proventrikulus

Um genauer zu sehen, welche Bereiche des Proventrikulus missgebildet sind und um zu bestimmen, auf welche Bereiche besonderes Interesse gelegt werden sollte, wurden die Proventrikuli fixiert, anschließend in Kunstharz eingebettet und semidünn, d. h. 2  $\mu\text{m}$  dick, geschnitten. Die Schnitte wurden angefärbt und konnten dann im Lichtmikroskop analysiert werden (Abb. 3.5 F). Durch diese Präparation ist ein genauer Blick in das Innere des Organs möglich. Ein noch deutlicheres Bild bekommt man aber bei der Analyse im Elektronmikroskop (Abb. 3.5 G). Hierfür wurde der eingebettete Proventrikulus ultradünn geschnitten (ca. 100 nm). Durch diese Präparation und aufgrund der sehr hohen Auflösung des EMs ist es möglich, sehr detailreiche Aufnahmen auch bei niedrigen Vergrößerungen zu erreichen.

Um die Struktur der nicht invaginierten Bereiche besser zu erkennen, wurde der Proventrikulus aus einem Embryo, des Stadium 17, präpariert. Dadurch war es möglich, Dehnungsartefakte im Proventrikulus durch das steckengebliebende Futter zu vermeiden.



**Abb. 3.5: Der Invaginationsdefekt des *kropf* Proventrikulus**

Die Übersichtsaufnahme A zeigt die Verteilung des rot gefärbten Futters im Mittel- und Hinterdarm einer wildtypischen Larve im ersten Larvenstadium. In *kropf* Larven hingegen, bleibt das Futter vor der Proventrikulusstruktur (Pfeile) im Vorderdarm stecken (B). In den Vergrößerungen C und D ist die Ursache für den Fütterungsdefekt in *kropf* Mutanten zu erkennen: Das Gewebe der ILP (Inneren Schicht des Proventrikulus) invaginiert im Laufe der Entwicklung nicht in den endodermalen Proventrikuluskelch (OLP), wie es im Wildtyp der Fall ist. Das Futter gelangt nicht in den Kelch. In E-F sind die freipräparierten Proventrikuli in verschiedenen Darstellungsweisen gezeigt. In E ist eine Durchsicht durch den gesamten *kropf* Proventrikulus zu sehen mit den gastrischen Caeci (gC). Deutlich zu erkennen ist das rote Futter. In F ist eine lichtmikroskopische Aufnahme eines Semidünnschnitts zu sehen und in G die elektronenmikroskopische Aufnahme des Proventrikulus. In G wurde ein Stadium 17 Embryo präpariert, um Dehnungsartefakte durch das steckengebliebene Futter zu vermeiden. In G markiert der Pfeil die ILP, Pfeilspitzen die RLP (zurückführende Schicht) und das Sternchen die OLP. Maßbalken entsprechen 30  $\mu\text{m}$ .

Beide Abbildungen (Abb. 3.5 F, G) zeigen, dass bei der *kropf* Mutante keine Invagination in den Kelch stattgefunden hat. In der elektronenmikroskopischen Aufnahme sind die Zellen der inneren Schicht, welche eine undifferenzierte Verlängerung des Ösophagus darstellt (Pfeil in Abb. 3.5 G) und die Zellen der äußeren Schicht (Sternchen in Abb. 3.5 G) deutlich zu erkennen. Die mittlere Schicht scheint aber nicht deutlich ausgeprägt zu sein und eine geringere Zellzahl gegenüber dem Wildtyp aufzuweisen (Pfeilköpfe markieren Beginn und Ende der mittleren Schicht, im Vergleich zu Abb. 3.11). Diese Ergebnisse sind konsistent mit früheren Ergebnissen, in denen gezeigt worden ist, dass sich in der *kropf* Mutante nicht die sogenannte „keyhole<sup>12</sup>“-Struktur (siehe Einleitung Abb. 1.7) ausbildet (Bauer *et al.*, 2002). Aufgrund dieses Resultates zusammen mit der starken Expression von Innexin 2 in der äußeren Schicht des Proventrikulus (engl.: outer layer of Proventrikulus (OLP)) während der Embryogenese, wurden in den nachfolgenden Versuchen die Zellen der OLP sowohl im Wildtyp als auch in der *kropf* Mutante genauer untersucht.

### 3.3 Umlagerungsprozess der Zellverbindungen in den Zellen der OLP während der Embryonalentwicklung

Der Proventrikulus stellt den Übergang zwischen Vorder- und Mitteldarm dar. Er bildet somit die Grenze zwischen den ektodermalen und endodermalen Geweben. Diese Gewebe unterscheiden sich, wie schon in Kapitel 1.1.1 beschrieben, nicht nur deutlich in ihrem Aufbau der Zellkontakte sondern unterscheiden sich auch in dem Expressionsmuster einiger Markerproteine. So ist in der Literatur beschrieben, dass das Vorhandensein einer Zonula adhaerens und die Crumbs Expression Merkmale ektodermaler Gewebe sind (Tepass, 1997). Um eventuelle Veränderungen in der Zellmorphologie in der *kropf* Mutante entdecken zu können, war es notwendig die wildtypische Situation im Detail zu kennen.

In Abb. 3.6 A-C ist die Lokalisation von dem apikalen Protein Crumbs und einer Komponente der Adherens junctions *DE-cadherin* während der embryonalen Entwicklung des Proventrikulus dargestellt. Im Stadium 14 (Abb. 3.6 A) ist in allen Abschnitten des Proventrikulus eine deutliche Crumbs Expression zu sehen. Das heißt, dass bei Verwendung dieses Markers in diesem Stadium kein Unterschied zwischen den Bereichen, welche sich zu

---

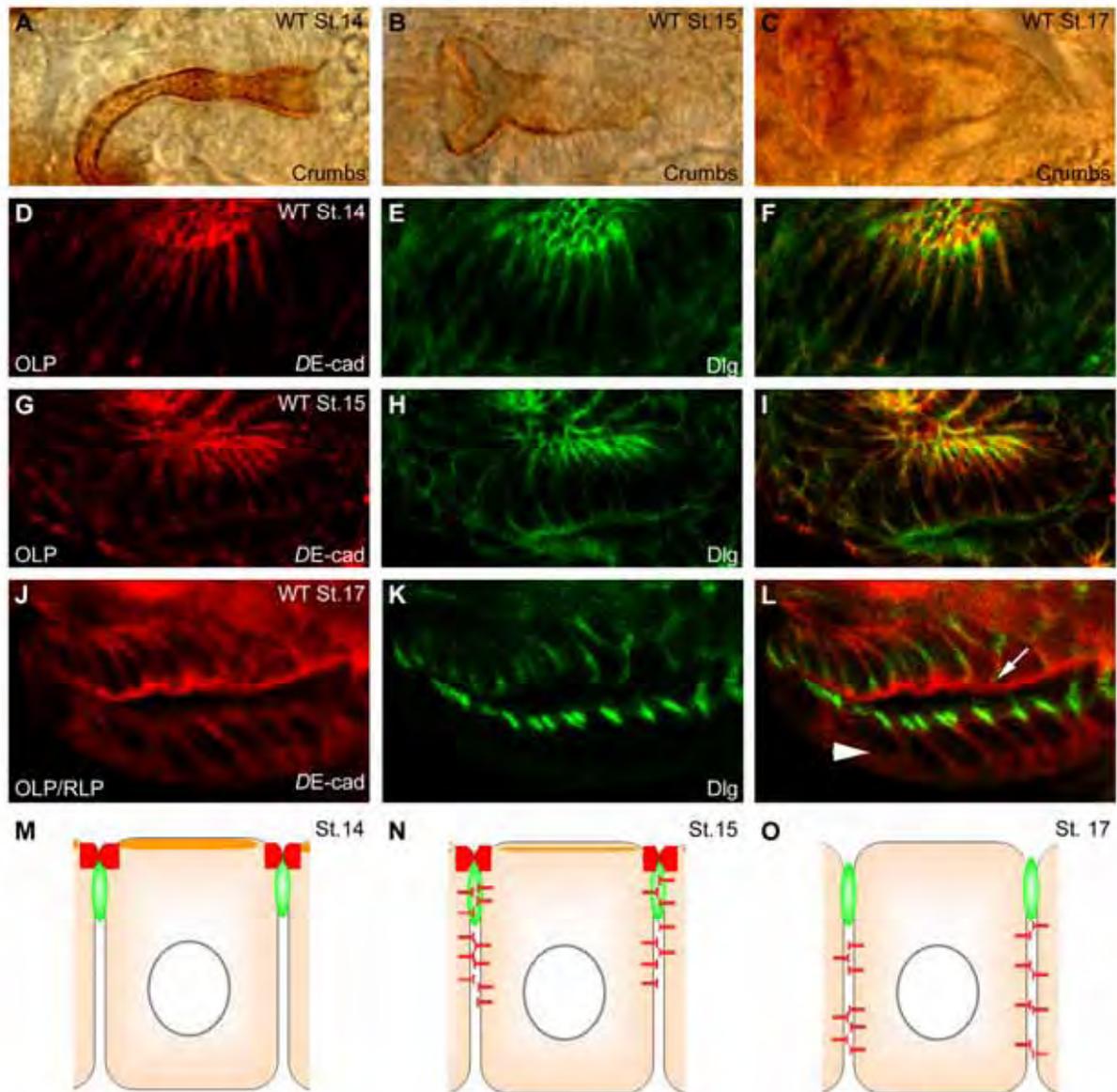
<sup>12</sup> (engl.)= Schlüsselloch

der OLP entwickeln werden und den beiden inneren Schichten, auszumachen ist. Mit Beginn der Invagination in Stadium 15 wird die Crumbs Expression in den Zellen, aus denen die sich OLP entwickelt, schwächer (Abb. 3.6 B) und ist dann im Stadium 17 kaum noch zu detektieren (Abb. 3.6 C).

Ein ebenfalls dynamischer Prozess ist während der Entwicklung bei den Adherens junctions, markiert durch *DE-cadherin*, zu beobachten. In Abb. 3.7 D-L ist der Bereich dargestellt, aus welchem sich die OLP bilden wird, in J-L ist dabei zusätzlich der Bereich der mittleren Schicht des Proventrikulus (RLP) zu sehen.

In Stadium 14 (Abb. 3.6 D-F) ist *DE-cadherin* sehr apikal in den Zellen lokalisiert. Durch die Kofärbung mit dem Septate junction Marker Discs large erkennt man, dass in diesem Stadium die Adherens junctions im Bereich der Septate junctions liegen oder sogar noch oberhalb dieser. In Stadium 15 (Abb. 3.6 G-I) ist die Situation noch vergleichbar mit der von Stadium 14. Es scheint aber so, als ob sich die *DE-cadherin* Domäne etwas nach basal ausgedehnt hat. In Stadium 17 ist die Lokalisation von *DE-cadherin* in der OLP deutlich verändert. Die Lokalisation von *DE-cadherin* ist nun deutlich basolateral zu Discs large. Es kommt dabei zu keiner Überlappung der beiden Proteine.

In diesem Stadium erkennt man nun sehr deutlich, dass die Zellen der OLP eine andere Qualität besitzen als die beiden inneren Schichten. In Abb. 3.6 L sieht man im direkten Vergleich die Zellen der OLP und RLP. In der OLP ist die Lokalisation von *DE-cad* wie schon beschrieben basolateral zu Discs large. In der RLP dagegen ist noch eine sehr dominante apikale Färbung von *DE-cadherin* zu sehen. Diese apikale Lokalisation lässt vermuten, dass in diesen Zellen die Struktur der Zonula adhaerens vorhanden ist, wogegen in der OLP die Adherens junctions an der lateralen Membran als Spot-Adherens junctions ausgebildet sind. Diese Ergebnisse werden durch elektronenmikroskopische Untersuchungen von Tepass und Hartenstein (1994) bestätigt: Sie beschreiben in ihrer Publikation, dass in der sich entwickelnden OLP in Stadium 12-14 die vollständig entwickelte Struktur der Zonula adhaerens vorhanden ist. Diese Struktur fragmentiert dann aber in den späteren Stadien komplett.



**Abb. 3.6: Die Entwicklung des Proventrikulus**

In A-C ist der Bereich des anti-Crumbs gefärbten Proventrikulus in Wildtyp Embryonen in den Stadien 14, 15 und 17 zu sehen. Die in Stadium 14 starke Expression des apikalen Membranproteins schwächt sich in den späteren Embryonalstadien deutlich ab. In D-L sind Kofärbungen des Adherens junctions-Markers *DE-cadherin* (*DE-cad*) und des Septate junctions-Markers *Discs large* (*Dlg*) in dem entwickelnden Proventrikulus in den Stadien 14 (D-F), 15 (G-H) und 17 (J-L) zu sehen. Die prominente apikale Färbung von *DE-cadherin* lagert sich bis Stadium 17 in eine laterale Färbung um. Der Pfeil markiert in L die Zonula adherens der mittleren Schicht des Proventrikulus (RLP) und die Pfeilspitze die spot- Adherens junctions der äußeren Schicht (OLP). Diese Umlagerung in der äußeren Schicht im Bereich der Zonula adherens und *Crumbs* sind in M-O schematisch dargestellt. In grün sind die Septate junctions markiert, die roten Kästchen stellt die Zonula adherens dar, die roten Striche zeigen die spot-Adherens junctions, und in braun ist die *Crumbs* Expression markiert.

### 3.4 Analyse der Verteilung von Innexine 1, 2 und 3 im wildtypischen larvalen Proventrikulus

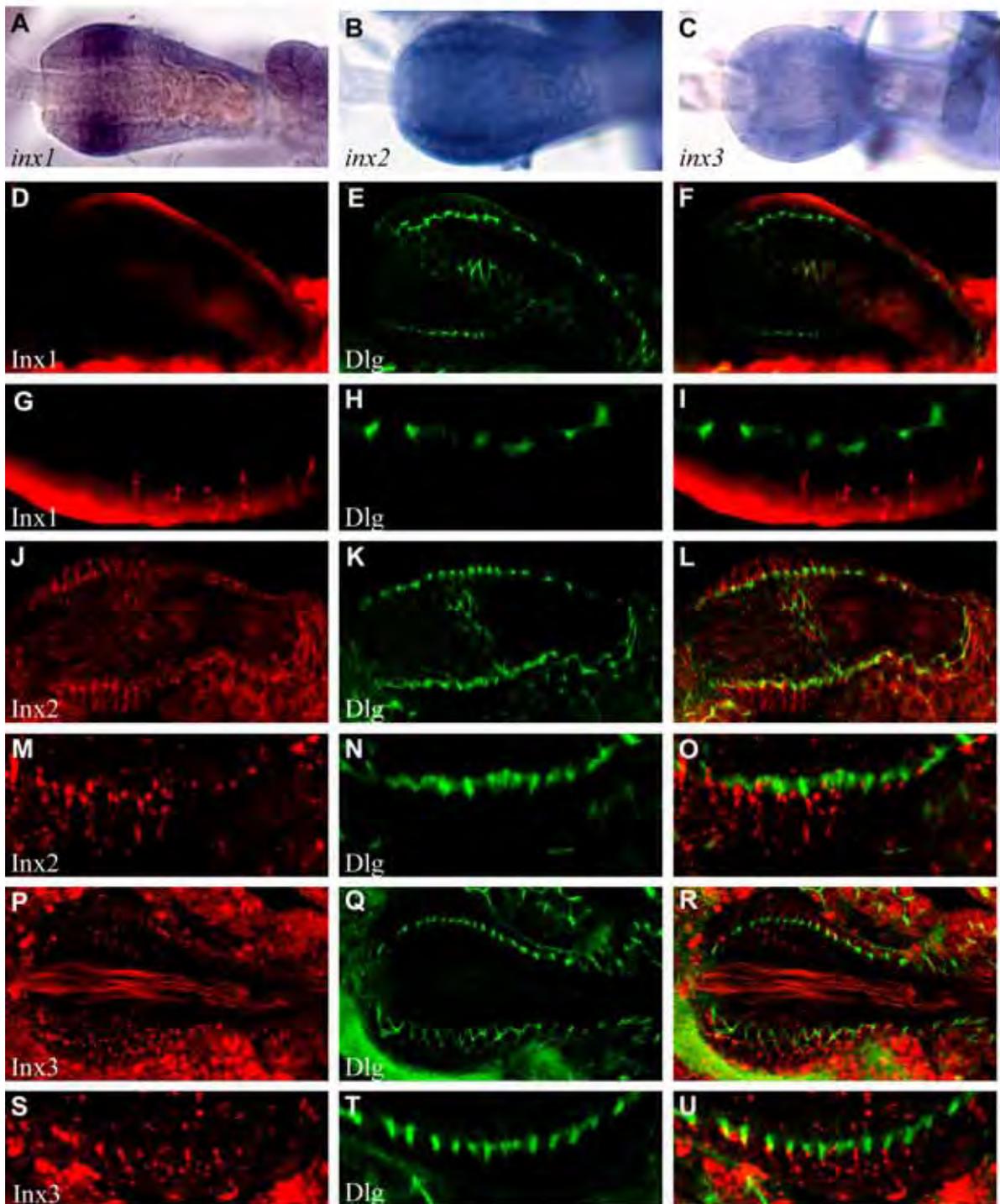
Innexin 1, 2 und 3 zeigen während der Embryogenese ein in weiten Teilen überlappendes Expressionsmuster, welches auch im Proventrikulus lokalisiert ist (Bauer *et al.*, 2001, Bauer *et al.*, 2002, Stebbings *et al.*, 2002).

Um eine genaue Analyse des larvalen *kropf* Proventrikulus durchführen zu können, wurde die Expression dieser Innexine auf RNA- und Proteinebene im larvalen Proventrikulus eingehend untersucht. Dabei wurde der Focus der Untersuchungen, aus den oben genannten Gründen, auf die äußere Schicht des Proventrikulus gelegt. Während der Versuche stellte sich außerdem heraus, dass es sehr schwierig ist die beiden innen liegenden Schichten im Wildtyp anzufärben. Die chitinhaltige peritrophe Membran, die der äußeren Schicht apikal aufgelagert ist, und die Kutikula der inneren Schicht, verhindern in den meisten Fällen die Penetration von Antikörpern und RNA Sonden.

#### 3.4.1 Expressionsmuster der mRNA von *innexin 1, 2* und *3*

Für die Untersuchung der Expressionsmuster mittels *in situ* Hybridisierung wurde für alle drei *innexine* spezifische mRNA-antisense-Sonden hergestellt. Für die Färbung wurden die Proventrikuli von L1 Larven herauspräpariert und chemisch fixiert. Nach der *in situ*-Färbung wurden diese lichtmikroskopisch charakterisiert (Abb. 3.7 A-C). Alle drei Transkripte konnten im larvalen Proventrikulus detektiert werden. Dabei wiesen *innexin 2* und *3* ein sehr ähnliches Muster auf. Beide Transkripte waren deutlich im OLP in allen Zellen nachweisbar. Sie zeigten beide eine ubiquitäre Expression im Proventrikulus. Weiterhin konnte in den larvalen OLP Zellen gezeigt werden, dass die Transkripte sowohl von *innexin 2* wie auch von *innexin 3* eine polarisierte Lokalisation innerhalb der Zelle aufweisen. Beide Transkripte sind apikal in den Zellen angereichert.

Ganz anders zeigte sich das Expressionsmuster von *innexin 1* (Abb. 3.7 C). Das Transkript von *innexin 1* konnte nur in einem schmalen Streifen von einer Breite von ca. 5 Zellen im anterioren Bereich der äußeren Schicht des Proventrikulus nachgewiesen werden.



**Abb. 3.7: Die Lokalisierung von Innexin 1, 2 und 3 im larvalen Proventrikulus**

A-C: Wildtyp Expression von *innexin 1* (A), *innexin 2* (B) und *innexin 3* (C) mRNA in larvalen Proventrikuli. D-U: Proteinlokalisierung von Innexin 1 (D-I), Innexin 2 (J-O) und Innexin 3 (P-U) jeweils in einer Doppelfärbung mit dem Septate junction Marker Discs large (Dlg in grün). Dabei ist in F, L und R eine Übersicht über den gesamten Proventrikulus mit beiden Proteinen zu sehen und in I, O und U eine Vergrößerung, um die zelluläre Lokalisation der jeweiligen Innexinen besser darstellen zu können.

### 3.4.2 Die Charakterisierung der Proteinexpression von Innexin 1, 2 und 3

Für die Charakterisierung der Proteinexpression von Innexin 1, 2 und 3 wurden ebenfalls präparierte Proventrikuli angefärbt (Abb. 3.7 D-U). Zur besseren Bewertung der Lokalisation der Innexin Proteinexpression innerhalb der Zellen wurden die jeweiligen anti-Innexin Antikörper zusammen mit einem Marker-Antikörper in Kofärbungen eingesetzt. Als Marker-Antikörper wurde der anti-Discs large Antikörper gewählt. Discs large gehört zu der Proteinfamilie der „membrane-associated guanylat kinase“ (MAGUK) und ist an der zytoplasmatischen Seite der Septate junctions lokalisiert (Woods und Bryant, 1991).

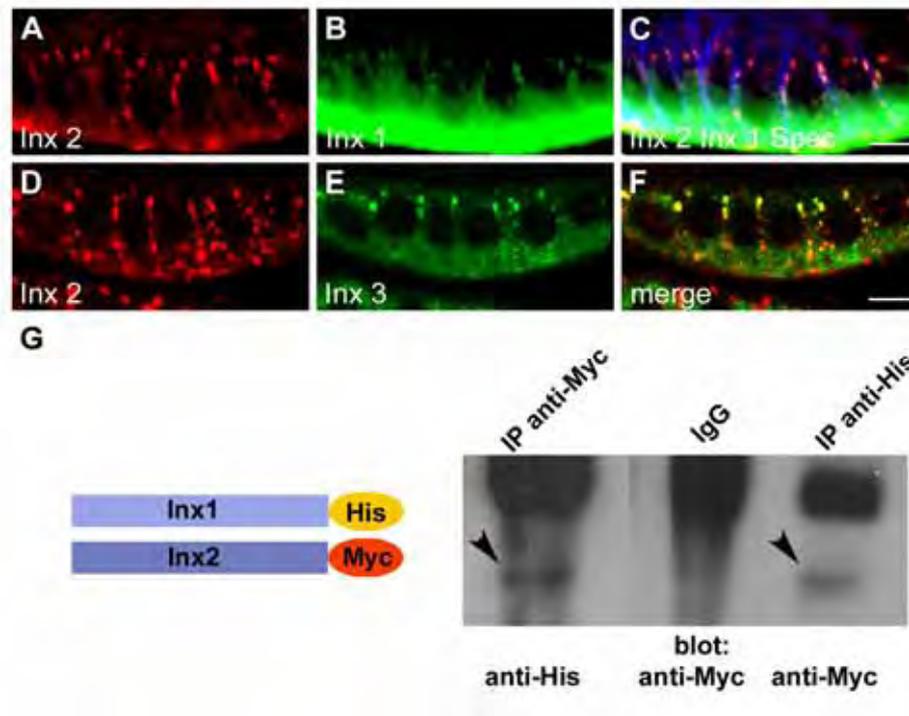
Die Innexin Antikörperfärbung wies ein mit der mRNA Expression vergleichbares Muster auf: Innexin 2 und 3 Protein konnte in der gesamten äußeren Schicht nachgewiesen werden und Innexin 1 nur im anterioren Bereich des Proventrikulus. Dabei zeigten alle drei Innexine das typische punktartige Expressionsmuster. Durch die Doppelfärbungen der Innexine 1, 2 und 3 zusammen mit Discs large ließ sich die Lokalisation aller drei Innexine hauptsächlich auf den lateralen Bereich basal zu den Septate junctions zuordnen. Die Expression der drei Innexine entlang der lateralen Membran war aber nicht völlig übereinstimmend, sondern zeigte auch Unterschiede: Innexin 1 zeigte eine eher basale Lokalisation. Dagegen konnte vereinzelt eine Innexin 2 Lokalisation auch in dem apikalen Bereich der Zellen festgestellt werden, sowie teilweise eine Kolo-kalisation mit Discs large. Das Verteilungsmuster von Innexin 3 ist dem von Innexin 2 vergleichbar.

### 3.4.3 Innexin 1, 2 und 3 bilden möglicherweise heteromere Kanäle im Proventrikulus.

In unsere Abteilung wurde kürzlich gezeigt, dass Innexin 2 und 3 über den zytoplasmatischen C-Terminus interagieren können und heteromere Kanäle bilden (Lehmann *et al.*, 2006). Um zu untersuchen ob Innexin 1 und 2 auch miteinander wechselwirken, wurden Kofärbungen von Innexin 1, 2 und 3 und in Zusammenarbeit mit R. Bauer Koimmunpräzipitations-Analysen durchgeführt.

Bei der Analyse der zellulären Proteinverteilung wurde bestätigt, dass Innexin 2 und 3 auch im larvalen Proventrikulus kolo-kalisieren und es konnte auch eine partielle Kolo-kalisation von Innexin 2 und Innexin 1 gezeigt werden (Abb. 3.8 A-F).

Die Interaktion der Gap junction-Proteine Innexin 1 und Innexin 2 konnte durch eine Koimmunpräzipitation bestätigt werden: Dafür wurden Schneiderzellen verwendet, welche stabil Innexin 2-Myc Fusionsproteine exprimieren können. Diese Zellen wurden mit einem *innexin 1* His Fusionskonstrukt transfiziert. Die aus diesen Zellen gewonnen Proteinextrakte wurden für unterschiedliche Koimmunpräzipitationen eingesetzt. Wie in Abb. 3.8 G zu sehen ist, konnte spezifisch das Innexin 1-His Fusionsprotein mit dem anti-Myc Antikörper präzipitiert werden und das Innexin 2-Myc Fusionsprotein mit dem anti-His Antikörper. Als Negativkontrolle wurde für die Präzipitation ein unspezifisches IgG verwendet. Diese Ergebnisse sind konsistent mit früheren Ergebnissen aus dem heterologen *Xenopus* Expressionssystem. In diesen Experimenten konnte gezeigt werden, dass Innexin 2 heteromere Kanäle mit Innexin 1 bilden kann (zitiert als unpublizierte Beobachtungen in Phelan, 2005).



**Abb. 3.8: Innexin 1, 2 und 3 sind kolokalisiert und Innexin 2 interagiert biochemisch mit Innexin 1.**

A-F: Immunohistochemische Doppelfärbung von Innexin 1 und Innexin 3 jeweils mit Innexin 2 zeigen in der OLP eine Kolokalisierung. In A-F ist Innexin 2 in rot dargestellt, Innexin 1 in grün (B, C) und Innexin 3 in grün (E, F). In F ist zusätzlich noch als Membranmarker Spectrin (Spec) in blau zu sehen.

G: Koimmunpräzipitations-Experiment mit in Schneiderzellen exprimierten Innexin 1 His (Inx1 HIS) und Innexin 2 Myc (Inx2 Myc) Fusionsproteinen. Die Immunpräzipitation wurde mit dem anti-Myc Antikörper (erste Spur) und dem anti-His Antikörper durchgeführt (dritte Spur). Es konnte mit dem jeweils anderen Antikörper die biochemische Interaktion von Innexin 1 und 2 auf einem Immunblot bestätigt werden. Pfeilspitzen markieren die immunpräzipitierte Proteine. Als Negativ-Kontrolle wurde mit einen unspezifischen IgG präzipitiert (zweite Spur).

### 3.5 Untersuchung der Gap junctions im larvalen *kropf* Proventrikulus

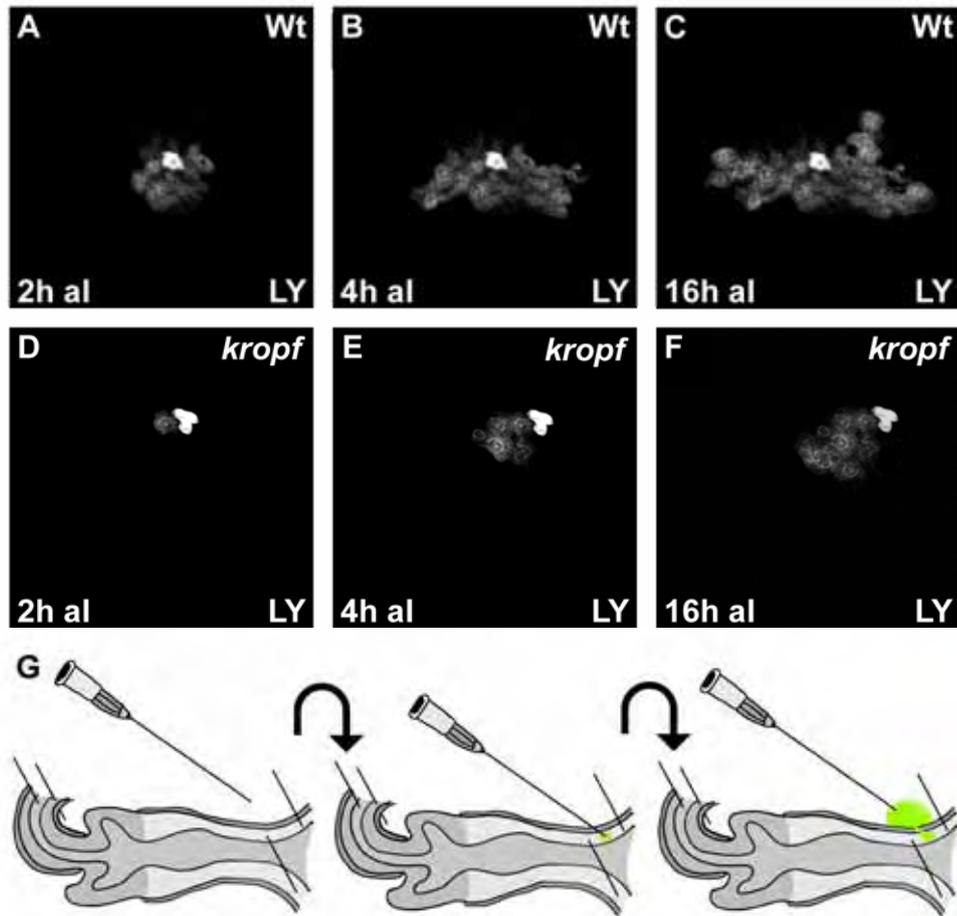
In der *kropf* Mutante wird kein *innexin 2* transkribiert, aber aufgrund der starken maternalen Komponente kann in frühen embryonalen Stadien Innexin 2 häufig noch nachgewiesen werden. In den larvalen Stadien von *kropf* Mutanten hat sich aber das Proteinlevel von Innexin 2 sehr verringert, und in immunhistochemischen Färbungen ist es kaum mehr zu detektieren (siehe Abb. 3.19).

Wie im vorherigen Kapitel gezeigt wurde, sind aber im larvalen Proventrikulus mindestens noch zwei weitere Mitglieder der Innexin-Familie exprimiert. In den folgenden Versuchen soll nun untersucht werden, ob Innexin 1 und 3 eventuell redundant zu Innexin 2 sind, und ob funktionelle Gap junctions in *kropf* Proventrikuli vorhanden sind.

#### 3.5.1 Die Zell-Zell-Kommunikation in den Proventrikuluszellen von *kropf* Mutanten ist beeinträchtigt.

Um herauszufinden, ob die Zell-Zell-Kommunikation in den Proventrikuluszellen von *kropf* Mutanten betroffen ist, wurden in Zusammenarbeit mit F. Josten Farbkopplungsexperimente durchgeführt. Dazu wurden larvale wildtypische und mutante Proventrikuli isoliert und ein Farbstoff in die posterioren Zellen der äußeren Schicht injiziert. Als Farbstoff wurde Lucifer Yellow benutzt, von dem bereits zuvor gezeigt wurde, dass es durch Gap junctions von Zelle zu Zelle transportiert wird (Warner *et al.*, 1981).

Es konnte gezeigt werden, dass sich der Farbstoff in den Wildtyp Embryonen nach 16 Stunden auf eine Fläche von 10 bis 15 Zelldurchmessern verteilt hat (Abb. 3.9 A-C). In *kropf* Mutanten ist dieser Transport deutlich reduziert. Hier konnte nach 16 h in höchstens vier bis sechs Zellen der Farbstoff detektiert werden (Abb. 3.9 D-F). Diese Ergebnisse zeigen, dass in *kropf* Mutanten die Zell-Zell-Kommunikation durch die Gap junctions stark beeinträchtigt ist.

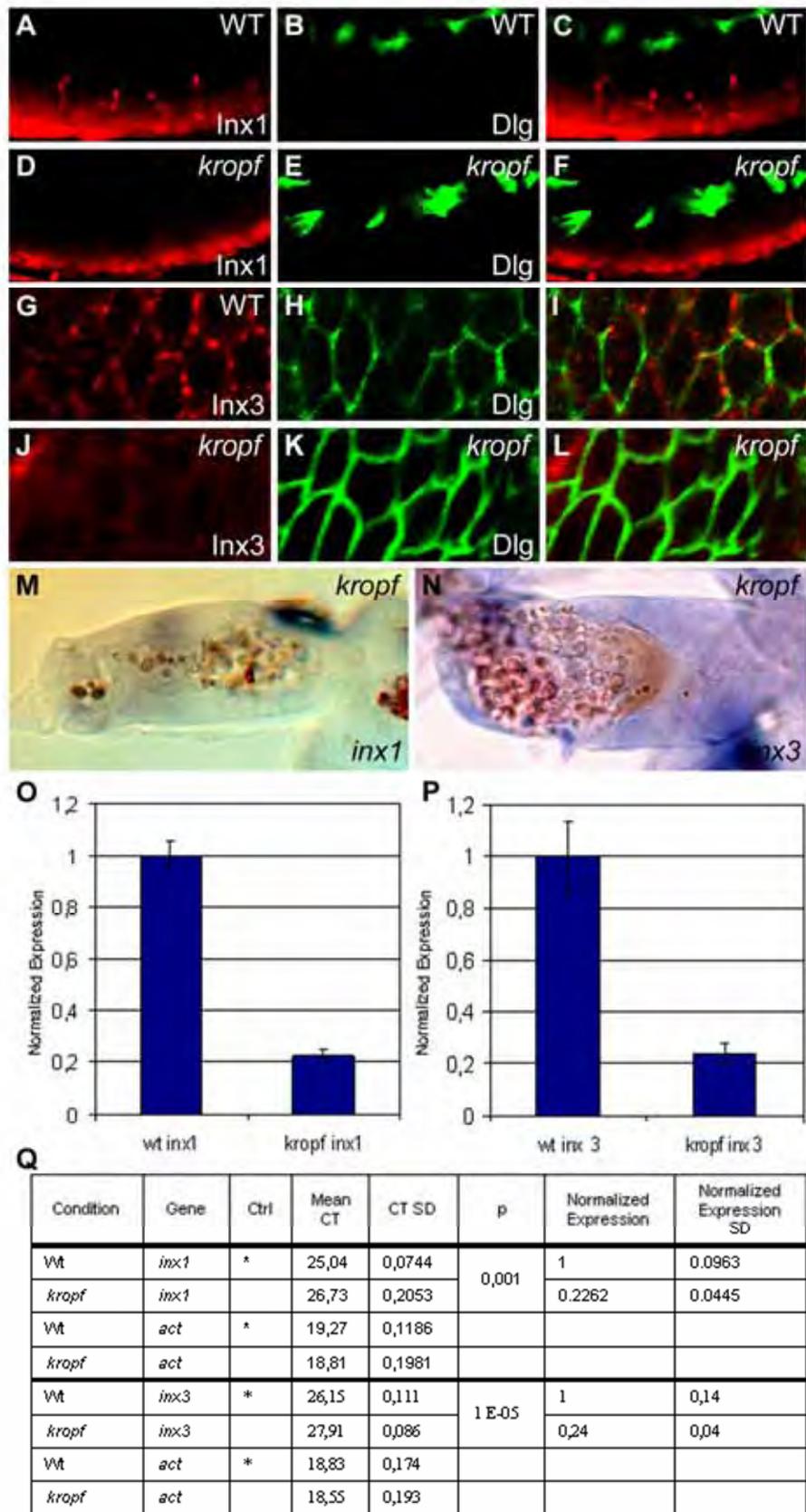


**Abb. 3.9: Innexin 2 wird für die Weiterleitung von Signalen von Zelle zu Zelle benötigt.**

A-F: Lucifer Yellow Verteilung in Wildtyp (A-C) und *kropf* Mutanten (D-F) 2 Stunden (A, D), 4 Stunden (B, E) und 16 Stunden (C, F) nach der Injektion. Im Wildtyp Proventrikulus verteilt sich der Farbstoff auf einen Raum von circa 20 Zellen, während in der Mutante nur eine Ausbreitung in ungefähr 3-4 Zellen zu beobachten ist. G: Schematische Darstellung der Injektionsexperimente

### 3.5.2 In *innexin 2* Mutanten sind *innexin 1* und *3* auf transkriptioneller Ebene herunterreguliert.

Mit den Farbkopplungsexperimenten konnte gezeigt werden, dass die Gap junction Kommunikation in den *kropf* Mutanten stark beeinträchtigt ist. Um herauszufinden, ob dieser starke Defekt auch mit einer Veränderung anderer im Proventrikulus exprimierter Innexine zusammenhängt, wurden Expressionsanalysen von Innexin 1 und 3 in der *innexin 2* Mutante durchgeführt.



**Abb. 3.10: Gap junction Gene zeigen eine koordinierte transkriptionelle Regulation.**

A-L: Proteinexpression in der äußeren Schicht in Proventrikuli von Innexin 1 in Wildtyp (A-C) und *kropf* (D-F) und von Innexin 3 in Wildtyp (G-I) und *kropf* (J-L). (Fortsetzung s. nächste Seite)

**Fortsetzung Abb. 3.10:** Die jeweiligen Innexine wurden mit dem Septate junction Marker Discs large (Dlg in grün) zusammen angefärbt. In F und L sieht man eine deutliche Reduktion von Innexin 1 und Innexin 3 gegenüber der respektiven Wildtyp Färbung. Ebenso ist eine deutliche Reduktion der mRNA Expression von *innexin 1* (M) und *innexin 3* (N) zu erkennen. Quantitative RT-PCR mit der kalkulierten normalisierten Expression zeigten eine 5 fache Reduktion des *innexin 1* (O) und *innexin 2* (P) Transkripts. Q: Ergebnisse eines Experimentes mit der schon gemittelten Zyklenzahl an der definierten Schwelle (mean Threshold-Cycle (CT)), welche den Beginn der exponentiellen Phase der Amplifikation kennzeichnet und die Basis für die Berechnung der Ausgangsmenge der vorhandenen Ziel-DNA ist. Darüber hinaus ist die Standardabweichung dieser gemittelten Werte angegeben (CT SD) und der mit dem einseitigen t-Test berechneten p-Wert. Die normalisierte Expression<sup>13</sup> ist mit der  $\Delta\Delta\text{CT}$  Methode berechnet. In der letzten Spalte ist die Standardabweichung für die normalisierte Expression angegeben.

Antikörperfärbungen zeigten eine starke Reduktion und in einigen Proventrikuli sogar einen kompletten Verlust der Proteinexpression von Innexin 1 (Abb. 3.10 A-F) und Innexin 3 (Abb. 3.10 G-L) in *kropf* Mutanten. Um die Ursache für diese starke Reduktion auf Proteinebene zu finden, wurde ebenfalls die jeweilige RNA Expression in den *kropf* Proventrikuli untersucht. *In situ* Hybridisations-Experimente zeigten, dass beide Transkripte, von *innexin 1* (Abb. 3.10 M) und *innexin 3* (Abb. 3.10 N) in der äußeren epithelialen Schicht des Proventrikulus ebenfalls im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 3.5 A und C) reduziert sind.

Dieses Ergebnis konnte durch eine quantitative RT-PCR bestätigt werden. In diesem Experiment wurde die gesamte RNA von *kropf* und Wildtyp Larven verglichen. Dabei wurde das relative Niveau jeder mRNA Expression nach der  $\Delta\Delta\text{CT}$ <sup>14</sup> Methode berechnet, wobei gegen  *$\beta$ -actin* normalisiert wurde (Pfaffl, 2001). Die Ergebnisse wurden statistisch abgesichert und in einem einseitigen t-Test zu  $\alpha = 0,025$  getestet (Abb. 3.10 Q). Es ergab sich ein signifikantes Ergebnis, mit dem gezeigt werden konnte, dass die Transkription von *innexin 1* (Abb. 3.10 O) und 3 (Abb. 3.10 P) in der *kropf* Mutante je 5 fach reduziert war.

Diese Ergebnisse der drei Experimente zusammen zeigen einen neuen Mechanismus einer koordinierten transkriptionellen Regulation von Gap junction Genen in *D. melanogaster*.

---

<sup>13</sup> engl.= normalized Expression

<sup>14</sup> CT= Threshold-Cycle

## 3.6 Der larvale *kropf* Phänotyp auf zellulärer Ebene

### 3.6.1 Ultrastrukturelle Untersuchungen des Proventrikulus von Wildtyp und *kropf* Mutante

#### 3.6.1.1 Der wildtypische Proventrikulus

In der Übersicht der elektronenmikroskopischen Aufnahme des Wildtyps sieht man deutlich die drei Schichten des Proventrikulus (Abb. 3.11): Die innere Schicht (ILP) ist eine Fortsetzung des Ösophagus. Die Zellen zeigen keine Spezialisierung gegenüber den Zellen des Ösophagus. Zwischen der inneren Schicht und der mittleren Schicht (RLP) befindet sich der Hilus des Proventrikulus, welcher Muskeln in einer extrazellulären Matrix beinhaltet. Die innere und die mittlere Schicht sind unter anderem durch die Ausprägung der Kutikula als ektodermales Gewebe gekennzeichnet. Das abgerundete anteriore Ende des Proventrikulus markiert den Übergang zwischen der mittleren Schicht und der äußeren Schicht (OLP).

Die gesamte OLP zeigt im larvalen Stadium die Merkmale des Mitteldarmepithels. Zu diesen Charakteristika gehört auch der Besitz eines Bürstensaums. Ein weiteres Merkmal dieser Zellen, welches sie deutlich von den Zellen der ILP und RLP unterscheidet, ist die sehr ausgedehnte Zellverbindung der glatten Septate junctions. Diese erstreckt sich über 20 bis 30 % des apikalen Bereichs der lateralen Membran (Abb. 3.11 C, Pfeilspitzen, Tepass und Hartenstein, 1994). In diesem Bereich der Septate junctions sind die benachbarten Zellen eng verbunden. Unterhalb dieser dichten apikalen Region befindet sich zwischen benachbarten Zellen ein schmaler interzellulärer Spalt, welcher durch einzelne enge Membrankontaktstellen unterbrochen ist. In diesen Kontaktstellen sind die spot-Adherens junctions und Gap junctions lokalisiert (Abb. 3.11 C, Pfeile).

Die OLP kann aufgrund der Zellmorphologie in zwei Abschnitte eingeteilt werden, den anterioren Bereich, der ungefähr 2/3 der äußeren Schicht ausmacht und der posteriore Abschnitt. In der Publikation von King (1988) wird die OLP des adulten Proventrikulus in drei Abschnitte unterteilt. Die dort beschriebene weitere Ausdifferenzierung der Zellen ist in dem 1. Larvenstadium jedoch noch nicht zu erkennen. Es ist auch keine klare Grenze zwischen beiden Bereichen ausgebildet, so dass nur von dem anterioren und posterioren Bereich der OLP gesprochen werden kann.

Die Zellen des anterioren Bereichs sind sehr große säulenförmige Zellen mit einem ausgeprägten Bürstensaum mit kurzen, dichten und sehr regelmäßigen Mikrovilli. Dagegen

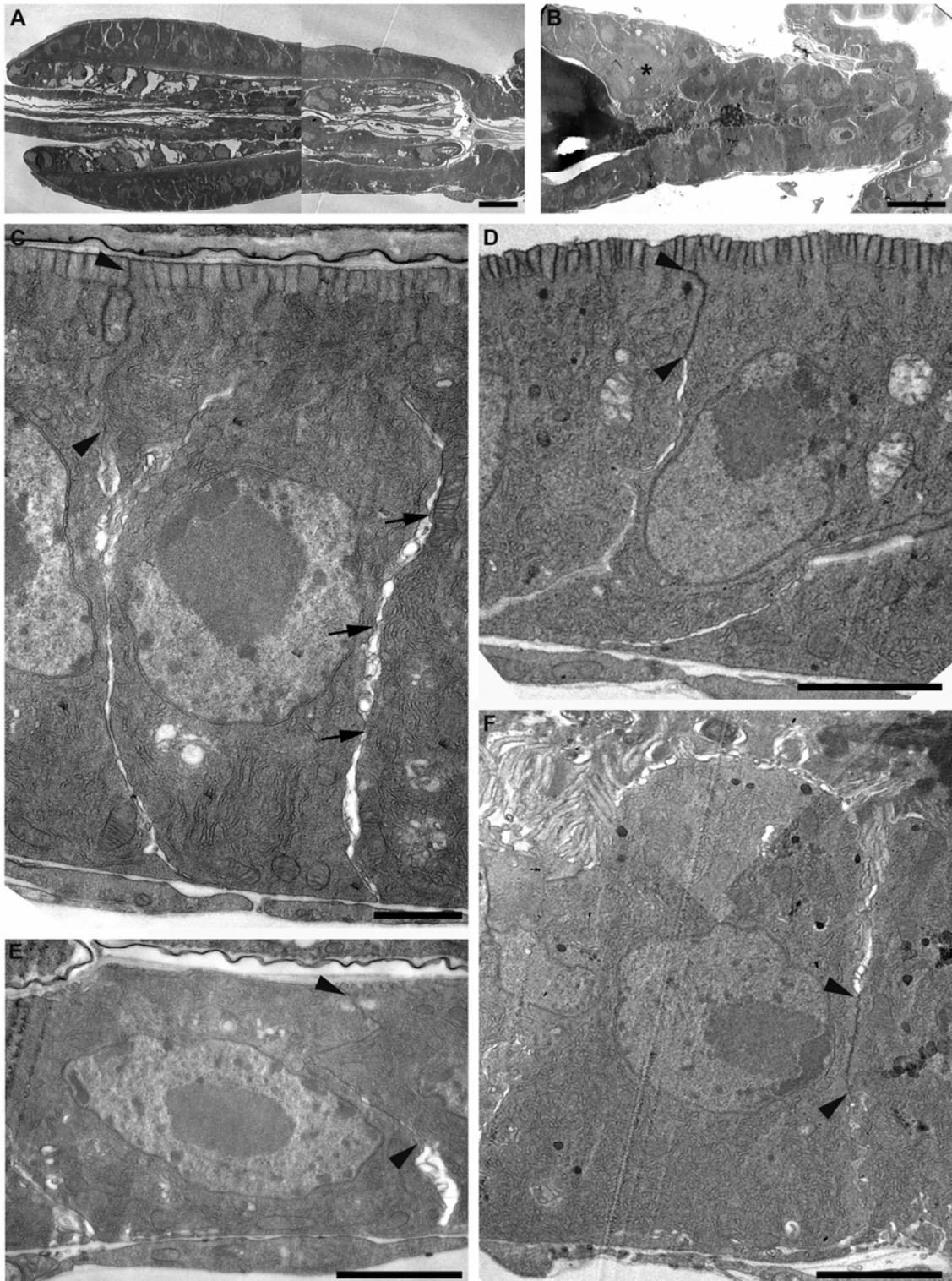
weisen die posterioren Zellen eine andere Gestalt auf: Sie sind deutlich kleiner, haben nicht diese säulenartige Form und nicht so deutlich ausgeprägte Mikrovilli (Abb. 3.11 E). Auch später im adulten Stadium weisen die posterioren Zellen einen schmalen Saum von Mikrovilli auf als der anteriore Bereich der äußeren Schicht (King, 1988). Übereinstimmend für beide Abschnitte ist aber der Besitz der sehr ausgeprägten glatten Septate junctions (Abb. 3.11 E, Pfeilspitzen) und die an der basalen Seite der Zellen angrenzende viscerele Muskelschicht. Diese erstreckt sich durchgehend vom Proventrikulus zum Mitteldarm.

Eine weitere Funktion des Proventrikulus ist, neben der schon beschriebenen Schleusenfunktion bei der Passage des Futters, die Bildung der peritrophischen Membran. Diese multilaminare Membran kleidet den Darm aus und formt eine selektive Barriere zwischen dem inneren Darmlumen und dem Bereich außerhalb dieser Membran. Bei der Bildung dieser vierschichtigen Membran sind verschiedene Bereiche der mittleren und äußeren Schicht beteiligt (Abb. 1.7; King, 1988; Terra, 2001).

### **3.6.1.2 Der *kropf* Proventrikulus**

Durch die ultrastrukturellen Untersuchungen konnte bestätigt werden, dass in den *kropf* Mutanten die mittlere Schicht des Proventrikulus stark reduziert ist (siehe Kapitel 3.2) und es zu einer Missbildung des Organs kommt, was in allen homozygoten Larven festgestellt werden kann. Bei der detaillierten Untersuchung der OLP der *kropf* Mutante konnte aber eine gewisse Varianz der Defekte gefunden werden: Die in Abb. 3.5 G gezeigte Übersicht eines mutanten Phänotyps zeigt ein noch relativ intaktes Zellgewebe ohne große Deformation, eine drastische Ausprägung des missgebildeten Proventrikulus Phänotyps ist dagegen in Abb. 3.11 B gezeigt.

In dieser Abb. 3.11 B ist der Proventrikulus einer *kropf* Larve dargestellt, die aufgrund des Fütterungsdefektes identifiziert worden ist. Hier sieht man, wie das Futter in dem Kelch der äußeren Schicht steckengeblieben ist. In diesem Fall ist es schwierig, eine Aussage über die Ausbildung des Übergangs der inneren / mittleren zur äußeren Schicht zu machen, da diese Bereiche durch das Futter stark gedehnt sind. Aber auch die Zellen der äußeren Schicht zeigen eine deutlich Missbildung und Defekte in der Morphogenese. Die Zellzahl ist aber vergleichbar zum Wildtyp.



**Abb. 3.11: Ultrastrukturelle Analyse des wildtypischen und des *kropf* Proventrikulus**

A: Übersicht über den wildtypischen Proventrikulus. Zu sehen ist das dreilagige Organ mit der inneren, der mittleren und der äußeren Schicht. Die beiden innen liegenden Schichten weisen eine Kutikula auf und sind ektodermalen Ursprungs. Die äußere Schicht weist im Larvenstadium alle typischen Merkmale des Mitteldarmepithels auf. (Fortsetzung auf der nächsten Seite)

**Fortsetzung Abb. 3.11:** C: Im anterioren Bereich der äußeren Schicht ist deutlich ein gleichmäßiger, dichter Mikrovillisaum zu erkennen. Dieser wird im posterioren Bereich deutlich schwächer (E). Im gesamten Bereich der äußeren Schicht (C und E) sind die Zellen an der apikolateralen Seite durch glatte Septate junctions miteinander dicht verbunden (Pfeilspitzen). Unterhalb dieser Region ist zwischen den benachbarten Zellen ein schmaler interzellulärer Spalt. Hier sind die Zellen lockerer durch Adherens junctions und Gap junctions verbunden (Pfeile). B: Übersicht über den Proventrikulus der *kropf* Mutante. Die epitheliale Organisation ist in der äußeren Schicht zerstört. Die Zellen bilden ein mehrlagiges Epithel (Sternchen). D: Der anteriore Teil weist nur eine leichte Veränderung auf, die Form der Zellen und der Bürstensaum sind etwas unregelmäßig. F: Im posterioren Abschnitt zeigen sich massive Polaritäts-Defekte. Dabei ist der apikale Bereich der Zellen betroffen. Die Mikrovilli sind sehr lang und ungleichmäßig. Die glatten Septate junctions sind lateral lokalisiert (Pfeilspitzen). Die Maßbalken entsprechen in den Übersichtsaufnahmen A und B 10 µm und in den übrigen Bildern (C-F) 2 µm.

In Abb. 3.11 D ist eine Vergrößerung des anterioren Bereichs zu sehen: Die Zellen weisen nicht die gleiche säulenartige Form auf wie im Wildtyp, aber sie haben wie im Wildtyp eine apikale Kontaktzone durch die glatten Septate junctions (Pfeilspitzen in Abb. 3.11 D) und weisen an der apikalen Seite einen Bürstensaum auf. Dieser Bürstensaum ähnelt dem des Wildtyps, ist aber nicht ganz so regelmäßig ausgeprägt.

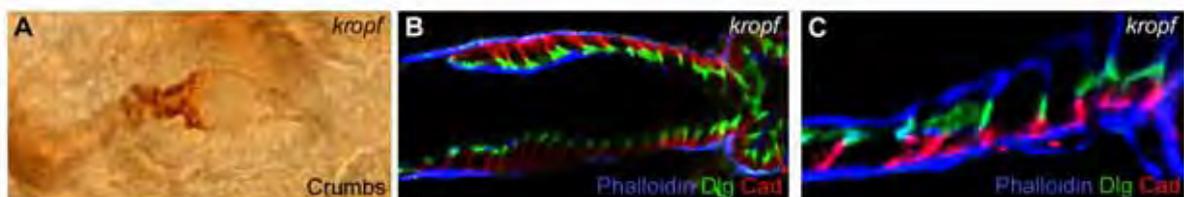
Im mittleren Abschnitt der äußeren Schicht des Proventrikulus ist eine weitere sehr deutliche Veränderung zu beobachten. Das im Wildtyp einschichtige Epithel ist hier zu einem teilweise mehrschichtigen Epithel angewachsen (Abb. 3.11 B, Sternchen). Schwere Zellpolaritäts-Defekte sind im posterioren Bereich zu beobachten (Abb. 3.11 F). Der apikale Bereich dieser Zellen zeigt deutliche Veränderungen. Die Mikrovilli sind sehr unregelmäßig und teilweise länger als im Wildtyp und die apikale Kontaktzone durch die glatten Septate junctions ist eher basolateral lokalisiert (Pfeilspitzen in 3.11 F). Dabei sind die Zellen in der Höhe beinahe doppelt so groß wie die wildtypischen Zellen.

### 3.6.2 In der *kropf* Mutante findet der Umlagerungsprozess der Zellverbindungen während der Embryogenese statt.

Wie im Kapitel 3.3 beschrieben, finden während der Proventrikulus-Entwicklung in der äußeren Schicht komplexe Umstrukturierungen der Zell-Zell Verbindungen statt. Zur Klärung der Frage, ob bei *kropf* Mutanten dieser Umlagerungsprozess durch das Fehlen von Innexin 2 und die Reduktion von Innexin 1 und 3 (siehe Kapitel 3.5.2) gestört ist, wurde die Lokalisation dieser Zellverbindungen in den Proventrikuli der *kropf* Mutante in immunhistochemischen Färbungen untersucht. Die Antikörperfärbung gegen das Septate junction Protein Discs large und das Adherens junction Protein DE-cadherin zeigt in den

mutanten Proventrikuli keine Veränderung in ihrer Position zueinander (Abb. 3.12 B und C verglichen mit Abb. 3.8).

Sowohl auf ultrastruktureller Ebene (Abb. 3.11) wie auch durch Antikörperfärbungen (Abb. 3.12) konnte gezeigt werden, dass in der *kropf* Mutante, wie im Wildtyp, die Zonula adhaerens der OLP während der Embryogenese fragmentiert und die benachbarten Zellen durch Adherens junctions an der lateralen Membran miteinander verbunden sind. Auch konnte die Region der apikolateral lokalisierten glatten Septate junctions in der *kropf* Mutante nachgewiesen werden. Durch die Antikörperfärbung konnte das Ergebnis der ultrastrukturellen Untersuchungen bestätigt werden: Der Septate junction Komplex, markiert durch Discs large ist eher basolateral positioniert und der apikale Bereich, markiert durch F-actin (angefärbt durch Phalloidin) hat sich ausgedehnt. Ebenfalls konnte durch immunhistochemische Färbung im *kropf* Proventrikulus gezeigt werden, dass die Crumbs Expression vergleichbar zum Wildtyp während der Embryonalentwicklung reduziert ist (Abb. 3.12 A verglichen mit Abb. 3.7 A-C).



**Abb. 3.12: In *kropf* Proventrikuli ist die Ausbildung der Septate junctions und der Adherens junctions nicht verändert.**

A: Immunhistochemische Färbung mit anti-Crumbs. In *kropf* Proventrikuli ist in der späten embryonalen Phase nur noch eine geringe Crumbs Expression zu detektieren. B: Immunhistochemische Färbung der verschiedenen Zell-Zellverbindungen in larvalen *kropf* Proventrikulus. Anti-Discs large (Dlg, grün), anti-DE-cadherin (DE-cad, rot) und Phalloidin (blau). Die Position der Komplexe zueinander ist nicht verändert, aber die Lokalisation im posterioren Bereich des Proventrikulus ist nach basolateral verschoben. C: Ausschnittsvergrößerung von B.

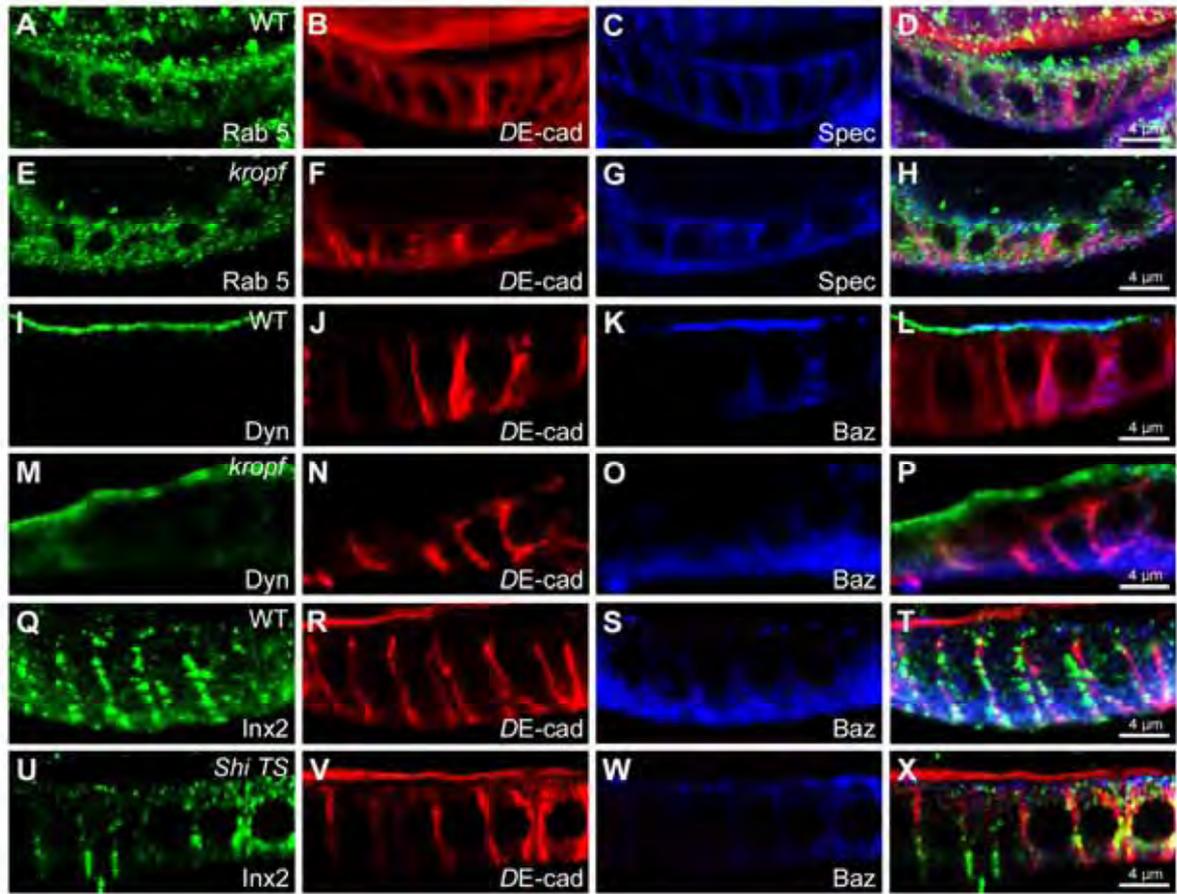
### 3.6.3 In der *kropf* Mutante gibt es keine eindeutigen Hinweise auf eine veränderte Endozytose.

Im Rahmen von Literaturrecherchen wurde die Hypothese aufgestellt, dass in der *kropf* Mutante der Endozytoseweg beeinträchtigt sein könnte.

Für diese Hypothese wurde der Phänotyp von *kropf* Mutanten (siehe Abb. 3.11) mit in der Literatur beschriebenen Mutanten verglichen. Dabei wurden interessante Ähnlichkeiten zu Mutanten gefunden, bei denen der Endozytoseweg verändert ist. Zum einen wurde der

Phänotyp von Rab 5 Mutanten mit einer Expansion der apikalen Membran epithelialer Zellen, einer starken Proliferation und der Ausbildung von mehrschichtigen Epithelien, beschrieben (Lu und Bilder, 2005). Zum anderen weisen  $\beta$ -heavy-Spectrin Mutanten ebenfalls einen Endozytose-Defekt auf. Spectrin ist ein Protein des Zytoskeletts und in diesen Mutanten ist, wie in der *kropf* Mutante, der Bürstensaum missgebildet (Phillips, 2006). In Rahmen dieser Recherchen wurde weiterhin die Hypothese aufgestellt, dass Innexin 2 eventuell selber über den frühen Endozytoseweg transportiert wird.

Um diese Fragestellungen zu untersuchen, wurden verschiedene immunhistochemische Färbungen durchgeführt. Dazu wurde zuerst die Verteilung des frühen Endosomenmarkers Rab 5 und von Dynamin in Wildtyp und *kropf* Mutante verglichen. Dynamin ist ein GTP-bindendes Protein, das nach der Bildung eines Clathrin umhüllten Vesikels für dessen Loslösung von der Membran erforderlich ist (Alberts, 2004). Weiterhin wurde in der temperatursensitiven Mutante *shibire<sup>Ts</sup>* (*Shi<sup>Ts</sup>*) Dynamin durch einen Temperaturanstieg auf 37 °C inaktiviert. Damit wurde dieser Endozytoseweg unterbunden und dann die Verteilung von Innexin 2 analysiert. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Abb. 3.13 zu sehen. Im Wildtyp ist Rab 5 in den Zellen der äußeren Schicht des Proventrikulus apikal akkumuliert (Abb. 3.13 A-D), hier in einer Doppelfärbung mit den Adherens junctions Protein DE-cadherin und dem Zytoskelett Proteine  $\alpha$ -Spectrin. In der *kropf* Mutante sieht man, dass die Färbung von Rab 5 nicht reduziert ist (Abb. 3.13 E-H). Im Unterschied zu den wildtypischen Proventrikuli fällt auf, dass die verstärkte apikale Lokalisation von Rab 5 nicht mehr zu sehen ist und das Rab 5 gleichmäßig im gesamten Zytosplasma verteilt ist. Bei der Anfärbung von Dynamin ist dagegen kein Unterschied zwischen der *kropf* Mutante und dem Wildtyp zu erkennen. In beiden Fällen ist Dynamin deutlich apikal lokalisiert (Abb. 3.13 I-P). Ebenfalls muss die Hypothese abgelehnt werden, dass Innexin 2 über die Clathrin umhüllten Vesikel endozytiert wird. In der *shibire<sup>Ts</sup>* Mutante zeigt Innexin 2 keine veränderte Lokalisation gegenüber dem Wildtyp.



**Abb. 3.13: Expression von Rab 5 und Dynamin in *kropf* Mutanten und Innexin 2 in *shibire<sup>TS</sup>* Mutanten in den OLP**

A-H: Immunhistochemische Färbung von Rab5 (grün) DE-cadherin (*DE-cad* in rot) und Spectrin (*Spec* in blau) im Wildtyp (A-D) und in der *kropf* Mutante (E-H). I-P: Immunhistochemische Färbung von Dynamin (*Dyn* in grün), DE-cadherin (rot) Bazooka (*Baz* in blau) im Wildtyp (I-L) und *kropf* Mutante (M-P). In der *kropf* Mutante zeigt Rab 5 eine leicht veränderte Lokalisation aber keine Reduktion in der Expression. Dynamin ist dagegen nicht umverteilt in der *kropf* Mutante. Q-X: Immunhistochemische Färbung von Innexin 2 (*Inx2* in grün), DE-cadherin (*DE-cad* in rot) und Bazooka (*Baz* in blau) in Wildtyp (Q-T) und *shibire<sup>TS</sup>* nach Hitzebehandlung (U-X). Hier zeigt Innexin 2 keine Veränderung in der Lokalisation. Die deutliche, anscheinend im apikalen Bereich der OLP-Zellen lokalisierte Färbung von DE-cadherin in (R) und (V) zeigt die Zonula adhaerens der dicht anliegende Epithel der RLP.

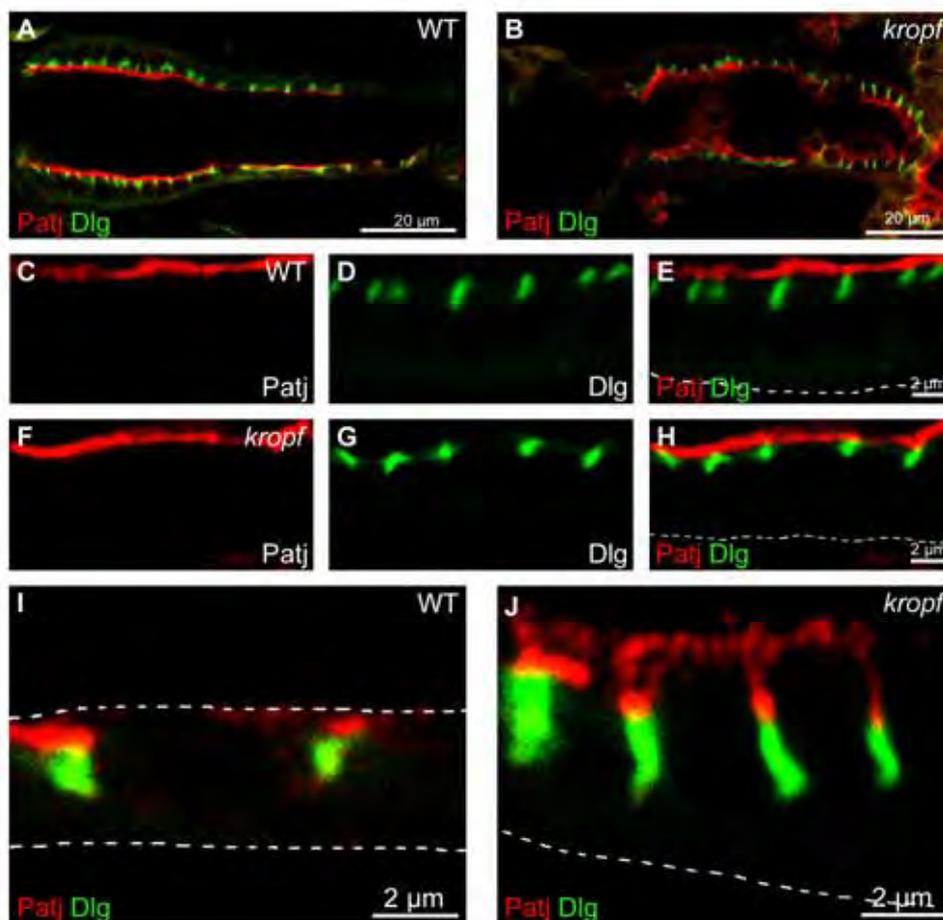
### 3.7 Untersuchung des subapikalen Komplexes in der *kropf* Mutante

Die bisherigen Ergebnisse bei der Untersuchung des *kropf* Phänotyps haben gezeigt, dass die lateralen Zellverbindungen wie die smooth Septate junctions als auch spot-Adherens junctions in der äußeren Schicht des Proventrikulus ausgebildet sind (Abb. 3.11 D und F; Abb. 3.12 B-C). Es konnte zwar eine Veränderung ihrer Lokalisation im posterioren Bereich des Proventrikulus festgestellt werden, aber nicht in der Position zueinander.

Ein sehr auffälliger Befund der elektronenmikroskopischen Untersuchung war dem gegenüber die stark missgebildete apikale Region mit den deformierten Mikrovilli. In den folgenden Experimenten wurde deshalb der Focus auf die apikale Region gelegt und die Lokalisation verschiedener Mitglieder des subapikalen Proteinkomplexes in der *kropf* Mutante analysiert.

### 3.7.1 Die Lokalisation von *DPatj* ist in der *kropf* Mutante nicht verändert.

Die Proteine des subapikalen Crumbs Komplexes haben eine entscheidende Bedeutung für die Aufrechterhaltung der Zellpolarität. *Drosophila* PALS-1 Associated Tight junctions Protein (*DPatj*) ist ein Bestandteil dieses Komplexes.



**Abb. 3.14: *DPatj* ist im Proventrikulus der *kropf* Mutante nicht fehllokalisiert.**

Immunohistochemische Färbung mit anti-*Patj* in rot und anti-*Discs large* (*dlg*) in grün an larvalen Proventrikuli. A, C-D, I: Färbung des wildtypischen Proventrikulus, Übersicht in A, Vergrößerung des anterioren Bereichs der OLP (C-D) und des posterioren Bereichs (I). B, F-H, J: Färbung des Proventrikulus der *kropf* Mutante. Übersicht (B), anteriorer Bereich der OLP (F-H) und posteriorer Bereich (J).

In den äußeren Zellen des wildtypischen Proventrikulus ist *DPatj* deutlich oberhalb der Septate junctions Region (markiert durch *Discs large*) lokalisiert (Abb. 3.14 A). Diese Lokalisierung zeigt *DPatj* auch im Proventrikulus der *kropf* Mutante (Abb. 3.14 B). Wie in den vorhergehenden Ergebnissen gezeigt werden konnte, weist der posteriore Abschnitt des Proventrikulus meist den stärkeren Phänotyp bezüglich einer Veränderung der Morphologie der Zellen auf. So wurde gezielt die Lokalisation von *DPatj* in den verschiedenen Regionen des Proventrikulus analysiert. Bei dem Vergleich der anterioren Zellen ist zwischen dem *kropf* und dem Wildtyp Proventrikulus kein nennenswerter Unterschied zu erkennen (Abb. 3.14 C-H). Aber auch in dem posterioren Abschnitt der äußeren Schicht des Proventrikulus ist *DPatj* membranständig apikal zu den Septate junctions lokalisiert. Wiederum fällt aber deutlich der Größenunterschied bei den posterioren Zellen auf: Die Zellen der *kropf* Mutante sind nahezu doppelt so hoch wie die vergleichbaren Wildtyp Zellen (Abb. 3.14 I und J).

### 3.7.2 Bazooka und *DaPKC* sind im Proventrikulus der *kropf* Mutante misslokalisiert.

Bazooka und *Drosophila* atypische Protein Kinase C (*DaPKC*) gehören neben dem Crumbs-Komplex zu dem zweiten subapikalen Proteinkomplex, der für die Ausbildung der Polarität wichtig ist. Zu diesem sogenannten Bazooka-Komplex gehört auch noch das Protein *DPAR6*, welches im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht wurde.

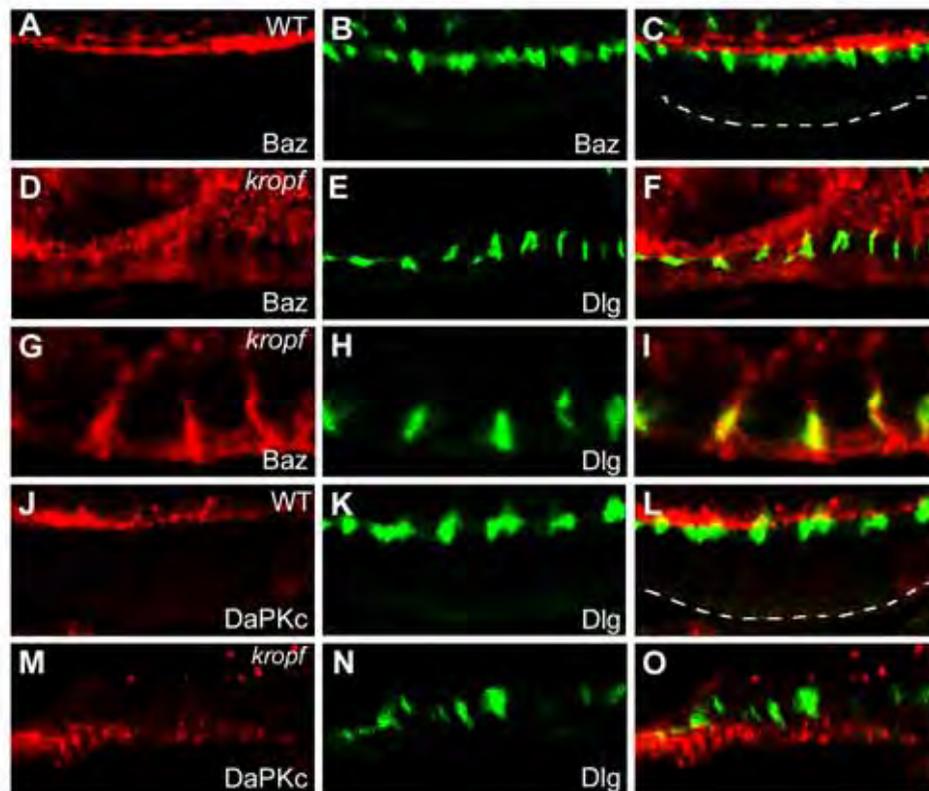
Die Expressionsmuster von Bazooka und *DaPKC* sind in den larvalen Proventrikuli mit dem von *DPatj* vergleichbar. Die beiden Proteine des Bazooka-Komplexes sind in der gesamten äußeren Schicht des Proventrikulus exprimiert (Daten nicht gezeigt). Durch Doppelfärbungen dieser Antikörper zusammen mit dem Antikörper gegen das Septate junction Protein *Discs large*, ließ sich die Lokalisation dieser Proteine in den Zellen der äußeren Schicht genau bestimmen. So konnte gezeigt werden, dass in diesen Zellen der Bazooka *DaPKC* Komplex, wie zuvor für *DPatj* gezeigt, apikal zu den Septate junctions lokalisiert ist und keine zytoplasmatische Färbung aufweist (Abb. 3.15 C und J).

Ein markanter Unterschied fiel aber bei den *kropf* Mutanten auf (Abb. 3.15 D-L). Bei der immunhistochemischen Färbung sowohl von Bazooka wie auch von *DaPKC* fiel eine deutliche Fehllokalisierung der beiden Proteine auf (Abb. 3.15 D-I und M-O).

Bei Wiederholungen dieses Experimentes konnte gezeigt werden, dass die Misslokalisierung von Bazooka in *innexin 2* Mutanten eine hohe Penetranz aufwies. Dennoch fiel auf, dass es

bei der Misslokalisierung zwei verschiedene Arten der Ausprägung gab. Ein Teil der *kropf* Mutanten zeigte eine starke zytoplasmatische Expression von Bazooka (Abb. 3.15 D-F), in anderen Larven war dagegen Bazooka an der basolateralen Membran lokalisiert und zeigte zum Teil eine deutliche Kolo-kalisation mit dem Septate junction Protein Discs large (Abb. 3.15 G-I).

Für *DaPKC* konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass in den *kropf* Mutanten die wildtypische apikale Färbung nicht mehr nachweisbar war und *DaPKC* in den Zellen des Proventrikulus zytoplasmatisch lokalisiert ist (Abb. 3.15 M-O).



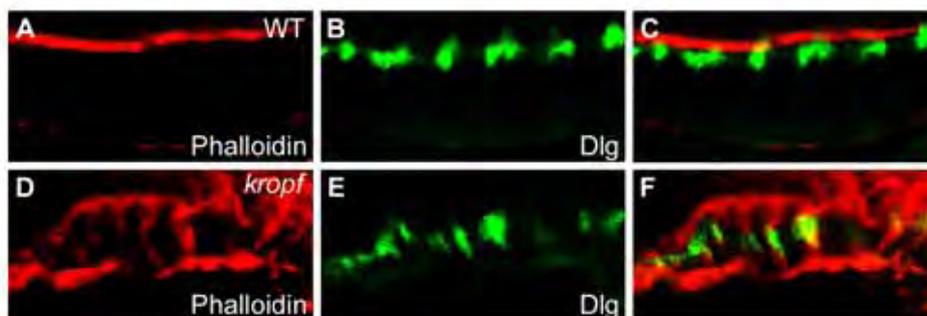
**Abb. 3.15: Der Bazooka/DaPKC -Komplex weist in der *kropf* Mutante eine deutliche Misslokalisierung auf.** Immunohistochemische Färbungen mit Antikörpern gegen die Proteine Bazooka (Baz) (A, D, G) und atypische Protein Kinase C (*DaPKC*) (J und M) in Kofärbung mit Antikörper gegen das Septate junction Protein Discs large (Dlg) in grün. In den äußeren Zellen des larvalen Proventrikulus (OLP) weisen im Wildtyp (A-C und J-L) beide Proteine eine subapikale Lokalisation auf. In den OLP Zellen der *kropf* Mutante kommt es bei Bazooka zu einer zytoplasmatischen (D-F) oder basolateralen (G-I) Lokalisation. Ebenfalls zeigt *DaPKC* in den OLP Zellen der *kropf* Mutante eine zytoplasmatische Lokalisation (M,O).

### 3.8 Untersuchung von einzelnen Komponenten des Zytoskeletts in der *kropf* Mutante.

In den vorangegangenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass spezifisch der Bazooka Komplex in der *kropf* Mutante misslokalisiert ist. Die missgebildeten Mikrovilli in der OLP waren ein weiterer interessanter Befund bei den ultramikroskopischen Untersuchungen.

Wie schon erwähnt, konnte in anderen Publikationen gezeigt werden, dass die korrekte Entwicklung der Mikrovilli in Mutanten von Zytoskelett-Komponenten (spectrin-based membrane skeleton (SBMS)) gestört ist (Lee, 1993; Phillips, 2006). Weitere Studien verknüpfen die Lokalisation von Bazooka mit dem Mikrotubuli Motorprotein Dynein (Harris und Peifer, 2005). Dies führt zu der Hypothese, dass die Deformation der Mikrovilli auf ein missgebildetes Zytoskelett zurückzuführen ist und diese Missbildung des Zytoskeletts ebenfalls die Fehllokalisierung von Bazooka verursacht.

Für die Überprüfung dieser Hypothese wurde im Rahmen dieser Arbeit die Ausprägung des Zytoskeletts in dem Proventrikulus der *kropf* Mutante untersucht.



**Abb. 3.16: F-actin ist in *kropf* Proventrikuli an dem lateralen Kortex verstärkt.**

A-C: F-actin, gefärbt durch Phalloidin in rot, ist apikal in den äußeren Zellen des wildtypischen Proventrikulus lokalisiert. D-F: In der *kropf* Mutante hat sich das Signal der Phalloidin Färbung verstärkt und ist auch an dem lateralen Kortex zu sehen. In beiden Abbildungen ist der Septate junction Marker Discs large (Dlg) für die bessere Lokalisierung des Signals in grün mitgefärbt.

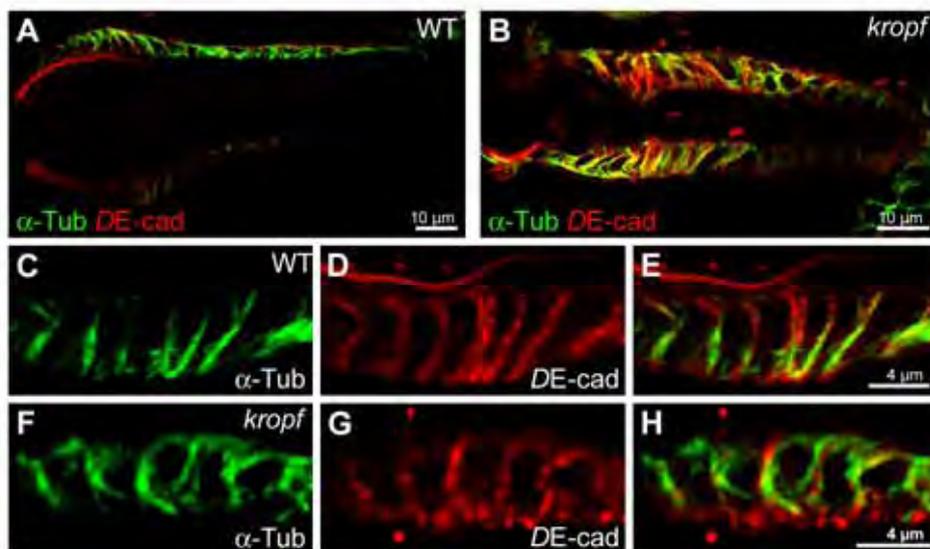
#### 3.8.1 Innexin 2 begrenzt die Rekrutierung von F-actin an den lateralen Kortex

In den äußeren Zellen des Proventrikulus ist F-actin, markiert durch Phalloidin, auf den apikalen Bereich des Kortex beschränkt (Abb. 3.16 A-C). Dieser Bereich liegt oberhalb der Septate junctions. In der *kropf* Mutante ist diese klare apikale Struktur aufgelöst. In der Färbung erkennt man, dass neben der apikalen Lokalisation auch an dem lateralen Kortex

verstärkt Actinfilamente lokalisiert sind. Auch an dem basalen Bereich der Zelle kann das Actin detektiert werden. Die gesamte Struktur erscheint nicht so kompakt wie im wildtypischen Proventrikulus.

### 3.8.2 In *kropf* Mutanten sind Struktur und Polarität der Mikrotubuli verändert.

Mikrotubuli sind Proteinfilamente, die sich aus Dimerbausteinen zusammensetzen, die jeweils aus zwei globulären Untereinheiten, dem  $\alpha$  - und  $\beta$ - Tubulin bestehen. Aufgrund dieser Heterodimere kommt es zu einer Asymmetrie des Proteinfilamentes, welche mit Plus- und Minus-Ende bezeichnet wird. In polarisierten Epithelien sind die Mikrotubuli normalerweise parallel zur Längsachse angeordnet, wobei das Minus-Ende dieser Proteinfilamente in Richtung der apikalen Oberfläche gerichtet ist und das Plus-Ende an der basalen Seite lokalisiert ist. Diese Orientierung lässt sich unter anderem durch die Anfärbung der Motorproteine sichtbar machen. So kann mit Antikörpern gegen Dynein, welches ein Minus-Ende-orientierter Mikrotubulimotor ist, das Minus-Ende der Mikrotubuli angefärbt werden (Goldstein und Yang, 2000).

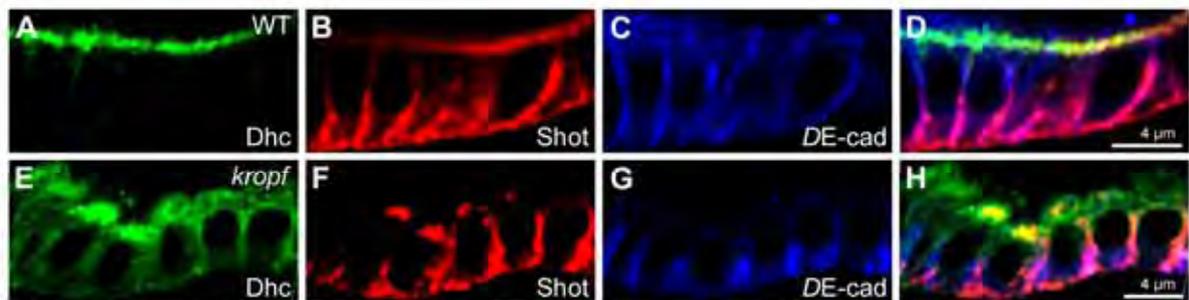


**Abb. 3.17: Die Mikrotubuli-Filamente sind in *kropf* Mutanten verändert.**

Immunhistochemische Färbung mit Antikörpern gegen  $\alpha$ -Tubulin (grün) und DE-cadherin (rot) in wildtypischen und *kropf* Proventrikuli. A: Übersicht über den gesamten Proventrikulus des Wildtyps. B: Übersicht der OLP der *kropf* Mutante. C-H: Ausschnittsvergrößerung aus den anterioren Bereichen von Wildtyp (C-E) und *kropf* (F-H). Die durch  $\alpha$ -Tubulin angefärbten Mikrotubuli-Filamente sind im Wildtyp am lateralen Kortex der Zellen lokalisiert (C), dagegen erkennt man in der *kropf* Mutante eine verstärkte Färbung im Zytoplasma (F).

Alle diese für polare Epithelien typischen Charakteristika der Mikrotubuli besitzt auch der wildtypische larvale Proventrikulus. Für diese Färbung wurden die Proventrikuli nach einem speziellen Protokoll fixiert, um die Mikrotubuli zu erhalten (siehe Material und Methoden). Wie in Abb. 3.17 A und C-D zu sehen ist, erstrecken sich Mikrotubulifilamente entlang der lateralen Membran. Dynein, das Minus-Ende orientierte Motorprotein ist im Wildtyp im apikalen Kortex der Zellen lokalisiert (Abb. 3.18 A-C).

Anders sieht dagegen die Situation in der *kropf* Mutante aus: Proventrikuli, welche gleich wie die wildtypischen behandelt worden waren, zeigten eine veränderte Struktur der Mikrotubuli. Die Färbung des  $\alpha$ -Tubulin war nicht mehr so deutlich an dem Kortex der lateralen Membran lokalisiert (Abb. 3.17 C-E) sondern schien in einer aufgelockerten Struktur verstärkt auch im Zytoplasma lokalisiert zu sein. Deutlich wurde die Veränderung der Mikrotubuli mit der Färbung des Dynein. Im Gegensatz zu der Lokalisation im apikalen Kortex im Wildtyp ist Dynein in den Zellen des *kropf* Proventrikulus sehr stark zytoplasmatisch lokalisiert. Die Lokalisation ist allerdings noch weiterhin im apikalen Bereich der Zellen verstärkt. (Abb. 3.18 E- H).

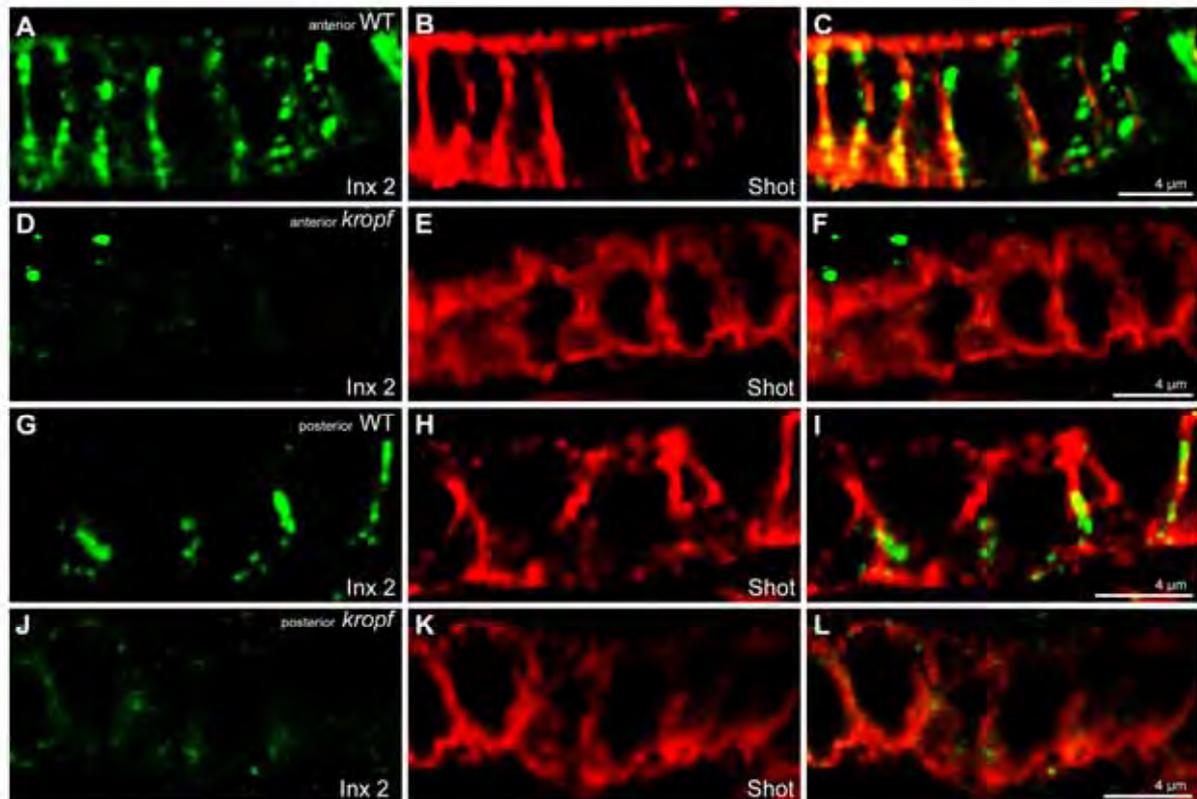


**Abb. 3.18: Der Verlust von Innexin 2 verändert die Verteilung von Mikrotubuli Minus-Enden.**

Tripel-Antikörperfärbung mit Antikörpern gegen die schwere Kette von Dynein (Dhc in grün), gegen das Spectraplaklin Short Stop (Shot in rot) und gegen das Adherens junction Protein *DE-cadherin* (*DE-cad* in blau). A-D: Färbung der äußeren Zellen des wildtypischen Proventrikulus. Dynein ist apikal und Short Stop, welches eine Mikrotubuli-bindende Domäne besitzt und die Mikrotubuli markiert, ist am lateralen Kortex und apikal lokalisiert. E-H: In der *kropf* Mutante ist Dynein misslokalisiert und ist im Zytoplasma der Zellen lokalisiert.

Für weitere Untersuchungen des Zytoskeletts wurde im Proventrikulus die Expression von Short Stop (Shot) untersucht. Das Gen *short stop* (*shot*) ist auch unter dem Namen *kakapo* bekannt und codiert für ein Mitglied der kürzlich benannten Spectraplaklin Familie von Zytoskelettbindeproteinen. Short stop besteht aus einer C-terminalen Mikrotubuli Binde-Domäne, einer N-terminalen Actin Binde-Domäne und einer sich wiederholenden Plakin-Domäne, die mit Transmembran Rezeptoren interagieren kann, welche für die Zelladhäsion

von Bedeutung sind (Gregory und Brown, 1998; Strumpf und Volk, 1998; Röper und Brown, 2003). Bei vorangegangenen Untersuchungen in unserer Abteilung konnte schon gezeigt werden, dass Short Stop im Proventrikulus exprimiert wird und eine Schlüsselfunktion in der Regulation der Proventrikulus Morphogenese hat (Fuss *et al.*, 2004).



**Abb. 3.19: Innexin 2 ist für die Lokalisierung des Spectraplakins Short stop notwendig.**

Anti-Short stop (Shot in rot) und Anti-Innexin 2 (Inx2 in grün) Antikörperfärbung in Wildtyp (A-C; G-I) und *kropf* (D-F; J-L) Proventrikuli. Short stop ist im anterioren Bereich der äußeren Schicht des Proventrikulus (OLP) apikal lokalisiert. In diesen Zellen ist aber ebenso eine laterale Färbung mit einer Kolokalisation mit Innexin 2 festzustellen (A-C). In den posterioren Zellen der OLP im Wildtyp ist nur noch die laterale Färbung zu sehen. In der *innexin 2* Mutante ist die apikale Färbung im anterioren Bereich deutlich reduziert und die laterale Lokalisation erscheint unstrukturiert. Das Signal ist im gesamten Zytoplasma zu detektieren (D-F). Maßbalken entsprechen 4  $\mu\text{m}$ .

Bei der Untersuchung der Lokalisation im larvalen Proventrikulus zeigte sich, dass Short stop an der apikalen Seite der anterioren äußeren Zellen akkumuliert ist. Zusätzlich kann aber auch in diesen vorderen Zellen eine deutliche laterale Färbung von Short Stop detektiert werden, welche teilweise eine Kolokalisation mit dem lateralen Gap junction Protein Innexin 2 aufweist (Abb. 3.19 A-C). Im posterioren Abschnitt des Proventrikulus ist die apikale Lokalisation ein wenig schwächer, aber an dem lateralen Kortex der Zellen kann weiterhin eine deutliche Färbung lokalisiert werden und auch eine Überlappung mit Innexin 2 (Abb.

3.19 G-I). In dem Proventrikulus der *kropf* Mutante ist eine deutliche Veränderung von Short Stop zu registrieren: Die prominente apikale Färbung des anterioren Bereichs ist nicht mehr nachweisbar. Und auch die laterale Färbung, die im Wildtyp nur im lateralen Kortex zu sehen war, ist verändert. Die Lokalisation von Short Stop ist mehr zytoplasmatisch. Die aufgelockerte Struktur, die von Short Stop gekennzeichnet ist, ähnelt sehr der  $\alpha$ -Tubulin Färbung (Abb. 3.17 F). Im anterioren Bereich des Proventrikulus bestätigt sich die Veränderung im lateralen Bereich, auch wenn der Unterschied zwischen Wildtyp und Mutante weniger deutlich ist.

### 3.9 Innexin 2 beeinflusst direkt die Lokalisation von Bazooka.

Obwohl in den vorangegangenen Untersuchungen gezeigt werden konnte, dass die *kropf* Mutante sehr deutliche Defekte im Zytoskelett aufweist, fiel auf, dass Polaritätsmarker und andere Zellverbindungskomplexe nicht in der Lokalisierung verändert sind.

Es kann nur immer wieder ein sehr spezieller Defekt mit der Misslokalisierung von Bazooka beobachtet werden. Diese Beobachtungen legen nahe, dass die bisherigen Ergebnisse für eine sehr spezifische Funktion von Innexin 2 für die Lokalisierung von Bazooka sprechen.

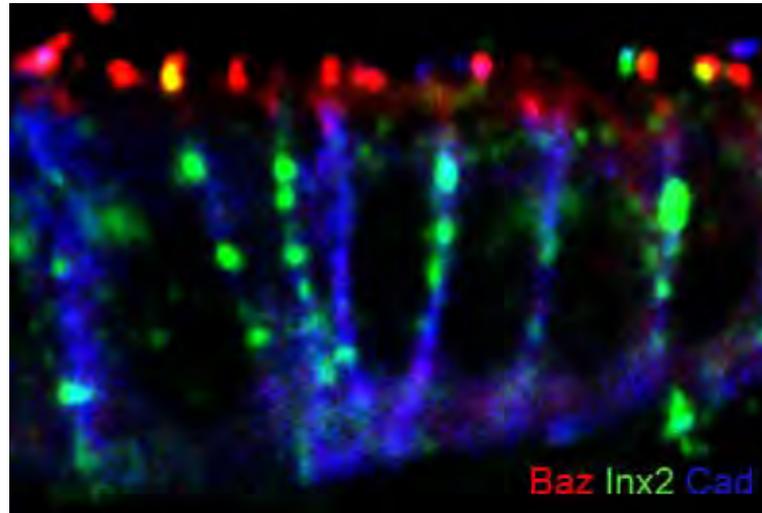
#### 3.9.1 Innexin 2 interagiert direkt oder indirekt mit Bazooka.

In dieser Arbeit konnte bereits gezeigt werden, dass Innexin 2 nicht nur lateral lokalisiert ist, sondern auch im apikalen Bereich von Epithelzellen detektiert werden kann (siehe Abb. 3.2 G-I). Auch in den äußeren Zellen des Proventrikulus konnten immer wieder einzelne Punkte auf der apikalen Seite detektiert werden. Auch wenn die Struktur der Gap junctions generell an der lateralen Seite der Zellen positioniert ist, konnte auch in der Koimmunfärbung mit dem apikalen Protein Bazooka in der konfokalen Aufnahme ein kleiner Überlappungsbereich festgestellt werden (Abb. 3.20).

Um diesen ersten Hinweis von einer möglichen direkten oder indirekten Interaktion zwischen Innexin 2 und Bazooka zu bestätigen, wurde eine Koimmunpräzipitation durchgeführt. Hierfür wurden Proteinextrakte aus wildtypischen Stadium 17 Embryonen hergestellt.

Die Proteinextrakte wurden für unterschiedliche Koimmunpräzipitationsexperimente eingesetzt. Zum einen setzte man den anti-Innexin 2 Antikörper zur Präzipitation ein, zum

anderen den anti-Bazooka Antikörper. Als Kontrolle wurde ein unspezifisches Kaninchen IgG verwendet (Abb. 3.21 B).



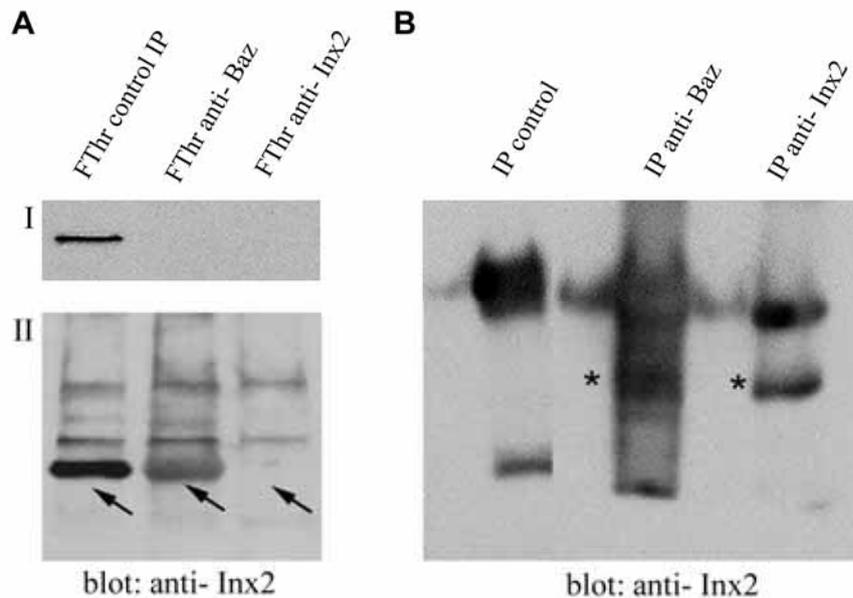
**Abb. 3.20: Partielle Kolokalisation zwischen Innexin 2 und Bazooka.** Immunhistochemische Färbung mit Antikörpern gegen Bazooka (Baz in rot) Innexin 2 (Inx2 in grün) und DE-cadherin (DE-cad in blau). In den Zellen der äußeren Schicht des Proventrikulus kommt es im apikalen Bereich teilweise zu einer Kolokalisation von Bazooka und Innexin 2 (gelbe Punkte).

In dem wildtypischen Proteinextrakt wurde als Positiv-Kontrolle mit dem anti-Innexin 2 Antikörper präzipitiert. Bei dem anschließenden Immunblot konnte ein Signal in der erwarteten Größe von 42 kDa mit dem anti-Innexin 2 Antikörper detektiert werden. Die Negativ-Kontrolle, bei der ein unspezifisches IgG eingesetzt wurde, zeigte kein Signal in der erwarteten Größe. Bei der Immunpräzipitation mit anti-Bazooka konnte eine Bande in Höhe von Innexin 2 detektiert werden, allerdings war das Signal nicht klar von dem Hintergrund zu trennen. Weitere starke Hintergrundbanden in der Höhe von 55 kDa und 26 kDa, die in allen drei Spuren zu sehen sind, stammen von den zur Präzipitation verwendeten Antikörpern, welche noch im Proteinpräzipitat vorhanden waren.

Um zu zeigen, dass die schwache Bande in der Immunpräzipitation mit dem Antikörper anti-Bazooka tatsächlich auf eine direkte oder indirekte Interaktion von Innexin 2 und Bazooka hinweist, wurde auch der Überstand der Immunpräzipitation, welcher das ungebundene Protein enthält, aufgetragen und in einem Immunblot auf das Vorhandensein von Innexin 2 überprüft (Abb. 3.21 A).

In dem Überstand der Kontrolle konnte eine sehr starke Bande in der erwarteten Größe detektiert werden, welche schon nach kurzer Expositionszeit sichtbar wurde (Abb. 3.21 A1). In dem Überstand der Immunpräzipitationen mit dem anti-Bazooka und anti-Innexin 2

Antikörper war das Signal dieser Bande auch bei langer Expositionszeit (Abb. 3.21 A2) stark reduziert oder nicht mehr nachzuweisen. Somit konnte gezeigt werden, dass durch die Präzipitation von Bazooka aus dem Proteinextrakt Innexin 2 ebenfalls präzipitiert wird.

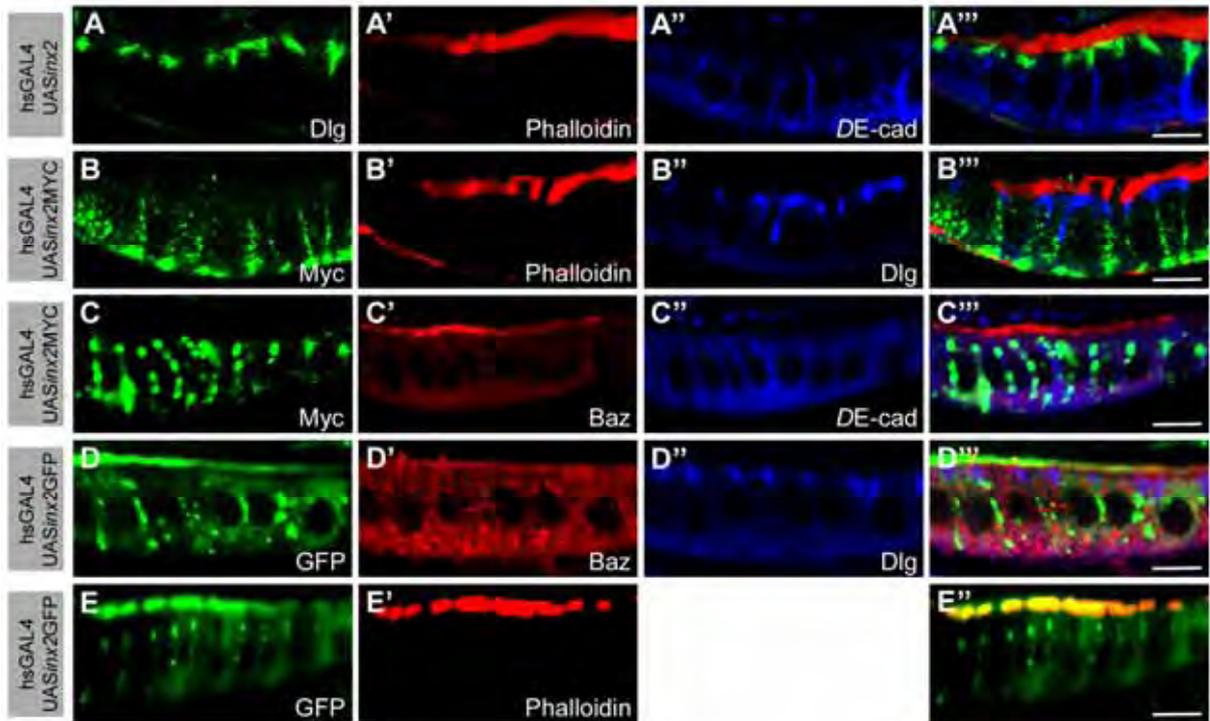


**Abb. 3.21: Biochemisch interagiert Bazooka mit Innexin 2.**

A: Nach der Immunpräzipitation (IP) ist das ungebundene Protein (Flow Through, FThr) auf ein 10 % SDS Gel aufgetragen worden und Innexin 2 auf einem Immunblot nachgewiesen worden. In dem Überstand der Kontroll IP kann Innexin 2 Protein nachgewiesen werden, im Gegensatz zu den Überständen der anti-Bazooka und anti-Innexin 2 IP. In beiden Extrakten konnte Innexin 2 Protein kaum oder stark reduziert nachgewiesen werden (Pfeile). In A I ist der Immunblot nach kurzer Expositionszeit zu sehen: Hier erkennt man nur die starke Innexin 2 Bande in dem Kontrollüberstand. In A II ist derselbe Blot bei längerer Expositionszeit zu sehen. B: Koimmunpräzipitationsexperimente mit den Proteinen Innexin 2 und Bazooka. Als Kontrolle wurde die Immunpräzipitation mit Kaninchen IgG durchgeführt (Control IP). Die Sternchen (\*) kennzeichnen das präzipitierte Innexin 2.

### 3.9.2 Die Bazooka Lokalisation ist von dem C-Terminus des Innexin 2 abhängig.

Um die Funktion des Innexin 2 in der Entwicklung des Proventrikulus genauer zu analysieren, wurden neben Funktionsverlust-Experimenten auch Funktionsgewinn-Experimente (Loss and Gain of function Experimente) durchgeführt. Bei letzteren Experimenten kommt es zu einem Zugewinn der normalen Genfunktion. Wenn durch diese Überexpression dominante Phänotypen auftreten, können ebenfalls Hinweise auf die Funktion eines Gens gewonnen werden. Neben dieser Überexpression des wildtypischen Gens, wurden verschiedene Varianten des Innexin 2 Gens untersucht.



**Abb. 3.22: Überexpression von verschiedenen UAS *innexin 2* Konstrukten**

Durch den hs GAL4 Treiber wurde in den späten Embryonalstadien eine ubiquitäre Expression von verschiedenen UAS Innexin 2 Konstrukten vermittelt. Durch immunhistochemische Färbungen wurde die Lokalisation verschiedener Polaritätsmarker in den Zellen der äußeren Schicht des Proventrikulus analysiert.

A-A''': Überexpression des wildtypischen Innexin 2. Der Septate junction Marker Discs large (Dlg in grün), der Adherens junction Marker *DE-cadherin* (*DE-cad* in blau) und F-actin, angefärbt durch Phalloidin (in rot) weisen keine Veränderung im Vergleich zum Wildtyp auf.

B-C''': Überexpression des mit MYC markierten Innexin 2. Auch hier sind F-actin ((B') Phalloidin in rot), Discs large ((B'') Dlg in blau), *DE-cadherin* ((C'') *DE-cad* in blau) und Bazooka ((C') Baz in rot) nicht umverteilt. Ebenfalls weist Innexin 2 MYC ((B und C) Myc in grün) dieselbe Lokalisation wie wildtypisches Innexin 2 auf.

D-E'': Überexpression des Innexin 2 GFP Konstruktes. Innexin 2 GFP (GFP in grün) zeigt neben dem für Innexin typischen lateralen punktförmigen Muster eine markante apikale Färbung. Disc large ((D'') Dlg in grün) und F-actin ((E') angefärbt durch Phalloidin in rot) zeigen keine Veränderungen. Eine deutliche Umverteilung von Bazooka ((D') Baz in rot) ist aber in diesem Überexpressionsexperiment zu beobachten. Maßbalken entsprechen 4 µm.

Für die Überexpressions-Experimente wurde das Gal4/UAS-System verwendet (siehe Material und Methoden). Da für die Untersuchung die Ausbildung des Proventrikulus notwendig war, wurde ein temperatursensitives System genutzt, so dass die frühe Entwicklung normal verlief und erst im späten Embryonalstadium durch einen Hitzeschock der Embryonen die gewünschten Genkonstrukte überexprimiert wurden.

Die Überexpression des wildtypischen Innexin 2 Konstruktes führte zu keiner Umverteilung des Actin-Zytoskeletts und dem Adherens junction Protein *DE-cadherin* (Abb. 3.22 A) Es gab aber in diesem Versuch keine Möglichkeit zu kontrollieren, in welchem Level die Überexpression nun tatsächlich stattgefunden hat, da es nicht möglich ist, zwischen dem

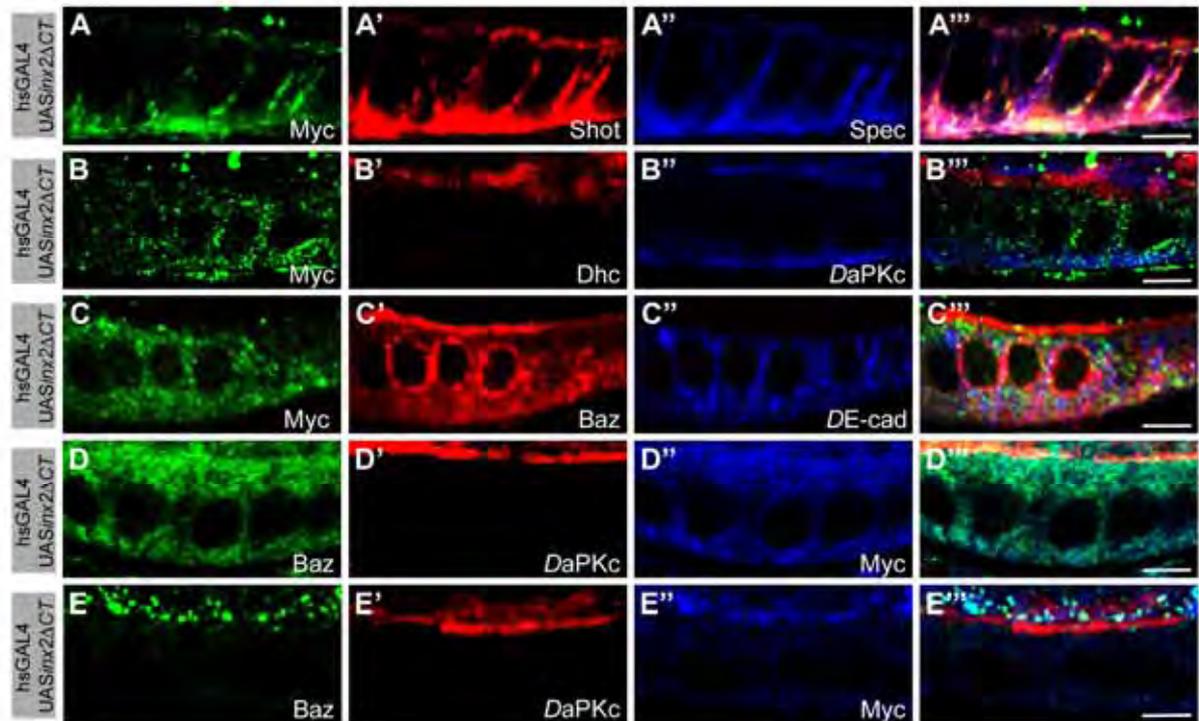
endogenen und dem überexprimierten Innexin 2 zu unterscheiden. Um dieses Problem zu lösen, wurden in unserem Labor durch H. Lechner und im Rahmen dieser Arbeit transgene Fliegen hergestellt, die ein wildtypisches Innexin Konstrukt mit einer angehängten Sequenz haben, welche spezifisch nachweisbar ist. So wurde für diese Untersuchungen eine sehr kurze MYC Markierung und eine grün fluoreszierendes Protein (GFP) Markierung, welche mit ca. 20 kDA relativ groß ist, benutzt. Beide Markierungen sind am zytoplasmatischen Ende von Innexin 2 angehängt.

Innexin 2 MYC ist wie das wildtypische Innexin in einem punktförmigen Muster an der lateralen Membran lokalisiert. Die Überexpression führte wie bei den Experimenten mit dem wildtypischen Innexin 2 zu keiner Veränderung der verwendeten Polaritätsmarker. So zeigte das Actin-Zytoskelett, die mit *DE-cadherin* markierten Adherens junctions und die mit *Discs large* angefärbten Septate junctions keine Veränderung in der Lokalisierung. Ebenso kam es zu keiner Umverteilung von *Bazooka* (Abb. 3.22 B und C).

Bei der Analyse der Überexpressionsversuche mit dem Innexin 2 GFP Konstrukt fiel zunächst auf, dass dieses Fusionsprotein nicht dieselbe Lokalisierung zeigt wie das wildtypische Innexin 2. Neben dem erwarteten punktförmigen, an der lateralen Membran lokalisierten, Muster, konnte eine deutliche apikale Färbung detektiert werden. Dieses apikale GFP Signal war mit dem apikalen Actin kolokalisiert, wobei es aber zu keiner Veränderung in dem Actin-Zytoskelett kam. Auffällig war in diesem Experiment, dass *Bazooka* deutlich fehllokalisiert war. Neben einer reduzierten apikalen Färbung, konnten sehr starke zytoplasmatische, in den gesamten Zellen verteilte Signale detektiert werden (Abb. 3.22 D und E).

Schon frühere Ergebnisse in unserem Labor wiesen darauf hin, dass bei dem Innexin 2 GFP Konstrukt der zytoplasmatischen C-Terminus eventuell durch das GFP maskiert wird und die Funktionalität beeinträchtigt ist (Lehmann *et al.*, 2006).

Um zu untersuchen, ob die Misslokalisierung von *Bazooka* auf einen maskierten C-Terminus des Innexin 2 GFP zurückzuführen ist, wurde ein Konstrukt überexprimiert, bei dem der zytoplasmatische C-Terminus deletiert ist. Dieses Konstrukt war ebenfalls mit der MYC Sequenz markiert.



**Abb. 3.23: Überexpression von UAS *innexin 2* ΔCT**

Durch den *hs GAL4* Treiber wurde in den späten Embryonalstadien eine ubiquitäre Expression von *innexin 2* ΔCT vermittelt. Bei diesem Konstrukt ist der zytoplasmatische Schwanz von Innexin 2 deletiert und das Protein mit der MYC Sequenz markiert.

*Innexin 2* ΔCT zeigt bei der Überexpression im larvalen Proventrikulus nicht die wildtypische Lokalisation von Innexin 2. Es kann teilweise eine laterale Membran-Ständigkeit detektiert werden ((A) Myc) aber ebenso auch eine apikale und zytoplasmatische Färbung (B, C, D', E'). Das Mikrotubuli-Zytoskelett, markiert durch Short Stop (A', Shot) und Dynein (B', Dhc) ist nicht verändert. Ebenso sind Spectrin (A'', Spec) und *DE-cadherin* (C'', *DE-cad*) nicht misslokalisiert. In D erkennt man aber im direkten Vergleich, dass bei einer starken *Innexin 2* Myc-Expression (D'') Bazooka (D, Baz) umverteilt ist aber nicht *DaPKC* (D'). Wenn nur eine schwache *Innexin 2* Myc-Expression nachzuweisen ist, kommt es dagegen zu keiner Misslokalisierung von Bazooka (E; Baz). Maßbalken entsprechen 4 μm.

Bei den Überexpressionsexperimenten, bei denen dieselben Konditionen wie in den vorangegangenen gewählt worden sind, war Bazooka ebenfalls misslokalisiert (Abb. 3.23 C und D). Es konnte aber gezeigt werden, dass diese Misslokalisierung ein sehr spezifischer Effekt ist. So waren weder Komponenten des Zytoskeletts, noch die Adherens junctions (Abb. 3.23 A, B, C) verändert. Besonders bemerkenswert ist aber die Tatsache, dass die Umverteilung von Bazooka nicht die Umverteilung des gesamten Bazooka Komplexes repräsentierte. So zeigte *DaPKC*, ebenfalls eine Komponente des Bazooka Komplexes, in demselben Versuch im selben Organ, bei dem Bazooka misslokalisiert war, ein wildtypisches Muster (Abb. 3.23 D). Besonders interessant war, dass dieses Ergebnis dosisabhängig ist. Eine Umverteilung von Bazooka ist nur in den Fällen zu detektieren, bei denen auch eine starke Myc-Färbung

detektiert werden konnte, welche auf eine starke Expression von Innexin 2  $\Delta$ CT schließen lässt. In Proventrikuli, bei denen nur ein schwaches Myc Signal zu sehen war, zeigte auch Bazooka das wildtypische Muster mit der apikalen Lokalisierung (Abb. 3.23 E). Damit ergaben die Analysen, dass das Innexin 2  $\Delta$ CT in der Lage ist, spezifisch Bazooka im larvalen Proventrikulus umzuverteilen.

## 4 Diskussion

### 4.1 Der Proventrikulus, ein Organ zwischen Vorder- und Mitteldarm

Der Proventrikulus ist ein dreischichtiges Organ, welches an der Grenze zwischen Vorder- und Mitteldarm liegt und den Transport des Futters unterstützt. Während seiner Entwicklung laufen hier Signale der wichtigsten Genkaskaden zusammen und werden in morphogenetische Prozesse umgesetzt (Fuss *et al.*, 2004; Josten *et al.*, 2004).

Die äußere Schicht, welche im Rahmen dieser Arbeit von besonderem Interesse war, weist eine einzigartige Besonderheit auf: Während der Entwicklung zeigt sie sowohl Merkmale eines ektodermalen wie auch endodermalen Gewebes.

Die äußere Schicht entwickelt sich aus dem caudalen Anteil des Stomodeums (Tepass und Hartenstein, 1994). Es findet keine viscerale mesenchymale-epitheliale Transition statt, welche ein Merkmal eines typischen endodermalen Gewebes wäre. Das Gewebe entwickelt sich in den frühen Stadien der Embryonalentwicklung mit allen typischen Merkmalen eines primären Gewebes. So ist in Stadium 14 Crumbs, ein typischer Marker ektodermalen Gewebes, deutlich in den Zellen der äußeren Schicht exprimiert. Ein weiteres typisches ektodermales Merkmal ist die Ausprägung der Zonula adhaerens. In dem Stadium 14 konnte dieses durch eine deutlich apikale Färbung des Adherens junctions Protein *DE-cadherin* nachgewiesen werden (Abb. 3.7). Diese Beobachtung wird durch eindeutige elektronenmikroskopische Bilder einer apikalen Zonula adhaerens in der Publikation von Tepass und Hartenstein (1994) unterstützt. Diese deutliche Zonula adhaerens fragmentiert in den folgenden Entwicklungsschritten und es bilden sich die Merkmale eines endodermalen Mitteldarmgewebes aus: Dazu gehören ein ausgeprägter Mikrovillisaum und die spot-Adherens junctions, die an der lateralen Seite der Zellen lokalisiert sind.

In der Vergangenheit wurde die Frage, ob es sich bei diesen Zellen um ektodermales oder endodermales Gewebe handelt, von verschiedenen Autoren anders gewertet. Von Tepass und Hartenstein (1994) wurden die frühen ektodermalen Merkmale beachtet und die Zellen der äußeren Schicht als ektodermales Gewebe bezeichnet. In einer weiteren Publikation, in welcher die Morphologie des adulten Proventrikulus beschrieben wurde, wurde dagegen die äußere Schicht als Mitteldarmgewebe bezeichnet und somit zu den endodermalen Geweben gezählt (King, 1988). In unserem Labor wurde dagegen beobachtet, dass auch in den frühen

Stadien, in denen das mikroskopische Bild auf ein ektodermales Gewebe schließen lässt, der endodermale Marker *Defective proventriculus* deutlich exprimiert ist (Fuss, 1998), weshalb die äußere Schicht zu den endodermalen Geweben gezählt wurde. Abschließend kann man sagen, dass es sich bei dieser äußeren Schicht des Proventrikulus um Zellen besonderer Qualität handelt, welche verschiedene Merkmale der primären und sekundären Gewebe vereinen.

### 4.2 Die Verteilung von Innexin 1, 2 und 3 in epithelialen Zellen

Bei der Analyse der Verteilung der verschiedenen Innexine (Innexin 1, 2 und 3) im larvalen Proventrikulus konnte gezeigt werden, dass *innexin 2* und *3* ein fast identisches Expressionsmuster haben. Beide Transkripte sind ubiquitär im Proventrikulus exprimiert. Dagegen wies *innexin 1* ein sehr distinktes Expressionsmuster auf und war nur in einem Band von ca. 5 Zellen Breite im anterioren Bereich des Proventrikulus zu detektieren. Auf Proteinebene konnte für Innexin 2 und 3 die ubiquitäre Verteilung in der äußeren Schicht des Proventrikulus bestätigt werden, aber für Innexin 1 war es nicht möglich, auf Proteinebene das distinkte Expressionsmuster des Transkriptes zu bestätigen. Die Proteinexpression war zwar im anterioren Bereich verstärkt, aber nicht so deutlich auf 5 Zellen beschränkt.

Diese Diskrepanz zwischen der mRNA Lokalisation und dem Muster der Proteinverteilung konnte auch bei der Untersuchung der Innexin 2 Expression während der Embryonalentwicklung festgestellt werden. In der Epidermis ist Innexin 2, dargestellt durch immunhistochemischen Färbungen, entlang der anterioren-posterioren Achse uniform exprimiert. Demgegenüber findet man die *innexin 2* mRNA Expression in einem segmentalen, sich wiederholenden Muster (Abb. 3.1; Bauer *et al.*, 2002; Curtin *et al.*, 1999; Stebbings *et al.*, 2002).

Eine Erklärung für diese Diskrepanz zwischen dem Verteilungsmuster der mRNA und des Proteins könnte die viel höhere Stabilität des Proteins im Vergleich zur mRNA sein. Für Innexin 1 und 2 konnten in früheren Studien eine ubiquitäre Verteilung des maternalen Proteins festgestellt werden. Zusätzlich konnte für *innexin 1* eine dynamische Expression während der Entwicklung beobachtet werden. In Stadium 14 ist das Transkript in dem gesamten Bereich des sich entwickelnden Proventrikulus detektierbar; diese Expression

verringert sich bis Stadium 17 zu einem schmalen Streifen im anterioren Bereich der äußeren Schicht des Proventrikulus (Bauer *et al.*, 2001 und eigene Beobachtung).

Die Analyse des Expressionsmusters von Innexin 2 auf zellulärer Ebene ergab in verschiedenen Geweben des Embryos und des larvalen Proventrikulus das für Gap junction Proteine typische punktierte membranständige Muster (Abb. 3.2; 3.5 und 3.6). In geringen Maßen ist Innexin 2 auch an der apikalen Membran und im Zytoplasma lokalisiert, der größte Anteil ist aber an der lateralen Membran verteilt. Dabei kann eine Akkumulation des Proteins gewebeabhängig in spezifischen Membrandomänen beobachtet werden: Innexin 2 ist in der apiko-lateralen Membrandomäne in der Epidermis, in der lateralen Domäne im Hinterdarm und in einer baso-lateralen Position in den Speicheldrüsen lokalisiert. Im larvalen Proventrikulus ist Innexin 2 an der gesamten lateralen Membran lokalisiert, zeigt aber eine Akkumulation unterhalb der apiko-lateral lokalisierten smooth Septate junctions. Diese laterale Lokalisation der Gap junctions in den Zellen der äußeren Schicht des Proventrikulus (OLP) konnte auch in den elektronenmikroskopischen Untersuchungen bestätigt werden (Abb. 3.11) und stimmt mit früheren Studien überein (Tepass und Hartenstein, 1994).

Beim Vergleich der zellulären Lokalisation von Innexin 2 mit anderen Innexinen konnte in dieser Arbeit beobachtet werden, dass sich im larvalen Proventrikulus die zellulären Verteilungsmuster von Innexin 2 und 3 sehr ähneln. Für Innexin 1 dagegen konnte eine leicht veränderte Lokalisation festgestellt werden. Zwar wurde auch eine Verteilung über die gesamte laterale Membran detektiert aber mit einer basalen Akkumulation. Diesen Unterschied in der subzellulären Lokalisation zwischen Innexin 1 und 2 konnte auch in anderen Untersuchungen in unserem Labor für den embryonalen Hinterdarm festgestellt werden (Bauer *et al.*, 2004).

Somit wurden im Rahmen dieser Arbeit frühere Beobachtungen unseres Labors bestätigt, dass verschiedene Innexine nicht nur eine gewebeabhängige Spezifität haben, sondern auch, dass die Akkumulation der einzelnen Innexine in für sie jeweils spezifischen Membrandomänen der Epithelien durch gewebespezifische Faktoren reguliert wird.

### 4.3 Innexin 1, 2 und 3 bilden heteromere Kanäle in den Zellen des Proventrikulus.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Interaktion von Innexin 1, 2 und 3 im Proventrikulus untersucht. Bei immunhistochemischen Färbungen im larvalen Proventrikulus konnte eine deutliche Kolo-kalisation von Innexin 2 und 3 gezeigt werden. Dieselbe Beobachtung galt auch für die Lokalisationsanalysen der Proteine Innexin 1 und 2, obwohl der Überlappungsbereich der beiden Proteine kleiner war. Koimmunpräzipitations-Experimente erbrachten aber weitere Hinweise für eine direkte Interaktion beider Proteine.

Für Interaktionen von Gap junction Proteinen innerhalb der Kanäle gibt es zwei grundsätzliche kombinatorische Möglichkeiten. In heterotypischen Kanälen interagieren zwei Hemikanäle, aufgebaut aus unterschiedlichen Innexinen miteinander, während in heteromeren Kanälen der Hemikanal aus verschiedenen Innexinen aufgebaut ist.

In unserem Labor konnte vor kurzem bestätigt werden, dass Innexin 2 und 3 heteromere Kanäle in embryonalen Geweben bilden: Biochemische Interaktionsstudien, surface plasmon resonance Analysen, genetische und biochemische Fraktionierungsexperimente haben gezeigt, dass beide Innexine über ihre zytoplasmatischen Termini während der Bildung zu heteromeren Kanälen interagieren (Lehmann *et al.*, 2006).

Für Innexin 2 und 3, die während der Embryogenese ein überlappendes Expressionsmuster haben, wurde gezeigt, dass die Bildung heteromerer Kanäle aus beiden Proteinen entscheidend für die epitheliale Organisation ist (Lehmann *et al.*, 2006).

Ein Vergleich der Expressionsmuster lässt den Schluss zu, dass nicht nur die Interaktion von Innexin 2 und 3 von entscheidender Bedeutung ist, sondern auch die mit Innexin 1:

Die Expressionsmuster von Innexin 1, 2 und 3 ähneln sich während der embryonalen Entwicklung sehr. Alle drei Innexine werden in einem segmentalen Muster in der Epidermis exprimiert und zeigen auch in anderen Organen deutliche Überlappungsbereiche (Stebbing *et al.*, 2002; eigene Beobachtung).

Neben den gezeigten biochemischen Interaktionsdaten von Innexin 1 und 2 in dieser Arbeit, konnte auch im heterologen *Xenopus* Expressionssystem Hinweise für eine Interaktion von Innexin 1 und 2 gefunden werden. In diesem System wurde gezeigt, dass nur Innexin 2 homomere Kanäle bilden kann, aber nicht Innexin 1 und 3. Hingegen sind beide Proteine,

Innexin 1 und 3 in der Lage, mit Innexin 2 heteromere Kanäle auszubilden (Stebbing *et al.*, 2000; Phelan, 2004).

Diese Daten bestärken die Vermutung, dass im anterioren Bereich des larvalen Proventrikulus Innexin 2 mit Innexin 1 und 3 heteromere Kanäle bildet und im posterioren Bereich die Gap junction Kanäle aus Innexin 2 und 3 gebildet werden.

#### 4.4 Transkriptionelle Kreuz-Regulation von *innexinen* im larvalen Proventrikulus

Um einen Einblick in die Rolle der Gap junction Proteine im Proventrikulus zu gewinnen, wurde in dieser Arbeit untersucht, welchen Effekt der Verlust eines Innexins auf die interzelluläre Kommunikation hat und wie dieser Verlust sich auf Innexine auswirkt, die ebenfalls im Proventrikulus exprimiert sind.

Durch die Injektion eines Farbstoffs in den larvalen Proventrikulus konnte in dieser Arbeit der Nachweis erbracht werden, dass die Kommunikation über die Gap junction Kanäle in *innexin 2* Mutanten stark beeinträchtigt ist. Durch immunhistochemische Färbungen konnte gezeigt werden, dass zwei weitere, auch im Proventrikulus exprimierte Innexine, ebenfalls stark reduziert waren. Im Gegensatz zu vorhergegangenen Publikationen konnte in dieser Arbeit erstmals nicht nur eine Reduktion auf Proteinebene nachgewiesen werden, sondern auch eine eindeutige Reduktion auf mRNA Level. Diese transkriptionelle Kreuzregulation von *innexin 1* und *2* wurde durch *in situ* Hybridisierungen nachgewiesen und durch quantitative RT-PCR bestätigt (Abb. 3.10).

Eine koordinierte Regulation von heteromeren Gap junction Kanälen konnte in verschiedenen Studien sowohl bei Vertebraten wie auch in *D. melanogaster* beobachtet werden:

In der Maus wurde diese Regulation unter anderem in den vaskulären Endothelzellen nachgewiesen. Die Gap junctions dieser Zellen bestehen aus den Connexinen 37 (Cx37), 40 (Cx40) und 43 (Cx43) (Simon *et al.*, 2003, Isakson *et al.*, 2005). Nach Simon *et al.* (2003) hat die Deletion entweder von Cx37 oder Cx40 eine deutliche Reduktion des Gap junction vermittelten Farbtransfers zur Folge, wohingegen eine Doppelverlustmutante zu einem

kompletten Verlust der interendothelialen Kopplung führt. Ein wichtiges Ergebnis dieser Studie war, dass die Deletion eines Connexins auch Einfluss auf die nicht betroffenen Connexine hat. So zeigten die Autoren, dass das Proteinlevel von Cx37 in der Cx40 Deletionsmutante 17-fach reduziert und Cx40 dagegen um das 4,2-fache in Cx37 Deletionsmutanten gegenüber dem Wildtyp reduziert war. Diese Reduktion auf Proteinebene ging aber nicht auf eine Verringerung des jeweiligen Connexin mRNA Levels zurück. Somit wurde von den Autoren ein post-transkriptionaler Effekt postuliert (Simon *et al.*, 2003).

Kürzlich konnte in *D. melanogaster* ebenfalls dargelegt werden, dass auch die heteromeren Innexine 2 und 3 wechselseitig voneinander abhängig sind. In der embryonalen Epidermis führte der Verlust von Innexin 2 zu einer Misslokalisierung von Innexin 3. Dagegen wurde bei einer Überexpression von Innexin 2 Innexin 3 in die ektopische Expressionsdomäne rekrutiert. In umgekehrter Richtung konnte auch bei der Verringerung von *innexin 3* durch RNAi eine Misslokalisierung von Innexin 2 detektiert werden (Lehmann *et al.*, 2006).

Dieser in dieser Arbeit erbrachte Beweis für eine transkriptionellen Kreuzregulation verschiedener Gap junction Proteine stellt aber einen für diese Proteingruppe noch nicht beschriebenen Mechanismus dar. Von Mitarbeitern unseres Labors wurden aber kürzlich weitere Evidenzen gefunden, dass Innexin 2 eine essentielle Rolle in der transkriptionellen Regulation spielt. H. Lechner und F. Josten konnten zeigen, dass im Proventrikulus Faktoren wichtiger Signalkaskaden, wie *hedgehog*, *wingless* und *delta*, durch Innexin 2 transkriptionell reguliert werden (Lechner *et al.*, submitted).

Die molekularen Mechanismen dieser transkriptionellen Regulation sind nicht bekannt. Eine Möglichkeit wäre, dass das Gap junction Protein Innexin 2 selbst als Transkriptionsfaktor wirken könnte, dabei könnte der intrazelluläre Teil des Transmembranproteins abgespalten und in den Kern transportiert werden, wo er potentielle Zielgene aktiviert. Hinweise für diese Hypothese wurden unter anderem bei einem Experiment gefunden, bei dem Zellen mit der C-Terminus Domäne von Cx43 transfiziert worden sind. Nach der Transfektion konnte CT-Cx43 im Zellkern der Zellen detektiert werden und es wurde ein Effekt auf die Genexpression und das Zellwachstum beobachtet (Dang, 2003). Es konnte aber weder bei Connexinen noch bei Innexinen eine endogene Spaltung des zytoplasmatischen Schwanzes bewiesen werden.

Eine weitere Möglichkeit der Regulation könnte sein, dass durch eine veränderte Gap junction Struktur indirekt andere Faktoren beeinflusst werden. Bei Untersuchungen von Cx43 gab es Hinweise, dass dieses Gap junction Protein eine duale Funktion besitzt: Neben der etablierten Funktion als kanalbildendes Protein konnte Cx43, ohne Bildung der Gap junction Struktur, das Zellwachstum hemmen und diese Funktion wurde über den C-Terminus von Cx43 vermittelt (Moorby und Patel, 2001). Die Autoren diskutierten in dieser Publikation, ob dieser Effekt eventuell über die Bindung mit c-Scr oder zonula occludens-1 ZO-1, ein PDZ-Domänen enthaltendes Protein, vermittelt wird.

Die generelle Möglichkeit der Einflussnahme von Gap junction Proteinen auf Transkriptionsfaktoren und deren Aktivität konnte durch Interaktionsanalysen in Oligodendrozyten und Astrozyten gezeigt werden. In diesen Zellen wurde eine Kollokalisierung von Cx43 mit dem Komplex aus ZO-1 und dem Transkriptionsfaktor ZO-1 nuclei acid-binding proteins (ZONAB), welcher die Genexpression regulieren kann, beschrieben (Penes *et al.*, 2005). Es ist möglich, dass eine Innexin 2 abhängige transkriptionelle Regulation ähnlich funktionieren könnte, indem es durch Veränderungen im Gap junction Komplex zur Bindung oder Freisetzung von Transkriptionsfaktoren kommt.

### 4.5 Gap junctions interagieren mit anderen Zellverbindungen:

#### 4.5.1 Innexin 2 ist für die Ausbildung der Zonula adhaerens in ektodermalen Geweben notwendig.

Bei der elektronenmikroskopischen Analyse der embryonalen *kropf* Mutante wurden in verschiedenen ektodermalen Geweben im apikalen Kontaktbereich benachbarter Zellen strukturelle Veränderungen entdeckt: In den Aufnahmen transversaler Schnitte durch die Speicheldüse und die Tracheen war in wildtypischen Zellen im apikalen Bereich der Zellen deutlich die Struktur der Zonula adhaerens zu erkennen. Diese Region des Zellkontakts ist im Wildtyp durch einen konstanten interzellulären Spalt und die aufgelagerten elektronendichten Actinfilamente gekennzeichnet. In den *innexin 2* mutanten Embryos war die zytoplasmatische Auflagerung deutlich reduziert oder nicht vorhanden und die typische Struktur der Zonula adhaerens nicht ausgebildet (Abb. 3.4).

Hinweise, dass diese Veränderungen in der *kropf* Mutante auf eine Interaktion verschiedener Zellverbindungsproteine mit Innexin 2 zurückzuführen sein könnte, ergaben sich in dieser

Arbeit aus den Expressionsstudien: Bei immunhistochemischen Färbungen im Embryo konnte in der Epidermis die Kolokalisation mit dem Adherens junction Protein *DE-cadherin* detektiert werden (Abb. 3.2).

Für eine Interaktion von Innexin 2 mit *DE-cadherin* wurde in früheren Studien biochemische Evidenzen gefunden: So wurde in einem Hefe-zwei-Hybrid System *DE-cadherin* als möglicher Interaktionspartner für Innexin 2 identifiziert und biochemisch durch Immunpräzipitationen bestätigt (Bauer *et al.*, 2004). Hinweise auf eine funktionelle Abhängigkeit der beiden Zellverbindungskomplexe konnten bei immunhistochemischen Analysen von Funktionsverlust- und Funktionsgewinn-Experimenten gefunden werden: In embryonalen *kropf* Mutanten ist die Lokalisation von Armadillo und *DE-cadherin* verändert und in zygotischen *armadillo* und *DE-cadherin* Mutanten die Lokalisation von Innexin 2. In Funktionsgewinn-Experimenten konnte gezeigt werden, dass durch eine Überexpression von Innexin 2 Armadillo in das ektopische Expressionsmuster rekrutiert wird (Bauer *et al.*, 2004; Lehmann *et al.*, 2006).

Hinweise für einen funktionellen Zusammenhang zwischen Gap und Adherens junctions wurden auch in Vertebraten gefunden. Dabei wurde eine Interaktion zwischen Connexinen und dem Armadillo Homolog  $\beta$ -catenin mehrfach bestätigt. (Fujimoto *et al.*, 1997; Ai *et al.*, 2000). Eine direkte Korrelation der Funktion der Zelladhäsion, die durch E-cadherin vermittelt wurde, mit der Zell-Zell-Kommunikation via Gap junctions ist in Epidermiszellen der Maus demonstriert worden (Jongen *et al.*, 1991). Mit Hilfe sowohl von anti-Connexin als auch von anti-Cadherin Antikörper postulierten Meyer *et al.* (1992) ein bidirektionales Signalling zwischen Adhäsionsproteinen und Connexinen in Novikoff Hepatomazellen.

Beobachtungen aus dieser Arbeit und früheren Studien in *D. melanogaster* und Vertebraten zeigten, dass es einen funktionellen Zusammenhang zwischen Innexin 2 und *DE-cadherin* gibt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Hinweise gefunden, dass diese Interaktion und Abhängigkeit eventuell auch gewebespezifisch sein könnte. In der äußeren Schicht des Proventrikulus, die einen endodermalen Charakter hat, erschien zwar die gesamte Struktur der Zellen in der *kropf* Mutante verändert, aber die Lokalisation von *DE-cadherin* war nicht betroffen. Auch in Funktionsgewinn-Experimenten konnte durch eine Überexpression von

*innexin 2* in den äußeren Zellen des Proventrikulus keine Veränderung in der Lokalisation von DE-cadherin in den spot Adherens junctions festgestellt werden (Abb. 3.13 und 3.22).

### 4.5.2 Zellkontaktdefekte im Bereich der Septate junctions

In elektronenmikroskopischen Aufnahmen konnte, neben der oben beschriebenen Missbildung der Zonula adhaerens, im Bereich der Septate junctions eine weitere Veränderung des Zellkontaktes zwischen benachbarten Zellen nachgewiesen werden. Zwischen den endodermalen anterioren Mitteldarmzellen lagen die benachbarten Zellen nicht dicht aneinander, sondern wiesen Erweiterungen des interzellulären Spalts in blasenartigen Strukturen auf (Abb. 3.4). Diese Strukturen konnten, wenn auch im geringeren Ausmaße, in manchen ektodermalen Zellen gefunden werden.

Ob dieser Defekt tatsächlich auf eine Veränderung im Bereich der Septate junctions zurückzuführen ist, müssen künftige Untersuchungen noch klären. In unserer Abteilung konnte aber gezeigt werden, dass auch der Septate junction Marker Coracle und *Innexin 2* funktionell interagieren. In embryonalen *kropf* Mutanten ist ebenfalls die Lokalisation von Coracle verändert und in Überexpressionsexperimenten konnte neben DE-cadherin auch Coracle in das ektopische Expressionsmuster von *Innexin 2* rekrutiert werden (Bauer *et al.*, 2004).

Kürzlich wurden in einer menschlichen Lungenepithel-Zelllinie ebenfalls Hinweise für eine Abhängigkeit zwischen Gap junctions und den Tight junctions gefunden (Go *et al.*, 2006). Dies ist von besonderem Interesse, da Tight junctions viele Ähnlichkeiten zu den Septate junctions in *D. melanogaster* aufweisen (Behr *et al.*, 2003). In der Publikation von Go *et al.* (2006) wurde die Rolle der Gap junctions in der Regulation der Barrierefunktion der Tight junctions untersucht. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass die Cx26 Expression, aber nicht die dadurch vermittelte interzelluläre Kommunikation, die Barrierefunktion der Tight junctions regulieren könnte.

## 4.6 Gap junctions sind an der Etablierung der Zellpolarität beteiligt.

Die Ergebnisse der Untersuchung des embryonalen *kropf* Phänotyp in dieser und in früheren Arbeiten haben erste Hinweise erbracht, dass das Gap junction Protein Innexin 2 eine wichtige Funktion in der Etablierung der Zellpolarität hat (Bauer *et al.*, 2004; Lehmann *et al.*, 2006). Die in den Untersuchungen des larvalen Proventrikulus gewonnenen Ergebnisse bestätigten diese Vermutung und konnten erstmals einen Einfluss von Innexin 2 auf den subapikalen Komplex zeigen.

### 4.6.1 Die Morphologie des apikalen Bereiches ist in *kropf* Proventrikuli missgebildet.

Die Zellen der äußeren Schicht des wildtypischen Proventrikulus besitzen eine ausgeprägte Polarität: Die apikale Oberfläche der Zellen ist durch einen gleichmäßigen Mikrovillisaum gekennzeichnet. An der apiko-lateralen Membran sind benachbarte Zellen durch sehr prominente smooth Septate junctions miteinander verbunden. Unterhalb dieser engen Kontaktzone befindet sich ein schmaler interzellularen Spalt, welcher durch spot Adherens junctions und Gap junctions überbrückt wird (Abb. 3.11; Tepass und Hartenstein, 1994). Konsistent mit dieser Beobachtung konnte durch immunhistochemischen Färbungen gezeigt werden, dass das Adherens junction Protein *DE-cadherin* und die Gap junction Proteine Innexin 1, 2 und 3 in dieser lateralen Region lokalisiert sind (Abb. 3.6 und Abb. 3.13 Q-T).

In den ultrastrukturellen und immunhistochemischen Untersuchungen des *kropf* Proventrikulus wurde eine starke strukturelle Veränderung im posterioren Bereich des Proventrikulus detektiert. Dabei war besonders die Oberfläche der Zellen betroffen. So fielen bei den ultrastrukturellen Untersuchungen die stark deformierten Mikrovilli auf (Abb. 3.11 F). Neben dieser deutlichen strukturellen Missbildung waren die posterioren Zellen in der *kropf* Mutante deutlich größer als die wildtypischen Zellen (Abb. 3.11; 3.14). Dabei waren die Zellen teilweise doppelt so hoch, die Breite war aber nicht betroffen.

Auffällig war, dass diese starken Missbildungen stets nur im posterioren Abschnitt des Proventrikulus zu finden waren. Es ist unklar, wie es zu diesem unterschiedlichen Phänotyp innerhalb eines Organs kommt, da Innexin 2 sowohl auf mRNA- als auch Protein-Ebene ubiquitär im Proventrikulus exprimiert ist (Abb. 3.7). Eine Möglichkeit wäre, dass im

anterioren Bereich der Phänotyp durch das nur dort lokalisierte Innexin 1 gemildert wird. Obwohl in *kropf* Mutanten *innexin 1* herunterreguliert ist, könnte eine verbliebene Expression partiell redundant zu Innexin 2 sein. Hinweise auf eine redundante Funktion von verschiedenen Gap junction Proteinen wurde bereits in der Epidermis der Maus zwischen Cx 26 und 30 gefunden (Kretz *et al.*, 2003).

### 4.6.2 In *kropf* Proventrikuli ist spezifisch der Bazooka Komplex misslokalisiert.

Die ultrastrukturellen Untersuchungen der *kropf* Mutante ergaben insbesondere eine Veränderungen im apikalen Bereich (s. Kapitel 4.6.1). Aufgrund dieser Beobachtungen wurde untersucht, inwieweit einzelne Komponenten des subapikalen Komplexes betroffen sind. Durch immunhistochemische Färbungen wurden Komponenten des Crumbs-, Bazooka- und Discs large-Komplex untersucht:

Patj, ein Mitglied des Crumbs/Stardust-Komplex, war nicht in seiner Lokalisation verändert (Abb. 3.14). Discs large, eine Komponente des Discs large-Komplex, zeigte in manchen Zellen eine Veränderung in seiner relativen Position innerhalb der lateralen Membran. Besonders in den posterioren Zellen des Proventrikulus war Discs large basolateral lokalisiert (Abb. 3.11 F; 3.15 G-I). Bei der Analyse des Bazooka-Komplexes konnte sowohl für Bazooka als auch für DaPKC eine deutliche Misslokalisierung beobachtet werden. In den Zellen der äußeren Schicht des Proventrikulus haben sowohl Bazooka als auch DaPKC ihre wildtypische apikale Lokalisation verloren und waren zytoplasmatisch oder basolateral lokalisiert (Abb. 3.15).

Diese beiden Komplexe, der Discs large- und Bazooka-Komplex, welche in der *kropf* Mutante betroffen sind, sind für die Etablierung und Erhaltung der apiko-lateralen Zellpolarität von elementarer Bedeutung (Johnson und Wodarz, 2003). Funktionelle Untersuchungen konnten zeigen, dass beide Komplexe als Antagonisten wirken. Dabei bewirkt der Discs large-Komplex, dass der Bazooka-Komplex auf die apikale Region beschränkt ist und der Bazooka-Komplex seinerseits schließt zusammen mit dem Crumbs Komplex den Discs large Komplex von der apikalen Region aus. Dieses führt zu der asymmetrischen Verteilung der beiden Komplexe in der Zellmembran (Humbert, 2006).

*Discs large* selbst wurde ursprünglich als ein Tumor Supressor Gen identifiziert und ist ein Mitglied der MAGUK (membrane-associated guanylat kinase) Familie. Wie schon beschrieben, ist es an der zytoplasmatischen Seite der Septate junctions lokalisiert und es ist für die Zellverbindungsstrukturen, Zell Polarität und die Proliferations-Kontrolle notwendig (Woods und Bryant, 1989; Woods *et al.*, 1996). Darüber hinaus ist die Lokalisation von *Discs large* von den anderen Mitgliedern des Komplexes (*Scribble* und *Lethal giant larvae*) abhängig (Suzuki und Ohno, 2006).

*bazooka*, welches zu den *partition-defective (par)* Genen gehört, wurde in *C. elegans* als essentielles Gen für die asymmetrische Zellteilung der Zygote entdeckt (Etemad-Moghadam *et al.*, 1995; Guo und Kemphues, 1995). *Bazooka*, homolog zu *Par-3* aus *C. elegans* und Vertebraten, ist ein drei PDZ-Domänen enthaltendes Gerüstprotein. *Bazooka* interagiert mit *DaPKC* und *Par-6* und bildet mit ihnen eine funktionelle Einheit (Suzuki und Ohno, 2006).

Die Untersuchung der *bazooka* und *discs large* Mutanten zeigten für beide Gene sehr ähnliche Phänotypen. So wurde beobachtet, dass in beiden Mutanten sich keine Zonula adhaerens ausbildet. Weiterhin weisen beide Mutanten eine veränderte Zellform auf, und es bildet sich teilweise eine vielschichtige Epidermis aus. Zusätzlich wurde aber nur bei den *discs large* Mutanten eine Erweiterung der apikalen Region beschrieben. Hierbei expandieren die Proteine der subapikalen Region, z. B. *Crumbs*, in die laterale Membranregion (Müller und Wieschaus, 1996; Bilder *et al.*, 2000; Bilder *et al.*, 2003; Tanentzapf und Tepass, 2003).

Diese von *discs large* und *bazooka* Mutanten beschriebenen Defekte ähneln sehr dem Phänotyp der *innexin 2* Mutante *kropf*. Von besonderer Bedeutung ist neben der veränderten Zellform und der Bildung von vielschichtigen Epithelien (Abb 3.11 B), dass auch in ektodermalen Zellen der *kropf* Mutante sich keine Zonula adhaerens ausbildet (Abb. 3.4). Es ist aber zu beachten, dass es durch die Missexpression von *Bazooka* und *DaPKC* zu keiner Expansion von *Discs large* in den apikalen Bereich kommt. Dies könnte aber vielleicht dadurch erklärt werden, dass *Patj*, ein Mitglied des *Crumbs*-Komplex keine veränderte Lokalisation aufweist und somit in *kropf* Mutanten die apikale Identität weiterhin besteht.

#### 4.7 Die Lokalisation von Bazooka ist direkt von Innexin 2 abhängig.

Bazooka ist eine wichtige Landmarke in der Polarität der Zelle und ist für die Etablierung und Erhaltung der apiko-lateralen Zellpolarität von elementarer Bedeutung (Johnson und Wodarz, 2003, Harris und Peifer, 2005). In dieser Arbeit wurde erstmals in der Gap junction Mutante *kropf* eine spezifische Misslokalisierung des Bazooka-Komplexes nachgewiesen. Eine wichtige Frage, die sich aus diesem Ergebnis ergibt, ist, wie ein Gap junction Protein die Lokalisierung des Bazooka (Par-3)-DaPKC Komplexes beeinflussen kann.

Während der Zellularisierung im *D. melanogaster* Embryo ist die Positionierung von Bazooka abhängig vom Zytoskelett und von einem durch das Mikrotubuli Minus-Ende Motorprotein Dynein vermittelten Transport (Harris und Peifer, 2005).

Es wurde vermutet, dass eventuell diese Dynein abhängige Lokalisierung von Bazooka in der *kropf* Mutante durch ein missgebildetes Zytoskelett beeinträchtigt sein könnte. Hinweise, dass in der *kropf* Mutante das Zytoskelett missgebildet ist, ergaben sich durch den Befund der missgebildeten Mikrovilli (Abb. 3.11), was auf Veränderungen in der Struktur von F-actin hinweist (Lee, 1993). Durch immunhistochemische Färbungen konnte bestätigt werden, dass im larvalen *kropf* Proventrikulus die Organisation des Zytoskeletts deutlich desorganisiert ist (Abb. 3.16; 3.17; 3.18 und 3.19). Weiterhin konnte eine Veränderung der Polarität der Mikrotubuli nachgewiesen werden: Das im Wildtyp apikal lokalisierte Mikrotubuli Minus-Ende Motorprotein Dynein zeigte in *kropf* Mutanten eine zytoplasmatische Lokalisation (Abb. 3.17 und 3.18).

Gestützt wurde diese Hypothese einer Interaktion des Zytoskeletts mit den Gap junctions durch eine Publikation, die eine direkte Interaktion zwischen dem Gap junction Protein Cx43 und Mikrotubuli postuliert (Giepmans *et al.*, 2001). Dass diese Interaktion auch für Innexin 2 gelten könnte, wurde durch Koimmunpräzipitations-Analysen von Innexin 2 und  $\beta$ -Tubulin gezeigt (mündliche Information von H. Lechner).

Gegen die Hypothese der Fehllokalisierung von Bazooka durch ein desorganisiertes Zytoskelett sprach, dass der zytoskelettale Phänotyp auch ein sekundärer Effekt der Bazooka-Misslokalisierung sein könnte. So wurde gezeigt, dass die Lokalisierung von Dynein und die Bindung der Mikrotubuli an den zellulären Kortex durch den Par-3 (Bazooka)/ aPKC/ Par-6

Komplex reguliert wird (Etienne-Manneville und Hall, 2001; Palazzo *et al.*, 2001; Gomes *et al.*, 2005; Etienne-Manneville und Hall, 2003; Munro, 2006). Weiterhin konnte in Funktionsgewinn Experimenten eine Misslokalisierung von Bazooka nachgewiesen werden, ohne dass Dynein oder andere Komponenten des Zytoskeletts verändert waren (Abb. 3.23; siehe unten).

Eine andere Möglichkeit wäre, dass eine direkte oder indirekte Interaktion mit Innexin 2 die Lokalisation von Bazooka beeinflusst. Gestützt wurde diese Hypothese zunächst durch immunhistochemische Färbungen, die eine partielle Kolo-kalisation der beiden Proteine in der apikalen Region zeigten (Abb. 3.20). Diese mögliche Interaktion wurde biochemisch durch Immunpräzipitations-Analysen bestätigt (Abb. 3.21).

Es konnte durch Funktionsgewinn-Experimente gezeigt werden, dass zwischen Innexin 2 und Bazooka eine funktionelle Abhängigkeit besteht, welche von essentieller Bedeutung ist: So wurde nachgewiesen, dass die zelluläre Lokalisation von Bazooka von dem Innexin 2 C-Terminus abhängt. Überexpression eines entsprechenden Deletionskonstruktes von Innexin 2 führte spezifisch zu einer Misslokalisierung von Bazooka, während die Lokalisation von *DaPKC* nicht betroffen war (Abb. 3.23). Dasselbe Resultat wurde durch die Überexpression eines C-terminal mit GFP markierten Konstruktes erreicht. Schon frühere Studien lieferten den Beweis, dass das C-terminale GFP von Innexin 2 den C-Terminus maskiert und Interaktionen mit anderen Proteinen blockiert (Lehmann *et al.*, 2006).

Bei dem Vergleich der Ergebnisse der Funktionsgewinn- und Funktionsverlust Experimente, fallen die für *DaPKC* ambivalenten Resultate auf. So konnte in *kropf* Mutanten eine Misslokalisierung von *DaPKC* festgestellt werden, dagegen wurde durch die Überexpression eines Deletionskonstruktes von Innexin 2 keine Veränderung erzielt. Bazooka war dagegen in beiden Experimenten misslokalisiert.

Diese spezifische Misslokalisierung von Bazooka unterstützt die in der Literatur beschriebene Funktion als Schlüsselprotein, das für die Lokalisierung sowohl von Adherens junctions wie auch *DaPKC* notwendig ist (Harris und Peifer, 2004). So kann häufig beobachtet werden, dass zuerst Bazooka in einer spezifischen Membranregion positioniert ist und *DaPKC* und *DPar6* in diese Region rekrutiert wird (Suzuki und Ohno, 2006). Ein Verlust des Genproduktes von *bazooka* führt sowohl zu einer Fehlverteilung von *DPar-6* als auch *DaPKC*, dagegen ist in

*apkc* Mutanten Bazooka nicht misslokalisiert (Petronczki und Knoblich, 2001; Harris und Peifer, 2005).

Dass es in den Funktionsgewinn Experimenten zu keiner Fehllokalisierung von *DaPKC* kam, widerspricht den oben genannten Daten nicht: Zum einen wurden die Experimente in einem wildtypischen Hintergrund durchgeführt, was stets auch noch eine verbleibende wildtypische Verteilung von Bazooka vermuten lässt, welches die *DaPKC* Lokalisation weiterhin stabilisiert. Ein anderer Grund könnte im Ablauf des Versuches zu finden sein: Die Experimente wurden 12 h nach Induktion der Genexpression der *Innexin 2*-Konstrukte abgestoppt. Eventuell ist dieser Zeitraum zu kurz, um die postulierten sekundären Effekte einer Bazooka Missexpression zu generieren.

Zusammenfassend zeigen diese Experimente zum ersten Mal einen möglichen Mechanismus, wie Gap junction Proteine über eine Positionierung und Stabilisierung von Bazooka die Etablierung der zellulären Polarität beeinflussen könnten.

### 5 Zusammenfassung

Die direkte Kommunikation benachbarter Zellen durch Gap junctions ist notwendig für die Entwicklung von Geweben und Organen in Organismen. In Invertebraten setzen sich Gap junctions aus Proteinen der Innexinfamilie zusammen und bilden interzelluläre Kanäle, durch die die Zellen direkt metabolisch und elektrisch miteinander gekoppelt sind. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Bedeutung von Innexin 2 für die Etablierung der apikal-basal Polarität von Zellen in *D. melanogaster* detailliert untersucht.

Die Untersuchungen konzentrierten sich dabei auf den Proventrikulus, da *innexin 2* stark im Proventrikulus exprimiert ist und für die Ausbildung eines funktionellen Proventrikulus eine essentielle Bedeutung hat. In diesem Organ sind ebenfalls *innexin 1* und *3* exprimiert. Koimmunpräzipitations-Experimente zeigten, dass Innexin 1 und 2 miteinander interagieren, wie auch schon für Innexin 2 und 3 nachgewiesen wurde. Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass Innexine 1, 2 und 3 für eine effiziente Zell-Zell Kommunikation möglicherweise heteromere Kanäle ausbilden. Durch Farbkopplungsexperimente wurde nachgewiesen, dass in den *kropf* Mutanten die Zell-Zell Kommunikation stark beeinträchtigt ist. Übereinstimmend damit wurde durch *in-situ*-Hybridisierungs-Experimente und quantitative RT-PCR festgestellt, dass *innexin 1* und *3* in der *kropf* Mutante auf transkriptioneller Ebene herunterreguliert sind.

Die phänotypische Analyse des Proventrikulus in der *kropf* Mutante zeigte schwere Polaritätsdefekte. Durch ultrastrukturelle Untersuchungen des Proventrikulus mit Hilfe der Elektronenmikroskopie wurde festgestellt, dass besonders der apikale Bereich der Zellen betroffen ist. Weiterführende immunhistochemische Analysen des subapikalen Komplexes, welcher aus dem Crumbs- und dem Bazooka-Komplex besteht, identifizierten Bazooka und DaPKC als Komponenten des Bazooka-Komplexes, die in den *kropf* Mutanten fehllokalisiert sind. Zur Analyse der Ursache für die Fehllokalisierung wurde der direkte Einfluss von Innexin 2 durch verschiedene Funktionsgewinn-Experimente untersucht. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass die zelluläre Lokalisation von Bazooka vom C-Terminus von Innexin 2 abhängt. Darüber hinaus zeigten biochemische Interaktionsstudien, dass Bazooka direkt oder indirekt mit Innexin 2 interagiert.

Zusammenfassend hat diese Misslokalisierung von Bazooka in *kropf* Mutanten eine besondere Bedeutung, da es in der Etablierung der apikalen Identität eine Schlüsselrolle innehat. So zeigen diese Experimente zum ersten Mal einen möglichen Mechanismus, wie Gap junction Proteine über eine Positionierung und Stabilisierung von Bazooka die Etablierung der zellulären Polarität beeinflussen könnten.

## 6 Literaturverzeichnis

**Adams, M.D., Celinker, S.E., Holt, R.A., Evans, C.A., Gocayne, J.D., Amantides, P.G., et al.** (2000) The Genome Sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287(5461), 2185-95

**Ahmad, S., Diez, J.A., George, C.H., Evans, W.H.** (1999) Synthesis and assembly of connexins in vitro into homomeric and heteromeric functional gap junction hemichannels. *Biochem J* 339(2), 247-253

**Ai, Z., Fischer, A., Spray, D.C., Brown, A.M.C., Fishman, G.I.** (2000) Wnt-1 regulation of connexin43 in cardiac myocytes. *J Clin Invest* 105, 161-171

**Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.** (2004) Molekularbiologie der Zelle. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim

**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, 638-643

**Barnes, T.M.** (1994) Opus \320 a growing family of gap junction proteins. *Trends Genet* 10, 303-305

**Bauer, R., Lehmann, C., Hoch, M.** (2001) Gastrointestinal development in the *Drosophila* embryo requires the activity of the innexin gap junction channel proteins. *Cell Commun Adhes* 8, 307-310

**Bauer, R., Martini, J., Lehmann, C., Hoch, M.** (2003) Cellular distribution of innexin 1 and 2 gap junctional channel proteins in epithelia of the *Drosophila* embryo. *Cell Commun Adhes* 10(4-6), 221-5

**Bauer, R., Lehmann, C., Martini, J., Eckardt, F., Hoch, M.** (2004) Gap junction channel protein innexin 2 is essential for epithelial morphogenesis in the *Drosophila* embryo. *Mol Biol Cell* 15(6), 2992-30

**Bauer, R., Loer, B., Ostrowski, K., Martini, J., Weimbs, A., Lechner, H., Hoch, M.** (2005) Intercellular communication: the *Drosophila* innexin multiprotein family of gap junction proteins. *Chem Biol* 12(5),515-26

**Behr, M., Riedel, D., Schuh, R..** (2003) The claudin-like megatrachea is essential in septate junctions for the epithelial barrier function in *Drosophila*. *Dev Cell* 5, 611-620

**Bilder, D., Li, M., Perrimon, N.** (2000) Cooperative regulation of cell polarity and growth by *Drosophila* tumor suppressors. *Science* 289, 113-116

**Bilder, D., Perrimon, N.** (2000) Localization of apical epithelial determinants by the basolateral PDZ protein Scribble. *Nature* 403(6770), 676-680

- Bilder, D., Schober, M., Perrimon, N.** (2003) Integrated activity of PDZ protein complexes regulates epithelial polarity. *Nature Cell Biol* 5(1), 53-58
- Blagburn, J.M., Alexopoulos, H., Davies, J.A., Bacon, J.P.** (1999) Null mutation in shaking-B eliminates electrical, but not chemical, synapses in the *Drosophila* giant fiber system: a structural study. *J Comp Neurol* 404(4), 449-58
- Brand, A. H., Perrimon, N.** (1993) Targeted gene expression as a means of altering cellfates and generating dominant phenotypes. *Development* 118, 401-15
- Bryant, P.J.** (1997) Junction genetics. *Dev Genet* 20, 75-90
- C. elegans Sequencing Consortium** (1998) Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science* 282(5396), 2012-8
- Campos Ortega, J.A., Hartenstein, V.** (1997) The embryonic development of *Drosophila melanogaster*. Springer Verlag, Berlin
- Crompton, D., Todman, M., Wilkin, M., Ji, S., Davies, J.** (1995) Essential and neural transcripts from the *Drosophila* shaking-B locus are differentially expressed in the embryonic mesoderm and pupal nervous system. *Dev Biol* 170, 142-158
- Dahl, G., Werner, R., Levine, E., Rabadan-Diehl, C.** (1992) Mutational analysis of gap junction formation. *Biophys J* 62(1), 172-182
- Dang X., Doble, B.W., Kardami, E.** (2003) The caboxy-tail of connexin-42 localizes to the nucleus and inhibits cell growth. *Mol Cell Biochem* 242(1-2), 35-38
- Delmar, M., Stergiopoulos, K., Homma, N., Calero, G., Morley, G., Ek-Vitorin, J.F., Taffet, S.M.** (2000) A molecular model for the chemical regulation of connexin43 channels: the "ball- and-chain" hypothesis. *Current Topics in Membranes* 49, 223-248
- Eaton, S., Simons, K.** (1995) Apical, basal, and lateral cues for epithelial polarization. *Cell* 82, 5-8
- Etemad-Moghadam, B., Guo, S., Kempfues, K.J.** (1995) Asymmetrically distributed PAR-3 protein contributes to cell polarity and spindle alignment in early *C. elegans* embryos. *Cell* 83, 743-752
- Etienne-Manneville, S., Hall, A.** (2001) Integrin-mediated activation of Cdc42 controls cell polarity in migrating astrocytes through PKCzeta. *Cell* 106, 489-498
- Etienne-Manneville, S., Hall, A.** (2003) Cell polarity. Par6, aPKC and cytoskeletal crosstalk *Curr Biol* 15, 67-72
- Falk, M.M.** (2000) Biosynthesis and structural composition of gap junction intercellular membrane channels. *Eur J Cell Biol* 79, 564-574

**Falk, M.M., Buehler, L.K., Kumar, N.M., Gilula, N.B.** (1997) Cell-free synthesis and assembly of connexins into functional gap junction membrane channels. *EMBO J* 16, 2703-2716

**Falk, M.M., Gilula, N.B.** (1998) Connexin membrane protein biosynthesis is influenced by polypeptide positioning within the translocon and Signal peptidase access. *J Biol Chem* 273, 7856-7864

**Falk, M.M., Kumar N.M., Gilula N.B.** (1994) Membrane insertion of gap junction connexins: polytopic channel forming membrane proteins. *J Cell Biol* 127, 343-355

**Fehon, R.G., Dawson, I.A., Artavanis-Tsakonas, S.** (1994) A *Drosophila* homologue of membrane skeleton protein 4.1 is associated with septate junctions and is encoded by the coracle gene. *Development* 120, 545-547

**Flegler, S.** (1995) *Elektronenmikroskopie*, 1. Auflage, Spektrum, Heidelberg

**Fujimot, K., Nagafuchi, A., Tsukita, S., Kuraoka, A., Ohokuma A., Shibata, Y.** (1997) Dynamics of connexins, E-cadherin and a-catenin on cell membranes during gap junction formation *J Cell Science* 110, 311-322

**Furuse, M., Tsukita, S.** (2006) Claudins in occluding junctions of humans and flies. *Trends Cell Biol* 16(4), 181-189

**Fuss, B., Hoch, M.** (1998) *Drosophila* endoderm development requires a novel homeobox gene which is a target of Wingless and Dpp signalling. *Mech Dev* 79, 83-97

**Fuss, B., Josten, F., Feix, M., Hoch, M.** (2004) Cell movements controlled by the Notch signalling cascade during foregut development in *Drosophila*. *Development*. 131(7), 1587-95

**George, C.H., Kendall, J.M., Evans, W.H.** (1999) Intracellular trafficking pathways in the assembly of connexin into gap junctions. *J Biol Chem* 274, 8678-8685

**Giepmans, B.N.G., Verlaan, I., Hengeveld, T., Janssen, H., Calafat, J., Falk, M.M., Moolenaar, W.H.** (2001) Gap junction protein connexin-43 interacts directly with microtubules. *Curr Biol* 11(17), 1364-1369

**Go, M., Kojima, T., Takano, K., Murata, M., Koizumi, J, Kurose, M., Kamekura, R., Osanai, M., Chiba, H., Spray, D.C., Himi, T., Sawada, N.** (2006) Connexin 26 expression prevents down-regulation of barrier and fence functions of tight junctions by Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase inhibitor ouabain in human airway epithelial cell line Calu-3. *Experimental Cell Research* 312(19), 3847-56

**Goldstein, L.S., Yang, Z.** (2000) Microtubule-based transport systems in neurons: The Roles of Kinesins and Dyneins. *Annu Rev Neurosci* 23, 39-71

**Gomes, E.R., Jani, S., Gundersen, G.G.** (2005) Nuclear movement regulated by Cdc42, MRCK, myosin, and actin flow establishes MTOC polarization in migrating cells. *Cell* 121, 451-463

- Goodenough, D.A., Paul, D.L.** (2003) Beyond the gap: functions of unpaired connexon channels. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 285-294
- Green, W.N., Millar, N.S.** (1995) Ion-channel assembly. *Trends Neurosci* 18, 280-287
- Gregory, S.L., Brown, N.H.** (1998) kakapo, a gene required for adhesion between and within cell layers in *Drosophila*, encodes a large cytoskeletal linker protein related to plectin and dystrophin. *J Cell Biol* 143, 1271-1282
- Guo, S., Kempfues, K.J.** (1995) par-1, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. *Cell* 81, 611-620
- Harris, T.J., Peifer, M.** (2004) Adherens junction-dependent and -independent steps in the establishment of epithelial cell polarity in *Drosophila*. *J Cell Biol* 167, 135-147
- Harris, T.J., Peifer, M.** (2005) The positioning and segregation of apical cues during epithelial polarity establishment in *Drosophila*. *J Cell Biol* 170, 813-823
- Hervé, J.-C., Phelan, P., Bruzzone, R., White, T.W.** (2005) Connexins, innexins and pannexins: Bridging the communication gap. *Biochim Biophys Acta* 1719, 3-5
- Humbert, P.O., Dow, L.E., Russell, S.M.** (2006) The Scribble and Par complexes in polarity and migration: friends or foes? *Trends Cell Biol* Dec 16(12), 622-630
- Isakson, B.E., Damon, D.N., Day, K.H., Liao, Y., Duling, B.R.** (2005) Connexin40 and Connexin43 in mouse aortic endothelium: evidence for coordinated regulation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290(3), 1199-1205
- Januschke, J., Gervais, L., Gillet, L., Keryer, G., Bornens, M., Guichet, A.** (2006) The centrosome-nucleus complex and microtubule organization in the *Drosophila* oocyte. *Development* 133(1), 129-139
- Johnson, K., Wodarz, A.A.** (2003) A genetic hierarchy controlling cell polarity. *Nat Cell Biol* 5(1), 12-14
- Jongen, W.M.F., Fithgerald, D.J., Asamoto, M., Piccoli, C., Slaga, T.J., Gros, D., Takeichi, M., Yamasaki, H.** (1991) Regulation of connexin 43-mediated gap junctional intercellular communication by  $Ca^{++}$  in mouse epidermal cells is controlled by E-cadherin. *J Cell Biol* 114, 545-555
- Josten, F., Fuß, B., Feix, M., Meissner, T., Hoch, M.** (2004) Cooperation of JAK/STAT and Notch signaling in the *Drosophila* foregut. *Dev Biol* 267, 181-9
- King, D.G.** (1988). Cellular organization and peritrophic membrane formation in the cardia (proventriculus) of *Drosophila melanogaster*. *J Morphol* 196, 253-82
- Knust, E.** (2002) Regulation of epithelial cell shape and polarity by cell-cell adhesion. *Mol Membr Biol* 19(2), 113-20

- Knust, E., Bossinger, O.** (2002) Composition and formation of intercellular junctions in epithelial cells. *Science* 298, 1955-1959
- Kretz, M., Euwens, C., Hombach, S., Eckardt, D., Teubner, B., Traub, O., Willecke, K., Ott, T.** (2003) Altered connexin expression and wound healing in the epidermis of connexin-deficient mice. *J Cell Science* 116(16), 3443-3453
- Kretz, M., Maass, K., Willecke, K.** (2004) Expression and function of connexins in the epidermis, analyzed with transgenic mouse mutants. *Eur J Cell Biol* 83, 647-54
- Kruger, O., Beny, J.L., Chabaud, F., Traub, O., Theis, M., Brix, K., Kirchhoff, S., Willecke, K.** (2002) Altered dye diffusion and upregulation of connexin37 in mouse aortic endothelium deficient in connexin40. *J Vasc Res* 39(2), 160-72
- Kumar, N.M., Gilula, N.B.** (1996) The Gap Junction Communication Channel. *Cell* 84, 381-388
- Laemmli, U.K.** (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685
- Lang, R.** (1981) Das Elektronenmikroskop, Thieme, Stuttgart
- Le Borgne, R., Bellaïche, Y., Schweisguth, F.** (2002) *Drosophila* E-Cadherin Regulates the Orientation of Asymmetric Cell Division in the Sensory Organ Lineage. *Current Biology* 12, 95-104
- Lee, J.K., Coyne, R.S., Dubreuil, R.R., Goldstein, L.S.B., Branton, D.** (1993) Cell Shape and Interaction Defects in  $\alpha$ -Spectrin Mutants of *Drosophila Melanogaster*. *J Cell Biol* 123(6), 3443-3453
- Lehmann, C., Lechner, H., Löer, B., Knieps, M., Herrmann, S., Famulok, M., Bauer, R., Hoch, M.** (2006). Heteromerization of innexin gap junction proteins regulates epithelial tissue organization in *Drosophila*. *Mol Biol Cell* 17(4), 1676-85
- Lindsley, D.L., Zimm, G.G.** (1992) The Genome of *Drosophila melanogaster*. Academic Press, San Diego
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., Baltimore, D., Darnell, J.** (2000) Molecular Cell Biology. 4th Edition WH Freeman & Company, New York
- Martin, P.E., Blundell, G., Ahmad, S., Errington, R.J., Evans, W.H.** (2001) Multiple pathways in the trafficking and assembly of connexin 26, 32 and 43 into gap junction intercellular communication channels. *J Cell Science* 114 (21), 3845-3855
- Martin, P.E.M., Evans, W.H.** (2004) Incorporation of connexins into plasma membranes and gap junctions. *Cardiovasc Res.* 62, 378-387

- Meyer, R.A., Laird, D.W., Revel, J.-P., Johnson, R.G.** (1992) Inhibition of gap junction and adherens junction assembly by connexin and A-CAM antibodies. *J Cell Biol* 119, 179–189
- Moorby C., Patel, M.** (2001) Dual function for connexins: Cx43 regulates growth independently of Gap junction formation. *Experimental Cell Research* 271, 238-248
- Müller, H.A., 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(1), 149-163
- Munro, E.M.** (2006) PAR proteins and the cytoskeleton: a marriage of equals. *Curr Biol* 18, 86-94
- Musil, L.S., Goodenough, D.A.** (1993) Multisubunit assembly of an integral plasma membrane channel protein, gap junction connexin 43, occurs after exit from ER. *Cell* 74, 1047-1058.
- Musil, L.S., Cunningham, B.A., Edelman, G.M., Goodenough, D.A.** (1990) Differential phosphorylation of the gap junction protein connexin 43 in junctional communication-competent and -deficient cell lines. *J Cell Biol* 111, 2077–2088
- Nelson, W.J.** (2003) Adaption of core mechanisms to generate cell polarity. *Nature* 422(6933), 766-774
- Ohno, S.** (2001) Intercellular junctions and cellular polarity: the PAR-aPKC complex, a conserved core cassette playing fundamental roles in cell polarity. *Curr Opin Cell Biol* 13, 641-648
- Palazzo, A.F., Joseph, H.L., Chen, Y.J., Dujardin, D.L., Alberts, A.S., Pfister, K.K., Vallee, R.B., Gundersen, G.G.** (2001) Cdc42, dynein, and dynactin regulate MTOC reorientation independent of Rho-regulated microtubule stabilization. *Curr Biol* 11, 1536-1541
- Peracchia, C.** (1973) Structure details and Further Evidence for Intercellular Channels by Freeze-Fracture and negative Staining. *Cell Biol* 57, 66-67
- Pfaffl, M.W.** (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29(9), 45
- Phelan, P.** (2005) Innexins: members of an evolutionarily conserved family of gap-junction proteins. *Biochim Biophys Acta* 1711, 225-45
- Phelan, P., Nakagawa, M., Wilkin, M.B., Moffat, K.G., O'Kane, C.J., Davies, J.A., Bacon, J.P.** (1996) Mutations in shaking-B prevent electrical synapse formation in the *Drosophila* giant fiber system. *J Neurosci* 16, 1101-1113
- Phelan, P., Starich, T.A.** (2001) Innexins get into the gap. *Bioessays* 23, 388-396

- Phelan, P., Stebbings, L.A., Baines, R.A., Bacon, J.P., Davies, J.A. and Ford, C.** (1998b) *Drosophila* Shaking-B protein forms gap junctions in paired *Xenopus* oocytes. *Nature* 391, 181-184
- Phelan, P., Bacon, J.P., Davies, J.A., Stebbings, L.A., Todman, M.G., Baines, R.A., Barnes, T.M., Ford, C., Hekimi, S., Lee, R., Shaw, J.E., Starich, T.A., Curtin, K.D., Sun, Y.A., Wyman, R.J.** (1998a) Innexins: a family of invertebrate gap-junction proteins. *Trends Genet* 14, 348-349
- Phillips, M.D., Graham T.H.** (2006) Brush border spectrin is required for early endosome recycling in *Drosophila*. *J Cell Sci* 119(7), 1361-70
- Pielage, J., Stork, T., Bunse, I., Klämbt, 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), 841–851
- Plattner, H., Zingsheim, H.P.** (1987) Elektronenmikroskopische Methodik in der Zell und Molekularbiologie. Fischer, Stuttgart
- Revel, J.P., Karnovsky, M.J.** (1967) Hexagonal array of subunits in intercellular junctions of the mouse heart and liver. *J Cell Biol* 33, C7–C12
- Robinson, D.G., Schürmann, F.-M.** (1985) Präparationsmethodik in der Elektronenmikroskopie. Springer, Berlin
- Röper, K., Gregory, S.L., Brown, N.H.** (2002) The ‘Spectraplakins’: cytoskeletal giants with characteristics of both spectrin and plakin families. *J Cell Sci* 115 (22), 4215-4225
- Saez, J.C., Berthoud, V.M., Branes, M.C., Martinez, A.D., Beyer, E.C.** (2003) Plasma Membrane Channels Formed by Connexins: Their Regulation and Functions. *Physiol Rev* 83(4),1359-1400
- Segretain, D., Falk, M.M.** (2004) Regulation of connexin biosynthesis, assembly, gap junction formation, and removal. *Biochim Biophys Acta* 1662, 3–21
- Simon, A.M., McWhorter, A.R.** (2003) Decreased intercellular dye-transfer and down regulation of non ablated connexins in aortic endothelium deficient in connexin37 or connexin40. *J Cell Sci* 116, 2223-2236
- Skaer, H.** (1993) The alimentary canal In *The Development of Drosophila melanogaster*. (ed. M. Bate and A. Martinez Arias). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 941- 1012
- Söhl, G., Willecke, K.** (2004) Gap junctions and the connexin protein family. *Cardiovasc Res* 62, 228–232
- Stebbing, L.A., Todman, M.G., Phelan, P., Bacon, J.P., Davies, J.A.** (2000) Two *Drosophila* innexins are expressed in overlapping domains and cooperate to form gap-junction channels. *Mol Biol Cell* 11, 2459-2470

- Stebbing, L.A., Todman, M.G., Phillips, R., Greer, C.E., Tam, J., Phelan, P., Jacobs, Bacon, J.P. and Davies, J.A.** (2002) Gap junctions in *Drosophila*: developmental expression of the entire innexin gene family. *Mech Dev* 113, 197-205
- Strasburger, M.** (1932) Bau, Funktion und Variabilität des Darmtraktes von *Drosophila melanogaster*. *Z Wiss Zool* 140, 536–649
- Strumpf, D., Volk, T.** (1998) Kakapo, a novel cytoskeletal-associated protein is essential for the restricted localization of the neuregulin-like factor, vein, at the muscle-tendon junction site. *J Cell Biol* 143, 1259-1270
- Suzuki, A., Ohno, S.** (2006) The PAR-aPKC system: lessons in polarity. *J Cell Sci* 119, 979–987
- Tanentzapf, G., Tepass, U.** (2003) Interactions between the crumbs, lethal giant larvae and bazooka pathways in epithelial polarization. *Nature* 5, 46-52
- Tepass, U.** (1997) Epithelial differentiation in *Drosophila*. *Bioessays* 19(8), 673-82
- Tepass, U., Hartenstein, V.** (1994) The development of cellular junctions in the *Drosophila* embryo. *Dev Biol* 161(2), 563-96
- Tepass, U., Tanentzapf, G., Ward, R., Fehon, R.** (2001) Epithelial Cell Polarity and Cell Junctions in *Drosophila*. *Annu Rev Genet* 35, 747-84
- Terra, W.R.** (2001) The origin and functions of the insect peritrophic membrane and peritrophic gel. *Arch Insect Biochem Physiol* 47(2), 47-61
- Thomas, J.B., Wyman, R.J.** (1984) Mutations altering synaptic connectivity between identified neurons in *Drosophila*. *J Neurosci* 4, 530– 538
- Todman, M.G., Baines, R.A., Stebbings, L.A., Davies, J.A., Bacon, J.P.** (1999) Gap-junctional communication between developing *Drosophila* muscles is essential for their normal development. *Dev Genet* 24, 57-68
- Tsukita, S., Furuse, M.** (2002) Claudin-based barrier in simple and stratified cellular sheets. *Curr Opin Cell Biol* 14, 531–536
- VanSlyke, J.K., Musil, L.S.** (2000) Analysis of connexin intracellular transport and assembly. *Methods* 20, 156-164
- Watanabe, T., Kankel, D.R.** (1990) Molecular Cloning and Analysis of *I(1)ogre*, a Locus of *Drosophila melanogaster* With Prominent Effects on the Postembryonic Development of the Central Nervous System. *Genetics* 126, 1033-1044
- Willecke, K., Eiberger, J., Degen, J., Eckardt, D., Romualdi, A., Guldenagel, M., Deutsch, U., Söhl, G.** (2002) Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome. *Biol Chem* 383,725-737

**Woods, D.F., Bryant, P.J.** (1989) Molecular cloning of the lethal(1)discs large-1 oncogene of *Drosophila*. *Dev Biol* 134(1), 222-35

**Woods, D.F., Hough, C., Peel, D., Callaini, G., Bryant, P.J.** (1996) Dlg Protein Is Required for Junction Structure, Cell Polarity, and Proliferation Control in *Drosophila* Epithelia. *J Cell Biol* 134(6), 1469-1482

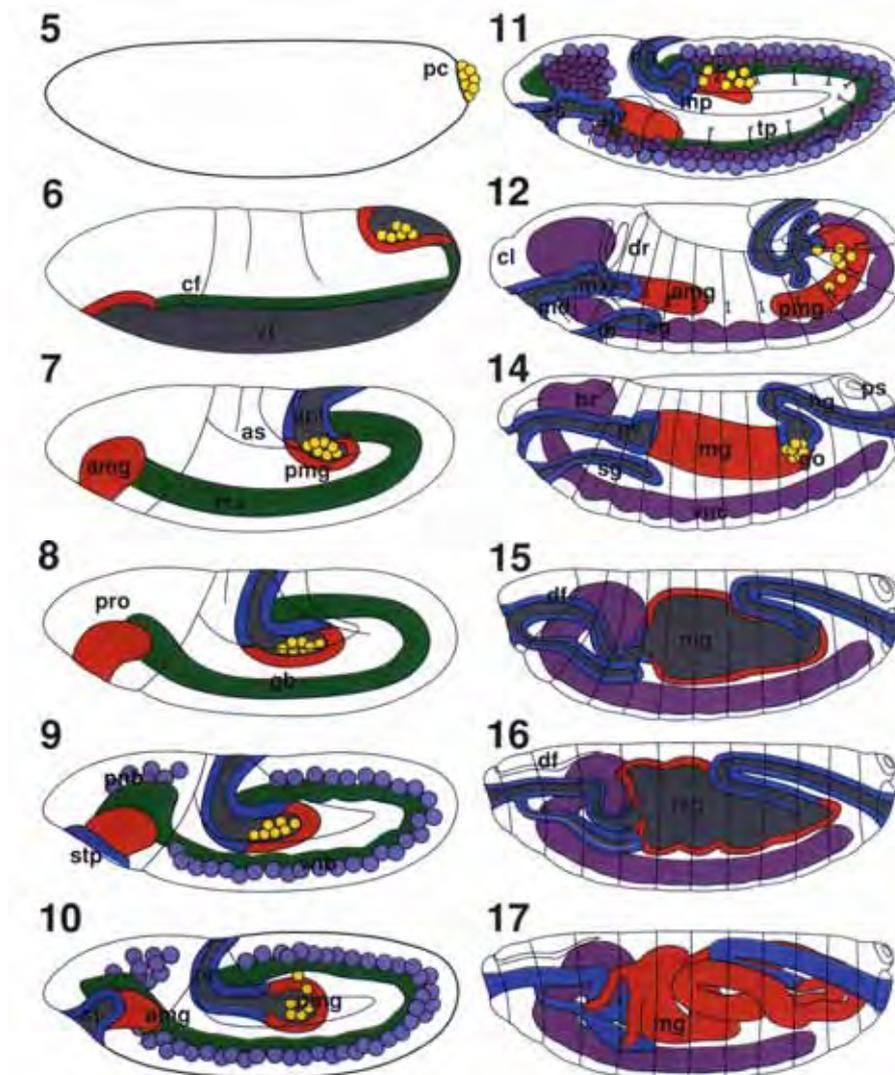
**Wu, V.M. et al.** (2004) Sinuous is a *Drosophila* claudin required for septate junction organization and epithelial tube size control. *J Cell Biol* 164, 313–323

**Xu, X., et al.** (2001) Modulation of mouse neural crest cell motility by N-cadherin and connexin 43 gap junctions. *J Cell Biol* 154, 217–229

**Zhang, J.-T. Chen, M., Foote, C.L., Nicolson, B.J.** (1996) Membrane integration of *in-vitro*-translated gap junctional proteins: co- and post-translational mechanisms. *Mol Biol Cell* 7, 471-482

## A Anhang

### A.1 Embryonalentwicklung von *Drosophila melanogaster*



**Abb. A 1:** Schematische Abbildung der Embryonalentwicklung von *D. melanogaster* (nach Campos Ortega und Hartenstein, 1997)

Stadium 5: Zelluläres Blastoderm. Stadium 6: Invagination der Ventralfurche zu Beginn der Gastrulation. Stadium 7: Vollendung der Gastrulation. Invagination von anterioren und posterioren Primordien des Intestinaltraktes. Stadium 8: Ausdehnung des Keimstreifens. Stadium 10: Invagination des Stomodäums. Stadium 11: Die epidermale Segmentierung wird sichtbar. Die Darmprimordien vergrößern sich. Stadium 12: Verkürzung des Keimstreifens. Anteriore und posteriore Mitteldarmprimoriden wandern entlang des angrenzenden viszeralen Mesoderms und fusionieren. Vergrößerung der Anlagen für die Malphigischen Gefäße. Stadium 14: Beginnende Kopfinvolution. Stadium 15: Mitteldarm und Epidermis schließen sich dorsal. Stadium 16: Die drei Mitteldarmkonstriktionen werden angelegt. Beginnende Einfaltung der Proventrikulus-Epithelien. Stadium 17: Vollendung der Konstriktionen und der Proventrikulus-Morphogenese. **St.** = Stadium; **G** = Gehirn; **Ks** = Keimstreifen; **Md** = Mitteldarm; **Ms** = Mesoderm; **MT** = Malphigische Gefäße; **pMd** = posteriorer Mitteldarm; **Pv** = Proventrikulus; **Pz** = Polzellen; **Sd** = Speicheldrüsen; **Sm** = Stomodäum; **Vd** = Vorderdarm, **Vf** = Ventralfurche, **vNb** = ventrale Neuroblasten, **vNS** = ventrales Nervensystem.

## DANKSAGUNG

Bei Herrn Prof. Dr. Michael Hoch möchte ich mich sehr herzlich für die Überlassung des Themas und die Begutachtung dieser Arbeit bedanken. Seine Diskussionsbereitschaft, seine Motivation und seine Unterstützung haben entschieden zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Herrn Prof. Dr. W. Kolanus danke ich sehr herzlich für die Übernahme des Korreferats.

Ebenfalls herzlich bedanken möchte ich mich bei Frau PD Dr. H. Lichtenberg-Fraté und Herrn Prof. Dr. S. Baader, die sich bereit erklärten, in meinem Promotionsausschuss mitzuwirken.

Herrn Prof. Dr. Menzel danke ich, dass ich einen Teil der Arbeit an dem Elektronenmikroskop des IZMB durchführen konnte.

Bei Dr. Reinhard Bauer möchte ich mich ganz herzlich für die gute Betreuung und die Diskussionsbereitschaft bedanken.

Für die Einführung und die stete Unterstützung bei der Arbeit mit dem Elektronenmikroskop möchte ich mich besonders bei Alice Ihmer, Ulla Mettbach, Dr. B. Buchen und Bernd Vogelsberg bedanken.

Für die Diskussionen über statistische Signifikanz möchte ich Dr. Astrid Heinicke danken.

Tom Wegner danke ich, dass er meine vielen Computer-, Scanner-, Drucker- und Profilprobleme mit Ruhe und Geduld stets behoben hat.

Den aktuellen und ehemaligen Arbeitsgruppenmitgliedern Franka Eckardt, Birgit Löer, Hildegard Lechner, Katinka Ostrowski, Thomas Becker, Matthias Behr, Pilar Carrera Santaliestra, Bernhard Fuß, Ingo Zinke, Verena Arndt, Gerrit Loch, Claudia Müller, Sabine Büttner, Carmen Müller, Birgit Stümpges, Christian Wingen, Corinna Lehmann, Maritta Feix, Julieta Araujo, Andy Weimbs, Mara Bersch, Viola Gesellchen, Bianca Bauch, Dunia Sforzin, Sabine Over und Heidrun Schneider-Klinkosch, die mich während meiner Zeit im Labor begleitet haben, sei für ein schönes Arbeitsklima gedankt. Besonders hervorheben möchte ich noch Frank Josten, der mich bei den Farbkopplungsexperimenten unterstützt hat.

Meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, danke ich für das immerwährende Interesse an meiner Arbeit und die vielfältige Unterstützung während meiner Promotions- und Studienzeit.

Bedanken möchte ich schließlich bei meinem Mann Guido, mit dem ich das gesamte Studium zusammen erlebt habe und welcher stets mit unermüdlicher Geduld und Zuneigung mich mit Rat und Tat unterstützt hat.

## **Erklärung**

Hiermit versichere ich, dass diese Dissertation von mir selbst und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt wurde. Es wurden keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet. Ferner erkläre ich, dass diese vorliegende Arbeit an keiner anderen Hochschule als Dissertation eingereicht worden ist.

Julia Martini

Bonn, im Juli 2007