

**Funktionelle Analyse des lysosomalen
Scavenger Rezeptors Leaky Spiracles in
*Drosophila melanogaster***

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Almut Clara Steinhagen

aus

Hilden

Bonn 2014

Angefertigt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. Michael Hoch
2. Gutachter: Priv. Doz. Dr. Reinhard Bauer

Tag der Promotion: 12. November 2014

Erscheinungsjahr: 2014

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Die Familie der Scavenger Rezeptoren	1
1.2	Scavenger Rezeptoren der Klasse B.....	3
1.2.1	CD36 – Ein multifunktionelles Protein	3
1.2.2	SR-BI und seine Funktion im Cholesterin-Stoffwechsel.....	5
1.2.3	Das lysosomale Membranprotein LIMP-2	7
1.3	Scavenger Rezeptoren der Klasse B in <i>Drosophila melanogaster</i>	10
1.3.1	Epithelial Membrane Protein	12
1.3.2	Croquemort.....	12
1.3.3	Snmp1	13
1.3.4	Peste.....	14
1.3.5	NinaD und Santa Maria	14
1.4	Das Tracheensystem von <i>Drosophila melanogaster</i>	15
1.4.1	Morphogenese und Aufbau des Tracheensystems.....	15
1.4.2	Die apikale extrazelluläre Matrix des Tracheensystems	15
1.4.3	Die posterioren Spirakel	16
1.5	Zielsetzung.....	18
2	Material	19
2.1	Allgemeine Materialien	19
2.1.1	Chemikalien	19
2.1.2	Verbrauchsmaterialien.....	19
2.1.3	Geräte.....	19
2.1.4	Software	21
2.1.5	Standards und Kits	21
2.2	Puffer und Lösungen	22
2.3	Enzyme	25
2.4	Antikörper/sonstige Marker.....	26
2.4.1	Primärantikörper	26

2.4.2	Sekundärantikörper	26
2.4.3	Sonstige Marker.....	27
2.5	Oligonukleotide	27
2.5.1	PCR Primer.....	27
2.5.2	Real Time-PCR Primer	29
2.6	Vektoren	30
2.7	Bakterienstämme.....	30
2.8	Fliegenlinien.....	31
2.8.1	Gal4-Fliegenlinien.....	31
2.8.2	RNAi-Fliegenlinien	32
2.8.3	Mutante Fliegenlinien	34
2.8.4	Sonstige Fliegenlinien	35
2.9	Nährmedien	36
2.9.1	LB-Medium	36
2.9.2	LB-Ampicillin-Agar	36
2.9.3	Fliegenfutter.....	36
2.9.4	Apfelsaftagarplatten.....	36
3	Methoden	37
3.1	Molekularbiologische Methoden.....	37
3.1.1	Polymerasekettenreaktion (PCR)	37
3.1.2	Agarosegelelektrophorese.....	38
3.1.3	Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	39
3.1.4	Restriktion von DNA	39
3.1.5	Ligation	40
3.1.6	Herstellung und Transformation chemokompetenter Bakterien.....	40
3.1.7	TOPO-Klonierung	40
3.1.8	DNA-Minipräparation	41
3.1.9	DNA-Midipräparation	41
3.1.10	Genomische DNA-Präparation aus adulten Fliegen	42
3.1.11	RNA-Präparation	42
3.1.12	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	42
3.1.13	Sequenzierung von DNA	42
3.1.14	Reverse Transkription	42
3.1.15	Real Time-PCR Analyse (RT-PCR).....	43

3.1.16	Herstellung einer DIG-markierten <i>Lsr in situ</i> -Sonde.....	44
3.2	Proteinbiochemische Methoden	45
3.2.1	Herstellung von Proteinextrakten	45
3.2.2	Bestimmung von Proteinkonzentrationen.....	45
3.2.3	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	45
3.2.4	Western-Blot	46
3.2.5	Immundetektion	47
3.2.6	Deglykosylierung mittels PNGase	47
3.2.7	Affinitätschromatographische Reinigung von Antiseren.....	47
3.3	Arbeiten mit <i>Drosophila melanogaster</i>	48
3.3.1	Haltung und Kreuzung von Fliegen	48
3.3.2	Sammeln von Embryonen	48
3.3.3	Sortieren von Embryonen und Larven.....	48
3.3.4	Letalitätstest	49
3.3.5	Expressionsinduktion mittels Gal4-UAS-System	49
3.3.6	Erzeugung von Flip Out Klonen	50
3.3.7	Erzeugung transgener Fliegenlinien und Bestimmung des P-Element- Insertionschromosoms.....	50
3.3.8	<i>Ends-out Gene Targeting</i>	51
3.3.9	Untersuchung der Gasfüllung.....	53
3.3.10	Untersuchung der Permeabilität der Spirakel.....	53
3.3.11	Kutikulapräparation.....	53
3.4	Fluoreszenz- und histochemische Färbungen	54
3.4.1	Immunfluoreszenzfärbungen von Embryonen	54
3.4.2	Immunfluoreszenzfärbungen von larvalen Geweben.....	55
3.4.3	<i>In situ</i> -Hybridisierung	56
3.4.4	Oil Red O Färbung der posterioren Spirakeln	57
3.4.5	LysoTracker Färbung und Lysosomenquantifizierung	58
3.4.6	Filipin Färbung.....	58
4	Ergebnisse	59
4.1	Molekulare und biochemische Charakterisierung des Scavenger Rezeptors Lsr	59
4.1.1	<i>Lsr</i> Gen- und Proteinstruktur	59
4.1.2	Posttranslationale Modifikation des Lsr Proteins	62
4.1.3	Homologievergleiche der Lsr CD36-Domäne.....	62

4.2	Analyse des Lsr Expressionsmusters	63
4.2.1	Lsr Expression während der Embryogenese	64
4.2.2	Lsr Expression innerhalb der posterioren Spirakel.....	66
4.2.3	Postembryonale <i>Isr</i> Expression	68
4.3	Erzeugung einer <i>Isr</i> Mutante mittels <i>Ends-out Gene Targeting</i>	70
4.3.1	<i>Isr</i> knock out.....	70
4.3.2	Verifizierung der <i>Isr</i> Mutation.....	73
4.4	Phänotypische Untersuchung der <i>Isr</i>^{ko} Mutanten.....	75
4.4.1	Überlebensrate von <i>Isr</i> ^{ko} Mutanten während der Entwicklung	75
4.4.2	Größenwachstum und Verhalten von <i>Isr</i> ^{ko} Mutanten	76
4.4.3	Morphologie der posterioren Spirakel von <i>Isr</i> ^{ko} Mutanten	77
4.4.4	Physiologie der posterioren Spirakel von <i>Isr</i> ^{ko} Mutanten.....	79
4.4.5	Tracheenwachstum von <i>Isr</i> ^{ko} Mutanten	81
4.4.6	Funktion des Atmungssystems von <i>Isr</i> ^{ko} Larven	82
4.5	Untersuchung der gewebsspezifischen <i>Isr</i> Expression.....	83
4.5.1	Genetische Rettung von <i>Isr</i> ^{ko} Mutanten.....	84
4.5.2	Ektopische <i>Isr</i> Überexpression.....	86
4.6	Zellbiologische Untersuchungen der Lsr Funktion	88
4.6.1	Subzelluläre Lokalisation von Lsr	88
4.6.2	Lysosomale Lsr Funktion.....	91
4.6.3	Potentielle Lsr Interaktionspartner	96
5	Diskussion.....	101
5.1	Lsr Funktion im respiratorischen System	102
5.1.1	Lsr wird nicht für die Morphogenese der Spirakel benötigt	102
5.1.2	Lsr ist für die Funktionalität der Spirakel essentiell	103
5.1.3	Lsr beeinflusst Umbauprozesse der apikalen extrazellulären Matrix	105
5.1.4	Funktionsfähigkeit der Spirakel ist für die Larvalentwicklung von großer Bedeutung	106
5.2	Lsr Funktion im lysosomalen Kompartiment	108
5.2.1	Lsr ist ein lysosomales Protein	108
5.2.2	Lsr - Ein funktionelles LIMP-2 Homolog?	109
5.2.3	Das lysosomale Kompartiment beeinflusst den Aufbau der apikalen extrazellulären Matrix	111

6 Zusammenfassung	115
Literaturverzeichnis	117
Abkürzungsverzeichnis	129

1 Einleitung

1.1 Die Familie der Scavenger Rezeptoren

Scavenger Rezeptoren bilden eine Familie von Transmembranproteinen, die erstmals 1979 von Goldstein und Brown im Rahmen ihrer Untersuchungen der familiären Hypercholesterinämie beschrieben wurden (Goldstein, Ho, Basu, & Brown, 1979). Familiäre Hypercholesterinämie bezeichnet einen erhöhten Cholesterinspiegel im Blut, dessen Ursache Mutationen im *Low Density Lipoprotein (LDL) Rezeptor* Gen darstellen (Brown and Goldstein, 1986). Diese führen zu einer Akkumulation von LDL, einem Lipoprotein, das als Transportvehikel für wasserunlösliche Lipide wie Cholesterin, Fettsäuren und Triglyceride im Blutplasma dient. Überschüssiges LDL dringt in die Gefäßwand ein und kann durch freie Radikale, die von Endothelzellen sowie der glatten Muskulatur im Rahmen entzündlicher Prozesse gebildet werden, oxidiert werden (Steinberg, 1997). Oxidiertes LDL (oxLDL) ist zytotoxisch und wird kontinuierlich von Makrophagen aufgenommen. Durch massenhafte Lipideinlagerung entwickeln sich Makrophagen zu so genannten Schaumzellen, die einen Bestandteil von atherosklerotischen Plaques darstellen (Young & McEneny, 2001). Die fortschreitenden Ablagerungen in der Gefäßwand im Rahmen einer atherosklerotischen Erkrankung führen zu einer Verengung und Verhärtung der Arterie zu dessen Folgen Herzinfarkte, Schlaganfälle und Thrombosen zählen.

Scavenger Rezeptoren spielen bei diesen Prozessen eine entscheidende Rolle, da sie als Rezeptoren für oxLDL identifiziert wurden und eine Aufnahme dieser Partikel in die Zelle ermöglichen (Brown et al., 1980). Weitere Untersuchungen zeigten, dass Scavenger Rezeptoren als multifunktionelle Rezeptoren fungieren und neben oxLDL eine Reihe weiterer endogener sowie exogener, vorwiegend polyanionischer Moleküle binden (Mukhopadhyay and Gordon, 2004). So vermitteln Scavenger Rezeptoren beispielsweise die Erkennung und Aufnahme von apoptotischen Zellen und Bakterien und spielen somit neben dem Lipidmetabolismus eine wichtige Rolle in der angeborenen Immunität (Dunne et al., 1994; Ren et al., 1995). Weitere Liganden stellen Komponenten der extrazellulären Matrix dar, weshalb Scavenger Rezeptoren auch an der Zelladhäsion beteiligt sind (Santiago-García et al., 2003; Tandon et al., 1989).

Im Laufe der Jahre wurde eine Vielzahl von Transmembranproteinen aufgrund ihrer Eigenschaft oxLDL zu binden der Familie der Scavenger Rezeptoren zugeordnet. Da es

sich hierbei teilweise um strukturell sehr unterschiedliche Proteine handelt, wurde 1997 von Krieger eine Einteilung der Rezeptoren entsprechend ihrer Domänenstruktur vorgenommen (Krieger, 1997). Die Klassifizierung wurde im Zuge der Forschung erweitert, so dass man heute mindestens acht Klassen (A-H) unterscheidet (Plüddemann et al., 2007). Eine Zugehörigkeit von zwei weiteren Klassen (I und J) wird ebenfalls diskutiert (Canton et al., 2013). Generell zeigen die Mitglieder der gleichen Klasse strukturelle Gemeinsamkeiten, während die Proteine unterschiedlicher Klassen keine bzw. nur eine geringfügige Homologie aufweisen. Einige Vertreter der einzelnen Klassen sind in Abb. 1.1 dargestellt.

Da im Rahmen dieser Arbeit ein *Drosophila* Scavenger Rezeptor der Klasse B untersucht wurde, wird diese Klasse im Folgenden näher erläutert.

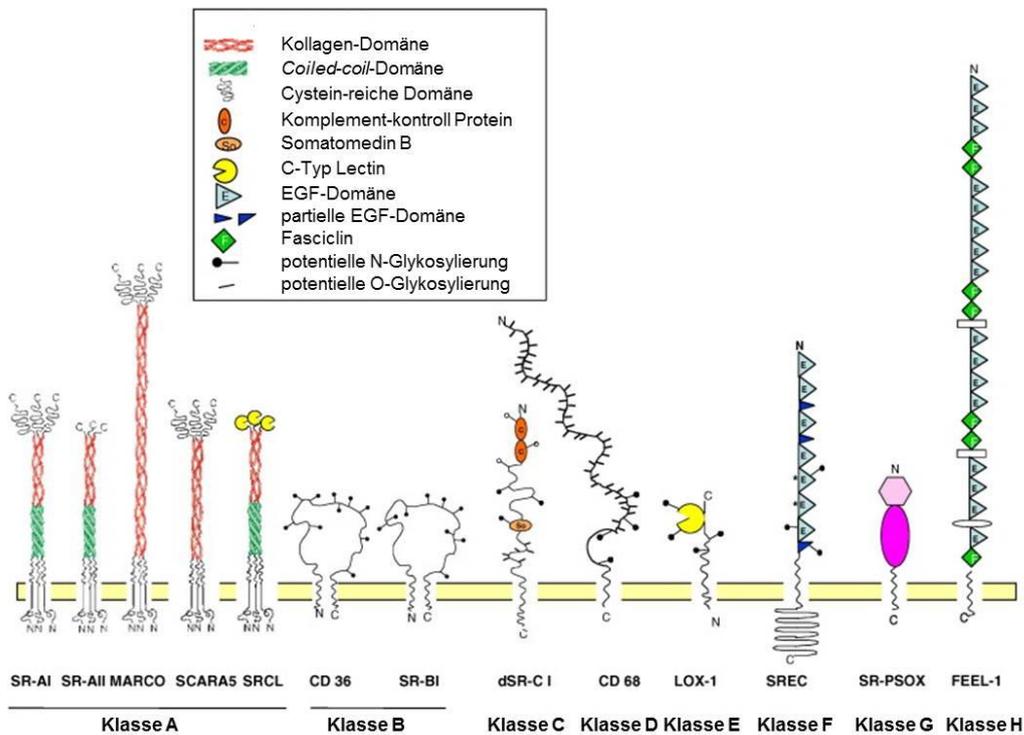


Abb. 1.1 Die Familie der Scavenger Rezeptoren. Basierend auf einer Einteilung von Krieger, 1997 werden Scavenger Rezeptoren aufgrund ihrer Domänenstruktur in acht Klassen (A-H) unterteilt. Dargestellt sind typische Vertreter der einzelnen Klassen mit ihrer Domänenstruktur. (modifiziert nach Plüddemann et al. 2007)

1.2 Scavenger Rezeptoren der Klasse B

Scavenger Rezeptoren der Klasse B bilden eine charakteristische Haarnadelstruktur aus. Sie besitzen zwei Transmembrandomänen und eine große, hochgradig glykosylierte extrazelluläre Schleife (Abb. 1.2). Diese besteht nahezu vollständig aus der so genannten CD36 (*Cluster of Differentiation 36*)-Domäne, die zahlreiche Ligandenbindungsstellen beinhaltet (Canton et al., 2013). Konservierte Cysteinreste im extrazellulären Bereich führen zur Ausbildung von Disulfidbrücken, die für die Tertiärstruktur und somit Ligandenerkennung entscheidend sind (Gruarin et al., 1997). Die relativ kurzen N- und C-Termini liegen im Zytoplasma und sind durch Interaktion mit zytosolischen Proteinen an der Regulation von Signalwegen beteiligt.

Die Klasse B beinhaltet in Säugetieren drei Gene. *CD36*, *SCARB1* (*Scavenger Receptor-B1*) das durch alternative Spleißvorgänge die zwei Isoformen SR-BI und SR-BII kodiert und *SCARB2*, das das Protein LIMP-2 (*Lysosomal Integral Membrane Protein-2*) kodiert (Calvo et al., 1995).

1.2.1 CD36 – Ein multifunktionelles Protein

CD36 ist ein 471 Aminosäure großes Protein, das die typische Haarnadelstruktur von Klasse B Rezeptoren aufweist (Abb. 1.2). Es ist heute der wohl am besten untersuchte Klasse B Rezeptor, wenngleich noch viele offene Fragen bestehen. So ist trotz der vielen Studien beispielsweise die Weiterleitung von Signalen durch CD36 in die Zelle nach wie vor nicht vollständig verstanden.

Es wurde erstmals 1977 als 88 kDa großes „Glykoprotein IV“ in der Membran von Monozyten beschrieben (Clemetson et al., 1977). Weitere Untersuchungen zeigten, dass CD36 in Säugetieren in vaskuläre Endothelzellen, Makrophagen, Dendritische Zellen, Adipozyten, Herz- und Skelettmuskelzellen sowie Epithelzellen der Retina, der Brust und des Darms exprimiert wird (Silverstein and Febbraio, 2009). Subzellulär hält es sich vorwiegend in Cholesterin- und Sphingolipid-reichen Mikrodomänen der Plasmamembran, so genannten *Lipid rafts* auf, wo es mit anderen Rezeptoren wie Caveolin-1 assoziiert ist (Lisanti et al., 1994). Die subzelluläre Lokalisation und der Transport durch die Zelle werden durch zahlreiche posttranslationale Proteinmodifikationen vermittelt. Dazu gehören die N-Glykosylierungen im extrazellulären Bereich sowie die Acylierungen und Ubiquitinierungen in den kurzen zytoplasmatischen Domänen (Abb. 1.2) (Smith et al., 2008; Tao et al., 1996).

Das große Ligandenspektrum zeigt, dass CD36 ein multifunktionelles Protein darstellt (Abb. 2). So fungiert CD36 beispielsweise im vaskulären Endothel durch die Bindung des sekretierten Proteins Thrombospondin-1 (TSP-1) durch Signalweiterleitung als negativer Regulator der Neubildung von Blutgefäßen (Asch et al., 1987). Neben TSP-1 bindet CD36 auch an Kollagen, eine andere Komponente der extrazellulären Matrix und kann dadurch Zelladhäsion vermitteln (Tandon et al., 1989).

Aufgrund der Bindung und Aufnahme von langkettigen Fettsäuren (*long chain fatty acids*, LCFA) und oxidierten Fettsäuren wird CD36 auch als *Fatty Acid Translocase* bezeichnet. Die Aufnahme von LCFA durch CD36 in Adipozyten und Myozyten trägt entscheidend zur Regulation der Lipid-Homöostase des Körpers bei (Hajri and Abumrad, 2002). So wiesen beispielsweise CD36-defiziente Mäuse eine verringerte Masse des Fettgewebes auf (Hajri et al., 2007). Darüber hinaus fungiert CD36 als Sensor bei der Perzeption von Lipiden. So konnte gezeigt werden, dass CD36 in Geschmacksknospen für die chemo-sensorische Wahrnehmung von Fett als Geschmack verantwortlich ist (Laugerette et al., 2005; Pepino et al., 2012).

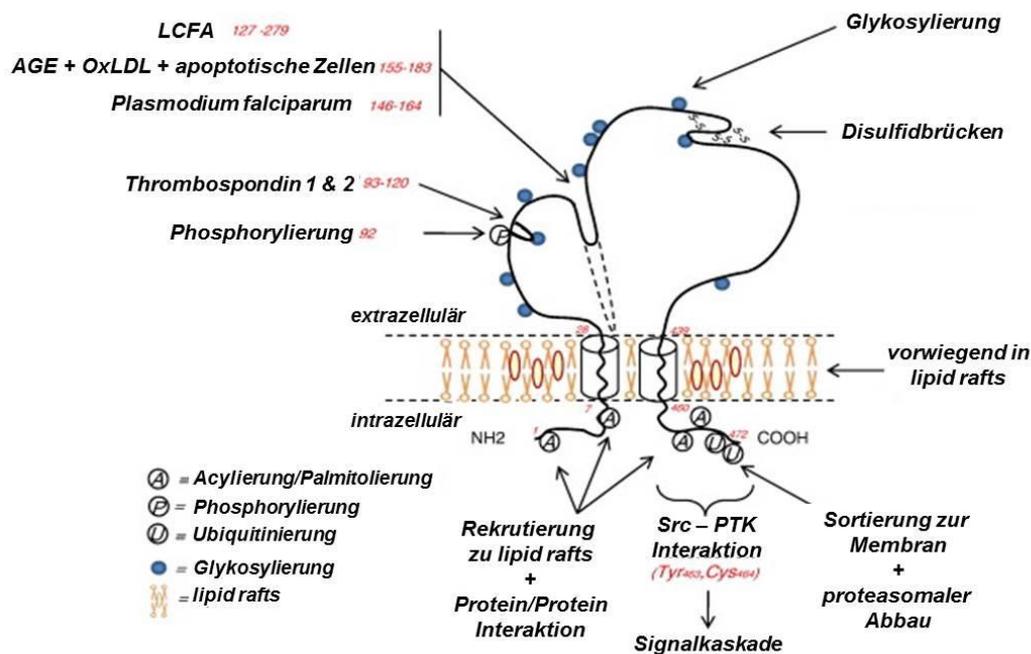


Abb. 1.2 Struktur und Eigenschaften des humanen CD36. Dargestellt ist CD36 in der Plasmamembran mit unterschiedlichen Liganden und ihren Bindungsstellen in der extrazellulären Domäne. N- und C-Terminus sind für die subzelluläre Lokalisation und die Signalweiterleitung entscheidend. Darüber hinaus sind posttranslationale Modifikationen dargestellt. AGE, *advanced glycation end products*; Src-PTK, Src-Protein Tyrosinkinase; LCFA, *long chain fatty acids* (langkettige Fettsäuren). (modifiziert nach Martin et al. 2011)

CD36 fungiert außerdem als klassischer Scavenger Rezeptor und vermittelt die endozytische Aufnahme von oxLDL in Makrophagen (Endemann et al., 1993). Die Endozytose erfolgt über einen *Lipid raft* vermittelten Weg, der jedoch unabhängig von Caveolin-1 oder Clathrin zu funktionieren scheint (Zeng et al., 2003).

Des Weiteren ist CD36 als Phagozytoserezeptor von apoptotischen Zellen (Savill et al., 1992), β -Amyloid Peptiden (Coraci et al., 2002) und *Plasmodium falciparum* infizierten Erythrozyten (Oquendo et al., 1989) beschrieben und ist demnach in Krankheiten wie Alzheimer und Malaria involviert.

Darüber hinaus agiert CD36 als Ko-Rezeptor von Integrinen, Toll-Like Rezeptoren sowie Tetraspaninen und ist im Rahmen dieser Interaktionen an Signaltransduktionsprozessen beteiligt (Miao et al., 2001; Stuart et al., 2005).

1.2.2 SR-BI und seine Funktion im Cholesterin-Stoffwechsel

SR-BI (auch CLA-1) ist ein 509 Aminosäuren großes Glykoprotein, das erstmals 1993 durch seine Homologie zu CD36 identifiziert wurde (Calvo and Vega, 1993). Studien haben gezeigt, dass SR-BI als Multiligand-Rezeptor, ähnlich wie CD36 Lipoproteine wie oxLDL und Very Low Density Lipoprotein (VLDL), aber auch apoptotische Zellen und andere Liganden binden kann (Calvo et al., 1997; Murao et al., 1997). Bahnbrechend war allerdings die Entdeckung, dass SR-BI als effektiver Rezeptor für High Density Lipoprotein (HDL) fungiert (Acton et al., 1996). Dabei vermittelt SR-BI die selektive Aufnahme von Cholesterin und Cholesterinestern vom hydrophoben Kern des HDLs ohne endozytische Aufnahme und anschließenden Abbau des gesamten Partikels (Rigotti et al., 2003). Der Cholesterintransport funktioniert bidirektional entlang eines Konzentrationsgradienten, so dass SR-BI auch den Efflux von Cholesterin aus der Plasmamembran hin zu HDL-Partikeln vermittelt (Ji et al., 1997a).

Subzellulär liegt SR-BI in Clustern vor und induziert die Entstehung von Mikrovilli-ähnlichen Ausstülpungen der Plasmamembran, wodurch der Cholesterintransport zwischen Membran und HDL begünstigt wird (Peng et al., 2004). Auch andere Studien haben gezeigt, dass SR-BI die Membraneigenschaften beeinflussen kann. So führt die Expression von SR-BI in Insektenzellen zu einer verstärkten Einlagerung von Phosphatidylcholin-Subtypen in der Membran, wodurch ebenfalls der Cholesterinflux erleichtert wird (Parathath et al., 2004).

In der Funktion als HDL-Rezeptor spielt SR-BI eine entscheidende Rolle im Cholesterin-Metabolismus von Säugetieren (Abb. 1.3). Eine der wichtigsten Aufgaben des

Lipoproteins HDL ist der Rücktransport von überschüssigem Cholesterin aus peripheren Geweben zur Leber, wo das Cholesterin in Gallensäuren umgewandelt und durch die Galle ausgeschieden wird (Fielding and Fielding, 1995). An diesem Prozess ist SR-BI maßgeblich beteiligt, da es in der Leber exprimiert wird und die Cholesterinaufnahme bewirkt (Rigotti et al., 1997). Zudem vermittelt SR-BI in Makrophagen und Zellen der arteriellen Wand den Efflux von Cholesterin und wirkt so einer Entstehung von Schaumzellen entgegen (Ji et al. 1997; Zhang et al. 2003).

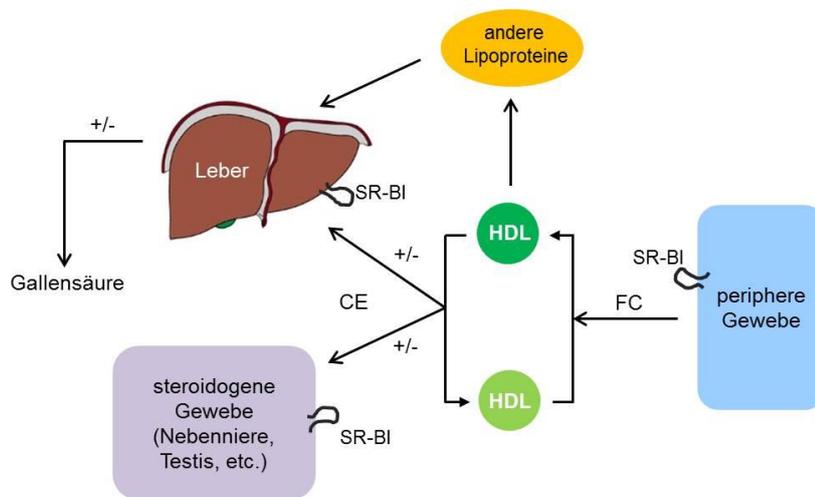


Abb. 1.3 Die Funktion von SR-BI im Cholesterin-Stoffwechsel. In peripheren Geweben wie der Arterienwand oder Makrophagen vermittelt SR-BI durch die Bindung an HDL den Efflux von überschüssigem Cholesterin. Durch HDL wird das Cholesterin zur Leber transportiert, wo es von SR-BI selektiv aufgenommen und zu Gallensäuren umgewandelt wird. Dieser Prozess wird auch als reverser Cholesterintransport bezeichnet. In steroidogenen Geweben bewirkt SR-BI die Aufnahme von Cholesterin aus HDL-Partikeln, welches hier für die Synthese von Steroidhormonen benötigt wird. Von HDL kann Cholesterin auch auf andere Lipoproteine übertragen werden. FC, freies Cholesterin; CE, Cholesterinester. (modifiziert nach Viñals, 2001)

Des Weiteren spielt SR-BI eine wichtige Rolle im Steroidmetabolismus. In steroidogenen Organen, wie der Nebenniere und den Ovarien sorgt es für die Aufnahme von Cholesterin, welches hier für die Synthese von Steroidhormonen benötigt wird (Abb. 1.3) (Reaven et al., 1999). So wird die *SCARB1* Expression vom Steroidogenic factor-1 (SF-1) reguliert (Cao et al., 1999).

1.2.3 Das lysosomale Membranprotein LIMP-2

1.2.3.1 Funktion der Lysosomen und lysosomaler Proteine

Lysosomen sind ubiquitäre, membranumschlossene Zellorganellen, deren Funktion in der intrazellulären Verdauung liegt und für die eukaryotische Zelle unabdinglich ist. Das Lumen besitzt einen niedrigen pH-Wert von etwa 5 und ist mit bis zu 60 verschiedenen Hydrolasen angereichert. Dazu gehören unter anderem Peptidasen, Lipasen, Nukleasen, Phosphatasen und Glukosidasen, die den Abbau von Makromolekülen vermitteln (Settembre et al., 2013). Die Ansäuerung erfolgt durch Protonenpumpen (H^+ -ATPasen) in der lysosomalen Membran, die unter ATP-Verbrauch H^+ -Ionen in das Lysosom pumpen (Alberts et al., 2002).

Das abzubauen Material gelangt abhängig von seinem Ursprung durch verschiedene Wege ins Lysosom. Der am besten untersuchteste Weg ist die Endozytose. Hierbei werden extrazelluläre Makromoleküle von der Zelle aufgenommen und durch Vesikel zunächst zu frühen Endosomen transportiert. Durch schrittweise Ansäuerung und Einlagerung von Hydrolasen die vom Golgi-Apparat dorthin transportiert werden, reifen die Vesikel zu späten Endosomen und schließlich Lysosomen heran. Dieser Prozess wird durch Verschmelzung mit bereits bestehenden späten Endosomen und Lysosomen beschleunigt. Dabei wird die Spezifität des Vesikelandockens durch *Targeting*-GTPasen, so genannte Rab-Proteine vermittelt, die sich auf der Oberfläche der Vesikel befinden. Die Abbauprozesse starten in späten Endosomen, die bereits Hydrolasen und einen niedrigen pH-Wert von ca. 6 besitzen (Alberts et al. 2002).

Große Partikel und Mikroorganismen gelangen durch Phagozytose zu den Lysosomen. Hierbei werden die Objekte von der Plasmamembran umschlossen und ins Zellinnere transportiert. Das so genannte Phagosom wird ebenfalls durch Fusion mit späten Endosomen und schließlich Lysosomen schrittweise angesäuert und mit Hydrolasen versetzt, die die Degradation des Partikels vermitteln (Haas, 2007). Auch zelleigene Bestandteile können, wenn sie nicht mehr benötigt werden über Lysosomen abgebaut werden. Bei diesem als Autophagie bezeichneten Vorgang werden beispielsweise ganze Zellorganellen wie Mitochondrien von einer Membran umschlossen, deren Ursprung vermutlich das Endoplasmatische Retikulum (ER) darstellt. Das so entstandene Autophagosom fusioniert ebenfalls mit Lysosomen, was zum anschließenden Abbau des Zellmaterials durch Hydrolasen führt (Shibutani and Yoshimori, 2014).

Die sauren Hydrolasen werden meist über einen speziellen Weg zu den Lysosomen transportiert. Nach Synthese im ER und Transport zum Golgi-Apparat werden sie dort mit einer Mannose-6-Phosphat (M6P)-Gruppe markiert, die als Signal für den Transport zu

späten Endosomen fungiert und über M6P-Rezeptoren vermittelt wird (Braulke and Bonifacino, 2009). Über späte Endosomen gelangen die Hydrolasen schließlich zu Lysosomen.

Neben den sauren Hydrolasen übernehmen auch Proteine innerhalb der Membran von Lysosomen wichtige Aufgaben. Beispielsweise handelt es sich hierbei um Proteine, die den Transport von Abbauprodukten wie Zucker, Aminosäuren oder Nukleotide aus dem Lysosom ins Zytoplasma vermitteln (Eskelinen et al., 2003). Zudem sind Proteine präsent, die für Reifungs- und Fusionsprozesse beispielsweise im Rahmen der Phagozytose und Autophagie unabdinglich sind. Beispiele hierfür sind die Proteine LAMP-1 und LAMP-2 (*Lysosome-associated membrane protein*), welche die häufigsten Proteine in der lysosomalen Membran darstellen (Eskelinen, 2006). Ein weiteres lysosomales Membranprotein ist der Scavenger Rezeptor LIMP-2 dessen Struktur und Funktion im folgenden Abschnitt näher beschrieben wird.

1.2.3.2 LIMP-2

LIMP-2 (auch LGP85) ist ein 85 kDa großes Glykoprotein, das erstmals 1985 von Lewis in der Lysosomenmembran von Rattenleberzellen identifiziert wurde (Lewis, 1985). Das 478 Aminosäuren große LIMP-2 besitzt die typische Struktur einer Klasse B Scavenger Rezeptors mit zwei Transmembrandomänen. Während sich die relativ kurzen N- und C-Termini im Zytoplasma befinden, reicht die große, stark glykosylierte und dadurch vor dem Abbau geschützte Schleife ins Lumen des Lysosoms (Fukuda, 1991; Vega et al., 1991). In der Nähe des zytoplasmatischen C-Terminus besitzt LIMP-2 ein Di-Leucinmotiv (Leu 475, Ile 476), das als Signal zur Sortierung in Lysosomen genutzt wird (Ogata and Fukuda, 1994). Im *trans*-Golgi Netzwerk bindet hieran das Adapterprotein AP-3, das weitere Faktoren rekrutiert und einen Transport über späte Endosomen zu Lysosomen vermittelt (Höning et al., 1998).

Studien in Zellkultur zeigten, dass LIMP-2 an der Biogenese und Aufrechterhaltung von endosomalen/lysosomalen Kompartimenten beteiligt ist. So führte die Überexpression von LIMP-2 in COS1-Zellen zu vergrößerten frühen/späten Endosomen sowie Lysosomen. Die Autoren vermuten daher eine Interaktion von LIMP-2 mit der Maschinerie, die die Fusion und Teilung von Vesikeln reguliert. Die Überexpression führte darüber hinaus zu einer Akkumulation von Cholesterin in den genannten Kompartimenten, was möglicherweise auf einen inhibierten Membrantransport zurückzuführen ist (Kuronita et al., 2002).

Eine weitere wichtige Funktion von LIMP-2 ist der Transport des Enzyms β -Glucocerebrosidase (GCCase) vom Endoplasmatischen Retikulum (ER) über den Golgi-Apparat zu den Lysosomen (Reczek et al., 2007). Hierbei handelt es sich um eine Hydrolase, die den Abbau von Glycosylceramiden einer Gruppe von Sphingolipiden in Lysosomen bewirkt. Somit vollführt LIMP-2 einen alternativen Transportweg zu den Lysosomen, der unabhängig vom gängigen M6P-Weg funktioniert (Abb. 1.4) (Coutinho et al., 2012). Als Transportrezeptor und Chaperon für GCCase ist LIMP-2 bei der Entstehung der häufigsten lysosomalen Speicherkrankheit Morbus Gaucher involviert. Ursache dieser Erkrankung, bei der es zur Akkumulation von Glucocerebrosiden in Lysosomen kommt, stellen Mutationen im Gen der GCCase (*GBA1*) dar, die zur Fehlfunktion des Proteins führen (Beutler, 2006). Aber auch Mutationen im *SCARB2*-Gen (LIMP-2 kodierendes Gen) können zur Entstehung der Krankheit beitragen (Velayati et al., 2011).

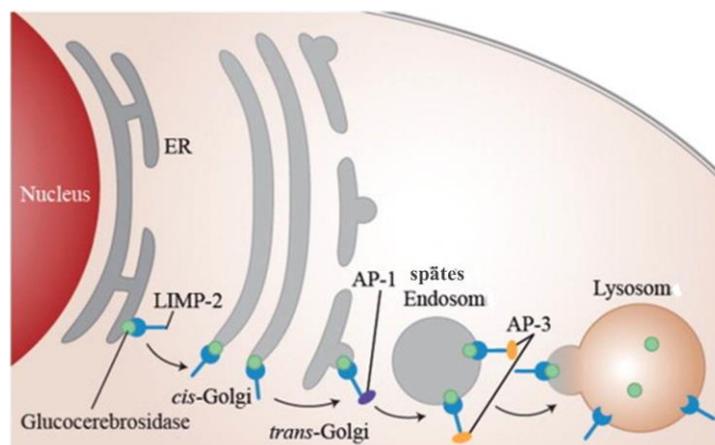


Abb. 1.4 LIMP-2 als Transportrezeptor von GCCase. Bereits im ER bindet LIMP-2 (blau) mit seiner luminalen Domäne an GCCase (grün). Der Komplex wird über das *cis*-Golgi zum *trans*-Golgi Netzwerk transportiert. Die Adapterproteine AP-1 und AP-3 vermitteln den anschließenden Transport zu späten Endosomen und Lysosomen. Nach Erreichen des Lysosoms dissoziiert der GCCase/LIMP-2-Komplex aufgrund des niedrigen pH-Wertes. (modifiziert nach Gonzalez et al., 2014)

Die Interaktion von LIMP-2 und GCCase ist pH-abhängig. So dissoziieren die beiden Proteine bei einem niedrigen pH-Wert was zur Freisetzung von GCCase in Lysosomen führt (Reczek et al., 2007). Dafür verantwortlich ist ein Histidinrest (His171) in der luminalen Domäne von LIMP-2, der als pH-Sensor fungiert (Zachos et al., 2012). Eine neue Studie zur Kristallstruktur von LIMP-2 zeigt, dass die Bindung an GCCase über eine helicale Domäne von LIMP-2 erfolgt (Neculai et al., 2013).

Studien an LIMP-2-defizienten Mäusen, die pleiotrope Phänotypen offenbarten, zeigten dass das Protein eine Vielfalt an weiteren Funktionen besitzt. Beispielsweise wiesen die

Mäuse eine periphere demyelinisierende Neuropathie sowie einen progressiven Hörverlust auf (Gamp et al., 2003). Ursache des Hörverlusts scheinen Fehllokalisationen des Kaliumkanals KCNQ1/KCNE1 sowie des Endozytoserezeptors Megalin in der Stria vascularis des Innenohrs darzustellen (Knipper et al., 2006). Außerdem entwickelten die Mäuse eine Hydronephrose aufgrund einer Harnleiterverengung. Ursache ist ein Verlust des Proteins Uroplakin an der apikalen Membran des Harnwegsepithels. Uroplakin stabilisiert die Membran und ist ein Regulator der Barrierefunktion. Das Harnleiterepithel zeigte darüber hinaus eine Akkumulation von Lysosomen, was sich auch in einer erhöhten Expression des lysosomalen Proteins LAMP-1 zeigte. Aufgrund dessen wurde postuliert, dass ein inhibierter Membrantransport zwischen Uroplakin-enthaltenden Vesikeln und der apikalen Plasmamembran die Ursache der Fehllokalisation darstellt (Gamp et al., 2003). Somit reguliert LIMP-2 auch die Lokalisation von apikalen Membranproteinen.

1.3 Scavenger Rezeptoren der Klasse B in *Drosophila melanogaster*

Scavenger Rezeptoren der Klasse B wurden nicht nur in Säugetieren untersucht sondern sind auch in Invertebraten, wie *Drosophila melanogaster*, derzeit im Fokus der Forschung. Die Taufliege *Drosophila* eignet sich aufgrund der leichten genetischen Manipulierbarkeit, sowie des kurzen Generationszyklus (9 Tage bei 25°C) und der einfachen Haltung hervorragend als Modellorganismus. Aufgrund der Tatsache, dass ca. 75 Prozent der humanen krankheitsverursachenden Gene ein potentiell funktionelles Homolog in *Drosophila* haben, macht die Taufliege für die Untersuchung von menschlichen Erkrankungen aber auch allgemeinen zellbiologischen Vorgängen sehr beliebt (Reiter et al., 2001).

Das *Drosophila* Genom besteht aus vier Chromosomen und beinhaltet im Vergleich zu Säugetieren nicht nur drei sondern 14 Gene, die Scavenger Rezeptoren der Klasse B kodieren (Nichols and Vogt, 2008). Diese Gene sind auf dem zweiten und dritten Chromosom lokalisiert und wurden aufgrund von phylogenetischen Gesichtspunkten in drei Gruppen (1-3) und mehrere Subgruppen (1a und b, 2a-c) unterteilt (Nichols and Vogt, 2008). Die Gene sind in Tab. 1.1 aufgelistet. Die Existenz von 14 Scavenger Rezeptoren in *Drosophila* lässt auf eine Diversifikation der Funktionen schließen (Nichols and Vogt, 2008). Die physiologischen Funktionen der Rezeptoren sind in *Drosophila* abgesehen von Crq, Pes, Santa Maria, NinaD und Snmp1 weitestgehend uncharakterisiert. Allerdings wurde das Expressionsmuster aller 14 Gene im dritten Larvenstadium im Detail

beschrieben. Hierbei zeigte sich, dass die Expression der Scavenger Rezeptor Gene in *Drosophila* zeitlich und räumlich strikt reguliert ist (Herboso et al., 2011).

Gennummer	Genname	Gruppe
1. CG1887		1a
2. CG2727	<i>emp</i>	1a
3. CG3829		1a
4. CG2736		1b
5. CG40006		1b
6. CG10345		1b
7. CG4280	<i>croquemort</i>	2a
8. CG31741		2a
9. CG31783	<i>ninaD</i>	2a
10. CG7227		2b
11. CG7228	<i>peste</i>	2b
12. CG12789	<i>santa maria</i>	2b
13. CG7000	<i>snmp1</i>	3
14. CG7422	<i>snmp2</i>	3

Tab. 1.1 Klasse B Scavenger Rezeptorgene in *Drosophila melanogaster*. Aufgelistet sind die 14 Gene in *Drosophila*, welche Scavenger Rezeptoren der Klasse B kodieren. Angegeben sind jeweils Gennummer, sofern vorhanden Genname und Gruppe. *emp*, Epithelial membrane protein; *snmp*, sensory neuron membrane protein; *ninaD*, neither inactivation nor afterpotential-D. (verändert nach Nichols & Vogt 2008)

Einige der Scavenger Rezeptoren wurden in verschiedenen *Screens* identifiziert, wodurch Rückschlüsse auf ihre Funktion gezogen werden können. Beispielsweise wurden alle Scavenger Rezeptoren außer *Snmp2* und CG40006 von Bruno Lemaître als Gene des Immunsystems identifiziert (www.flybase.org). *emp*, *crq*, CG12789 und CG3829 wurden bei einem Screen als Gene identifiziert, die beim autophagischen Zelltod der Speicheldrüse hoch reguliert sind (Gorski et al., 2003). Darüber hinaus wurde der Scavenger Rezeptor CG2736 als ein Protein des Subproteoms von Lipidtröpfchen identifiziert (Beller et al., 2006). Eine aktuelle Studie identifizierte den Scavenger Rezeptors CG1887 (Han et al., 2014), dessen Charakterisierung Bestandteil dieser Arbeit ist. Die Daten der genannten Studie werden in der Diskussion dargelegt und den hier vorgestellten Ergebnissen gegenübergestellt.

Nachfolgend werden die wichtigsten Funktionen und Expressionsdaten einiger Scavenger Rezeptoren in *Drosophila* zusammengefasst.

1.3.1 Epithelial Membrane Protein

Epithelial Membrane Protein (Emp) wurde erstmals 1993 von Hart und Wilcox beschrieben (Hart and Wilcox, 1993). Analysen durch *in situ* Hybridisierungen zeigten, dass das Gen während der Embryogenese von *Drosophila*, 6-8 h nach Fertilisation in ektodermalen Geweben, wie Epidermis sowie Epithelzellen des Vorder- und Hinterdarms exprimiert wird. Des Weiteren konnte *emp* Transkript im Tracheensystem, das das Atmungsorgan von Insekten darstellt und ebenfalls ektodermalen Ursprungs ist, detektiert werden (Hart and Wilcox, 1993; Herboso et al., 2011). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die *emp* Expression abhängig vom Transkriptionsfaktor Tracheless ist (Chung et al., 2011).

Aufgrund der Lokalisation und Homologie zu CD36 wurde von Hart und Wilcox eine Funktion während der Entwicklung von epithelialen Zellen und Strukturen oder bei der Adhäsion von Epithelien und extrazellulärer Matrix vorgeschlagen. Eine neue Studie scheint weitere Hinweise darauf zu liefern (persönliche Kommunikation mit P. Carrera).

1.3.2 Croquemort

Der Scavenger Rezeptor Croquemort (Crq) wurde bei einem *Screen* identifiziert, bei dem nach einem Kandidaten gesucht wurde, der in die Phagozytose von apoptotischen Zellen involviert ist und in Makrophagen exprimiert wird (Franc et al., 1996). Weitere Untersuchungen an Crq Nullmutanten zeigten, dass Crq sehr spezifisch für die Phagozytose von apoptotischen Zellen während der Embryogenese verantwortlich ist (Franc et al., 1999). Somit fungiert Crq ähnlich wie CD36 (Savill et al., 1992) als Phagozytoserezeptor. Auch Sears et al. 2003 zeigte, dass Crq für die Aufnahme von apoptotischen Zellen während der Morphogenese des zentralen Nervensystems (ZNS) von *Drosophila* unabdinglich ist. Eine Studie in S2 Zellen zeigte, dass Crq die phagozytotische Aufnahme des Bakteriums *Staphylococcus aureus* vermittelt (Stuart et al., 2005).

Eine neue Untersuchung offenbarte, dass ein *knock down* von *crq* in epidermalen Zellen während der Phagozytose zur Entstehung von vergrößerten, unförmigen Phagosomen führt (Han et al., 2014). Hier wird Crq also nicht als eigentlicher Phagozytoserezeptor, der die Aufnahme von Partikeln vermittelt, sondern als eine Komponente im Reifungsprozess von Phagosomen beschrieben. Dabei scheint Crq die Fusion von Phagosomen untereinander zu inhibieren (Han et al., 2014).

1.3.3 Snmp1

Snmp1 (Sensory neuron membrane protein 1) wird spezifisch in olfaktorischen sensorischen Neuronen in trichoiden Sensillen von *Drosophila* exprimiert. Untersuchungen an Snmp1 Nullmutanten zeigten, dass es dort an der Signaltransduktion von 11-*cis*-Vaccenylacetat (cVA), einem fettsäureartigen Pheromon, das das Sexual- und Sozialverhalten von Fliegen steuert, beteiligt ist (Benton et al., 2007; Jin et al., 2008). Snmp1 fungiert hierbei als inhibitorischer Ko-Rezeptor eines Komplexes, der aus dem Geruchsrezeptor OR67d und dem Ionenkanal Orco (OR83b) besteht. cVA bindet an das extrazelluläre Protein LUSH, das dadurch eine Konformationsänderung durchläuft. Der stabile cVA/LUSH Komplex bindet nun an Snmp1, das daraufhin vom Komplex dissoziiert wodurch der Ionenkanal geöffnet wird und ein Einstrom von Kationen ins Neuron erfolgt (Abb. 1.5, Laughlin et al. 2008; Smith 2012).

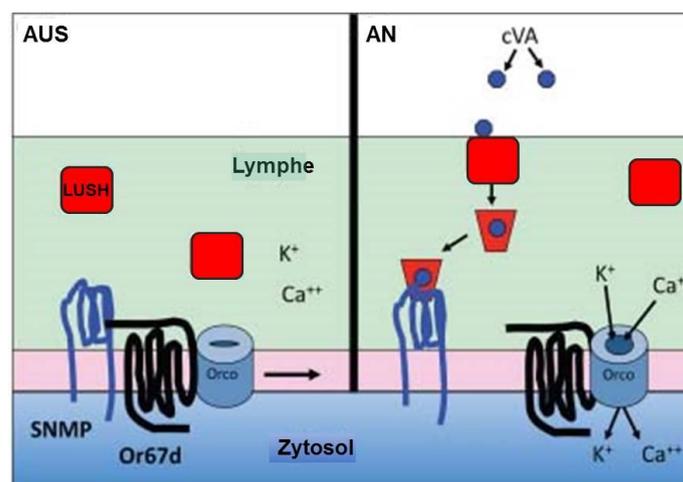


Abb. 1.5 Rolle von Snmp1 bei der cVA Detektion. Links: In Abwesenheit von cVA fungiert Snmp1 als Inhibitor des Geruchsrezeptorkomplexes bestehend aus dem olfaktorischen Rezeptor OR67d und dem Ionenkanal Orco. Rechts: cVA bindet an das extrazelluläre Protein LUSH, das dadurch seine Konformation ändert. Der cVA/LUSH Komplex bindet an Snmp1 das dadurch vom Geruchsrezeptorkomplex dissoziiert, was in einer Öffnung des Ionenkanals resultiert. (modifiziert nach Smith 2012)

Im Larvalstadium von *Drosophila* wird Snmp1 neben dem ZNS in steroidogenen Organen, wie Ovarien und der Ringdrüse, die das Häutungshormon Ecdyson produziert, exprimiert (Herboso et al., 2011). Dort besitzt es ähnlich wie SR-BI in Säugetieren eine Funktion bei der Aufnahme von Cholesterin für die Synthese von Steroidhormonen wie Ecdyson (Talamillo et al., 2013). So führte eine Reduktion der *snmp1*-Expression in der Ringdrüse zu einem geringeren Cholesterinlevel und weniger Fetttropfchen in diesem Organ, was zu einem Stillstand der Entwicklung am Ende des Larvenstadiums führte. Auch in Ovarien ist

Snmp1 an der Aufnahme von Lipiden beteiligt. Die *snmp1*-Expression wird vom Transkriptionsfaktor Ftz-f1 reguliert, der homolog zu SF-1 in Säugetieren ist und dort ebenfalls die Expression von SR-BI reguliert (Cao et al., 1999; Talamillo et al., 2013).

1.3.4 Peste

Peste (Pes) wurde bei einem RNAi Screen in *Drosophila* S2 Zellen als ein Protein identifiziert, dass spezifisch die Phagozytose von *Mycobacterium fortuitum* jedoch nicht von *L. monocytogenes* oder *E. coli* bewirkt. Die Expression von Pes in humanen embryonalen Nierenzellen (HEK293) zeigte, dass die Aufnahme von *M. fortuitum* ähnlich effizient wie die von SR-BI ist. Daher wird eine evolutionär konservierte Funktion der beiden Proteine in der Immunabwehr postuliert (Philips et al., 2005).

Während der Larvalentwicklung von *Drosophila* wird Pes sehr ubiquitär exprimiert. So zeigten *in situ* Hybridisierungen, dass *pes* Transkript neben steroidogenen Organen, wie Ringdrüse und Gonaden auch im Darm, Fettkörper und ZNS detektiert werden konnte (Herboso et al., 2011). Des Weiteren bewirkte ein *knock down* von *pes* mittels RNAi in der Ringdrüse ähnlich wie *snmp1* einen Arrest der Larven im L3 Stadium und weniger Lipideinlagerungen in den Zellen. Daher wird auch für Pes eine Funktion bei der Aufnahme von Lipiden in steroidogene Organe angenommen (Talamillo et al., 2013).

1.3.5 NinaD und Santa Maria

NinaD (Neither inactivation nor afterpotential-D) und Santa Maria (Scavenger receptor acting in neural tissue and majority of rhodopsin is absent) sind Scavenger Rezeptoren, die jeweils als Carotinoid-Transporter identifiziert wurden. Carotinoide werden aus der Nahrung aufgenommen und dienen als Vorläufer für die Synthese von Vitamin A, das nach Umwandlung in das Sehpigment Rhodopsin eingelagert wird. So führte eine Mutation im *ninaD* Gen, das vorwiegend im Darm exprimiert wird, zu einer verminderten Aufnahme von Carotinoiden und Blindheit von *Drosophila* (Kiefer et al., 2002).

Eine Mutation in *santa maria* resultierte ebenfalls in reduzierten Rhodopsinkonzentrationen. Es wird spezifisch in Neuronen und Gliazellen des Gehirns exprimiert und bewirkt hier die Aufnahme von β -Carotin, das anschließend in Vitamin A umgewandelt und in die Retina transportiert wird (Wang et al., 2007). So haben NinaD und Santa Maria eine ähnliche Funktion, arbeiten allerdings in unterschiedlichen Geweben.

1.4 Das Tracheensystem von *Drosophila melanogaster*

Das Tracheensystem ist das Atmungsorgan von *Drosophila melanogaster*. Es stellt ein verzweigtes Röhrensystem dar, das aus einem einschichtigen Epithel besteht und durch spezialisierte Öffnungen, sogenannte Spirakel mit Luft gefüllt wird (Abb. 1.6 A, Manning and Krasnow, 1993).

1.4.1 Morphogenese und Aufbau des Tracheensystems

Die Morphogenese des Tracheensystems beginnt vier Stunden nach der Eiablage mit der Invagination von lateralen Epithelzellen. Hierbei entstehen auf jeder Seite 10 Epitheltaschen (Plakoden), jeweils bestehend aus ca. 80 Zellen, die durch Knospung tubuläre Tracheenäste ausbilden, die schließlich miteinander fusionieren und ein verzweigtes Netzwerk bilden (Abb. 1.6 A, Affolter & Shilo 2000; Ghabrial et al. 2003).

Beginnend in st 14 der Embryogenese sekretieren die Epithelzellen eine transiente aus Chitin (N-Acetyl-D-glucosamin) bestehende Matrix in das mit Flüssigkeit gefüllte tracheale Lumen. Dieses sogenannte Chitinkabel stabilisiert und koordiniert das Wachstum des tubulären Netzwerkes (Tonning et al., 2005).

Kurz vor dem Schlüpfen der Larve in st 17 der Embryogenese findet die Gasfüllung des Tracheensystems statt. Damit das Tracheensystem mit Luft gefüllt werden kann, müssen zuvor feste (Chitin, Proteine) und flüssige Bestandteile aus dem Lumen entfernt werden. Dies erfolgt in einer koordinierten Abfolge und wird maßgeblich durch Endozytose gesteuert (Behr et al., 2007; Tsarouhas et al., 2007). Dabei entsteht in einem der dorsalen Tracheenäste durch einen noch unbekanntem Prozess eine Gasblase, die sich innerhalb von ca. 10 min im gesamten Tracheensystem ausbreitet (Tsarouhas et al., 2007).

1.4.2 Die apikale extrazelluläre Matrix des Tracheensystems

Neben dem Chitinkabel sekretieren die trachealen Epithelzellen während der Embryonalentwicklung (st 15-17) eine weitere extrazelluläre Matrix, die so genannte Kutikula. Diese kleidet das Tracheensystem von innen aus (Abb. 1.6 B) und bildet ein Kontinuum mit der äußeren Kutikula, die von der Epidermis produziert wird. Sie fungiert als stabilisierendes Exoskelett und schützt den Organismus vor Dehydration und dem Eindringen von Mikroorganismen (Manning and Krasnow, 1993). Diese apikale extrazelluläre Matrix besteht aus drei Schichten: Die unterste Schicht ist die aus

Chitinfilamenten aufgebaute Prokutikula, die der apikalen Plasmamembran der Epithelzellen aufliegt. Darüber befindet sich die proteinreiche Epikutikula. Diese ist wiederum von einer wasserdichten Wachsschicht (*Envelope*) umhüllt, die mit dem Lumen in Kontakt steht (Locke, 2001; Moussian et al., 2006).

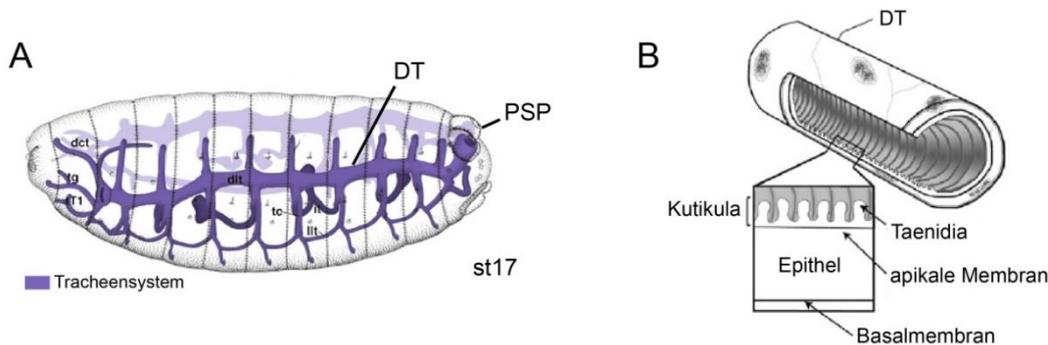


Abb. 1.6 Das Tracheensystem von *Drosophila melanogaster*. (A) Schematische Darstellung des Tracheensystems innerhalb eines st 17 Embryos. (B) Schematische Darstellung eines dorsalen Tracheenastes (DT). Die von Epithelzellen apikal sekretierte Kutikula kleidet das Lumen aus und besitzt ringförmige Verdickungen, so genannte Taenidia. PSP, posteriore Spirakel. (verändert nach Campos-Ortęga & Hartenstein 1985; Glasheen et al. 2010)

Im Gegensatz zum transienten Chitinkabel bleibt die apikale Kutikula dauerhaft. Sie muss jedoch während des larvalen Wachstums vergrößert werden. Ringförmige Verdickungen, die auch als taenidiale Faltungen bezeichnet werden, erlauben zwar eine Flexibilität und ein gewisses Längenwachstum der Kutikula, jedoch kein Breitenwachstum (Glasheen et al., 2010). So wird die Kutikula während der Larvalentwicklung im Rahmen von zwei, nacheinander stattfindenden Häutungen durch jeweils eine neue, größere Kutikula ersetzt, die unterhalb der alten Kutikula gebildet wird (Beitel and Krasnow, 2000). Bei der Häutung wird die Kutikula des Tracheensystems abgebaut und durch die Spirakel hindurch entfernt (Manning and Krasnow, 1993).

1.4.3 Die posterioren Spirakel

Die Spirakel stellen die Öffnungen des Tracheensystems dar. Dabei sind sie intern mit dem Tracheensystem und extern mit der Epidermis verbunden (Hu and Castelli-Gair, 1999). Man unterscheidet zwischen anterioren und posterioren Spirakeln, die jeweils paarweise vorliegen sowie den lateralen Spirakeln. In der frühen Larvalentwicklung erfolgt der Gasaustausch jedoch nur über die posterioren Spirakel (Manning and Krasnow,

1993). Die posterioren Spirakel stehen am hinteren Ende der Larven hervor und werden wenn die Larve frisst aus der Futterquelle hinaus gestreckt um die Sauerstoffzufuhr zu gewährleisten (Hu and Castelli-Gair, 1999). Diese Protrusionen werden als Stigmatophore bezeichnet und besitzen an ihren Öffnungen (Stigma) jeweils 4 sensorische Haare, die als Mechanorezeptoren fungieren (Abb. 1.6 C, Hu & Castelli-Gair 1999). Im Innern besitzen die posterioren Spirakel jeweils eine Spirakelkammer, die über so genannte *spiracular branches* mit den beiden dorsalen Ästen des Tracheensystems verbunden sind (Abb. 1.6 C, Abb. 4.6 E).

Die Morphogenese der posterioren Spirakel erfolgt im 8. Abdominal Segment (A8) und basiert auf einer anderen genetischen Kaskade und Zellpopulation als die des Tracheensystems. Sie wird durch das HOX-Gen Abdominal-B initiiert. Hierbei entstehen durch die Einwanderung von jeweils ca. 90 Epithelzellen die Spirakelkammern, die ein kontinuierliches Lumen mit den Tracheenästen bilden. Durch die Invagination erhalten die Zellen der Kammer eine charakteristische längliche, flaschenförmige Form (Hu and Castelli-Gair, 1999).

Die posterioren Spirakel besitzen als Öffnungen eine wichtige Barrierefunktion, die das Tracheensystem der semiaquatischen Larven vor dem Eintritt von Schmutz, Pathogenen und Flüssigkeiten schützt. Dies wird unter anderem durch spezielle kutikuläre Strukturen gewährleistet. Hierzu gehört der so genannte Filzkörper. Hierbei handelt es sich um eine ineinander verzahnte Kutikula, die von den Zellen der Spirakelkammer sekretiert wird und eine Filterfunktion besitzt (Hu and Castelli-Gair, 1999). Auch an den Stigma der Spirakel befindet eine spezielle Kutikula, die als Spirakelplatte bezeichnet wird (Keilin, 1944).

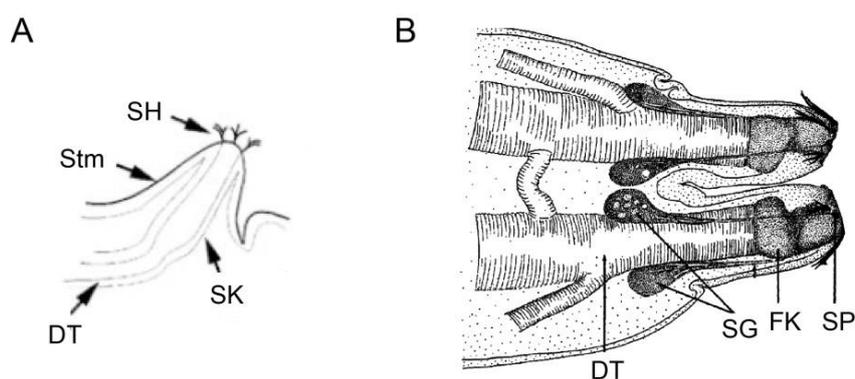


Abb. 1.7 Die posterioren Spirakel von *Drosophila melanogaster*. (A) Schematische Zeichnung eines posterioren Spirakels (laterale Ansicht). Die Spirakel stehen am posterioren Ende der Larve hervor. Die Protrusion wird als Stigmatophor (Stm.) bezeichnet und besitzt an ihrer Öffnung sensorische Haare (SH). Im Innern befindet sich die Spirakelkammer (SK), die mit dem dorsalen Tracheenast (DT) verbunden ist. (B) Zeichnung des posterioren Endes einer Larve im 3. Larvenstadium (dorsale Ansicht). Dargestellt sind der Filzkörper (FK) und die Lipidrüsen (*spiracular glands*, SG), die über Gänge mit der Spirakelplatte (SP) verbunden sind. (verändert nach Hu and Castelli-Gair, 1999; Rizki, 1956)

Des Weiteren beruht die Barriere auf einem hydrophoben Lipidfilm der Spirakelöffnungen, der durch spezielle Drüsenzellen (*spiracular glands*) sekretiert wird (Parvy et al., 2012; Rizki, 1956). Hierzu besitzt jede der zwei Spirakel drei Drüsenzellen, die über Gänge mit den Spirakelplatten verbunden sind (Abb. 4.15 C). Die Gänge sind verzweigt und ebenfalls mit einer Kutikula ausgekleidet. Innerhalb der Zellen befindet sich eine große Anzahl an Lipidtröpfchen die vorwiegend aus Triglyzeriden bestehen (Jarial and Engstrom, 1995; Rizki, 1956). Basierend auf einer neueren Studie wird postuliert, dass die Lipiddrüsen durch ein Signal kontrolliert werden, das von den Oenocyten ausgesendet wird (Parvy et al., 2012).

1.5 Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Klasse B Scavenger Rezeptor CG1887, hier als Leaky spiracles (Lsr) bezeichnet im Modellorganismus *Drosophila melanogaster* untersucht werden. Dabei sollte zunächst die zeit- und gewebespezifische Expression von Lsr auf Transkript- und Proteinebene Informationen zur Genfunktion liefern. Hierzu sollten Real Time-PCRs und *in situ*-Hybridisierungen in verschiedenen Stadien der Entwicklung durchgeführt werden. Um die Expression auch auf Proteinebene untersuchen zu können wurde ein Lsr-spezifischer Antikörper generiert.

Des Weiteren sollte eine *lsr* Nullmutante mittels homologer Rekombination erzeugt werden. Durch eine anschließende phänotypische Analyse der Mutanten sollten Rückschlüsse auf die Funktion des Gens gezogen werden. Genetische Rettungsexperimente mit Hilfe des Gal4-UAS-Systems sollten schließlich weiteren Aufschluss auf die gewebespezifische Funktion von Lsr ergeben.

Ein weiteres Ziel stellte darüber hinaus die Analyse von Lsr auf Zellebene dar. So war die Untersuchung der subzellulären Lsr Verteilung im Rahmen einer Kolokalisationsstudie ebenfalls Gegenstand dieser Arbeit. Auch zellspezifische Überexpressions- und *knock down*-Experimente mittels genetischer Mosaikanalyse sollten zu diesem Zwecke durchgeführt werden.

2 Material

2.1 Allgemeine Materialien

2.1.1 Chemikalien

Sofern nicht anders angegeben, wurde alle Chemikalien von den Firmen Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (Steinheim), Roche (Mannheim), Merck (Darmstadt), Invitrogen (Carlsbad, USA), Bio-Rad (Hercules, USA), Promega (Madison, USA), Qiagen (Hilden), Stratagene (La Jolla, USA), Fermentas (Heidelberg) und Macherey-Nagel (Düren) und bezogen.

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Allgemeiner Laborbedarf	Faust (Meckenheim), Schütt (Göttingen)
Plastikwaren	Roth (Karlsruhe), Greiner (Solingen)
Reaktionsgefäße	Eppendorf (Hamburg)
Röntgenfilme	Fuji X-Ray Film Super RX (Düsseldorf)

2.1.3 Geräte

Gerät	Modell/Hersteller
Autoklav	Varioklav Dampfsterilisator EP-2, HP Varioklav Dampfsterilisator Typ25 T, HP
Agarosegel-Kammern	PeqLab
Bakterienbrutschrank	Model 400, Memmert
Binokular	S2X 12, Olympus SZ 40, Olympus Stemi 2000, Zeiss

Material

	SteREO Discovery, Zeiss
Blotapparatur	Bio-Rad
Drehrad	Test-Tube Rotator, Snijders
Elektropipette	Accu-Jet, Brand
Entwicklermaschine	Curix 60, Agfa
Fotometer	NanoDrop 2000, PeqLab
Gel-Dokumentation	Alpha Digi Doc, Biozym
Homogenisatoren	Precellys 24, Peqlab Ultra-Turrax T25 basic, IKA
Mikroinjektionsgerät	FemtoJet und TransferMan NK2, Eppendorf
Magnetrührer	RH-KT/C, IKA
Mikroskope	AX 70, Olympus LSM-710, Zeiss
Mikrowelle	NN-E235M, Panasonic
PCR-Cycler	C1000 Thermal Cycler, Bio-Rad S1000 Thermal Cycler, Bio-Rad
pH-Messgerät	FiveEasy FE20, Mettler Toledo
Pipetten	Eppendorf Research
Real Time-PCR-Cycler	I Cycler mit optischer Einheit IQ5, Bio-Rad CFX Connect, Bio-Rad
Rotoren	AV-720 x P: JA-10, Beckman Coulter
Spannungsgeräte	Agarosegelelektrophorese: Power Pac Basic, Bio-Rad Polyacrylamidgelelektrophorese: Power Pac 3000, Bio-Rad
Thermomixer	Thermomixer comfort, Eppendorf
Thermoschüttler	Unitron HT Schüttler, Infors AG
Vakuumtrockner	Speed-Vac SPD 111, Savant

Ultraschall-Homogenisator	Sonoplus HD2070, Bandelin
Waagen	BL 1500 S, Sartorius B211 D, Sartorius EW 4200-2NM, Kern & Sohn
Wasserbad	WNB, Memmert
Wippe	Duomax 1030, Heidolph
Wirbelstrommischer	Vortex Genie 2, Scientific Industries
Zentrifugen	J-26 XP, Avanti X 15R, Allegra AV-720, Beckmann Coulter Centrifuge 5415 R, Eppendorf Centrifuge 5424 R, Eppendorf

2.1.4 Software

Adobe Illustrator CS5
 Adobe Photoshop CS5
 Alpha Digi Doc Biozym
 CellF Olympus
 Clone Manager Sci-Ed
 ImageJ
 iQ5-Optical System Software Bio-Rad
 Microsoft Office 2010
 PerlPrimer Marshall OJ
 Zen Light 09 Zeiss

2.1.5 Standards und Kits

Standard/Kit	Hersteller
Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo-Scientific (Rockford, USA)
DIGoxygenin RNA Labeling Kit	Roche (Mannheim)
DNeasy Blood and Tissue Kit	Qiagen (Hilden)

Pierce ECL Western Blotting Substrate	Thermo-Scientific (Rockford, USA)
Gene Ruler DNA Ladder Mix	Fermentas (Heidelberg)
iQ5 SYBR Green Supermix	Bio-Rad (Hercules, USA)
2-log DNA Marker	New England Biolabs (Ipswich, USA)
Nucleobond AX 100	Macherey-Nagel (Düren)
Nucleospin Extract II	Macherey-Nagel (Düren)
Nucleospin RNA II	Macherey-Nagel (Düren)
Precision Plus Protein Standard	Bio-Rad (Hercules, USA)
TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen (Carlsbad, USA)
QuantiTect Reverse Transcription Kit	Qiagen (Hilden)

2.2 Puffer und Lösungen

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle Lösungen, Puffer und Medien mit doppelt deionisiertem und autoklaviertem Wasser (*Aqua bidest*) hergestellt. Bei Lösungen, die als konzentrierte Stammlösung angesetzt wurden, ist der Konzentrationsfaktor angegeben. Bei Lösungen, die nicht bei Raumtemperatur aufbewahrt wurden, ist die Lagertemperatur angegeben.

Puffer	Zusammensetzung
Agarose	1-1,5% Agarose in TAE
Ampicillin-Stammlösung (-20 °C)	50 mg/ml in <i>A. bidest</i>
AP-Puffer	100 mM NaCl 50 mM MgCl 10 mM Tris, pH 9,5 0,1% Tween 1 mM Levamisol
Blockierungslösung (Färbungen)	5 % Eselserum in PBT
Blockierungslösung (Western Blot)	4 % Milchpulver in TBST

Blotpuffer	20 mM Tris 150 mM Glycin 20 % Methanol
Chlorix 50% (4°C)	äquivalent zu 2,5% Natriumhypochlorit-Lsg.
DNA-Ladepuffer 5x (4°C)	0,1% Bromphenolblau 0,1% Xylen Cyanol FF 30% Glycerin
DEPC-Wasser	0,1 % DEPC (min 3 h Inkubation bei 37°C)
EDTA	0,5 M EDTA, pH 8,0
SSC 20x	3 M NaCl 300 mM Na-Citrat
Filipin Stammlösung	25 mg/ml in DMSO
SYBR Safe	10 mg/ml (4 °C; lichtgeschützt)
Fixierungslösung (4 °C)	4% Formaldehyd in PBS
Hoyer's Medium	30 g Gummi Arabicum 50 ml H ₂ O 200 g Chloralhydrat 20 g Glycerin
Hybe-Puffer (-20 °C)	50 % deionisiertes Formamid 5 x SSC (pH 7,0) 0,05 mg/ml sonifizierte Lachssperma DNA 0,1 mg/ml tRNA
Hybe-B-Puffer (-20 °C)	50 % deionisiertes Formamid 5 x SSC (pH 7,0)
Karbonatpuffer (-20 °C)	120 mM Na ₂ CO ₃ 80 mM NaHCO ₃
Lysozym (-20 °C)	10 mg/ml Lysozym
Nipagin-Lsg. 10% (4-Hydroxomethylbenzoesäure)	100 g Nipagin in 1 l 70% Ethanol

Material

Oil Red O Stammlösung	0,1 % in Isopropanol
Oil Red O Färbelösung	60 % Oil Red O Stammlösung 40 % PBS gefiltert durch einen Sterilfilter (Porengröße 0,2 µm)
PBS 20x	2,6 M NaCl 140 mM Na ₂ HPO ₄ 60 mM NaH ₂ PO ₄ pH 7, autoklaviert
PBT	0,1 % Tween in PBS
Proteinase K Stammlösung (-20 °C)	20 mg/ml in DEPC Wasser/Glycerin (1:1)
Protein Probenpuffer 5x (4 °C)	500 mM Tris-HCl 50 % Glycerin 5 % SDS 10 % β-Mercaptoethanol 0,5 % Bromphenolblau
RNA-Fixer (4 °C)	10% Formaldehyd in PBS 50 mM EGTA
RIPA (4 °C)	150 mM NaCl 1 % IGEPAL CA-630 0,5 % Natrium Desoxycholat (DOC) 0,1 % SDS 50 mM Tris, pH 8,0 Protease Inhibitor Mix (Roche)
SDS-PAGE Laufpuffer	25 mM Tris 192 mM Glycin 0,1 % SDS
Stopp-Lösung (Karbonatverdau)	0,2 M NaAc 1 % Essigsäure pH 6,0
Stopp-Puffer (Proteinase K Verdau)	2 mg/ml Glycin in PBT
TAE-Puffer (pH 8,0)	40 mM Tris-Acetat

	1mM EDTA
TBS 10x	200 mM Tris-HCl pH 7,5 1,25 M NaCl
TBST	0,1 % Tween in TBS
TELT (-20 °C)	50 mM Tris-HCl pH 7,5 62,5 mM EDTA 2,5 M LiCl 0,4 % Triton X-100
Triton-NaCl (Hitzefixierung, 4 °C)	0,15 M NaCl 0,1 % Triton X 100

2.3 Enzyme

Enzym	Hersteller
Complete Protease-Inhibitoren	Roche (Mannheim)
DNase I	Roche (Mannheim)
Go-Taq Polymerase	Promega (Madison, USA)
T4-Ligase	Roche (Mannheim)
Lysozym	Roth (Karlsruhe)
Phusion Hot Start II Polymerase	Thermo-Scientific (Rockford, USA)
PNGase F	New England Biolabs (Ipswich, USA)
Proteinase K	Roth (Karlsruhe)
rAPid Alkaline Phosphatase	Roche (Mannheim)
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs (Ipswich, USA)
RNase A	Sigma Aldrich (Steinheim)
SP6 RNA Polymerase	Roche (Mannheim)
T7 RNA Polymerase	Roche (Mannheim)

2.4 Antikörper/sonstige Marker

2.4.1 Primärantikörper

Bezeichnung	Spezies	Hersteller	Konzentration
anti-Lsr	Meerschweinchen	diese Arbeit (Pineda)	1:200
anti-Cadherin	Ziege	Santa Cruz	1:50
anti-Spektrin	Maus	DSHB	1:10
anti-GFP	Maus	Santa Cruz	1:100
anti-GFP	Ziege	Santa Cruz	1:100
anti-Mega	Maus	PSL	1:10
anti-Cut	Maus	DSHB	1:10
anti-Rab7	Kaninchen	zur Verfügung gestellt von M. Behr	1:100
anti-Rab5	Kaninchen	Abcam	1:200
anti-HRP- DyLight649	Ziege	Dianova	1:500
anti-Vermiform	Kaninchen	zur Verfügung gestellt von M. Behr	1:200
anti-DIG-AP	Schaf	Roche	1:2000

2.4.2 Sekundärantikörper

Bezeichnung	Herkunft	Hersteller	Konzentration
anti-Meer- schweinchen-Cy3	Ziege	Jackson ImmunoResearch	1:200
anti-Meer- schweinchen- Alexa647	Ziege	Molecular Probes	1:100

anti-Maus-Alexa488	Ziege	Molecular Probes	1:200
anti-Kaninchen-Alexa488	Ziege	Molecular Probes	1:200
anti-Ziege-Alexa647	Esel	Molecular Probes	1:100
anti-Meerschweinchen HRP	Esel	Santa Cruz	1:15000

2.4.3 Sonstige Marker

Bezeichnung	Hersteller	Konzentration
WGA-647	Molecular Probes	1:100
Filipin complex, aus <i>Streptomyces filipinensis</i>	Sigma	0,05 mg/ml
LysoTracker Red DND-99	Life Technologies	1:4000

2.5 Oligonukleotide

2.5.1 PCR Primer

Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide (Primer) wurden von der Firma Invitrogen bezogen.

Bezeichnung	5' - 3'-Sequenz	Anwendung
LSR HomRec 5 fw	ccg cta gcc cta caa aag cga tct gaa atg	Klonierung 5' Homologiearm
LSR HomRec 5 rev	ggg gta ccc aaa gat ttg gct gcg att ag	Klonierung 5' Homologiearm
LSR HomRec 3 arm II fw	ccg gcg cgc ctt gca gat ata tat acg tac aac	Klonierung 3' Homologiearm

LSR HomRec 3 arm II rev	ggc cta ggg cac acc att caa aca gcc ag	Klonierung 3' Homologiearm
Isr_5HA_1fw	cct gaa act gag gct gtg tg	Sequenzierung 5' Homologiearm
Isr_5HA_2fw	ctg caa ctg caa tcg aaa g	Sequenzierung 5' Homologiearm
Isr_5HA_3fw	gaa tac cct tgg gaa gtt gg	Sequenzierung 5' Homologiearm
Isr_5HA_4fw	gac acg tgc att gac ctg ag	Sequenzierung 5' Homologiearm
Isr_5HA_rw	gaa ggc act tga atg gct tc	Sequenzierung 5' Homologiearm
LSR HA3II 1 fw	gca atg ttt ggc cgg aaa act c	Sequenzierung 3' Homologiearm
LSR HA3II 2fw	gaa gtt gct gac ctt gat gat g	Sequenzierung 3' Homologiearm
LSR HA3II rev	cac att gta atc att gac cag	Sequenzierung 3' Homologiearm
IsrIntron1fw2	ccc gat gcg ttg tat ctt aat tg	Verifikation Homologe Rekombination
3homRekKOattP	aga gaa ctc aaa ggt tac cc	Verifikation Homologe Rekombination
whitefw2	att ctc atc gtg agc ttc cg	Verifikation Homologe Rekombination
Tmhsrev2	gcc ata atc ggt tgc ata gat g	Verifikation Homologe Rekombination
CG1887ATGNotfw	ccg cgg ccg ctg atg ggc ttg gaa aaa cat tac ctg cga	Klonierung UAS-Isr Konstrukt
CG1887stopXbarv	ggt cta gac tac gac tcc tga ctg att ccg cca c	Klonierung UAS-Isr Konstrukt
CG1887E3f	gct gtg gaa tga tac act gag	Sequenzierung UAS-Isr

		Konstrukt
CG1887E5f	gct ggg ata tct cct gtc caa g	Sequenzierung UAS-Isr Konstrukt
CG1887E8f	gac atg gac cca tgg cca cct	Sequenzierung UAS-Isr Konstrukt
CG1887 E2rv	tga tgg ctg tgc atg tgt ttg	Sequenzierung UAS-Isr Konstrukt

2.5.2 Real Time-PCR Primer

Bezeichnung	Gen	5' - 3'-Sequenz
act5c fw	<i>actin</i>	gtg cac cgc aag tgc ttc taa
act5c rv	<i>actin</i>	tgc tgc act cca aac ttc cac
rpL32RTfw	<i>rpL23 (rp49)</i>	gct aag ctg tgc cac aaa tg
rpL32RTrv	<i>rpL23 (rp49)</i>	gtt cga tcc gta acc gat gt
CG1887RT3fw	<i>lsr</i>	cca gtg cgt gat ttt cga gac
CG1887RT3rv	<i>lsr</i>	gcc caa ata aat cca gcg c
CG1887RT5fw	<i>lsr</i>	ttc aag ccc ttc atc aac gtc
CG1887RT5rv	<i>lsr</i>	tgc ttc gga taa aac ctg tgg
Scylla RT1 fw	<i>scylla</i>	aaa taa tcc gcg tgt cgg ag
Scylla RT1 rev	<i>scylla</i>	caa tgc gac gcg aat tct t
Hairy RT fw	<i>hairy</i>	tgc gag ttg gat gag ttg tgg
Hairy Rt rev	<i>hairy</i>	act gtg tga acg agg tta gcc g
Bnl RT fw	<i>branchless</i>	cat caa gtt gca gag tgt gg
Bnl RT rev	<i>branchless</i>	ccc atg ttc tgc ttg aag ac
Tmhs RT1 fw	<i>tmhs</i>	gca gcc aga tcc gat ata cc
Tmhs RT1 rev	<i>tmhs</i>	cag tta tgc gtg ggt tgg a
dGCase RT1 fw	<i>CG31414</i>	cga tga gaa ctt caa ggc ag

dGCase RT1 rev	<i>CG31414</i>	atg cga tat gtc tta atg ctg g
Chrb RT1 fw	<i>charybdis</i>	tgt act tga cat tga ggc agg
Chrb RT1 rev	<i>charybdis</i>	gac tga tgt tga tgg tat tgc t
dAtg8a RT1 fw	<i>atg8a</i>	cgt cat tcc acc aac atc gg
dAtg8a RT1 rev	<i>atg8a</i>	gcc atg ccg taa aca ttc tc
dAtg7 RT1 fw	<i>atg7</i>	ttg gag ctg gta ctt tag ga
dAtg7 RT1 rev	<i>atg7</i>	ctg gat tag aga acc caa cct
dAtg18 fw	<i>atg18</i>	gcc att gga atg tga aat gct
dAtg18 rev	<i>atg18</i>	ggc aac tca aat atc aaa gcg a
dLamp1 RT1 fw	<i>lamp-1</i>	caa cca tat ccg caa cca tcc
dLamp1 RT1 rev	<i>lamp-1</i>	gta aag ttt ccc tcc cta gcc

2.6 Vektoren

Bezeichnung	Herkunft/Referenz
pUAST	Brand & Perrimon 1993
pGX attP	Huang et al. 2009
pCR II TOPO	Invitrogen

2.7 Bakterienstämme

Bezeichnung	Genotyp	Herkunft
DH5 α	F- <i>endA1 deoR</i> (ϕ 80/ <i>lacZ</i> Δ M15) <i>recA1 gyrA</i> (Nal ^r) <i>thi-1 hsdR17</i> (r _K ⁻ , m _K ⁺) <i>supE44 relA1</i> Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169	Statagene
One Shot Top10	F- <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ 80/ <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74 recA1 araD139</i>	Invitrogen

	$\Delta(araleu)7697$ <i>gaU gaK rpsL</i> (StrR) <i>endA1 nupG</i>	
--	---	--

2.8 Fliegenlinien

2.8.1 Gal4-Fliegenlinien

Bezeichnung	Herkunft
actin-Gal4	Bloomington #4414
bab1-Gal4	Bloomington #6803
BO-Gal4	Bloomington #6486
btl-Gal4	Bloomington #41803
cg-Gal4	Bloomington #7011
cg-Gal4; UAS-Dcr2	diese Arbeit
daughterless-Gal4	Bloomington #55849
dpp8B6A-Gal4	Bloomington #7006
elav-Gal4	Bloomington #8760
ems-Gal4	zur Verfügung gestellt von Corinne Maurel-Zaffran (Merabet et al., 2002)
Feb36-Gal4	Bloomington #29968
GMR-Gal4	Bloomington #8605
grh-Gal4	zur Verfügung gestellt von Andrea Brand (Chell and Brand, 2010)
lsp2-Gal4	Bloomington #6357
MJ12a-Gal4	Bloomington #6991
MJ12a-Gal4; UAS-Dcr2	diese Arbeit

rst-Gal4	Bloomington # 23302
69B-Gal4	Bloomington #1774

2.8.2 RNAi-Fliegenlinien

Bezeichnung	Herkunft
ACC RNAi	VDRC #8105
Atet RNAi	VDRC #10404, #42751, #42750
bmm RNAi	VDRC #37880
crumbs RNAi	VDRC #39177
crq RNAi	VDRC #33155 #45883
CG31414 RNAi	VDRC #21336, #101212
CG7227 RNAi	VDRC #108059 #28612
CG6660 RNAi	VDRC #6835 #101046
CG10345 GD RNAi	VDRC #51537, #100252
DHR3 RNAi	VDRC #12044, #106837, #20157
Draper RNAi	VDRC #4833, #27086
emp RNAi	VDRC #12232 #12233
KAR RNAi	VDRC #110678 #40949
kkv RNAi	VDRC #42611,

	#100327
LAMP-1 RNAi	Bloomington # 38835 NIG# 3402R-1
Isr RNAi	VDRC #4100, #100219
megalyn RNAi	VDRC #29324
mmp1 RNAi	VDRC #101505
mummy RNAi	VDRC #105829
NijA RNAi	VDRC #5208, #103439
NPC2a RNAi	VDRC #106771
NPC2b RNAi	VDRC #101233, #16652
Peste RNAi	VDRC #33155 #100391
psidin RNAi	VDRC #103558, # 21960
Rab7 RNAi	Bloomington # 27051
Snmp1 RNAi	VDRC #104210, NIG #7000R-2
Snmp2 RNAi	VDRC #27997, #101136
Thiolase RNAi	VDRC # 16099 # 107027
uif RNAi	VDRC #1047
WASp RNAi	Bloomington #25955
wurst RNAi	VDRC #110270

2.8.3 Mutante Fliegenlinien

Bezeichnung	Genotyp	Herkunft
w ⁻ oder wt (als wildtypische Kontrolle verwendet)	w[1118]; +; +	Bloomington #6326
Isr ^{f07156} /TM3 GFP	w[1118]; +; PBac{WH} CG1887 ^{f07156} /TM6B, Tb	Bloomington #19052
Isr ^{ko} /TM3 GFP	w[1118];;Isr ^{ko} /TM3 St Ser twist-Gal4 UAS-GFP	diese Arbeit
Isr ^{ko} w ⁻ /TM3 GFP	w[1118];;Isr ^{ko} w ⁻ /TM3 St Ser twist-Gal4 UAS-GFP	diese Arbeit
Isr ^{ko} UAS-Isr ¹¹ /TM3 GFP	w[1118];; Isr ^{ko} w ⁻ UAS-Isr ¹¹ /TM3 St Ser twist-Gal4 UAS-GFP	diese Arbeit
MJ12a-Gal4; Isr ^{ko} /TM3 GFP	w[1118]; MJ12a-Gal4; Isr ^{ko} w ⁻ /TM3 St Ser twist-Gal4 UAS-GFP	diese Arbeit
Isr ^{ko} btl-Gal4/TM3 GFP	w[1118]; +; Isr ^{ko} w ⁻ btl-Gal4/TM3 St Ser twist-Gal4 UAS-GFP	diese Arbeit
Isr ^{ko} 69B-Gal4/TM3 GFP	w[1118]; +; Isr ^{ko} w ⁻ 69B-Gal4/TM3 St Ser twist-Gal4 UAS-GFP	diese Arbeit
Isr ^{ko} lsp2-Gal4/TM3 GFP	w[1118]; +; Isr ^{ko} w ⁻ lsp2-Gal4/TM3 St Ser twist-Gal4 UAS-GFP	diese Arbeit
Isr ^{ko} bab1-Gal4/TM3 GFP	w[1118]; +; Isr ^{ko} w ⁻ bab1P-Gal4/TM3 St Ser twist-Gal4 UAS-GFP	diese Arbeit
Isr ^{ko} 8B6A-Gal4/TM3 GFP	w[1118]; +; Isr ^{ko} w ⁻ dpp8B6A-Gal4/TM3 St Ser twist-Gal4 UAS-GFP	diese Arbeit
cg-Gal4; Isr ^{ko} /TM3 GFP	w[1118]; cg-Gal4; Isr ^{ko} w ⁻ /TM3 St Ser twist-Gal4 UAS-GFP	diese Arbeit

2.8.4 Sonstige Fliegenlinien

Bezeichnung	Genotyp	Herkunft
Act CD2 GFP	hsFlp;act>CD2>Gal4;UAS-GFP	AG Hoch Stammsammlung
Act CD2 RFP	hsFlp;act>CD2>Gal4;UAS-RFP	AG Hoch Stammsammlung
Screening-Linie	yw/Y; Pin/CyO; Gal4 ^{221w-} /Gal4 ^{221w-}	Bloomington #26259
Targeting-Linie	yw/Y, hs-hid; hs-Flp, hs-I-Scel/CyO, hs-hid; +/+	Bloomington #25680
UAS-Dcr2	w[1118]; P{w[+mC]=UAS-Dcr-2.D}10	Bloomington #24651
UAS-GFP.SKL X-Chr.	w[*], P{w[+mC]=UAS-GFP.SKL}	Bloomington #28880
UAS-Grasp65 GFP	w[*]; P{w[+mC]=UAS-Grasp65-GFP}2	Bloomington #8507
UAS-GFP.KDEL	w[*]; P{w[+mC]=UAS-GFP.KDEL}11.1	Bloomington #9898
UAS-LAMP-1 GFP	w[1118]; UAS-LAMP-1 GFP/CyO; MKRS/TM6B	zur Verfügung gestellt von M. Richard
UAS-Isr ¹¹	w[1118]; If/CyO; UAS-Isr ¹¹	diese Arbeit
UAS-Isr ²⁵	w[1118]; If/CyO; UAS-Isr ²⁵	diese Arbeit
shi ^{DN}	y[1] w[*] P{w[+mC]=UAS-shi.K44A}4-1; P{w[+mC]=UAS-shi.K44A}3-7	Bloomington #5811
Cre	y[1] w[67c23] P{y[+mDint2]=Crey}1b; D[*]/TM3, Sb[1]	Bloomington #851
UAS-mCD8GFP	y[1] w[*]; Pin[Yt]/CyO; P{w[+mC]=UAS- mCD8::GFP.L}LL6	Bloomington #5130
UAS-mCD8RFP	y[1] w[*]; P{w[+mC]=UAS- mCD8.mRFP.LG}10b	Bloomington #27399

2.9 Nährmedien

2.9.1 LB-Medium

Für 1 l LB-Medium wurden 10 g NaCl, 10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt in 1 l *A. bidest* gelöst und der pH-Wert auf 7,0 eingestellt. Anschließend wurde das Medium autoklaviert.

Bei Bedarf wurde 50 µg/ml Ampicillin zugegeben.

2.9.2 LB-Ampicillin-Agar

Für LB-Ampicillin-Agar wurde 1 l LB-Medium mit 20 g Agar vermischt und autoklaviert. Anschließend wurde 50 µg/ml Ampicillin zugegeben und die Platten gegossen.

2.9.3 Fliegenfutter

Das Fliegenfutter besteht aus 80 g Fadenagar, 165 g Trockenhefe, 815 g Maismehl, 1 l Zuckerrübensirup und 200 ml 10 % iger NIPAGIN-Lösung in 11 l H₂O.

Zur Herstellung des Fliegenfutters wurde der Fadenagar bis zur vollständigen Auflösung im Dampfkochtopf mit 8 l VE-Wasser gekocht. Gleichzeitig wurde die Hefe und das Maismehl in 3 l VE-Wasser zu einer homogenen Mischung verrührt, die dann zusammen mit dem Zuckerrübensirup zu dem kochenden Agar hinzugegeben wurde. Nach 30 min Abkühlen des Futters auf 60 °C wurde die NIPAGIN-Lösung hinzugegeben und nach guter Durchmischung mittels einer Portionierungspumpe in die Futterröhrchen aliquotiert.

2.9.4 Apfelsaftagarplatten

Es wurden 85 g Agar in 4 l VE-Wasser aufgekocht und nach vollständiger Lösung auf 60 °C abgekühlt. Gleichzeitig wurden 100 g Zucker in 1 l Apfelsaft gelöst und auf 60 °C erhitzt. Beide Ansätze wurden vermischt und 40 ml einer 10 %igen NIPAGIN-Lösung hinzugegeben. Anschließend wurde der Apfelsaftagar in Petrischalen gegossen.

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) nach Saiki et al. (1988) wurde zur *in vitro* Amplifikation von DNA-Fragmenten angewendet. Für Klonierungs-PCRs wurde die Phusion Hot Start Polymerase verwendet, da diese eine Korrekturlesefunktion besitzt. Alle anderen PCRs erfolgten mit der Go-Taq Polymerase.

Die PCR-Ansätze und Temperaturprofile setzten sich wie folgt zusammen:

a) Phusion-PCR

Reagenz	Menge
Matrizen-DNA	50 - 200 ng
5' Oligonukleotid (10 µM)	1 µl
3' Oligonukleotid (10 µM)	1 µl
5 x HF-Puffer	10 µl
dNTP-Lösung (10 mM)	1 µl
Phusion Polymerase	0,5 µl
<i>A. bidest</i> (autoklaviert)	ad 50 µl

Phase	Temp.	Zeit
1. Initiale Denaturierung	98 °C	30 s
2. Denaturierung (zyklisch)	98°C	10 s
3. Primer Anlagerung (zyklisch)	56-62 °C	30 s
4. Elongation (zyklisch)	72 °C	30 s/kb
5. 2.-5. Phase 32 x wiederholen		

6. Terminale Elongation	72 °C	10 min
7. Kühlung	12 °C	dauerhaft

b) Go-Taq-PCR

Reagenz	Menge
Matrizen-DNA	100 - 200 ng
5' Oligonukleotid (10 µM)	0,5 µl
3' Oligonukleotid (10 µM)	0,5 µl
5 x Green Go-Taq Puffer	5 µl
dNTP-Lösung (10 mM)	0,5 µl
Go-Taq Polymerase	0,25 µl
<i>A. bidest</i> (autoklaviert)	ad 25 µl

Phase	Temp.	Zeit
1. Initiale Denaturierung	95 °C	3 min
2. Denaturierung (zyklisch)	95 °C	30 s
3. Primer Anlagerung (zyklisch)	52-58 °C	30 s
4. Elongation (zyklisch)	72 °C	1 min/kb
5. 2.-5. Phase 35 x wiederholen		
6. Terminale Elongation	72 °C	10 min
7. Kühlung	12 °C	dauerhaft

Zur Erhöhung der PCR-Stringenz wurden Anlagerungstemperatur bzw. -zeit der Oligonukleotide oder die Anzahl der Zyklen verändert.

3.1.2 Agarosegelelektrophorese

DNA-Fragmente wurden mit Hilfe einer Agarosegelelektrophorese ihrer Länge nach aufgetrennt. Dabei variierte die Prozentigkeit der Agarosegele in Abhängigkeit der Größe

der aufzutrennenden DNA-Fragmente (meist 0,8-1,2 %). Der gewünschte Massenanteil Agarose wurde in 1 x TAE-Puffer gegeben und unter Kochen in der Mikrowelle aufgelöst. Nach Abkühlen der Agarose auf 60 °C wurde zur Visualisierung der DNA der interkalierende Farbstoff SYBR Safe (Life Technologies) in einer Endkonzentration von 1 µl/ml hinzugegeben. Die flüssige Agarose wurde anschließend in einen Gelwanne überführt in welche ein Kamm gesteckt wurde, der während des Auspolymerisierens der Agarose Taschen hinterlässt. In diese Taschen wurde nach Aushärtung des Gels die aufzutrennende, mit DNA-Ladepuffer versetzte DNA pipettiert. Die Auftrennung erfolgte in einer mit TAE-Puffer gefüllten Gelkammer durch Anlegen einer Spannung von 80-150 V. Die DNA wurde auf einem UV-Transilluminator bei 366 nm visualisiert. Zur Dokumentation wurde das Gel mit Hilfe eines digitalen Fotoapparates fotografiert.

3.1.3 Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Extraktion von DNA-Fragmenten aus dem Agarosegel, wurden die entsprechenden Banden unter schwachem UV Licht einer Handlampe mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die Reinigung der DNA erfolgte anschließend unter Verwendung des Nucleospin Extract II Kits nach Angaben des Herstellers (Macherey Nagel).

3.1.4 Restriktion von DNA

Die Linearisierung von DNA erfolgte mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen und entsprechenden Puffersystemen der Firma NEB.

Zur Kontrolle einer Klonierung oder eines Vektors wurde ein analytischer Restriktionsverdau durchgeführt. Hierfür wurden ca. 200 ng DNA mit 1 U des jeweiligen Enzyms und dem geeigneten Puffer in einem 10 µl Ansatz (Endvolumen wurde mit Hilfe von sterilem *A. bidest* eingestellt) für 1-2 Stunden bei 37°C in einem Brutschrank inkubiert. Der Ansatz wurde anschließend mit Ladepuffer versetzt und mittels Agarosegelelektrophorese analysiert.

Zur Extraktion von PCR-Produkten oder klonierten DNA-Fragmenten wurden 1 µg PCR-Fragment bzw. 10 µg Plasmid-DNA mit 5 U Restriktionsenzym und dem geeigneten Puffer bei 37 °C über Nacht verdaut. Die DNA wurde nach erfolgter Gelelektrophorese wie unter 3.1.3 beschrieben aus dem Gel eluiert.

3.1.5 Ligation

Die Ligation von geschnittenen DNA-Fragmenten aus Plasmiden oder PCR-Produkten geschah über kohäsive Enden, die über einen Restriktionsverdau mit den gleichen Enzymen erzeugt wurden. Vor Ligation wurden die geschnittenen Vektoren zunächst mit Hilfe der rAPid Alkaline Phosphatase dephosphoryliert. Hierzu wurde 1 µg Vektor-DNA mit 1 U Enzym und dem geeigneten Puffer versetzt. Die Dephosphorylierung erfolgte für 30 min bei 37°C. Zur Inaktivierung des Enzyms erfolgte anschließend für 2 min eine Inkubation bei 37 °C.

Für die Ligation wurde die T4-Ligase verwendet. Dabei enthielt ein Ligationsansatz etwa 200 ng Vektor-DNA; einen 3-fachen molaren Überschuss der Insert-DNA, sowie 1 U Ligase und den geeigneten Puffer. Die Ligationsreaktion erfolgte über Nacht bei 16 °C.

3.1.6 Herstellung und Transformation chemokompetenter Bakterien

Zur Herstellung von chemokompetenten DH5α Bakterien wurden 2 ml Bakterien mit 50 ml LB Medium versetzt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Bakterien wurden bis zu einer optischen Dichte von 0,5 bei einer Wellenlänge von 550 nm inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien durch Zentrifugation (15 min/1000 UpM/4°C) pelletiert, in 17 ml eiskalter RF-1 Lösung resuspendiert und für 15 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Bakterien in 4,5 ml RF-2 Lösung resuspendiert und nochmals für 15 min auf Eis inkubiert. Die Bakterien wurden in 100 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

Für die Transformation wurden 100 µl kompetente Bakterien mit 10 µl Ligationsansatz oder 100 ng DNA gemischt und auf Eis für 30 min inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien einem Hitzeschock bei 42 °C im Wasserbad ausgesetzt. Nach einer 5 minütigen Inkubation auf Eis wurden 250 µl LB-Medium zugegeben. Die Bakterien wurden dann für 1 h bei 37 °C im Schüttler inkubiert und anschließend auf entsprechenden Antibiotika-haltigen Agarplatten ausplattiert.

3.1.7 TOPO-Klonierung

Für die Zwischenklonierung von PCR-Produkten wurde das TOPO TA Cloning Kit von Invitrogen verwendet. Hierbei wird ein durch die Taq Polymerase amplifiziertes PCR-Produkt direkt in einen Vektor inseriert. Da die Taq Polymerase eine terminale

Transferase-Aktivität besitzt, hängt sie an das PCR-Produkt ein einzelnes dATP an. Gleichzeitig trägt der linearisierte pCRII-TOPO Vektor ein einzelnes überhängendes dTTP. Durch die an den linearisierten Vektor gebundene Topoisomerase I wird das PCR-Produkt effizient mit dem Plasmidvektor ligiert. Die TOPO-Klonierung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

3.1.8 DNA-Minipräparation

Die Isolierung kleinerer Mengen Plasmid-DNA wurde mit Hilfe der TELT-Methode durchgeführt. Hierzu wurde 3 ml Antibiotika-haltiges LB-Medium mit einer *E. coli* Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C in einem Schüttler inkubiert. Anschließend erfolgte eine 1-minütige Zentrifugation bei 16.000 UpM. Der Überstand wurde verworfen und das Bakterienpellet in 200 µl TELT und 20 µl Lysozym durch Vortexen resuspendiert. Zum Bakterienaufschluss wurde die Suspension 5 min bei RT inkubiert und anschließend 5 min bei 97 °C gekocht. Nach 5-10 minütiger Abkühlung auf Eis erfolgte eine Zentrifugation für 20 min bei 13.200 UpM und 4 °C. Hierbei wurden die präzipitierte genomischen DNA sowie die Proteine pelletiert. Anschließend wurde der Überstand mit der Plasmid-DNA abgenommen und mit 100 µl Isopropanol vermischt. Die gefällte Plasmid-DNA wurde für 5 min bei 13.000 UpM und 4 °C pelletiert, der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde dann mit 500 µl 70 % igem Ethanol gewaschen und erneut bei 13.000 UpM und 4 °C für 5 min zentrifugiert. Nach Abnahme des Ethanols wurde das Plasmid-DNA Pellet getrocknet und in 50 µl autoklaviertem *A. bidest* gelöst.

3.1.9 DNA-Midipräparation

Für die Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien im mittleren Maßstab wurde das Nucleobond AX100 Kit der Firma Macherey-Nagel verwendet. Hierfür wurden 100 ml Antibiotikum-haltiges LB-Medium mit einer Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C im Schüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Bakterien der Kultur durch Zentrifugation bei 4.500 UpM pelletiert. Der Überstand wurde abgenommen und die DNA-Isolierung nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die isolierte DNA wurde in 100 µl autoklaviertem *A. bidest* aufgenommen und bei -20 °C gelagert.

3.1.10 Genomische DNA-Präparation aus adulten Fliegen

Die Isolierung von genomischer (g)DNA aus adulten Fliegen erfolgte mit Hilfe des DNeasy Blood and Tissue Kits von Qiagen. Als Ausgangsmaterial dienten 15-20 adulte Fliegen. Die Präparation der gDNA erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die isolierte gDNA wurde in 150 µl autoklaviertem *A. bidest* aufgenommen und bei 4 °C gelagert.

3.1.11 RNA-Präparation

Um RNA aus *Drosophila* zu isolieren, wurde das Nucleospin RNA II Kit der Firma Macherey-Nagel verwendet. Hierfür wurden je nach Entwicklungsstadium ca. 50 µl Embryonen, 100 L1 Larven, 30-50 L2 Larven oder 5-10 L3 Larven/Puppen/adulte Fliegen verwendet. Embryonen und Larven wurden durch mehrmaliges Waschen mit Wasser von Futterresten befreit.

Zur Lyse wurden die jeweiligen Proben mit 600 µl RA1-Puffer versetzt und für 1 min mit dem UltraTurrax oder 3 x 15 s mit dem Precellys bei 5000 UpM homogenisiert. Anschließend wurde 6 µl β-Mercaptoethanol hinzugegeben. Alle weiteren Schritte wurden nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die gewonnene RNA wurde in 40 µl RNase-freiem H₂O aufgenommen und bei -80 °C gelagert.

3.1.12 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von DNA und RNA wurde mit Hilfe des NanoDrop 2000 photometrisch ermittelt. Hierfür wurde jeweils 1 µl der in *A. bidest* gelösten DNA bzw. RNA vermessen.

3.1.13 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von DNA wurde von der Firma Seqlab (Göttingen) durchgeführt. Die Aufbereitung der Proben erfolgte nach den Anforderungen der Firma.

3.1.14 Reverse Transkription

Zur Herstellung von copy (c)DNA aus RNA für die Durchführung von Real Time-PCR Analysen wurde das QuantiTect Reverse Transcription Kit von Qiagen verwendet.

Zur Entfernung von evtl. vorhandener gDNA wurden 500-1000 ng RNA mit 1 µl DNase-haltigem *wipeout*-Puffer versetzt, auf 14 µl mit RNase freiem H₂O aufgefüllt und für 5 Min bei 42°C inkubiert. Nach einer kurzen Inkubation auf Eis wurde der Ansatz in 2 x 7 µl aufgeteilt. Ein Ansatz (+RT) wurde mit 2 µl RT-Puffer (5 x), 0,5 µl Primer-Mix und 0,5 µl Reverser Transkriptase versetzt und diente zur Herstellung der cDNA. Der zweite Ansatz (-RT) wurde anstelle von Reverser Transkriptase mit H₂O versetzt und diente zur Kontrolle einer gDNA Kontamination. Beide Ansätze wurden 30 min bei 42°C und anschließend 5 min bei 95°C inkubiert. Danach wurden alle Ansätze mit autoklaviertem *A. bidest* auf 50 µl aufgefüllt und bei -20°C gelagert.

3.1.15 Real Time-PCR Analyse (RT-PCR)

Real Time-PCR Analysen zur Untersuchung der Genexpression wurden mit Hilfe von Real Time-PCR Cyclern (CFX Connect oder I-Cycler mit optischer Einheit IQ5) der Firma Bio-Rad durchgeführt.

Hierzu wurde die aus RNA generierte cDNA als Matrize verwendet. Als DNA interkalierender Farbstoff, wurde SYBR-Green (BioRad) eingesetzt. Die Real Time-PCR wurde im 96 *well* Format durchgeführt. Dabei wurde jede Probe als Triplikat gemessen und setzte sich wie folgt zusammen:

Reagenz	Menge
cDNA	1 µl
Primerpaar (je 5 µM)	1 µl
SYBR-Green Supermix	12,5 µl
<i>A. bidest</i> (autoklaviert)	ad 25 µl

Zur Durchführung der Real Time-PCR wurde das folgende Temperaturprogramm angewendet:

Phase	Temperatur	Zeit (s)	Zyklen
Aktivierung d. Polymerase	95 °C	300	1

Denaturierung d. DNA	95 °C	30	40
Primer Anlagerung	59 °C	30	
Elongation	72 °C	30	
Schmelzkurve	55-95 °C (+0,5 °C pro Zyklus)	30	81

Die Expressionsdaten wurden mit Hilfe der Herstellersoftware (BioRad) nach der $\Delta\Delta C_t$ Methode ausgewertet. Als Referenz wurde die Expression des Haushaltsgens rp49 oder Actin5c gemessen. Die gezeigten Ergebnisse sind jeweils relativ zur Expression des Referenzgens dargestellt. Jedes Experiment wurde unabhängig drei- bis fünfmal durchgeführt. Um eine Kontamination der Primer, bzw. des Wasser sowie des SYBR-Green Supermixes auszuschließen, wurde für jeden Primer ein Ansatz ausschließlich mit SYBR-Green und Wasser verwendet. Darüber hinaus wurden zur Kontrolle möglicher Verunreinigungen mit gDNA die -RT-Ansätze mit den Primern eines Haushaltsgens vermessen. Zum Ausschluss von Primer-Dimeren wurde zusätzlich eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt.

Die Primer für die Real Time-PCR Analysen wurden vor der Verwendung einem Effizienztest unterzogen. Der Effizienztest basiert auf einer Verdünnungsreihe der cDNA von 1:1 bis 1:625. Für die Analysen wurden lediglich Primer verwendet, die eine Effizienz von über 80 % aufwiesen.

3.1.16 Herstellung einer DIG-markierten *Isr in situ*-Sonde

Als Matrize für die Herstellung einer *Isr antisense* Sonde wurde der cDNA Klon IP12256 (Drosophila Genomics Resource Center, DGRC) verwendet. Zunächst wurden 4 µg des Vektors mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* in einem Gesamtvolumen von 40 µl linearisiert. Anschließend wurde die DNA durch Zugabe von 50 µl RNase-freiem H₂O, 10 µl 3 M NaAc und 250 µl Ethanol präzipitiert. Nach einer einstündigen Inkubation bei -20 °C wurde die Probe für 30 min bei 16.000 UpM zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das DNA-Pellet mit 80 % Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde nun getrocknet und in 24 µl RNase-freiem H₂O aufgenommen. Davon wurden 6 µl (1 µg linearisierte DNA) für die anschließende Herstellung der *antisense* Sonde eingesetzt. Hierzu wurde das DIGoxigenin RNA Labeling Kit der Firma Roche unter Verwendung der SP6 RNA Polymerase nach Angabe des Herstellers verwendet.

Die Sonde wurde anschließend einem Karbonat-Verdau unterzogen. Dazu wurde der gesamte Ansatz der Markierungsreaktion (10 µl) mit 15 µl RNase-freiem H₂O und 25 µl 2 x Karbonatpuffer versetzt. Der Verdau erfolgte für 10 min bei 70 °C und wurde durch die Zugabe von 50 µl Stopp-Lösung, 10 µl 4 M LiCl und 300 µl Ethanol beendet. Der Ansatz wurde erneut 30 min bei 16.000 UpM und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 80 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in 150 µl HYBE-Puffer resuspendiert. Die Sonde wurde bei -20 °C gelagert.

3.2 Proteinbiochemische Methoden

3.2.1 Herstellung von Proteinextrakten

Für die Herstellung von Proteinextrakt wurden 20 frühe Puppen gesammelt und mit 200 µl RIPA versetzt. Die Puppen wurden mit Hilfe eines Plastikpistills manuell homogenisiert und anschließend 3 x 30 s mit jeweils 1 min Pause dazwischen mit einem Ultraschall-Homogenisator (Cycle 30, Intensität 70%) bei 4 °C sonifiziert. Anschließend wurden die Zelltrümmer bei 10.000 UpM für 20 Minuten (4 °C) abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und bei -20 °C gelagert.

3.2.2 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Für die Bestimmung von Proteinkonzentrationen in Lysaten wurde das Pierce BCA Protein Assay Kit nach Angaben des Herstellers (Thermo-Scientific) verwendet. Als Kontrolle diente RIPA-Puffer. Die Konzentration wurde mit Hilfe des NanoDrop 2000 photometrisch ermittelt.

3.2.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteinen anhand ihres Molekulargewichtes erfolgte mit Hilfe von Natriumdodecylsulfat Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE), die dem von Laemmli (1970) entwickelten diskontinuierlichen System entsprach. Die hierfür verwendeten SDS-Gele unterschiedlicher Konzentrationen wurden mit Hilfe einer Gießapparatur der Firma BioRad hergestellt und setzten sich wie folgt zusammen (Mengenangaben gelten für 2 Gele):

Reagenz	Trenngel (10 %)	Sammelgel (5 %)
H ₂ O	7,15 ml	7,25 ml
40 % Acrylamid	3,75 ml	1,25 ml
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	3,8 ml	-
1 M Tris-HCl, pH 6,8	-	1,25 ml
10 % SDS	150 µl	100 µl
10 % APS	150 µl	100 µl
TEMED	12 µl	10 µl

Nachdem die Gele auspolymerisiert waren wurden sie in eine mit SDS-Laufpuffer gefüllte Gelelektrophoresekammer (BioRad) überführt. Anschließend wurden die Proteinproben aufgetragen. Diese wurde jedoch zuvor mit 5x Protein Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95 °C auf dem Heizblock gekocht. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 100-200 V.

3.2.4 Western-Blot

Die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden für eine spätere Immundetektion mittels Tankblot Verfahren auf eine PVDF-Membran übertragen. Dazu wurde die Membran zunächst mit Methanol aktiviert. Anschließend wurde das SDS-Gel in Blotpuffer äquilibriert und auf die Membran gelegt. Membran und Gel wurden beidseitig mit zwei in Blotpuffer getränkten Whatman-Filterpapieren umgeben und zwischen zwei Schwämmen eingebettet in eine Tankblot-Kassette gelegt. Diese wurde in einen mit Blotpuffer gefüllten Tank eingesetzt, dabei wurde das Gel zur Kathode und die Membran zur Anode orientiert. Zur Kühlung wurde ein Kühlpack zugefügt. Der Transfer erfolgte für ca. 70 min bei 100 V unter ständiger Durchmischung des Blotpuffers durch einen Magnetrührer.

Zur Überprüfung des Transfers wurde die Membran für 3 min in eine Ponceau S Lösung gelegt und anschließend so lange mit *A. bideest* abgespült, bis der Hintergrund weiß und die Proteine ausreichend rot gefärbt waren.

3.2.5 Immundetektion

Nach erfolgreichem Transfer der Proteine auf die Membran wurde diese 30 min mit 4 % Milchpulver in TBST blockiert. Anschließend wurde die Membran mit dem Primärantikörper in 4 % Milchpulver/TBST über Nacht bei 4 °C auf der Wippe inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Membran einmal 5 min und 3 x 15 min mit TBST gewaschen und erneut 20 min mit 4 % Milchpulver in TBST blockiert. Danach erfolgte die Inkubation mit dem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper in TBST für 1 h bei Raumtemperatur. Nach weiteren drei Wachsritten wurde die Membran auf eine durchsichtige Plastikfolie gelegt und mit Pierce ECL Western Blotting Substrate benetzt. Anschließend wurde die Membran mit einer zweiten Plastikfolie bedeckt und in eine Entwicklerkassette gelegt. Die Chemilumineszenz wurde durch Auflegen eines Röntgenfilms und anschließender Entwicklung in einer Entwicklermaschine detektiert.

3.2.6 Deglykosylierung mittels PNGase

Für die Deglykosylierung wurden 50 µg Proteinextrakt aus Puppen eingesetzt (siehe 3.2.2). Die Deglykosylierungsreaktion erfolgte mit Hilfe von PNGaseF und wurde nach Angaben des Herstellers (New England Biolabs) durchgeführt. Als Kontrolle wurde ein Ansatz anstelle von PNGaseF mit H₂O versetzt, ansonsten jedoch gleich behandelt. Die Ansätze wurden anschließend durch SDS-PAGE aufgetrennt. Die Deglykosylierungsreaktion wurde nach erfolgreichem Western Blot und Immundetektion ausgewertet.

3.2.7 Affinitätschromatographische Reinigung von Antiseren

Die Aufreinigung der von der Firma Pineda erhaltenen Antiseren erfolgte mit Hilfe der SulfoLink Coupling Resin (Thermo-Scientific). Hierzu wurden zunächst 2 mg des lyophilisierten Peptids (synthetisiert von Pineda) nach Angaben des Herstellers über seine Sulfhydrylgruppen an die Säule gebunden.

Die Antiseren wurden anschließend ebenfalls nach Angaben von ThermoScientific über die generierte Säule affinitätschromatographisch gereinigt. Den aufgefangenen Antikörperfraktionen wurden jeweils 15 µl entnommen. Diese Proben wurden mittels SDS-PAGE auf Reinheit und Antikörpergehalt untersucht. Die geeigneten Antikörperfraktionen wurden anschließend aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

3.3 Arbeiten mit *Drosophila melanogaster*

3.3.1 Haltung und Kreuzung von Fliegen

Die Haltung und Vermehrung von *Drosophila* Fliegenlinien erfolgte nach Standardmethoden wie in Roberts (1986) beschrieben. Die Fliegen wurden, wenn nicht anders beschrieben, für Experimente bei einer Temperatur von 25 °C und zur Lagerung bei 18 °C gehalten. Das Umsetzen der Fliegen in frische Futterröhrchen wurde bei 25 °C alle 2-3 Wochen und bei 18 °C alle 5-6 Wochen durchgeführt.

Kreuzungen wurden in der Regel bei 25 °C nach den in Greenspan (2004) beschriebenen Methoden durchgeführt. Hierfür wurden ca. 2-20 unbefruchtete weibliche Fliegen (Jungfrauen) mit ca. halb so vielen männlichen Fliegen verpaart. Kreuzungen wurden alle 2-3 Tage in neue Röhrchen überführt.

Die Embryonalstadien wurden nach Campos-Ortége & Hartenstein (1985) bestimmt.

3.3.2 Sammeln von Embryonen

Zum Sammeln von Embryonen wurden ca. 50-150 junge Fliegen in Ablagekäfige überführt. Dieser war einseitig mit einem Gitternetz versehen und wurde auf der anderen Seite mit einer Apfelsaftagarplatte, auf welche etwas Futter (frische Hefe vermischt mit Wasser) gegeben wurde, verschlossen. Die Fliegen wurden bei 25 °C für maximal 10 Tage im Käfig gehalten. Die Ablagezeit (die Zeit die eine Apfelsaftagarplatte als Ablagefläche diente) variierte je nach Experiment und dem gewünschten Alter der Embryonen. Um Larven oder Puppen zu erhalten wurden die Platten nach der Ablage für die entsprechende Zeit bei 25 °C inkubiert. Gegebenenfalls wurde nach einigen Tagen etwas Futter hinzugefügt.

3.3.3 Sortieren von Embryonen und Larven

Um Embryonen oder Larven anhand ihres Genotyps sortieren zu können, wurde durch Kreuzung ein GFP exprimierendes Balancerchromosom (z.B. TM3 St Ser twist-Gal4 UAS-GFP) in die Fliegenlinie eingebracht. Die Tiere konnten dann, anhand ihrer Fluoreszenzintensität entsprechend ihres Genotyps unter einem Fluoreszenzbinokular sortiert werden. Ein starkes Fluoreszenzsignal lässt auf ein homozygotes Balancerchromosom schließen, eine schwache Fluoreszenz zeigte Heterozygotie an und keine Fluoreszenz bedeutet, dass die Embryonen den Marker nicht exprimieren. Das

Umsetzen von Embryonen und Larven des gewünschten Genotyps auf frische Apfelsaftagarplatten erfolgte mit einer Pinzette.

3.3.4 Letalitätstest

Für die Letalitätstests wurden Embryonen über einen Zeitraum von ca. 4 h gesammelt. Nach 12-18 h wurden ca. 25 Embryonen des gewünschten Genotyps auf eine frische Apfelsaftagarplatte mit etwas Futter überführt. Überlebensrate und Entwicklung wurden über einen Zeitraum von 14 Tagen täglich beobachtet und dokumentiert, tote Tiere wurden entfernt. Insgesamt wurde der Test 5-7 x wiederholt, so dass insgesamt ca. 120-180 Tiere pro Genotyp ausgezählt wurden.

3.3.5 Expressionsinduktion mittels Gal4-UAS-System

Das Gal4-UAS-System dient in *Drosophila* dazu, beliebige Gene gezielt in bestimmten Geweben oder Zellen zu exprimieren (Brand and Perrimon, 1993). Das System stammt aus der Hefe und basiert einerseits auf dem Transkriptionsfaktor Gal4, der durch einen gewebsspezifischen Enhancer induziert wird. Die zweite Komponente ist die *Upstream Activating Sequence* (UAS), welche die Bindungsstelle des Transkriptionsfaktors darstellt und vor dem zu exprimierenden Gen liegt. Durch Kreuzung von zwei transgenen Fliegenlinien, von denen die eine ein ins Genom inseriertes Gal4-Konstrukt (Induktorkonstrukt) und die andere ein UAS-Konstrukt mit einklonierter Transkriptionseinheit (Effektorkonstrukt) besitzt, kommt es in den Nachkommen zur ektopischen Expression des Effektorkonstrukts im Induktorkonstruktmuster.

Da das System aus der Hefe stammt ist die Induktion bei 37 °C am effektivsten. Da eine solch hohe Temperatur bei *Drosophila* zu Sterilität und Letalität führt, wurde die Temperatur für Gal4-UAS-Experimente lediglich auf 29 °C erhöht.

Diese Methode kann neben der Überexpression von Genen auch zur Herunterregulation (*knock down*) der Genexpression basierend auf RNA Interferenz (RNAi) genutzt werden (Fire et al., 1998). Hierbei werden Gal4-Fliegenlinien mit Linien gekreuzt, die ein entsprechendes UAS-RNAi Konstrukt besitzen (Dietzl et al., 2007).

3.3.6 Erzeugung von Flip Out Klonen

Das FRT *Flip Out* System ermöglicht die gezielte Expression von Genen in Zellklonen innerhalb eines Gewebes. Zur Induktion der *flip out* Zellklone wird eine UAS-Fliegenlinie mit der Fliegenlinie *hsFlp; Act>CD2>Gal4; UAS-GFP* (alternativ *UAS-RFP*) gekreuzt. Dabei wird die Expression des UAS-Effektoronstrukts zufällig in einzelnen Zellen induziert (Neufeld et al., 1998; Pignoni and Zipursky, 1997). Diese lassen sich durch die Expression von GFP bzw. RFP von den umliegenden Zellen des Gewebes, in denen die Expression nicht beeinflusst wird, unterscheiden.

Für einen RNAi vermittelten *knock down* der Genexpression in Zellklonen wurde die Linie *hsFlp UAS-Dicer-2; Act>CD2>Gal4; UAS-GFP* verwendet. Diese enthält auf dem X-Chromosom ein UAS-Dicer-2 (*Dcr-2*) Konstrukt, das die RNAi Effizienz erhöht (Dietzl et al., 2007).

3.3.7 Erzeugung transgener Fliegenlinien und Bestimmung des P-Element-Insertionschromosoms

P-Elemente stellen Transposons dar, die bei *Drosophila* als Transformationsvektoren genutzt werden. Die P-Element Transformation erfolgte nach dem Prinzip von Spradling & Rubin (1982); bzw. Rubin & Spradling (1982) und wurde nach dem in Roberts (1986) beschriebenen Standardprotokoll durchgeführt.

Die Injektion der P-Elementvektoren erfolgte in Embryonen der weißäugigen Fliegenlinie *w¹¹⁸*. Da P-Element-Konstrukte verwendet wurden, die ein *white* Gen als Marker besaßen, konnten die transgenen Tiere durch eine rote Augenfarbe identifiziert werden. Nach der Injektion der Vektoren mit Hilfe eines Mikroinjektionsgerätes wurden die Embryonen bis zum Schlüpfen bei 18 °C in Halocarbonöl belassen und dann die geschlüpften Larven (nach zwei bis drei Tagen) auf Standardfliegenfutter überführt. Die geschlüpften adulten Fliegen wurden einzeln mit *w* Fliegen rückgekreuzt. Die F1 Generation dieser Kreuzungen wurde nach rotäugigen und demnach transformierten Fliegen durchsucht. Durch Kreuzung der rotäugigen Fliegen mit Balancerlinien wie in Greenspan (2004) beschrieben konnte das Insertionschromosom identifiziert werden. Die generierten transgenen Fliegen wurden homozygot oder über einem Balancerchromosom gehalten.

3.3.8 *Ends-out Gene Targeting*

Zur Erzeugung einer *Isr* Mutante wurde die *Ends-Out Gene Targeting* Technologie nach Huang et al. (2008), basierend auf homologer Rekombination angewendet. Dabei wird die Zielsequenz durch eine Donorsequenz ersetzt, die als Marker ein *white* Gen als Selektionsmarker enthält. Das *white* Gen in der Donorsequenz wird zudem von loxP Sequenzen flankiert, die nach Kreuzung mit einer Cre-Fliegenlinie eine Entfernung des Markers erlauben. Die Donorsequenz enthält darüber hinaus eine attP-Sequenz, die es ermöglicht nach erfolgter Mutagenese ein DNA-Fragment gezielt in diesen Lokus zurückzubringen (Huang et al., 2009).

Die Donorsequenz wird durch den Donorvektor pGX attP eingebracht (Huang et al., 2009). In diesen Vektor werden zunächst zwei Sequenzen inkloniert, die homolog zu den beiden Bereichen sind, die die zu deletierende Zielsequenz flankieren (siehe Ergebnisse 4.3.1). Diese Sequenzen werden als 5' und 3' Homologiearm (HA) bezeichnet. Der Donorvektor enthält außerdem das Apoptosegen *reaper* unter der Kontrolle eines UAS-Promotors. Dieses Gen geht bei korrekter homologer Rekombination verloren und wird nur bei einer fehlerhaften Insertion aktiviert. Dadurch hilft es das Auftreten von falsch-positiven Kandidaten beim *Ends-out Gene Targeting* zu reduzieren (Huang et al., 2009). Zur späteren Mobilisierung des Vektors im Genom enthält er zusätzlich FRT-Sequenzen, die von einer Flippase (Flp) erkannt und untereinander rekombiniert werden. Die ebenfalls enthaltenen Scel Restriktionsschnittstellen erlauben eine Linearisierung des durch die Flippase mobilisierten Vektors.

Der klonierte Donorvektor (Abb. 4.9 A) wurde anschließend zur Herstellung von transgenen Fliegenlinien (Donorlinien) verwendet. Dazu besitzt der Vektor ein 5' und ein 3' P-Element, die zur transgenen Insertion genutzt werden. Die Nachkommen, die eine stabile Insertion tragen, lassen sich anhand ihrer roten Augenfarbe erkennen, die durch das *white* Gen des Donorvektors vermittelt wird.

Die Donorlinie wurde anschließend auf ihre Funktionalität überprüft. Dabei sollte untersucht werden, ob sich das inserierte Donorkonstrukt durch Flp und das Restriktionsenzym Scel mobilisieren lässt. Hierzu wurden Weibchen der Donorlinie mit Männchen der Targeting-Linie (*yw/Y*, *hs-hid*; *hs-Flp*, *hs-I-Scel/Cyo*, *hs-hid*; *+/+*) gekreuzt und die Nachkommen einem Hitzeschock (~1,5 h bei 38°C) unterzogen, der Flp und Scel aktiviert. Die adulten Nachkommen zeigten die erwarteten rot-weißen Mosaikaugen, die dadurch entstehen, dass in den Zellen in denen die Mobilisierung erfolgt das *white* Gen verloren geht. Des Weiteren sollte die Funktionalität des Apoptosegens UAS-*reaper* (*rpr*) überprüft werden (Abb. 4.5 A). Dazu wurde die Donorlinie mit der Screening-Linie (*yw/Y*;

Pin/CyO; Gal4^{221w-/Gal4^{221w-}}) gekreuzt, die Gal4 unter einem starken neuronalen Promotor exprimiert. Die Kreuzung führte in allen Fällen zu der erwarteten Letalität der Nachkommen im Puppenstadium, was auf eine erfolgreiche Aktivierung des *reaper* Gens schließen lässt (Huang et al., 2008).

Das *Ends-out Gene Targeting* erfolgte nun in drei aufeinander folgenden Fliegenkreuzungen (Huang et al., 2008), die im Folgenden näher beschrieben werden.

3.3.8.1 Targeting-Kreuzung

Damit eine homologe Rekombination erfolgen kann, muss das inserierte Donorkonstrukt zunächst mobilisiert werden. Dazu dienen die FRT-Sequenzen, die von einer Flippase erkannt und untereinander rekombiniert werden. Hierzu wurde die folgende Kreuzung durchgeführt:

$$\frac{yw}{Y, hs-hid} ; \frac{hs-Flp, hs-I-SceI}{CyO, hs-hid} ; \frac{+}{+} \quad \text{♂} \quad \times \quad \text{♀} \quad \frac{w}{w} ; \frac{pGX \text{ } lsr}{pGX \text{ } lsr} ; \frac{+}{+}$$

Insgesamt wurden hierzu 40 Fliegenröhrchen mit jeweils 30 Jungfrauen der Donorlinie und 30 Männchen der *Targeting*-Linie angesetzt. Diese Kreuzungen wurden alle 24 Stunden für eine Woche in neue Röhrchen umgesetzt. Die abgelegten Eier entwickelten sich bei 25 °C und an Tag 2 und 3 wurden jeweils 90 minütige Hitzeschocks bei 38 °C im Wasserbad durchgeführt.

3.3.8.2 Screening-Kreuzung

Für die *Screening*-Kreuzung wurden die weiblichen, mosaik-ägigen Nachkommen der *Targeting*-Kreuzung mit Männchen der *Screening*-Linie nach folgendem Schema gekreuzt:

$$\frac{yw}{Y} ; \frac{Pin}{CyO} ; \frac{Gal4^{221(w-)}}{Gal4^{221(w-)}} \quad \text{♂} \quad \times \quad \text{♀} \quad \frac{yw}{w} ; \frac{hs-Flp, hs-I-SceI}{pGX \text{ } lsr^*} ; \frac{+}{+}$$

* = mobilisiertes, extrachromosomales Donorkonstrukt

Dazu wurden jeweils 25 Jungfrauen mit 5-10 Männchen in kleinen Röhrchen gekreuzt (insgesamt ca. 220 Röhrchen, 5500 Jungfrauen) und alle 2-3 Tage, insgesamt 5 x in neue Röhrchen überführt. Die Röhrchen mit den sich entwickelnden Nachkommen wurden bei 25 °C gelagert.

3.3.8.3 Mapping-Kreuzung

Die rotäugigen Nachkommen aus der *Screening*-Kreuzung wurden mit der Balancerlinie *w; If/CyO; MKRS/TM6B* gekreuzt und Stämme mit der Mutation über dem *TM6B* Balancer etabliert. Anschließend wurden die Mutanten auf Letalität über dem Allel *CG1887^{f07156}* getestet. Die erhaltenen mutanten *Isr^{ko}* Allele wurden über den Balancerchromosomen *TM6B Tb* oder *TM3 St Ser twist-Gal4 UAS-GFP* gehalten. Durch Kreuzung mit einer *Cre*-Fliegenlinie wurde ebenfalls ein weißäugiger *Isr^{ko}* Stamm etabliert (Abb. 4.8).

3.3.9 Untersuchung der Gasfüllung

Zur Untersuchung des Gasfüllungsprozesses wurden ca. 16-20 h alte Embryonen verwendet. Um die Gasfüllung beobachten zu können wurde zunächst die Chorionhülle der Embryonen entfernt. Hierzu wurden die Embryonen in ein Sieb überführt und für 3 min mit 4 %iger Natriumhypochloridlösung inkubiert. Nach mehrmaligem Abspülen der Embryonen mit H_2O wurden sie auf ein Agarblöckchen, das sich auf einem Objektträger befand, platziert. Die Gasfüllung wurde mit Hilfe eines Durchlichtmikroskops beobachtet. Pro Genotyp wurden ca. 120-140 Embryonen ausgezählt.

3.3.10 Untersuchung der Permeabilität der Spirakel

Um die Barrierefunktion der Spirakel zu testen wurden Larven des ersten Larvenstadiums für 5 min in eine 10 %ige Erioglaucin/PBS-Lösung überführt. Nach mehrmaligem Waschen der Larven mit *A. bidest* wurden sie in 70 % Glycerin in PBS eingebettet und mittels Durchlichtmikroskop auf eine Blaufärbung innerhalb des Tracheensystems untersucht.

3.3.11 Kutikulapräparation

Die Kutikula besteht vorwiegend aus Chitin und stellt das Außenskelett von *Drosophila melanogaster* dar. Zur Durchführung einer Kutikulapräparation wird zunächst Hoyer's Medium mit Milchsäure im Verhältnis 1:1 vermischt. Hiervon werden zwei Tropfen auf einen Objektträger gegeben. Anschließend werden dechorionierte Embryonen oder Larven in das Gemisch überführt und mit einem Deckglas abgedeckt. Der Objektträger wird dann für 24 - 48 h bei 65 °C inkubiert. In dieser Zeit lösen sich die inneren Organe

der Tiere auf und die Kutikula kann anschließend mit Hilfe eines Lichtmikroskops visualisiert werden.

3.4 Fluoreszenz- und histochemische Färbungen

3.4.1 Immunfluoreszenzfärbungen von Embryonen

3.4.1.1 Fomaldehyd Fixierung

Für Immunfluoreszenzfärbungen müssen die Embryonen zunächst fixiert werden. Dafür wurden die Embryonen von der Apfelsaftagarplatte in ein feines Sieb überführt und wie unter 3.3.10 beschrieben dechorioniert. Anschließend wurden die Embryonen mit *A. bidest* gewaschen und mit Hilfe eines Pinsels in ein Glasszintillationsgefäß mit 4 ml n-Heptan und 4 ml 4 % Formaldehyd in PBS überführt. Die Embryonen wurden für 20 min in der Fixierlösung geschüttelt. Anschließend wurde die untere wässrige Phase entfernt (Embryonen sammeln sich an der Interphase). Durch Zugabe von 5 ml Methanol und starkem Schütteln mit Hilfe eines Wirbelstrommixers (ca. 30 s) wurde die Vitellinmembran entfernt. Die Embryonen wurden nun mit Hilfe einer Glaspasteurpipette abgesaugt, in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt und 3 x 5 min auf dem Drehrad mit Methanol gewaschen. Die fixierten und dehydrierten Embryonen wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C in Methanol gelagert.

3.4.1.2 Hitzefixierung

Die dechorionierten Embryonen wurden in ein 50 ml Falcon mit 10 ml Triton-NaCl-Lösung gegeben, die zuvor im Wasserbad auf 95 °C erwärmt wurde. Das Falcon mit den Embryonen wurde für etwa 5 s im Wasserbad inkubiert und anschließend kurz geschüttelt. Zu den 10 ml wurden dann 40 ml eiskalte Triton-NaCl-Lösung gegeben. Das Falcon wurde daraufhin für einige Minuten in Eiswasser abgekühlt.

Anschließend wurde der Überstand vollständig entfernt und 4 ml n-Heptan hinzugegeben. Nach Zugabe von 3,8 ml Methanol und 200 µl einer 0,5 M EDTA-Lösung wurden die Embryonen für 30 s zur Entfernung der Vitellinmembran geschüttelt. Das Falcon wurde nun bei -20 °C über Nacht gelagert. Am nächsten Tag wurden die Embryonen abgesaugt und 3 x 5 min mit Methanol gewaschen. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C in Methanol.

3.4.1.3 Immunfluoreszenzfärbungen von Embryonen

Hierfür wurden die in Methanol gelagerten Embryonen mit PBT rehydratisiert. Dies erfolgte schrittweise durch Ersetzen des Methanols zunächst mit 50 % Methanol in PBT und dann vollständig mit PBT. Alle folgenden Wasch- und Inkubationsschritte wurden bei Raumtemperatur auf dem Drehrad durchgeführt. Die Embryonen wurden nun 3 x 20 min mit 1 ml PBT gewaschen. Anschließend wurden die Embryonen 30 min mit Blockierungslösung inkubiert. Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte über 2-3 Tage bei 4 °C in Blockierungslösung in einem Volumen von 200 µl. Anschließend wurden die Embryonen 1 x 5 min und 3 x 20 min mit 1 ml PBT gewaschen und erneut blockiert. Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper erfolgte für 1, 5 h im Dunkeln bei Raumtemperatur auf dem Drehrad in ebenfalls 200 µl Gesamtvolumen. Nach weiteren Waschschritten im Dunkeln (1 x 5 min, 3 x 20 min) wurde das PBT möglichst vollständig abgenommen und einige Tropfen Fluoromount Einbettmedium (Southern Biotech) zugegeben. Die Embryonen wurden nun mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze auf einen Objektträger pipettiert. Anschließend wurde ein Deckgläschen aufgelegt. Bis zur Analyse mittels konfokaler Lasermikroskopie wurden die Präparate bei 4 °C gelagert.

3.4.2 Immunfluoreszenzfärbungen von larvalen Geweben

3.4.2.1 Fixierung von Larven

Zur Durchführung von Fluoreszenzfärbungen an larvalen Geweben wurden die Larven zunächst präpariert und fixiert. Hierfür wurden die Larven in einem Tropfen PBS auf einem Objektträger unter dem Binokular mit zwei Pinzetten vorsichtig am posterioren Ende geöffnet. Anschließend erfolgte eine *inside out* Präparation bei der das Innere der Larve nach außen gedreht wurde. Die Gewebe bleiben bei dieser Methode nach wie vor mit der Kutikula verbunden. Die präparierten Larven wurden in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 4 % iger Formaldehyd-PBS Lösung für 30 min auf der Wippe bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend wurden die Gewebe in ein Glasfärbeschälchen überführt für 3 x 20 min mit 1 ml PBT gewaschen.

3.4.2.2 Immunfluoreszenzfärbungen von larvalen Geweben

Die fixierten larvalen Gewebe wurden zunächst für 30 min mit Blockierungslösung inkubiert. Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte über Nacht bei 4 °C in

Blockierungslösung bei einem Gesamtvolumen von 300 µl. Am nächsten Tag wurden die Larven 1 x 5 min und 3 x 20 min mit 1 ml PBT gewaschen und erneut 30 min blockiert. Nach Inkubation mit dem Sekundärantikörper in 300 µl Blockierungslösung für 1 h im Dunkeln auf der Wippe wurden die Larven erneut 1 x 5 min und 3 x 20 min mit 1 ml PBT gewaschen. Daraufhin wurde der PBT Überstand möglichst ganz abgenommen, die Gewebe in einem Tropfen Fluoromount auf dem Objektträger unter dem Binokular freipräpariert und eingebettet. Die Präparate können einige Tage im Dunkeln bei 4 °C überdauern. Die Larvenpräparate wurden mittels konfokaler Lasermikroskopie analysiert.

3.4.3 *In situ*-Hybridisierung

3.4.3.1 *In situ*-Hybridisierung auf Embryonen

Für eine *in situ*-Hybridisierung zum Nachweis von *Isr* mRNA wurden die Embryonen zunächst wie unter 3.4.1.1 beschrieben fixiert. Alle folgenden Inkubations- und Waschschrte erfolgten in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß bei Raumtemperatur auf dem Drehrad.

Zunächst wurde das Methanol durch 1 ml einer 50 % igen Methanol/PBT Lösung ersetzt und die Embryonen für 5 min darin inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen und 500 µl PBT, sowie 500 µl RNA-Fixer zugegeben und erneut 20 min fixiert. Nach Abnahme der Fixier-Lösung wurden die Embryonen 4 x mit je 1 ml PBT gewaschen. Anschließend wurden die Embryonen mit PBT und 2,5 µl Proteinase K Stammlösung für exakt 1 min inkubiert. Der Überstand wurde schnellstmöglich abgenommen und durch 1 ml Stopp-Puffer ersetzt. Die Embryonen werden daraufhin 2 x mit 1 ml PBT gewaschen und erneut mit 500 µl RNA-Fixer und 500 µl PBT abermals für 20 min fixiert. Anschließend wurden die Embryonen 4 x mit je 1 ml PBT gewaschen. Das PBT wurde nun durch 250 µl PBT und 250 µl Hybe-B-Puffer ersetzt. Die Mischung wurde wiederum durch 250 µl Hybe-B-Puffer und anschließend 250 µl Hybe-Puffer ausgetauscht. Nun erfolgte die Prä-Hybridisierung in 250 µl frischem Hybe-Puffer für 1 h bei 65 °C im Wasserbad. Im Anschluss daran wurden 3 µl der *in situ*-Sonde in 30 µl Hybe-Puffer auf die Embryonen gegeben. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 65 °C im Wasserbad.

Am nächsten Tag wurde die verdünnte Sonde abgenommen und die Embryonen mit 500 µl 65 °C heißen Hybe-Puffer gewaschen. Es folgten zwei weitere Waschschrte mit jeweils 1 ml Hybe-B-Puffer für je 15 min bei 65 °C im Wasserbad. Der Hybe-B-Puffer wurde nun abgenommen und durch 500 µl PBT ersetzt. Die Embryonen wurden dann abermals 3 x 1 min, 2 x 15 min und 1 x 1 min mit je 1 ml PBT gewaschen.

Zur Markierung der *in situ*-Sonde wurden 2,5 µl eines 1:10 in PBT verdünnten, auf *wt* Embryonen prä-adsorbierten α -DIG-AP-Antikörpers, in 500 µl PBT für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin wurden die Embryonen 2 x 1 min, 1 x 20 min, 1 x 30 min und 1 x 1 min mit je 1 ml PBT gewaschen.

Vor Zugabe des Substrates der alkalischen Phosphatase wurden die Embryonen 3 x mit je 1 ml AP-Puffer für jeweils 5 Minuten auf dem Drehrad umgepuffert. Nun wurden die Embryonen in ein Glasfärbeschälchen umgesetzt und mit 10 µl NBT/BCIP (Roche) in 500 µl AP-Puffer ca. 30 min (je nach Intensität der Färbung) inkubiert. Die Farbreaktion wurde dann durch Zugabe von 1 ml PBT gestoppt, die Embryonen zurück in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und 3 x mit je 1 ml PBT für jeweils 10 min gewaschen. Anschließend wurden die Embryonen durch eine Ethanolreihe (25 %, 50 %, 75 % Ethanol in PBT, 100 % Ethanol) erst de- und dann in umgekehrter Reihenfolge wieder rehydratisiert. Die Embryonen wurden schließlich in Fluoromount eingebettet.

3.4.3.2 *In situ*-Hybridisierung auf larvalem Gewebe

Zur *in situ*-Hybridisierung auf larvalem Gewebe erfolgten die Präparation und Fixierung der Larven im Prinzip wie unter 3.4.2.1 beschrieben, allerdings wurde hier eine 10 % ige Formaldehydlösung verwendet. Nach Überführung der Larven in ein Färbeschälchen aus Glas wurden sie 3 x mit je 1 ml PBT für je 20 min auf der Wippe bei Raumtemperatur gewaschen. Die weiteren Schritte erfolgten wie bei der *in situ*-Hybridisierung auf Embryonen ab dem zweiten Fixierungsschritt mit RNA-Fixer.

3.4.4 Oil Red O Färbung der posterioren Spirakeln

Zur Visualisierung der Drüsenzellen in den posterioren Spirakeln von *Drosophila* Larven wurden Oil Red O Färbungen durchgeführt. Hierzu wurden L1 Larven, wie unter 3.4.2.1 beschrieben präpariert und fixiert. Die Fixierung sowie alle nachfolgenden Schritte wurden in einer kleinen Mikrotiterplatte (Volumen pro *well* 15 µl) mit Hilfe eines Binokulars durchgeführt. Im Anschluss an die Fixierung wurden die Larven 3 x für jeweils 5 min mit 15 µl PBS gewaschen. Daraufhin erfolgte eine 5 minütige Inkubation mit 15 µl 60 % Isopropanol in PBS. Zur Visualisierung der Lipide wurden die Larven nun für 20-30 min mit 15 µl Oil Red O Färbelösung inkubiert. Anschließend wurden die Larven erneut für 5 min mit 60 % Isopropanol und 3 x 5 min mit PBS gewaschen. Die Präparate wurden nach der Einbettung in Glycerin sofort mikroskopiert.

3.4.5 LysoTracker Färbung und Lysosomenquantifizierung

Für die LysoTracker-Färbung zur Visualisierung der sauren Kompartimente wurden L3 Larven wie unter 3.4.2.1 beschrieben präpariert. Anschließend wurden die Larven in ein Färbeschälchen aus Glas überführt, 2 x mit 1 ml PBS gewaschen und 15-20 min mit 4 % Formaldehyd in PBS bei Raumtemperatur auf der Wippe fixiert. Die Larven wurden nun 3 x mit 1 ml PBS gewaschen und für 15 min mit 0,25 µl LysoTracker in 1 ml PBS inkubiert. Anschließend wurden die Larven 3 x mit 1 ml PBS gewaschen. Die Fettkörper wurden nun unter einem Binokular freipräpariert und in 80 % Glycerin in PBS eingebettet. Die Präparate wurden umgehend mikroskopiert.

Die Quantifizierung der Lysosomengröße und -anzahl erfolgte mit der Software ImageJ und dem *Analyze Particles* Werkzeug. Pro Genotyp wurden 7-11 Zellklone unterschiedlicher Larven ausgezählt. Als Kontrolle diente das umliegende Gewebe.

3.4.6 Filipin Färbung

Für die Cholesterin Färbung mit Filipin wurden die Larven wie unter 3.4.2.1 beschrieben präpariert und fixiert. Anschließend wurden sie in einem Glasfärbeschälchen 3 x mit PBS gewaschen und 2 h bei Raumtemperatur auf der Wippe mit 1 µl der Filipin Stammlösung in 500 µl PBS inkubiert. Daraufhin wurden die Larven 3 x mit 1 ml PBS gewaschen. Die Fettkörper wurden in 80 % Glycerin in PBS unter einem Binokular freipräpariert, eingebettet und sofort mikroskopiert.

4 Ergebnisse

4.1 Molekulare und biochemische Charakterisierung des Scavenger Rezeptors Lsr

Scavenger Rezeptoren der Klasse B stellen eine vielseitige Gruppe von Proteinen dar, die aufgrund ihres breiten Ligandenspektrums diverse Funktionen im Stoffwechsel, in der angeborenen Immunität und in der Zelladhäsion besitzen. Aufgrund dieser Multifunktionalität stellen Fehlfunktionen dieser Proteine die Ursache verschiedener Erkrankungen dar und sind daher Gegenstand intensiver Forschung. Da Klasse B Scavenger Rezeptoren auch in Invertebraten hoch konserviert sind, wurde hier das Modellsystem *Drosophila melanogaster* gewählt um weitere grundlegende Funktion dieser Proteine zu entdecken.

Hierzu wurden zunächst verschiedene mutante *Drosophila* Linien, die ein Transposon in einem der noch unbekanntem Scavenger Rezeptor kodierenden Gene besitzen, auf mögliche Phänotypen untersucht (durchgeführt von P. Carrera). Hierbei zeigte sich, dass eine dieser Linien homozygot letal war. Hierbei handelt es sich um die Linie $w^{118}; +; PBac\{WH\}CG1887^{f07156}$ bei der das Scavenger Rezeptor kodierende Gen CG1887 ein *Piggy Bac* Transposon im 7. Exon beinhaltet (Abb. 4.1 A). Mit CG1887 wurde der erste Scavenger Rezeptor in *Drosophila* identifiziert, der für die Entwicklung und Lebensfähigkeit der Tiere essentiell ist. Aufgrund des mutanten Phänotyps wurde das Gen vorerst als *lethal scavenger receptor (Lsr)* bezeichnet.

Um erste Erkenntnisse bezüglich der *Lsr* Funktion in *Drosophila* zu erlangen, wurde das Lsr Protein genauer untersucht. Hierzu wurden anhand von Sequenzanalysen und proteinbiochemischen Methoden die Topologie, Domänenstruktur und posttranslationale Modifikationen analysiert sowie Homologievergleiche erstellt.

4.1.1 *Lsr* Gen- und Proteinstruktur

Datenbankanalysen zeigten, dass das *Lsr* Gen auf dem linken Arm des dritten Chromosoms liegt (3L: 62B9-62B10) und acht Exons umfasst (Abb. 4.1 A). Diese kodieren ein 2619 Basenpaar (bp) großes Transkript, wobei sich das Startkodon des Gens auf dem zweiten Exon befindet (Abb. 4.1 A) und der offene Leserahmen (*open*

reading frame, ORF) aus 1848 bp besteht. Möglicherweise gibt es zwei weitere Transkripte, die jedoch sehr kurz sind und hier nicht weiter untersucht wurden (www.flybase.org).

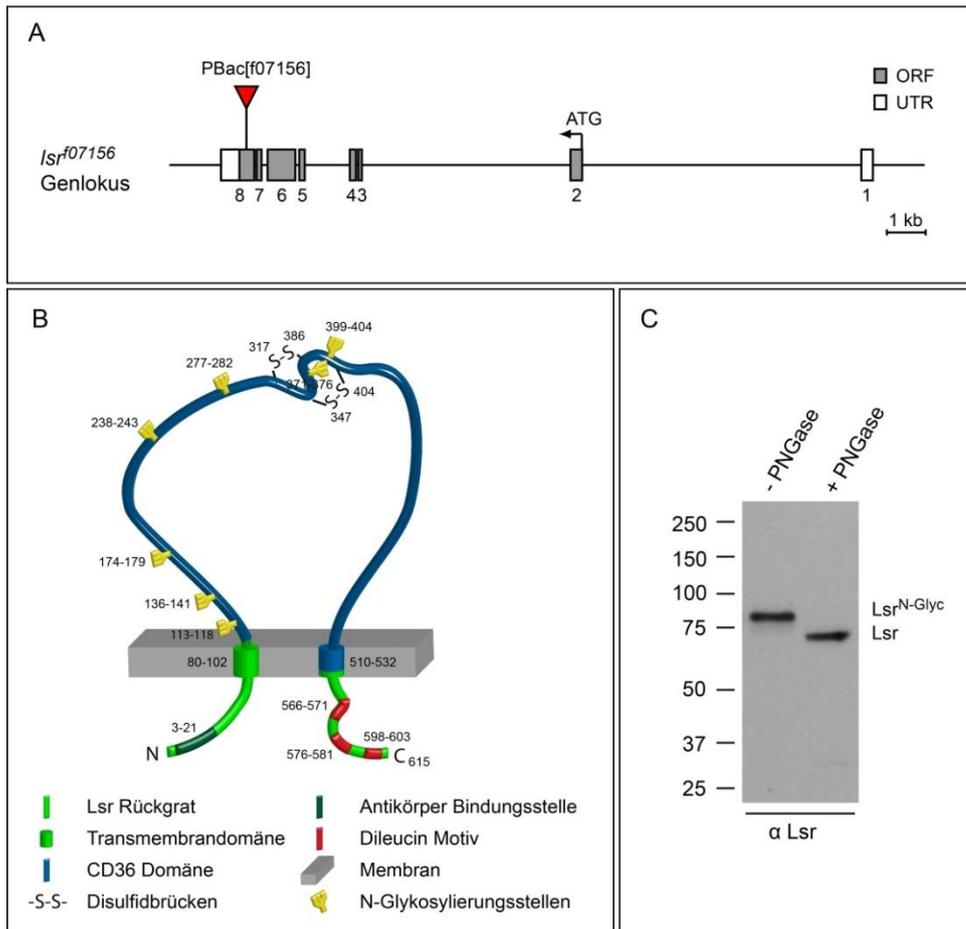


Abb. 4.1 Das *Lsr* Gen kodiert einen Klasse B Scavenger Rezeptors, der mehrfach glykosyliert vorliegt.

(A) *Lsr* (CG1887) Genlokus auf dem dritten Chromosom mit inseriertem Transposon PBac[f07156]. *Lsr* besteht aus acht Exons, das PBac liegt im 8. Exon. Der Transkriptionsstart (Pfeil, ATG) befindet sich im zweiten Exon. Die grauen Kästen stellen den offenen Leserahmen (ORF) dar, die weißen Kästen die untranslatierte Region (UTR). (B) Schematische Darstellung des Lsr Proteins in der Membran. Vorhersagen lassen darauf schließen, dass das Protein die Membran zweimal durchspannt und somit eine große extrazelluläre Domäne und zwei kürzere intrazelluläre Termini besitzt. Vorhergesagte Domänen und posttranslationale Modifikationen sind farblich und durch Angabe der Aminosäuresequenznummer gekennzeichnet. Diese Abbildung wurde in Zusammenarbeit mit André Vözlmann erstellt. (C) Ein Immunoblot bei dem der anti-Lsr Antikörper verwendet wurde zeigt die Bandenverschiebung von ca. 80 auf 70 kDa nach Inkubation des wt Puppenlysates mit PNGase F.

Das längste *Lsr* Transkript kodiert ein 615 Aminosäuren großes Protein mit einem errechneten Molekulargewicht von 69,99 kDa. Sequenzanalysen mit Hilfe des Programms ELM (www.elm.eu.org) zeigten, dass das Lsr Protein zwei vorhergesagte

Transmembrandomänen (Aminosäuren 80-102 und 510-532) besitzt, woraus sich die charakteristische Topologie eines Scavenger Rezeptors der Klasse B ergibt: eine große extrazelluläre Schleife und zwei relativ kurze intrazelluläre Domänen (Abb. 4.1 B). Die extrazelluläre Schleife des Lsr Proteins beinhaltet eine CD36-Domäne, die Scavenger Rezeptoren der Klasse B kennzeichnet. Weitere Analysen unter der Verwendung des Programms ELM zeigten, dass der extrazelluläre Bereich sieben mögliche N-Glykosylierungsstellen beinhaltet sowie vier konservierte Cysteinreste, die vermutlich untereinander zwei Disulfidbrücken ausbilden (Abb. 4.1 B).

Im intrazellulären Bereich nahe dem C-Terminus von Lsr wurden drei Sequenzen identifiziert, die als späte endosomale/lysosomale Zielsequenzen fungieren könnten (Abb. 4.1 B). Hierbei handelt es sich um so genannte Dileucin-Motive, die die konservierte Aminosäuresequenz DXXXLL (X= beliebige Aminosäure) besitzen (Dietrich et al., 1997). Hierbei kann die Aminosäure Asparaginsäure (D) durch die ebenfalls saure Aminosäure Glutaminsäure (E) ersetzt sein (Pond et al., 1995). Auch das zweite Leucin (L) ist in manchen Fällen, wie beispielsweise beim lysosomalen Klasse B Scavenger Rezeptor LIMP-2, durch ein Isoleucin ausgetauscht (Höning et al., 1998; Ogata and Fukuda, 1994). Die drei Dileucin-Motive in Lsr umfassen die Aminosäure 566-571, 576-581 und 598-603. Dabei ähnelt das zweite Motiv der Konsensussequenz am stärksten (Abb. 4.2). Das Motiv 3 besitzt anstelle von zwei Leucinresten zwei Isoleucinreste und besitzt davor ein Prolin. Dadurch ähnelt dieses Motiv sehr stark dem spezifischen Dileucin-Motiv des humanen LIMP-2 Proteins, das die Sequenz DERAPLI am C-Terminus aufweist.

Lysosomale Zielsequenz: D/E X X X L L/I



Abb. 4.2 Lsr besitzt am C-Terminus drei Dileucin-Motive, die als lysosomale Zielsequenzen dienen könnten. Dargestellt sind die Sequenzbereiche von Lsr in der Nähe des C-Terminus, die die Dileucin-Motive umfassen. Die drei Motive sind jeweils der Konsensussequenz gegenüber gestellt. Die Bereiche der Übereinstimmung sind grau hinterlegt. Motiv 2 zeigt die stärkste Ähnlichkeit zur Konsensussequenz.

4.1.2 Posttranslationale Modifikation des Lsr Proteins

Um die Funktion von Lsr näher untersuchen zu können sollte zunächst ein Lsr-spezifischer Antikörper generiert werden. Hierzu wurde ein 19 Aminosäure großes Peptid des Lsr N-Terminus (Aminosäure 3-21, Abb. 4.1 B) aufgrund seiner potentiell günstigen immunogenen Eigenschaften als Antigen ausgewählt. Dieses wurde anschließend von der Firma Pineda synthetisch hergestellt und für die Immunisierung von Meerschweinchen verwendet. Nach affinitätschromatographischer Reinigung des Antiserums zeigte sich, dass der Antikörper sehr spezifisch Lsr erkennt (Abb. 4.5).

Der Antikörper sollte nun genutzt werden um die potentielle N-Glykosylierung von Lsr nachzuweisen. Zu diesem Zweck wurde ein Proteinlysate aus white Puppen, im Folgenden als wildtypisch (wt) bezeichnet, hergestellt und mit dem Enzym PNGase F versetzt. Hierbei handelt es sich um eine Endoglykosidase, die spezifisch eine Spaltung der glykosidischen Bindung von N-Acetylglucosamin an Asparagin katalysiert. Als Kontrolle diente ein Ansatz, der nicht mit PNGase F versetzt, jedoch gleichwertig behandelt wurde. Anschließend erfolgte ein Immunoblot der Lysate unter Verwendung des Lsr-spezifischen Antikörpers. Hierbei trat im Kontrolllysate eine Bande auf der Höhe von ca. 80 kDa auf. Im PNGase F behandelten Lysat zeigte sich hingegen eine Bande auf der Höhe von ca. 70 kDa, was dem errechneten Molekulargewicht von Lsr entspricht (Abb. 4.1 C). Diese Bandenverschiebung lässt auf eine erfolgte Deglykosylierung durch PNGase F schließen. So kann davon ausgegangen werden, dass Lsr in der Tat an den vorhergesagten Bereichen der extrazellulären Domäne N-glykosyliert vorliegt und somit ein Glykoprotein darstellt.

4.1.3 Homologievergleiche der Lsr CD36-Domäne

Die extrazelluläre Schleife von Lsr enthält neben Glykosylierungsstellen die für Klasse B Scavenger Rezeptoren typische CD36-Domäne. Diese erstreckt sich von Aminosäure 106-529 und umfasst damit neben dem gesamten extrazellulären Bereich auch große Teile der C-terminalen Transmembrandomäne (Abb. 4.1 B und 4.3).

Sequenzvergleiche der CD36-Domänen von Lsr und humanen Klasse B Scavenger Rezeptoren, mit Hilfe des Programms Stretcher EMBOSS (www.ebi.ac.uk/Tools/psa/) zeigten, dass die stärkste Übereinstimmung (50,6 %) zwischen Lsr und LIMP-2 besteht (Abb. 4.3). Im Vergleich dazu sind die Übereinstimmung der CD36-Domänen von Lsr und CD36, bzw. SR-BI geringer. Sie liegen bei jeweils 45,9 % bzw. 47,2 % (Abb. 4.3). Bei der

Analyse zeigte sich zudem, dass die intrazellulären Domänen von Lsr wesentlich länger als die der humanen Klasse B Scavenger Rezeptoren sind (Abb .4.3).

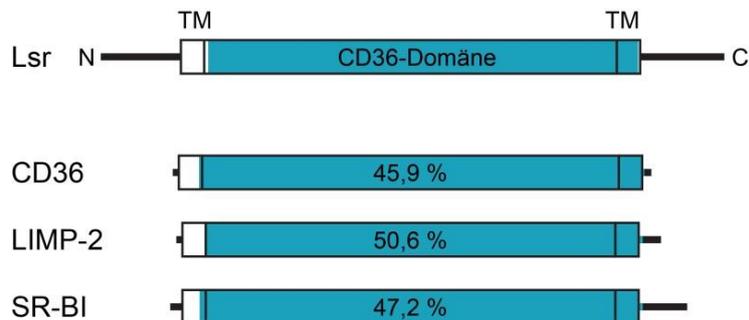


Abb. 4.3 Die CD36-Domäne von Lsr ist der des humanen Scavenger Rezeptors LIMP-2 am ähnlichsten. Gezeigt ist die schematische Struktur von Lsr mit seinen Transmembrandomänen (TM) im Vergleich zu den humanen Klasse B Scavenger Rezeptoren CD36, LIMP-2 und SR-BI. Die CD36-Domänen sind in blau dargestellt. Die jeweilige Sequenzübereinstimmung der CD36-Domänen im Vergleich zu der von Lsr ist in % angegeben. Die größte Übereinstimmung besteht zwischen Lsr und LIMP-2 und beträgt 50,6%. Die Homologien zu CD36 und SR-BI liegen jeweils bei 45,9 % bzw. 47,2%. Zu beachten ist außerdem, dass die intrazellulären Domänen von Lsr viel länger als die der humanen Scavenger Rezeptoren sind.

Zusammenfassend zeigte die Analyse der Aminosäuresequenz von Lsr, dass das Protein die Struktur eines Klasse B Scavenger Rezeptors aufweist. Eine für diese Rezeptoren typische N-Glykosylierung konnte ebenfalls gezeigt werden. Darüber hinaus wurde festgestellt, dass Lsr eine starke Ähnlichkeit zum humanen LIMP-2 aufweist. Die Ähnlichkeit basiert nicht nur auf Sequenzvergleichen der CD36-Domänen sondern auch auf der Tatsache, dass Lsr ähnlich wie LIMP-2 lysosomale Zielsequenzen am C-Terminus besitzt.

4.2 Analyse des Lsr Expressionsmusters

Um weitere Einblicke bezüglich der Lsr Funktion zu erlangen sollte nun das Expressionsmuster von Lsr analysiert werden. Hierzu sollte sowohl die *Lsr* Transkriptverteilung mittels *in situ*-Hybridisierungen als auch die Proteinlokalisierung durch Immunfluoreszenzanalysen untersucht werden.

4.2.1 *Lsr* Expression während der Embryogenese

Zur Durchführung der *in situ*-Hybridisierung wurde zunächst eine *Lsr*-spezifische DIG-markierte *in situ*-Sonde hergestellt, die den gesamten offenen Leserahmen umfasst. Anschließend wurde die *in situ*-Hybridisierung an *wt* Embryonen unterschiedlicher Stadien durchgeführt. Zur Überprüfung der *Lsr in situ*-Sonde wurden Embryonen verwendet, die UAS-*Lsr* (siehe 4.5.1) unter der Kontrolle von paired (*prd*)-Gal4 im Paarregelgenmuster exprimieren. Hier zeigte sich das für Paarregelgene charakteristische streifenförmige Muster, das darauf schließen lässt, dass die Sonde spezifisch *Lsr* mRNA erkennt (Abb. 4.4 A).



Abb. 4.4 *Lsr* wird während der späten Embryogenese spezifisch in posterioren Spirakeln exprimiert. (A-E) *In situ*-Hybridisierung an Embryonen unter Verwendung einer *Lsr antisense* Sonde. (A) Laterale Ansicht eines st 10 Embryos, der UAS-*Lsr* unter der Kontrolle von *prd*-Gal4 exprimiert. Das streifenförmige Muster zeigt, dass die *antisense* Sonde spezifisch die ektopisch exprimierte *Lsr* mRNA erkennt. (B) In st 5 *wt* Embryonen kann keine *Lsr* mRNA detektiert werden. (C) Dorsale Ansicht eines st 17 Embryos. *Lsr* wird in den posterioren Spirakeln exprimiert (Pfeil). (D) Detailansicht der posterioren Spirakeln. (E) *Lsr* Expression in der Analplatte (ventrale Ansicht). Maßstabsbalken: 100 μ m B; 20 μ m in D und E.

Des Weiteren zeigten die *in situ*-Hybridisierung an *white* (nachfolgend als *wt* bezeichnet) Embryonen, dass *Lsr* keine maternale Komponente besitzt (Abb. 4.4 B). Es wird erst in st 17, dem letzten Stadium der Embryogenese, exprimiert (Abb. 4.4 C). Hier zeigte sich eine spezifische Expression von *Lsr* in den posterioren Spirakeln (Abb. 4.4 C und D). Darüber hinaus konnte *Lsr* Transkript zu Beginn von st 17 in einem Ring detektiert werden, der die Begrenzung der Analplatte darstellt (Abb. 4.4 E). Diese Expression war jedoch nur vorübergehend detektierbar und wurde daher im Folgenden nicht weiter untersucht.

Dieses hochspezifische Expressionsmuster konnte im Folgenden durch Immunfluoreszenzfärbungen bestätigt werden. Hierzu wurde eine Doppelfärbung unter

Verwendung des beschriebenen anti-Lsr- (siehe 4.1.2) und anti- α -Spektrin-Antikörpers zur Markierung der Zellmembranen durchgeführt. Hierbei konnte Lsr ebenfalls erst in st 17 detektiert werden (Abb. 4.5 A und B). Wie die *lSr* RNA war auch das Lsr Protein sowohl in den posterioren Spirakeln (Abb. 4.5 B) als auch in der Analplatte (Abb. 4.5 C) lokalisiert.

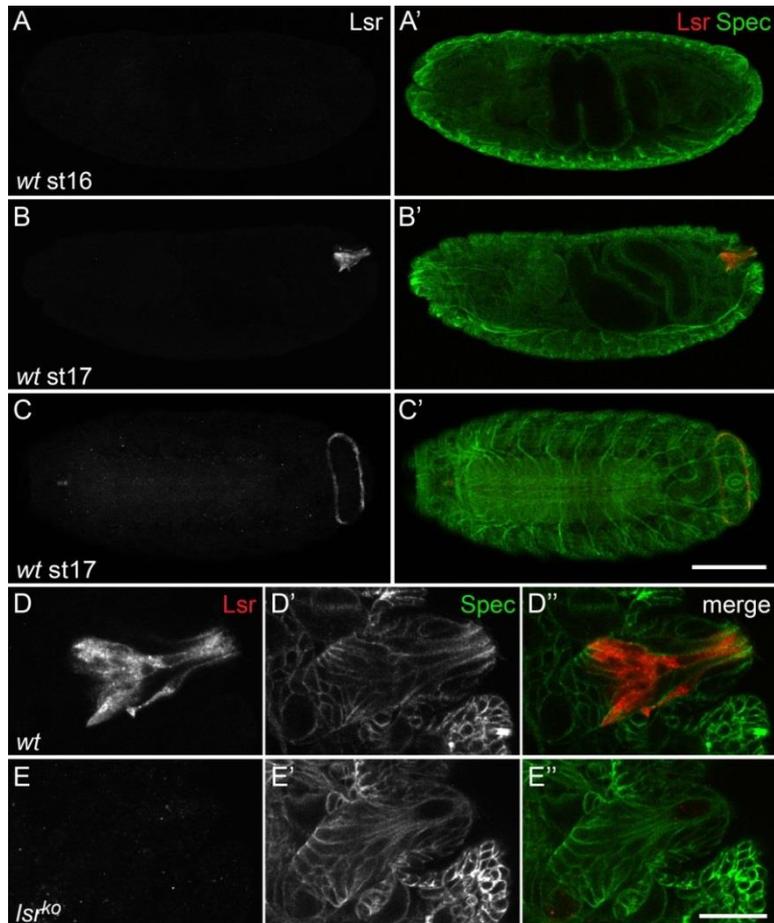


Abb. 4.5 Lsr ist in den posterioren Spirakeln lokalisiert. (A-E) Immunfluoreszenzmarkierungen von Lsr (rot) und α -Spektrin (Spec, grün). Die Färbungen zeigen, dass Lsr in st 16 noch nicht exprimiert wird (A, A'). In st 17 ist Lsr in den posterioren Spirakeln (B, B', dorsale Ansicht) und der Analplatte (C, C', ventrale Ansicht) lokalisiert. Eine laterale Detailaufnahme der posterioren Spirakeln zeigt die Lsr Expression in st 17 eines wt Embryos (D-D''). In st 17 von *lSr*^{ko} Mutanten kann Lsr nicht detektiert werden (E-E''). Maßstabsbalken: 100 μ m C'; 20 μ m in E''.

Detailaufnahmen zeigten, dass Lsr in mehreren Zellen der posterioren Spirakel exprimiert wird. Darüber hinaus konnte subzellulär ein vesikuläres Muster detektiert werden, das darauf hindeutet, dass Lsr in bestimmten Zellorganellen lokalisiert ist (Abb. 4.5 D).

Darüber hinaus sollte im Rahmen dieser Färbungen die Spezifität des anti-Lsr-Antikörpers getestet werden. Dazu wurde ebenfalls eine Markierung von Lsr und α -Spektrin an in dieser Arbeit generierten *lSr*^{ko} Mutanten durchgeführt (siehe 4.3.2). Hierbei konnte die

Spezifität des Lsr-Antikörpers bestätigt werden, da Lsr in der Mutante nicht detektierbar war (Abb. 4.5 E).

4.2.2 Lsr Expression innerhalb der posterioren Spirakel

Um die Lokalisation von Lsr näher zu spezifizieren sollten die Lsr exprimierenden Zellen innerhalb der posterioren Spirakel mit Hilfe von Immunfluoreszenzfärbungen identifiziert werden. Die verschiedenen Zelltypen der posterioren Spirakel zeichnen sich durch die Expression spezifischer Transkriptionsfaktoren aus. Dabei unterscheidet man nach Maurel-Zaffran et al. 2010 vier Gruppen von Zellen. Die erste Gruppe exprimiert den Transkriptionsfaktor Cut. Hierbei handelt es sich um Zellen des sensorischen Organs. Die zweite Gruppe exprimiert Cut, Empty spiracles (Ems) und Grainy head (Grh) und markiert die proximalen Zellen der Spirakelkammer. Ein dritter Zelltyp ist Cut und Ems positiv. Hierbei handelt es sich um distale Zellen der Spirakelkammer. Die vierte Gruppe ist lediglich Ems positiv und markiert die *spiracular branch* Zellen. Die unterschiedlichen Zelltypen der Spirakel sind in Abb. 4.6 E dargestellt.

Zur Markierung der verschiedenen Zelltypen wurde ein anti-Cut sowie ein Horseradish Peroxidase (HRP)-Antikörper, der Neurone anfärbt, verwendet. Des Weiteren wurden die Fliegenlinien *ems-Gal4* und *grhD4-Gal4* verwendet, die jeweils Gal4 unter der Kontrolle eines Enhancers der Gene *ems* bzw. *grh* exprimieren. Diese Linien wurden jeweils mit der Linie UAS-mCD8-GFP gekreuzt, wodurch die *ems*- und *grh*-Expressionsdomänen mit GFP markiert wurden.

Die Immunfluoreszenzmarkierungen zeigten, dass alle Lsr-exprimierenden Zellen Cut positiv sind (Abb. 4.6 A-A“). Darüber hinaus zeigte sich innerhalb der Spirakelkammer eine starke Überlappung der *lsr*- und *grh*-Expressionsdomänen (Abb. 4.6 B-B“). Hingegen waren nur wenige Lsr exprimierenden Zellen auch Ems positiv (Abb. 4.6 C-C“, Pfeil). Des Weiteren stellte sich bei der Doppelfärbung mit dem HRP-Antikörper heraus, dass Lsr zusätzlich zu den Zellen der Spirakelkammer in Zellen exprimiert wird, die direkt neben den sensorischen Neuronen der Mechanorezeptoren liegen. Dabei ist jeweils eine Lsr-positive Zelle mit einem Neuron assoziiert (Abb. 4.6 D-D“, Pfeil).

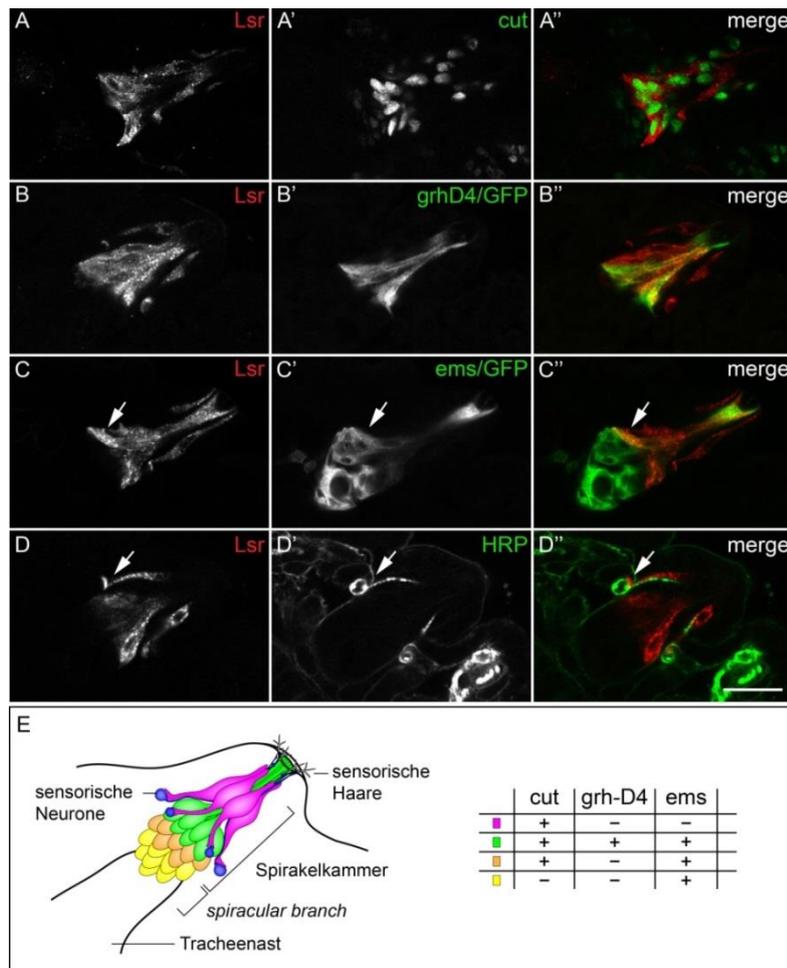


Abb. 4.6 Lsr wird in Zellen der Spirakelkammer und des sensorischen Organs exprimiert. (A-D) Immunfluoreszenzfärbungen von Lsr (rot) und Ko-Markern (grün) in den posterioren Spirakeln von st 17 Embryonen. (A-A'') Doppelfärbung von Lsr und Cut. Alle Lsr exprimierenden Zellen sind Cut positiv. (B-B'') Ko-Markierung von Lsr und GFP in Embryonen, bei denen UAS-mCD8-GFP durch grhD4-Gal4 getrieben wird. Die Färbung zeigt eine starke Überlappung von Lsr und grhD4/GFP. (C-C'') Die Doppelmarkierung von Lsr und GFP an Embryonen, die GFP unter der Kontrolle von ems-Gal4 exprimieren, zeigt eine schwache Überlappung der Lsr Expressionsdomäne und ems/GFP (Pfeil). (D-D'') In der Kofärbung mit HRP wird deutlich, dass Lsr in einzelnen Zellen lokalisiert ist, die jeweils mit einem sensorischen Neuron assoziiert sind (Pfeil). (E) Schematische Darstellung der unterschiedlichen Zelltypen innerhalb der posterioren Spirakel (Schematische Darstellung in Zusammenarbeit mit A. Völzmann). Maßstabsbalken: 20 μ m in D''.

Aus den Ergebnissen dieser Studie lässt sich schließen, dass Lsr in distalen Zellen, also in den am meisten posterior gelegenen Zellen der Spirakelkammer exprimiert wird. Hingegen wird Lsr nicht in proximalen Zellen der Kammer exprimiert und konnte auch im *spiracular branch* nicht detektiert werden. Zusätzlich wurde Lsr in einzelnen Zellen lokalisiert, die möglicherweise unterstützende Hüllzellen der sensorischen Neurone darstellen, welche die Haare des Stigmas innervieren.

4.2.3 Postembryonale *Isr* Expression

Neben der embryonalen Expression sollte nun die *Isr* Genaktivität auch in nachfolgenden Entwicklungsstadien untersucht werden. Hierzu wurde zunächst eine Real-Time PCR Studie durchgeführt, bei der die *Isr* Expression in allen Stadien der Entwicklung analysiert wurde. Hierfür wurde RNA aus *wt* Embryonen (16-20 h), L1 (28-32 h), L2 (52-56 h) und frühen L3 (76-80 h) Larven isoliert. Des Weiteren wurde RNA aus späten L3 Larven des Wanderungsstadiums (108-112 h), sowie aus frühen Puppen und weiblichen, adulten Fliegen verwendet. Die Real Time-PCR zeigte, dass *Isr* in den Larvenstadien L1, L2 und frühes L3 schwächer als im Embryonalstadium exprimiert wird (Abb. 4.7 A). Zum Ende der Larvalentwicklung steigt die *Isr* Expression jedoch stark an und erreicht das 4,5-fache der Expression im Embryonalstadium. Im Puppenstadium wurde die maximale *Isr* Expression gemessen. Diese war ca. 6,5-fach höher als während der Embryonalentwicklung. Nach der Metamorphose bzw. in adulten Fliegen sinkt die Expression wieder auf ein mittleres Maß, das im Vergleich zu Embryonen etwas höher ist (Abb. 4.7 A).

Da die *Isr* Transkription im späten Larvenstadium stark ansteigt, sollte nun untersucht werden, in welchen Geweben der L3 Larven *Isr* exprimiert wird. Zu diesem Zweck wurden *in situ*-Hybridisierungen mit Hilfe der *Isr antisense* Sonde an Geweben von L3 Larven des Wanderungsstadiums durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass *Isr* in der Ringdrüse (Abb. 4.7 B, Pfeilspitze) sowie in den optischen Loben des Gehirns (Abb. 4.7 B, Pfeil) exprimiert wird. Des Weiteren konnte *Isr* mRNA in den Imaginalscheiben der Flügel, Augen/Antennen und Beine detektiert werden (Abb. 4.14 C-E). Darüber hinaus wird *Isr* im Fettkörper, Speicheldrüsen und Gonaden exprimiert (Abb. 4.7 F-H). Eine Expression in den posterioren Spirakeln konnte in diesem Stadium nicht detektiert werden (Abb. 4.7 I). Allerdings zeigte sich eine Färbung in den anterioren Spirakeln (Abb. 4.7 J, Pfeil).

Zusammengefasst wird *Isr* während der späten Embryogenese sehr spezifisch in den posterioren Spirakeln exprimiert. Gegen Ende der Larvalentwicklung steigt die Expression von *Isr* jedoch stark an und verteilt sich auf eine Vielzahl unterschiedlicher Gewebe.

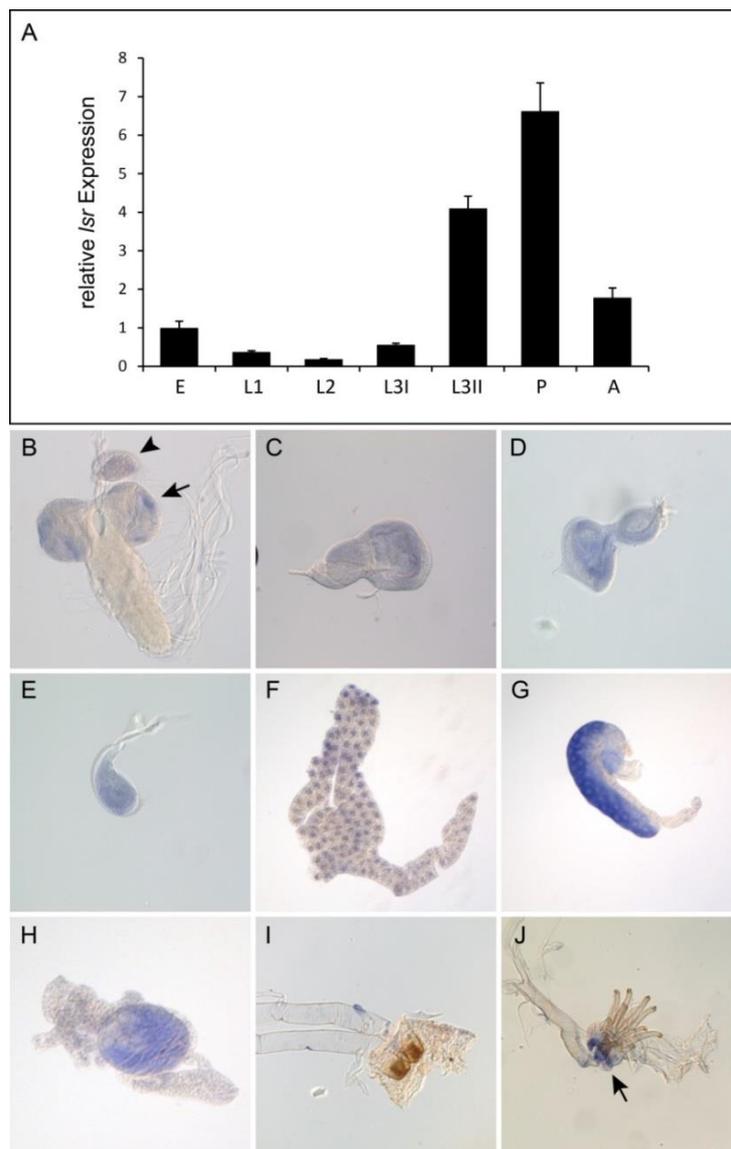


Abb. 4.7 *Isr* wird im dritten Larvenstadium in unterschiedlichen Geweben exprimiert. (A) Eine Real Time-PCR Analyse zeigt die *Isr* Expression in den verschiedenen Stadien der Entwicklung. Während *Isr* in den frühen Stadien der Entwicklung nur schwach exprimiert wird, steigt die Expression in L3 Larven des Wanderungsstadiums (L3 II) auf das 4,5-fache im Vergleich zur Embryogenese an. Eine maximale Expression (6,5-fach höher im Vergleich zur Embryogenese) wurde während der Metamorphose gemessen. Fehlerbalken repräsentieren die Stabw. (B-J) *In situ*-Hybridisierung mittels *Isr antisense* Sonde auf Gewebe von L3 Larven des Wanderungsstadiums. *Isr* wird in den optischen Loben des Gehirns (B, Pfeil) und der Ringdrüse (B, Pfeilspitze) exprimiert. Des Weiteren konnte eine Färbung in den Imaginalscheiben von Flügeln (C), Augen/Antennen (D) und Beinen (E) detektiert werden. Außerdem zeigte sich eine Expression im Fettkörper (F), Speicheldrüsen (G) und Gonaden (H). In den posterioren Spirakeln (I) konnte keine *Isr* Expression verzeichnet werden. Jedoch war es in den anterioren Spirakeln detektierbar (J, Pfeil).

4.3 Erzeugung einer *Isr* Mutante mittels *Ends-out Gene Targeting*

Wie unter 4.1 beschrieben wurde im Rahmen dieser Studie eine homozygot letale Mutante identifiziert, die ein *Piggy Bac* Transposon im *Isr* Genlokus beinhaltet. Da es vorkommen kann, dass solche Fliegenlinien weitere Mutationen besitzen, sollte zunächst untersucht werden, ob die Letalität tatsächlich auf eine Mutation im *Isr* Genlokus zurückzuführen ist. Hierzu sollte ein zweites unabhängiges, mutantes *Isr* Allel mittels *Ends-out Gene Targeting* erzeugt werden (Huang et al., 2008). Hierbei handelt es sich um eine Methode, die auf homologer Rekombination basiert und eine gezielte Mutagenese ermöglicht. Im Anschluss daran sollte eine Phänotypenanalyse dazu dienen funktionelle Rückschlüsse auf den Scavenger Rezeptor zu ziehen.

4.3.1 *Isr knock out*

Als Zielsequenz für das *Ends-out Gene Targeting* wurde ein ca. 8 kb großer Bereich des *Isr* Gens ausgewählt, der sich vom Ende des ersten Introns bis hin zur 3' untranslatierten Region (UTR) von Exon 8 erstreckt. Diese Region umfasst den kompletten Proteinkodierenden Bereich inklusive des Translationsstartpunktes (ATG) und sollte im Rahmen der homologen Rekombination durch ein *white* Gen ausgetauscht werden (Abb. 4.8). Bei erfolgreicher Rekombination sollte daher eine vollständige *Isr* Nullmutante entstehen. Außerdem soll in den *Isr* Lokus eine attP-Sequenz eingebracht werden, die es nach erfolgter Mutagenese ermöglicht ein DNA-Fragment gezielt dorthin zurückzubringen (Huang et al., 2009). Somit kann die Mutante in Zukunft beispielsweise durch Einbringen des GFP Gens oder *Isr* Deletionskonstrukten für Promotor- oder Domänenanalysen genutzt werden. Die Strategie des *Isr knock outs* ist in Abb. 4.4 schematisch dargestellt.

Die auszutauschende Zielsequenz wurde in die Fliegen durch den Donorvektor pGX-attP (Huang et al., 2009) eingebracht, in den wie nachfolgend beschrieben zunächst die Homologiearme, welche die Zielsequenz flankieren, kloniert wurden. Als 5' Homologiearm wurde hierfür eine 3541 bp große Region des ersten *Isr* Introns festgelegt. Als 3' Homologiearm wurde ein Bereich zwischen *Isr* und dem Nachbarn *tmhs* ausgewählt. Dieser beinhaltet auch UTRs der beiden Gene und hat eine Größe von 2809 bp. Die Homologiearme wurden vor und hinter die Donorsequenz des Vektors pGX-attP kloniert. Dazu wurden die Homologiearme mittels PCR aus genomischer DNA von *white* Fliegen amplifiziert. Die Klonierung in die *Multiple Cloning Site* (MCS) von pGX-attP erfolgte beim 5' Homologiearm mit Hilfe der Restriktionsenzyme *NheI* und *KpnI*, im Falle des 3' Homologiearms mittels *Ascl* und *BlnI* (= *AvrII*) (Abb. 4.9 A).

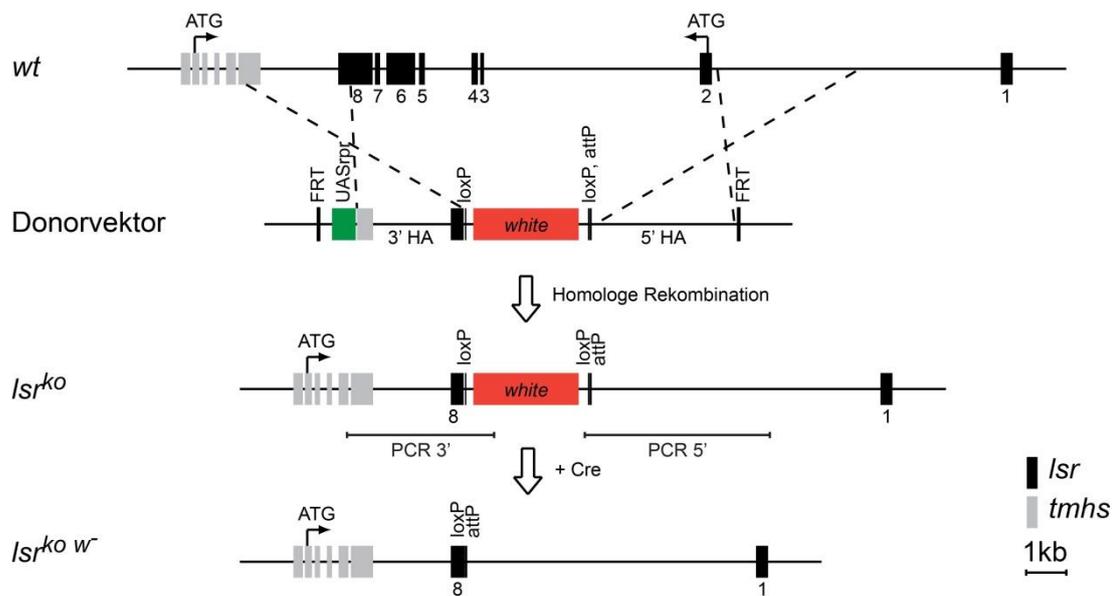


Abb. 4.8 *Isr* knock out durch homologe Rekombination. Schematisch dargestellt ist der Genlocus von *Isr* (schwarz) sowie der des Nachbargens *tmhs* (grau). Die Kästen stellen Exons dar, die Translationsstartpunkte sind durch die Startkodons (ATG) gekennzeichnet. Der 5' Homologiearm besteht aus einem Teil des ersten Introns von *Isr*. Der 3' Homologiearm umfasst UTRs von *tmhs* und *Isr* sowie den Bereich, der zwischen den beiden Genen liegt. Der ca. 8 kb große Bereich des *Isr* Gens zwischen den Homologiearmen enthält die gesamte kodierende Region und soll im Rahmen der homologen Rekombination durch das *white* Gen (rot) des Donorkonstrukts ersetzt werden. Das *white* Gen wird von zwei loxP- und einer attP-Sequenz flankiert. Die FRT-Sequenzen des Donorkonstrukts werden genutzt um den Vektor mittels Flippase zu mobilisieren. Das UAS-reaper (*rpr*) Gen hilft falsch-positive Mutanten zu eliminieren. Ebenfalls dargestellt ist der Genlocus nach erfolgter homologer Rekombination (*Isr*^{ko}) sowie nach zusätzlicher Entfernung des *white* Gens (*Isr*^{ko w}) durch die Cre-Rekombinase. Eingezeichnet sind zudem die Bereiche, die zur Verifikation der Mutante mittels PCR genutzt wurden.

Die Insertion der Homologiearme wurde anschließend durch eine Restriktionsanalyse überprüft. Dabei zeigte sich, dass der Verdau des Vektors mit *NheI* und *KpnI* zu den erwarteten zwei Fragmenten der Größen ~10 kb und ~3,5 kb führte (Abb. 4.9 B). Auch der Verdau mit *AscI* und *BlnI* lieferte die Fragmente der errechneten Größen ~10,8 kb und ~2,8 kb (Abb. 4.9 B). Die erfolgreiche Insertion der beiden Homologiearme in pGX-attP wurde ebenfalls durch eine Sequenzierung der betreffenden Regionen im Vektor bestätigt.

Der klonierte Donorvektor wurde anschließend zur Herstellung von transgenen Fliegenlinien verwendet. Dazu besitzt der Vektor ein 5' und ein 3' P-Element, die zur transgenen Insertion genutzt wurden. Die Nachkommen, die eine stabile Insertion tragen lassen sich anhand ihrer roten Augenfarbe erkennen, die durch das *white* Gen des Donorvektors vermittelt wird.

4.3.2 Verifizierung der *Isr* Mutation

Im Rahmen des *Ends-out Gene Targetings* konnten ca. 90 potentielle Mutanten identifiziert werden. Um festzustellen, ob es sich hierbei um *Isr* Mutanten handelt, wurden die Kandidaten gegen die Linie *w^{;;} CG1887^{f07156}/TM6B* gekreuzt (siehe 4.1 und 4.3). Das inserierte PBac Transgen im *Isr* Genlokus führt zu einer Reduktion der *Isr* Expression auf ca. 20 % (Abb. 4.10 B). Die Tatsache, dass die Linie homozygot letal ist lässt darauf schließen, dass ein *Isr knock out* ebenfalls Letalität verursacht. Somit wurden die Nachkommen, die das neu erzeugte Allel über dem *CG1887^{f07156}* Allel besitzen auf Letalität untersucht. Von den 90 Kandidaten konnten im Rahmen dieser Kreuzung sechs unabhängige Fliegenlinien identifiziert werden, die Letalität über *CG1887^{f07156}* zeigten.

Um zu überprüfen, ob in diesen Kandidaten tatsächlich eine korrekte homologe Rekombination stattgefunden hat, folgte eine PCR Analyse. Dazu wurde zunächst genomische DNA (gDNA) aus den sechs Kandidaten isoliert. In den anschließenden PCR-Reaktionen wurden Primerpaare verwendet, die sowohl den 5' als auch den 3' Homologiearm überspannen (Abb. 4.8). Somit erhält man lediglich ein Amplikon, wenn das Konstrukt im richtigen Lokus inseriert ist. Für den 5' Homologiearm wurde die Primerkombination *IsrIntron1fw2* und *3homRekKOattP* verwendet, die einen 3766 bp großen Abschnitt amplifizieren sollen. Für den 3' Homologiearm wurde die Kombination *whitefw2* und *Tmhsrev2* verwendet, welche ein Fragment der Größe 3447 bp liefern sollte. Beide PCR-Reaktionen führten bei allen sechs Kandidaten zu Produkten der erwarteten Größe (Abb. 4.10 A), was auf eine korrekte Insertion des Donorkonstruktes schließen lässt. Als Negativkontrolle wurde gDNA der Donorlinie verwendet. Hier wurde wie erwartet kein Fragment amplifiziert (Abb. 4.10 A).

Zur weiteren Verifikation wurden die im Rahmen der PCRs amplifizierten DNA Fragmente sequenziert. Hierbei zeigte sich ein korrekter Übergang zwischen dem Donorkonstrukt und dem Insertionsort. Für alle weiteren Untersuchungen wurde die Linie *Isr^{ko62}* verwendet, die nachfolgend als *Isr^{ko}* bezeichnet wird (Abb. 4.10 A Pfeil).

Zusätzlich wurde die *Isr* Expression mittels Real Time-PCR in L1 Larven untersucht. Hier konnte im Vergleich zu *wt* Tieren kein *Isr* Transkript detektiert werden (Abb. 4.10 B). Im Gegensatz dazu wurde das Nachbargen *tmhs* unverändert exprimiert (Abb. 4.10 C). So kann davon ausgegangen werden, dass es im Rahmen der Mutagenese nicht beeinträchtigt wurde.

Neben dem *Isr* Transkriptlevel wurde mit Hilfe des anti-Lsr-Antikörpers auch die Lsr Proteinexpression in den *Isr^{ko}* Mutanten untersucht. In den hierzu durchgeführten

Immunfluoreszenzfärbungen der posterioren Spirakel konnte Lsr nicht detektiert werden (Abb. 4.5 E).

Zusammenfassend lassen die Ergebnisse von PCR, Sequenzierung, Real Time-PCR und Immunfluoreszenzfärbung darauf schließen, dass das *Ends-out Gene Targeting* erfolgreich war und hier eine *Lsr* Transkript- und Protein-Nullmutante erzeugt wurde.

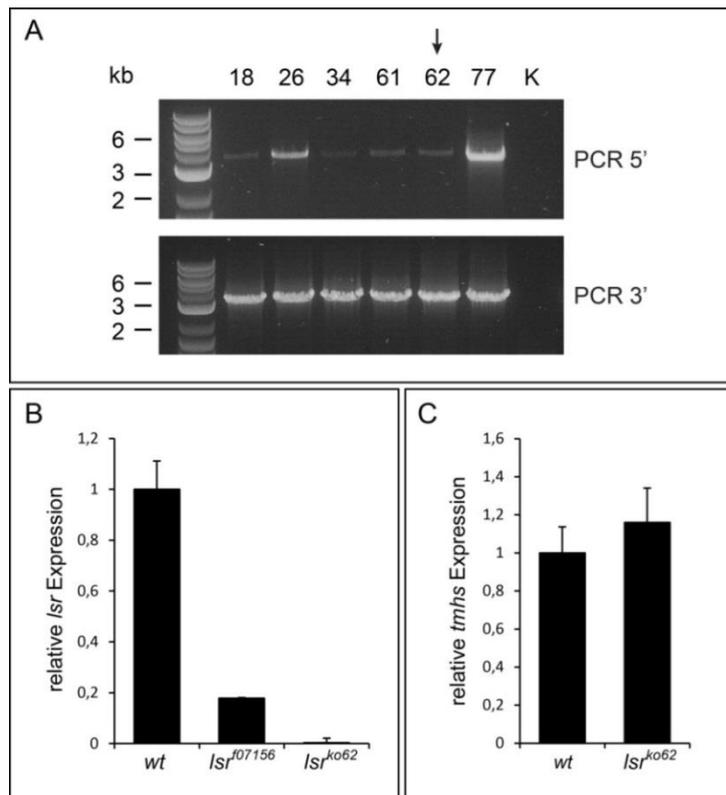


Abb. 4.10 Verifizierung der *Lsr*^{ko} Kandidaten. (A) PCR Analyse der sechs *Lsr*^{ko} Kandidaten. Sowohl die PCR-Produkte des 5' Homologiearms sowie die des 3' Homologiearms zeigen im Agarosegel bei allen Kandidaten Banden, die den erwarteten Amplikonlängen von 3766 bzw. 3447 kb entsprachen. Als Kontrolle (K) wurde die Donorlinie verwendet, bei der wie zu erwarten kein Produkt detektiert werden konnte. Die Linie 62 ist mit einem Pfeil gekennzeichnet, da diese für alle weiteren Untersuchungen verwendet wurde. (B) In der Real Time-PCR konnte in der Linie CG1887¹⁰⁷¹⁵⁶ eine Reduktion des *Lsr* Transkripts auf ~20 % detektiert werden. In der durch homologe Rekombination erzeugten Linie *Lsr*^{ko62} wurde keine *Lsr* Expression gemessen. (C) Die Real Time-PCR zeigt, dass das *Lsr* Nachbarn *tmhs* in der generierten *Lsr*^{ko62} Mutante unverändert exprimiert wird. In B und C jeweils n=3, Fehlerbalken repräsentieren den SEM.

4.4 Phänotypische Untersuchung der *Isr^{ko}* Mutanten

Wie bereits beschrieben sind die *Isr^{ko}* Mutanten homozygot letal. Um nun Rückschlüsse auf die Funktion des Scavenger Rezeptors während der Entwicklung von *Drosophila* zu ziehen, sollte zunächst durch Erstellung eines Letalitätsprofils der genaue Zeitpunkt der Letalität bestimmt werden. Durch weiterführende Analysen des Phänotyps, vornehmlich in den Geweben und Entwicklungsstadien, in denen Lsr exprimiert wird, soll im Anschluss daran die Ursache der Letalität identifiziert werden. Diese Untersuchungen sollen neben der bereits beschriebenen Charakterisierung der Proteinstruktur und des Expressionsmusters weitere Hinweise bezüglich der Proteinfunktion erbringen.

4.4.1 Überlebensrate von *Isr^{ko}* Mutanten während der Entwicklung

Für den Letalitätstest wurden zunächst homozygote *Isr^{ko}*, heterozygote *Isr^{ko}/+* und *wt* Embryonen als Kontrolltiere gesammelt. Die *wt* Larven schlüpften ca. 20 h nach Eiablage. Erstes und zweites Larvalstadium (L1 und L2), getrennt durch eine Häutung dauerten jeweils weitere 24 h. Nach einer zweiten Häutung erreichten die Larven das dritte Larvenstadium (L3) das nach weiteren 48 h endete. Die Larven verpuppten sich und vollzogen die Metamorphose in ca. 4 Tagen. Anschließend (nach insgesamt ca. 9 Tagen) schlüpften die adulten Fliegen. Während der *wt* Entwicklung konnte nur eine geringe Letalität verzeichnet werden. So starben ca. 2 % während der Embryogenese, 1 % während L2 und jeweils 5 % im L3 und Puppenstadium. Insgesamt lebten nach 14 Tagen ungefähr 88 % als adulte Fliegen (Abb. 4.11 A und B).

Die heterozygoten Mutanten (*Isr^{ko}/+*) zeigten im Vergleich zur *wt* Kontrolle nur ein gering verändertes Letalitätsprofil. Während der Embryogenese konnte eine Letalität von ca. 11 % beobachtet werden, im weiteren Verlauf des Experiments entwickelten sie sich jedoch ohne Verzögerung parallel zu den *wt* Fliegen. Insgesamt erreichten ca. 80 % das Adultstadium (Abb. 4.11 A).

Im Gegensatz zur *wt* Kontrolle und den heterozygoten Mutanten zeigten die homozygoten *Isr^{ko}* Mutanten ein stark verändertes Letalitäts- und Entwicklungsprofil. So wiesen die *Isr^{ko}* Mutanten eine Letalität von ca. 16 % während der Embryogenese auf. Weitere ~70 % starben im Verlauf der nächsten 5 Tage im Larvenstadium. Die restlichen ~10 % lebten teilweise bis zu 14 Tage als Larven (Abb. 4.11 A). Die *Isr^{ko}* Mutanten wiesen demnach eine starke Entwicklungsverzögerung bzw. einen Entwicklungsstopp auf. Insgesamt starben ~24 % als L1, ~55 % als L2 und lediglich ~5 % als L3 Larven (Abb. 4.11 B). Viele

Larven starben während der Häutung von L1 zu L2 (diese wurden in der Statistik als L2 gezählt). Dies zeigte sich daran, dass einigen toten Larven die alte Kutikula anhaftete. Dabei blieb die alte Kutikula mit den posterioren Spirakeln verbunden. Auch in lebenden Larven konnte beobachtet werden, dass der Häutungsprozess verlangsamt war und die alte Kutikula über einen längeren Zeitraum mit den Spirakeln verbunden blieb (Daten nicht gezeigt). Des Weiteren vollzogen die Mutanten keine Metamorphose und erreichten somit auch das Adultstadium nicht (Abb. 4.11 B).

Zusammenfassend wiesen die *Isr^{ko}* Mutanten eine 100 % ige Letalität vor Erreichen des Puppenstadiums auf und waren stark entwicklungsverzögert.

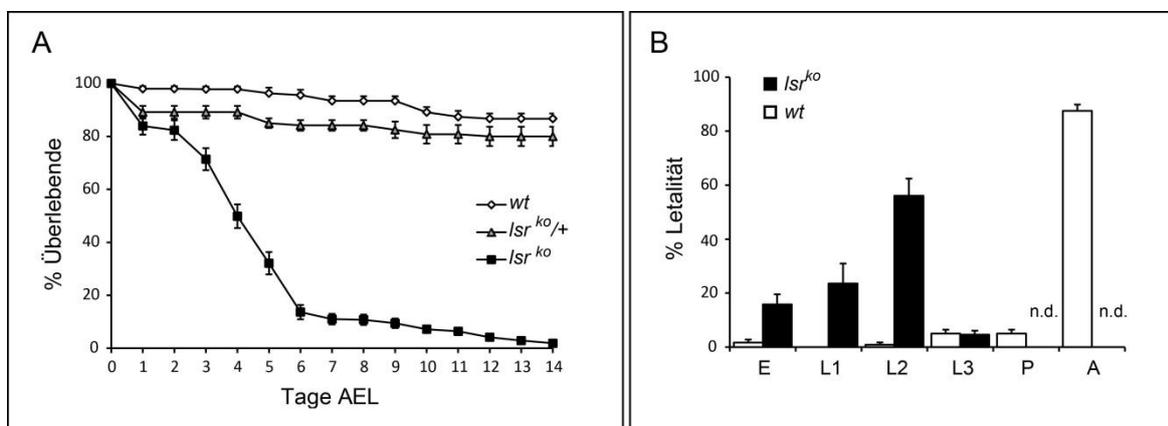


Abb. 4.11 *Isr^{ko}* Mutanten sind larval letal und stark entwicklungsverzögert. (A) Überlebensrate von *wt*, heterozygoten *Isr^{ko/+}* und homozygoten *Isr^{ko}* Mutanten in einem Zeitraum von 14 Tagen nach Eiablage (*after egg laying*, AEL). Im Verlauf der 14 Tage starben ca. 12 % der *wt* Kontrolle. Die heterozygoten Mutanten zeigten zu Beginn eine Letalität von ca. 11 %, entwickelten sich anschließend aber parallel zu *wt* Tieren. Nach 14 Tagen lebten ca. 80 %. Im Vergleich dazu starben ca. 90 % der *Isr^{ko}* Mutanten innerhalb der ersten 6 Tage nach Eiablage. Die restlichen 10 % starben innerhalb von weiteren 8 Tagen. (B) Letalitätsprofil während der *Drosophila* Entwicklung. Ca 88 % der *wt* erreichten das Adultstadium (A). Während der Embryogenese (E) starben 2 %. In L2 1 % und in L3 und dem Puppenstadium (P) jeweils 5 %. Die *Isr^{ko}* Mutanten zeigten eine ~16 %ige Letalität während der Embryogenese. In L1 starben ~24 %, in L2 ~55 % und in L3 ~5 %. *Isr^{ko}* Mutanten erreichten das Puppenstadium nicht. n.d., nicht detektierbar. n=120-180, Fehlerbalken repräsentieren die Stabw.

4.4.2 Größenwachstum und Verhalten von *Isr^{ko}* Mutanten

Neben der larvalen Letalität und der Entwicklungsverzögerung zeigten die *Isr^{ko}* Mutanten im Vergleich zu *wt* Larven einen Wachstumsdefekt (Abb. 4.12 A). Dieser konnte bereits in L1 beobachtet werden und wurde im Verlauf der Entwicklung immer drastischer. Eine Erklärung für die geringe Größe der *Isr^{ko}* Mutanten könnte das ebenfalls beobachtete veränderte Fressverhalten darstellen (Abb. 4.12 B). Im Verlauf der Larvalentwicklung

fraßen *wt* Larven kontinuierlich und befanden sich in der Regel ausschließlich in der Futterquelle (Hefe).

Im Gegensatz zu den *wt* Larven wanderten *Isr^{ko}* mutante Larven meist außerhalb der Futterquelle umher und fraßen nur wenig. Dabei gruben sie sich allerdings nicht in die Futterquelle ein, wie es bei *wt* Larven beobachtet wurde (Abb. 4.12 B). Nach einigen Tagen befanden sich viele der *Isr^{ko}* Mutanten in der Plastikumrandung der Petrischale, wo sie nach kurzer Zeit austrockneten.

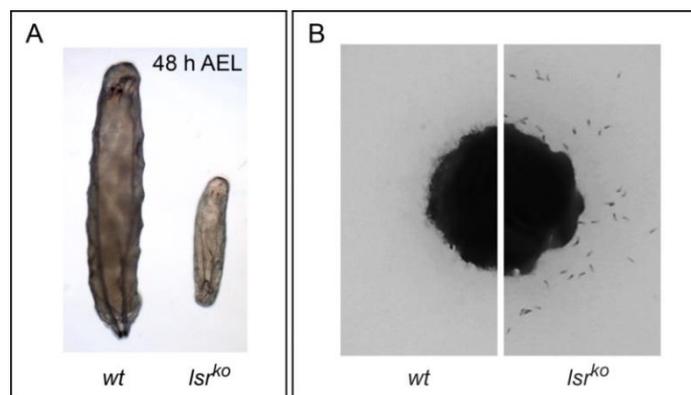


Abb. 4.12 *Isr^{ko}* Mutanten zeigen ein reduziertes Größenwachstum und verändertes Fressverhalten. (A) Mikroskopische Aufnahme einer *wt* und *Isr^{ko}* Larve, 48 h AEL. Die *Isr^{ko}* Mutante ist deutlich kleiner als die *wt* Larve. (B) Aufnahme von *wt* und *Isr^{ko}* Larven auf Apfelsaftagarplatten, 48 h AEL. Abgebildet ist jeweils die Hälfte jeder Platte, in der Mitte befindet sich die Hefe als Futterquelle. Auf beiden Platten befinden sich 80 Larven. *wt* Larven befinden sich innerhalb der Hefequelle und sind daher nicht sichtbar. *Isr^{ko}* Larven halten sich außerhalb der Futterquelle auf.

4.4.3 Morphologie der posterioren Spirakel von *Isr^{ko}* Mutanten

Um nun die Ursache der larvalen Letalität und der beobachteten Phänotypen festzustellen sollten die Gewebe, in denen *Lsr* im Wildtyp exprimiert wird, in den *Isr^{ko}* Mutanten untersucht werden. Daher wurde zunächst die Morphologie der posterioren Spirakel von st 17 Embryonen, in denen *Isr* während der Entwicklung erstmals exprimiert wird, analysiert.

Mit Kutikulapräparationen wurde zunächst eine spezielle extrazelluläre Matrix in den Spirakeln, der so genannte Filzkörper untersucht. Es zeigte sich jedoch, dass in st 17 *Isr^{ko}* Embryonen im Vergleich zu *wt* Embryonen keine offensichtlichen Unterschiede in diesem Bereich festzustellen waren (Abb 4.13 A, B). Die kutikulären, sensorischen Haare wiesen in den *Isr^{ko}* Mutanten ebenfalls keine Veränderungen auf (Abb. 4.13 B).

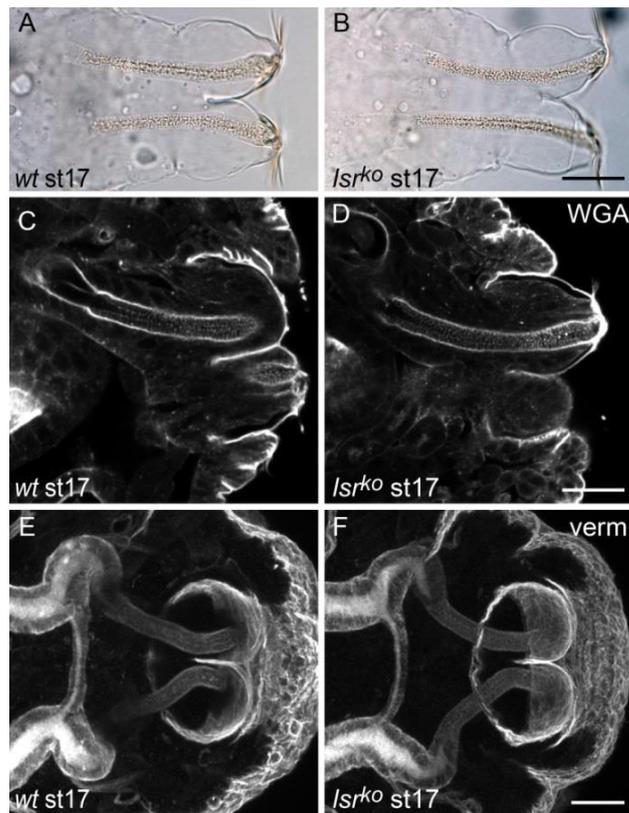


Abb. 4.13 Extrazelluläre Matrix und Struktur der posterioren Spirakel von *Isr^{ko}* Mutanten sind während der späten Embryogenese intakt. (A, B) Die Kutikulapräparationen von *wt* (A) und *Isr^{ko}* (B) st 17 Embryonen zeigen keine offensichtlichen Unterschiede. (C, D) Immunfärbung mit WGA. Zellmembranen und extrazellulären Matrix sind ebenfalls unauffällig in *Isr^{ko}* Mutanten. (E, F) Die Immunfluoreszenzfärbung des Chitin-modifizierenden Proteins Vermiform (Verm) zeigt ebenfalls keine morphologischen Veränderungen in *Isr^{ko}* Mutanten (F) im Vergleich zum *wt* (E) (Projektion mehrere konfokaler Bilder). Maßstabsbalken: 100 μ m.

Neben Kutikulapräparationen wurden zu diesem Zweck auch Färbungen mit fluoreszenzmarkiertem *Wheat Germ Agglutinin* (WGA), einem Lektin, das an N-Actylglucosamin bindet und dadurch Zellmembranen und extrazelluläre Matrix anfärbt, durchgeführt. Auch hier konnten keine Unterschiede im Aufbau der extrazellulären Matrix oder der Morphologie der Spirakel festgestellt werden (Abb. 4.13 C, D). Des Weiteren wurde eine Immunfärbung von Vermiform (Verm), einem sekretierten Chitin-modifizierenden Enzym, durchgeführt. Verm ist Bestandteil der Kutikula sowie des Chitinkabels, das während der Embryogenese im Tracheensystem liegt und während der Entwicklung für das Breitenwachstum der Tracheenäste entscheidend ist (Luschig et al., 2006). Konfokale Fluoreszenzaufnahmen ließen ebenfalls keine Unterschiede in der Verm Markierung von *wt* und *Isr^{ko}* Embryonen erkennen (Abb. 4.13 C, D). Auch die Verbindung von Spirakel und dorsalen Tracheenästen, sowie das Chitinkabel schienen in *Isr^{ko}* Mutanten intakt zu sein (Abb. 4.13 C, D). Darüber hinaus ließ die α -Spektrin Markierung

keine morphologischen Auffälligkeiten bzw. Defekte der Integrität des Gewebes der Spirakel von *Isr^{ko}* Mutanten im Vergleich zu *wt* Embryonen erkennen (Abb. 4.5 D' und E').

4.4.4 Physiologie der posterioren Spirakel von *Isr^{ko}* Mutanten

Wie in 4.4.3 beschrieben konnten keine morphologischen Auffälligkeiten in der Struktur der Spirakel von *Isr^{ko}* Mutanten während der Embryogenese beobachtet werden. Da zu diesem Zeitpunkt, also kurz vor dem Schlüpfen der Larve auch die Gasfüllung des Tracheensystems stattfindet, sollte nun untersucht werden ob Lsr bei diesem Prozess eine Rolle spielt.

Die Gasfüllung von *Isr^{ko}* Mutanten während des st 17 der Embryogenese verlief zu Anfang normal. So konnte genau wie bei *wt* Embryonen die Entstehung der Gasblase und die anschließende Ausbreitung der Gasfüllung auf die Tracheenäste beobachtet werden. Allerdings stoppte die Gasfüllung des Tracheensystems der *Isr^{ko}* Mutanten bei Erreichen der posterioren Spirakel (Abb. 4.14 B, Pfeil). In ca. 90 % der Fälle konnten diese bei *Isr^{ko}* Embryonen nicht vollständig mit Gas gefüllt werden (Abb. 4.18 A).

Die *Isr^{ko}* Embryonen verharrten 1-3 h länger in diesem Zustand als die *wt* Kontrolltiere, bei denen die Gasfüllung in wenigen Minuten vollzogen war. Schließlich schlüpfen die Mutanten ohne Belüftung der Spirakel (Abb. 4.14 B). In einigen Fällen konnte jedoch nach dem Schlüpfen eine verspätete Gasfüllung beobachtet werden.

Des Weiteren besitzen posteriore Spirakel im Larvenstadium eine wichtige Funktion bei der Aufrechterhaltung einer Barriere, die das Eintreten von wässrigen Substanzen in das respiratorische System verhindert.

Diese Permeabilität der Spirakel sollte nun mit Hilfe des Farbstoffes Erioglaucin in *wt* und *Isr^{ko}* Larven des ersten Larvenstadiums getestet werden. Nach mehrmaligen Waschen der Larven zeigte sich bei *Isr^{ko}* im Gegensatz zu *wt* Larven, dass die Flüssigkeit über die posteriore Spirakel in das Tracheensystem eingedrungen war (Abb 4.14 D und F, Pfeile). Somit scheint Lsr in der Tat für die Barrierefunktion der posterioren Spirakel essentiell zu sein.

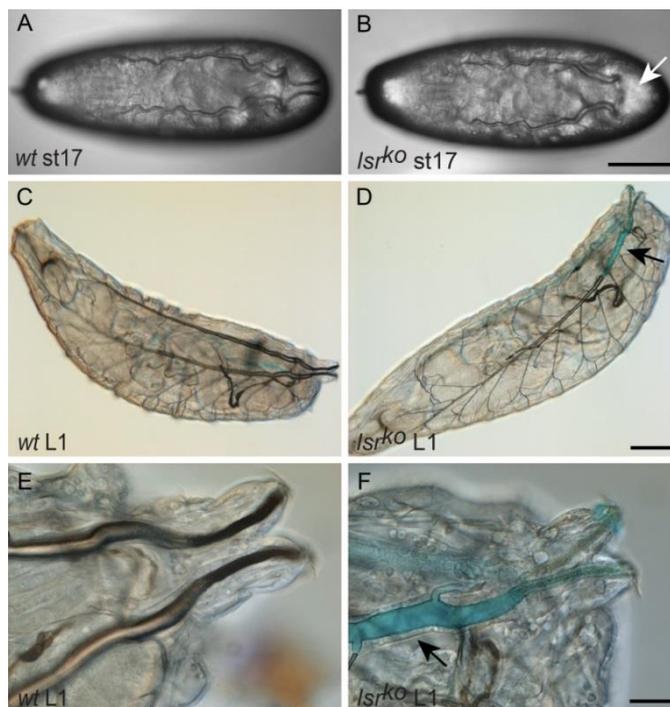


Abb. 4.14 Lsr ist für die Gasfüllung und Barrierefunktion der posterioren Spirakeln wichtig. (A, B) Durchlichtmikroskopische Aufnahmen von st 17 Embryonen zeigen, dass die posterioren Spirakeln von *Isr^{ko}* Mutanten (B, Pfeil) im Vergleich zu *wt* Embryonen (A) während der späten Embryogenese nicht mit Gas gefüllt werden. (C-F) Untersuchung der Permeabilität von posterioren Spirakeln durch Inkubation von L1 Larven mit 10% Erioglaucin in PBS. (C, E) Die blau gefärbte Flüssigkeit kann nicht in das Tracheensystem von *wt* Larven eindringen. (D, F) Die blaue Flüssigkeit dringt durch die posterioren Spirakeln bei *Isr^{ko}* Larven in das Tracheensystem, jedoch nicht in das umliegende Gewebe ein (Pfeile in D und F). Maßstabsbalken: 100 μ m in B und D; 20 μ m in F.

Aufgrund dieses mutanten Phänotyps wurde das Gen CG1887 von *lethal scavenger receptor* nun in *leaky spiracles* umbenannt, die Abkürzung *Isr* wurde jedoch beibehalten.

Um zu überprüfen, ob der Barriere Defekt auf eine fehlende hydrophobe Schicht zurückzuführen ist, sollten die sekretorischen Drüsenzellen der Spirakeln auf ihren Lipidgehalt untersucht werden (Abb. 4.15 C). Hierzu wurden die posterioren Spirakeln von L1 Larven frei präpariert und mit Oil Red O gefärbt. Hierbei konnten sowohl bei *wt* als auch bei *Isr^{ko}* Larven in den Drüsenzellen sowie in den Gängen Lipidtröpfchen sichtbar gemacht werden (Abb 4.15, Pfeile).

Zusammenfassend konnte in *Isr^{ko}* Mutanten also ein Barriere Defekt der posterioren Spirakeln, jedoch keine nachweisbaren Veränderungen in der Lipidspeicherung der Drüsenzellen detektiert werden.

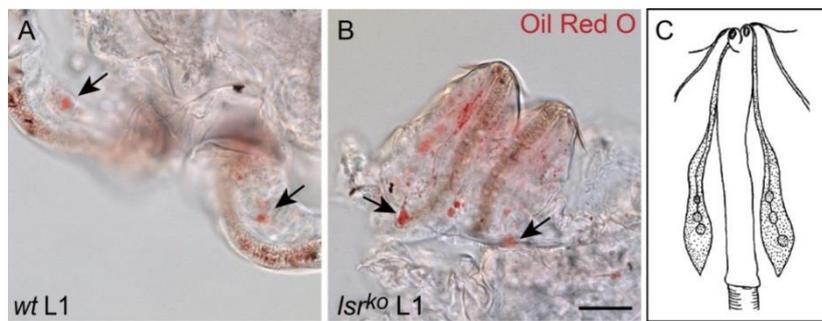


Abb. 4.15 Die Lipidspeicherung der sekretorischen Zellen der posterioren Spirakel erscheint in *Isr^{ko}* Mutanten unverändert. Oil Red O Färbung der posterioren Spirakel von L1 Larven. Sowohl in *wt* (A) als auch in *Isr^{ko}* (B) Larven konnten Lipidtröpfchen (Pfeile) in den Drüsenzellen sowie in den Gängen nachgewiesen werden. (C) Schematische Darstellung der Lipiddrüsen von posterioren Spirakeln (nach Rizki 1956). Maßstabsbalken: 20 μ m.

4.4.5 Tracheenwachstum von *Isr^{ko}* Mutanten

Neben den beschriebenen Defekten in Gasfüllung und Barrierefunktion der Spirakel, konnten im Laufe der Larvalentwicklung in *Isr^{ko}* Mutanten weitere, das Tracheensystem betreffende Phänotypen beobachtet werden. So wurde mittels Durchlichtmikroskopie festgestellt, dass die dorsalen Tracheenäste von *Isr^{ko}* Mutanten im Vergleich zu *wt* Larven bereits im L1 Stadium verkürzt waren. Im Laufe der Entwicklung wurde die Verkürzung des Tracheensystems in Bezug zur Gesamtlänge der Larven ausgeprägter. So zeigten die Tracheenäste vor allem nach der Häutung zu L2 eine deutliche Verkürzung, die damit einherging, dass die posterioren Spirakel in die Körperhöhle gezogen wurden (Abb. 4.16 C, Pfeil). In vielen Fällen führte dieser mit dem Wachstum der Larve progressiv verlaufende Phänotyp schließlich zu einer solch starken Überdehnung, die zum Zerreißen der dorsalen Äste führte (Abb. 4.16 D, Pfeil).

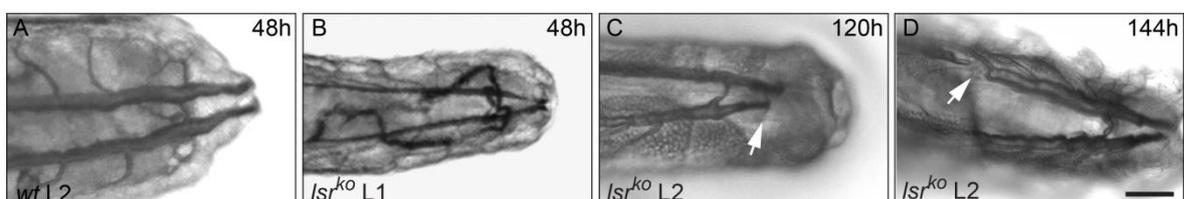


Abb. 4.16 *Isr^{ko}* Larven zeigen defektes Tracheenwachstum. Durchlichtmikroskopische Aufnahmen von *wt* und *Isr^{ko}* Larven. Im Vergleich zu *wt* Larven (A) besitzen die Mutanten (B, C, D) verkürzte dorsale Tracheenäste. Nach 48 h (B) ist der Phänotyp kaum sichtbar, wird jedoch nach der Häutung zu L2 (120 h) aufgrund des Larvenwachstums deutlich und führt dazu, dass die posterioren Spirakel in die Körperhöhle gezogen werden (C, Pfeil). In vielen Fällen führt die Überdehnung schließlich zum Zerreißen der dorsalen Äste (D, Pfeil). Maßstabsbalken: 125 μ m.

4.4.6 Funktion des Atmungssystems von *Isr^{ko}* Larven

Die Wachstumsdefekte des Tracheensystems, die schließlich zum Zerreißen der dorsalen Äste führen treten zeitgleich mit der beobachteten larvalen Letalität auf (siehe 4.4.1). Ein dadurch auftretender Sauerstoffmangel könnte also die Ursache der Letalität darstellen. Außerdem ist bekannt, dass ein auftretender Sauerstoffmangel bei *Drosophila* Larven binnen weniger Sekunden zu einem veränderten Verhalten führen kann. So hören die Larven unter Hypoxie umgehend auf zu fressen und verlassen die Futterquelle. Im weiteren Verlauf wandern sie gezielt zu saubereren Flächen der Agarplatte oder versuchen sogar die Petrischale zu verlassen. Darüber hinaus bleiben hypoxische Larven in ihrer Entwicklung stehen (Wingrove and O'Farrell, 1999).

So könnte also das bei *Isr^{ko}* Larven beobachtete Wanderverhalten und die reduzierte Futteraufnahme (siehe 4.4.2) ein hypoxisches Verhalten anzeigen, dass aufgrund des defekten Tracheensystems auftritt. Um diese Hypothese zu überprüfen sollte mittels Real Time-PCR analysiert werden, ob Hypoxie-Gene bei *Isr^{ko}* mutanten Larven hochreguliert sind. Hierzu wurden die Gene *branchless* (*bnl*), *hairy*, *scylla* und *charybdis* (*chr*) ausgewählt. Branchless ist das *Fibroblast growth factor* (FGF) Homolog in *Drosophila* und ist während der Entwicklung des Tracheensystems an der Bildung von Verzweigungen durch Aktivierung der Zellmigration beteiligt (Sutherland et al., 1996). Auch bei Hypoxie wird es hochreguliert und initiiert nach Bindung an den Rezeptor Breathless, das Auswachsen von Tracheenästen, wodurch eine bessere Sauerstoffverteilung gewährleistet wird (Jarecki et al., 1999). Der Transkriptionsfaktor Hairy wird ebenfalls bei Sauerstoffmangel verstärkt exprimiert und bewirkt die Suppression verschiedener Gene des Metabolismus um die Hypoxie-Toleranz zu erhöhen (Zhou et al., 2008). Scylla und Chrb sind Homologe des REDD1 Proteins und fungieren als negative Wachstumsregulatoren. Sie werden ebenfalls bei Hypoxie transkriptionell hochreguliert. Dabei wird die *scylla* Genexpression durch den Transkriptionsfaktor HIF-1 (*Hypoxia inducible factor*) kontrolliert (Reiling and Hafen, 2004).

Für die Real Time-PCR wurden 65 h alte *Isr^{ko}* Mutanten und gleichaltrige *wt* Larven als Kontrolle verwendet. Die Analyse zeigte, dass alle getesteten Hypoxie-Gene in den Mutanten im Vergleich zum *wt* signifikant hochreguliert waren (Abb. 4.17). So war *bnl* um das 1,6-fache induziert und *hairy* um das 3-fache. *scylla* und *chr* zeigten ebenfalls eine signifikant erhöhte Expression um das 2,8- bzw. 2,6-fache. Die Ergebnisse des Real Time-PCR Experiments lassen in der Tat darauf schließen, dass *Isr^{ko}* Larven unter Hypoxie leiden.

Zusammenfassend ergaben die phänotypischen Analysen von *Isr^{ko}* Mutanten, neben zunächst auftretenden Gasfüllungs- und Barriere-defekten der posterioren Spirakel, im weiteren Verlauf der Larvalentwicklung eine gravierende Fehlfunktion des Tracheenwachstums, welche vermutlich die Ursache eines Sauerstoffmangels darstellt. Außerdem wurde ein verändertes Fress- und Wanderverhalten sowie eine Entwicklungsverzögerung der Larven beobachtet. *Isr^{ko}* Mutanten starben noch vor der Metamorphose, vorwiegend in L1 und L2.

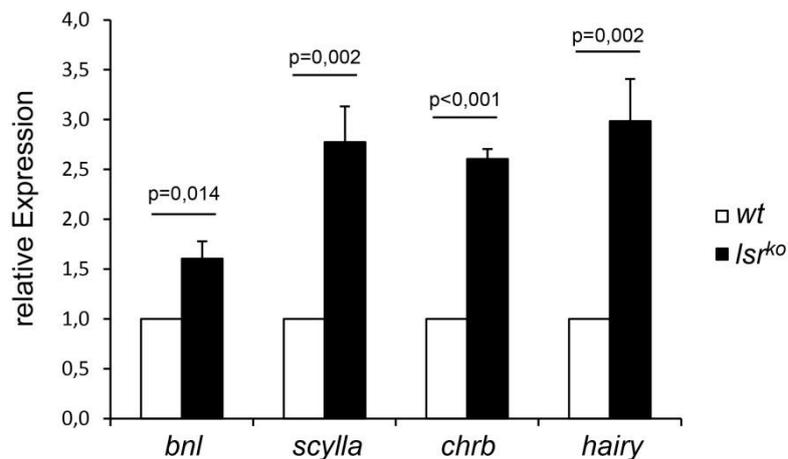


Abb. 4.17 Hypoxie-Gene sind in *Isr^{ko}* Larven hochreguliert. Real Time-PCR Analyse von *Isr^{ko}* Mutanten 65 h AEL. Die Hypoxie-Gene *branchless (bnl)*, *hairy*, *scylla* und *charybdis (chrb)* werden in *Isr^{ko}* Mutanten im Vergleich zu *wt* Larven signifikant hochreguliert. *bnl* ist um das 1,6-fache und *hairy* um das 3-fache hochreguliert. Die Gene *scylla* und *chrb* zeigen eine Expression, die um das 2,8- bzw. 2,6-fache im Vergleich zu *wt* Larven erhöht ist. n=5, Fehlerbalken repräsentieren den SEM, p-Werte mittels T-Test (ungepaart) zum Vergleich von *wt* und *ko*.

4.5 Untersuchung der gewebspezifischen *Isr* Expression

Um nun heraus zu finden ob die *Isr^{ko}* vermittelte Letalität während der Larvalentwicklung tatsächlich auf die fehlende Funktion von *Lsr* in den posterioren Spirakeln zurückzuführen ist, sollten genetische Rettungsexperimente durchgeführt werden. Hierzu soll *Isr* mit Hilfe des Gal4-UAS-Systems (Brand and Perrimon, 1993) ektopisch in den posterioren Spirakeln von *Isr^{ko}* Mutanten exprimiert werden. Die Fliegen sollen anschließend auf eine mögliche Rettung der beschriebenen Phänotypen und der larvalen Letalität hin untersucht werden. Darüber hinaus soll mit Hilfe von *Isr* Überexpressionsstudien auch der Einfluss eines Funktionsgewinns (*gain of function*) auf die *Drosophila* Entwicklung untersucht

werden. Hierbei auftretende Phänotypen könnten weitere Hinweise auf die Funktion des Scavenger Rezeptors erbringen.

4.5.1 Genetische Rettung von *Isr^{ko}* Mutanten

Zur Durchführung der Rettungsexperimente wurde zunächst eine UAS-*Isr* Fliegenlinie generiert. Dazu wurde die kodierende Sequenz von *Isr* aus dem cDNA Klon IP12256 amplifiziert und in den Vektor pUAST kloniert. Der Vektor wurde anschließend für die Herstellung transgener Fliegenlinien verwendet. Die Funktionalität der erhaltenen Linien wurde mittels *in situ*-Hybridisierung (Abb. 4.4 A) und Real Time-PCR überprüft (Abb. 4.22 A). Anschließend wurde eine stabile Fliegenlinie erzeugt, die neben der *Isr^{ko}* Mutation das UAS-*Isr* Konstrukt besitzt.

Für die spezifische Expression in den posterioren Spirakeln wurden Treiberlinien ausgewählt, die Gal4 in diesem Bereich exprimieren. Hierfür kamen nach Literaturrecherche und Angaben des *Bloomington Drosophila Stock Centers* die Linien MJ12a-Gal4, bab1-Gal4, dpp-8B6A-Gal4 und 69B-Gal4 in Frage. Da *Lsr* während der Larvalentwicklung auch im Fettkörper exprimiert wird, wurden ebenfalls die Linien cg-Gal4 und *Isp2*-Gal4 verwendet, die Gal4 spezifisch im Fettkörper exprimieren. In die genannten Gal4-Linien wurde ebenfalls durch Kreuzungen das in dieser Arbeit erzeugte *Isr^{ko}* Allel eingebracht. Anschließend wurden diese Linien jeweils mit der Linie gekreuzt, die die *Isr^{ko}* Mutation sowie das UAS-*Isr* Konstrukt besitzt.

Hierbei konnte mit den Linien bab1-Gal4, dpp-8B6A-Gal4, cg-Gal4 und *Isp2*-Gal4 keine Rettung der larvalen Letalität von homozygoten *Isr^{ko}* Mutanten erreicht werden. Die Expression von *Isr* mit 69B-Gal4 in *Isr^{ko}* Mutanten führte allerdings zu einer partiellen Rettung der larvalen Letalität. So entwickelten sich einige Larven bis zur Puppe, starben allerdings während der frühen Metamorphose. Mit der Linie MJ12a-Gal4 konnte hingegen eine vollständige Rettung der beschriebenen Phänotypen und der larvalen Letalität erzielt werden. Die geretteten Tiere zeigten während der späten Embryogenese keine Gasfüllungsdefekte (Abb. 4.18 A) und entwickelten sich bis ins Puppenstadium ohne Verzögerung (Abb. 4.18 B). Jedoch starben die Tiere beim Schlüpfen aus der Puppe (Abb. 4.18 C) bzw. im Anschluss daran. Die adulten Tiere wiesen Blasen in den Flügeln und eine weiche, nur schwach pigmentierte Kutikula auf (Abb. 4.18 D).

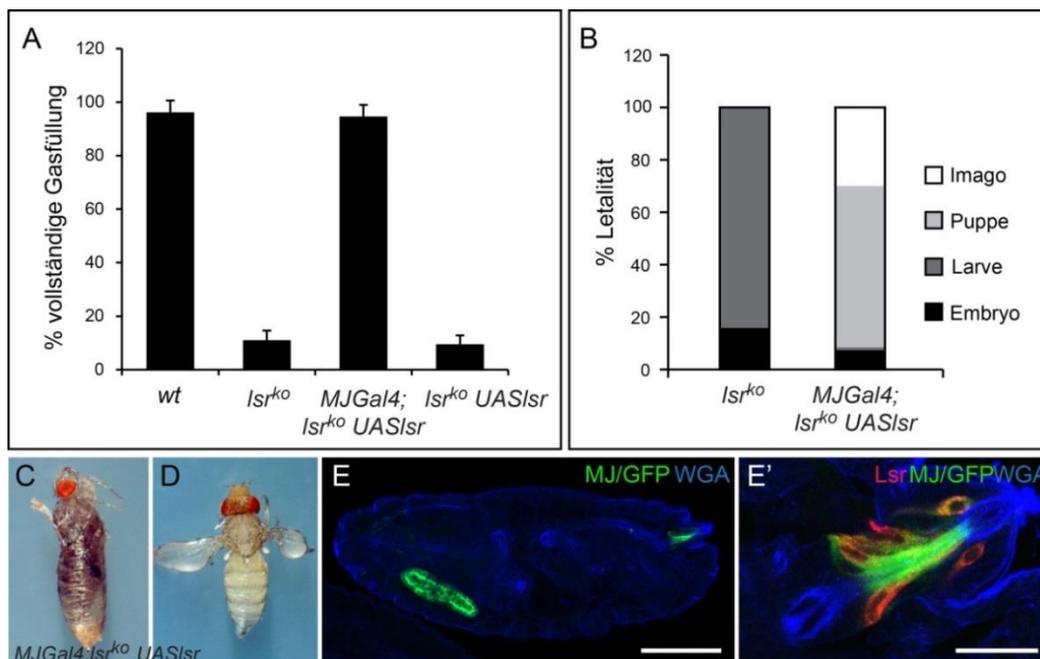


Abb. 4.18 *Isr^{ko}* vermittelte Letalität kann durch ektopische *Isr* Expression in den Spirakeln gerettet werden. (A) Die Quantifizierung der Gasfüllung zeigt, dass nur ca. 10 % der *Isr^{ko}* Mutanten während der Embryogenese eine komplette Gasfüllung aufweisen. Der Gasfüllungsdefekt von *Isr^{ko}* Mutanten kann durch MJ12a-Gal4 vermittelte *Isr* Expression gerettet werden. Die Gasfüllung der geretteten Tiere entspricht der von *wt* Embryonen. Die Kontrolle *Isr^{ko}, UAS-Isr* verhält sich wie *Isr^{ko}* alleine. n= 120-140, Fehlerbalken repräsentieren die Stabw. (B) Letalitätsprofil von *Isr^{ko}* Mutanten im Vergleich zu den geretteten Tieren mit dem Genotyp *MJ12a-Gal4; Isr^{ko}, UAS-Isr*. *Isr^{ko}* Mutanten sterben vorwiegend während der Larvalentwicklung (84,2 %, dunkelgrau), während die Letalität von *MJ12a-Gal4; Isr^{ko}, UAS-Isr* in der Metamorphose (61,6 %, hellgrau) oder im Adultstadium (30 %, weiß) erfolgt. n= 120-140 (C, D) *Isr^{ko}* Fliegen, die durch MJ12a-Gal4 vermittelte Expression von UAS-*Isr* gerettet wurden. Die Fliegen sterben beim Schlüpfen aus der Puppe (C) oder kurz danach (D). (E, E') Immunfluoreszenzfärbungen eines st 17 Embryos, der UAS-mCD8GFP unter der Kontrolle von MJ12a-Gal4 (MJ/GFP) exprimiert. Die Kofärbung von GFP (grün) und WGA (blau) zeigt die spezifische Expression von MJ/GFP in den Speicheldrüsen und den posterioren Spirakeln (E), wo es mit Lsr (rot) kolokalisiert (E'). Maßstabsbalken: 100 µm in E; 20 µm in E'.

Um nun zu überprüfen in welchen Geweben die Treiberlinie MJ12a-Gal4 aktiv ist, wurde sie mit der Linie UAS-mCD8GFP gekreuzt. Hierbei konnte während der späten Embryonal- und gesamten Larvalentwicklung eine GFP Expression in den posterioren Spirakeln sowie den Speicheldrüsen detektiert werden. Auch in den anterioren Spirakeln konnte in späten Larvenstadien eine GFP Expression verzeichnet werden. Darüber hinaus zeigte die Fluoreszenzmikroskopie, dass MJ12a-Gal4 während der Larvalentwicklung im Fettkörper aktiv ist (Daten nicht gezeigt).

Eine anschließende Immunfluoreszenzmarkierung von GFP und Lsr in späten Embryonen zeigte, eine eindeutige Kolokalisation von GFP und Lsr in Zellen der Spirakelkammer sowie in den Zellen, die mit dem Neuron des sensorischen Organs assoziiert sind (Abb 4.17 E'). Somit ist in der Tat die Lsr Funktion in den Spirakeln für das Überleben der Tiere

entscheidend. Möglicherweise trägt auch die Expression im Fettkörper von MJ12a-Gal4 dazu bei. Die Expression im Fettkörper alleine führte jedoch zu keiner Rettung der Letalität.

Zusammenfassend zeigten die Rettungsexperimente, dass die beschriebenen Phänotypen und die larvale Letalität von *Isr^{ko}* Mutanten tatsächlich auf einen Genfunktionsverlust von *Isr* in den posterioren Spirakeln während der Entwicklung zurückzuführen ist.

4.5.2 Ektopische *Isr* Überexpression

Um nun einen Funktionsgewinn von *Isr* auf die Tiere zu untersuchen wurde die UAS-*Isr* Linie mit verschiedenen Gal4 Treiberlinien gekreuzt. Die beobachteten Phänotypen sind in Tab. 4.1 aufgelistet.

Die ubiquitäre Expression von *Isr* mit den Treiberlinien daughterless-Gal4 und actin-Gal4 führte zu larvaler Letalität, vorwiegend in L2. Bei der Expression von *Isr* im Auge mit GMR-Gal4 oder mit dem Treiber *rst*-Gal4, der spezifisch in Pigmentzellen aktiv ist, zeigte sich eine teilweise fehlende Pigmentierung (Abb. 4.19 B) sowie einige nekrotische oder apoptotische Zellen (Abb. 4.19 B, Pfeil). Die Expression mit *cg*-Gal4 im larvalen Fettkörper und den Hämocyten führte zu fehlenden Borsten auf dem Skutellum von adulten Fliegen (Abb. 4.19 C, D). Die Expression im L3 Fettkörper mit *Isp2*-Gal4 führte hingegen zu keinerlei offensichtlichen Phänotypen. Eine *Isr* Expression im gesamten Tracheensystem offenbarte Defekte bei der Gasfüllung. Die Tiere starben noch im ersten Larvenstadium.

Gal4-Linie	Ort der <i>Isr</i> Expression	Phänotypen
daughterless-Gal4	ubiquitär	letal in L2
actin-Gal4	ubiquitär	letal in L2
GMR-Gal4	Auge	unregelmäßige Pigmentierung und degenerierte Ommatidien im Auge
<i>rst</i> -Gal4	Pigmentzellen im Auge	unregelmäßige Pigmentierung und degenerierte Ommatidien im Auge

cg-Gal4	Fettkörper und Hämocyten	fehlende Borsten auf dem Skutellum
Isp2-Gal4	Fettkörper (L3)	kein Phänotyp
breathless-Gal4	Tracheensystem	keine Gasfüllung in st17, letal in L1
elav-Gal4	zentrales Nervensystem	letal in L2
Feb36-Gal4	Ringdrüse	kein Phänotyp
69B-Gal4	Epidermis, Imaginalscheiben, Tracheensystem (schwach)	pupal letal
MJ12a-Gal4	Spirakel, Fettkörper	kein Phänotyp

Tab. 4.1 Die ektopische Expression von *Isr* führt abhängig vom Expressionsort zu einer Vielzahl von unterschiedlichen Phänotypen. Auflistung der Gal4-Linien, Ort der Expression und Phänotypen. Die Überexpressionsstudien wurden teilweise in Zusammenarbeit mit P. Carrera durchgeführt.

Auch die Expression mit elav-Gal4 in Neuronen des zentralen Nervensystems führte zu Letalität in L2. Die Expression in der Ringdrüse mit Feb36-Gal4 lieferte hingegen keine Phänotypen. Wurde *Isr* durch 69B-Gal4 in der Epidermis, sowie in Imaginalscheiben und im Tracheensystem (schwach) exprimiert, starben die Tiere im späten Puppenstadium. Die Larven in denen *Isr* mit MJ12A-Gal4 ektopisch in den Spirakeln exprimiert wurde zeigten keine Phänotypen.

Zusammengefasst konnte eine Vielzahl unterschiedlicher Phänotypen, abhängig vom Ort der *Isr* Expression, beobachtet werden. Somit zeigten viele Gewebe eine hohe Sensitivität gegenüber einer verstärkten *Isr* Expression.

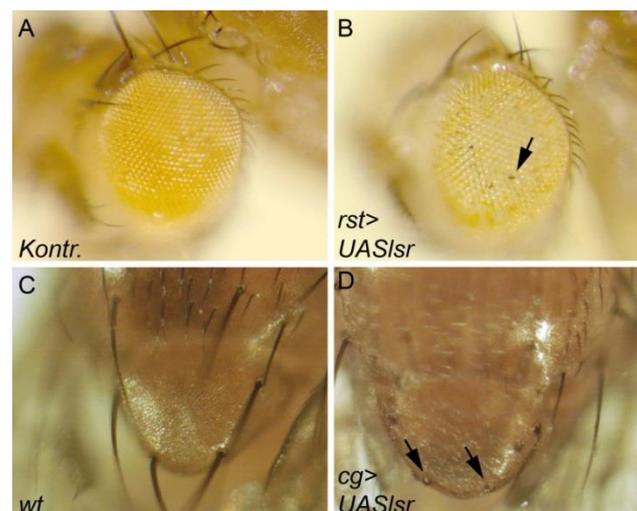


Abb. 4.19 Ektopische Expression von *Lsr* führt zu Phänotypen im Auge und im Skutellum abhängig vom Expressionsort. (A) Auge der Kontroll-Linie *w; +; UAS-Lsr*. (B) Die Überexpression von *Lsr* in Pigmentzellen des Auges führt zu einer teilweise fehlenden Pigmentierung und einigen degenerierten Ommatidien (schwarze Bereiche, Pfeil). (C) *wt* Skutellum einer adulten Fliege. (D) Ektopische Expression von *Lsr* mit *cg-Gal4* führt zu fehlenden Borsten auf dem Skutellum (Pfeile).

4.6 Zellbiologische Untersuchungen der *Lsr* Funktion

Immunfluoreszenzmarkierungen von *Lsr* in den posterioren Spirakeln zeigten, dass *Lsr* in einem vesikulären Muster lokalisiert ist (Abb. 4.5 D). Darüber hinaus wurden am C-terminus von *Lsr* ähnlich wie bei LIMP-2, lysosomale Zielsequenzen identifiziert (siehe 4.1.4). Um die Funktion von *Lsr* auf Zellebene zu untersuchen und somit die molekulare Ursache der beschriebenen Phänotypen bei *Lsr* Verlust oder Überexpression zu identifizieren, sollte zunächst die subzelluläre Lokalisation des Scavenger Rezeptors analysiert werden. Hierzu erfolgte eine Koloalisationsstudie mit Hilfe von Immunfärbungen.

4.6.1 Subzelluläre Lokalisation von *Lsr*

Zur Untersuchung der Lokalisation wurden Doppelmarkierungen von *Lsr* und Markerproteinen, die spezifisch für bestimmte Zellorganellen sind, in den posterioren Spirakeln von späten Embryonen durchgeführt. Für die Markierung des ERs wurde die Fliegenlinie *UAS-GFP.KDEL* verwendet (Adamson et al., 2011). Der Golgi-Apparat wurde mit Hilfe der Linie *UAS-Grasp65.GFP* markiert (Kaido et al., 2009). Eine Markierung von

Peroxisomen und Lysosomen wurde durch die Linien UAS-GFP.SK1 (Chen et al., 2010) bzw. UAS-GFP.LAMP-1 (Pulipparacharuvi et al., 2005) erzielt. Um eine Expression der GFP-Fusionsproteine in den Lsr-exprimierenden Zellen der posterioren Spirakel zu erreichen, wurden die UAS-Fliegenlinien jeweils mit der Linie MJ12a-Gal4 gekreuzt (siehe 4.5.5).

Zur Untersuchung einer möglichen Kollokalisierung von Lsr und den jeweiligen Fusionsproteinen wurden Immunfluoreszenzmarkierungen von Lsr und GFP durchgeführt. Die Markierung von frühen und späten Endosomen wurde hingegen durch direkte Antikörperfärbungen der GTPasen Rab5 bzw. Rab7, die spezifisch für die jeweiligen Endosomen sind, (Chavrier et al., 1990) an *wt* Embryonen erreicht. Die Plasmamembran wurde durch einen anti-E-Cadherin-Antikörper visualisiert.

Die Immunfluoreszenzmarkierungen zeigten, dass Lsr partiell mit dem ER-Marker GFP.KDEL kollokalisiert (Abb. 4.20 A-A“, Pfeil). Auch im Golgi-Apparat konnte es durch partielle Kollokalisierung mit dem Fusionsprotein GFP.Grasp65 detektiert werden. Dabei schien Lsr vor allem im *trans*-Golgi Netzwerk zu akkumulieren (Abb. 4.20 B-B“, Pfeil). Im Gegensatz dazu, zeigte Lsr keine Überlappung mit dem peroxisomalen Marker GFP.SK1 (Abb. 4.20 C-C“). Darüber hinaus lokalisierte Lsr im Zellkortex und teilweise auch an der Plasmamembran, wie eine Kollokalisierung mit dem Membranmarker E-Cadherin zeigte (Abb. 4.20 D-D“). Zusammenfassend konnte Lsr in Kompartimenten des sekretorischen Weges detektiert werden.

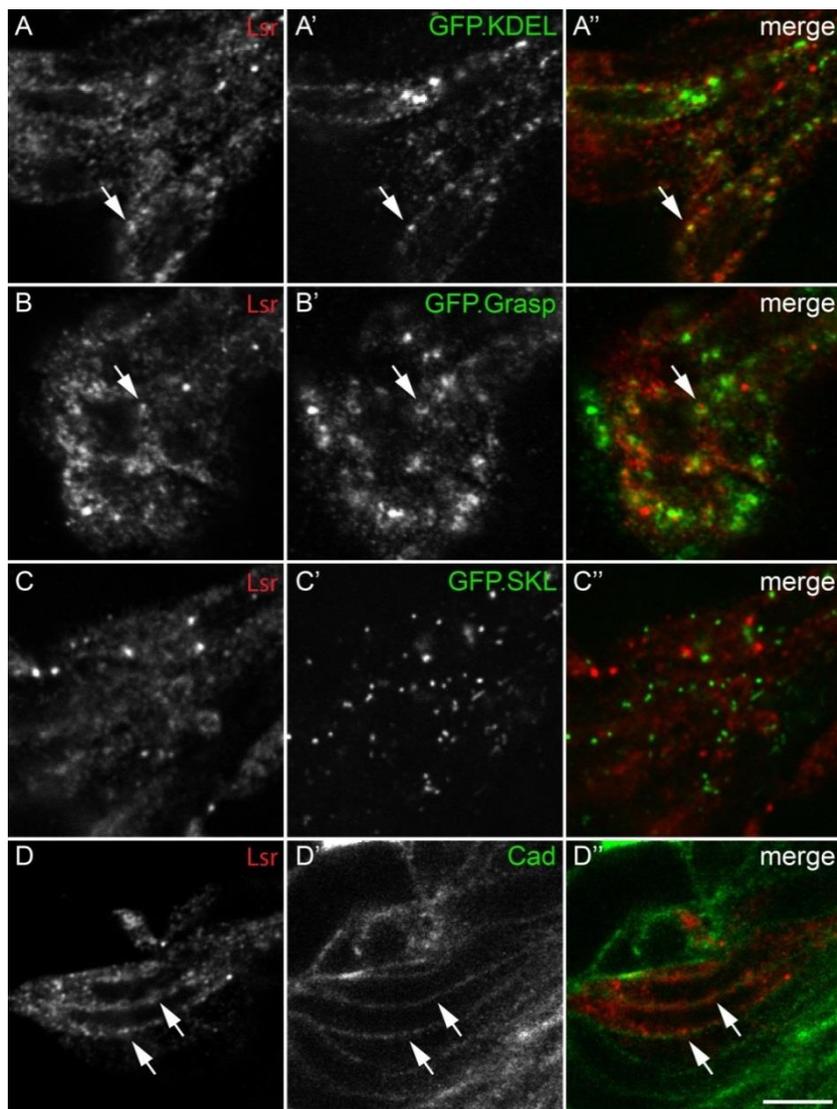


Abb. 4.20 Lsr kolokalisiert partiell mit ER-, Golgi- und Membran-Markern. (A-C) Immunfluoreszenzmarkierungen von Lsr (rot) und GFP-Fusionsproteinen (grün) in st 17 Embryonen. Die Fusionsproteine unter der Kontrolle von UAS werden durch den Treiber MJ12a-Gal4 in den posterioren Spirakeln exprimiert. (A-A'') Die Färbung von Lsr (A) und dem ER-Marker GFP.KDEL (A') zeigt eine partielle Kolokalisation (A'', Pfeil). (B-B'') Der Golgi-Marker GFP.Grasp65 (B') und Lsr (B) lokalisieren ebenfalls teilweise in räumlicher Nähe (B'', Pfeil). (C-C''). Die Lsr Markierung (C) zeigt keine Überlappung mit dem peroxisomalen Protein GFP.SKL (C'). (D-D'') Lsr (D) lokalisiert teilweise an der Plasmamembran, wie eine Markierung mit E-Cadherin (Cad, D') zeigt (D'', Pfeile). Maßstabsbalken: 5 μ m in D''.

Die Immunfärbungen von Lsr und Rab5 zeigten keine direkte Kolokalisation. Allerdings waren die Lsr-positiven Vesikel in räumlicher Nähe zu den durch Rab5-markierten frühen Endosomen (Abb. 4.21 A-A'', Pfeil). Die Doppelfärbung von Lsr und dem für späte Endosomen spezifischen Rab7 zeigte hingegen eine eindeutige Kolokalisation der beiden Proteine (Abb. 4.21 B-B'', Pfeil). Auch in Lysosomen konnte Lsr aufgrund einer starken

Überlappung mit dem lysosomalen Marker GFP.LAMP-1 detektiert werden (Abb. 4.21 C-C', Pfeil). Somit konnte Lsr tatsächlich wie durch die Sequenzanalyse vorhergesagt (siehe 4.1.1), im spät endosomalen/lysosomalen Kompartiment detektiert werden.

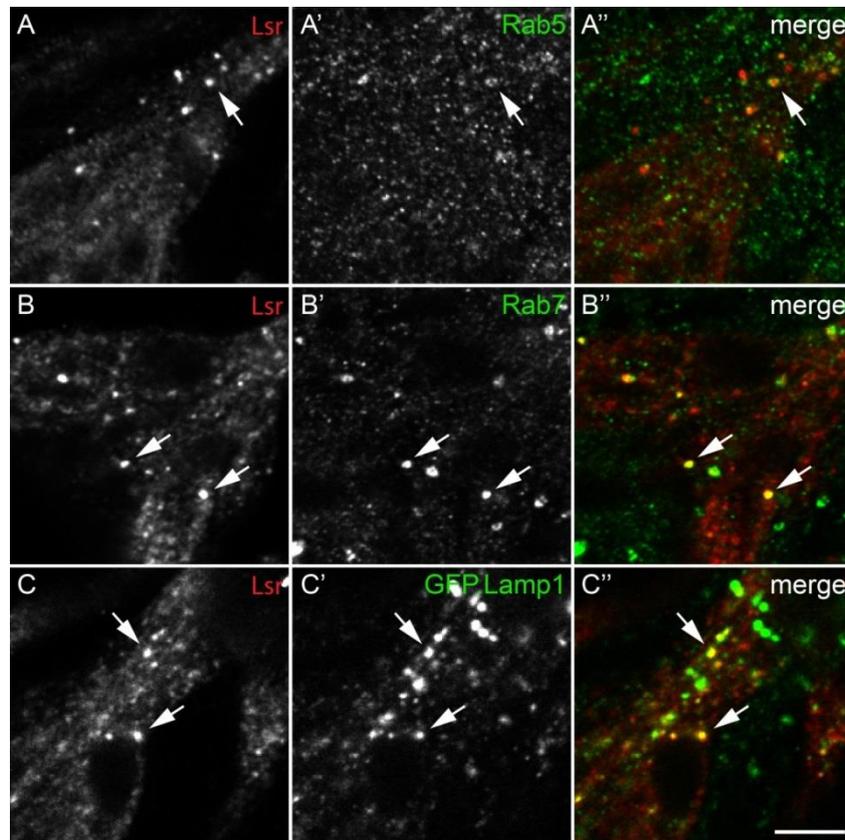


Abb. 4.21 Lsr ist in späten Endosomen und Lysosomen lokalisiert. (A-C) Immunfluoreszenzmarkierungen von Lsr (rot) und einem subzellulären Marker (grün) in den posterioren Spirakeln von st 17 Embryonen. (A-A'') Die Färbung von Lsr (A) und dem frühen Endosomenmarker Rab5 (A') zeigt, dass die Lsr-positiven Vesikel mit frühen Endosomen assoziiert sind (A'', Pfeil). (B-B'') Lsr (B) ist mit dem späten Endosomenmarker Rab7 (B') kolokalisiert (B'', Pfeil). (C-C'') Kofärbung von Lsr (C) und GFP (C') auf Embryonen, die UAS-GFP.LAMP-1 durch MJ12a-Gal4 in posterioren Spirakeln exprimieren. Lsr kolokalisiert eindeutig mit dem lysosomalen Marker GFP.LAMP-1 (C'', Pfeil). Maßstabsbalken: 5 μ m in C''.

4.6.2 Lysosomale Lsr Funktion

4.6.2.1 Lsr Funktion bei der programmierten Autophagie während der Entwicklung

Wie die Kolokalisationsstudie zeigte, ist Lsr subzellulär in späten Endosomen und Lysosomen lokalisiert. Des Weiteren konnte im Rahmen dieser Arbeit durch *in situ*-Hybridisierungen gezeigt werden, dass *Lsr* am Ende des L3 Stadiums im Fettkörper

exprimiert wird (siehe Abb. 4.7). Zu diesem Zeitpunkt wird die programmierte Autophagie des Fettkörpers initiiert, der dadurch beginnend im Wanderungsstadium und während der Metamorphose abgebaut wird (Rusten et al., 2004). Da das lysosomale Kompartiment bei der Autophagie eine entscheidende Rolle spielt, sollte nun untersucht werden, ob *Lsr* Einfluss auf diesen Prozess nimmt.

Hierzu wurde mittels Real Time-PCR der Einfluss einer *Lsr* Überexpression bzw. eines *knock downs* im Fettkörper auf die Expression von Autophagie-spezifischen Genen untersucht. Die Überexpression von *Lsr* erfolgte mit Hilfe der UAS-*Lsr* Linie (siehe 4.5.1). Für den *knock down* wurden zwei UAS-*Lsr*^{RNAi} Linien des *Vienna Drosophila RNAi Centers* verwendet (Dietzl et al. 2007, www.vdrc.at). Um einen stärkeren Effekt zu erzielen wurde durch Kreuzungen eine Linie erzeugt, die beide UAS-*Lsr*^{RNAi} Konstrukte beinhaltet (UAS-*Lsr*^{RNAi KK,GD}). Zur Expression der Konstrukte wurde die Fettkörper-spezifische *cg-Gal4* Linie verwendet. Um die RNAi Effizienz noch weiter zu erhöhen wurde für das *knock down* Experiment ein UAS-*Dcr-2* Konstrukt, in die *cg-Gal4* Linie gekreuzt (Dietzl et al., 2007). Zur Kontrolle wurden die *cg-Gal4*-Linien jeweils gegen *wt* Fliegen gekreuzt.

Für die Real Time-PCR wurden L3 Larven des Wanderungsstadiums der Nachkommen der verschiedenen Kreuzungen verwendet. Um die *Lsr* Überexpressions- bzw. *knock down*-Effizienz zu überprüfen, wurde in beiden Bedingungen neben den Autophagie-Genen *atg7*, *atg8a* und *atg18* auch das *Lsr* Transkriptlevel untersucht. Hierbei zeigte sich, dass die *Lsr* Expression in beiden Bedingungen wie gewünscht signifikant verändert war. So war das *Lsr* Transkriptlevel in der Überexpression um das ca. 170-fache hochreguliert (Abb. 4.21 A). In *Lsr knock down* Larven war das *Lsr* Transkriptlevel auf ca. 25% reduziert (Abb. 4.21 D). Allerdings wurde das Transkriptlevel in beiden Bedingungen in gesamten Larven untersucht, während die Expression der UAS-Konstrukte durch *cg-Gal4* jeweils nur im Fettkörper erfolgte. So ist davon auszugehen, dass die Transkriptionen im Fettkörper selbst noch viel stärker verändert waren.

Die Analyse der Autophagie-Gene in der *Lsr* Überexpression ergab, dass die getesteten Gene *atg7*, *atg8a* und *atg18* zwar nicht signifikant aber dennoch tendenziell verstärkt exprimiert wurden (Abb. 4.22 A). In der *Lsr knock down*-Bedingung zeigte sich ebenfalls eine leicht erhöhte Expression der Autophagie-Gene (Abb. 4.22 B).

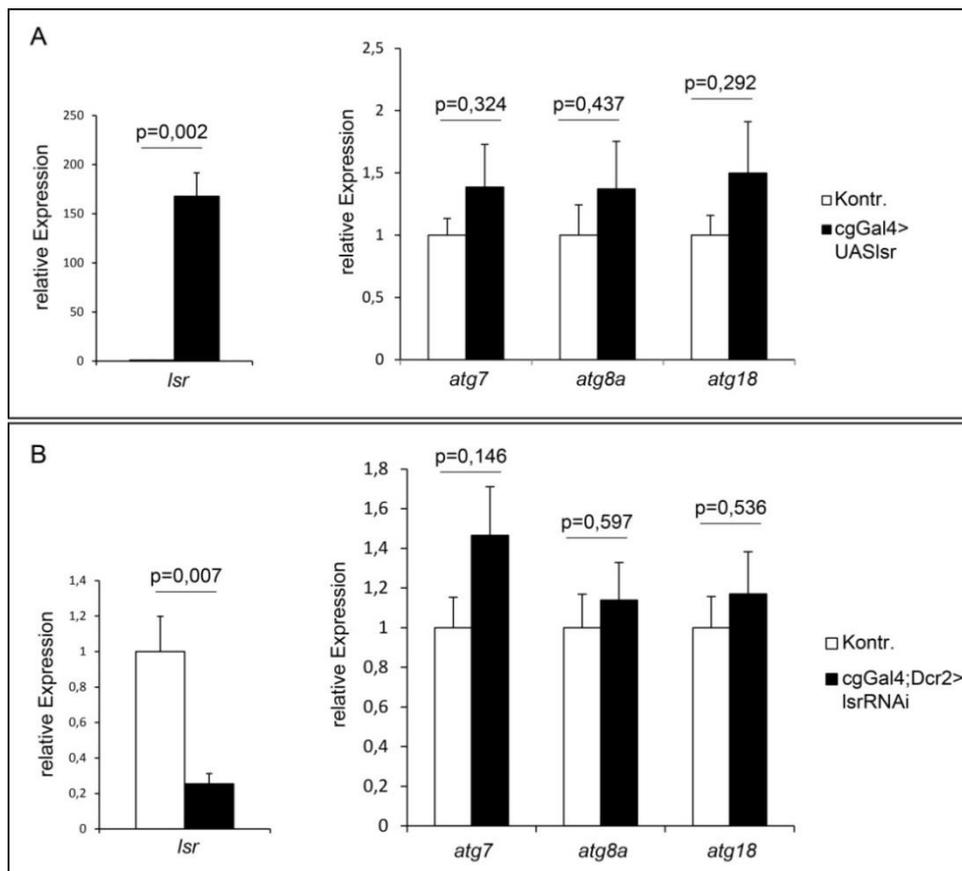


Abb 4.22 Die Expression von Autophagie-Genen ist nach *Lsr* Überexpression bzw. *knock down* leicht erhöht. Transkriptanalysen mittels Real Time-PCR in L3 Larven des Wanderungsstadiums. (A) *Lsr* wird mit cg-Gal4 im Fettkörper überexprimiert. Als Kontrolle (Kontr.) wurde die cg-Gal4 Linie mit *wt* Fliegen gekreuzt. (A) *Lsr* wird durch Überexpression mittels cg-Gal4 um das ca. 170-fache hochreguliert. Die Autophagie-Gene *atg7*, *atg8a* und *atg18* sind leicht induziert. (B) *Knock down* von *Lsr* im Fettkörper durch Expression des UAS-*Lsr*^{RNAi} Konstrukts mit cg-Gal4;Dcr-2. Kontr.: cg-Gal4;Dcr-2>*wt*. *Lsr* ist durch RNAi auf ca. 25% herunterreguliert. Die Transkriptionslevel der Autophagie-Gene sind leicht erhöht. Jeweils n=5, Fehlerbalken repräsentieren den SEM, p-Werte mittels T-Test (ungepaart) zum Vergleich von Kontr. und OE bzw. RNAi.

4.6.2.2 Einfluss von Lsr auf die Größe des lysosomalen Kompartiments

Wie Sequenzvergleiche der CD36-Domänen von Lsr und den humanen Klasse B Scavenger Rezeptoren zeigten besitzt Lsr die stärkste Homologie zu LIMP-2 (siehe 4.1.13). Darüber hinaus ist es ähnlich wie LIMP-2 subzellulär in späten Endosomen und Lysosomen lokalisiert. Nun sollte untersucht werden, ob es auch ähnliche Funktionen wie der humane Scavenger Rezeptor besitzt und wie LIMP-2 die Größe des lysosomalen Kompartiments beeinflusst. So wurde in Zellkultur gezeigt, dass eine Überexpression von LIMP-2 zu vergrößerten späten Endosomen und Lysosomen führte (Kuronita et al., 2002). LIMP-2 *knock out* Mäuse zeigten außerdem eine Akkumulation von Lysosomen, die sich

auch in einer verstärkten Expression von LAMP-1 darstellte (Gamp et al., 2003). Um den Einfluss von *Lsr* auf die Größe und Anzahl von Lysosomen zu untersuchen, wurde eine Mosaikanalyse am Fettkörper von L3 Larven durchgeführt. Hierzu wurde das FRT *flip out* System angewendet, das es ermöglicht, die *Lsr* Expression gezielt in Zellklonen zu modulieren. Für Überexpression und *knock down* wurden jeweils die Linien UAS-*Lsr* bzw. UAS-*Lsr*^{RNAi KK,GD} verwendet.

Zur Visualisierung des lysosomalen Kompartiments wurde der Fettkörper aus L3 Larven des Wanderungsstadiums isoliert und mit dem Farbstoff LysoTracker angefärbt, der sich gezielt in saure Kompartimente einlagert. Dadurch werden neben Lysosomen auch Autolysosomen markiert.

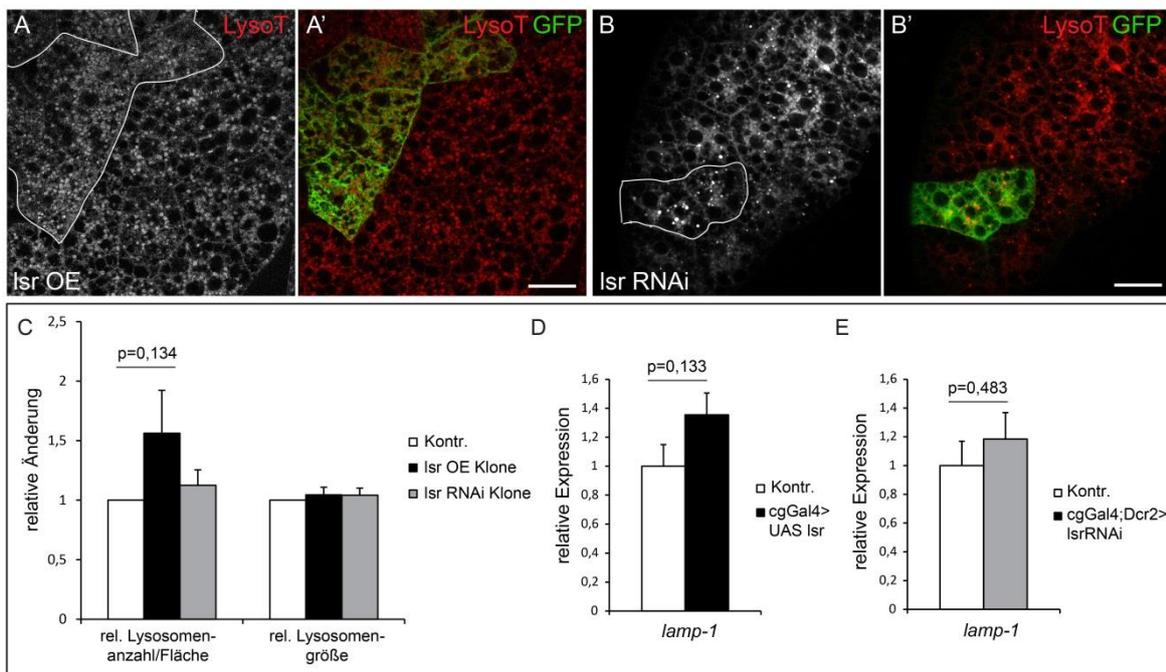


Abb. 4.23 *Lsr* Überexpression und *knock down* im Fettkörper führen zu einem leichten Anstieg der Lysosomenanzahl. (A-B) LysoTracker (LysoT)-Färbung (rot) des Fettkörpers von L3 Larven im Wanderungsstadium. Mit Hilfe der *flip out* Methode wurden *Lsr* Überexpressions- (*Lsr* OE, A-A') bzw. *knock down* (*Lsr* RNAi, B-B') Klone erzeugt. Die Klone können aufgrund ihrer GFP Expression (grün) identifiziert werden; die Grenzen des Klons sind in A und B nachgezeichnet. Die Anzahl der Lysosomen waren in *Lsr* OE- (A) sowie in *Lsr* RNAi-Zellen (B) im Vergleich zu den umliegenden Zellen leicht erhöht. (C) Die Quantifizierungen der relativen Lysosomenanzahl pro Fläche, basierend auf den LysoTracker-Färbungen, zeigen einen 1,5 fachen Anstieg der Lysosomenanzahl in *Lsr* OE Klonen. In *knock down* Klonen konnte ein leichter Anstieg der Lysosomenanzahl verzeichnet werden. Die relative Lysosomengröße war in beiden Bedingungen unverändert. (in Zusammenarbeit mit D. Gosejacob). n=7-11, Fehlerbalken repräsentieren den SEM, p-Werte mittels T-Test (ungepaart) zum Vergleich von Kontr. und OE. (D-E) Transkriptanalysen mittels Real Time-PCR ergaben eine leichte Induktion von *lamp-1* bei *Lsr* Überexpression (D) bzw. *knock down* (E) im gesamten Fettkörper mit Hilfe von *cg-Gal4*. In D und E n=5, Fehlerbalken repräsentieren den SEM, p-Werte mittels T-Test (ungepaart) zum Vergleich von Kontr. und OE bzw. RNAi. Kontrollen (Kontr.): *cg-Gal4>wt* in D; *cg-Gal4;Dcr-2>wt* in E. Maßstabsbalken: 50 µm in A' und B'.

Die Färbungen zeigten, dass die Lysosomen bzw. Autolysosomen in den Zellen des Fettkörpers sehr heterogen waren. So war die Anzahl und Größe der Lysosomen nicht nur vom Alter der Larven abhängig, sondern auch innerhalb eines Fettkörpers sehr unterschiedlich. Insgesamt konnten in den *lsc* überexprimierenden Zellen ein 1,5 facher Anstieg der Lysosomenanzahl, im Vergleich zum umliegenden Gewebe, detektiert werden. Die Lysosomengröße war jedoch nicht verändert (Abb. 4.23 A-A', C). Auch Zellklone, in denen die *lsc* Expression durch RNAi herunterreguliert wurde, zeigten tendenziell mehr Lysosomen. Die Lysosomengröße war wie bei *lsc* Überexpression ebenfalls unverändert (Abb. 4.23 B-B' und C).

Neben Färbungen des lysosomalen Kompartiments, wurden auch *lamp-1* Transkriptanalysen mittels Real Time-PCR durchgeführt. LAMP-1 ist eines der häufigsten lysosomalen Membranproteine und selbst an der Lysosomenbiogenese beteiligt. Als Ausgangsmaterial für die PCR wurden die unter 4.6.2.1 beschriebenen Larven verwendet, in denen die *lsc* Expression im gesamten Fettkörper hoch- bzw. herunterreguliert war. Auch hier zeigten sich sowohl bei der *lsc* Überexpression (Abb. 4.23 D) als auch beim *knock down* (Abb. 4.23 E) nicht signifikante, jedoch leicht erhöhte *lamp-1* Transkriptlevel. Zusammenfassend ergaben die LysoTracker-Färbungen und Transkriptanalysen, dass sowohl eine *lsc* Überexpression als auch ein *knock down* im Fettkörper tendenziell zu einer erhöhten Anzahl von Lysosomen/Autolysosomen führte.

4.6.2.3 Lsc Funktion in der Cholesterinhomöostase

Neben vergrößerten Lysosomen zeigten Kuronita et al. 2002 auch, dass eine LIMP-2 Überexpression auch zu einer lysosomalen Akkumulation von Cholesterin, möglicherweise als Folge eines inhibierten Membranfluss, führt.

So sollte auch der Einfluss von Lsc auf die Cholesterinverteilung im Fettkörper untersucht werden. Hierzu wurden Filipin Färbungen an larvalen Fettkörpern durchgeführt. Filipin bindet spezifisch an Cholesterin und kann aufgrund seiner Autofluoreszenz visualisiert werden. Auch hier sollten *lsc* Überexpressions- und *knock down*-Klone untersucht werden (siehe 4.6.2.2). In diesem Fall wurden die Klone allerdings mit Hilfe der Linie hsFlp; Act>CD2>Gal4; UAS-RFP erzeugt, wodurch die Klone nicht durch GFP sondern RFP Expression gekennzeichnet werden. Dies ist notwendig, da die Anregungsspektren von Filipin und GFP sehr nah beieinander liegen und eine getrennte Anregung daher nicht möglich ist.

Die Filipin-Färbungen zeigten, dass eine Überexpression von *lsc* nicht wie bei LIMP-2 zu einer Akkumulation von Cholesterin führte (Abb. 4.24 A-A'). Auch in *knock down*-

Zellklonen konnte keine Veränderung der Cholesterinverteilung im Vergleich zum umliegenden Gewebe beobachtet werden (Abb. 4.24 B-B').

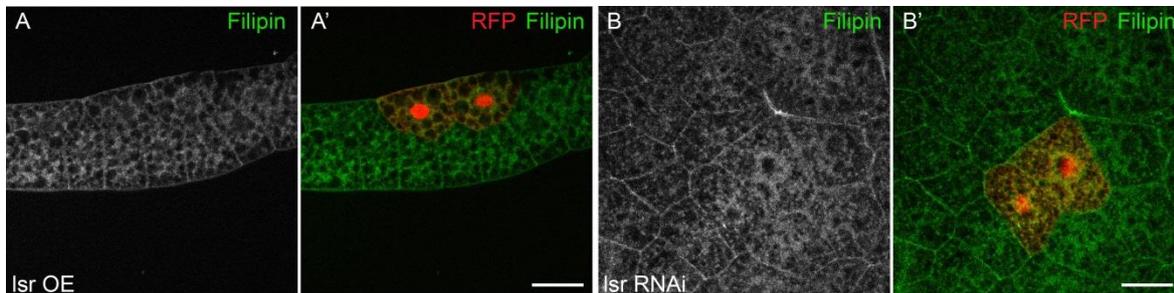


Abb. 4.24 Eine *Isr* Überexpression bzw. Herunterregulation hat keinen Einfluss auf die Cholesterinverteilung im Fettkörper. Filipin-Färbung (grün) des Fettkörpers von L3 Larven des Wanderungsstadiums. Die durch RFP (rot) markierten *Isr* Überexpressions- (A-A') bzw. *knock down*-Klone (B-B') zeigen keine Veränderung des Filipinsignals. Maßstabsbalken: 50 μ m in A' und B'.

Zusammengefasst ergaben die zellbiologischen Analysen, dass Lsr wie LIMP-2 subzellulär in späten Endosomen und Lysosomen lokalisiert ist. Untersuchungen zur Funktion von Lsr in der Autophagie des Fettkörpers, bei der Lysosomen eine entscheidende Funktion übernehmen, könnten auf eine Beteiligung von Lsr hindeuten. Weiterführende Analysen zeigten, dass Lsr einen Einfluss auf die Größe des lysosomalen Kompartiments, jedoch nicht auf den Cholesterintransport im Fettkörper von L3 Larven besitzt.

4.6.3 Potentielle Lsr Interaktionspartner

Wie die zellbiologischen Analysen zeigten, ist Lsr vorwiegend in späten Endosomen und Lysosomen lokalisiert. Nun sollten mit Hilfe eines RNAi Screens mögliche Interaktionspartner oder Prozesse in der Zelle, an denen Lsr beteiligt sein könnte, identifiziert werden.

Hierzu wurde eine Auswahl an Genen untersucht, die beispielsweise eine Funktion in Lysosomen übernehmen, in den posterioren Spirakeln exprimiert werden oder Interaktionspartner des humanen Scavenger Rezeptors LIMP-2 darstellen (für weitere Informationen zu den einzelnen Genen siehe www.flybase.org). Die Expression der ausgewählten Gene wurde dann mit Hilfe von UAS-RNAi-Linien durch Kreuzung mit MJ12a-Gal4;UAS-Dcr2 in den posterioren Spirakeln herunterreguliert. Die Tiere wurden anschließend auf Phänotypen untersucht, die denen der *Isr^{ko}* Mutanten ähneln

(Phänokopie) und somit als mögliche Interaktionspartner Hinweise auf die Funktion von Lsr erbringen. Demnach wurden die Tiere vorwiegend auf larvale Letalität und einen Wachstumsdefekt des Tracheensystems, der zur Internalisierung der posterioren Spirakel führt, untersucht (siehe 4.4). Als Kontrolle dienten die Nachkommen der Kreuzung von *w; MJ12a-Gal4; UAS-Dcr2* mit *UAS-Lsr^{RNAi KK,GD}*, die in der Tat eine Phänokopie der *Isr^{ko}* Mutanten zeigten (Abb. 4.25 B). Der Phänotyp war jedoch etwas schwächer als bei *Isr^{ko}* Mutanten (vgl. 4.4). So starben die Larven erst in L3 und zeigten eine nahezu normale Größe. Auch der beschriebene Wachstumsphänotyp des Tracheensystems sowie das beobachtete, veränderte Fressverhalten wurden geringfügig später in der Entwicklung sichtbar. Dennoch starben alle Tiere wie *Isr^{ko}* Mutanten noch vor Erreichen des Puppenstadiums.

Die entsprechenden Gene der getesteten RNAi Linien und das Auftreten einer Phänokopie sind in Tab. 4.2 aufgelistet.

Gename	CG Nummer	Phänokopie
<i>acc</i>	CG11198	-
<i>atet</i>	CG2969	-
<i>brummer</i>	CG5295	-
<i>croquemort</i>	CG4280	-
<i>crumbs</i>	CG6383	-
<i>DHR3 (HR46)</i>	CG33183	-
<i>draper</i>	CG2086	-
<i>emp</i>	CG2727	-
<i>FAS Elongase</i>	CG6660	-
<i>gcase</i>	CG31414	-
<i>KAR</i>	CG1444	-
<i>kkv</i>	CG2666	-
<i>lamp-1</i>	CG3305	-
<i>Isr</i>	CG1887	+
<i>megalin</i>	CG42611	-
<i>mmp1</i>	CG4859	-
<i>mummy</i>	CG9535	-
<i>nijA</i>	CG6449	-
<i>npc2a</i>	CG7291	-
<i>npc2b</i>	CG3153	-
<i>peste</i>	CG7228	-
<i>psidin</i>	CG4845	-
<i>rab7</i>	CG5915	-

<i>shibire</i>	CG18102	+
<i>snmp1</i>	CG7000	+
<i>snmp2</i>	CG7422	-
<i>SR-B</i>	CG10345	-
<i>SR-B</i>	CG7227	-
<i>thiolase</i>	CG4581	-
<i>uninflatable</i>	CG9138	+
<i>wasp</i>	CG1520	-
<i>wurst</i>	CG9089	+

Tab. 4.2 RNAi Screen zur Identifikation von möglichen Lsr Interaktionspartnern. Angegeben sind die entsprechenden Gene der getesteten RNAi Linien sowie das Auftreten einer Phänokopie von *Isr^{ko}* Mutanten. Diese Studie wurde in Zusammenarbeit mit P. Carrera durchgeführt.

Im Rahmen dieser Studie konnten vier Gene identifiziert werden, bei denen eine spezifische Herunterregulation der Genexpression in den Spirakeln durch MJ12a-Gal4 zu einer Phänokopie der *Isr^{ko}* Mutation führte. Hierzu gehörte das Gen *wurst*, das einen wichtigen Endozytoseregulator kodiert und an der embryonalen Gasfüllung des Tracheensystems beteiligt ist (Behr et al., 2007). Hier konnte eine Verkürzung des Tracheensystems, bzw. Internalisation der Spirakel beobachtet werden (Abb. 4.25 C). Darüber hinaus zeigten die Larven eine reduzierte Größe und ein typisches Hypoxieverhalten (siehe 4.4.6). Ein Unterschied zu *Isr^{ko}* Mutanten konnte jedoch in der Filzkörpermorphologie verzeichnet werden. So blieb der L1 Filzkörper der *wurst* RNAi Larven über die gesamte Larvalentwicklung bestehen und wurde im Rahmen der Häutung nicht durch einen neuen, größeren Filzkörper ersetzt (Abb. 4.25 C).

Konsistent mit diesem Ergebnis führte auch die Inhibition des Dynamin-Homologs Shibire in den Spirakeln zu einer Phänokopie (Abb. 4.25 D). Die Inhibierung von Shibire wurde als Ausnahme nicht durch RNAi sondern durch eine UAS-Linie, die ein dominant-negatives Shibire Protein (*shi^{DN}*) kodiert erreicht. Shibire ist eine GTPase, die die Abschnürung von Clathrin-Vesikeln von der Plasmamembran bzw. vom *trans*-Golgi Netzwerk vermittelt. Somit stellt Shibire ein Schlüsselprotein für intrazelluläre Transportprozesse dar (Hinshaw and Schmid, 1995; Marks et al., 2001). Der resultierende Phänotyp nach *shi^{DN}* Expression in den Spirakeln war dem von *Isr^{ko}* Mutanten bzw. *Isr* RNAi Larven sehr ähnlich (siehe Abb. 4.25 B und D).

Des Weiteren wurde das Gen *uninflatable* (*uif*) identifiziert, das für ein Transmembranprotein kodiert, das in der apikalen Zellmembran des Tracheensystems lokalisiert ist und vermutlich mit der Kutikula interagiert (Zhang and Ward, 2009). Darüber

hinaus konnte der Scavenger Rezeptor Snmp1 identifiziert werden. Ein *knock down* von *snmp1* in den Spirakeln führte ebenfalls zu einer Kopie des *Isr^{ko}* Phänotyps (Abb. 4.25 E).

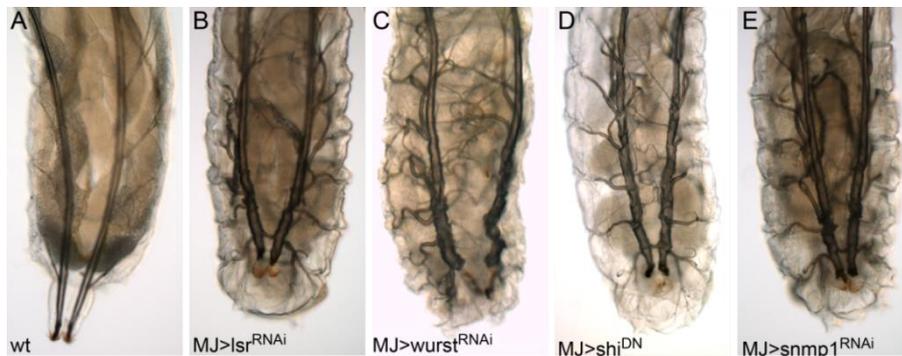


Abb. 4.25 Phänokopie der *Isr^{ko}* Mutation. (A) Durchlichtmikroskopische Aufnahme einer *wt* L3 Larve. (B) *Knock down* von *Isr* in den Spirakeln durch MJ12aGal4(MJ)>*Isr* RNAi führt zur Phänokopie der *Isr^{ko}* Mutation. (C) Ein *knock down* von *wurst* durch MJ12aGal4 zeigt einen ähnlichen Phänotyp. (D) Durch Expression eines dominant negativen Shibire Proteins (*shi^{DN}*) durch MJ12aGal4 kann eine Phänokopie der *Isr^{ko}* Mutation erzeugt werden. (E) Auch ein *snmp1 knock down* in den Spirakeln führt zu einer Phänokopie.

Zusammenfassend konnten in dem *Screen* nach potentiellen Interaktionspartnern von *Lsr* bzw. nach Faktoren, die an ähnlichen Prozessen beteiligt sind, zwei Gene identifiziert werden, deren Genprodukte an Endozytose bzw. intrazellulärem Transport beteiligt sind. Zusätzlich wurden *Uif* und der Scavenger Rezeptor *Snmp1* identifiziert.

5 Diskussion

Scavenger Rezeptoren der Klasse B sind hoch konservierte, glykosylierte Transmembranproteine. Aufgrund ihrer Ligandendiversität besitzen sie unterschiedliche Funktionen in Prozessen wie der Lipidhomöostase, der angeborenen Immunität, der Zelladhäsion oder des intrazellulären Proteintransports. Im Vergleich zu Säugetieren, die die drei Klasse B Scavenger Rezeptoren CD36, SR-B1 und LIMP-2 besitzen, kodiert das *Drosophila* Genom für 14 Klasse B Scavenger Rezeptoren. Diese wurden aufgrund von Sequenzhomologien und ihrer Genstruktur in drei Gruppen unterteilt. Dabei ist die Gruppe 1 innerhalb der Diptera (Zweiflügler) am stärksten konserviert, weshalb Genen dieser Gruppe allgemeine, zentrale Funktionen zugesprochen werden (Nichols and Vogt, 2008). Dennoch sind die Gene dieser Gruppe bisher am wenigsten untersucht.

Ein Gen dieser Gruppe stellt *lsr* (CG1887) dar, dessen Charakterisierung Gegenstand dieser Arbeit ist. Es wurde aufgrund eines P-Element-Screens ausgewählt, der ergab, dass eine Mutation im *lsr* Gen Letalität verursacht (siehe Ergebnisse 4.1). Im Vergleich dazu erreichen bisher beschriebene Klasse B Scavenger Rezeptor Mutanten das Adultstadium (Benton et al., 2007; Franc et al., 1999; Kiefer et al., 2002; Wang et al., 2007). Damit wurde der erste Klasse B Scavenger Rezeptor identifiziert, der eine zentrale, lebenswichtige Funktion besitzt, wodurch die Hypothese von Nichols & Vogt der Bedeutsamkeit von Gruppe 1 Genen gestützt wird.

Sequenzanalysen in dieser Arbeit zeigten, dass *Lsr* tatsächlich alle Charakteristika eines Klasse B Rezeptors aufweist. So besitzt es die typische Topologie von zwei vorhergesagten Transmembrandomänen und einer großen extrazellulären Schleife, die zahlreiche und wie in dieser Arbeit gezeigt auch funktionelle N-Glykosylierungsstellen aufweist (Abb. 4.1). Darüber hinaus besitzt es in der extrazellulären Schleife die für Klasse B Rezeptoren charakteristische CD36-Domäne, die möglicherweise wie bei anderen Klasse B Rezeptoren verschiedene Ligandenbindungsstellen beinhaltet (Canton et al., 2013).

Ein zentrales Ziel dieser Arbeit stellte die Erzeugung einer *lsr* Nullmutante mittels homologer Rekombination dar. Für weiterführende Untersuchungen wurde eine attP-Sequenz eingebracht, wodurch diese Mutante neben den hier durchgeführten phänotypischen Analysen auch weitere Möglichkeiten bietet. Beispielsweise kann sie in Zukunft dazu genutzt werden, *lsr* Varianten mit spezifischen Punktmutationen oder Deletionen in den ursprünglichen Locus zurückzubringen und so Funktionen einzelner Domänen detailliert zu analysieren.

Die an diesem Modell durchgeführten phänotypischen Untersuchungen ermöglichten es Rückschlüsse auf die Rolle von *lsr* während der Entwicklung zu ziehen und werden im nachfolgenden Kapitel dargelegt.

5.1 Lsr Funktion im respiratorischen System

5.1.1 Lsr wird nicht für die Morphogenese der Spirakel benötigt

Die Analyse der Lsr Expression ergab, dass *lsr* keine maternale Komponente besitzt und erst in st 17 und somit am Ende der Embryogenese exprimiert wird. *In situ* Hybridisierungen und fluoreszente Antikörperfärbungen zeigten in diesem Stadium eine sehr spezifische Expression in den posterioren Spirakeln (Abb. 4.4 und 4.5). Durch detaillierte Analysen wurde ersichtlich, dass Lsr sowohl in der Spirakelkammer als auch in Hüllzellen von Neuronen des sensorischen Organs der Spirakel exprimiert wird (Abb. 4.6). Die Morphogenese der Spirakel ist bereits in st 16 abgeschlossen (Hu and Castelli-Gair, 1999). Demnach kann Lsr nicht an Signalkaskaden der Morphogenese oder an Zellinvasionsprozessen zur Bildung der Spirakel beteiligt sein. In der Tat zeigten *lsr*^{ko} Mutanten am Ende der Embryogenese keine morphologischen Auffälligkeiten der posterioren Spirakel. So waren die Stigmatophore normal ausgeprägt und besaßen an den Öffnungen die sensorischen Haare. Auch die Spirakelkammern von *lsr*^{ko} Mutanten wurden durch Zellinvasion ausgebildet und bildeten ein kontinuierliches Lumen mit den dorsalen Hauptästen des Tracheensystems (Abb. 4.13).

Nach Beendigung der Morphogenese erfolgen der weitere Aufbau und die Differenzierung von apikaler extrazellulärer Matrix. So wird die Kutikula im Laufe von st 17 dicker und erlangt erst kurz vor dem Schlüpfen der Larve die hierfür benötigten physikalischen Eigenschaften (Moussian et al., 2006). Die Tatsache, dass *lsr* erst in st 17 exprimiert wird könnte bedeuten, dass es am Aufbau der apikalen extrazellulären Matrix der Spirakel beteiligt ist. Die Expression in der Spirakelkammer, die für die Sekretion spezifischer kutikulärer Strukturen wie Filzkörper und Spirakelplatte verantwortlich ist, bestärkt diese Hypothese. Dass die Funktion in der Spirakelkammer und nicht im sensorischen Organ entscheidend ist, zeigten Analysen mittels RNAi. So ist eine spezifische Reduktion der *lsr* Expression in der Spirakelkammer mit Hilfe der Linie *grh-Gal4* (siehe Abb. 4.6) hinreichend die weiter unten beschriebenen Phänotypen zu kopieren (Daten nicht gezeigt).

Die Untersuchungen der Spirakel ergaben allerdings keine ersichtlichen Defekte der apikalen extrazellulären Matrix in st 17. So zeigten die Kutikulapräparationen sowie Fluoreszenzmarkierung der Kutikula mit WGA in *Isr^{ko}* Mutanten keine Unterschiede der Filzkörperstruktur im Vergleich zu den Kontrolltieren (Abb. 4.13). Dennoch sind Veränderungen in der Zusammensetzung oder im Aufbau der Kutikula nicht auszuschließen, da eine Visualisierung der einzelnen Schichten, vor allem der äußersten Wachsschicht, lediglich mittels Elektronenmikroskopie möglich ist.

5.1.2 Lsr ist für die Funktionalität der Spirakel essentiell

Untersuchungen der Gasfüllung in st 17 zeigten allerdings, dass die Funktionalität der Spirakel von *Isr^{ko}* Mutanten eingeschränkt ist. So wird die Gasfüllung bei *Isr^{ko}* Embryonen in st 17 wie im Wildtyp durch Entstehung einer Gasblase in einem dorsalen Hauptast zunächst initiiert (Tsarouhas et al., 2007). Die Belüftung des Tracheensystems stoppte jedoch beim Erreichen der Spirakel (Abb. 4.14). In einigen Fällen erfolgte allerdings nach dem Schlüpfen die Gasfüllung der Spirakel. Ursachen einer defekten Gasfüllung könnten durch Defekte in endozytotischen Prozesse erklärt werden. Diese sind für die Entfernung von festen und flüssigen Bestandteilen, die sich während der Morphogenese im Tracheensystem befinden, verantwortlich (Tsarouhas et al., 2007). Einer der Schlüsselregulatoren hierfür ist das *wurst* Gen. So kann das Tracheensystem von *wurst* Mutanten nicht mit Gas gefüllt werden, was zu Letalität der Mutanten noch während der späten Embryogenese führt (Behr et al., 2007). Wurst ist im Tracheensystem für die Rekrutierung von Clathrin und Hsc70 zur apikalen Plasmamembran verantwortlich und ermöglicht so die Clathrin-vermittelte Endozytose. (Behr et al., 2007; Wingen et al., 2009).

Die beeinträchtigte Gasfüllung könnte allerdings auch einen Hinweis auf bereits vermutete Defekte in der apikalen extrazellulären Matrix darstellen. So zeigte eine neue Studie, dass eine Mutation im *waterproof* Gen ebenfalls zu defekter Gasfüllung führt (Jaspers et al., 2014). Das Gen kodiert eine Acyl CoA-Reduktase, die an der Synthese von Wachsestern, die im *Envelope* (äußerste Kutikulaschicht) eingelagert werden, beteiligt ist. Hier wird postuliert, dass fehlende hydrophobe Eigenschaften der Kutikula die Entstehung einer Gasblase und deren anschließende Ausbreitung verhindern (Jaspers et al., 2014).

Veränderungen in den physikochemischen Eigenschaften, wie zum Beispiel in der Hydrophobizität der apikalen extrazellulären Matrix der Spirakel, könnten auch bei *Isr^{ko}* Mutanten die Ursache des beobachteten Barriere-defektes darstellen. So konnte das

Eindringen einer gefärbten Flüssigkeit in das Tracheensystem über die posterioren Spirakel beobachtet werden (Abb. 4.14). Dabei drang die Flüssigkeit jedoch nicht in das umliegende Gewebe bzw. in die Hämolymphe ein, was auf eine intakte epitheliale Integrität des Tracheensystems hindeutet.

Zusätzlich zu der äußeren Wachsschicht der Kutikula besitzen die posterioren Spirakel eine weitere hydrophobe Barriere, die durch spezielle Lipiddrüsen erzeugt wird (Rizki, 1956). Diese sekretorischen Zellen sind mit den Spirakeln assoziiert und speichern große Mengen an Lipidtröpfchen, die sie über Gänge in die Öffnungen der Spirakel sekretieren und dadurch imprägnieren. Parvy et al. zeigte 2012, dass eine Reduktion der *acetyl-CoA-carboxylase* (*ACC*) in den Oenozysten zu einem verminderten Lipidgehalt in den Lipiddrüsen der Spirakel führte. Dies resultierte wie bei *Isr^{ko}* Mutanten in einem Verlust der Barrierefunktion. Färbungen der Lipide mit dem Lipidfarbstoff Oil Red O zeigten jedoch keine Veränderungen des Lipidgehalts in den Drüsenzellen von *Isr^{ko}* Mutanten an (Abb. 4.15). Ob die Lipide auch in die Spirakelöffnung sekretiert werden und dort eine hydrophobe Schicht bilden, konnte mit dieser Methode jedoch nicht untersucht werden. Da *Lsr* auch nicht in den Drüsenzellen sondern in den Epithelzellen der Kammer exprimiert wird erscheint die Hypothese, dass *Lsr* für die Sekretion des Lipidfilms wichtig ist, insgesamt als eher unwahrscheinlich. Wahrscheinlicher ist es, dass *Lsr* am Aufbau der apikalen extrazellulären Matrix beteiligt ist und somit eine Fehlfunktion der Kutikula in *Isr^{ko}* Mutanten die Ursache von Gasfüllungs- und Barrierephänotypen darstellt.

Interessanterweise zeigten die *in situ*-Hybridisierungen dieser Arbeit, dass *Isr* am Ende der Larvalentwicklung auch in den anterioren Spirakeln exprimiert wird (Abb. 4.7). Eine Expression von *Isr* sowie weiteren Klasse B Scavenger Rezeptoren in den anterioren Spirakeln wurde auch von Herboso et al. 2011 gezeigt. Die anterioren Spirakel werden erst zum Ende der Larvalentwicklung funktionsfähig. In früheren Stadien findet der Gasaustausch lediglich durch die posterioren Spirakel statt (Manning and Krasnow, 1993). Demnach wird *Isr* in solchen Spirakeln exprimiert, welche auch aktiv sind. Diese Beobachtung unterstreicht, dass *Lsr* zur Physiologie bzw. Funktionsfähigkeit der Spirakel beiträgt und somit für die Atmung des Organismus sehr wichtig ist.

5.1.3 Lsr beeinflusst Umbauprozesse der apikalen extrazellulären Matrix

Bei *Isr^{ko}* Mutanten wurde während ihrer Larvalentwicklung beobachtet, dass einige Larven während der Häutung die Kutikula nicht vollständig abstreifen konnten. Dabei blieb die alte Kutikula mit den posterioren Spirakeln verbunden. Dies zeigten auch Semidünnschnitte dieser Larven, in denen vor allem im posterioren Bereich des Tracheensystems oft mehrere Kutikulae übereinander detektiert wurden (persönliche Kommunikation mit Y. Pesch). Diese Beobachtungen lieferten Hinweise darauf, dass Lsr vermutlich nicht nur am Aufbau sondern auch an Umbauprozessen von apikaler extrazellulärer Matrix beteiligt ist.

Darüber hinaus konnte das Tracheensystem von *Isr^{ko}* Mutanten während des larvalen Wachstums nicht elongieren. Dies führte vor allem im zweiten Larvenstadium zu einer starken Überdehnung der dorsalen Hauptäste, wodurch es zur Internalisierung der Spirakel und zum Zerreißen der Tracheenäste kam (Abb. 4.16). Eine verstärkte Expression typischer Hypoxiegene, sowie das verringerte Fress- und verstärkte Wanderungsverhalten der *Isr^{ko}* Larven zeigten an, dass die Tiere im zweiten Larvenstadium einen enormen Sauerstoffmangel aufwiesen (Abb. 4.12 und 4.17). Dieser ist sehr wahrscheinlich auf die beschriebenen Defekte des Tracheensystems zurückzuführen und letztlich auch die Ursache der larvalen Letalität.

Ähnliche Phänotypen wurde auch für die *Drosophila* Mutanten des *uif* sowie des *matrix metalloproteinase 1 (mmp1)* Gens beschrieben. In beiden Fällen zeigten die Larven Häutungsdefekte und ein verringertes Tracheenwachstum, so dass die Tracheenäste einhergehend mit dem larvalen Wachstum stark gedehnt werden. Dies führte wie bei *Isr^{ko}* Mutanten schließlich zur Internalisierung der posterioren Spirakel und zum Zerreißen der dorsalen Äste (Abb. 5.1, Page-McCaw et al., 2003; Zhang and Ward, 2009).

Die Funktion von Uif ist weitestgehend unbekannt. Es handelt sich hierbei um ein Transmembranprotein, dass an der apikalen Plasmamembran der Tracheenzellen lokalisiert ist. Es wird postuliert, dass es über die extrazelluläre Domäne mit der apikalen extrazellulären Matrix interagiert und sich an Auf- und Umbauprozessen der Kutikula beteiligt (Zhang and Ward, 2009). Mmp1 ist ebenfalls in Umbauprozesse der apikalen extrazellulären Matrix, vor allem während der Häutung, involviert. So führt ein Mmp1 Funktionsverlust zu einem unvollständigen Abbau der alten Kutikula (Glasheen et al., 2010).

Die Ähnlichkeit der Phänotypen von *Isr* und *mmp1* bzw. *uif* Mutanten unterstützt die Hypothese, dass Lsr an Prozessen der Kutikula-Biosynthese bzw. des Umbaus während

der Häutung beteiligt ist. Epistase-Experimente, bei denen transheterozygoten Mutanten untersucht wurden, ließen allerdings keine Rückschlüsse auf eine genetische Interaktion von *lsr* und *mmp1* bzw. *uif* zu (Daten nicht gezeigt).

Eine wichtige Tatsache stellt in diesem Zusammenhang das unterschiedliche Expressionsmuster der Proteine dar. So werden *Mmp1* und *Uif* im gesamten Tracheensystem exprimiert (Glasheen et al., 2010), während *Lsr* spezifisch in den posterioren Spirakeln lokalisiert ist (Abb. 4.5). Somit ist es offensichtlich, dass eine korrekte Funktion der posterioren Spirakel für die Funktionalität des gesamten Tracheensystems wichtig ist. Das Tracheenwachstum stellt also einen gemeinsamen, koordinierten Prozess von posterioren Spirakeln und Tracheenästen dar.

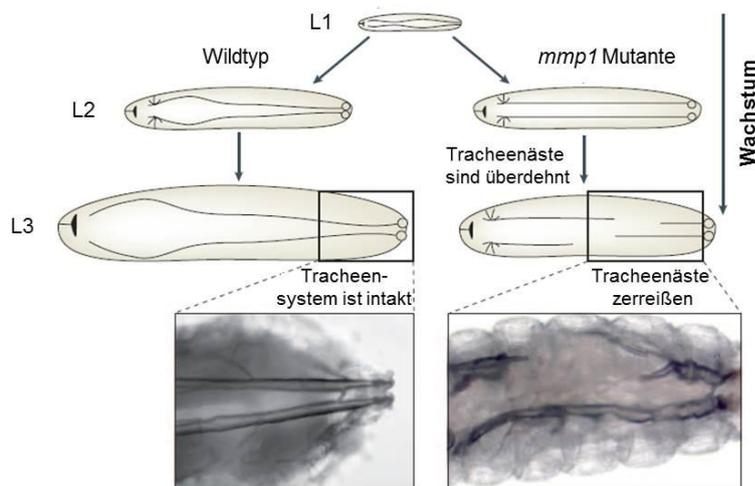


Abb. 5.1 Defektes Tracheenwachstum bei *Drosophila mmp1* Mutanten. Schematische Darstellung und mikroskopische Aufnahmen des Tracheensystems von *wt* und *mmp1* mutanten Larven während der Entwicklung. Das Tracheensystem von *mmp1* Mutanten kann wie bei *lsr^{ko}* Larven (vgl. Abb. 4.16) nicht elongieren wodurch eine Überdehnung der dorsalen Tracheenäste auftritt, die daraufhin zerreißen. (nach Page-McCaw et al. 2007)

5.1.4 Funktionsfähigkeit der Spirakel ist für die Larvalentwicklung von großer Bedeutung

Wie beschrieben führten Expressions- und Phänotypenanalysen zu dem Schluss, dass die *Lsr* Funktion in den posterioren Spirakeln wichtig für die larvale Entwicklung ist. Im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Rettungsexperimente zeigten darüber hinaus, dass die Expression von *Lsr* in diesem Organ tatsächlich essentiell für das Überleben der Larven ist. So führte eine spezifische Expression von *Lsr* in den posterioren Spirakel der

Isr^{ko} Mutanten dazu, dass die larvale Letalität sowie Fehlfunktionen des Tracheensystems vollständig aufgehoben wurden (Abb. 4.18).

Die genetische Rettung der Mutanten durch *Isr* Expression in den Spirakeln erfolgte jedoch nur über den Zeitraum der Larvalentwicklung und nicht bis zum Adultstadium. So starben die Tiere am Ende der Metamorphose bzw. während oder kurz nach dem Schlüpfen aus der Puppe (Abb. 4.18). Daraus lässt sich schließen, dass Lsr während der Metamorphose auch in anderen Organen eine wichtige Rolle spielt. Das spiegelt sich auch im Expressionsprofil während der Entwicklung wieder. So konnte im Wildtyp die stärkste Expression von *Isr* im frühen Puppenstadium verzeichnet werden (Abb. 4.7). Generell scheinen Klasse B Scavenger Rezeptoren während der Metamorphose eine wichtige Rolle zu spielen. So zeigen neben *Isr* auch andere Rezeptoren wie beispielsweise *ninaD*, *santa maria* und *crq* Expressionsmaxima während der frühen Metamorphose (Kiefer et al. 2002, www.flybase.org). In der Tat wurde in einer aktuellen Studie gezeigt, dass Lsr (von den Autoren als Debris buster (Dsb) bezeichnet) sowie Crq während der Metamorphose in der Epidermis eine wichtige Rolle bei der Phagozytose von degenerierten Dendriten spielen (Han et al., 2014).

Isr wird gegen Ende der Larvalentwicklung auch in anderen Geweben, die im Umbau begriffen sind exprimiert. So zeigte sich beispielsweise eine Expression in der Speicheldrüse sowie im Fettkörper (Abb. 4.7). Die hier beobachtete Tendenz einer Expressionsinduktion von Autophagiegenen bei *Isr* Überexpression und *knock down* könnte auf eine Beteiligung von Lsr an der programmierten Autophagie des Fettkörpers hindeuten, müsste jedoch näher untersucht werden (Abb. 4.22).

Neben dem Fettkörper wird *Isr* im dritten Larvenstadium in Imaginalscheiben exprimiert (Abb. 4.7). Die Tatsache, dass gerettete adulte Tiere Blasen in den Flügeln aufwiesen lässt vermuten, dass *Isr* auch an der Flügelentwicklung beteiligt ist (Abb. 4.18).

Im Rahmen der Rettungsexperimente war auffällig, dass verschiedene Organe sehr sensitiv gegenüber einer Überexpression von *Isr* zu sein scheinen. Abhängig vom Gewebe führte die ektopische *Isr* Expression zu verschiedenen Phänotypen und die ubiquitäre Expression sogar zu larvaler Letalität (Tab. 4.1). Die Sensitivität der Gewebe gegenüber einer erhöhten *Isr* Expression deutet darauf hin, dass die Sicherung des richtigen Lsr-Levels von großer Bedeutung ist und die *Isr* Expression vermutlich strikt reguliert ist.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Expression von *Isr* in den Spirakeln der Mutante hinreichend ist, um die larvale Letalität und die beobachteten Defekte des Tracheensystems zu retten. Allerdings wurde auch klar, dass Lsr über seine Funktion im

Tracheensystem hinaus weitere Aufgaben in anderen Geweben während der Entwicklung ausübt.

5.2 Lsr Funktion im lysosomalen Kompartiment

5.2.1 Lsr ist ein lysosomales Protein

Homologievergleiche der CD36-Domäne von Lsr mit denen der drei humanen Scavenger Rezeptoren ergab, dass die stärkste Übereinstimmung zwischen der CD36-Domäne von Lsr und der des lysosomalen LIMP-2 besteht (Abb. 4.3). Darüber hinaus ergaben Analysen der Proteinsequenz, dass Lsr am zytoplasmatischen C-Terminus drei potentielle Dileucin-Motive besitzt (Abb. 4.2). Hierbei handelt es sich um lysosomale Zielsequenzen der Abfolge DXXXLL, die von Adapterproteinen am *trans*-Golgi Netzwerk gebunden werden. Diese vermitteln einen Transport des Proteins über späte Endosomen zu Lysosomen (Dietrich et al., 1997; Pond et al., 1995). Auch LIMP-2 besitzt am C-Terminus ein Dileucin-Motiv (Höning et al., 1998; Ogata and Fukuda, 1994), das vor allem dem Motiv 3 von Lsr, in Bezug auf Sequenz und die Lage direkt am C-Terminus, stark ähnelt (Abb. 4.2).

Die in dieser Studie durchgeführten Immunfluoreszenzmarkierungen mit Hilfe des spezifischen Lsr-Antikörpers bestätigten die subzelluläre Lokalisation von Lsr in späten Endosomen und Lysosomen (Abb. 4.21). Darüber hinaus konnte Lsr partiell im ER und Golgi-Apparat sowie in der Plasmamembran lokalisiert werden (Abb. 4.20). Die Ergebnisse zur subzellulären Lokalisation von Lsr stimmen auch mit den Daten der bereits erwähnten, neuen Studie zur Phagozytose von degenerierten Dendriten überein. So zeigten auch Han et al., 2014 durch eine Kolo-kalisation mit LAMP-1, dass Lsr einen lysosomalen Scavenger Rezeptor darstellt.

Zusammenfassend ergaben somit nicht nur Sequenzvergleiche und -analysen, sondern auch die Lokalisationsstudien Hinweise darauf, dass Lsr zu Lysosomen transportiert wird und daher möglicherweise ein funktionelles LIMP-2 Homolog in *Drosophila* darstellt.

5.2.2 Lsr - Ein funktionelles LIMP-2 Homolog?

Zur Untersuchung, ob Lsr ähnlich wie LIMP-2 eine Rolle in der Lysosomenbiogenese spielt, wurde analysiert, ob Lsr wie LIMP-2 bei Überexpression zu vergrößerten späten Endosomen bzw. Lysosomen führt (Kuronita et al., 2002). Die hierzu durchgeführten Mosaikanalysen im Fettkörper zeigten allerdings, dass eine *lsr* Überexpression nicht zu vergrößerten Lysosomen führte. Ebenso konnte keine Akkumulation von Cholesterin, wie es bei einer LIMP-2 Überexpression, vermutlich aufgrund eines inhibierten Membrantransportes beobachtet wurde, detektiert werden (Abb. 4.23, Kuronita et al. 2002). Die Lysosomen zeigten also keine veränderte Morphologie, jedoch konnte infolge einer *lsr* Überexpression ein Anstieg der relativen Lysosomenanzahl beobachtet werden (Abb. 4.23). Dies spiegelte sich auch in den *lamp-1* Transkriptanalysen wieder. LAMP-1 stellt eines der häufigsten lysosomalen Membranproteine dar und ist selbst an Biogeneseprozessen beteiligt. *lamp-1* wurde bei *lsr* Überexpression im Fettkörper tendenziell verstärkt exprimiert (Abb. 4.23). Dies deutet ebenfalls auf eine erhöhte Anzahl von Lysosomen hin. Weiterführende Experimente sind jedoch nötig um den Einfluss von Lsr auf die Lysosomenbiogenese genauer zu untersuchen. Beispielsweise wäre es sinnvoll die Rolle von Lsr in der Lysosomenbiogenese in Zellkultur zu untersuchen, da der Effekt von LIMP-2 ebenfalls in diesem System gezeigt wurde. So wäre denkbar, dass das umliegende Gewebe innerhalb des Fettkörpers einen regulatorischen Einfluss auf die *lsr* Überexpressionsklone nimmt, wodurch der Effekt abgeschwächt wird. Zusammenfassend liefern die Ergebnisse erste Hinweise, dass Lsr ähnlich wie LIMP-2 einen positiven Einfluss auf die Lysosomenbiogenese besitzt. Somit könnte Lsr möglicherweise eine Rolle bei der Regulation von Teilungsereignissen von späten Endosomen, Lysosomen bzw. Autolysosomen spielen.

Weitere Experimente untermauern, dass Lsr eine Rolle bei der Biogenese von Lysosomen spielt. So führte eine Überexpression von *lsr* in Pigmentzellen des Auges von *Drosophila* zu einem partiellen Verlust der Augenfarbe (Abb. 4.19).

Die Augenfarbe wird durch zwei Pigmenttypen (Ommochrom und Drosoplerin) bestimmt, die sich innerhalb der Pigmentzellen in so genannten Pigmentgranula befinden (Shoup, 1966). Hierbei handelt es sich, ähnlich wie bei Melanosomen in Säugetieren, um spezialisierte Organellen, die aus Lysosomen hervorgegangen sind (*Lysosome-related organelles*, LROs) (Simpson et al., 1997). Ursachen fehlender Pigmentierung stellen unter anderem Mutationen dar, die Gene betreffen, deren Genprodukte an der Biogenese der Pigmentgranula beteiligt sind (Lloyd et al., 1998). Hierzu gehören solche, die Proteine

zum lysosomalen Kompartiment transportieren und somit unter anderem für die entsprechende Enzymausstattung der Granula sorgen. Dabei handelt es sich beispielsweise um Komponenten des Vesikeltransports vom *trans*-Golgi Netzwerk über späte Endosomen zu Lysosomen (z.B. Untereinheiten des Adapterproteins AP3 wie garnet oder ruby) (Huizing et al., 2002; Simpson et al., 1997).

Aufgrund der Homologie zu LIMP-2, das als Transportrezeptor der Hydrolase GCCase fungiert und sie mit Hilfe von AP-3 vom *trans*-Golgi Netzwerk zu Lysosomen transportiert sowie des beobachteten Pigmentierungsphänotyps ist es möglich, dass Lsr in die zuletzt beschriebene Gruppe von Genen gehört. So ist es denkbar, dass Lsr eine spezielle Fracht, wie ein Enzym, zu den Lysosomen transportiert. Durch eine Lsr Überexpression ist dieser Prozess möglicherweise aus dem Gleichgewicht und resultiert in einer Fehlfunktion der Pigmentgranula.

Diese Hypothese wird auch durch die Studie von Han et al. 2014 gestützt. So zeigten sie, dass Lsr zusammen mit Crq am Reifungsprozess von Phagosomen in Epidermiszellen beteiligt ist. Allerdings fungiert Lsr nicht wie Crq bei der Vesikelfusion von frühen Phagosomen, sondern viel später beim letzten Reifungsschritt des Phagolysosoms (Abb. 5.2). So führte ein *lsr knock down* dazu, dass phagozytiertes Material nicht vollständig in Phagolysosomen degradiert werden konnte. Es ist daher denkbar, dass auch hier aufgrund der verringerten *lsr* Expression eine wichtige Komponente des lysosomalen Abbaus, beispielsweise eine Hydrolase, fehlt. Dass es sich hierbei wie beim humanen LIMP-2 um die Hydrolase GCCase handelt, ist eher unwahrscheinlich. So postulieren Zachos et al. 2012 dass eine Bindung von LIMP-2 an GCCase außerhalb von Säugetieren unwahrscheinlich ist, da die hierfür wichtige Bindedomäne in anderen Spezies nicht konserviert ist. Dies konnte bei einer Analyse der Lsr Aminosäuresequenz bestätigt werden (Daten nicht gezeigt).

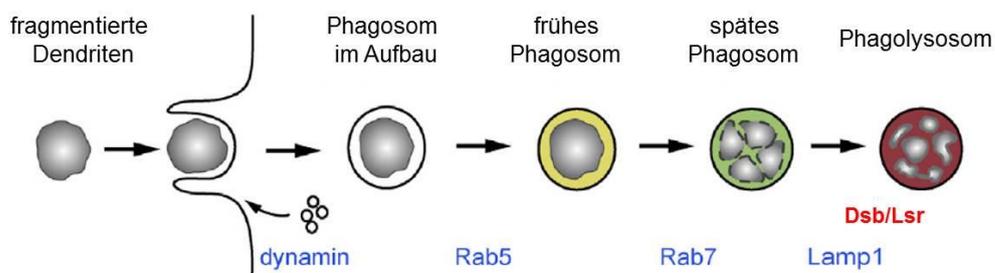


Abb. 5.2 Funktion von Lsr bei der Reifung von späten Phagosomen. Dargestellt ist die Phagozytose von fragmentierten Dendriten durch epidermale Zellen. Dsb/Lsr ist am letzten Schritte des Reifungsprozesses von Phagosomen zu Phagolysosomen beteiligt. (modifiziert nach Han et al. 2014)

Bei einer Beteiligung von Lsr an lysosomalen Abbauprozessen würde man bei einem Verlust der Lsr Funktion wie bei lysosomalen Speicherkrankheiten ggf. eine Anreicherung von Stoffwechselprodukten und dadurch eine Vergrößerung des lysosomalen Kompartiments erwarten. Dies zeigte sich in LIMP-2 defizienten Mäusen, die eine Akkumulation von Lysosomen und eine verstärkte Expression von *lamp-1* im Epithel des Ureters aufwiesen (Gamp et al., 2003). Um den Einfluss eines Lsr Verlustes zu untersuchen wurden im Rahmen der Mosaikanalysen auch *Isr knock down* Klone im Fettkörper untersucht. Hierbei zeigten sich, wie bei der Überexpression, keine signifikanten Veränderungen, jedoch konnte ebenfalls die Tendenz festgestellt werden, dass eine Reduktion von *Isr* zu einem Anstieg der Lysosomenanzahl führt (Abb. 4.23). Dies wurde auch durch Transkriptanalysen untermauert die zeigten, dass *lamp-1* nach *Isr knock down* im Fettkörper verstärkt exprimiert wird (Abb. 4.23). Ob dies tatsächlich auf fehlende Abbauprozesse zurückzuführen ist, bleibt unklar und bedarf weiterer Untersuchungen.

Interessanterweise zeigten Han et al., 2011 trotz defektem lysosomalen Abbau in Folge einer *Isr* Reduktion keine Auswirkungen auf die Anzahl oder Morphologie von Lysosomen. Denkbar wäre, dass eine Veränderung der Lysosomenmorphologie nach einem längeren Zeitraum auftritt und erst in dem bislang nicht untersuchten Adultstadium sichtbar wird. Darüber hinaus wurde hier sowie von Han et al., 2011 lediglich der Einfluss einer reduzierten *Isr* Expression untersucht. Weiterführende Analysen der Lysosomen in *Isr^{ko}* Mutanten, beispielsweise mittels Elektronenmikroskopie, könnten Klarheit bezüglich der lysosomalen *Isr* Funktion erbringen.

Zusammenfassend ergaben die Daten dennoch erste Hinweise darauf, dass Lsr eine Rolle in der Lysosomenbiogenese sowie der -funktion spielt. Möglicherweise fungiert es hierbei, ähnlich wie LIMP-2, als Transportrezeptor von Enzymen oder Membranproteinen.

5.2.3 Das lysosomale Kompartiment beeinflusst den Aufbau der apikalen extrazellulären Matrix

Wie bereits in 5.1 diskutiert sind vermutlich fehlerhafte Auf- und Umbauprozesse der apikalen extrazellulären Matrix in *Isr^{ko}* Mutanten Ursache des Verlusts der Kutikulaintegrität. Dies äußert sich zunächst in einer defekten Gasfüllung, sowie in einem Barriereverlust der posterioren Spirakel. Schließlich führen defekte Umbauprozesse im Rahmen der larvalen Entwicklung zu einer unvollständigen Häutung und verkürzten sowie instabilen Tracheenästen. Die Ursache der beschriebenen Phänotypen von *Isr^{ko}* Mutanten

muss letztendlich auf die fehlende Funktion von Lsr im spät endosomalen/lysosomalen Kompartiment der Spirakel zurückgeführt werden. Ob dieses Kompartiment an Auf- oder Umbauprozesse von kutikulären Strukturen während der Larvalentwicklung beteiligt ist, ist bisher nicht bekannt. Die Vermutung, dass hierbei vor allem die für Lsr postulierte Funktion als Transportrezeptor zu den Lysosomen wichtig ist, wird durch weitere Daten eines in dieser Arbeit durchgeführten RNAi Screens bekräftigt.

So führte eine gezielte Expressionsreduktion bzw. die Inhibierung wichtiger Komponenten von Transportwegen zu den Lysosomen in posterioren Spirakeln zu einer Phänokopie des beschriebenen *Isr^{ko}* mutanten Phänotyps (siehe 4.6.3). Zu diesen Komponenten gehört das Dynamin-Homolog Shibire, das die Abschnürung von Clathrin-Vesikeln vermittelt (Hinshaw and Schmid, 1995; Marks et al., 2001). Clathrin-Vesikel sind an zwei Transportrouten zu den Lysosomen beteiligt. So transportieren sie einerseits endozytiertes Material von der Plasmamembran zum endosomalen Kompartiment, von wo aus es zu den Lysosomen gelangt. Andererseits bringen Clathrin-Vesikel neu-synthetisierte Proteine wie Hydrolasen vom *trans*-Golgi Netzwerk über späte Endosomen zu Lysosomen (Royle, 2006). Neben Shibire führte auch der *knock down* von *wurst* in den posterioren Spirakeln zu einem ähnlichen Phänotyp der *Isr^{ko}* Mutanten. Wurst ist wie Shibire an der Clathrin-vermittelten Endozytose beteiligt und somit ebenfalls ein wichtiger Regulator intrazellulärer Transportprozesse (Behr et al., 2007; Wingen et al., 2009).

Darüber hinaus konnte in diesem Screen ein weiteres Gen identifiziert werden, das nach *knock down* in den Spirakeln zu einer Kopie des *Isr* mutanten Phänotyps führte. Hierbei handelt es sich um den Klasse B Scavenger Rezeptor *Snmp1*, der bisher noch nicht mit einer Funktion in späten Endosomen/Lysosomen in Zusammenhang gebracht wurde (siehe Einleitung 1.3.3). Immunfluoreszenzmarkierungen von *Snmp1* zeigten allerdings, dass es ebenfalls in einem vesikulären Muster exprimiert wird (Talamillo et al., 2013). Ob *Snmp1* tatsächlich in Lysosomen exprimiert wird und möglicherweise einen Interaktionspartner von Lsr darstellt bedarf jedoch weiterer Untersuchungen.

Wie nun genau späte Endosomen und Lysosomen an Auf- bzw. Umbauprozessen von apikaler extrazellulärer Matrix beteiligt sind und welche Rolle Lsr dabei spielt bleibt unklar. Denkbar wäre, dass Lsr ähnlich wie LIMP-2 ein Enzym zu den Lysosomen transportiert, das am Abbau von endozytiertem Material beteiligt ist. Um welches Enzym es sich hierbei handelt, könnte mittels Immunopräzipitation und anschließender Massenspektrometrie adressiert werden. Bei dem endozytierten Material könnte es sich um eine spezielle Komponente handeln, die lediglich in den posterioren Spirakeln auftritt, da Lsr sehr spezifisch dort exprimiert wird. Möglicherweise handelt es sich um Produkte, die bei der

Synthese des Filzkörpers anfallen und anschließend endozytiert werden. Dafür spricht, dass Endozytose maßgeblich an der Entfernung von Bestandteilen aus dem trachealen Lumen beteiligt ist (Behr et al., 2007; Tsarouhas et al., 2007) und *Isr^{ko}* Mutanten eine verlangsamte Gasfüllung der posterioren Spirakel am Ende der Embryogenese aufweisen (Abb. 4.14).

Eine zweite Möglichkeit wäre, dass es sich bei den Vesikeln in denen Lsr lokalisiert ist um spezielle sekretorische Lysosomen handelt. So könnte Lsr ein luminales oder membranständiges Enzym zu den Lysosomen transportieren, das nach Sekretion in die Spirakelkammer bzw. an die apikale Plasmamembran gelangt und am Auf- und Umbau von extrazellulärer Matrix beteiligt ist. Hierbei könnte es sich auch um spezielle Lipide oder lipidsynthetisierende Enzyme handeln, die für die hydrophoben Eigenschaften der äußersten Kutikulaschicht wichtig sind. Die Tatsache, dass Lsr partiell an der Plasmamembran lokalisiert ist (Abb. 4.20), unterstützt diese Hypothese.

Ein mögliches von Lsr transportiertes Protein stellte das apikale Membranprotein Uif dar. So führte ein *knock down* von *uif* in den posterioren Spirakeln zu einer Kopie des *Isr^{ko}* Phänotyps (siehe Ergebnisse 4.6.3). Eine genetische Interaktion der beiden Gene konnte allerdings nicht gezeigt werden. Darüber hinaus ergaben Immunfluoreszenzfärbungen, dass Uif in Zellen der Spirakelkammer von *Isr^{ko}* Mutanten wie im Wildtyp an der apikalen Membran lokalisiert ist (Daten nicht gezeigt). Somit ist eine Interaktion der beiden Proteine eher unwahrscheinlich.

Gamp et al. 2003 zeigte, dass auch LIMP-2 an der Lokalisation von apikalen Membranproteinen beteiligt ist. Hierzu gehören neben dem apikalen Kaliumkanal KCNQ1/KCNE1 im Ohr von Mäusen auch das Membranprotein Uroplakin in der apikalen Membran des Epithels der Harnwege (Gamp et al., 2003). Die Autoren vermuten hier als Ursache einen inhibierten Membranfluss, der dazu führt, dass apikale Membranproteine ihr Ziel nicht erreichen können. Dies stellt eine weitere Hypothese dar und könnte auch bei *Isr^{ko}* Mutanten der Fall sein. Schließlich stellen späte Endosomen und Lysosomen Knotenpunkte des intrazellulären Vesikeltransports dar. Fehlfunktionen dieser Kompartimente können Auswirkungen auf die Lokalisation apikaler Membranproteine zur Folge haben.

Schließlich konnte in dieser Studie erstmals gezeigt werden, dass das lysosomale Kompartiment am Auf- und Umbau von extrazellulärer Matrix in *Drosophila* beteiligt ist. Lsr übernimmt vermutlich als Transportrezeptor hierbei eine entscheidende Funktion.

6 Zusammenfassung

Scavenger Rezeptoren der Klasse B sind hoch konservierte, glykosylierte Transmembranproteine. Aufgrund ihres breiten Ligandenspektrums fungieren sie in verschiedenen Prozessen wie der Lipidhomöostase, der angeborenen Immunität, der Zelladhäsion oder dem intrazellulären Proteintransport. Die essentielle Bedeutung der Scavenger Rezeptoren wird dadurch deutlich, dass Fehlfunktionen dieser Proteine maßgeblich zur Entstehung der Volkskrankheit Arteriosklerose und anderer schwerwiegender Erkrankungen beitragen. Somit ist die Erforschung dieser Rezeptoren vor allem in *in vivo* Modellsystemen von zentraler Bedeutung, aufgrund ihrer Multifunktionalität aber auch sehr komplex.

In *Drosophila melanogaster* gibt es im Vergleich zu Säugetieren nicht drei, sondern 14 Klasse B Scavenger Rezeptoren, deren Funktionen weitestgehend unbekannt sind. Im Rahmen dieser Studie wurde mit Leaky spiracles (Lsr) der erste und bisher einzige Klasse B Scavenger Rezeptor in *Drosophila* identifiziert, der für die Entwicklung und Lebensfähigkeit der Tiere essentiell ist.

Expressionsanalysen zeigten, dass Lsr während der späten Embryogenese sehr spezifisch in den posterioren Spirakeln, den Öffnungen des respiratorischen Systems, exprimiert wird. Die Untersuchung der mittels homologer Rekombination erzeugten *lsr* Nullmutanten ergab, dass die Tiere vorwiegend während des Larvenstadiums starben. Die Ursache stellten schwere Defekte im Tracheensystem dar, die zu einem Sauerstoffmangel der Tiere führten. Zu diesen Defekten zählte der für das Gen namensgebende Verlust der Barrierefunktion der posterioren Spirakel. Wachstumsdefizite der Tracheenäste und eine unvollständige Häutung führten neben dieser Beobachtung zu dem Schluss, dass die Phänotypen auf eine Fehlfunktion der sekretierten apikalen extrazellulären Matrix zurückzuführen sind. Durch eine spezifische Wiederherstellung der *lsr* Genfunktion in den posterioren Spirakeln der *lsr* Mutanten wurde deutlich, dass Lsr tatsächlich eine essentielle Rolle in diesem Organ spielt. Neben den beobachteten Phänotypen wurde hierbei auch die larvale Letalität aufgehoben.

Subzelluläre Lokalisationsstudien offenbarten, dass Lsr in späten Endosomen und Lysosomen lokalisiert ist. Darüber hinaus zeigten Homologievergleiche mit humanen Scavenger Rezeptoren, dass Lsr dem in Lysosomen lokalisierten LIMP-2 am stärksten ähnelt und somit möglicherweise ein funktionelles Ortholog dieses Proteins darstellt. Hinweise, dass Lsr wie LIMP-2 am Proteintransport zu den Lysosomen beteiligt ist, lieferten spezifische *knock down* Experimente in den posterioren Spirakeln. So führte eine

verminderte Expression von Komponenten, die den Transport zu Lysosomen vermitteln, zum gleichen Phänotyp wie dem von *Lsr* Mutanten. Im Rahmen dieser Experimente konnte mit *Snmp1* ein weiterer Scavenger Rezeptor identifiziert werden, der nach *knock down* ebenfalls zu einer Kopie des *Lsr* mutanten Phänotyps führte. Somit könnte das in diesem Zusammenhang völlig unbekanntes *Snmp1* ebenfalls als Transportrezeptor fungieren oder sogar einen Interaktionspartner von *Lsr* darstellen.

Schließlich konnte in dieser Studie erstmals gezeigt werden, dass das lysosomale Kompartiment am Aufbau von apikaler extrazellulärer Matrix in *Drosophila* beteiligt ist. Dabei wurde mit dem Scavenger Rezeptor *Lsr* ein Schlüsselfaktor in diesem Prozess identifiziert.

Literaturverzeichnis

- Acton, S., Rigotti, a, Landschulz, K.T., Xu, S., Hobbs, H.H., and Krieger, M. (1996). Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. *Science* 271, 518–520.
- Adamson, A.L., Chohan, K., Swenson, J., and LaJeunesse, D. (2011). A *Drosophila* model for genetic analysis of influenza viral/host interactions. *Genetics* 189, 495–506.
- Affolter, M., and Shilo, B.Z. (2000). Genetic control of branching morphogenesis during *Drosophila* tracheal development. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12, 731–735.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P. (2002). *Molecular Biology of the Cell* (New York: Garland Science).
- Asch, A.S., Barnwell, J., Silverstein, R.L., and Nachman, R.L. (1987). Isolation of the thrombospondin membrane receptor. *J. Clin. Invest.* 79, 1054–1061.
- Behr, M., Wingen, C., Wolf, C., Schuh, R., and Hoch, M. (2007). Wurst is essential for airway clearance and respiratory-tube size control. *Nat. Cell Biol.* 9, 847–853.
- Beitel, G.J., and Krasnow, M.A. (2000). Genetic control of epithelial tube size in the *Drosophila* tracheal system. *Development* 127, 3271–3282.
- Beller, M., Riedel, D., Jansch, L., Dieterich, G., Wehland, J., Jäckle, H., and Kühnlein, R.P. (2006). Characterization of the *Drosophila* lipid droplet subproteome. *Mol. Cell. Proteomics* 5, 1082–1094.
- Benton, R., Vannice, K.S., and Vosshall, L.B. (2007). An essential role for a CD36-related receptor in pheromone detection in *Drosophila*. *Nature* 450, 289–293.
- Beutler, E. (2006). Gaucher disease: multiple lessons from a single gene disorder. *Acta Paediatr. Suppl.* 95, 103–109.
- Brand, A.H., and Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118, 401–415.
- Braulke, T., and Bonifacino, J.S. (2009). Sorting of lysosomal proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1793, 605–614.
- Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (1986). A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 232, 34–47.
- Brown, M.S., Goldstein, J.L., Krieger, M., Ho, Y.K., and Anderson, R.G. (1979). Reversible accumulation of cholesteryl esters in macrophages incubated with acetylated lipoproteins. *J. Cell Biol.* 82, 597–613.

- Brown, M.S., Basu, S.K., Falck, J.R., Ho, Y.K., and Goldstein, J.L. (1980). The scavenger cell pathway for lipoprotein degradation: specificity of the binding site that mediates the uptake of negatively-charged LDL by macrophages. *J. Supramol. Struct.* *13*, 67–81.
- Calvo, D., and Vega, M.A. (1993). Identification, primary structure, and distribution of CLA-1, a novel member of the CD36/LIMPII gene family. *J. Biol. Chem.* *268*, 18929–18935.
- Calvo, D., Dopazo, J., and Vega, M.A. (1995). The CD36, CLA-1 (CD36L1), and LIMPII (CD36L2) gene family: cellular distribution, chromosomal location, and genetic evolution. *Genomics* *25*, 100–106.
- Calvo, D., Gómez-Coronado, D., Lasunción, M.A., and Vega, M.A. (1997). CLA-1 is an 85-kD plasma membrane glycoprotein that acts as a high-affinity receptor for both native (HDL, LDL, and VLDL) and modified (OxLDL and AcLDL) lipoproteins. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *17*, 2341–2349.
- Campos-Ortega, J.A., and Hartenstein, V. (1985). *The embryonic development of Drosophila melanogaster* (Berlin: Springer-Verlag).
- Canton, J., Neculai, D., and Grinstein, S. (2013). Scavenger receptors in homeostasis and immunity. *Nat. Rev. Immunol.* *13*, 621–634.
- Cao, G., Zhao, L., Stangl, H., Hasegawa, T., Richardson, J.A., Parker, K.L., and Hobbs, H.H. (1999). Developmental and hormonal regulation of murine scavenger receptor, class B, type 1. *Mol. Endocrinol.* *13*, 1460–1473.
- Chavrier, P., Parton, R.G., Hauri, H.P., Simons, K., and Zerial, M. (1990). Localization of low molecular weight GTP binding proteins to exocytic and endocytic compartments. *Cell* *62*, 317–329.
- Chell, J.M., and Brand, A.H. (2010). Nutrition-responsive glia control exit of neural stem cells from quiescence. *Cell* *143*, 1161–1173.
- Chen, H., Liu, Z., and Huang, X. (2010). Drosophila models of peroxisomal biogenesis disorder: peroxins are required for spermatogenesis and very-long-chain fatty acid metabolism. *Hum. Mol. Genet.* *19*, 494–505.
- Chung, S., Chavez, C., and Andrew, D.J. (2011). Trachealess (Trh) regulates all tracheal genes during Drosophila embryogenesis. *Dev. Biol.* *360*, 160–172.
- Clemetson, K.J., Pfueller, S.L., Luscher, E.F., and Jenkins, C.S. (1977). Isolation of the membrane glycoproteins of human blood platelets by lectin affinity chromatography. *Biochim. Biophys. Acta* *464*, 493–508.
- Coraci, I.S., Husemann, J., Berman, J.W., Hulette, C., Dufour, J.H., Campanella, G.K., Luster, A.D., Silverstein, S.C., and El-Khoury, J.B. (2002). CD36, a class B scavenger receptor, is expressed on microglia in Alzheimer's disease brains and can mediate production of reactive oxygen species in response to beta-amyloid fibrils. *Am. J. Pathol.* *160*, 101–112.

- Coutinho, M.F., Prata, M.J., and Alves, S. (2012). A shortcut to the lysosome: the mannose-6-phosphate-independent pathway. *Mol. Genet. Metab.* 107, 257–266.
- Dietrich, J., Kastrup, J., Nielsen, B.L., Odum, N., and Geisler, C. (1997). Regulation and function of the CD3gamma DxxxLL motif: a binding site for adaptor protein-1 and adaptor protein-2 in vitro. *J. Cell Biol.* 138, 271–281.
- Dietzl, G., Chen, D., Schnorrer, F., Su, K.-C., Barinova, Y., Fellner, M., Gasser, B., Kinsey, K., Oettel, S., Scheiblaue, S., et al. (2007). A genome-wide transgenic RNAi library for conditional gene inactivation in *Drosophila*. *Nature* 448, 151–156.
- Dunne, D.W., Resnick, D., Greenberg, J., Krieger, M., and Joiner, K.A. (1994). The type I macrophage scavenger receptor binds to gram-positive bacteria and recognizes lipoteichoic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 1863–1867.
- Endemann, G., Stanton, L.W., Madden, K.S., Bryant, C.M., White, R.T., and Protter, A.A. (1993). CD36 is a receptor for oxidized low density lipoprotein. *J. Biol. Chem.* 268, 11811–11816.
- Eskelinen, E.-L. (2006). Roles of LAMP-1 and LAMP-2 in lysosome biogenesis and autophagy. *Mol. Aspects Med.* 27, 495–502.
- Eskelinen, E.-L., Tanaka, Y., and Saftig, P. (2003). At the acidic edge: emerging functions for lysosomal membrane proteins. *Trends Cell Biol.* 13, 137–145.
- Fielding, C.J., and Fielding, P.E. (1995). Molecular physiology of reverse cholesterol transport. *J. Lipid Res.* 36, 211–228.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., and Mello, C.C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806–811.
- Franc, N.C., Dimarcq, J.L., Lagueux, M., Hoffmann, J., and Ezekowitz, R.A. (1996). Croquemort, a novel *Drosophila* hemocyte/macrophage receptor that recognizes apoptotic cells. *Immunity* 4, 431–443.
- Franc, N.C., Heitzler, P., Ezekowitz, R.A., and White, K. (1999). Requirement for croquemort in phagocytosis of apoptotic cells in *Drosophila*. *Science* 284, 1991–1994.
- Fukuda, M. (1991). Lysosomal membrane glycoproteins. Structure, biosynthesis, and intracellular trafficking. *J. Biol. Chem.* 266, 21327–21330.
- Gamp, A.-C., Tanaka, Y., Lüllmann-Rauch, R., Wittke, D., D’Hooge, R., De Deyn, P.P., Moser, T., Maier, H., Hartmann, D., Reiss, K., et al. (2003). LIMP-2/LGP85 deficiency causes ureteric pelvic junction obstruction, deafness and peripheral neuropathy in mice. *Hum. Mol. Genet.* 12, 631–646.
- Ghabrial, A., Luschnig, S., Metzstein, M.M., and Krasnow, M.A. (2003). Branching morphogenesis of the *Drosophila* tracheal system. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 19, 623–647.

Glasheen, B.M., Robbins, R.M., Piette, C., Beitel, G.J., and Page-McCaw, A. (2010). A matrix metalloproteinase mediates airway remodeling in *Drosophila*. *Dev. Biol.* *344*, 772–783.

Goldstein, J.L., Ho, Y.K., Basu, S.K., and Brown, M.S. (1979). Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *76*, 333–337.

Gonzalez, A., Valeiras, M., Sidransky, E., and Tayebi, N. (2014). Lysosomal integral membrane protein-2: A new player in lysosome-related pathology. *Mol. Genet. Metab.* *111*, 84–91.

Gorski, S.M., Chittaranjan, S., Pleasance, E.D., Freeman, J.D., Anderson, C.L., Varhol, R.J., Coughlin, S.M., Zuyderduyn, S.D., Jones, S.J.M., and Marra, M.A. (2003). A SAGE approach to discovery of genes involved in autophagic cell death. *Curr. Biol.* *13*, 358–363.

Greenspan, R.J. (2004). *Fly Pushing: The Theory and Practice of Drosophila Genetics* (Cold Spring Harbor Laboratories).

Gruarin, P., Sitia, R., and Alessio, M. (1997). Formation of one or more intrachain disulphide bonds is required for the intracellular processing and transport of CD36. *Biochem. J.* *328* (Pt 2, 635–642).

Ha, T.S., and Smith, D.P. (2009). Odorant and pheromone receptors in insects. *Front. Cell. Neurosci.* *3*, 10.

Haas, A. (2007). The phagosome: compartment with a license to kill. *Traffic* *8*, 311–330.

Hajri, T., and Abumrad, N.A. (2002). Fatty acid transport across membranes: relevance to nutrition and metabolic pathology. *Annu. Rev. Nutr.* *22*, 383–415.

Hajri, T., Hall, A.M., Jensen, D.R., Pietka, T.A., Drover, V.A., Tao, H., Eckel, R., and Abumrad, N.A. (2007). CD36-facilitated fatty acid uptake inhibits leptin production and signaling in adipose tissue. *Diabetes* *56*, 1872–1880.

Han, C., Song, Y., Xiao, H., Wang, D., Franc, N.C., Jan, L.Y., and Jan, Y.-N. (2014). Epidermal Cells Are the Primary Phagocytes in the Fragmentation and Clearance of Degenerating Dendrites in *Drosophila*. *Neuron* *81*, 544–560.

Hart, K., and Wilcox, M. (1993). A *Drosophila* gene encoding an epithelial membrane protein with homology to CD36/LIMP II. *J. Mol. Biol.* *234*, 249–253.

Herboso, L., Talamillo, A., Pérez, C., and Barrio, R. (2011). Expression of the Scavenger Receptor Class B type I (SR-BI) family in *Drosophila melanogaster*. *Int. J. Dev. Biol.* *55*, 603–611.

Hinshaw, J.E., and Schmid, S.L. (1995). Dynamin self-assembles into rings suggesting a mechanism for coated vesicle budding. *Nature* *374*, 190–192.

Höning, S., Sandoval, I. V., and von Figura, K. (1998). A di-leucine-based motif in the cytoplasmic tail of LIMP-II and tyrosinase mediates selective binding of AP-3. *EMBO J.* *17*, 1304–1314.

- Hu, N., and Castelli-Gair, J. (1999). Study of the posterior spiracles of *Drosophila* as a model to understand the genetic and cellular mechanisms controlling morphogenesis. *Dev. Biol.* 214, 197–210.
- Huang, J., Zhou, W., Watson, A.M., Jan, Y.-N., and Hong, Y. (2008). Efficient ends-out gene targeting in *Drosophila*. *Genetics* 180, 703–707.
- Huang, J., Zhou, W., Dong, W., Watson, A.M., and Hong, Y. (2009). From the Cover: Directed, efficient, and versatile modifications of the *Drosophila* genome by genomic engineering. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 8284–8289.
- Huizing, M., Boissy, R.E., and Gahl, W.A. (2002). Hermansky-Pudlak syndrome: vesicle formation from yeast to man. *Pigment Cell Res.* 15, 405–419.
- Jarecki, J., Johnson, E., and Krasnow, M.A. (1999). Oxygen regulation of airway branching in *Drosophila* is mediated by branchless FGF. *Cell* 99, 211–220.
- Jarial, M.S., and Engstrom, L. (1995). Fine structure of the spiracular glands in larval *Drosophila melanogaster* (Meig.) (Diptera : Drosophilidae). *Int. J. Insect Morphol. Embryol.* 24, 1–12.
- Jaspers, M.H.J., Pflanz, R., Riedel, D., Kawelke, S., Feussner, I., and Schuh, R. (2014). The fatty acyl-CoA reductase Waterproof mediates airway clearance in *Drosophila*. *Dev. Biol.* 385, 23–31.
- Ji, Y., Jian, B., Wang, N., Sun, Y., Moya, M.L., Phillips, M.C., Rothblat, G.H., Swaney, J.B., and Tall, A.R. (1997a). Scavenger receptor BI promotes high density lipoprotein-mediated cellular cholesterol efflux. *J. Biol. Chem.* 272, 20982–20985.
- Ji, Y., Jian, B., Wang, N., Sun, Y., Moya, M. de la L., Phillips, M.C., Rothblat, G.H., Swaney, J.B., and Tall, A.R. (1997b). Scavenger Receptor BI Promotes High Density Lipoprotein-mediated Cellular Cholesterol Efflux. *J. Biol. Chem.* 272, 20982–20985.
- Jin, X., Ha, T.S., and Smith, D.P. (2008). SNMP is a signaling component required for pheromone sensitivity in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 10996–11001.
- Kaido, M., Wada, H., Shindo, M., and Hayashi, S. (2009). Essential requirement for RING finger E3 ubiquitin ligase Hakai in early embryonic development of *Drosophila*. *Genes Cells* 14, 1067–1077.
- Keilin, D. (1944). Respiratory systems and respiratory adaptations in larvae and pupae of Diptera. *Parasitology* 36, 1–66.
- Kiefer, C., Sumser, E., Wernet, M.F., and Von Lintig, J. (2002). A class B scavenger receptor mediates the cellular uptake of carotenoids in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 10581–10586.
- Knipper, M., Claussen, C., Rüttiger, L., Zimmermann, U., Lüllmann-Rauch, R., Eskelinen, E.-L., Schröder, J., Schwake, M., and Saftig, P. (2006). Deafness in LIMP2-deficient mice due to early loss of the potassium channel KCNQ1/KCNE1 in marginal cells of the stria vascularis. *J. Physiol.* 576, 73–86.

Krieger, M. (1997). The other side of scavenger receptors: pattern recognition for host defense. *Curr. Opin. Lipidol.* *8*, 275–280.

Kuronita, T., Eskelinen, E.-L., Fujita, H., Saftig, P., Himeno, M., and Tanaka, Y. (2002). A role for the lysosomal membrane protein LGP85 in the biogenesis and maintenance of endosomal and lysosomal morphology. *J. Cell Sci.* *115*, 4117–4131.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* *227*, 680–685.

Laugerette, F., Passilly-Degrace, P., Patris, B., Niot, I., Febbraio, M., Montmayeur, J.-P., and Besnard, P. (2005). CD36 involvement in orosensory detection of dietary lipids, spontaneous fat preference, and digestive secretions. *J. Clin. Invest.* *115*, 3177–3184.

Laughlin, J.D., Ha, T.S., Jones, D.N.M., and Smith, D.P. (2008). Activation of pheromone-sensitive neurons is mediated by conformational activation of pheromone-binding protein. *Cell* *133*, 1255–1265.

Lewis, V. (1985). Glycoproteins of the lysosomal membrane. *J. Cell Biol.* *100*, 1839–1847.

Lisanti, M.P., Scherer, P.E., Vidugiriene, J., Tang, Z., Hermanowski-Vosatka, A., Tu, Y.H., Cook, R.F., and Sargiacomo, M. (1994). Characterization of caveolin-rich membrane domains isolated from an endothelial-rich source: implications for human disease. *J. Cell Biol.* *126*, 111–126.

Lloyd, V., Ramaswami, M., and Krämer, H. (1998). Not just pretty eyes: *Drosophila* eye-colour mutations and lysosomal delivery. *Trends Cell Biol.* *8*, 257–259.

Locke, M. (2001). The Wigglesworth Lecture: Insects for studying fundamental problems in biology. *J. Insect Physiol.* *47*, 495–507.

Luschig, S., Bätz, T., Armbruster, K., and Krasnow, M.A. (2006). serpentine and vermiform encode matrix proteins with chitin binding and deacetylation domains that limit tracheal tube length in *Drosophila*. *Curr. Biol.* *16*, 186–194.

Manning, G., and Krasnow, M.A. (1993). Development of the *Drosophila* tracheal System. In *The Development of Drosophila Melanogaster*, M. Bate, and A. Martinez Arias, eds. (New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press), pp. 609–685.

Marks, B., Stowell, M.H., Vallis, Y., Mills, I.G., Gibson, A., Hopkins, C.R., and McMahon, H.T. (2001). GTPase activity of dynamin and resulting conformation change are essential for endocytosis. *Nature* *410*, 231–235.

Martin, C., Chevrot, M., Poirier, H., Passilly-Degrace, P., Niot, I., and Besnard, P. (2011). CD36 as a lipid sensor. *Physiol. Behav.* *105*, 36–42.

Maurel-Zaffran, C., Pradel, J., and Graba, Y. (2010). Reiterative use of signalling pathways controls multiple cellular events during *Drosophila* posterior spiracle organogenesis. *Dev. Biol.* *343*, 18–27.

- Merabet, S., Catala, F., Pradel, J., and Graba, Y. (2002). A green fluorescent protein reporter genetic screen that identifies modifiers of Hox gene function in the *Drosophila* embryo. *Genetics* 162, 189–202.
- Miao, W.M., Vasile, E., Lane, W.S., and Lawler, J. (2001). CD36 associates with CD9 and integrins on human blood platelets. *Blood* 97, 1689–1696.
- Moussian, B., Seifarth, C., Müller, U., Berger, J., and Schwarz, H. (2006). Cuticle differentiation during *Drosophila* embryogenesis. *Arthropod Struct. Dev.* 35, 137–152.
- Mukhopadhyay, S., and Gordon, S. (2004). The role of scavenger receptors in pathogen recognition and innate immunity. *Immunobiology* 209, 39–49.
- Murao, K., Terpstra, V., Green, S.R., Kondratenko, N., Steinberg, D., and Quehenberger, O. (1997). Characterization of CLA-1, a human homologue of rodent scavenger receptor BI, as a receptor for high density lipoprotein and apoptotic thymocytes. *J. Biol. Chem.* 272, 17551–17557.
- Neculai, D., Schwake, M., Ravichandran, M., Zunke, F., Collins, R.F., Peters, J., Neculai, M., Plumb, J., Loppnau, P., Pizarro, J.C., et al. (2013). Structure of LIMP-2 provides functional insights with implications for SR-BI and CD36. *Nature* 504, 172–176.
- Neufeld, T.P., de la Cruz, A.F., Johnston, L.A., and Edgar, B.A. (1998). Coordination of growth and cell division in the *Drosophila* wing. *Cell* 93, 1183–1193.
- Nichols, Z., and Vogt, R.G. (2008). The SNMP/CD36 gene family in Diptera, Hymenoptera and Coleoptera: *Drosophila melanogaster*, *D. pseudoobscura*, *Anopheles gambiae*, *Aedes aegypti*, *Apis mellifera*, and *Tribolium castaneum*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 38, 398–415.
- Ogata, S., and Fukuda, M. (1994). Lysosomal targeting of Limp II membrane glycoprotein requires a novel Leu-Ile motif at a particular position in its cytoplasmic tail. *J. Biol. Chem.* 269, 5210–5217.
- Oquendo, P., Hundt, E., Lawler, J., and Seed, B. (1989). CD36 directly mediates cytoadherence of *Plasmodium falciparum* parasitized erythrocytes. *Cell* 58, 95–101.
- Page-McCaw, A., Serano, J., Sante, J.M., and Rubin, G.M. (2003). Are Required for Tissue Remodeling , but Not Embryonic Development. *Situ* 4, 95–106.
- Page-McCaw, A., Ewald, A.J., and Werb, Z. (2007). Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 221–233.
- Parathath, S., Connelly, M.A., Rieger, R.A., Klein, S.M., Abumrad, N.A., De La Llera-Moya, M., Iden, C.R., Rothblat, G.H., and Williams, D.L. (2004). Changes in plasma membrane properties and phosphatidylcholine subspecies of insect Sf9 cells due to expression of scavenger receptor class B, type I, and CD36. *J. Biol. Chem.* 279, 41310–41318.
- Parvy, J.-P., Napal, L., Rubin, T., Poidevin, M., Perrin, L., Wicker-Thomas, C., and Montagne, J. (2012). *Drosophila melanogaster* Acetyl-CoA-carboxylase sustains a fatty

acid-dependent remote signal to waterproof the respiratory system. *PLoS Genet.* 8, e1002925.

Peng, Y., Akmentin, W., Connelly, M.A., Lund-Katz, S., Phillips, M.C., and Williams, D.L. (2004). Scavenger receptor BI (SR-BI) clustered on microvillar extensions suggests that this plasma membrane domain is a way station for cholesterol trafficking between cells and high-density lipoprotein. *Mol. Biol. Cell* 15, 384–396.

Pepino, M.Y., Love-Gregory, L., Klein, S., and Abumrad, N.A. (2012). The fatty acid translocase gene CD36 and lingual lipase influence oral sensitivity to fat in obese subjects. *J. Lipid Res.* 53, 561–566.

Philips, J.A., Rubin, E.J., and Perrimon, N. (2005). Drosophila RNAi screen reveals CD36 family member required for mycobacterial infection. *Science* 309, 1251–1253.

Pignoni, F., and Zipursky, S.L. (1997). Induction of Drosophila eye development by decapentaplegic. *Development* 124, 271–278.

Plüddemann, A., Neyen, C., and Gordon, S. (2007). Macrophage scavenger receptors and host-derived ligands. *Methods* 43, 207–217.

Pond, L., Kuhn, L.A., Teyton, L., Schutze, M.P., Tainer, J.A., Jackson, M.R., and Peterson, P.A. (1995). A role for acidic residues in di-leucine motif-based targeting to the endocytic pathway. *J. Biol. Chem.* 270, 19989–19997.

Pulipparacharuvil, S., Akbar, M.A., Ray, S., Sevrioukov, E.A., Haberman, A.S., Rohrer, J., and Krämer, H. (2005). Drosophila Vps16A is required for trafficking to lysosomes and biogenesis of pigment granules. *J. Cell Sci.* 118, 3663–3673.

Reaven, E., Lua, Y., Nomoto, A., Temel, R., Williams, D.L., van der Westhuyzen, D.R., and Azhar, S. (1999). The selective pathway and a high-density lipoprotein receptor (SR-BI) in ovarian granulosa cells of the mouse. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* 1436, 565–576.

Reczek, D., Schwake, M., Schröder, J., Hughes, H., Blanz, J., Jin, X., Brondyk, W., Van Patten, S., Edmunds, T., and Saftig, P. (2007). LIMP-2 is a receptor for lysosomal mannose-6-phosphate-independent targeting of beta-glucocerebrosidase. *Cell* 131, 770–783.

Reiling, J.H., and Hafen, E. (2004). The hypoxia-induced paralogs Scylla and Charybdis inhibit growth by down-regulating S6K activity upstream of TSC in Drosophila. *Genes Dev.* 18, 2879–2892.

Reiter, L.T., Potocki, L., Chien, S., Gribskov, M., and Bier, E. (2001). A systematic analysis of human disease-associated gene sequences in Drosophila melanogaster. *Genome Res.* 11, 1114–1125.

Ren, Y., Silverstein, R.L., Allen, J., and Savill, J. (1995). CD36 gene transfer confers capacity for phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *J. Exp. Med.* 181, 1857–1862.

- Rigotti, A., Trigatti, B., Babitt, J., Penman, M., Xu, S., and Krieger, M. (1997). Scavenger receptor BI—a cell surface receptor for high density lipoprotein. *Curr. Opin. Lipidol.* 8, 181–188.
- Rigotti, A., Miettinen, H.E., and Krieger, M. (2003). The role of the high-density lipoprotein receptor SR-BI in the lipid metabolism of endocrine and other tissues. *Endocr. Rev.* 24, 357–387.
- Rizki, M.T.M. (1956). The cytophysiology of the spiracular glands of *Drosophila melanogaster*. *J. Morphol.* 98, 497–511.
- Roberts, D.B. (1986). *Drosophila: a practical approach*. (Oxford: IRL Press).
- Royle, S.J. (2006). The cellular functions of clathrin. *Cell. Mol. Life Sci.* 63, 1823–1832.
- Rubin, G.M., and Spradling, A.C. (1982). Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors. *Science* 218, 348–353.
- Rusten, T.E., Lindmo, K., Juhász, G., Sass, M., Seglen, P.O., Brech, A., and Stenmark, H. (2004). Programmed autophagy in the *Drosophila* fat body is induced by ecdysone through regulation of the PI3K pathway. *Dev. Cell* 7, 179–192.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., and Erlich, H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487–491.
- Santiago-García, J., Kodama, T., and Pitas, R.E. (2003). The class A scavenger receptor binds to proteoglycans and mediates adhesion of macrophages to the extracellular matrix. *J. Biol. Chem.* 278, 6942–6946.
- Savill, J., Hogg, N., Ren, Y., and Haslett, C. (1992). Thrombospondin cooperates with CD36 and the vitronectin receptor in macrophage recognition of neutrophils undergoing apoptosis. *J. Clin. Invest.* 90, 1513–1522.
- Sears, H.C., Kennedy, C.J., and Garrity, P.A. (2003). Macrophage-mediated corpse engulfment is required for normal *Drosophila* CNS morphogenesis. *Development* 130, 3557–3565.
- Settembre, C., Fraldi, A., Medina, D.L., and Ballabio, A. (2013). Signals from the lysosome: a control centre for cellular clearance and energy metabolism. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 14, 283–296.
- Shibutani, S.T., and Yoshimori, T. (2014). A current perspective of autophagosome biogenesis. *Cell Res.* 24, 58–68.
- Shoup, J.R. (1966). The development of pigment granules in the eyes of wild type and mutant *Drosophila melanogaster*. *J. Cell Biol.* 29, 223–249.
- Silverstein, R.L., and Febbraio, M. (2009). CD36, a scavenger receptor involved in immunity, metabolism, angiogenesis, and behavior. *Sci. Signal.* 2, re3.

Simpson, F., Peden, A.A., Christopoulou, L., and Robinson, M.S. (1997). Characterization of the adaptor-related protein complex, AP-3. *J. Cell Biol.* 137, 835–845.

Smith, D.P. (2012). Volatile pheromone signalling in *Drosophila*. *Physiol. Entomol.* 37.

Smith, J., Su, X., El-Maghrabi, R., Stahl, P.D., and Abumrad, N.A. (2008). Opposite regulation of CD36 ubiquitination by fatty acids and insulin: effects on fatty acid uptake. *J. Biol. Chem.* 283, 13578–13585.

Spradling, A.C., and Rubin, G.M. (1982). Transposition of cloned P elements into *Drosophila* germ line chromosomes. *Science* 218, 341–347.

Steinberg, D. (1997). Low Density Lipoprotein Oxidation and Its Pathobiological Significance. *J. Biol. Chem.* 272, 20963–20966.

Stuart, L.M., Deng, J., Silver, J.M., Takahashi, K., Tseng, A.A., Hennessy, E.J., Ezekowitz, R.A.B., and Moore, K.J. (2005). Response to *Staphylococcus aureus* requires CD36-mediated phagocytosis triggered by the COOH-terminal cytoplasmic domain. *J. Cell Biol.* 170, 477–485.

Sutherland, D., Samakovlis, C., and Krasnow, M.A. (1996). *branchless* encodes a *Drosophila* FGF homolog that controls tracheal cell migration and the pattern of branching. *Cell* 87, 1091–1101.

Talamillo, A., Herboso, L., Pirone, L., Pérez, C., González, M., Sánchez, J., Mayor, U., Lopitz-Otsoa, F., Rodríguez, M.S., Sutherland, J.D., et al. (2013). Scavenger receptors mediate the role of SUMO and Ftz-f1 in *Drosophila* steroidogenesis. *PLoS Genet.* 9, e1003473.

Tandon, N.N., Kralisz, U., and Jamieson, G.A. (1989). Identification of glycoprotein IV (CD36) as a primary receptor for platelet-collagen adhesion. *J. Biol. Chem.* 264, 7576–7583.

Tao, N., Wagner, S.J., and Lublin, D.M. (1996). CD36 is palmitoylated on both N- and C-terminal cytoplasmic tails. *J. Biol. Chem.* 271, 22315–22320.

Tonning, A., Hemphälä, J., Tång, E., Nannmark, U., Samakovlis, C., and Uv, A. (2005). A transient luminal chitinous matrix is required to model epithelial tube diameter in the *Drosophila* trachea. *Dev. Cell* 9, 423–430.

Tsarouhas, V., Senti, K.-A., Jayaram, S.A., Tiklová, K., Hemphälä, J., Adler, J., and Samakovlis, C. (2007). Sequential pulses of apical epithelial secretion and endocytosis drive airway maturation in *Drosophila*. *Dev. Cell* 13, 214–225.

Vega, M.A., Seguí-Real, B., García, J.A., Calés, C., Rodríguez, F., Vanderkerckhove, J., and Sandoval, I. V (1991). Cloning, sequencing, and expression of a cDNA encoding rat LIMP II, a novel 74-kDa lysosomal membrane protein related to the surface adhesion protein CD36. *J. Biol. Chem.* 266, 16818–16824.

Velayati, A., DePaolo, J., Gupta, N., Choi, J.H., Moaven, N., Westbroek, W., Goker-Alpan, O., Goldin, E., Stubblefield, B.K., Kolodny, E., et al. (2011). A mutation in SCARB2 is a modifier in Gaucher disease. *Hum. Mutat.* 32, 1232–1238.

- Viñals, M. (2001). Role of SR-BI in regulating lipoprotein structure and metabolism. *Drug News Perspect.* 14, 221–225.
- Wang, T., Jiao, Y., and Montell, C. (2007). Dissection of the pathway required for generation of vitamin A and for *Drosophila* phototransduction. *J. Cell Biol.* 177, 305–316.
- Wingen, C., Aschenbrenner, A.C., Stümpges, B., Hoch, M., and Behr, M. (2009). The Wurst protein: a novel endocytosis regulator involved in airway clearance and respiratory tube size control. *Cell Adh. Migr.* 3, 14–18.
- Wingrove, J.A., and O'Farrell, P.H. (1999). Nitric oxide contributes to behavioral, cellular, and developmental responses to low oxygen in *Drosophila*. *Cell* 98, 105–114.
- Young, I.S., and McEneaney, J. (2001). Lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *Biochem. Soc. Trans.* 29, 358–362.
- Zachos, C., Blanz, J., Saftig, P., and Schwake, M. (2012). A critical histidine residue within LIMP-2 mediates pH sensitive binding to its ligand β -glucocerebrosidase. *Traffic* 13, 1113–1123.
- Zeng, Y., Tao, N., Chung, K.-N., Heuser, J.E., and Lublin, D.M. (2003). Endocytosis of oxidized low density lipoprotein through scavenger receptor CD36 utilizes a lipid raft pathway that does not require caveolin-1. *J. Biol. Chem.* 278, 45931–45936.
- Zhang, L., and Ward, R.E. (2009). uninflatable encodes a novel ectodermal apical surface protein required for tracheal inflation in *Drosophila*. *Dev. Biol.* 336, 201–212.
- Zhang, W., Yancey, P.G., Su, Y.R., Babaev, V.R., Zhang, Y., Fazio, S., and Linton, M.F. (2003). Inactivation of macrophage scavenger receptor class B type I promotes atherosclerotic lesion development in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 108, 2258–2263.
- Zhou, D., Xue, J., Lai, J.C.K., Schork, N.J., White, K.P., and Haddad, G.G. (2008). Mechanisms underlying hypoxia tolerance in *Drosophila melanogaster*: hairy as a metabolic switch. *PLoS Genet.* 4, e1000221.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
<i>A. bidest</i>	zweifach destilliertes Wasser
APS	Ammoniumperoxidsulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (engl.: bovine serum albumin)
bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cDNA	<i>copy</i> (komplementäre) DNA
CyO	<i>Curly of Oyster</i> (Balancerchromosom)
C-Terminus	Carboxyterminus
DEPC	Diethyldicarbonat
DIG	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
et al.	Et aliter
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EtOH	Ethanol
EZM	Extrazelluläre Matrix
g	Gramm
Gal	Galaktose
gDNA	genomische DNA
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
h	Stunde
HA	Homologiearm
HDL	<i>High Density Lipoprotein</i>
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i> (Meerrettich-Peroxidase)
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton (1 Da = $1,7 \times 10^{-24}$ g)
kg	Kilogramm
KO	<i>knock out</i> (Mutation die zum Verlust der Genfunktion führt)
l	Liter
LB	Luria Broth
LCFA	<i>Long Chain Fatty Acids</i> (langkettige Fettsäuren)
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i>
<i>lsr</i>	<i>leaky spiracles</i>

L1	erstes Larvenstadium (analog L2 und L3)
μ	Mikro
m	Milli
M	Molar (mol/l)
MCS	<i>Multiple Cloning Site</i>
min	Minute
mRNA	<i>messenger</i> (Boten) RNA
n	Nano
NBT	4-Nitro-blue-tetrazolium-chlorid
OE	<i>overexpression</i> (Überexpression)
ORF	<i>open reading frame</i> (offener Leserahmen)
oxLDL	oxidiertes LDL
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung)
PCR	Polymerasekettenreaktion
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
RFP	<i>Red Fluorescent Protein</i>
RT-PCR	Real Time-PCR
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA Interferenz
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	<i>Standard Error of the Mean</i> (Standardfehler)
SR-B	Scavenger Rezeptor der Klasse B
St	Stadium
Stabw	Standardabweichung
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TM3	<i>Third Multiple-3</i> (Balancerchromosom)
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
tRNA	Transfer RNA
Tween	Polyoxyethylensorbitan-Monolaurat
UAS	<i>Upstream Activating Sequence</i>
UpM	Umdrehungen pro Minute
UTR	Untranslatierte Region
UV	Ultraviolett
V	Volt
VLDL	<i>Very Low Density Lipoprotein</i>
vgl.	vergleiche
<i>w⁻</i>	<i>white⁻</i>
<i>wt</i>	wildtypisch/Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem
+	Wildtypchromosom