

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR MOLEKULARE UND ZELLULÄRE ANATOMIE
LEITER: PROF. DR. RALPH WITZGALL
DER FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Domänenspezifische Funktionen des Polaritätsproteins Stardust in der
Embryonalentwicklung von Drosophila**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Leonie Theresa Koch

2017

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR MOLEKULARE UND ZELLULÄRE ANATOMIE
LEITER: PROF. DR. RALPH WITZGALL
DER FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Domänenspezifische Funktionen des Polaritätsproteins Stardust in der
Embryonalentwicklung von Drosophila**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Leonie Theresa Koch

2017

Dekan: Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. Michael Krahn

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Eugen Kerkhoff

Tag der mündlichen Prüfung: 14.12.2017

Diese Dissertationschrift beruht gemäß § 6, Absatz 7 der Promotionsordnungen für die Medizinische Fakultät und die Naturwissenschaftliche Fakultät III (medizinische Fächer) der Universität Regensburg auf folgender Publikation:

Koch, Leonie; Feicht, Sabine; Sun, Rui; Sen, Arnab; Krahn, Michael P. (2016): Domain-specific functions of Stardust in Drosophila embryonic development. In: Royal Society open science 3 (11), S. 160776.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	1
Originalpublikation	2
1. Einleitung.....	14
1.1. Epithelien.....	14
1.2. Polaritätsregulation in <i>Drosophila melanogaster</i>	14
1.3. Crumbs.....	16
1.4. Stardust.....	18
1.5. Einordnung in den wissenschaftlichen Kontext	20
2. Material und Methoden.....	21
2.1. Plasmide.....	21
2.2. Fliegenstämme und Genetik	21
2.3. Erzeugung eines Antikörpers gegen Sdt.....	22
2.4. Immunpräzipitation und Western- Blotting.....	22
2.5. Immunhistochemie	23
3. Ergebnisse und Diskussion	23
4. Zusammenfassung.....	27
Literaturverzeichnis.....	29
Abkürzungsverzeichnis	35
Abbildungsverzeichnis	36
Lebenslauf	37
Danksagung.....	39
Erklärung nach § 6, Absatz 5 Nr. 1 und 2 der Promotionsordnung	40

Originalpublikation

ROYAL SOCIETY
OPEN SCIENCE

rsos.royalsocietypublishing.org



Cite this article: Koch L, Feicht S, Sun R, Sen A, Krahn MP. 2016 Domain-specific functions of Stardust in *Drosophila* embryonic development. *R. Soc. open sci.* **3**: 160776. <http://dx.doi.org/10.1098/rsos.160776>

Received: 4 October 2016

Accepted: 19 October 2016

Subject Category:

Cellular and molecular biology

Subject Areas:

cellular biology/developmental biology

Keywords:

Crumbs, Stardust, PAR-6, *Drosophila*, epithelial polarity

Author for correspondence:

Michael P. Krahn

e-mail: michael.krahn@vkl.uni-regensburg.de

Electronic supplementary material is available online at <https://dx.doi.org/10.5061/dryad.n5fr8>.

THE ROYAL SOCIETY
PUBLISHING

Domain-specific functions of Stardust in *Drosophila* embryonic development

Leonie Koch, Sabine Feicht, Rui Sun, Arnab Sen and Michael P. Krahn

Molecular and Cellular Anatomy, University of Regensburg, Universitätsstr. 31, 93053 Regensburg, Germany

 MPK, 0000-0001-7718-9890

In *Drosophila*, the adaptor protein Stardust is essential for the stabilization of the polarity determinant Crumbs in various epithelial tissues, including the embryonic epidermis, the follicular epithelium and photoreceptor cells of the compound eye. In turn, Stardust recruits another adaptor protein, PATJ, to the subapical region to support adherens junction formation and morphogenetic events. Moreover, Stardust binds to Lin-7, which is dispensable in epithelial cells but functions in postsynaptic vesicle fusion. Finally, Stardust has been reported to bind directly to PAR-6, thereby linking the Crumbs-Stardust-PATJ complex to the PAR-6/aPKC complex. PAR-6 and aPKC are also capable of directly binding Bazooka (the *Drosophila* homologue of PAR-3) to form the PAR/aPKC complex, which is essential for apical-basal polarity and cell-cell contact formation in most epithelia. However, little is known about the physiological relevance of these interactions in the embryonic epidermis of *Drosophila in vivo*. Thus, we performed a structure-function analysis of the annotated domains with GFP-tagged Stardust and evaluated the localization and function of the mutant proteins in epithelial cells of the embryonic epidermis. The data presented here confirm a crucial role of the PDZ domain in binding Crumbs and recruiting the protein to the subapical region. However, the isolated PDZ domain is not capable of being recruited to the cortex, and the SH3 domain is essential to support the binding to Crumbs. Notably, the conserved N-terminal regions (ECR1 and ECR2) are not crucial for epithelial polarity. Finally, the GUK domain plays an important role for the protein's function, which is not directly linked to Crumbs stabilization, and the L27N domain is essential for epithelial polarization independently of recruiting PATJ.

© 2016 The Authors. Published by the Royal Society under the terms of the Creative Commons Attribution License <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>, which permits unrestricted use, provided the original author and source are credited.

1. Introduction

Apical–basal polarity is one of the most important characteristics of many epithelial cells to accomplish their function. In these cells, the apical plasma membrane domain faces an organ lumen or the outer surface of an organism on one side, and the basal plasma membrane domain connects the epithelial cells with the basal membrane and connective tissue on the other side. Furthermore, apical–basal polarity is closely linked to the formation of cell–cell contacts, thus ensuring mechanical integrity of the tissue as well as regulation of a paracellular diffusion barrier.

Many polarity determinants, which regulate apical–basal polarity and junction assembly, are highly conserved throughout evolution, from worm to human. According to their localization and function, polarity proteins can be classified as apical polarity regulators (APRs) or basolateral polarity regulators (BLPRs) [1].

Apical and basolateral polarity proteins interact in an antagonistic way, using negative feedback mechanisms. Thus, they ensure the differentiation of the plasma membrane in an apical and a basolateral domain, which is the prerequisite for correct sorting, e.g. of channels, receptors, enzymes or lipids.

In *Drosophila*, two apical protein complexes determine the apical plasma membrane domain—partly in redundancy, depending on the tissue and developmental context: the PAR complex and the Crumbs complex. The PAR complex is composed of the serine-threonine-kinase aPKC (atypical protein kinase C), the scaffold proteins PAR-6 and Bazooka (Baz) and the GTPase Cdc42 [2,3].

The second apical polarity complex, the Crumbs complex, consists in its canonical form of the transmembrane protein Crumbs (Crb), the adaptor protein Stardust (Sdt; protein associated with Lin-7 One, Pals1 in mammals), the PDZ domain containing protein PATJ (Pals1-associated tight junction protein) and Lin-7 [4].

Crb is a key determinant of apical identity: loss of Crb in the embryonic epidermis results in a strong reduction of the apical domain (reflected by an impaired secretion of the cuticle) and a weakening of the adherens junctions (AJ) [5,6], and vice versa, overexpression of Crb enlarges the apical plasma membrane at the expense of the basolateral domain [7]. Notably, loss of Crb is at least partly compensated by simultaneous reduction of one of the basolateral polarity cues (Lethal (2) Giant Larvae, Lgl, Discs Large or Scribble) [8].

The big extracellular domain of Crb has been reported to facilitate a homophilic interaction [9], although it might be dispensable for determining apical identity [7,9,10]. By contrast, the short—highly conserved—intracellular tail contains two important protein-interaction domains: the C-terminal ERLI-motif facilitates binding to Sdt which is in turn necessary to stabilize Crb in the membrane at the subapical region [11,12]. Furthermore, PAR-6 competes with Sdt for binding the ERLI-motif of Crb *in vitro* [13,14]. Secondly, Crb is linked via the FERM (Protein 4.1—Ezrin/Radixin/Moesin) domain to the subcortical Actin cytoskeleton through the FERM domain protein Moesin and β_{heavy} -spectrin [15,16]. Another function of the FERM domain is binding to Yurt, which restricts Crb activity [17]. Apart from the control of apical–basal polarity, Crb controls cell proliferation and organ growth by influencing the Hippo pathway via binding to the FERM domain protein Expanded [18–20] and by restricting the activation of Notch [21].

As Sdt stabilizes Crb at the correct subcellular position, *sdt* alleles exhibit similar phenotypes to *crb* mutants regarding apical–basal polarity [11,12,22,23].

However, Sdt is a large scaffold protein exhibiting several protein-interaction domains (figure 1a): The N-terminal evolutionary conserved regions (ECR) 1 and 2 have been reported to be involved in the binding of mammalian Pals1 to two different PAR-6 proteins in cultured mammalian cells [24–26]. However, apart from the function of a large N-terminal fragment, including ECR1/2, in apical recruitment of PAR-6 in photoreceptor cells [27], no function of this interaction in epithelia *in vivo* has been reported until now.

The first L27 (Lin-2/Lin-7) domain (L27N) is essential to recruit PATJ to the subapical region [28,29], which in turn stabilizes the AJ by promoting Myosin activity [30] but is not essential to stabilize the Crb-Sdt complex in the embryonic epidermis [28,30,31]. Via its second L27 domain (L27C), Sdt recruits Lin-7 (Veli) to the plasma membrane, which is not crucial for epithelial polarity in *Drosophila* but functions at the postsynaptic synapse membrane to prevent light-induced photoreceptor degeneration [32,33]. The PDZ domain of Sdt binds not only to the ERLI-motif of Crb but also to a conserved region of Baz [34], thus establishing two different polarity complexes which are present in parallel in the embryonic epidermis throughout embryogenesis: the Crb-Sdt-PATJ and the Baz-Sdt-PATJ complexes [29].

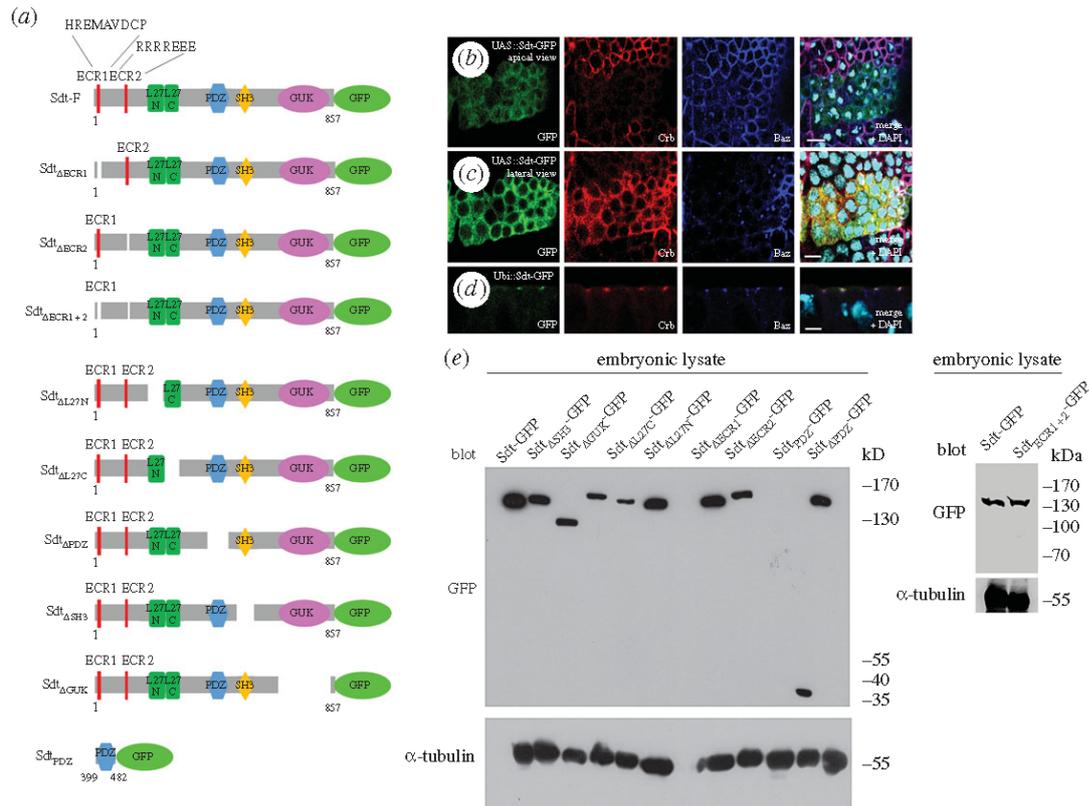


Figure 1. Structure–function analysis of *Drosophila* Stardust in epithelial cells. (a) Schematic drawing of different Sdt variants analysed in this study. The amino acid sequence of ECR1 and ECR2 is indicated in wild-type Sdt. (b, c) Overexpression of UAS::Sdt-GFP using en::GAL4 results in cytoplasmic Sdt-GFP localization and depletion of Crb and partially of Baz from the subapical region (focal plane in (b)) and an accumulation of the proteins in the cytoplasm (more lateral focal plane in (c)). (d) Ubi::Sdt-GFP localizes correctly to the apical junctions. (e) Western blotting of embryonic lysates expressing the Sdt variants described in this study. Pictures show embryonic stages 11–12. Scale bars, 5 μ m.

Apart from the PDZ domain, recent data from the crystallization of parts of the Crb-Pals1 complex reveal an important role of the SH3 (Src-homology-3) and GUK (guanylate kinase) domains in stabilizing the Crb-Pals1 complex, thus regulating lumen formation in mammalian cysts models [35].

Because limited information is available about the function of the protein-interaction domains of Sdt *in vivo*, we performed a structure–function analysis of Sdt in the embryonic epidermis of *Drosophila*.

2. Material and methods

2.1. Plasmids

The ORF of Sdt-F (formerly described as Sdt-B1) was cloned into pENTR (Life Technologies). Deletions of the distinct domains (introducing a flexible 3xGlycin spacer instead of the domain) were established by mutagenesis PCR using the following oligonucleotides:

SdtDECR1-F: 5'-CAAGATAACGGTCCAGGTGGAGGTGACACGTTTCATCGCA-3'—deletion of aa11–19;

SdtDECR2-F: 5'-TACCAGGAGCAACTGGGAGGTGGAGAGCGCATAGCGCAG-3'—deletion of aa119–125;

SdtDL27N-F: 5'-GCGGAACAGATCGATGGTGGAGGTTCTGGTCCACTGCAT-3'—deletion of aa193–250;

SdtDL27C-F: 5'-CGCGTCTCTGGTCCAGGAGGTGGAGGCACGCCCTCGCCA-3'—deletion of aa254–304;

SdtDPDZ-F: 5'-ATCATCCAGATCGAGGGAGGTGGACCAGCGGGTAGTCCA-3'—deletion of aa405-476;
 SdtDSH3-F: 5'-GACACCGCCGTGTTGGGAGGTGGACAGTCGTTCCAGCAT-3'—deletion of aa509-568;
 SdtDGUK-F: 5'-GCTACCCACAAGCGGGGAGGTGGACAATGGGTGCCCCGCC-3'—deletion of aa657-841.

The ORF of Sdt variants was subcloned into UWGattB (modified from UWG, which was obtained from the *Drosophila* Genomic Resource Center as described before [29]) vector by clonase reaction (Life Technologies).

2.2. Fly stocks and genetics

Fly stocks were cultured on standard cornmeal agar food and maintained at 25°C. Transgenic flies of UAS::Sdt-GFP and the Ubi::Sdt-GFP variants were established using the Phi-C31-Integrase system [36] with attP40 (for the UAS construct) and attPVK00037 (22A, for the Ubi::Sdt-GFP constructs). En::GAL4 and arm::GAL4 were obtained from the Bloomington stock center. The *sdt*^{K85} allele [37] was used for evaluation of the function of (mutant) Sdt proteins *in vivo* by producing germ line clones with the female sterile OvoD technique [38] using FRT19A-OvoD1, hs::Flp (BL#23880). Females of *sdt*^{K85}, FRT19A-OvoD1, FRT19A; Ubi::Sdt-GFP were mated with males carrying an FM7-ChFP-fluorescent balancer [39] and Ubi::Sdt-GFP. Embryos which were homozygous for *sdt*^{K85} were identified using staining against sex lethal [40] for immunostainings and by sorting against ChFP for cuticle preparations and lethality tests. The *crb*^{11A22} allele [41] was used for cuticle preparations of *crb*-mutant embryos. For lethality tests, *sdt*^{K85}-mutant embryos expressing the Sdt protein variants were generated as described above. In three independent experiments, 100 homozygous mutant embryos were scored (in each experiment) for embryonic lethality, L1/L2, L3 and pupal lethality and surviving flies. Error bars indicate the standard error of the mean.

2.2.1. Generation of an antibody against Sdt

An antibody directed against the PDZ domain of Sdt was raised by immunizing rabbits with GST-Sdt_{PDZ} (Davids Biotechnology, Regensburg, Germany). The specificity of the serum was tested in immunostainings on *sdt*^{K85} mutant embryos (electronic supplementary material, figure S1*c,d*).

2.2.2. Immunoprecipitation and western blotting

For immunoprecipitations, w⁻ embryos or embryos expressing GFP-tagged Sdt variants from an overnight collection were dechorionated and lysed in lysis buffer (1% Triton X-100, 150 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 50 mM Tris-HCl pH 7.5) supplemented with protease inhibitors. After centrifugation, either mouse anti Sdt antibody [42], mouse anti β-galactosidase or rabbit anti GFP (Life Technologies) was added to embryonic lysate corresponding to 500 μg total protein. Immune complexes were harvested using protein A/G-conjugated agarose (BioVision). Beads were washed five times in lysis buffer and boiled in 2× SDS sample buffer before SDS-PAGE and western blot. Immunoprecipitation from Schneider 2R cells transfected with Sdt-GFP (Sdt UWGattB) and Ubi::PAR-6-myc (PAR-6 UWM) was similarly performed as described previously [30]. Western blotting was done according to standard procedures. The primary antibodies used for western blotting were as follows: mouse anti Crb (Cq4, 1 : 50, DSHB), mouse anti Sdt (1 : 20, [42]), guinea pig anti PATJ (1 : 1000, [30]), rabbit anti Baz (1 : 2000, [43]), rabbit anti aPKC (aPKCζ, 1 : 500, Santa Cruz sc-216), mouse anti GFP (1 : 500, B2, Santa Cruz sc-9996) and guinea pig anti PAR6 (1 : 500, [44]).

2.2.3. Immunohistochemistry

Embryos were fixed in 4% formaldehyde, phosphate buffer pH 7.4 as previously described [45]. The primary antibodies used for indirect immunofluorescence were as follows: guinea pig anti PATJ (1 : 500, [30]), mouse anti Sdt (1 : 20, [42]), rabbit anti Sdt (1 : 2000, this study), rabbit anti Baz (1 : 1000, [43]), mouse anti Crb (Cq4, 1 : 50, DSHB), mouse anti Dlg (1 : 50, DSHB), rabbit anti GFP (#A11122, 1 : 1000, Life Technologies) and chicken anti GFP (1 : 2000, Aves Laboratories). Secondary antibodies conjugated with Alexa 488, Alexa 568 and Alexa 647 (Life Technologies) were used at 1 : 400.

Images were taken on a Zeiss LSM 710 Meta confocal microscope and processed using Adobe Photoshop.

3. Results and discussion

3.1. Sdt exhibits several evolutionary conserved protein-interaction domains

Similar to other MAGUK (membrane-associated GUK) proteins, e.g. discs large, ZO-1, calcium/calmodulin-dependent serine protein kinase or other members of the MPP (MAGUK p55 subfamily) family, Sdt contains a GUK domain, which is catalytically inactive but might facilitate protein–protein interaction, as well as a single PDZ domain (binding to Crb and Baz [11,12,34,46]), an SH3 domain and two L27 domains (L27N facilitating assembly of the Sdt-PAT] complex and L27C recruiting Lin-7/Veli [29,32,46–48]).

Furthermore, two highly conserved short amino acid motifs (ECR1 = HREMAVDCP and ECR2 = RRRREEE, figure 1a) have been identified in mammalian Pals1 to mediate an interaction with the PDZ domain of PAR-6 [24–26]. Interestingly, this interaction is only seen in Sdt isoforms, which do not exhibit a long spacer between ECR1 and ECR2 due to alternative splicing (formerly annotated as Sdt-B1 [11,27,37]).

Some insights into the *in vivo* relevance of the described protein interactions have already been drawn from structure–function analyses in photoreceptor cells of the developing *Drosophila* eye [27], a study in zebrafish using alleles and morpholino-knock-down of Nagie oko, the zebrafish homologue of Sdt [49], and expression of Pals1 variants in cultured mammalian epithelial cells in a wild-type background [46].

In order to investigate the relevance of the protein-interaction domains for epithelial polarization in the *Drosophila* epidermis and for development of the fly, we performed a structure–function analysis of diverse Sdt variants (as depicted in figure 1a) in a wild-type background as well as in an *sdt*-mutant background. Even mild overexpression of Sdt (using the UAS/GAL4 system with a weak *armadillo* promoter or *engrailed* promoter at 18°) causes a strong cytoplasmic mislocalization of the overexpressed protein as well as of Crb, polarity defects and embryonic lethality (figure 1b,c and data not shown). To avoid these overexpression artefacts, we expressed Sdt from a ubiquitous promoter (*ubiquitin*, *ubi*), resulting in a physiological localization at subapical region (figure 1d) and a robust rescue capacity (figure 4a). We decided to focus on the Sdt-F isoform (formerly annotated as Sdt-B1 [11,12,37,42]) because this isoform has been reported to be expressed throughout embryonic development and to be capable of interacting with PAR-6 as outlined above. We confirmed by western blotting the expression of a band around 110 kDa (predicted size of Sdt-F: 94 kDa), which probably corresponds to Sdt-F, from gastrulation onwards (electronic supplementary material, figure S1b). In addition, a second specific band appeared slightly above, which either corresponds to a newly identified isoform (Sdt-D [42]) or represents protein modifications of Sdt-F. Notably, Sdt-B (previously annotated as Sdt-MAGUK1 [11] or Sdt-A [37], predicted size 139 kDa) is only expressed at very low levels at the end of embryogenesis (electronic supplementary material, figure S1b, asterisk).

Although expression of Sdt-F in an *sdt*-mutant background results in a rescue of around 40% hatched flies and suppression of the apical–basal polarity phenotype in the embryonic epidermis, still approximately 40% of the rescued embryos die at the end of embryogenesis (or fail to hatch as larvae), showing no obvious polarity defects (figures 3b and 4d,m). This might be either due to the artificial promoter, which expresses Sdt in all tissues and might produce dominant negative effects, or due to the lack of further isoforms, which might be essential in a distinct developmental context [37,42]. However, with respect to apical–basal polarity of the embryonic epidermis, analyses of *sdt*-mutant embryos rescued with Sdt-F show a full rescue capacity and no polarity defects (figure 3b and data not shown). All Sdt variants were expressed with a C-terminal GFP and can be detected at the correct size in western blotting (figure 1e).

3.2. The PDZ and SH3 domain of Sdt cooperate to stabilize the Crb–Sdt complex

First, we investigated which domains are necessary to target the protein to the subapical region. In agreement with previous reports, the PDZ domain, which recruits Sdt either to Crb or to Baz at the subapical region [11,12,34,46,49], is essential for correct subcellular localization of Sdt. Deletion of the PDZ domain results in a strongly disturbed and mostly cytoplasmic localization of the mutant protein (figure 2f), whereas wild-type Sdt-GFP correctly localizes to the subapical region (figures 1d and 2a).

Strikingly, the PDZ domain alone is not sufficient to accomplish cortical recruitment (figure 2i), although the small PDZ-GFP chimeric protein is stable (figure 1e). A recent study suggests that apart from the PDZ domain, the SH3 and GUK domains play a crucial role to support the formation and

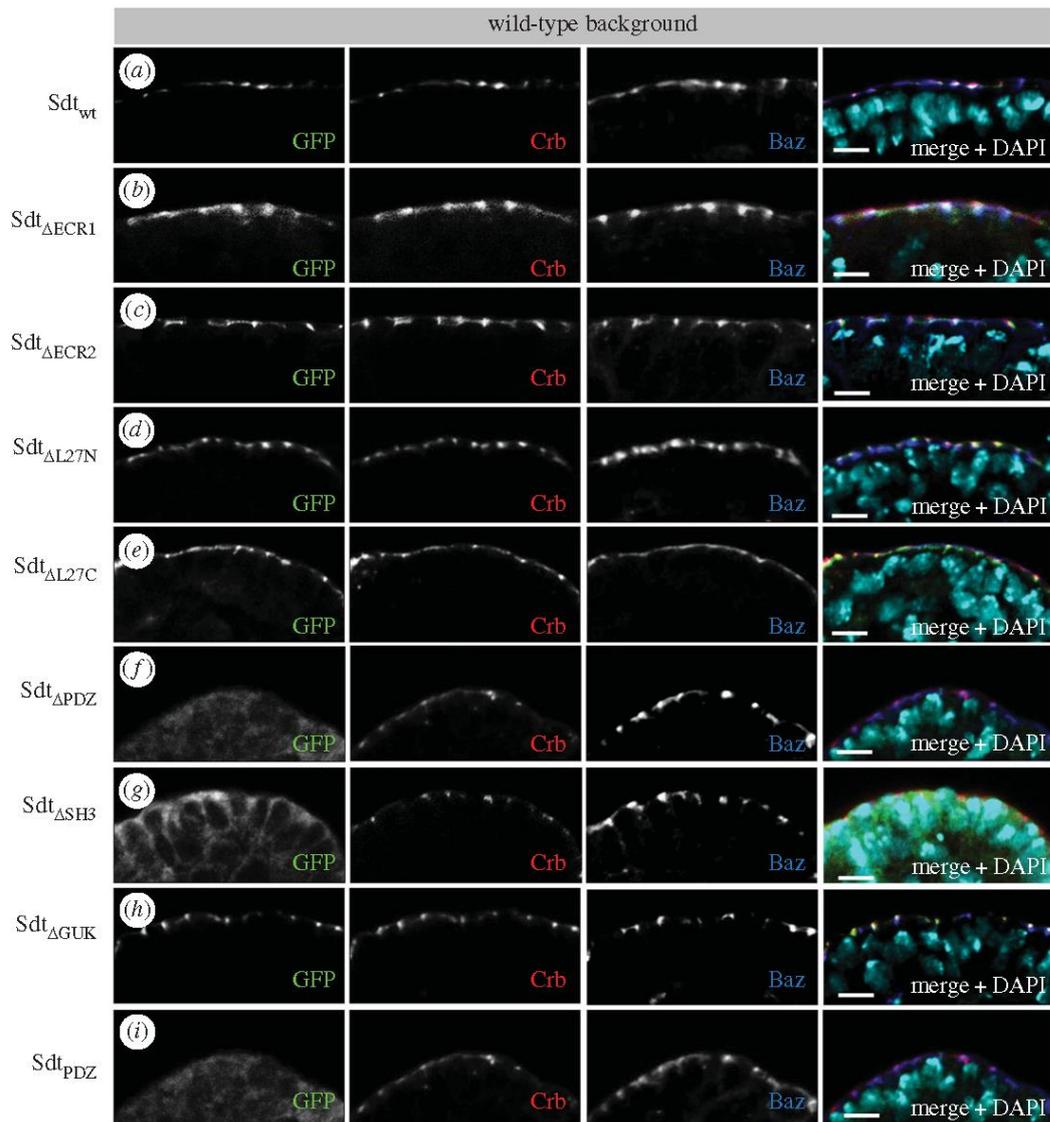


Figure 2. Localization of Sdt variants in wild-type epithelial cells. (*a–e,h*) Deletion of the ECR1, ECR2 motif or the L27N, L27C or GUK domain does not impair localization of the mutant protein at the subapical region of wild-type epithelial cells, where it colocalizes with Crb and Baz. (*f*) Sdt protein, which lacks the PDZ domain, results in a rather cytoplasmic localization of the mutant protein with some residual staining at the lateral membrane. (*g*) The SH3 domain supports correct targeting to the subapical region and Sdt $_{\Delta SH3}$ mislocalizes—similar to Sdt $_{\Delta PDZ}$ —to the cytoplasm and to the lateral cortex. (*i*) The isolated PDZ domain fused to GFP is not sufficient to localize to the (apical) junctions. All Sdt proteins were expressed with a ubiquitous promoter (Ubi::Sdt-GFP) from two chromosomes carrying the insertion. Pictures show embryonic stages 11–12. Scale bars, 5 μ m.

stability of the Crb–Pals1 complex [35]. Indeed deletion of the SH3 domain results in a rather cytoplasmic localization of the mutant protein (figure 2*g*), although some protein remains at the cell membrane but exhibits a broader localization along the lateral membrane. Although Sdt $_{\Delta PDZ}$ or Sdt $_{\Delta SH3}$ are still capable of binding endogenous PATJ (figure 5*d*), PATJ is not displaced from the subapical region by the cytoplasmic Sdt variants (electronic supplementary material, figure S2*b,c*). Co-immunoprecipitation experiments of mutant Sdt proteins with endogenous Crb demonstrate that apart from the PDZ domain, the SH3 domain of Sdt is indeed essential for the association of Sdt with Crb (figure 5*d*). Consequently, the expression of Sdt $_{\Delta PDZ}$ or Sdt $_{\Delta SH3}$ does not rescue the cuticle phenotype of *sdt*^{K85} (figure 4*c,d,j,k*) or Crb localization/apical–basal polarity in epithelial cells of the embryonic epidermis (figure 3*h,i*). These results are in line with previous studies in zebrafish retinal neural and pigmented epithelia and *Drosophila* photoreceptor cells describing a crucial role of the PDZ domain [27,49] and the SH3 domain [27] in these

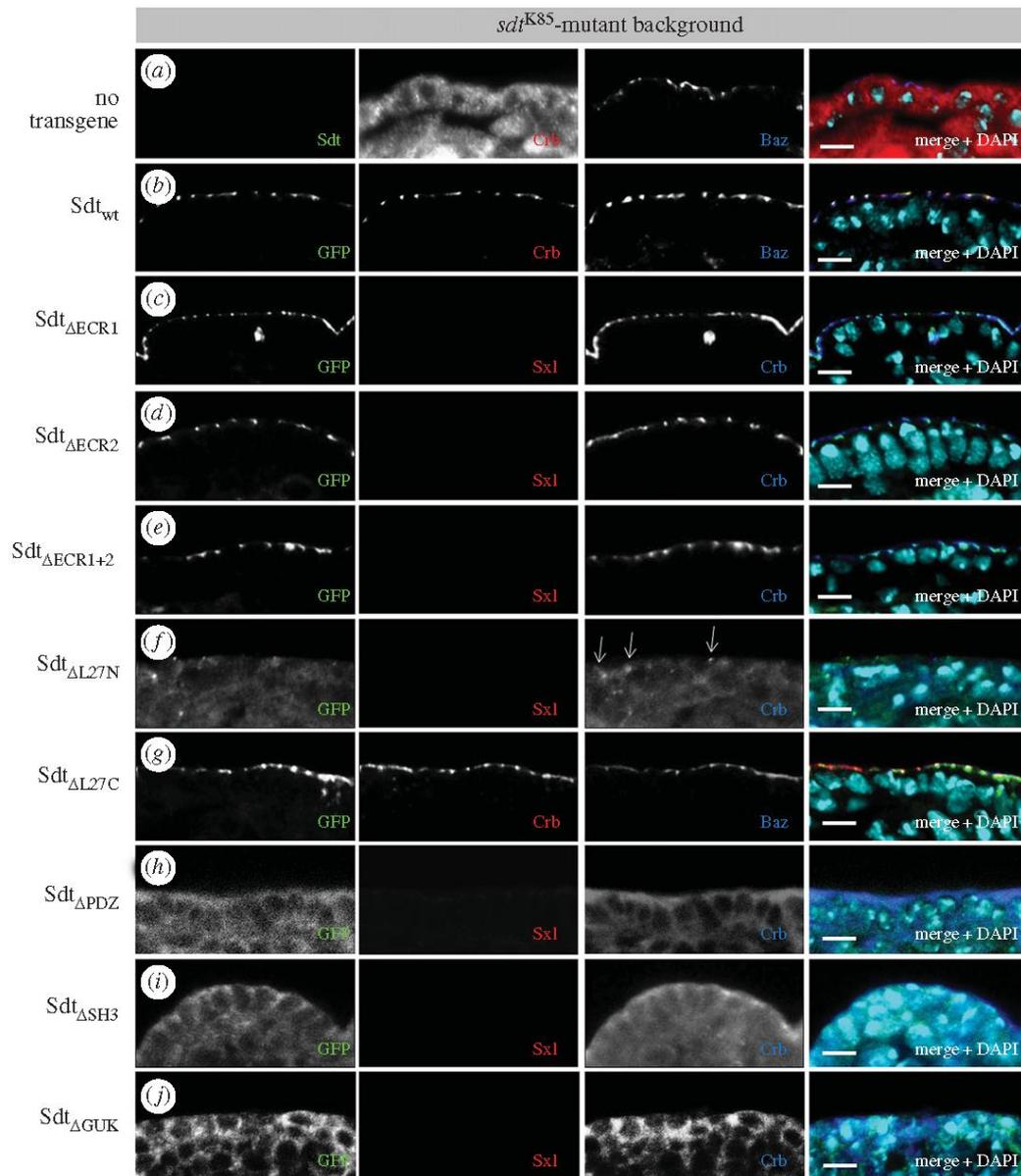


Figure 3. Several protein–protein interaction domains of Sdt are essential for epithelial cell polarity and fly development. (*a–e,g*) Expression of wild-type Sdt, Sdt $_{\Delta ECR1}$, Sdt $_{\Delta ECR2}$, Sdt $_{\Delta ECR1+2}$ or Sdt $_{\Delta L27C}$ in *sdt*-mutant cells of the embryonic epidermis rescues apical–basal polarity and Crb localization at the subapical region. (*f,h–j*) Expression of Sdt $_{\Delta L27N}$, Sdt $_{\Delta PDZ}$, Sdt $_{\Delta SH3}$ or Sdt $_{\Delta GUK}$ in *sdt*-mutant embryos results in disturbed apical–basal polarity and mislocalization of Crb. *sdt*^{K85}-mutant embryos were either derived from homozygous parents (Sdt_{wt}, Sdt $_{\Delta L27C}$) or germ line clones were generated as described in Material and methods and hemizygous mutant embryos were identified using staining against sex lethal. All Sdt proteins were expressed with a ubiquitous promoter (Ubi::Sdt-GFP) from two chromosomes carrying the insertion. Pictures show embryonic stages 11–12. Scale bars, 5 μ m.

apical–basal polarized cell types. By contrast, deletion of the SH3 domain does not affect targeting of Pals1 to the tight junctions (TJ) in cultured mammalian cells [46].

By contrast, deletion of the GUK domain does not affect localization of the mutant protein in wild-type epithelial cells or its association with Crb (figures 2*h* and 5*d*).

3.3. The ECR domains are not essential for apical–basal polarity in the embryonic epidermis

Apart from the canonical Crb–Sdt–PATJ complex, several interactions between the PAR/aPKC and the Crb complex have been suggested: endogenous Sdt and PATJ associate with Baz (but not in a quarternary

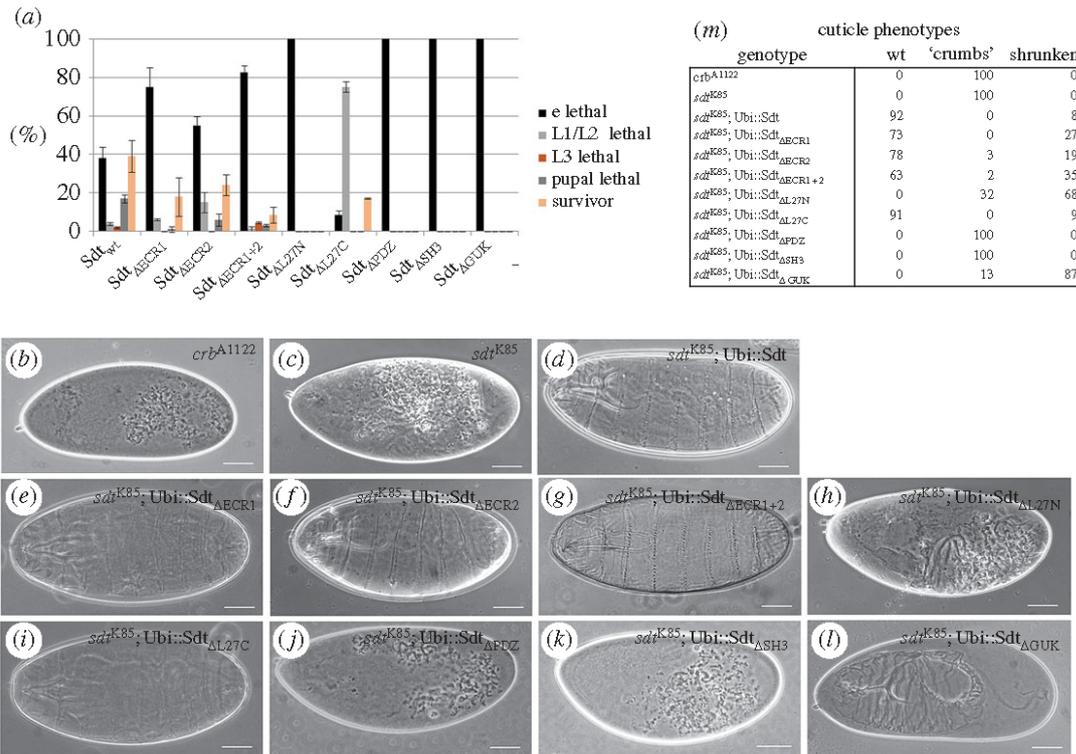


Figure 4. Functional analysis of Sdt domains in development of *Drosophila*. (a) Lethality test of different Sdt variants used in this study. For each of the three experiments, 100 homozygous mutant embryos derived from *sdt^{K85}* germ line clones were identified using the FM7-ChFP balancer. (b,c) Embryos homozygous mutant for *crb* or *sdt* die during embryonic development and fail to secrete more than debris of cuticle ('crumbs' phenotype), whereas expression of Sdt-GFP rescues this defect to a normal cuticle in most embryos (d,m). The majority of *sdt*-mutant embryos rescued by expressing Sdt_{ΔECR1} (e,m), Sdt_{ΔECR2} (f,m), Sdt_{ΔECR1+2} (g,m) or Sdt_{ΔL27C} (i,m) exhibit a regular cuticle. In embryos with Sdt_{ΔL27N}-rescue, one-third of the embryos exhibit a 'crumbs' phenotype, whereas in two-thirds of the embryos the cuticle is shrunken, shows holes and lacks head structures (h,m). Embryos with Sdt_{ΔPDZ}-rescue (j,m) or Sdt_{ΔSH3}-rescue (k,m) phenocopy the cuticle phenotype of *sdt*. (l,m) Rescue of *sdt* with Sdt_{ΔGUK} produces a shrunken cuticle in most cases with holes and defects in head development. In total, 100 cuticles were scored for each genotype. Scale bars, 200 μm.

complex Crb–Sdt–PATJ–Baz), probably by direct binding of Sdt to Baz [29,34]. aPKC binds to and phosphorylates Crb *in vitro* [50], although this phosphorylation is not essential for epithelial polarity and fly development [51] (R.S. and M.P.K. 2016, unpublished data). PAR-6 binds directly to the ERL1-motif of Crb [13,14] as well as to the ECR1/ECR2 domains of Pals1 [24–26] *in vitro* and under overexpression conditions in mammalian cultured cells. An *in vivo* relevance of the Sdt–PAR-6 interaction might be deduced from the mislocalization of PAR-6 in *sdt*-mutant photoreceptor cells, which are rescued by Sdt variant lacking the entire N-terminus including the ECR-motifs and the L27N domain [27]. We found that Sdt_{ΔECR1} and Sdt_{ΔECR2} localize correctly at the subapical region in the embryonic epidermis (figure 2b,c). Furthermore, expression of these transgenes as well as the double mutant protein (Sdt_{ΔECR1+2}) in an *sdt*-mutant background restores epithelial polarity and Crb localization (figure 3c–e). However, lethality tests reveal a higher embryonic lethality of *sdt*-mutants expressing either Sdt_{ΔECR1} or Sdt_{ΔECR2} compared with wild-type Sdt, with an even more increased lethality phenotype for Sdt_{ΔECR1+2} (figure 4a), although immunostainings with polarity markers (figure 3c–e and data not shown) do not reveal obvious polarity defects. Furthermore, cuticle preparations demonstrate secretion defects in only a minority of embryos (figure 4e–g,m). Hatched flies of these genotypes appear normal (data not shown). We confirmed that Sdt and PAR-6 can interact *in vitro* and under overexpression conditions in Schneider-2R cells (S2R cells) and that this interaction depends on ECR1 (figure 5a,b). However, upon immunoprecipitation of endogenous Sdt from wild-type embryos, we were not able to detect substantial amounts of PAR-6 to associate with Sdt whereas Crb, PATJ, Baz and aPKC co-immunoprecipitated with Sdt (figure 5c). Moreover, mutation of either ECR1 or ECR2 (or both together) does not impair the assembly of the Crb–Sdt complex *in vivo* (figure 5d).

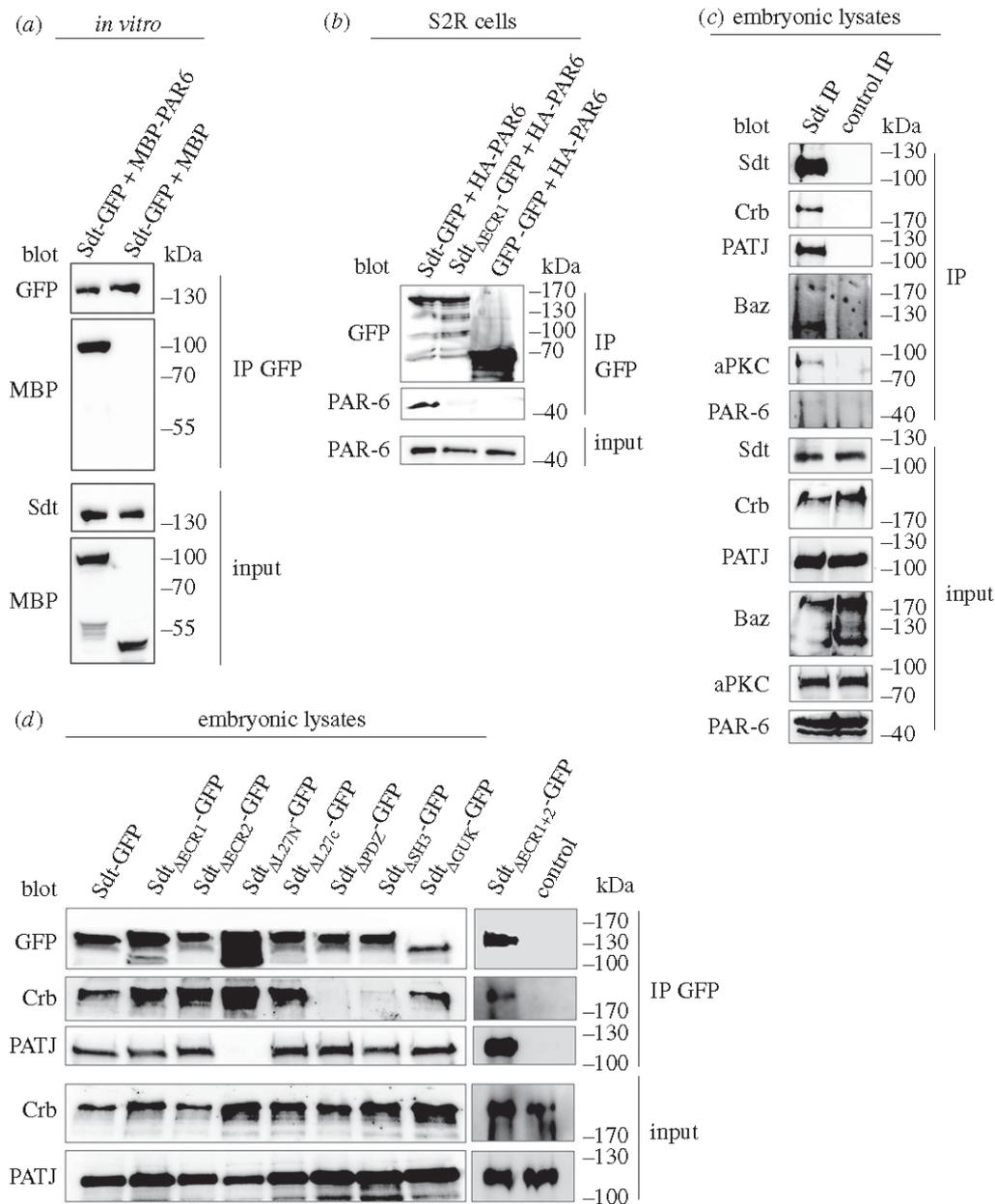


Figure 5. Association of Sdt with different polarity proteins. (a) Recombinant MBP-PAR-6 but not MBP alone interacts directly with Sdt-GFP, which was purified from transfected S2R cells. (b) Overexpressed HA-PAR-6 co-immunoprecipitates with Sdt-GFP but not with Sdt- Δ ECR1 or 2xGFP (negative control). (c) Endogenous Crb, PATJ, Baz and aPKC but not PAR-6 co-immunoprecipitate with endogenous Sdt from embryonic lysates. Control IP = IP with anti- β -galactosidase antibody. (d) Sdt variants were immunoprecipitated using an anti GFP antibody, and proteins bound to the chimeric proteins were identified by western blotting. All Sdt proteins were expressed with a ubiquitous promoter (Ubi::Sdt-GFP) from two chromosomes carrying the insertion.

These data suggest that the ECR1 and ECR2 motifs are not essential for a robust binding (which can be detected by co-immunoprecipitation) of Sdt with PAR-6 or a stabilization of the Crb-Sdt-PATJ complex under endogenous conditions and are dispensable for apical-basal polarity but are to some extent crucial for efficient embryonic development.

3.4. The L27N domain exhibits functions beyond binding of PATJ

We recently revealed that the association of PATJ with both apical polarity complexes (the Crb and the Baz complexes) is essential for its function [29]. The recruitment to these polarity landmarks is facilitated by the L27N domain of Sdt, which heterodimerizes with the L27 domain of PATJ [47].

Consequently, deletion of the L27 domain in PATJ abolishes binding to Sdt and localization of the mutant protein at the subapical region [28,29]; vice versa, deletion of L27N in Sdt does not affect the protein's localization in wild-type epithelial cells (figure 2d) but disturbs binding to PATJ (figure 5d). We and others revealed that PATJ is not crucial for apical-basal polarity or stabilization of the Crb-Sdt complex in the embryonic epidermis [28,30,31] but *PATJ*-mutant flies die during early pupation, showing no obvious metamorphosis, which is—at least partly—due to a decreased Myosin activation [30]. Surprisingly, *sdt*-mutant flies expressing the *Sdt* $_{\Delta L27N}$ transgene show a complete embryonic lethality (figure 4a), exhibiting strong polarity and cuticle defects with some residual intact cuticle left, which might be due to some apically localized Crb protein (figure 3f, arrows; and figure 4h).

A possible explanation for this finding is that L27N facilitates the formation of a stable supramolecular Crb-Sdt(-PATJ) complex by either hetero-oligomerization with PATJ or homo-oligomerization with another Sdt molecule. However, the first possibility can be ruled out because loss of PATJ does not affect the stability of Crb-Sdt complex in the embryonic epidermis [28,30,31] and embryos which are homozygous mutant for *PATJ* neither show polarity defects in the embryonic epidermis nor exhibit a fully penetrant embryonic lethality [30]. The second possibility is very unlikely because first homo-oligomerization of Sdt/Pals1 seems to be biochemically unfavourable [47] and second *Sdt* $_{\Delta L27N}$ robustly associates with endogenous Crb (figure 5d). A third explanation would be that unbound PATJ (which does not associate with Sdt anymore) exhibits a dominant negative effect (as overexpression of PATJ does [30]). However, we did not observe a rescue effect of *sdt*-*PATJ* double mutants expressing *Sdt* $_{\Delta L27N}$, which would support this hypothesis (data not shown).

Thus, the L27N domain might accomplish more crucial functions during epithelial polarization of the embryonic epidermis apart from recruiting PATJ.

In contrast with the L27N domain, the L27C domain does not seem to be essential for epithelial polarization and fly development because *Sdt* $_{\Delta L27C}$ can rescue the polarity phenotypes of *sdt*^{K85} and produces surviving flies (figures 3g and 4a,i). This is in line with previous results that identify Lin-7/Veli as an interaction partner of *Sdt* $_{L27C}$ and describe a role for Lin-7/Veli in postsynaptic signal transmission but not for epithelial polarity or fly development [32,33]. The increased early larval lethality might indeed be due to defects in synapse formation. Although this is in contrast with findings in mammalian cells, which suggest a supportive role of Veli in stabilization of the Crb-Pals1 complex [48], we could not detect a decreased targeting of apical-junctional *Sdt* $_{\Delta L27C}$ or Crb or a weaker association of mutant Sdt with Crb (figure 5d).

3.5. The GUK domain is not essential for stabilization of the Crb-Sdt complex but necessary for embryonic development

As mentioned above, deletion of the GUK domain affects neither localization of Sdt to the subapical region in wild-type cells nor its association with Crb (figures 2h and 5d). However, in an *sdt*^{K85}-mutant background, expression of *Sdt* $_{\Delta GUK}$ does not rescue the apical localization of Crb or the embryonic lethality (figures 4a and 3j). Epithelial polarity and embryonic morphology are severely disrupted, which is reflected by a disturbed cuticle secretion: cuticles from *sdt*^{K85}; *Sdt* $_{\Delta GUK}$ embryos are shrunken and display big holes in the dorsal cuticle (figure 4l). This is different from *sdt*^{K85} cuticles which exhibit only crumbles of cuticle and thus phenocopies a *crb* loss of function allele (figure 4b,c). In contrast with *sdt*^{K85}-mutant embryos (figure 3a), in which Crb is cytoplasmic/vesicular, *sdt*^{K85}; *Sdt* $_{\Delta GUK}$ embryos exhibit to some extent a cortical localization, although randomly distributed (figure 3j). However, this residual cortical localization seems to be sufficient to produce a segmented, although shrunken and irregular cuticle (figure 4l).

Therefore, we cannot verify a role for the GUK domain of Sdt in stabilizing the Crb-Sdt complex *in vivo*. Nonetheless, the GUK domain is essential for the function of Sdt during epithelial polarization, which might be independent of its canonical role to stabilize Crb.

Taken together our findings confirm an essential role of the PDZ-SH3 domain tandem in binding and stabilization of Crb *in vivo*. By contrast, we did not confirm a function of ECR1 and ECR2 in epithelial polarization *in vivo*—binding of Sdt to PAR-6 does not seem to take place at a substantial level in embryonic epithelia and, as *Sdt* $_{\Delta ECR1}$ - and *Sdt* $_{\Delta ECR2}$ -mutant embryos do not exhibit polarity phenotypes, it is unlikely that the PAR-6/Sdt interaction contributes to the establishment of apical-basal polarity but might rather have other functions, which are not related to Crb stabilization. This is in contrast with the function of these domains in photoreceptor cells, where the N-terminus of Sdt-H (originally described as Sdt-B2, an isoform which is exclusively expressed in heads), including ECR1,

ECR2 and L27N, is important for the recruitment of PAR-6 in pupae and localization to the stalk membrane in adults [27]. However, it remains to be clarified whether this phenotype is due to loss of PAR-6 binding (upon deletion of ECR1 and ECR2) or due to impaired binding of Sdt to PATJ (deletion of the L27N domain), or both. Indeed, loss of PATJ in photoreceptor cells results in mislocalization of Crb and PAR-6 [31].

On the other hand, Sdt isoforms containing a larger stretch of amino acids between ECR1 and ECR2 (e.g. Sdt-B) are not capable of fully targeting PAR-6 in photoreceptor cells. Similar, the ECR1 and L27N domains are essential for retinal neuron organization and myocard development in zebrafish [49], whereas ECR1 seems to be dispensable for apical–basal polarity in the retinal pigmented epithelium and the overall fish morphology. This further underlines the importance of the cellular and temporal context for the function of Sdt in polarized tissues, suggesting a crucial role of the Sdt–PAR-6 interaction in neural cells (*Drosophila* photoreceptor cells and zebrafish retinal neurons) but not in other epithelia (*Drosophila* epidermis, retinal pigmented epithelium).

Moreover, our data indicate a new, PATJ-independent function of the L27N domain, which is in line with previous reports demonstrating that mutant Nagie oko protein, which cannot bind PATJ fails to rescue body form defects and the neural retinal phenotype of a Nagie oko mutant allele in zebrafish [49]. Deletion of the L27N domain does not affect localization of the mutant protein in the epidermis of wild-type *Drosophila* (which is in agreement with the observation that deletion of PATJ does not affect Sdt localization [30]), whereas this domain seems to be crucial for TJ targeting of Pals1 in cultured mammalian cells [46].

Finally, we demonstrate that the GUK domain of Sdt is crucial for apical–basal polarity of the embryonic epidermis and for embryonic development. Similar, deletion of the GUK domain is indispensable for photoreceptor polarity in the adult *Drosophila* eye [27]. However, we demonstrate that the GUK domain is neither essential for stabilizing binding to Crumbs as suggested recently [35] nor important for the localization of the protein in wild-type epithelial cells. These data hint to an essential, Crb-independent role of the GUK domain during epithelial polarization and embryonic development which was not addressed in previous studies [27,46,49].

Data accessibility. Electronic supplementary material data are available in the electronic supplementary material at Dryad (<http://dx.doi.org/10.5061/dryad.n5fr8>) [52]. Supplementary figure 1 shows the expression of endogenous Sdt in embryonic lysates of different stages and supplementary figure 2 shows PATJ stainings on wild-type background with different Sdt variants.

Authors' contributions. L.K., S.F., R.S., A.S and M.P.K. performed the experiments, analysed the results and approved the final version of the manuscript; L.K. and M.P.K. designed the experiments and wrote the manuscript.

Competing interests. The authors declare no competing interests.

Funding. This work was supported by grants of the DFG to M.P.K. (DFG3901/2-1, DFG3901/1-2, SFB699-A13).

Acknowledgements. We thank E. Knust, A. Wodarz, the Bloomington *Drosophila* stock center at the University of Indiana and the Developmental Studies Hybridoma Bank at the University of Iowa for sending reagents.

References

1. Tepass U. 2012 The apical polarity protein network in *Drosophila* epithelial cells: regulation of polarity, junctions, morphogenesis, cell growth, and survival. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **28**, 655–685. (doi:10.1146/annurev-cellbio-092910-154033)
2. Nance J, Zallen JA. 2011 Elaborating polarity: PAR proteins and the cytoskeleton. *Development* **138**, 799–809. (doi:10.1242/dev.053538)
3. Suzuki A, Ohno S. 2006 The PAR-aPKC system: lessons in polarity. *J. Cell Sci.* **119**, 979–987. (doi:10.1242/jcs.02898)
4. Bulgakova NA, Knust E. 2009 The Crumbs complex: from epithelial-cell polarity to retinal degeneration. *J. Cell Sci.* **122**, 2587–2596. (doi:10.1242/jcs.023648)
5. Tepass U. 1996 Crumbs, a component of the apical membrane, is required for zonula adherens formation in primary epithelia of *Drosophila*. *Dev. Biol.* **177**, 217–225. (doi:10.1006/dlbio.1996.0157)
6. Tepass U, Theres C, Knust E. 1990 crumbs encodes an EGF-like protein expressed on apical membranes of *Drosophila* epithelial cells and required for organization of epithelia. *Cell* **61**, 787–799. (doi:10.1016/0092-8674(90)90189-L)
7. Wodarz A, Hinz U, Engelbert M, Knust E. 1995 Expression of Crumbs confers apical character on plasma membrane domains of ectodermal epithelia of *Drosophila*. *Cell* **82**, 67–76. (doi:10.1016/0092-8674(95)90053-5)
8. Tanentzapf G, Tepass U. 2003 Interactions between the crumbs, lethal giant larvae and bazooka pathways in epithelial polarization. *Nat. Cell Biol.* **5**, 46–52. (doi:10.1038/nclb.896)
9. Letizia A, Ricardo S, Moussian B, Martin N, Llimargas M. 2013 A functional role of the extracellular domain of Crumbs in cell architecture and apicobasal polarity. *J. Cell Sci.* **126**, 2157–2163. (doi:10.1242/jcs.122382)
10. Klebes A, Knust E. 2000 A conserved motif in Crumbs is required for E-cadherin localisation and zonula adherens formation in *Drosophila*. *Curr. Biol.* **10**, 76–85. (doi:10.1016/S0960-9822(99)00277-8)
11. Bachmann A, Schneider M, Theilenberg E, Grawe F, Knust E. 2001 *Drosophila* Stardust is a partner of Crumbs in the control of epithelial cell polarity. *Nature* **414**, 638–643. (doi:10.1038/414638a)
12. Hong Y, Stronach B, Perrimon N, Jan LY, Jan YN. 2001 *Drosophila* Stardust interacts with Crumbs to control polarity of epithelia but not neuroblasts. *Nature* **414**, 634–638. (doi:10.1038/414634a)
13. Kempkens O, Medina E, Fernandez-Ballester G, Ozuyaman S, Le Bivic A, Serrano L, Knust E. 2006 Computer modelling in combination with *in vitro* studies reveals similar binding affinities of *Drosophila* Crumbs for the PDZ domains of Stardust and DmPar-6. *Eur. J. Cell Biol.* **85**, 753–767. (doi:10.1016/j.ejcb.2006.03.003)
14. Lemmers C, Michel D, Lane-Guermonprez L, Delgrossi MH, Medina E, Arsanto JP, Le Bivic A. 2004 CRB3 binds directly to Par6 and regulates the morphogenesis of the tight junctions in mammalian epithelial cells. *Mol. Biol. Cell* **15**, 1324–1333. (doi:10.1091/mbc.E03-04-0235)

15. Medina E, Williams J, Klipfell E, Zarnescu D, Thomas G, Le Bivic A. 2002 Crumbs interacts with moesin and β Heavy-spectrin in the apical membrane skeleton of *Drosophila*. *J. Cell Biol.* **158**, 941–951. (doi:10.1083/jcb.200203080)
16. Wei Z, Li Y, Ye F, Zhang M. 2015 Structural basis for the phosphorylation-regulated interaction between the cytoplasmic tail of cell polarity protein crumbs and the actin-binding protein moesin. *J. Biol. Chem.* **290**, 11 384–11 392. (doi:10.1074/jbc.M115.643 791)
17. Laprise P, Beronja S, Silva-Gagliardi NF, Pellikka M, Jensen AM, McGlade CJ, Tepass U. 2006 The FERM protein Yurt is a negative regulatory component of the Crumbs complex that controls epithelial polarity and apical membrane size. *Dev. Cell* **11**, 363–374. (doi:10.1016/j.devcel.2006.06.001)
18. Chen C-L, Gajewski KM, Hamaratoglu F, Bossuyt W, Sansores-García L, Tao C, Halder G. 2010 The apical-basal cell polarity determinant Crumbs regulates Hippo signaling in *Drosophila*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **107**, 15 810–15 815. (doi:10.1073/pnas.1004060107)
19. Grzeschik NA, Parsons LM, Allott ML, Harvey KF, Richardson HE. 2010 Lgl, aPKC, and Crumbs regulate the Salvador/Warts/Hippo pathway through two distinct mechanisms. *Curr. Biol.* **20**, 573–581. (doi:10.1016/j.cub.2010.01.055)
20. Robinson BS, Huang J, Hong Y, Moberg KH. 2010 Crumbs regulates Salvador/Warts/Hippo signaling in *Drosophila* via the FERM-domain protein Expanded. *Curr. Biol.* **20**, 582–590. (doi:10.1016/j.cub.2010.03.019)
21. Richardson ECN, Pichaud F. 2010 Crumbs is required to achieve proper organ size control during *Drosophila* head development. *Development* **137**, 641–650. (doi:10.1242/dev.041913)
22. Lin Y-H, Currinn H, Pocha SM, Rothnie A, Wassmer T, Knust E. 2015 AP-2-complex-mediated endocytosis of *Drosophila* Crumbs regulates polarity by antagonizing Stardust. *J. Cell Sci.* **128**, 4538–4549. (doi:10.1242/jcs.174573)
23. Tepass U, Knust E. 1993 Crumbs and stardust act in a genetic pathway that controls the organization of epithelia in *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.* **159**, 311–326. (doi:10.1006/dbio.1993.1243)
24. Gao L, Macara IG. 2004 Isoforms of the polarity protein Par6 have distinct functions. *J. Biol. Chem.* **279**, 41 557–41 562. (doi:10.1074/jbc.M40372 3200)
25. Hurd TW, Gao L, Roh MH, Macara IG, Margolis B. 2003 Direct interaction of two polarity complexes implicated in epithelial tight junction assembly. *Nat. Cell Biol.* **5**, 137–142. (doi:10.1038/ncb923)
26. Wang Q, Hurd TW, Margolis B. 2004 Tight junction protein Par6 interacts with an evolutionarily conserved region in the amino terminus of PALS1/stardust. *J. Biol. Chem.* **279**, 30 715–30 721. (doi:10.1074/jbc.M401930200)
27. Bulgakova NA, Kempkens O, Knust E. 2008 Multiple domains of Stardust differentially mediate localisation of the Crumbs-Stardust complex during photoreceptor development in *Drosophila*. *J. Cell Sci.* **121**, 2018–2026. (doi:10.1242/jcs.031088)
28. Penalva C, Mirouse V. 2012 Tissue-specific function of Patj in regulating the Crumbs complex and epithelial polarity. *Development* **139**, 4549–4554. (doi:10.1242/dev.085449)
29. Sen A, Sun R, Krahn MP. 2015 Localization and function of Pals1-associated tight junction protein in *Drosophila* is regulated by two distinct apical complexes. *J. Biol. Chem.* **290**, 13 224–13 233. (doi:10.1074/jbc.M114.629014)
30. Sen A, Nagy-Zsver-Vadas Z, Krahn MP. 2012 *Drosophila* PATJ supports adherens junction stability by modulating Myosin light chain activity. *J. Cell Biol.* **199**, 685–698. (doi:10.1083/jcb.201206064)
31. Zhou W, Hong Y. 2012 *Drosophila* Patj plays a supporting role in apical-basal polarity but is essential for viability. *Development* **139**, 2891–2896. (doi:10.1242/dev.083162)
32. Bachmann A, Timmer M, Sierralta J, Pietrini G, Gundelfinger ED, Knust E, Thomas U. 2004. Cell type-specific recruitment of *Drosophila* Lin-7 to distinct MAGUK-based protein complexes defines novel roles for Sdt and Dlg-597. *J. Cell Sci.* **117**, 1899–1909. (doi:10.1242/jcs.01029)
33. Soukup SF, Pocha SM, Yuan M, Knust E. 2013. Dlin-7 is required in postsynaptic lamina neurons to prevent light-induced photoreceptor degeneration in *Drosophila*. *Curr. Biol.* **23**, 1349–1354. (doi:10.1016/j.cub.2013.05.060)
34. Krahn MP, Bückers J, Kastrup L, Wodarz A. 2010 Formation of a Bazooka–Stardust complex is essential for plasma membrane polarity in epithelia. *J. Cell Biol.* **190**, 751–760. (doi:10.1083/jcb.201006029)
35. Li Y, Wei Z, Yan Y, Wan Q, Du Q, Zhang M. 2014 Structure of Crumbs tail in complex with the PALS1 PDZ-SH3-GK tandem reveals a highly specific assembly mechanism for the apical Crumbs complex. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **111**, 17 444–17 449. (doi:10.1073/pnas.1416511111)
36. Groth AC, Fish M, Nusse R, Calos MP. 2004 Construction of transgenic *Drosophila* by using the site-specific integrase from phage ϕ C31. *Genetics* **166**, 1775–1782. (doi:10.1534/genetics.166.4.1775)
37. Berger S, Bulgakova NA, Grawe F, Johnson K, Knust E. 2007 Unraveling the genetic complexity of *Drosophila* stardust during photoreceptor morphogenesis and prevention of light-induced degeneration. *Genetics* **176**, 2189–2200. (doi:10.1534/genetics.107.071449)
38. Chou TB, Noll E, Perrimon N. 1993 Autosomal [PovoD1] dominant female-sterile insertions in *Drosophila* and their use in generating germ-line chimeras. *Development* **119**, 1359–1369.
39. Abreu-Blanco MT, Verboon JM, Liu R, Watts JJ, Parkhurst SM. 2012 *Drosophila* embryos close epithelial wounds using a combination of cellular protrusions and an actomyosin purse string. *J. Cell Sci.* **125**, 5984–5997. (doi:10.1242/jcs.109066)
40. Bopp D, Bell LR, Cline TW, Schedl P. 1991 Developmental distribution of female-specific Sex-lethal proteins in *Drosophila melanogaster*. *Genes Dev.* **5**, 403–415. (doi:10.1101/gad.5.3.403)
41. Jürgens G, Wieschaus E, Nüsslein-Volhard C, Kluding H. 1984 Mutations affecting the pattern of the larval cuticle in *Drosophila melanogaster*. II. Zygotic loci on the third chromosome. *Wilhelm Roux's Arch. Develop. Biol.* **193**, 283–295. (doi:10.1007/BF00848157)
42. Bulgakova NA, Rentsch M, Knust E. 2010 Antagonistic functions of two stardust isoforms in *Drosophila* photoreceptor cells. *Mol. Biol. Cell* **21**, 3915–3925. (doi:10.1091/mbc.E09-10-0917)
43. Wodarz A, Ramrath A, Kuchinke U, Knust E. 1999. Bazooka provides an apical cue for Inscuteable localization in *Drosophila* neuroblasts. *Nature* **402**, 544–547. (doi:10.1038/990128)
44. Kim S, Gailite I, Moussian B, Luschnig S, Goette M, Fricke K, Honemann-Capito M, Grubmüller H, Wodarz A. 2009 Kinase-activity-independent functions of atypical protein kinase C in *Drosophila*. *J. Cell Sci.* **122**, 3759–3771. (doi:10.1242/jcs.052 514)
45. Krahn MP, Egger-Adam D, Wodarz A. 2009 PP2A antagonizes phosphorylation of Bazooka by PAR-1 to control apical-basal polarity in dividing embryonic neuroblasts. *Dev. Cell* **16**, 901–908. (doi:10.1016/j.devcel.2009.04.011)
46. Roh MH, Makarova O, Liu C-J, Shin K, Lee S, Laurinec S, Goyal M, Wiggins R, Margolis B. 2002 The Maguk protein, Pals1, functions as an adaptor, linking mammalian homologues of Crumbs and Discs Lost. *J. Cell Biol.* **157**, 161–172. (doi:10.1083/jcb.200109010)
47. Li Y, Karnak D, Demeler B, Margolis B, Lavie A. 2004 Structural basis for L27 domain-mediated assembly of signaling and cell polarity complexes. *EMBO J.* **23**, 2723–2733. (doi:10.1038/sj.emboj.7600294)
48. Straight SW, Pieczynski JN, Whiteman EL, Liu C-J, Margolis B. 2006 Mammalian lin-7 stabilizes polarity protein complexes. *J. Biol. Chem.* **281**, 37 738–37 747. (doi:10.1074/jbc.M607059200)
49. Bir-Avragim N, Hellwig N, Rudolph F, Munson C, Stainier DY, Abdellilah-Seyfried S. 2008 Divergent polarization mechanisms during vertebrate epithelial development mediated by the Crumbs complex protein Nagie oko. *J. Cell Sci.* **121**, 2503–2510. (doi:10.1242/jcs.033167)
50. Sotillos S, Diaz-Meco MT, Gaminero E, Moscat J, Campuzano S. 2004 DaPKC-dependent phosphorylation of Crumbs is required for epithelial cell polarity in *Drosophila*. *J. Cell Biol.* **166**, 549–557. (doi:10.1083/jcb.200311031)
51. Huang J, Zhou W, Watson AM, Jan Y-N, Hong Y. 2008 Efficient ends-out gene targeting in *Drosophila*. *Genetics* **180**, 703–707. (doi:10.1534/genetics.108.090563)
52. Koch L, Feicht S, Sun R, Sen A, Krahn MP. 2016 Data from: Domain-specific functions of Stardust in *Drosophila* embryonic development. Dryad Digital Repository. (<http://dx.doi.org/10.5061/dryad.n5f8r>)

1. Einleitung

1.1. Epithelien

Epithelzellen sind der definierende Zelltyp aller Metazoen (Tepass 2012). Ihre Hauptaufgabe besteht darin, Zellverbände zu bilden, die Körperoberflächen bedecken, Hohlorgane auskleiden oder als Barrieren zwischen verschiedenen Kompartimenten fungieren. Sie dienen hier neben einigen organspezifischen Funktionen besonders dem Schutz vor schädigenden Einflüssen von außen und der Regulation der individuellen molekularen Zusammensetzung des nachgeschalteten Gewebes mittels Diffusion und Resorption (Tepass 2012; Bulgakova und Knust 2009; Shin et al. 2006). Grundvoraussetzung für die Organisation einzelner Zellen in Form von Epithelgeweben ist jedoch immer die Etablierung einer apikal-basalen Polarität und die Fähigkeit zur Bildung verschiedener Zell-Zell-Kontakte. Zellen adhären so, dass ihre apikalen Membranen nach außen oder zum Lumen von Hohlorganen orientiert sind (Tepass 2012) und die lateralen Membranabschnitte zu den benachbarten Zellen. Der basale Abschnitt der Plasmamembran hingegen verbindet die Epithelzelle mit der Basalmembran und dem darunterliegenden Bindegewebe (Bryant und Mostov 2008). In den meisten Epithelien trennt ein apikaler Komplex aus Zellkontakten (engl.: *apical junctional complex*) die apikale von der basolateralen Membran. Dieser Komplex besteht in Säugetierzellen aus Tight Junctions (TJ), die als selektive Diffusionsbarriere agieren, Adherens Junctions (AJ), die den mechanischen Kontakt mit den Nachbarzellen sicherstellen und Desmosomen. In *Drosophila melanogaster* finden sich an Stelle von Tight Junctions die sogenannten Septate junctions, die jedoch ähnliche Funktionen erfüllen (Tepass und Hartenstein 1994; Farquhar und Palade 1963; Chen und Zhang 2013; Tepass 1996). Desmosomen dagegen fehlen im apikalen junctionalen Komplex von *Drosophila* (Tepass 1996; Tepass und Hartenstein 1994). Der Abschnitt der apikalen Membran, der zwischen dem apikalen junctionalen Komplex und der apikalen Membran liegt, wird als Marginalzone bezeichnet (Tepass 2012; Tepass 1996).

1.2. Polaritätsregulation in *Drosophila melanogaster*

Die korrekte Etablierung und Aufrechterhaltung der zellulären Polarität bedarf verschiedener zellulärer Mechanismen, wie der asymmetrischen Verteilung von Proteinen, dem gerichteten Transport von Vesikeln, sowie der korrekten Anordnung von Gerüstproteinen und Zell-Zell-Kontakten (Mellman und Nelson 2008; Li und Gundersen 2008; Bryant und Mostov 2008; Tepass 2012). In allen mehrzelligen Organismen werden diese Prozesse von verschiedenen evolutionär bewahrten Polaritätsproteinen gesteuert, die teils synergistisch und teils antagonistisch in Form eines komplexen, dynamischen Proteinnetzwerks agieren (Flores-

Benitez und Knust 2016; Laprise und Tepass 2011; Tepass 2012; Bulgakova und Knust 2009; Nance und Zallen 2011). Gemäß ihrer Anordnung und Funktion können die beteiligten Proteine in apikale Polaritätsregulatoren (= APRs) und basolaterale Polaritätsregulatoren (=BLPRs) unterteilt werden. Bisher sind drei Proteinkomplexe beschrieben, die von Würmern über Fliegen bis hin zu Säugetieren evolutionär konserviert wurden und die Entwicklung der zellulären Polarität maßgeblich zu steuern scheinen. Hierzu zählen der Crumbs-Komplex, bestehend aus dem Transmembranprotein Crumbs (Crb), den Gerüstproteinen Stardust (Sdt; in Säugetieren: PALS1/MPP5), PATJ (in Säugetieren: PATJ/MUPP1) und Lin7, der PAR-Komplex, der die Proteine Bazooka (Baz; in Säugetieren: PAR-3), PAR-6, atypische Proteinkinase C (aPKC) und die GTPase Cdc42 beinhaltet, sowie der Lethal giant larvae (Lgl)/discs large (Dlg)/scribble-Komplex. Während Crb- und PAR- Komplex zu den apikalen Polaritätsregulatoren zählen und im Bereich der Marginalzone lokalisieren, befindet sich der Lgl/Dlg/scribble-Komplex an der basolateralen Membran (Tepass et al. 2001; Knust und Bossinger 2002). Zusätzlich zu diesen weit verbreiteten Multiproteinkomplexen wurden in *Drosophila melanogaster* weitere Proteine entdeckt, die im Verdacht stehen, die epitheliale Polarität mit zu beeinflussen. Hierbei sind die Proteine PAR-1, 14-3-3 (PAR-5) (Doerflinger et al. 2003; Benton und St Johnston 2003), Yurt, Moesin, Coracle (Cora) (Laprise et al. 2009), Rac, PTEN und PI3K (Chartier et al. 2011) zu nennen (vgl. Abb. 1).

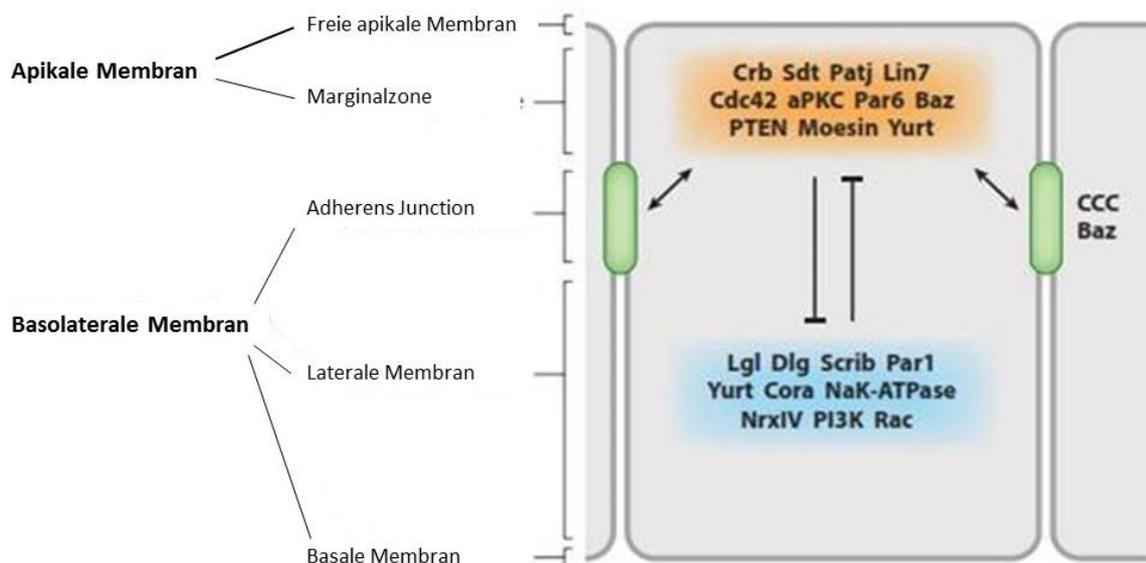


Abbildung 1: Übersicht Polaritätsregulatoren, modifiziert nach (Tepass 2012)

In den letzten Jahren wurden zahlreiche Mechanismen entdeckt, mittels derer die Beschaffenheit und Lokalisation der polaritätsdeterminierenden Proteinmodule reguliert

werden können, um so eine gewebs- und stadienspezifische Funktionsweise zu ermöglichen (Flores-Benitez und Knust 2016). Als erstes ist hierbei die Expression verschiedener Isoformen desselben Gens zu nennen. So kodiert Sdt etwa für zahlreiche verschiedene Isoformen, die gewebsspezifische Expressionsmuster aufweisen (Bulgakova et al. 2008). Beispielsweise wurden in Photorezeptoren zwei Sdt-Isoformen gegensätzlicher Funktion entdeckt. Während Sdt-H die Bildung der apikalen Membran vorantreibt, scheint Sdt-D diese zu antagonisieren. Ein Mechanismus der Crb-Regulation könnte also die gleichzeitige, ausgewogene Expression verschiedener Sdt-Isoformen sein (Bulgakova et al. 2010). Des Weiteren können mittels Phosphorylierungen, vorgenommen von verschiedenen Kinasen, zahlreiche relevante Prozesse, wie zum Beispiel Lokalisation, Zusammensetzung und Aktivität der Polaritätsproteine reguliert werden. So verhindert beispielsweise die Phosphorylierung von Lgl und PAR- 1 mittels aPKC die Anreicherung des Lgl/Dlg/scribble-Komplexes an der apikalen Membran (Yamanaka et al. 2003; Plant et al. 2003; Betschinger et al. 2003). Die Bedeutung der korrekten Lokalisierung der einzelnen Multiproteinkomplexe wird anhand der Überexpression einer aPKC ohne Kinase-Funktion deutlich. Die Unterbindung der beschriebenen Phosphorylierungen führt zu einer totalen Fehllokalisierung der Polaritäts-Determinanten und in der Folge zu einer gestörten Entwicklung der Zellpolarität (Sotillos et al. 2004). In verschiedenen Überexpressionsexperimenten wird außerdem deutlich, dass neben der korrekten Lokalisation der Polaritätsproteine auch ein ausgewogenes Kräfteverhältnis entscheidend ist. So kommt es in Embryonen mit einer Crb-Überexpression zur Bildung einer überproportional langen apikalen Membran (Wodarz et al. 1995), wohingegen die Überexpression von Lgl zu einem Überwiegen der basolateralen Membran führt (Chalmers et al. 2005).

1.3. Crumbs

Das durch Professor Jürgens in den 80er Jahren entdeckte Transmembranprotein Crumbs (Crb) ist der entscheidende Regulator der apikalen Identität. Der Verlust von Crb in der embryonalen Epidermis resultiert in einer starken Verringerung der apikalen Domäne und einer Schwächung der Adherens Junctions (Tepass 1996; Tepass et al. 1990). Die zu beobachtenden Kutikula-Phänotypen brachten dem Protein den Namen Crumbs, zu Deutsch: „Krümel“ ein (Assémat et al. 2008). Umgekehrt führt eine Überexpression von Crb zu einer Vergrößerung der apikalen Plasma Membran auf Kosten der basolateralen Domäne (Wodarz et al. 1995).

Drosophila Crb ist ein 200 kDA großes Typ-I-Transmembranprotein, welches aus einer großen extrazellulären Domäne und einem kurzen zytoplasmatischen Schwanz besteht. Die extrazelluläre Domäne enthält 30 Wiederholungen eines Polypeptides, das dem „Epidermal

growth factor“ (EGF; epidermaler Wachstumsfaktor) gleicht, und 4 globuläre Laminin-A-Domänen (Tepass et al. 1990). Neuere Studien legen nahe, dass die extrazelluläre Domäne zwar homophile Interaktionen zwischen Crb-Molekülen erleichtert und so zu einer Stabilisierung von Crb in der apikalen Zellregion beiträgt (Pichaud und Desplan 2002; Tepass et al. 2001; Fletcher et al. 2012; Letizia et al. 2013), jedoch scheint sie darüber hinaus in den meisten Epithelien für die Etablierung der apikal-basalen Polarität verzichtbar zu sein (Letizia et al. 2013; Wodarz et al. 1995; Klebes und Knust 2000). Lediglich in Photorezeptor-Zellen ist sie für die korrekte Lokalisierung von Crb verantwortlich (Muschalik und Knust 2011; Pellikka et al. 2002; Tepass 2012).

Der kurze, aus 37 Aminosäuren bestehende, zytoplasmatische Abschnitt von Crb beinhaltet zwei evolutionär konservierte Motive, und zwar eine FERM (Protein 4.1/Ezrin/Radixin/Moesin)-Protein-binde-Domäne und eine c-terminale PDZ (PSD-95/Discs-large/Zonula Occludens-1)-binde-Domäne, das sogenannte ERLI-Motiv (Bulgakova und Knust 2009; Pocha und Knust 2013). Diese beiden Protein-binde-Motive sind in den meisten Epithelien für eine korrekte Etablierung der Zell-Polarität essentiell, was dadurch deutlich wird, dass ein Crb-Konstrukt, welches lediglich die intrazelluläre Domäne besitzt, Crb-mutante Phänotypen ähnlich retten kann, wie das Voll-Längen-Protein (Klebes und Knust 2000; Wodarz et al. 1995; Bulgakova und Knust 2009). Das C-terminale ERLI-Motiv ermöglicht die Bindung von Crb an Sdt. Diese Interaktion ist wiederum notwendig, um Crb in der subapikalen Region der embryonalen Epidermis zu stabilisieren (Bachmann et al. 2001; Hong et al. 2001). Mittels der FERM-Domäne ist Crb über das FERM-Domänen-Protein Moesin und β -heavy-Spectrin mit dem subkortikalen Aktin-Zytoskelett verankert (Wei et al. 2015; Médina et al. 2002). So scheint es in gewissen Phasen der Embryogenese unabhängig von seiner Rolle in der Kontrolle der zellulären Polarität Einfluss auf die Morphologie mancher Organe, wie beispielsweise Tracheen und Speicheldrüsen von *Drosophila* zu nehmen, indem es die Invagination der Zell-Membran steuert (Letizia et al. 2013). Außerdem wird derzeit vermutet, dass Crb mittels dieser Interaktion die korrekte Organisation der Zonula Adherens in Photorezeptoren von *Drosophila* beeinflusst (Médina et al. 2002; Izaddoost et al. 2002). Eine weitere Aufgabe der FERM-Domäne ist, an Yurt zu binden, welches die Crb-Aktivität im Sinne eines negativen Feedback-Mechanismus begrenzt. Die Bedeutung von Yurt in der Kontrolle von Crb wird dadurch verdeutlicht, dass die Yurt-Loss-of-Function-Mutation ähnliche Phänotypen erzeugt, wie die Überexpression von Crb, nämlich eine deutliche Verlängerung der apikalen Membran der embryonalen Epidermis (Laprise et al. 2006; Bulgakova und Knust 2009).

Darüber hinaus hat sich herausgestellt, dass Crb über mehrere Wege das Zellwachstum und -überleben steuern kann. Dies ist daran zu erkennen, dass sowohl der Verlust als auch die Überexpression von Crb zu einer Stimulation des Zellwachstums führen (Ling et al. 2010; Chen et al. 2010; Robinson et al. 2010). Als erster relevanter Signalweg ist hierbei der Hippo- Weg zu nennen. In *Drosophila* steuern zwei FERM-Domänen-binde-Proteine, nämlich Expanded (Ex) und Merlin (Mer), das Zellwachstum, indem sie als Upstream-Regulatoren des Hippo-Weges agieren. Crb rekrutiert Expanded nach apikal. In Abwesenheit von Crb kommt es durch die fehlende Rekrutierung zu einer Misslokalisierung von Expanded und somit zu einer Downregulation des Hippo-Tumorsuppressor-Weges. Dies führt in der Folge zur Überproliferation des betroffenen Gewebes (Chen et al. 2010; Parsons et al. 2014; Robinson et al. 2010; Ling et al. 2010; Pocha und Knust 2013). Crb ist jedoch nicht nur für die Aktivierung, sondern auch für die Inaktivierung von Expanded verantwortlich, da es die Phosphorylierung und Degradation von Ex reguliert. So kann Crb die Aktivität des Hippo-Weges limitieren und ein ausgewogenes Zellwachstum garantieren (Pocha und Knust 2013). Neben der Regulation des Hippo-Weges scheint Crb auch den wachstumsfördernden Notch-Weg auf zweierlei Arten zu limitieren. Auf der einen Seite ist Crb in der Lage, mittels der EGF-ähnlichen Wiederholungen seiner extrazellulären Domäne Notch zu binden und somit die Endozytose und das Recycling von Notch und dessen Liganden Delta zu verhindern. Auf der anderen Seite scheint Crb die Aktivität des γ -Sekretase-Komplexes zu verringern (Richardson, Emily C N und Pichaud 2010; Tepass 2012).

Da Sdt Crb in der korrekten subzellulären Position stabilisiert, erzeugen *Sdt*-Allele hinsichtlich der apikal-basalen Polarität ähnliche Phänotypen wie *Crb*-Mutanten (Hong et al. 2001; (Bachmann et al. 2001; Tepass und Knust 1993; Lin et al. 2015).

1.4. Stardust

Sdt ist ein Gerüstprotein der MAGUK-Familie. Als typischer Vertreter dieser Gruppe besitzt es eine MAGUK (Membran-assoziierte-Guanylat-Kinase) - Domäne, eine PDZ (PSD-95/discs large/zonula occludens 1) - Domäne und eine SH3 (Src-homology-3) - Domäne. Gemäß neuester Daten aus der Kristallisation des Crb-PALS1-Komplexes scheinen diese drei Domänen ein dreidimensionales Supramodul zu bilden, das die terminalen vier Aminosäuren (ERLI-Motiv) des zytoplasmatischen Schwanzes von Crb hochspezifisch bindet (Li et al. 2014). Darüber hinaus bindet die PDZ-Domäne von Sdt an eine konservierte Region von Baz (Krahn et al. 2010). So bildet Sdt zwei verschiedene Polaritätskomplexe, die parallel während

der gesamten Embryogenese in der embryonalen Epidermis vorhanden sind: den Crb- Sdt- PATJ- und den Baz- Sdt- PATJ- Komplex (Sen et al. 2015).

Zusätzlich zu diesen drei Domänen beinhaltet Sdt außerdem zwei n-terminale ECR (evolutionary conserved region) - Domänen, welche in kultivierten Säugetier-Zellen an der Bindung des Säugetier-PALS1 zu zwei verschiedenen PAR-6-Proteinen beteiligt sein sollen (Wang et al. 2004; Gao und Macara 2004; Hurd et al. 2003). *In vitro* scheint insbesondere der ECR1-Domäne in dieser Interaktion eine besondere Bedeutung zuzukommen (Wang et al. 2004). *In vivo* konnte jedoch bislang, abgesehen von der apikalen Rekrutierung von PAR-6 in Photorezeptor- Zellen, vermittelt durch die ECR1- und ECR2-Domänen (Bulgakova et al. 2008), keine Bedeutung dieser Interaktion nachgewiesen werden.

Außerdem enthält Sdt zwei L27 (Lin2/Lin7) - Domänen und eine Hook-Domäne. Die erste L27-Domäne (L27N) ist notwendig, um PATJ zur subapikalen Region zu rekrutieren (Pénalva und Mirouse 2012; Sen et al. 2015), welches seinerseits die Adherens Junction stabilisiert, indem es die Myosin- Aktivität fördert (Sen et al. 2012). Jedoch scheint die L27N-Domäne nicht notwendig zu sein, um den Crb-Sdt-Komplex in der embryonalen Epidermis zu stabilisieren (Zhou und Hong 2012; Sen et al. 2012; Pénalva und Mirouse 2012).

Mittels seiner zweiten L27-Domäne (L27C), rekrutiert Sdt Lin-7 (Veli) zur Plasmamembran. Dies ist in *Drosophila* zwar nicht entscheidend für die epitheliale Polarität, wirkt allerdings an der postsynaptischen Membran, um einer lichtinduzierten Degeneration von Photorezeptoren vorzubeugen (Soukup et al. 2013; Bachmann et al. 2004).

Die Hook-Domäne dient als FERM-Domänen-Interaktionsstelle, was für einige Sdt-Orthologa bereits gezeigt werden konnte. Die Sdt-Orthologa Nagie Oko (Zebrafisch) und PALS1/MPP5 (Säugetiere) binden die entsprechenden Yurt-Orthologa mittels der Hook-Domäne (Hsu et al. 2006; Gosens et al. 2007). Yurt bindet darüber hinaus direkt an den zytoplasmatischen Schwanz von Crb und reguliert seine Aktivität negativ (Laprise et al. 2006). Somit könnte die Interaktion zwischen Yurt und Sdt dazu dienen, das Zusammenspiel von Sdt und Crb zu modulieren (Hsu et al. 2006). Abbildung 2 zeigt die wichtigsten Interaktionspartner von Sdt.

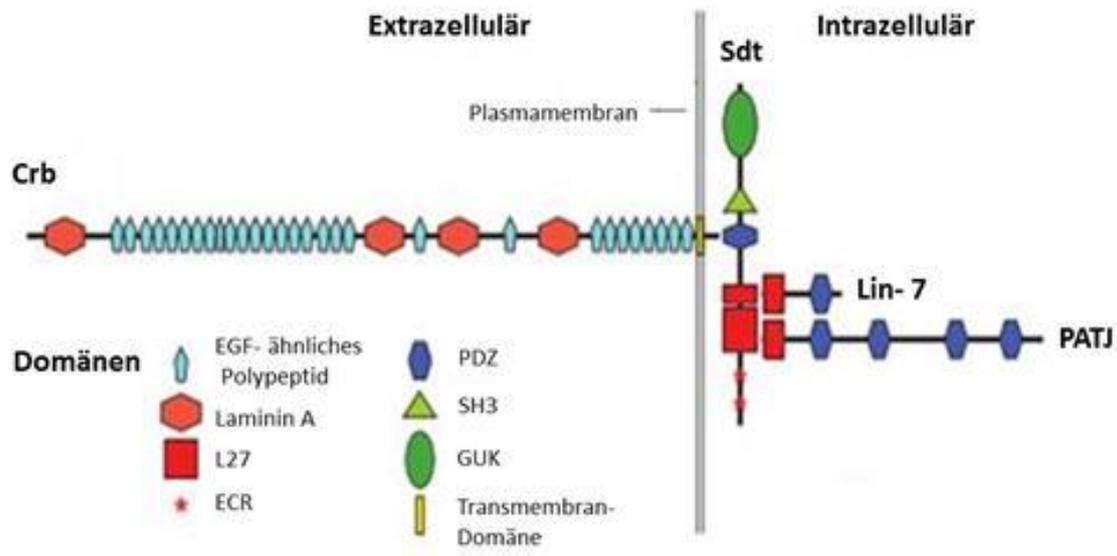


Abbildung 2: Kernkomponenten des Crb-Komplexes, modifiziert nach (Bulgakova 2009)

In seiner Funktion als zentrales Verbindungsstück im Crb-Komplex, ist Sdt essenziell, um den Crb-Komplex zu stabilisieren. So wird Crb in *Sdt*-mutanten Embryonen zwar wie gewohnt zur apikalen Plasmamembran transportiert, jedoch anschließend endozytiert und degradiert. Bestätigt wird dies durch die Tatsache, dass *Sdt*-mutante Embryonen den gleichen Phänotyp zeigen wie im Falle einer *Cr b*-Loss-of-Function-Mutation (Tepass und Knust 1993; Tepass 2012). Sdt-Isoformen sind ab dem zellulären Blastoderm in den meisten vom Ektoderm abstammenden Epithelien detektierbar (Bachmann et al. 2001), jedoch niemals in Neuroblasten oder anderen Zellen des ZNS. Dies führt zu dem Schluss, dass die Etablierung und Aufrechterhaltung der epithelialen Polarität in Neuroblasten unabhängig von Sdt erfolgt (Hong et al. 2001).

1.5. Einordnung in den wissenschaftlichen Kontext

Bereits seit einiger Zeit sind die Struktur Stardusts und viele der damit einhergehenden Funktionen bekannt. Außerdem konnten einige Mechanismen der Rekrutierung Sdts in den Crb-Komplex enthüllt werden (Bulgakova et al. 2008; Krahn et al. 2010). So führte die Arbeitsgruppe um Elisabeth Knust bereits 2008 eine ausführliche Struktur-Funktionsanalyse Sdts durch, anhand welcher sie die Mechanismen der Lokalisation des Crb-Sdt-Komplexes in Photorezeptorzellen untersuchte (Bulgakova et al. 2008). Auch eine Studie an Zebrafischen (Bit-Avragim et al. 2008) und die Expression von PALS1-Varianten in kultivierten Säugetierepithelzellen (Roh et al. 2002) halfen, die domänenspezifischen Aufgaben Stardusts in verschiedenen Organismen *in vivo* zu erforschen. Jedoch konnte bis heute nicht geklärt

werden, ob die beobachteten Mechanismen auch in anderen Geweben, wie zum Beispiel der embryonalen Epidermis, für eine korrekte Zellpolarität notwendig sind und ob die einzelnen Sdt-Domänen noch weitere, bis dato unbekannte Funktionen erfüllen. Aus diesem Grund wurden zur detaillierten Struktur-Funktions-Analyse verschiedene *Sdt*-Deletionskonstrukte geklont und in *Sdt*-mutante Embryonen des Genotyps *Sdt*^{K85} sowie wildtypische Embryonen injiziert (siehe Material und Methoden). Anhand der so etablierten Fliegenstämme wurden Rettungsexperimente und Letalitätstests durchgeführt, um zu überprüfen, wie die Deletion einzelner Sdt-Domänen die Überlebensfähigkeit der *Drosophila*-Embryonen beeinflusst. Des Weiteren wurden die Auswirkungen der Expression der modifizierten *Sdt*-Gene auf die Lokalisation verschiedener Polaritätsproteine in der embryonalen Epidermis mittels konfokaler Lasermikroskopie untersucht. Auch Kutikula-Präparationen wurden zur Analyse verschiedener *Sdt*-mutanten herangezogen.

2. Material und Methoden

2.1. Plasmide

Der offene Leserahmen (OLR) von *Sdt-F* (formal bezeichnet als *Sdt-B1*), wurde in pENTR (Life Technologies) geklont. Es wurden Deletionen der verschiedenen Domänen durch Mutagenese-PCR etabliert, indem ein flexibler 3xGlycin Platzhalter an Stelle der jeweiligen Domäne eingefügt wurde. Die verwendeten Oligonukleotide sind im Originalartikel aufgeführt. Der offene Leserahmen der *Sdt*-Varianten wurde in den Zielvektor UWGattB (modifiziert von UWG, welches vom Drosophila Genomic Resource Center bezogen wurde) mittels Clonase-Reaktion (Life Technologies) umklontiert.

2.2. Fliegenstämme und Genetik

Die Fliegenstämme wurden auf Standard Maismehl-Agar-Nährboden kultiviert und bei 25°C gehalten. Die transgenen Fliegen der UAS::*Sdt*-GFP und Ubi::*Sdt*-GFP-Varianten wurden unter Verwendung des PhiC31-Integrase-Systems (Groth et al. 2004) mit attP40 (für das UAS-Konstrukt) und attPVK00037 (22A, für die Ubi::*Sdt*-GFP Konstrukte) etabliert. En::*GAL4* und arm::*GAL4* wurden vom „Bloomington Drosophila Stock Center“ bezogen. Für die Beurteilung der Funktion (mutanter) Sdt-Proteine *in vivo* wurde das *sdt*^{K85}-Allel (Berger et al. 2007) verwendet, indem Keimbahnklone mit Hilfe der weiblichen, sterilen OvoD-Technik (Chou et al. 1993) unter Verwendung von FRT19A-OvoD1, hs::*Flp* (BL#23880) produziert wurden. Weibchen der Genotypen *sdt*^{K85}, FRT19A-OvoD1, FRT19A; Ubi::*Sdt*-GFP wurden gepaart mit Männchen, die den FM7-ChFP-Fluoreszenz-Balancer (Abreu-Blanco et al. 2012) und Ubi::*Sdt*-

GFP trugen. Embryonen, die homozygot für *sd^t^{K85}* waren, wurden für Kutikula-Präparationen und Letalitätstests identifiziert, indem Immunfärbungen mit Färbung von sex lethal (Bopp et al. 1991) durchgeführt und die Embryonen anschließend gegen ChFP sortiert wurden. Für Kutikula-Präparationen von *crb*-mutanten Embryonen wurde das *crb^{11A22}*-Allel (Wieschaus et al. 1984) verwendet. Für Letalitätstests wurden, wie oben beschrieben, *sd^t^{K85}*-mutante Embryonen generiert, die die Sdt-Protein-Varianten exprimieren. In drei unabhängigen Experimenten wurden je Experiment 100 homozygot mutante Embryonen nach embryonaler Letalität, L1/L2-, L3-, sowie Puppen-Letalität und überlebenden Fliegen bewertet. Fehlerbalken geben den mittleren Standardfehler an.

2.3. Erzeugung eines Antikörpers gegen Sdt

Ein gegen die PDZ-Domäne von Sdt gerichteter Antikörper wurde hergestellt, indem Hasen mit GST-Sdt_{PDZ} immunisiert wurden (Davids Biotechnologie, Regensburg, Deutschland). Die Spezifität des Serums wurde in Immunfärbungen an *sd^t^{K85}*-mutanten Embryonen getestet.

2.4. Immunpräzipitation und Western- Blotting

Für Immunpräzipitationen wurden w⁻-Embryonen oder Embryonen, die die GFP-markierten *Sdt*-Varianten exprimieren, einer Übernacht-Sammlung dechorionisiert und in durch Protease-Inhibitoren ergänztem Lyse-Puffer (1% Triton X-100, 150mM NaCl, 1mM CaCl₂, 1mM MgCl₂, 50mM Tris- HCL pH 7,5) lysiert. Nach der Zentrifugation wurden entweder Maus-anti-Sdt-Antikörper (Bulgakova et al. 2010), Maus-anti-β-Galaktosidase-Antikörper oder Hase-anti-GFP-Antikörper (Life Technologies) entsprechend einer Gesamtproteinmenge von 500µg zu dem Embryonen-Lysat hinzugefügt. Die Immunkomplexe wurden unter Verwendung von Protein A/G-konjugierter Agarose (BioVision) abgeerntet. Die Agarose-Kügelchen wurden fünf Mal in Lyse-Puffer gewaschen und vor SDS-Page und Western-Blot in 2x SDS-Proben-Puffer gekocht (Sen et al. 2012). Immunpräzipitationen von Schneider 2R-Zellen, die mit Sdt-GFP (Sdt UWGattB) und Ubi::PAR-6-myc (PAR-6 UWM) transfiziert wurden, wurden in ähnlicher Weise durchgeführt. Nach Abzentrifugation des Mediums und Lyse der S2R- Zellen in oben beschriebenem Lyse- Puffer wurde in gleicher Weise verfahren, wie bereits für Embryonen beschrieben. Western-Blotting wurde entsprechend des Standard-Vorgehens durchgeführt. Folgende primäre Antikörper wurden für das Western-Blotting verwendet: Maus-anti-Crb (Cq4 (Tepass und Knust 1993), 1:50, DSHB), Maus-anti-Sdt-Antikörper (1:20 (Bulgakova et al. 2010)), Meerschweinchen-anti-PATJ (1:1000 (Sen et al. 2012)), Hase-anti-Baz (1:2000 (Wodarz et al. 1999)), Hase-anti-aPKC (aPKCζ, 1:500, Santa Cruz sc-216), Maus-

anti-GFP (1:500, B2, Santa Cruz sc-9996) und Meerschweinchen-anti-PAR-6 (1:500 (Kim et al. 2009)).

2.5. Immunhistochemie

Embryonen wurden mit Natriumhypochlorid (NaClO) dechorionisiert und anschließend in einer 1:1-Mischung aus 4%-igem Formaldehyd, Phosphat-Puffer pH 7,4, 2 mM CaCl₂ und Heptan für circa zwanzig Minuten fixiert. Nach dem Aufbrechen der Vitellin-Membran mittels kräftigen Schüttelns in einer 1:1-Mischung aus Methanol und Heptan wurden die Embryonen für mindestens eine Stunde in reinem Methanol bei einer Temperatur von -20°C gelagert. Im Anschluss daran wurden sie in PBT (PBS und 0,1% Tween 20) für drei mal zwanzig Minuten unter ständigem Schwenken rehydratisiert und dann mit den primären Antikörpern unter Zugabe von 5% normalem Pferdeserum (NHS; engl.: *normal horse serum*) inkubiert (Krahn et al. 2010). Für die indirekte Immunfluoreszenz wurden folgende primäre Antikörper verwendet: Meerschweinchen-anti-PATJ (1:500 (Sen et al. 2012)), Maus-anti-Sdt-Antikörper (1:20 (Bulgakova et al. 2010)), Hase-anti-Sdt (1:2000, diese Studie), Hase-anti-Baz (1:1000 (Wodarz et al. 1999)), Maus-anti-Crb (Cq4, 1:50, DSHB), Maus-anti-Dlg (1:50, DSHB), Hase-anti-GFP (#A11122, 1:1000, Life Technologies) und Huhn-anti-GFP (1:2000, Aves Laboratories). Die mit Alexa 488, Alexa 568 und Alexa 647 (Life Technologies) konjugierten sekundären Antikörper wurden in einem Verhältnis von 1:400 verwendet. Bilder wurden mit einem Zeiss LSM 710 Meta konfokalen Mikroskop gewonnen und mit Adobe Photoshop bearbeitet.

3. Ergebnisse und Diskussion

Wie bereits beschrieben, weist Sdt zahlreiche Protein-Interaktionsdomänen auf, welche in Abhängigkeit des Entwicklungsstadiums und des Gewebes verschiedene Funktionen erfüllen. Zunächst erforschten wir, welche Domänen notwendig sind, um Sdt in der subapikalen Region zu positionieren. Analog zu vorherigen Berichten kamen auch wir zu dem Schluss, dass die PDZ-Domäne, die Sdt entweder zu Crb oder zu Baz in die subapikale Region rekrutiert (Hong et al. 2001; Bachmann et al. 2001; Roh et al. 2002; Krahn et al. 2010; Bit-Avragim et al. 2008), für die korrekte subzelluläre Lokalisation von Sdt essentiell ist. Die Deletion der PDZ-Domäne führt zu einer stark gestörten und größtenteils zytoplasmatischen Anreicherung des mutanten Proteins (Originalartikel Abb. 2f), wohingegen Wildtyp-Sdt-GFP korrekt in der subapikalen Region lokalisiert (Originalartikel Abb. 1d und 2a). Allerdings beobachteten wir, dass die PDZ-Domäne alleine nicht ausreicht, um die kortikale Rekrutierung von Sdt zu bewerkstelligen (Originalartikel Abb. 2i). Die Instabilität des kleinen chimären Proteins Sdt_{PDZ}-GFP konnten wir als Ursache dieser Beobachtung jedoch ausschließen, da im Western Blot eine spezifische

Bande bei circa 37 kDa nachweisbar war (Originalartikel Abb. 1e). Dies legt die Vermutung nahe, dass neben der PDZ- Domäne weitere Domänen notwendig sind, um die Bindung zwischen Sdt und Crb bzw. Baz zu ermöglichen. In einer Studie aus dem Jahr 2014 wird bereits postuliert, dass neben der PDZ-Domäne auch die SH3- und GUK-Domänen eine wichtige Rolle in der Bildung und Stabilisierung des Crb-PALS1-Komplexes spielen, da in gelchromatographischen Verfahren und Bindungs-Analysen eine 100-fach stärkere Bindungsaffinität des PDZ-SH3-MAGUK-Tandems zu Crb im Vergleich zur isolierten PDZ-Domäne nachgewiesen werden konnte (Li et al. 2014). In der Tat führt die Deletion der SH3-Domäne zu einer eher zytoplasmatischen Anreicherung des mutanten Proteins, wobei geringe Mengen Sdt weiterhin an der Zellmembran verbleiben (Originalartikel Abb. 2g). Vor wildtypischem Hintergrund lokalisiert Crb trotz Deletion der SH3- oder PDZ-Domäne von Sdt noch subapikal, was durch die verbleibende Menge wildtypischen Sdts zu erklären ist (Originalartikel Abb. 2 f, g). In Keimbahnklonen, in denen jegliches wildtypische Sdt fehlt, kommt es jedoch zu einer rein zytoplasmatischen Lokalisation von Crb und einer deutlichen Störung der apikal-basalen Polarität (Originalartikel Abb. 3 h, i). Auch Co-Immunpräzipitationsexperimente der mutanten Sdt-Proteine mit endogenem Crb demonstrieren, dass neben der PDZ-Domäne auch die SH3-Domäne notwendig ist, um eine Assoziation von Sdt mit Crb zu ermöglichen (Originalartikel Abb. 5d). Des Weiteren rettet die Expression von Sdt Δ PDZ oder Sdt Δ SH3 den Kutikula-Phänotyp von *sdt*^{K85} nicht (Originalartikel Abb. 4 c, d, j, k). Diese Ergebnisse stimmen mit den Resultaten vorangegangener Studien an retinalen Neural- und Pigmentepithelien in Zebrafischen, sowie Photorezeptorzellen von *Drosophila* überein, die eine zentrale Rolle der PDZ-Domäne (Bulgakova et al. 2008; Bit-Avragim et al. 2008) und SH3-Domäne (Bulgakova et al. 2008) in diesen apikal-basal polarisierten Zelltypen beschreiben.

Im Gegensatz zur Deletion der SH3- oder PDZ-Domäne beeinflusst die Deletion der GUK-Domäne in wildtypischen Epithelzellen die Lokalisation des mutanten Proteins oder die Assoziation mit Crb hingegen nicht (Originalartikel Abb. 2h, 5d). Dies könnte daran liegen, dass die GUK- Domäne nicht direkt an der Bindung zwischen Sdt und dem ERLI-Motiv von Crb beteiligt ist, sondern lediglich eine supportive Rolle einnimmt (Li et al. 2014). Allerdings rettet die Expression von Sdt Δ GUK in einem *Sdt*^{K85}-mutanten Hintergrund weder die apikale Lokalisierung von Crb, noch die embryonale Letalität (Originalartikel Abb. 4a und 3j). Epitheliale Polarität und embryonale Morphologie sind schwer gestört, was durch eine beeinträchtigte Sekretion der Kutikula zum Ausdruck kommt. Kutikulae von Embryonen des Genotyps *sdt*^{K85}; Sdt Δ GUK sind geschrumpft und weisen große Löcher in der dorsalen Kutikula

auf (Originalartikel Abb. 4l). Sie unterscheiden sich deutlich von Kutikulae der Embryonen des Genotyps *Sdt*^{K85}, *Sdt*^{K85}; *Sdt*_{ΔSH3}, sowie *sdt*^{K85}; *Sdt*_{ΔPDZ}, welche lediglich aus einzelnen Krümeln bestehen und so phänotypisch den Kutikulae eines *Crb*-Loss-of-Function Allels entsprechen (Originalartikel Abb. 4 b, c, j, k). Im Gegensatz zu *sdt*^{K85}-mutanten Embryonen (Originalartikel Abb. 3a), in denen *Crb* zytoplasmatisch lokalisiert, weisen Embryonen des Genotyps *sdt*^{K85}; *Sdt*_{ΔGUK} in einem gewissen Ausmaß eine kortikale Lokalisation von *Crb* auf, wenn auch mit willkürlichem Verteilungsmuster (Originalartikel Abb. 3 j). Dennoch scheint diese residuale, kortikale Lokalisation zu genügen, um eine segmentierte, wenn auch geschrumpfte und unregelmäßige Kutikula zu produzieren (Originalartikel Abb. 4l). Folglich können wir *in vivo* keine zentrale Bedeutung der GUK-Domäne von *Sdt* für die Stabilisierung des *Crb*-*Sdt*-Komplexes nachweisen. Dennoch ist die GUK-Domäne während der epithelialen Polarisierung essentiell für die Funktion von *Sdt*, was möglicherweise unabhängig ist von ihrer bisher angenommenen Bedeutung in der Stabilisierung von *Crb*.

Weiterhin konnte in der Vergangenheit gezeigt werden, dass PALS1 in kultivierten Säugetierzellen mittels seiner ECR1- und ECR2-Domäne mit PAR-6 interagiert (Gao und Macara 2004; Hurd et al. 2003; Wang et al. 2004). Eine *in vivo* Relevanz der *Sdt*-PAR-6-Interaktion in *Drosophila* könnte von der Misslokalisierung von PAR-6 in *Sdt*-mutanten Photorezeptorzellen abgeleitet werden, welche nicht durch *Sdt*-Varianten gerettet wird, denen der gesamte N-Terminus inklusive der ECR-Motive und der L27N-Domäne fehlt (Bulgakova et al. 2008). Wir fanden heraus, dass *Sdt*_{ΔECR1} und *Sdt*_{ΔECR2} korrekt an der subapikalen Region in der embryonalen Epidermis lokalisieren (Originalartikel Abb. 2 b, c). Darüber hinaus führt die Expression dieser Transgene, genauso wie die des doppelt mutanten Proteins (*Sdt*_{ΔECR1+2}) in einem *Sdt*-mutanten Hintergrund zur Wiederherstellung der epithelialen Polarität und subapikalen *Crb*-Lokalisation (Originalartikel Abb. 3 c-e). Dennoch verdeutlichen Letalitätstests im Vergleich zu wildtypischem *Sdt* eine höhere embryonale Letalität von *Sdt*-mutanten, die entweder *Sdt*_{ΔECR1} oder *Sdt*_{ΔECR2} exprimieren, und einen noch stärker gesteigerten Letalitäts-Phänotyp für *Sdt*_{ΔECR1+2} (Originalartikel Abb. 4a), auch wenn Immunfärbungen mit Polaritätsmarkern (Originalartikel Abb. 3 c-e) keine offensichtlichen Polaritätsdefekte aufzeigen. Weiterhin demonstrieren die durchgeführten Kutikula-Präparationen nur bei einer geringen Anzahl von Embryonen Sekretionsdefekte der Kutikula (Originalartikel Abb. 4 e-g, m). Geschlüpfte Fliegen dieser Genotypen weisen einen unauffälligen Phänotyp auf. Zwar konnten wir bestätigen, dass *Sdt* und PAR-6 in Schneider-2R-Zellen (S2R-Zellen) *in vitro* und unter Überexpressionsbedingungen miteinander interagieren können und dass diese Interaktion von ECR1 abhängt (Originalartikel Abb. 5a, b). Dennoch gelang es uns nicht, im Zuge von

Immunpräzipitationen von endogenem Sdt aus wildtypischen Embryonen wesentliche Mengen von PAR-6 in Interaktion mit Sdt nachzuweisen, wohingegen Crb, PATJ, Baz und aPKC mit Sdt immunpräzipitierten (Originalartikel Abb. 5c). Weiterhin beeinträchtigt die Mutation von ECR1 oder ECR2 oder beiden zusammen die Ausbildung des Crb-Sdt-Komplexes *in vivo* nicht (Originalartikel Abb. 5d). Diese Ergebnisse legen nahe, dass das ECR1- und ECR2-Motiv für die Stabilisierung des Crb-Sdt-PATJ-Komplexes in der embryonalen Epidermis von *Drosophila* unter endogenen Bedingungen nicht essentiell sind und dass sie für die apikal-basale Polarität entbehrlich sind. Jedoch scheinen sie in einem gewissen Maß, eventuell vermittelt über eine bis dato unentdeckte Funktion, wesentlich für eine effiziente embryonale Entwicklung zu sein.

Abschließend versuchten wir noch die *in vivo* Bedeutung der beiden L27-Domänen zu untersuchen. Sdt assoziiert mit PATJ, indem seine L27N-Domäne mit der L27-Domäne von PATJ heterodimerisiert (Li et al. 2004). Die Deletion der L27-Domäne in PATJ verhindert folglich die Bindung zu Sdt und somit auch die Lokalisation des mutanten Proteins in der subapikalen Region (Pénalva und Mirouse 2012; Sen et al. 2015). Umgekehrt beeinträchtigt die Deletion der L27N-Domäne in Sdt die Lokalisation des mutanten Sdt-Proteins in wildtypischen Epithelzellen nicht (Originalartikel Abb. 2d), obwohl sie nachweislich die Bindung von Sdt zu PATJ stört (Originalartikel Abb. 5d). Diese Ergebnisse passen zu den Daten vorangegangener Studien, die zeigen konnten, dass PATJ weder für die Stabilisierung des Sdt-Crb-Komplexes, noch für die apikal-basale Polarität in der embryonalen Epidermis essentiell ist (Pénalva und Mirouse 2012; Sen et al. 2012; Zhou und Hong 2012). Überraschenderweise zeigen Sdt-mutante Fliegen, die das Sdt Δ L27N-Transgen exprimieren jedoch eine komplette embryonale Letalität (Originalartikel Abb. 4a), wobei sie starke Sekretionsdefekte der Kutikula aufweisen. Kutikulae von Embryonen des Genotyps *Sdt*^{K85}; Sdt Δ L27N besitzen nur einzelne Überbleibsel intakter Kutikula und ähneln phänotypisch den Kutikulae des Crb-Loss-of-Function-Allels (Originalartikel Abb. 4b, h). Dies könnte durch die Reduktion des apikalen Crb-Levels erklärt werden, die sich in Keimbahnklonen des Genotyps *Sdt*^{K85}; Sdt Δ L27N zeigte (Originalartikel Abb. 3f Pfeile). So wurde schon mehrfach postuliert, dass der Verlust von PATJ zu einer verminderten Expression von Crb in polarisierten Zellen führt, ohne dabei die Lokalisation von Crb oder die apikal-basale Polarität zu beeinträchtigen (Tanentzapf und Tepass 2000; Zhou et al. 2012). Eine Bedeutung PATJs in der Stabilisierung des Crb-Sdt-Komplexes scheidet als Ursache dieser Beobachtung jedoch aus, da schon mehrfach gezeigt werden konnte, dass PATJ keinen Einfluss auf die Stabilität des Crb-Sdt-Komplexes hat (Pénalva und Mirouse 2012; Sen et al. 2012; Zhou und Hong 2012) und weiterhin Embryonen, die homozygot mutant sind für

PATJ weder Polaritätsdefekte der embryonalen Epidermis aufweisen noch eine vollständig penetrante embryonale Letalität zeigen (Sen et al. 2012). Ein weiterer Erklärungsansatz könnte sein, dass ungebundenes PATJ einen dominant negativen Effekt ausübt, so wie es bei der Überexpression von PATJ der Fall ist (Sen et al. 2012). Da also weder die vollständige embryonale Letalität, noch die stark derangierte Sekretion der Kutikulae in $Sdt_{\Delta L27N}$ -mutanten Embryonen alleine durch den Verlust von PATJ erklärt werden können, ist anzunehmen, dass die L27N-Domäne neben der Rekrutierung von PATJ weitere wesentliche Funktionen während der epithelialen Polarisierung der embryonalen Epidermis aufweist.

Im Gegensatz zur L27N-Domäne scheint die L27C-Domäne nicht essentiell für die epitheliale Polarisierung und die Fliegenentwicklung zu sein, da $Sdt_{\Delta L27C}$ in der Lage ist, die Polaritäts-Phänotypen von sdt^{K85} zu retten und darüber hinaus überlebende Fliegen erzeugt (Originalartikel Abb. 3g und 4a, i). Dies entspricht vorangegangenen Ergebnissen, die Lin-7 als Interaktionspartner von Sdt_{L27C} identifizieren und Lin-7 eine Rolle in der postsynaptischen Signalübertragung zuschreiben, jedoch nicht in der Ausbildung der epithelialen Polarität oder Fliegenentwicklung (Bachmann et al. 2004; Soukup et al. 2013). Die gesteigerte frühe Larvensterblichkeit könnte durch Störungen bei der Ausbildung von Synapsen begründet sein. Auch wenn dies in Widerspruch zu Beobachtungen an Säugetierzellen steht, welche eine unterstützende Rolle von Veli in der Stabilisierung des Crb-PALS1-Komplexes annehmen (Straight et al. 2006), konnten wir weder eine verminderte apikale Anreicherung des mutanten $Sdt_{\Delta L27C}$ oder Crb (Abb. 3g) noch eine Schwächung der Bindung des mutanten Sdt zu Crb feststellen (Abb. 5d).

4. Zusammenfassung

Zusammenfassend bestätigen unsere Ergebnisse eine entscheidende Rolle des PDZ-SH3-Domänen-Tandems bei der Bindung und Stabilisierung von Crb *in vivo*. Weiterhin konnten wir zeigen, dass entgegen kürzlich veröffentlichter Daten die GUK-Domäne weder essentiell für die Stabilisation der Bindung zu Crb (Li et al. 2014) noch notwendig für die korrekte Lokalisation von Sdt in wildtypischen Epithelzellen ist. Unsere Ergebnisse deuten jedoch auf eine wesentliche Crb-unabhängige Funktion der GUK-Domäne während der epithelialen Polarisierung und der Embryonalentwicklung hin, welche in vorangegangenen Studien nicht erwähnt wurde (Bit-Avrágim et al. 2008; Roh et al. 2002; Bulgakova et al. 2008).

Entgegen bisher veröffentlichter Daten, die in Photorezeptorzellen von *Drosophila* eine entscheidende Rolle der ECR1- und ECR2-Domäne in der apikalen Rekrutierung von PAR-6

feststellten, konnten wir *in vivo* keine Funktion dieser beiden Domänen während der epithelialen Polarisierung bestätigen. Erstens scheint gemäß unseren Resultaten aus Co-Immunpräzipitationen in embryonalen Epithelien eine Bindung zwischen Sdt und PAR-6 nicht in wesentlichem Umfang stattzufinden. Zweitens ist es unwahrscheinlich, dass die Interaktion zwischen PAR-6 und Sdt zur Etablierung der apikal-basalen Polarität beiträgt, da Sdt Δ ECR1- und Sdt Δ ECR2-mutante Embryonen phänotypisch keinerlei Polaritätsdefekte aufweisen. Allerdings könnte diese Interaktion unabhängig von der Stabilisierung von Crb eine andere, bis dato unentdeckte Funktion erfüllen, welche wesentlich für eine effiziente embryonale Entwicklung ist. Außerdem gilt es auch bei der Betrachtung der Funktion der ECR1- und ECR2-Domäne stets zwischen verschiedenen Organismen, Geweben und Entwicklungsstadien zu differenzieren. In neuronalen Zellen, wie z. B. Photorezeptorzellen von *Drosophila* (Bulgakova et al. 2008) und retinalen Neuronen von Zebrafischen (Bit-Avragim et al. 2008), kann eine entscheidende Rolle der Interaktion zwischen Sdt und PAR-6 angenommen werden. In anderen Epithelien, wie der Epidermis oder dem retinalen Pigmentepithel von *Drosophila*, dagegen nicht.

Weiterhin deuten unsere Ergebnisse auf eine neue PATJ-unabhängige Funktion der L27N-Domäne von Sdt hin. Sdt Δ L27N-mutante Embryonen weisen eine vollständige Letalität auf, begleitet von deutlichen Sekretionsdefekten der Kutikula. Diese Beobachtung ist jedoch nicht alleine durch die gestörte Interaktion mit PATJ zu erklären, da PATJ-mutante Embryonen weder Polaritätsdefekte der embryonalen Epidermis zeigen, noch eine vollständig penetrante embryonale Letalität (Sen et al. 2012). Darüber hinaus beeinträchtigt die Deletion der L27N-Domäne die Lokalisation des mutanten Proteins in der Epidermis von wildtypischen *Drosophila*-Exemplaren nicht. Dies bestätigt erstens, dass PATJ in der embryonalen Epidermis von *Drosophila* für die Stabilisierung des Crb-Komplexes nicht benötigt wird. Zweitens zeigen diese Ergebnisse, dass die L27N-Domäne *in vivo* eine für die epitheliale Polarisierung essentielle Funktion aufweist, die nicht im Zusammenhang mit der Stabilisierung des Crb-Komplexes steht. Abschließend konnten wir außerdem eine relevante Bedeutung der L27C-Domäne für die epitheliale Polarisierung und Fliegenentwicklung in *Drosophila* widerlegen.

Literaturverzeichnis

Abreu-Blanco, Maria Teresa; Verboon, Jeffrey M.; Liu, Raymond; Watts, James J.; Parkhurst, Susan M. (2012): *Drosophila* embryos close epithelial wounds using a combination of cellular protrusions and an actomyosin purse string. In: *Journal of cell science* 125 (Pt 24), S. 5984–5997. DOI: 10.1242/jcs.109066.

Assémat, Emeline; Bazellères, Elsa; Pallesi-Pocachard, Emilie; Le Bivic, André; Massey-Harroche, Dominique (2008): Polarity complex proteins. In: *Biochimica et biophysica acta* 1778 (3), S. 614–630. DOI: 10.1016/j.bbamem.2007.08.029.

Bachmann, A.; Schneider, M.; Theilenberg, E.; Grawe, F.; Knust, E. (2001): *Drosophila* Stardust is a partner of Crumbs in the control of epithelial cell polarity. In: *Nature* 414 (6864), S. 638–643. DOI: 10.1038/414638a.

Bachmann, André; Timmer, Marco; Sierralta, Jimena; Pietrini, Grazia; Gundelfinger, Eckart D.; Knust, Elisabeth; Thomas, Ulrich (2004): Cell type-specific recruitment of *Drosophila* Lin-7 to distinct MAGUK-based protein complexes defines novel roles for Sdt and Dlg-S97. In: *Journal of cell science* 117 (Pt 10), S. 1899–1909. DOI: 10.1242/jcs.01029.

Benton, Richard; St Johnston, Daniel (2003): *Drosophila* PAR-1 and 14-3-3 inhibit Bazooka/PAR-3 to establish complementary cortical domains in polarized cells. In: *Cell* 115 (6), S. 691–704.

Berger, Sandra; Bulgakova, Natalia A.; Grawe, Ferdi; Johnson, Kevin; Knust, Elisabeth (2007): Unraveling the genetic complexity of *Drosophila* stardust during photoreceptor morphogenesis and prevention of light-induced degeneration. In: *Genetics* 176 (4), S. 2189–2200. DOI: 10.1534/genetics.107.071449.

Betschinger, Jörg; Mechtler, Karl; Knoblich, Juergen A. (2003): The Par complex directs asymmetric cell division by phosphorylating the cytoskeletal protein Lgl. In: *Nature* 422 (6929), S. 326–330. DOI: 10.1038/nature01486.

Bit-Avragim, Nana; Hellwig, Nicole; Rudolph, Franziska; Munson, Chantilly; Stainier, Didier Y S; Abdelilah-Seyfried, Salim (2008): Divergent polarization mechanisms during vertebrate epithelial development mediated by the Crumbs complex protein Nagie oko. In: *Journal of cell science* 121 (Pt 15), S. 2503–2510. DOI: 10.1242/jcs.033167.

Bopp, D.; Bell, L. R.; Cline, T. W.; Schedl, P. (1991): Developmental distribution of female-specific Sex-lethal proteins in *Drosophila melanogaster*. In: *Genes & development* 5 (3), S. 403–415.

Bryant, David M.; Mostov, Keith E. (2008): From cells to organs: building polarized tissue. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 9 (11), S. 887–901. DOI: 10.1038/nrm2523.

Bulgakova, Natalia A.; Kempkens, Ozlem; Knust, Elisabeth (2008): Multiple domains of Stardust differentially mediate localisation of the Crumbs-Stardust complex during photoreceptor development in *Drosophila*. In: *Journal of cell science* 121 (Pt 12), S. 2018–2026. DOI: 10.1242/jcs.031088.

Bulgakova, Natalia A.; Knust, Elisabeth (2009): The Crumbs complex: from epithelial-cell polarity to retinal degeneration. In: *Journal of cell science* 122 (Pt 15), S. 2587–2596. DOI: 10.1242/jcs.023648.

Bulgakova, Natalia A.; Rentsch, Michaela; Knust, Elisabeth (2010): Antagonistic functions of two stardust isoforms in *Drosophila* photoreceptor cells. In: *Molecular biology of the cell* 21 (22), S. 3915–3925. DOI: 10.1091/mbc.E09-10-0917.

- Chalmers, Andrew D.; Pambos, Michael; Mason, Julia; Lang, Stephanie; Wylie, Chris; Papalopulu, Nancy (2005): aPKC, Crumbs3 and Lgl2 control apicobasal polarity in early vertebrate development. In: *Development (Cambridge, England)* 132 (5), S. 977–986. DOI: 10.1242/dev.01645.
- Chartier, François J-M; Hardy, Émilie J-L; Laprise, Patrick (2011): Crumbs controls epithelial integrity by inhibiting Rac1 and PI3K. In: *Journal of cell science* 124 (Pt 20), S. 3393–3398. DOI: 10.1242/jcs.092601.
- Chen, Chiao-Lin; Gajewski, Kathleen M.; Hamaratoglu, Fisun; Bossuyt, Wouter; Sansores-Garcia, Leticia; Tao, Chunyao; Halder, Georg (2010): The apical-basal cell polarity determinant Crumbs regulates Hippo signaling in Drosophila. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (36), S. 15810–15815. DOI: 10.1073/pnas.1004060107.
- Chen, Jia; Zhang, Mingjie (2013): The PAR-3/PAR-6/aPKC complex and epithelial cell polarity. In: *Experimental cell research* 319 (10), S. 1357–1364. DOI: 10.1016/j.yexcr.2013.03.021.
- Chou, T. B.; Noll, E.; Perrimon, N. (1993): Autosomal P[ovoD1] dominant female-sterile insertions in Drosophila and their use in generating germ-line chimeras. In: *Development (Cambridge, England)* 119 (4), S. 1359–1369.
- Doerflinger, Hélène; Benton, Richard; Shulman, Joshua M.; St Johnston, Daniel (2003): The role of PAR-1 in regulating the polarised microtubule cytoskeleton in the Drosophila follicular epithelium. In: *Development (Cambridge, England)* 130 (17), S. 3965–3975.
- FARQUHAR, M. G.; PALADE, G. E. (1963): Junctional complexes in various epithelia. In: *The Journal of cell biology* 17, S. 375–412.
- Fletcher, Georgina C.; Lucas, Eliana P.; Brain, Ruth; Tournier, Alexander; Thompson, Barry J. (2012): Positive feedback and mutual antagonism combine to polarize Crumbs in the Drosophila follicle cell epithelium. In: *Current biology : CB* 22 (12), S. 1116–1122. DOI: 10.1016/j.cub.2012.04.020.
- Flores-Benitez, David; Knust, Elisabeth (2016): Dynamics of epithelial cell polarity in Drosophila: how to regulate the regulators? In: *Current opinion in cell biology* 42, S. 13–21. DOI: 10.1016/j.ceb.2016.03.018.
- Gao, Lin; Macara, Ian G. (2004): Isoforms of the polarity protein PAR-6 have distinct functions. In: *The Journal of biological chemistry* 279 (40), S. 41557–41562. DOI: 10.1074/jbc.M403723200.
- Gosens, Ilse; Sessa, Alessandro; den Hollander, Anneke I; Letteboer, Stef J F; Belloni, Valentina; Arends, Maarten L. et al. (2007): FERM protein EPB41L5 is a novel member of the mammalian CRB-MPP5 polarity complex. In: *Experimental cell research* 313 (19), S. 3959–3970. DOI: 10.1016/j.yexcr.2007.08.025.
- Groth, Amy C.; Fish, Matthew; Nusse, Roel; Calos, Michele P. (2004): Construction of transgenic Drosophila by using the site-specific integrase from phage phiC31. In: *Genetics* 166 (4), S. 1775–1782.
- Hong, Y.; Stronach, B.; Perrimon, N.; Jan, L. Y.; Jan, Y. N. (2001): Drosophila Stardust interacts with Crumbs to control polarity of epithelia but not neuroblasts. In: *Nature* 414 (6864), S. 634–638. DOI: 10.1038/414634a.
- Hsu, Ya-Chu; Willoughby, John J.; Christensen, Arne K.; Jensen, Abbie M. (2006): Mosaic Eyes is a novel component of the Crumbs complex and negatively regulates photoreceptor

- apical size. In: *Development (Cambridge, England)* 133 (24), S. 4849–4859. DOI: 10.1242/dev.02685.
- Huang, Juan; Zhou, Wenke; Watson, Annie M.; Jan, Yuh-Nung; Hong, Yang (2008): Efficient ends-out gene targeting in *Drosophila*. In: *Genetics* 180 (1), S. 703–707. DOI: 10.1534/genetics.108.090563.
- Hurd, Toby W.; Gao, Lin; Roh, Michael H.; Macara, Ian G.; Margolis, Ben (2003): Direct interaction of two polarity complexes implicated in epithelial tight junction assembly. In: *Nature cell biology* 5 (2), S. 137–142. DOI: 10.1038/ncb923.
- Izaddoost, Shayan; Nam, Sang-Chul; Bhat, Manzoor A.; Bellen, Hugo J.; Choi, Kwang-Wook (2002): *Drosophila* Crumbs is a positional cue in photoreceptor adherens junctions and rhabdomeres. In: *Nature* 416 (6877), S. 178–183. DOI: 10.1038/nature720.
- Kim, Soya; Gailite, Ieva; Moussian, Bernard; Luschnig, Stefan; Goette, Maik; Fricke, Karen et al. (2009): Kinase-activity-independent functions of atypical protein kinase C in *Drosophila*. In: *Journal of cell science* 122 (Pt 20), S. 3759–3771. DOI: 10.1242/jcs.052514.
- Klebes, A.; Knust, E. (2000): A conserved motif in Crumbs is required for E-cadherin localisation and zonula adherens formation in *Drosophila*. In: *Current biology : CB* 10 (2), S. 76–85.
- Knust, Elisabeth; Bossinger, Olaf (2002): Composition and formation of intercellular junctions in epithelial cells. In: *Science (New York, N.Y.)* 298 (5600), S. 1955–1959. DOI: 10.1126/science.1072161.
- Koch, Leonie; Feicht, Sabine; Sun, Rui; Sen, Arnab; Krahn, Michael P. (2016): Domain-specific functions of Stardust in *Drosophila* embryonic development. In: *Royal Society open science* 3 (11), S. 160776. DOI: 10.1098/rsos.160776.
- Krahn, Michael P.; Bückers, Johanna; Kastrup, Lars; Wodarz, Andreas (2010): Formation of a Bazooka-Stardust complex is essential for plasma membrane polarity in epithelia. In: *The Journal of cell biology* 190 (5), S. 751–760. DOI: 10.1083/jcb.201006029.
- Krahn, Michael P.; Egger-Adam, Diane; Wodarz, Andreas (2009): PP2A antagonizes phosphorylation of Bazooka by PAR-1 to control apical-basal polarity in dividing embryonic neuroblasts. In: *Developmental cell* 16 (6), S. 901–908. DOI: 10.1016/j.devcel.2009.04.011.
- Laprise, Patrick; Beronja, Slobodan; Silva-Gagliardi, Nancy F.; Pellikka, Milena; Jensen, Abbie M.; McGlade, C. Jane; Tepass, Ulrich (2006): The FERM protein Yurt is a negative regulatory component of the Crumbs complex that controls epithelial polarity and apical membrane size. In: *Developmental cell* 11 (3), S. 363–374. DOI: 10.1016/j.devcel.2006.06.001.
- Laprise, Patrick; Lau, Kimberly M.; Harris, Kathryn P.; Silva-Gagliardi, Nancy F.; Paul, Sarah M.; Beronja, Slobodan et al. (2009): Yurt, Coracle, Neurexin IV and the Na(+),K(+)-ATPase form a novel group of epithelial polarity proteins. In: *Nature* 459 (7250), S. 1141–1145. DOI: 10.1038/nature08067.
- Laprise, Patrick; Tepass, Ulrich (2011): Novel insights into epithelial polarity proteins in *Drosophila*. In: *Trends in cell biology* 21 (7), S. 401–408. DOI: 10.1016/j.tcb.2011.03.005.
- Letizia, Annalisa; Ricardo, Sara; Moussian, Bernard; Martín, Nicolás; Llimargas, Marta (2013): A functional role of the extracellular domain of Crumbs in cell architecture and apicobasal polarity. In: *Journal of cell science* 126 (Pt 10), S. 2157–2163. DOI: 10.1242/jcs.122382.

- Li, Rong; Gundersen, Gregg G. (2008): Beyond polymer polarity: how the cytoskeleton builds a polarized cell. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 9 (11), S. 860–873. DOI: 10.1038/nrm2522.
- Li, Youjun; Wei, Zhiyi; Yan, Yan; Wan, Qingwen; Du, Quansheng; Zhang, Mingjie (2014): Structure of Crumbs tail in complex with the PALS1 PDZ-SH3-GK tandem reveals a highly specific assembly mechanism for the apical Crumbs complex. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (49), S. 17444–17449. DOI: 10.1073/pnas.1416515111.
- Li, Yuanhe; Karnak, David; Demeler, Borries; Margolis, Ben; Lavie, Arnon (2004): Structural basis for L27 domain-mediated assembly of signaling and cell polarity complexes. In: *The EMBO journal* 23 (14), S. 2723–2733. DOI: 10.1038/sj.emboj.7600294.
- Lin, Ya-Huei; Currinn, Heather; Pocha, Shirin Meher; Rothnie, Alice; Wassmer, Thomas; Knust, Elisabeth (2015): AP-2-complex-mediated endocytosis of Drosophila Crumbs regulates polarity by antagonizing Stardust. In: *Journal of cell science* 128 (24), S. 4538–4549. DOI: 10.1242/jcs.174573.
- Ling, Chen; Zheng, Yonggang; Yin, Feng; Yu, Jianzhong; Huang, Juan; Hong, Yang et al. (2010): The apical transmembrane protein Crumbs functions as a tumor suppressor that regulates Hippo signaling by binding to Expanded. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (23), S. 10532–10537. DOI: 10.1073/pnas.1004279107.
- Médina, Emmanuelle; Williams, Janice; Klipfell, Elizabeth; Zarnescu, Daniela; Thomas, Graham; Le Bivic, André (2002): Crumbs interacts with moesin and beta(Heavy)-spectrin in the apical membrane skeleton of Drosophila. In: *The Journal of cell biology* 158 (5), S. 941–951. DOI: 10.1083/jcb.200203080.
- Mellman, Ira; Nelson, W. James (2008): Coordinated protein sorting, targeting and distribution in polarized cells. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 9 (11), S. 833–845. DOI: 10.1038/nrm2525.
- Muschalik, Nadine; Knust, Elisabeth (2011): Increased levels of the cytoplasmic domain of Crumbs repolarise developing Drosophila photoreceptors. In: *Journal of cell science* 124 (Pt 21), S. 3715–3725. DOI: 10.1242/jcs.091223.
- Nance, Jeremy; Zallen, Jennifer A. (2011): Elaborating polarity: PAR proteins and the cytoskeleton. In: *Development (Cambridge, England)* 138 (5), S. 799–809. DOI: 10.1242/dev.053538.
- Parsons, Linda M.; Grzeschik, Nicola A.; Allott, Melinda; Richardson, Helena (2014): Lgl/aPKC and Crb regulate the Salvador/Warts/Hippo pathway. In: *Fly* 4 (4), S. 288–293. DOI: 10.4161/fly.4.4.13116.
- Pellikka, Milena; Tanentzapf, Guy; Pinto, Madalena; Smith, Christian; McGlade, C. Jane; Ready, Donald F.; Tepass, Ulrich (2002): Crumbs, the Drosophila homologue of human CRB1/RP12, is essential for photoreceptor morphogenesis. In: *Nature* 416 (6877), S. 143–149. DOI: 10.1038/nature721.
- Pénalva, Clothilde; Mirouse, Vincent (2012): Tissue-specific function of Patj in regulating the Crumbs complex and epithelial polarity. In: *Development (Cambridge, England)* 139 (24), S. 4549–4554. DOI: 10.1242/dev.085449.
- Pichaud, Franck; Desplan, Claude (2002): Cell biology: a new view of photoreceptors. In: *Nature* 416 (6877), S. 139–140. DOI: 10.1038/416139a.

- Plant, Pamela J.; Fawcett, James P.; Lin, Dan C C; Holdorf, Amy D.; Binns, Kathleen; Kulkarni, Sarang; Pawson, Tony (2003): A polarity complex of mPAR-6 and atypical PKC binds, phosphorylates and regulates mammalian Lgl. In: *Nature cell biology* 5 (4), S. 301–308. DOI: 10.1038/ncb948.
- Pocha, Shirin Meher; Knust, Elisabeth (2013): Complexities of Crumbs function and regulation in tissue morphogenesis. In: *Current biology : CB* 23 (7), S. R289-93. DOI: 10.1016/j.cub.2013.03.001.
- Richardson, Emily C N; Pichaud, Franck (2010): Crumbs is required to achieve proper organ size control during *Drosophila* head development. In: *Development (Cambridge, England)* 137 (4), S. 641–650. DOI: 10.1242/dev.041913.
- Robinson, Brian S.; Huang, Juang; Hong, Yang; Moberg, Kenneth H. (2010): Crumbs regulates Salvador/Warts/Hippo signaling in *Drosophila* via the FERM-domain protein Expanded. In: *Current biology : CB* 20 (7), S. 582–590. DOI: 10.1016/j.cub.2010.03.019.
- Roh, Michael H.; Makarova, Olga; Liu, Chia-Jen; Shin, KunYoo; Lee, Seonok; Laurinec, Stephanie et al. (2002): The Maguk protein, PALS1, functions as an adapter, linking mammalian homologues of Crumbs and Discs Lost. In: *The Journal of cell biology* 157 (1), S. 161–172. DOI: 10.1083/jcb.200109010.
- Sen, Arnab; Nagy-Zsvér-Vadas, Zsanett; Krahn, Michael P. (2012): *Drosophila* PATJ supports adherens junction stability by modulating Myosin light chain activity. In: *The Journal of cell biology* 199 (4), S. 685–698. DOI: 10.1083/jcb.201206064.
- Sen, Arnab; Sun, Rui; Krahn, Michael P. (2015): Localization and Function of PALS1-associated Tight Junction Protein in *Drosophila* Is Regulated by Two Distinct Apical Complexes. In: *The Journal of biological chemistry* 290 (21), S. 13224–13233. DOI: 10.1074/jbc.M114.629014.
- Shin, KunYoo; Fogg, Vanessa C.; Margolis, Ben (2006): Tight junctions and cell polarity. In: *Annual review of cell and developmental biology* 22, S. 207–235. DOI: 10.1146/annurev.cellbio.22.010305.104219.
- Sotillos, Sol; Díaz-Meco, María Teresa; Caminero, Eva; Moscat, Jorge; Campuzano, Sonsoles (2004): DaPKC-dependent phosphorylation of Crumbs is required for epithelial cell polarity in *Drosophila*. In: *The Journal of cell biology* 166 (4), S. 549–557. DOI: 10.1083/jcb.200311031.
- Soukup, Sandra-Fausia; Pocha, Shirin Meher; Yuan, Michaela; Knust, Elisabeth (2013): DLin-7 is required in postsynaptic lamina neurons to prevent light-induced photoreceptor degeneration in *Drosophila*. In: *Current biology : CB* 23 (14), S. 1349–1354. DOI: 10.1016/j.cub.2013.05.060.
- Straight, Samuel W.; Pieczynski, Jay N.; Whiteman, Eileen L.; Liu, Chia-Jen; Margolis, Ben (2006): Mammalian lin-7 stabilizes polarity protein complexes. In: *The Journal of biological chemistry* 281 (49), S. 37738–37747. DOI: 10.1074/jbc.M607059200.
- Suzuki, Atsushi; Ohno, Shigeo (2006): The PAR-aPKC system: lessons in polarity. In: *Journal of cell science* 119 (Pt 6), S. 979–987. DOI: 10.1242/jcs.02898.
- Tanentzapf, G.; Smith, C.; McGlade, J.; Tepass, U. (2000): Apical, lateral, and basal polarization cues contribute to the development of the follicular epithelium during *Drosophila* oogenesis. In: *The Journal of cell biology* 151 (4), S. 891–904.

- Tanentzapf, Guy; Tepass, Ulrich (2003): Interactions between the crumbs, lethal giant larvae and bazooka pathways in epithelial polarization. In: *Nature cell biology* 5 (1), S. 46–52. DOI: 10.1038/ncb896.
- Tepass, U. (1996): Crumbs, a component of the apical membrane, is required for zonula adherens formation in primary epithelia of *Drosophila*. In: *Developmental biology* 177 (1), S. 217–225. DOI: 10.1006/dbio.1996.0157.
- Tepass, U.; Hartenstein, V. (1994): The development of cellular junctions in the *Drosophila* embryo. In: *Developmental biology* 161 (2), S. 563–596. DOI: 10.1006/dbio.1994.1054.
- Tepass, U.; Knust, E. (1993): Crumbs and stardust act in a genetic pathway that controls the organization of epithelia in *Drosophila melanogaster*. In: *Developmental biology* 159 (1), S. 311–326. DOI: 10.1006/dbio.1993.1243.
- Tepass, U.; Tanentzapf, G.; Ward, R.; Fehon, R. (2001): Epithelial cell polarity and cell junctions in *Drosophila*. In: *Annual review of genetics* 35, S. 747–784. DOI: 10.1146/annurev.genet.35.102401.091415.
- Tepass, U.; Theres, C.; Knust, E. (1990): crumbs encodes an EGF-like protein expressed on apical membranes of *Drosophila* epithelial cells and required for organization of epithelia. In: *Cell* 61 (5), S. 787–799.
- Tepass, Ulrich (2012): The apical polarity protein network in *Drosophila* epithelial cells: regulation of polarity, junctions, morphogenesis, cell growth, and survival. In: *Annual review of cell and developmental biology* 28, S. 655–685. DOI: 10.1146/annurev-cellbio-092910-154033.
- Wang, Qian; Hurd, Toby W.; Margolis, Ben (2004): Tight junction protein PAR-6 interacts with an evolutionarily conserved region in the amino terminus of PALS1/stardust. In: *The Journal of biological chemistry* 279 (29), S. 30715–30721. DOI: 10.1074/jbc.M401930200.
- Wei, Zhiyi; Li, Youjun; Ye, Fei; Zhang, Mingjie (2015): Structural basis for the phosphorylation-regulated interaction between the cytoplasmic tail of cell polarity protein crumbs and the actin-binding protein moesin. In: *The Journal of biological chemistry* 290 (18), S. 11384–11392. DOI: 10.1074/jbc.M115.643791.
- Wieschaus, E.; Nüsslein-Volhard, C.; Jürgens, Gerd (1984): Mutations affecting the pattern of the larval cuticle in *Drosophila melanogaster*. III. Zygotic loci on the X-chromosome and fourth chromosome. In: *Wilhelm Roux's archives of developmental biology* 193 (5), S. 296–307. DOI: 10.1007/BF00848158.
- Wodarz, A.; Hinz, U.; Engelbert, M.; Knust, E. (1995): Expression of crumbs confers apical character on plasma membrane domains of ectodermal epithelia of *Drosophila*. In: *Cell* 82 (1), S. 67–76.
- Wodarz, A.; Ramrath, A.; Kuchinke, U.; Knust, E. (1999): Bazooka provides an apical cue for Inscuteable localization in *Drosophila* neuroblasts. In: *Nature* 402 (6761), S. 544–547. DOI: 10.1038/990128.
- Yamanaka, Tomoyuki; Horikoshi, Yosuke; Sugiyama, Yuki; Ishiyama, Chikako; Suzuki, Atsushi; Hirose, Tomonori et al. (2003): Mammalian Lgl forms a protein complex with PAR-6 and aPKC independently of PAR-3 to regulate epithelial cell polarity. In: *Current biology : CB* 13 (9), S. 734–743.
- Zhou, Wenke; Hong, Yang (2012): *Drosophila* Patj plays a supporting role in apical-basal polarity but is essential for viability. In: *Development (Cambridge, England)* 139 (16), S. 2891–2896. DOI: 10.1242/dev.083162.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AJ	Adherens Junction
aPKC	Atypische Proteinkinase C
APRs	Apikale Polaritätsregulatoren
Baz	Bazooka
BLPRs	Basolaterale Polaritätsregulatoren
CaCl ₂	Calciumchlorid
Cdc42	Cell division control protein 42
Crb	Crumbs
Cora	Coracle
Dlg	Discs large
ECR	Evolutionary conserved region
EGF	Epidermal Growth Factor
Engl.	Englisch
Ex	Expanded
FERM	Protein 4.1/Ezrin/Radixin/Moesin
GFP	Green fluorescent protein
GST	Glutathion-S-Transferase
GUK	Guanylat Kinase
kDA	Kilo Dalton
Lgl	Lethal giant larvae
L27	Lin2/Lin7
MAGUK	Membran assoziierte Guanylat Kinase
Mer	Merlin
MgCl	Magnesiumchlorid
mM	Millimol
MPP5	Membrane Palmitoylated Protein 5
MUPP1	Multi-PDZ domain protein 1
NaCl	Natriumchlorid
NHS	Normal horse serum
PALS1	Protein associated with Lin7, Stardust
Par	Partition defective

PATJ	PALS1- associated tight junction protein
PBS	Phosphate Buffered Saline
PBT	Phosphate buffered Saline Tween 20
PCR	Polymerase chain reaction
PDZ	PSD-95/Discs-large/Zonula Occludens-1
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinasen
SDS- PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
Sdt	Stardust
SH3	Src- homology- 3
S2R	Schneider – 2 - R
TJ	Tight Junction
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Übersicht Polaritätsregulatoren, modifiziert nach (Tepass 2012).....	15
Abbildung 2: Kernkomponenten des Crb- Komplexes, modifiziert nach (Bulgakova 2009)..	20

Lebenslauf

Leonie Koch

Geboren am 01.03.1991

In Werneck

Konfession römisch- katholisch

Staatsangehörigkeit deutsch

Ausbildung

- 09/2010- 07/2017 **Universität Regensburg**
Studiengang Humanmedizin (Staatsexamen)
- 05/17: Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung: *sehr gut*
 - 04/16: Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung: *gut* (89,7%)
 - 09/12: Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung: *sehr gut* (90,1%)
- 09/2001- 06/2010 **Johann- Philipp- von- Schönborn- Gymnasium Münnerstadt**
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife (1,1)
- 09/1997- 08/2001 **Grundschule Münnerstadt**

Praktische Erfahrung

Praktisches Jahr

- 12/2016- 04/2017 **Ospedale Regionale di Locarno (Schweiz)**
Chirurgie
- Abteilung für Allgemein Chirurgie
 - Notfallzentrum
- 09/2016- 12/2016 **Klinikum St Hedwig Regensburg**
Pädiatrie
- Abteilung für Neuropädiatrie
 - Abteilung für pädiatrische Onkologie
 - Abteilung für Neonatologie
- 05/2016- 09/2016 **Krankenhaus Barmherzige Brüder Regensburg**
Innere Medizin
- Klinik für allgemeine Innere Medizin und Geriatrie
 - Klinik für Gastroenterologie und interventionelle Endoskopie
 - Klinik für Kardiologie
 - Notfallzentrum

Famulaturen

02/2015- 03/2015	Allgemeinarztpraxis Dr. Kuchler Münnerstadt
08/2014	Hôpital l'Archet Nice (Frankreich) Klinik für Hämatologie und Onkologie
09/2013- 10/2013	Krankenhaus Barmherzige Brüder Regensburg Klinik für Anästhesie
08/2013- 09/2013	Caritas-Krankenhaus- St. Josef Regensburg Klinik für Innere Medizin I

Pflegepraktika

02/2012- 03/2012	Krankenhaus Barmherzige Brüder Regensburg
08/2011- 09/2011	Herz- und Gefäßklinik Bad Neustadt an der Saale
02/2011- 03/2011	Herz- und Gefäßklinik Bad Neustadt an der Saale

Werkstudenten- Tätigkeit

03/2014- 12/2015	Blutspendedienst des Bayrischen Roten Kreuzes Werkstudentin in der Abteilung mobile Blutspende <ul style="list-style-type: none">• Punktion der Spender• Labortätigkeit, Spenderregistrierung, Etikettierung und Konservensammelstelle
------------------	--

Veröffentlichung

Koch, Leonie; Feicht, Sabine; Sun, Rui; Sen, Arnab; Krahn, Michael P. (2016): Domain-specific functions of Stardust in Drosophila embryonic development. In: Royal Society open science 3 (11), S. 160776

Fremdsprachen

Französisch	Verhandlungssicher, C1
Englisch	Fließend in Wort und Schrift, B2
Italienisch	Fließend in Wort und Schrift, B2

Regensburg, den _____

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinen besonderen Dank nachstehenden Personen entgegenbringen, ohne deren Hilfe die Anfertigung meiner Dissertationsschrift niemals möglich gewesen wäre:

Mein Dank gilt zunächst Herrn Prof. Dr. Dr. Michael Krahn, meinem Doktorvater, für die Ideengebung zu dieser Arbeit, die zeitaufwändige Betreuung und die freundliche Hilfe.

Ich danke besonders Frau Dr. Sabine Feicht für die hilfsbereite und wissenschaftliche Betreuung, sowohl im Labor, aber insbesondere auch bei der Gewinnung der Bilder am konfokalen Lasermikroskop.

Mein besonderer Dank gilt jedoch Dr. Arnab Sen, der mir besonders zu Beginn meiner Arbeit stets zur Seite stand und sich immer Zeit für mich nahm, ohne zu wissen, wie wertvoll diese Zeit für ihn sein würde.

Ein weiterer Dank geht an alle Mitarbeiter des Labors, die direkt oder indirekt an meiner Arbeit beteiligt waren, dafür dass sie mich von Anfang an freundlich aufgenommen haben.

Abschließend möchte ich meinem Freund René Beck und meiner Familie dafür danken, dass sie mir immer eine große Unterstützung waren und stets verständnisvoll zur Seite standen.

Erklärung nach § 6, Absatz 5 Nr. 1 und 2 der Promotionsordnung

Ich erkläre hiermit, dass ich die der Medizinischen Hochschule Regensburg zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel „Domänenspezifische Funktionen des Polaritätsproteins Stardust in der Embryonalentwicklung von Drosophila“ in der Abteilung für molekulare und zelluläre Anatomie der Fakultät für Biologie und vorklinische Medizin der Universität Regensburg unter Betreuung von Prof. Dr. Dr. Michael Krahn, mit der Unterstützung durch Dr. Arnab Sen und Dr. Sabine Feicht durchgeführt habe. Prof. Dr. Dr. Michael Krahn hat die Idee zur Erstellung der vorliegenden Dissertation gehabt und während der gesamten Zeit ihre Ausarbeitung überwacht.

Weiterhin erkläre ich hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Regensburg, den

Leonie Koch