

**Peroxisomen-Biogenese und -Physiologie: Rolle
des konservierten Pex19 Proteins im
Modellorganismus *Drosophila***

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Christian Johannes Wingen

aus

Bonn

Bonn 2013

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

1. Gutachter

Herr Prof. Dr. Michael Hoch

2. Gutachter

Herr PD Dr. Reinhard Bauer

Tag der Promotion: 08.04.2013

Erscheinungsjahr: 2013

Teile dieser Arbeit wurden bereits vorab veröffentlicht:

Behr, M.; Wingen, C.; Wolf, C.; Schuh, R.; Hoch, M. (2007): **Wurst is essential for airway clearance and respiratory-tube size control**. Nat Cell Biol. 9(7): 847-53.

Wingen, C.*; Aschenbrenner, A.C.*; Stümpges, B.; Hoch, M.; Behr, M. (2009): **The Wurst protein: a novel endocytosis regulator involved in airway clearance and respiratory tube size control**. Cell Adh Migr. 3(1): 14-8.

Wingen, C.; Stümpges, B.; Hoch, M.; Behr, M. (2009): **Expression and localization of Clathrin heavy chain in *Drosophila melanogaster***. Cell Adh Migr. 3(1): 14-8.

Petkau, G.*; Wingen, C.*; Stümpges, B.*; Behr, M. (2012): **Clathrin Heavy Chain Expression and Subcellular Distribution in Embryos of *Drosophila melanogaster***. Embryogenesis, Dr. Ken-Ichi Sato. (Ed), ISBN: 978-953-51-0466-7, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/embryogenesis/clathrinheavy-chain-expression-and-subcellular-distribution-in-embryos-of-drosophila-melanogaster>.

Petkau, G.; Wingen, C.; Jussen, L.C.; Radtke, T.; Behr, M. (2012): **Obstructor-A is required for epithelial extracellular matrix dynamics, exoskeleton function, and tubulogenesis**. J Biol Chem. 287(25): 21396-405.

*These authors contributed equally to this work

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	Geschichte und Morphologie der Peroxisomen	2
1.2	Metabolismus der Peroxisomen	3
1.2.1	Detoxifikation von ROS und Xenobiotika	4
1.2.2	Peroxisomale β -Oxidation der Fettsäuren	6
1.2.3	α -Oxidation verzweigt-kettiger Fettsäuren	7
1.2.4	Etherphospholipid-Biosynthese	8
1.3	Peroxisomen-Biogenese	8
1.3.1	Import peroxisomaler Matrixproteine	11
1.3.2	PMP-Import	11
1.3.2.1	Direkter PMP-Import in Peroxisomen	12
1.3.2.2	ER-vermittelter PMP-Import	14
1.4	Peroxisomale Krankheiten	15
1.4.1	Peroxisomen-Biogenese-Krankheiten (PBDs)	16
1.4.2	Zellweger-Syndrom	18
1.5	Zellweger-Syndrom-Tiermodelle	19
1.6	Pex19 und Pex19 orthologe Proteine	20
1.7	Zielsetzung	22
2	MATERIAL	23
2.1	Allgemeine Materialien	23
2.1.1	Chemikalien	23
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	23
2.1.3	Geräte	23
2.1.4	Software	25
2.1.5	Standards und Kits	25
2.2	Puffer und Lösungen	25
2.3	Enzyme und Puffer	27
2.4	Antikörper	28

2.4.1	Primärantikörper	28
2.4.2	Sekundärantikörper	28
2.5	Oligonukleotide	29
2.5.1	PCR Primer.....	29
2.5.2	qRT-PCR Primer.....	29
2.6	Kultivierung von Fliegen.....	31
2.6.1	Verwendete Fliegenlinien	31
2.6.2	Fliegenfutter.....	35
2.6.3	Apfelsaftagarplatten.....	35
3	METHODEN	36
3.1	Molekularbiologische Methoden.....	36
3.1.1	DNA-Plasmidisolierung im analytischen Maßstab (Minipräparation)	36
3.1.2	DNA-Plasmidisolierung im mittleren Maßstab (Midipräparation)	36
3.1.3	Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i> Zellen	37
3.1.4	Natriumacetat-Präzipitation	37
3.1.5	Ligation	37
3.1.6	TOPO-Klonierung	38
3.1.7	Genomische DNA Präparation aus adulten Fliegen.....	38
3.1.8	Genomische DNA Präparation aus Einzelembryonen	38
3.1.9	Photometrische Nukleinsäure Konzentrationsbestimmung.....	39
3.1.10	Restriktion von DNA durch Endonukleasen	39
3.1.11	Polymerase-Kettenreaktion zur Amplifizierung von DNA.....	39
3.1.12	DNA-Gelelektrophorese	41
3.1.13	Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	41
3.1.14	DNA-Sequenzierung.....	42
3.1.15	RNA-Isolierung aus Embryonen, Larven und Puppen	42
3.1.16	cDNA-Synthese	42
3.1.17	Real-time PCR Analyse (qRT-PCR).....	43
3.1.18	Inverse PCR (Plasmid-Rescue).....	44
3.2	Arbeiten mit <i>Drosophila melanogaster</i>	44
3.2.1	Fliegenhaltung	44
3.2.2	Sammeln von Embryonen, Larven oder Puppen	45
3.2.3	Fixieren von Embryonen.....	45
3.2.4	Fluoreszenz-Antikörperfärbung an Embryonen.....	45
3.2.5	Fixierung und Fluoreszenz-Antikörperfärbung an larvalen Geweben.....	46
3.2.6	Ektopische Expression mittels UAS-Gal4 System	47

3.2.7	P-Element-Mutagenese	47
3.2.8	Rekombination zur Entfernung einer Mutation	48
3.2.9	Transposase vermittelte P-Element Exzision	49
3.2.10	Komplementationstest	49
3.2.11	Generierung maternaler Nullmutanten	50
3.2.12	Negativer Geotaxis-Versuch	51
3.2.13	Versuch zur Bestimmung der Flugfähigkeit	51
3.2.14	Fütterungsexperimente	52
3.2.15	Histologische Analyse von <i>Drosophila</i> Gehirnen	53
3.3	Gaschromatografie / Massenspektrometrie (GC/MS)	53
3.4	Elektronenmikroskopie	54
3.4.1	Fixierung, Kontrastierung und DAB-Färbung von Embryonen	54
3.4.2	Trimmen der in Durcupan eingebetteten Embryonen	56
3.4.3	Glasmesserherstellung für Semi- und Ultradünnschnitte	56
3.4.4	Schneiden und Färben von Semidünnschnitten	56
3.4.5	Schneiden und Vorbereiten von Ultradünnschnitten für das TEM	57
4	ERGEBNISSE	58
4.1	Charakterisierung von Genen, die an der Tracheenmorphogenese und - Physiologie beteiligt sind	58
4.1.1	Wurst: Ein neuer Endozytose Regulator der für die tracheale Luftfüllung essentiell ist	58
4.1.2	Clathrin heavy chain (Chc) Expressionsprofil in <i>Drosophila</i>	59
4.1.3	Obstructor-A vermittelt die Integrität der chitinösen EZM	60
4.2	Charakterisierung der dPex19 Funktion während der Peroxisomen-Biogenese in <i>Drosophila</i>	61
4.2.1	Charakterisierung der <i>dpex19</i> mutanten Fliegenlinien	61
4.2.1.1	Eine Inhibierung der <i>dpex19</i> Expression verursacht keine Letalität	62
4.2.1.2	Homozygote <i>dpex19</i> Defizienz-Mutanten sind embryonal letal	63
4.2.1.3	<i>dpex19</i> P-Element-Fliegenlinien zeigen widersprüchliche Letalitätsprofile	63
4.2.1.4	Die EY21383 Fliegenlinie trägt eine Letalität vermittelnde, <i>dpex19</i> unabhängige Mutation	64
4.2.1.5	Die Entfernung der letalen <i>dpex19</i> unabhängigen Mutation führt zu lebensfähigen EY21383-Fliegen	65
4.2.1.6	EY21383R Exzision verursacht unterschiedliche <i>dpex19</i> Deletionen	67
4.2.1.7	<i>dpex19</i> ^{ΔF7} ist eine Transkript-Nullmutante	70

4.2.1.8	Maternal-zygotische <i>dpex19</i> ^{ΔF7m-z} Mutanten sind Transkript- und Protein-Nullmutanten.....	71
4.2.1.9	Der Zeitpunkt des <i>dpex19</i> Genfunktionsverlusts beeinflusst das Letalitätsprofil.....	72
4.2.1.10	Die <i>dpex19</i> ^{ΔF7} vermittelte Letalität kann durch ektoische <i>dpex19</i> Expression gerettet werden.....	74
4.2.2	Zellbiologische Analyse der dPex19 Funktion.....	76
4.2.2.1	dPex19 kolokalisiert mit dem peroxisomalen Marker GFP.SKL.....	76
4.2.2.2	dPex19 und dPex3 kolokalisieren und zeigen eine Lokalisationsabhängigkeit ..	78
4.2.2.3	dPex3HA Überexpression verursacht eine dPex19 Mislokalisierung.....	79
4.2.2.4	<i>dpex19</i> ^{ΔF7} mutante L3 Larven haben keine GFP.SKL positiven Peroxisomen ...	81
4.2.2.5	Maternal zygotische <i>dpex19</i> ^{ΔF7m-z} Mutanten zeigen eine verringerte Peroxisomenanzahl	83
4.2.3	Phänotypische Untersuchung der <i>dpex19</i> ^{ΔF7} Nullmutanten	84
4.2.3.1	Bewegungsdefekte in <i>dpex19</i> ^{ΔF7} Mutanten	84
4.2.3.2	Neurodegenerative Defekte in <i>dpex19</i> ^{ΔF7} mutanten Fliegen.....	87
4.2.3.3	<i>dpex19</i> ^{ΔF7} Mutanten entwickeln melanotische Knoten	88
4.2.4	Physiologische Untersuchungen der <i>dpex19</i> ^{ΔF7} Mutanten	90
4.2.4.1	<i>dpex19</i> ^{ΔF7} Mutanten leiden unter oxidativem Stress.....	90
4.2.4.2	In <i>dpex19</i> ^{ΔF7} Mutanten akkumulieren sehr langkettige Fettsäuren	94
4.2.5	Untersuchung des Nahrungseinflusses auf den <i>dpex19</i> ^{ΔF7} mutanten Phänotyp	96
4.2.5.1	Ein Futterzusatz von Kokosnussöl oder Butter rettet die <i>dpex19</i> ^{ΔF7} vermittelte Letalität.....	96
4.2.5.2	Mittelkettige Nahrungs-TAGs retten <i>dpex19</i> ^{ΔF7} vermittelte Letalität.....	99
5	DISKUSSION.....	103
5.1	Analyse der dPex19 mRNA und Proteinexpression	104
5.1.1	dPex19 wird ubiquitär, mit zeitlicher und räumlicher Dynamik exprimiert.....	104
5.1.2	dPex19 ist partiell mit dem ER und Peroxisomen assoziiert.....	104
5.2	Charakterisierung <i>dpex19</i> mutanter Fliegen	105
5.2.1	Ein <i>dpex19</i> Genfunktionsverlust vermittelt Letalität	105
5.2.2	<i>dpex19</i> ^{ΔF7} Mutanten zeigen Bewegungsdefekte, Neurodegeneration und melanotische Knoten	107
5.2.3	<i>dpex19</i> ^{ΔF7} Mutanten besitzen keine funktionellen Peroxisomen	107
5.2.4	<i>dpex19</i> ^{ΔF7} mutante Fliegen zeigen einen veränderten Fettsäuremetabolismus	108
5.2.5	<i>dpex19</i> ^{ΔF7} Mutanten leiden unter oxidativem Stress	109
5.3	Genetische und diätische Rettungsexperimente von <i>dpex19</i>^{ΔF7} Mutanten	111
5.3.1	Eine ektoische dPex19 Expression rettet <i>dpex19</i> ^{ΔF7} Mutanten.....	111

5.3.2	Eine spezielle Lipiddiät rettet <i>dpex19</i> ^{ΔF7} mutante Phänotypen	112
5.4	dPex19/dPex3 Interaktionsstudien	114
5.4.1	dPex19 und dPex3 zeigen eine partielle Kollokalisierung.....	114
5.4.2	Eine <i>dpex3HA</i> Überexpression führt zu vergrößerten Peroxisomen und einer dPex19 Fehllokalisation.....	115
5.4.3	dPex3 mislokalisiert in <i>dpex19</i> ^{ΔF7} Mutanten.....	115
6	ZUSAMMENFASSUNG.....	116
7	ANHANG	118
7.1	<i>dpex19</i> Transkripte.....	118
7.2	Sequenzierung inverse PCR mit genomischer DNA der EY21383 Linie.....	119
7.3	EY21383 Insertion in genomischer <i>dpex19</i> Sequenz mit Markierung für RA-CG5325	120
7.4	Primer Anlagerungssequenz im <i>dpex19</i> Genlocus zur Verifikation des EY21383 P-Elements in <i>dpex19</i>	121
7.5	EY21383 “Jump out Screen”	122
7.6	Genomische <i>dpex19</i> Sequenz mit Markierung für RA-CG5325, EY21383 Insertion & Deletion dF7	124
7.7	Genomische <i>dpex19</i> Sequenz mit Zeichnung für RA-CG5325, EY21383 Insertion & Deletion dF8; dF10; dD10	125
7.8	Sequenzvergleich ΔEY Revertanten und white ⁻	127
7.9	Verfütterung von freien Fettsäuren	129
7.10	Fettsäurezusammensetzung der Speisefette und -öle	130
7.11	<i>dpex19</i> Expression während der Ontogenese	130
8	LITERATURVERZEICHNIS.....	131
9	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	143

1 Einleitung

Drosophila melanogaster ist aufgrund eines kurzen Generationszyklus, einfacher Haltung und genetischer Manipulierbarkeit ein beliebter Modellorganismus. Die Tatsache, dass für nahezu 75 Prozent der humanen krankheitsverursachenden Gene ein konserviertes potentiell funktionelles Homolog (Reiter et al, 2001) im *Drosophila* Genom zu finden ist, macht *Drosophila* zu einem geeigneten Modellsystem zur Analyse menschlicher Erkrankungen und allgemeiner zellbiologischer Vorgänge. Darüber hinaus besitzen die Larven und adulten Fliegen säugetieräquivalente Organe. So wird zum Beispiel die Nierenfunktion in *Drosophila* von den Malpighischen Gefäßen, die Leberfunktion vom Fettkörper und den Oenozyten übernommen. Das adulte *Drosophila* Gehirn ist aus mehr als 100.000 Neuronen zusammengesetzt und steuert komplexe Verhaltensweisen. Wie von Pandey und Kollegen zusammengefasst konnten beispielsweise der circadiane Rhythmus, Flugnavigation, Lernen und Erinnerung in *Drosophila* Gehirnen untersucht werden. Außerdem wurde gezeigt, dass das zentrale Nervensystem (ZNS) von *Drosophila* auf unterschiedliche psychisch aktive Medikamente ähnlich reagiert, wie es in Säugetieren beschrieben ist (Pandey & Nichols, 2011).

Viele Gene, die bei Mutation Krankheiten wie Alzheimer, Parkinson, Krebs, Herz-Kreislaufkrankungen, Entzündungs- und Infektionskrankheiten oder Metabolische Krankheiten wie Diabetes verursachen, findet man auch in *Drosophila*. Deren Gendefekte führen oft auch in der Fliege zu Phänotypen, welche den Symptomen der entsprechenden humanen Erkrankung gleichen (Pandey & Nichols, 2011). Die Entwicklung von *in vivo* Krankheitsmodellen in *Drosophila* kann somit dazu beitragen, die zellulären und systemischen Anomalien einer humanen Krankheit zu verstehen. Entsprechende Therapiemöglichkeiten können so in dem darauffolgenden Prozess untersucht und entwickelt werden.

Die Biogenese der Peroxisomen zu untersuchen kann dazu beitragen, schwere peroxisomale Krankheiten, wie Zellweger-Syndrom oder Adrenoleukodystrophie (ALD) besser zu verstehen. Dieses Verständnis kann wiederum für die Entwicklung diverser Therapien bedeutsam sein. Um einen tieferen Einblick in die Funktion der Peroxisomen zu bekommen, wird im Folgenden deren Morphologie, der Stoffwechsel, die Peroxisomen-Biogenese und einige relevante peroxisomale Krankheiten beschrieben.

1.1 Geschichte und Morphologie der Peroxisomen

Peroxisomen sind, ähnlich wie Mitochondrien, Zellkern, Endoplasmatisches Retikulum (ER) und Golgi-Apparat, vom Zytoplasma durch mindestens eine Lipiddoppelschicht abgetrennte Zellorganellen. Diese in nahezu allen eukaryotischen Zellen vorkommende Kompartimentierung ermöglicht das simultane Ablaufen unterschiedlichster Stoffwechselreaktionen.

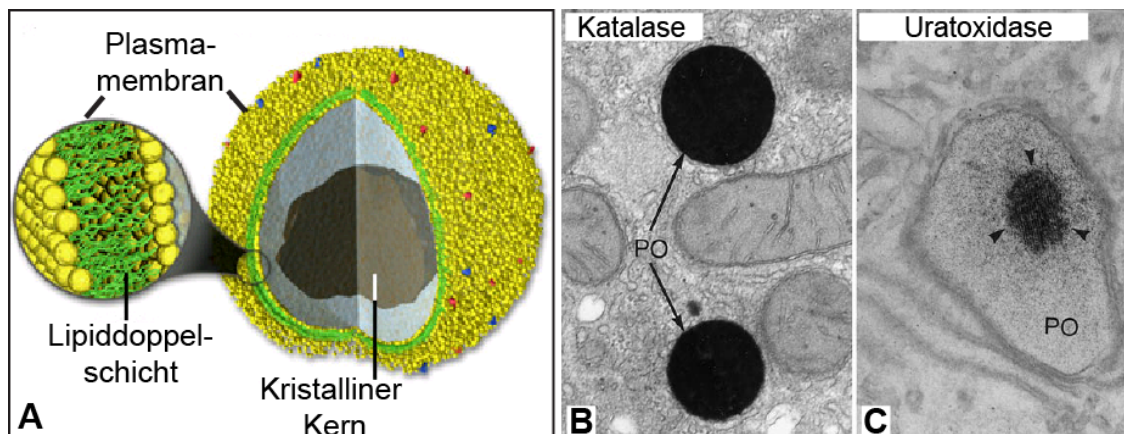


Abb. 1.1: Schematischer Aufbau und Ultrastruktur von Peroxisomen A: (modifiziert nach Molecular Expression; <http://micro.magnet.fsu.edu/cells/peroxisomes/peroxisomes.html>; © 1995-2012 by Michael W. Davidson and The Florida State University. Mit freundlicher Genehmigung von Michael W. Davidson.). Umgeben von einer Lipiddoppelschicht beherbergen Peroxisomen eine Vielzahl von Enzymen, die zum Teil in einem kristallinen Kern aggregieren. B: (modifiziert nach (Schrader & Fahimi, 2008) zytochemische Katalaselokalisation durch die Diaminobenzidin Technik in Peroxisomen (PO) von Rattenleberzellen. Die Peroxisomen sind umgeben von Mitochondrien unterschiedlicher Form und Größe. C: (modifiziert nach (Schrader & Fahimi, 2008) Zytochemische Uratoxidaselokalisation in Rattenleberzellen durch die Cerium Methode. Die Pfeilköpfe deuten auf den kristallinen Kern im Inneren des Peroxisoms.

Vor ca. 60 Jahren wurden die damals auch als „Microbodies“ bezeichneten, DNA-freien und von einer einfachen Lipiddoppelschicht umgebenen (Abb. 1.1 A) Kompartimente erstmals beschrieben (Rhodin, 1954). Über 10 Jahre später konnten De Duve und Baudhuin die peroxisomale Funktion, nämlich die durch Oxidasen vermittelte Produktion von Wasserstoffperoxid und dessen Entgiftung durch das Enzym Katalase, identifizieren (de Duve & Baudhuin, 1966). Aufgrund der Ergebnisse ihrer biochemischen Analysen wurden die Organellen Peroxisomen genannt. Definitionsgemäß bezeichnet man ein Organell, das sowohl Oxidasen (Abb. 1.1 C) als auch Katalasen (Abb. 1.1 B) beinhaltet, als Peroxisom (de Duve & Baudhuin, 1966). Die Katalase ist daher das bedeutendste peroxisomale Marker- oder Leitenzym (Wanders & Waterham, 2006a).

Die Peroxisomenmorphologie, ihre Anzahl, Enzymzusammensetzung und damit ihr Metabolismus variiert erheblich in unterschiedlichen Organismen, Organen, Geweben und Zelltypen. Diese auch vom physiologischen Status des betrachteten Zelltyps abhängige morphologische Heterogenität reicht von einigen sehr kleinen, runden Peroxisomen (0,1 μm) bis zu über 1000, zehnmal so großen, teilweise tubulären Peroxisomen (1 μm) pro Zelle (van den Bosch et al, 1992; Wanders & Waterham, 2006a; Wiese et al, 2007; Schrader & Fahimi, 2008). Peroxisomen kommen in allen bisher beschriebenen eukaryotischen Zellen mit Ausnahme der Erythrozyten, Spermien und einiger weniger Protisten vor (Lüers et al, 2006; Schlüter et al, 2006). Oftmals bilden die sehr hohen Enzymkonzentrationen innerhalb eines Peroxisoms kristalline Nukleole (Abb. 1.1), die mittels Elektronenmikroskopie sichtbar gemacht werden können (Angermüller et al, 1986; Zaar & Fahimi, 1991).

1.2 Metabolismus der Peroxisomen

Über 50 bis heute bekannte peroxisomale Enzyme katalysieren unterschiedlichste anabole und katabole Stoffwechselwege. Die peroxisomale Enzymzusammensetzung kann in Abhängigkeit vom Organismus, der Gewebeart und dessen akuten Stoffwechsels zum Teil erheblich variieren (Abb. 1.2). Allgemeine Funktionen von Peroxisomen sind, neben dem anabolen und katabolen Stoffwechsel diverser reaktiver Sauerstoffspezies (ROS für „reactive oxygen species“), die α - und β -Oxidation verschiedener Fettsäuren (van den Bosch et al, 1992). Während in Tieren die β -Oxidation von Fettsäuren in Mitochondrien und Peroxisomen stattfindet, werden in Pflanzen und eukaryotischen Mikroorganismen die Fettsäuren ausschließlich in Peroxisomen metabolisiert (Poirier et al, 2006; Cooper & Beevers, 1969). Die α -Oxidation und die β -Oxidation sehr langkettiger Fettsäuren mit einer Kettenlänge größer als 22 C-Atomen findet in allen eukaryotischen Lebewesen ausschließlich in Peroxisomen statt (Abb. 1.2, Wanders & Tager, 1998). Peroxisomen enthalten des weiteren Enzyme, die die Oxidation von einfach und mehrfach ungesättigten Fettsäuren katalysieren (Wanders et al, 2010). In Peroxisomen der Säugetiere findet zudem der Abbau von Purinen, Aminosäuren und Eikosanoiden, die Oxidation verzweigt-kettiger Fettsäuren sowie die Biosynthese von Plasmalogen (Etherlipid), Cholesterin und der Gallensäure statt (Titorenko & Rachubinski, 2001; Islinger et al, 2010; Wanders et al, 2010). Außerdem konnten Dixit und Kollegen 2010 eine Rolle der Peroxisomen in der antiviralen Immunreaktion identifizieren (Abb. 1.2, Dixit et al, 2010).

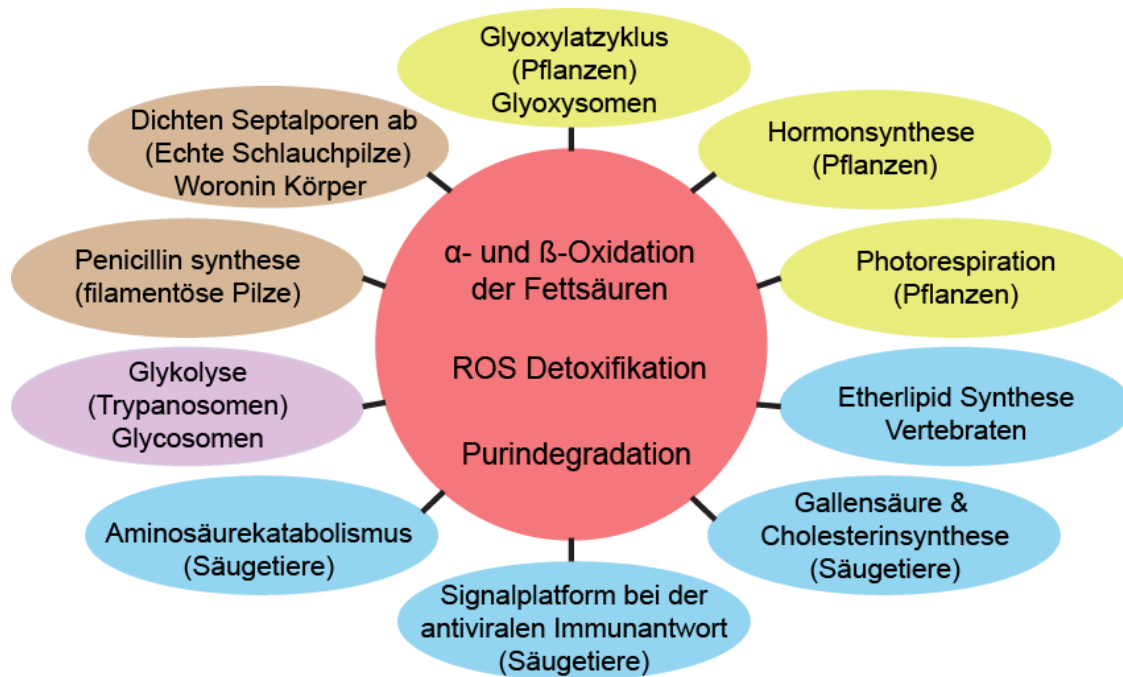


Abb. 1.2: Funktion von Peroxisomen in unterschiedlichen Organismen (modifiziert nach Till et al, 2012). In Peroxisomen finden diverse metabolische Prozesse statt, die von über 50 bekannten Enzymen katalysiert werden. Die allgemeinen, in fast allen eukaryotischen Zellen ablaufenden peroxisomalen Stoffwechselwege sind in der Mitte dargestellt (roter Kreis). ROS („reactive oxygene species“) = reaktive Sauerstoffspezies. Die organismenspezifischen Funktionen von Peroxisomen sind in unterschiedlich kolorierten Ellipsen dargestellt (blau = Tiere; grün = Pflanzen; braun = Pilze und Hefen; lila = einzelliger Flagellat).

In Pflanzen, Pilzen und Protozoen ist die Multifunktionalität des peroxisomalen Metabolismus nochmals erweitert (Islinger et al, 2010). So sind beispielsweise die Enzyme des Glyoxylatzyklus bei Pflanzen und Pilzen sowie Enzyme, die in filamentösen Pilzen für die Penicillinsynthese verantwortlich sind, in den Peroxisomen lokalisiert (Müller et al, 1991). Peroxisomen, die Enzyme des Glyoxylatzyklus (Abb. 1.2) beinhalten, werden aufgrund ihrer Funktion auch als Glyoxysomen bezeichnet (Breidenbach & Beevers, 1967). Der gemeinsame evolutionäre Ursprung der unterschiedlichen peroxisomalen Subtypen wird nicht zuletzt durch die Orthologie einiger ubiquitärer Peroxine (siehe Kapitel 1.3), die für die Peroxisomen-Biogenese verantwortlich sind, bestätigt (Till et al, 2012). Auf die allgemeinen und für diese Arbeit relevanten peroxisomalen Stoffwechselwege wird im Folgenden genauer eingegangen.

1.2.1 Detoxifikation von ROS und Xenobiotika

Diverse in den Peroxisomen lokalisierte Oxidasen reduzieren molekularen Sauerstoff zu Wasserstoffperoxid (H_2O_2), eins der bekannten ROS (Wanders & Waterham, 2006a). H_2O_2 kann durch die Peroxisomenmembran diffundieren und zelluläre

Signalwege modulieren. Zu hohe H_2O_2 Konzentrationen und die daraus produzierten Hydroxylradikale können hingegen Membranlipide durch Lipidoxidation ungesättigter Fettsäuren, aber auch Proteine irreversibel schädigen. Diese zellschädigende Wirkung entfaltet sich sowohl intra- als auch extraperoxisomal, also im Zytoplasma (Titorenko & Terlecky, 2011). Neben der Katalase sind die in der peroxisomalen Matrix lokalisierten Enzyme Glutathion-Peroxidase, Superoxid-Dismutase und Peroxiredoxin an der ROS Detoxifikation und somit an der Verhinderung von oxidativem Stress beteiligt (Abb. 1.3; Schrader & Fahimi, 2006; Titorenko & Terlecky, 2011).

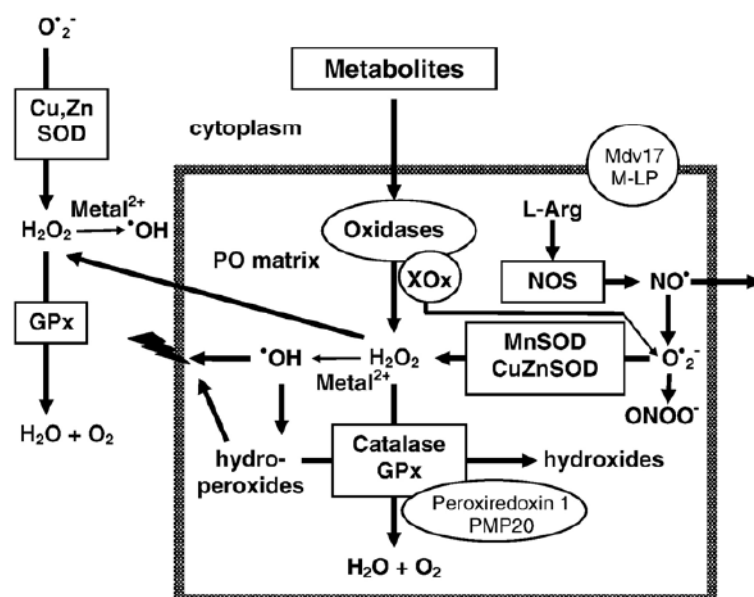


Abb. 1.3: Peroxisomaler ROS Metabolismus (nach Schrader & Fahimi, 2006). Im Zuge der Fettsäureoxidation und weiterer Stoffwechselprozesse produzieren die peroxisomalen Oxidasen H_2O_2 . Das zellschädigende H_2O_2 und weiter zum Teil davon abgeleitete ROS werden innerhalb der Peroxisomen durch Katalasen, Glutathion-Peroxidasen (GPx), Peroxiredoxin 1 und Superoxid-Dismutasen (Cu, ZnSOD und MnSOD) detoxifiziert. Die durch NO-Synthase (NOS) bei der L-Arginin-Oxidation entstehenden Stickstoffmonoxide können wie H_2O_2 die Peroxisomenmembran passieren und zelluläre Signalwegen modulieren.

Weitere ROS wie Superoxid-Anionen (O_2^-) werden durch Oxidoreduktasen in Peroxisomen gebildet und durch peroxisomale Superoxid-Dismutasen unschädlich gemacht. Auch die während der L-Arginin-Oxidation durch Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS) Aktivität generierten reaktiven NOs werden in den Peroxisomen detoxifiziert (Abb. 1.3, Schrader & Fahimi, 2006; Wanders & Waterham, 2006a). Peroxisomen besitzen außerdem Epoxidhydrolasen, die Epoxide, eine Gruppe endogener und exogener Carcinogene und Mutagene, unschädlich machen können (Wanders & Waterham, 2006a). Des Weiteren katalysieren peroxisomale Glutathion-S-Transferasen (GSTs) die Glutathion-Konjugation an elektrophile oder lipophile

Substrate, wie z.B. Xenobiotika oder peroxidierte Lipide (Litwack et al, 1971; Leaver & George, 1998). Durch die erhöhte Wasserlöslichkeit der gebildeten Konjugate können die zellschädigenden Substanzen entweder durch Exkretion aus der Zelle geschleust und in Vertebraten über die Niere ausgeschieden oder durch zellulären Abbau entgiftet werden (Douglas, 1987; Higgins & Hayes, 2011). Zusammengefasst bewirkt die peroxisomale Detoxifikation von ROS und einigen Xenobiotika, die oxidativen Stress, zelluläre Alterung, Neurodegeneration und Krebs verursachen können, einen Schutz des Organells, der Zelle und des Organismus (Walton & Pizzitelli, 2012; Wojcik et al, 2010; Peterson & Flood, 2012).

1.2.2 Peroxisomale β -Oxidation der Fettsäuren

Die β -Oxidation drei verschiedener Fettsäureklassen wird zu einem wesentlichen Teil in den Peroxisomen katalysiert. Hierzu gehören die sehr langkettigen Fettsäuren wie C24:0 und C26:0 (Abb. 1.4 C), die verzweigtkettige Fettsäure Pristansäure (Abb. 1.4 B) und die bei der Gallensäuresynthese produzierten Intermediate Dihydroxycholestansäure (DHCA) und Trihydroxycholestansäure (THCA, Abb. 1.4 D). Obwohl die β -Oxidation der Fettsäuren in Peroxisomen nur bis zu einer Kettenlänge von acht Kohlenstoffatomen abläuft, findet man in Peroxisomen alle Enzyme der β -Oxidation (Wanders et al, 2010). Nach dem nur zum Teil verstandenen Transport, der in den Peroxisomen gekürzten Fettsäuren in die Mitochondrien findet dort die vollständige Oxidation der Fettsäure-CoA-Ester zu Kohlenstoffdioxid und Wasser statt (Jakobs & Wanders, 1995; van Roermund et al, 1995). Die Gallensäureintermediate DHCA und THCA werden in den Leberperoxisomen in einem Oxidationszyklus am Carboxyl-Ende um zwei Kohlenstoffatome gekürzt. Die gebildeten CoA-Ester werden aus den Peroxisomen transportiert und in die Gallenflüssigkeit abgegeben.

Die β -Oxidation der Peroxisomen und Mitochondrien ähnelt sich insofern, als in beiden Organellen in den folgenden vier Schritten die Fettsäure um zwei Kohlenstoffatome gekürzt wird. Auf eine initiale Dehydratation folgt eine Hydratation, eine erneute Dehydratation und eine thiolytische Spaltung. Im Unterschied zur mitochondrialen β -Oxidation werden die Elektronen bei der peroxisomalen β -Oxidation nicht auf NAD^+ , sondern ohne Energiegewinn auf molekularen Sauerstoff übertragen. In einer durch die Katalase katalysierten Disproportionierung zu Wasser und Sauerstoff wird das entstandene H_2O_2 detoxifiziert (Wanders et al, 2010).

1.2.3 α -Oxidation verzweigtkettiger Fettsäuren

Der am β -Kohlenstoffatom assoziierte Methylrest von 3-Methyl verzweigtkettigen Fettsäuren verhindert die peroxisomale β -Oxidation und muss daher vorerst entweder durch α - oder ω -Oxidation modifiziert werden. Die zu diesem Zweck bevorzugte α -Oxidation der charakteristischen 3-Methyl-Fettsäure Phytansäure wird ausschließlich in den Peroxisomen vollzogen. Hierfür aktiviert die im Zytoplasma oder im Peroxisom lokalisierte „very-long-chain acyl-CoA synthetase“ (VLCS) die Phytansäure vorerst zu einem CoA-Ester. Dieses Phytanoyl-CoA wird dann intraperoxisomal zur Pristansäure oxidiert. Die Pristansäure wird anschließend durch peroxisomale β -Oxidation metabolisiert (Abb. 1.4 A, Jansen & Wanders, 2006; Steinberg et al, 1999; Watkins et al, 1996).

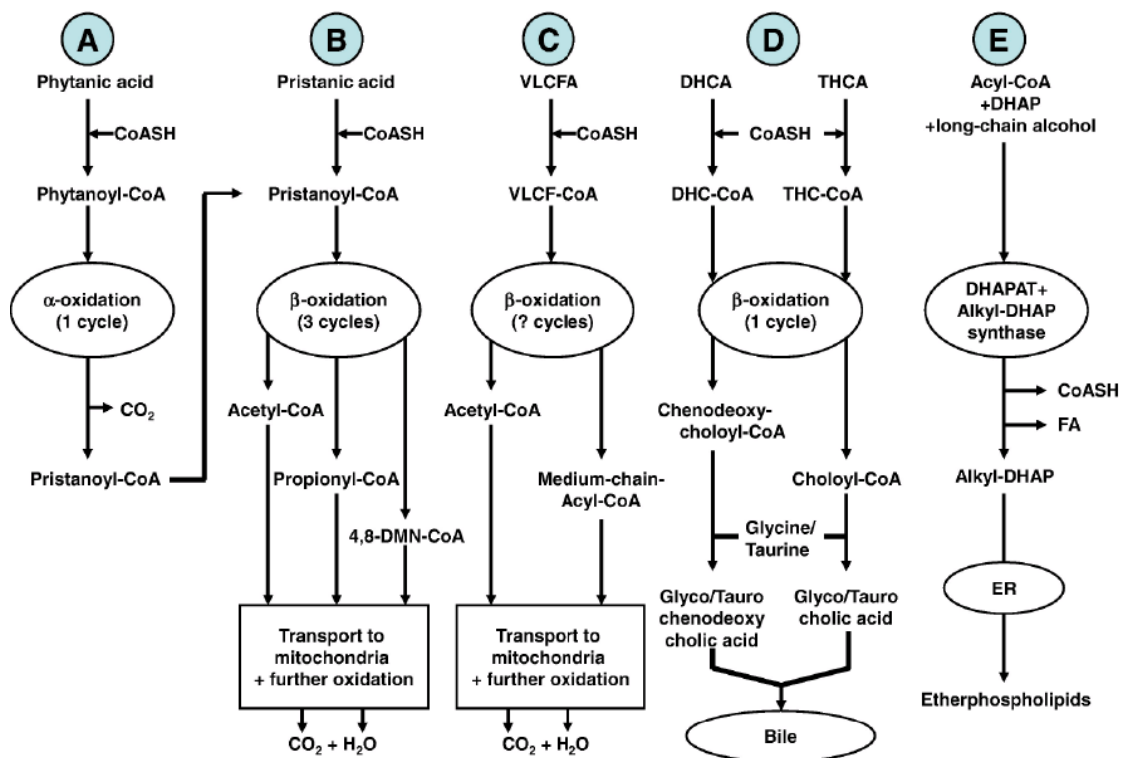


Abb. 1.4: Lipid-Metabolismus in Peroxisomen (nach Wanders et al, 2010). Dargestellt ist die α -Oxidation der verzweigtkettigen Phytansäure (A), die β -Oxidation der Pristansäure (B), der sehr langkettigen Fettsäuren (VLCFA, C), der DHCA und der THCA (D). Allen Oxidationszyklen geht eine Aktivierung der Fettsäure durch das Coenzym A (CoASH) voraus. Außerdem ist der peroxisomale Teil des Etherphospholipidsyntheseweges skizziert (E). Hierzu wird in Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) nach Acylierung die für Etherphospholipide charakteristische Etherbindung eingefügt. Dies wird durch das Enzym Alkyldihydroxyacetonphosphat (Alkyl-DHAP)-Synthase katalysiert. Weitere Schritte der Etherphospholipidsynthese werden im ER durchgeführt.

1.2.4 Etherphospholipid-Biosynthese

In Peroxisomen erfolgen außer den bisher beschriebenen katabolen auch eine Vielzahl von anabolen Stoffwechselprozessen. So sind humane Peroxisomen neben der Cholesterin- und Gallensäure-Synthese auch an der Biosynthese von Etherlipiden wie den Plasmalogenen beteiligt (Abb. 1.4 E). Diese machen in der weißen Substanz des Säugetiergehirns mehr als 80 % der Phospholipide aus (Wanders & Waterham, 2006b; Girzalsky et al, 2010). Die zu den Etherlipiden zählenden Plasmalogene sind durch Substitution der Glycerin C-1 und C-2 Atome mit Palmitin-, Stearin- oder Ölsäure bzw. mit den mehrfach ungesättigten Fettsäuren Linol- oder Arachidonsäure gekennzeichnet. Neben dem hohen Plasmalogenvorkommen im ZNS sind sie auch ein essentieller Zellmembranbestandteil in Hoden, Makrophagen und dem Herzkreislaufsystem. So sind Plasmalogene auch für die Lungenfunktion in Säugetieren essentiell (Wanders & Waterham, 2006b). Eine unter den noch nicht in Gänze beschriebenen Funktionen von Plasmalogenen liegt im Schutz vor zellzerstörenden ROS (Farooqui & Horrocks, 2001; Gorgas et al, 2006; Nagan & Zoeller, 2001). Die Plasmalogensynthese beginnt mit der in den Peroxisomen ablaufenden Acylierung von Dihydroxyacetonphosphat (DHAP). Die kennzeichnende Etherbindung wird im darauffolgenden Schritt durch das peroxisomale Enzym Alkyldihydroxyacetonphosphat-Synthase gebildet. Nach der Überführung des hierbei gebildeten Alkyl-DHAP zu 1-Alkyl-Glycerol-3-Phosphat an der cytoplasmatischen Seite der Peroxisomenmembran werden alle weiteren Syntheseschritte bis zum Plasmalogen im ER vollzogen (Abb. 1.4 E, Wanders et al, 2010).

1.3 Peroxisomen-Biogenese

Die Biogenese der Peroxisomen beinhaltet neben der Peroxisomenassemblierung auch die Teilung und Segregation auf zwei Tochterzellen. Die an der Peroxisomen-Biogenese beteiligten Proteine werden ihrer Funktion entsprechend Peroxine (Pex) genannt. Sie werden von den sogenannten *PEROXIN*-Genen (*PEX*) kodiert. Bis heute sind 32 Peroxine bekannt, die konservierte Funktionen während der Peroxisomen-Biogenese ausführen (Girzalsky et al, 2010). Mutationen in über 12 von der Hefe bis zu den Säugetieren konservierten *PEX*-Genen verursachen im Menschen tödlich verlaufende Peroxisomen-Biogenese-Krankheiten (siehe Kapitel 1.4).

Das Peroxisomen nicht nur aus bereits existierenden Peroxisomen hervorgehen, sondern auch *de novo* aus dem ER entstehen können, ist erst seit wenigen Jahren bekannt. Ursprünglich ging man zwar aufgrund von morphologischen und biochemischen Studien davon aus, dass die Peroxisomen aus dem ER entstehen (Novikoff & Novikoff, 1972; Gonzalez & Beevers, 1976), später wurde die Annahme jedoch durch zahlreiche Studien, in denen der posttranslationale Import von peroxisomalen Matrixenzymen und von einigen peroxisomalen Membranproteinen (PMPs) beobachtet wurde, widerlegt. Aufgrund der Peroxisomen eigenen Protein-Import-Maschinerie inklusive der Verwendung von Peroxisomalen Zielerkennungssequenzen (PTS, „peroxisomal targeting sequence“) nahm man an, dass Peroxisomen autonome Organellen seien und durch Wachstum und Teilung entstehen (Purdue & Lazarow, 2001; Ma et al, 2011). Erst im letzten Jahrzehnt konnte die Existenz einer ER-vermittelten *de novo* Synthese von Peroxisomen bestätigt werden. Sowohl in Hefe- als auch in Säugetierzellen führen Mutationen in den Peroxinen *PEX3* und *PEX19* zum kompletten Verlust von Peroxisomen. Die Komplementation mit dem entsprechenden Wildtypgen lässt neue funktionelle Peroxisomen aus dem ER entstehen (Höhfeld et al, 1991; Tam et al, 2005; Hoepfner et al, 2005; Kim et al, 2006; Tabak et al, 2008, van der Zand et al, 2010). Heute ist es daher weitestgehend akzeptiert, dass Peroxisomen einerseits durch einen Reifungsprozess vom ER und andererseits durch Wachstum und Teilung entstehen können (Abb. 1.5). Das ER stellt in jedem Fall die Membranlipide für die peroxisomale Biogenese zur Verfügung. Die PMPs werden von freien Ribosomen translatiert, mit Hilfe verschiedener Peroxine entweder ins ER inseriert und durch Vesikelknospung abgeschnürt, zu den Peroxisomen geleitet oder direkt zu den Peroxisomen transportiert und in deren Membran inseriert (siehe Kapitel 1.3.2). Die in der peroxisomalen Matrix lokalisierten Proteine/Enzyme werden durch eine weitere Klasse von Peroxinen im Zytosol gebunden. Nach erfolgtem Transport zum Zielorganell und Interaktion mit Peroxinen der PMP Gruppe (dem so genannten Translokon, siehe Kapitel 1.3.1) werden die Enzyme in die peroxisomale Matrix abgegeben. Bei einer Beeinträchtigung der PMP-Biogenese kann demnach kein aus PMPs aufgebautes Translokon für Matrixenzyme gebildet werden. Daraus folgt, dass neben den PMPs auch die peroxisomalen Matrixproteine nicht zur Bildung von Peroxisomen oder Peroxisomenvorläufern beitragen können. Hingegen werden bei einem Defekt des peroxisomalen Matrixproteinimports PMPs enthaltende Peroxisomen generiert, die allerdings keine Enzymaktivität aufweisen und deswegen als Geisterperoxisomen („peroxisomal ghosts“) bezeichnet werden (Ma et al, 2011).

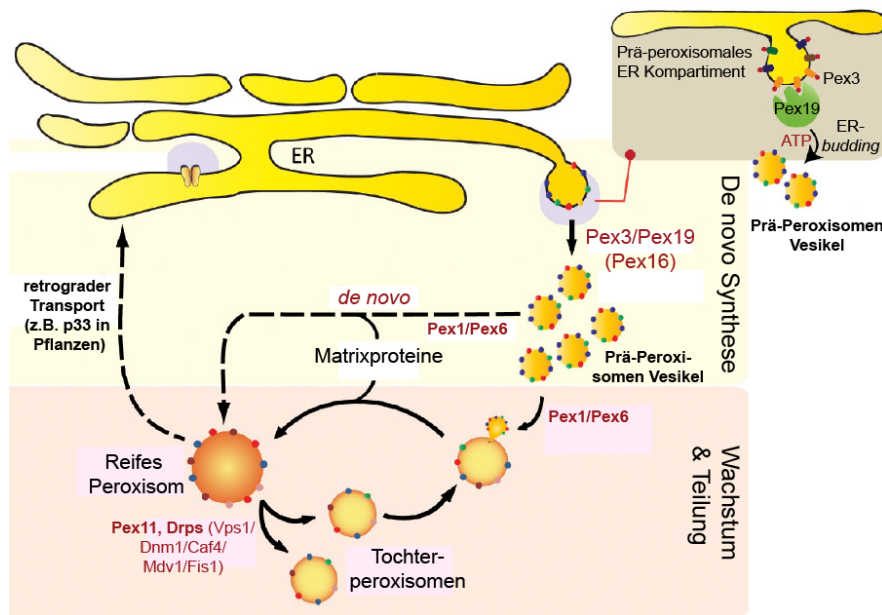


Abb. 1.5: Biogenese der Peroxisomen (nach Ma et al, 2011). In einem Pex3, Pex19 und Pex16 (außer in *S. cerevisiae*) abhängigen Prozess dissoziieren PMP beladene Prä-Peroxisomen-Vesikel durch Abknospung (budding) vom ER. Aus diesen Prä-Peroxisomen können durch Pex1 / Pex6 vermittelte Fusion und den Import von Matrixproteinen *de novo* reife Peroxisomen generiert werden. Reife Peroxisomen können zusätzlich durch Wachstum und Teilung, die von Pex11 und DRPs („dynamin related proteins“ - Dynamin verwandte Proteine) vermittelt wird, Tochterperoxisomen bilden. Diese können anschließend, ebenfalls durch Pex1 / Pex6 vermittelt, mit Prä-Peroxisomen fusionieren und nach Import peroxisomaler Matrixproteine zu reifen Peroxisomen werden. Ein p33 abhängiger retrograder Transport von Peroxisomen zum ER wurde für Pflanzen beschrieben (McCartney et al, 2005), muss aber noch bestätigt werden.

Bei der Teilung bereits bestehender Peroxisomen spielen wie bei der Mitochondrienteilung Dynamamin-verwandte Proteine („dynamin-related proteins“, DRPs) und Fis1 eine essentielle Rolle (Abb. 1.5, Nuttall et al, 2011; Li & Gould, 2003; Mano et al, 2004). Für die Peroxisomenvervielfältigung via Teilung interagiert Fis1 sowohl in Pflanzen als auch in Säugetieren mit dem PMP Pex11p (Lingard et al, 2008; Kobayashi et al, 2007). Die Überexpression von *PEX11* bewirkt eine Proliferation der Peroxisomen, und in *PEX11* defizienten Zellen wird nur ein einziges großes Peroxisom gebildet (Thoms & Erdmann, 2005).

Neben der *de novo* Synthese und der Teilung ist die Anzahl und damit die Homöostase der Peroxisomen durch Autophagie (Pexophagie) regulierbar (Manjithaya & Subramani, 2011).

1.3.1 Import peroxisomaler Matrixproteine

Es gibt zwei durch unterschiedliche Signalpeptide gekennzeichnete Klassen peroxisomaler Matrixproteine. Die meisten peroxisomalen Matrixproteine besitzen ein am Carboxylterminus lokalisiertes Typ-1 PTS (PTS1). Dieses hochkonservierte Tripeptid besteht aus der Konsensusaminosäuresequenz (S/A/C)(K/R/H)(L/A) und wird mit SKL für Serin (S), Lysin (K) und Leucin (L) abgekürzt (Gould et al, 1989). Eine Minderheit der Matrixproteine benutzt ein Typ-2 PTS (PTS2) als Signalpeptid für die korrekte Lokalisierung im Peroxisom. Es ist aus neun Aminosäuren aufgebaut und in der Nähe des Aminoterminus lokalisiert (Swinkels et al, 1991). Der Import der peroxisomalen Matrixproteine wird von einer Gruppe von Peroxinen bewerkstelligt, die in unterschiedlichen Subkomplexen organisiert sind und in ihrer Gesamtheit als Importomer bezeichnet werden (Ma et al, 2011). Der mehrstufige Matrixproteinimport beginnt mit der Bindung des Cargos an einen der beiden zytosolischen Rezeptoren Pex5 bzw. Pex7. Pex5 fungiert als PTS1 und Pex7 als PTS2 Rezeptor. Nach dem Transport der Rezeptor-Cargo-Komplexe zur Peroxisomenmembran binden diese an PMP „Docking“-Komplexe und entlassen die Matrixproteine in einem noch nicht im Detail beschriebenen Translokationsprozess ins Lumen. Die Matrixproteine können mit Kofaktoren assoziiert und in ihre funktionelle Tertiärstruktur gefaltet oder sogar als oligomere Proteine die Peroxisomenmembran passieren (Léon et al, 2006; McNew & Goodman, 1994). Da es bis heute keine eindeutigen Beweise für ein residierendes, peroxisomales Translokon gibt, nimmt man eine signalinduzierte Importomerassemblee an (Erdmann & Schliebs, 2005). Eine abschließende Ubiquitinierung des Rezeptors durch den RING-Subkomplex ermöglicht dessen Dissoziation und damit die erneute Bildung eines Transport Komplexes. Ausführlich dargestellt und diskutiert wird der hier angedeutete, bereits intensiv untersuchte Import peroxisomaler Matrixproteine in zahlreichen Review-Artikeln (Ma et al, 2011; Nuttall et al, 2011; Rucktäschel et al, 2011; Girzalsky et al, 2010).

1.3.2 PMP-Import

Im Gegensatz zu dem zuvor beschriebenen post-translationalen ER-unabhängigen Import der peroxisomalen Matrixenzyme ist der Import der PMPs ähnlich umstritten wie die Entstehung der Peroxisomen selbst (Rucktäschel et al, 2011). Studien in humanen Zellen zeigten, dass zwei verschiedene Importmechanismen für zwei PMP Typen koexistieren. Ein Großteil der PMPs gehört zum Typ der I-PMPs. Sie werden vom

Peroxin Pex19 an ihrem charakteristischen peroxisomalen Membran-Targeting-Signal (mPTS) gebunden und direkt zum Peroxisom transportiert.

Pex19 ist ein farnesyliertes Protein und zählt zusammen mit Pex3 und in einigen Organismen Pex16 zu den konservierten Peroxinen, die einerseits für die *de novo* Synthese der Peroxisomen und andererseits für den PMP Import essentiell sind. Die posttranslationale Farnesylierung beeinflusst die subzelluläre Pex19 Lokalisation nicht, ist aber für die Proteinstruktur und für die Funktion in der Peroxisomen-Biogenese wichtig (Eitzen et al, 1997; Ghaedi et al, 2000; Götte et al, 1998; Höhfeld et al, 1991; Honsho et al, 1998; Matsuzono et al, 1999; Rucktäschel et al, 2009). Pex19 ist überwiegend zytoplasmatisch, aber auch mit Peroxisomen assoziiert (Kammerer et al, 1997; Götte et al, 1998). Es interagiert über einen strukturierten globulären C-Terminus mit den PMP Targeting Signalen (mPTS) der meisten PMPs (Sacksteder et al, 2000; Snyder et al, 2000; Schueller et al, 2010). Der unstrukturierte Pex19 N-Terminus vermittelt die Interaktion mit dem PMP Pex3 und ist damit für den zielgerichteten PMP Cargo Transport zur peroxisomalen Membran verantwortlich (Shibata et al, 2004; Fransen et al, 2005; Matsuzono et al, 2006; Schueller et al, 2010; Rucktäschel et al, 2011).

Typ II-PMPs besitzen ein Targeting-Signal, das nicht mit Pex19 interagiert. Sie werden vorerst in die ER-Membran inseriert und dann, nach Abschnürung von Prä-Peroxisomenvesikeln zu reifen Peroxisomen transportiert. Alternativ können diese Prä-Peroxisomenvesikel durch Matrixproteinimport selber zu funktionellen Peroxisomen reifen (Jones et al, 2004). Aktuell werden beide Modelle für den PMP-Import analysiert und kontrovers diskutiert (Rucktäschel et al, 2011; Nuttall et al, 2011). Im Folgenden wird zum einen das direkte und zum anderen das ER-vermittelte PMP Transportmodell vorgestellt.

1.3.2.1 Direkter PMP-Import in Peroxisomen

Das Modell des direkten PMP-Imports beschreibt, dass die an freien Ribosomen translatierten Typ-I PMPs im Zytosol von Pex19 an ihrem spezifischen Signalpeptid (mPTS1) gebunden werden. Mit Hilfe der später dem peroxisomalen Lumen zugewandten mPTS1- und Pex19 Interaktionsdomäne wird das PMP zu einem Peroxisom transportiert. Hierbei übernimmt Pex19 eine Chaperon- und Targeting Rezeptorfunktion und hält die PMP-Konformation in einem importkompetenten Status (Rottensteiner et al, 2004; Pinto et al, 2006). An der peroxisomalen Membran interagiert dieser Pex19-PMP-Komplex mit dem Membranperoxin Pex3, welches in den

meisten Organismen (ausgenommen einige Hefen wie z.B. *S. cerevisiae*) wiederum mit Pex16 interagiert (Abb. 1.6). Pex19 bindet mit Hilfe seiner „Docking“-Domäne Pex19 direkt an das in die peroxisomale Membran inserierte Pex3 (Rottensteiner et al, 2004; Fang et al, 2004; Muntau et al, 2003). Nach Abgabe des PMPs in die Membran wird Pex19 recycelt und kann ein neues Cargo-PMP für ein erneutes Typ-I PMP Targeting im Zytosol binden.

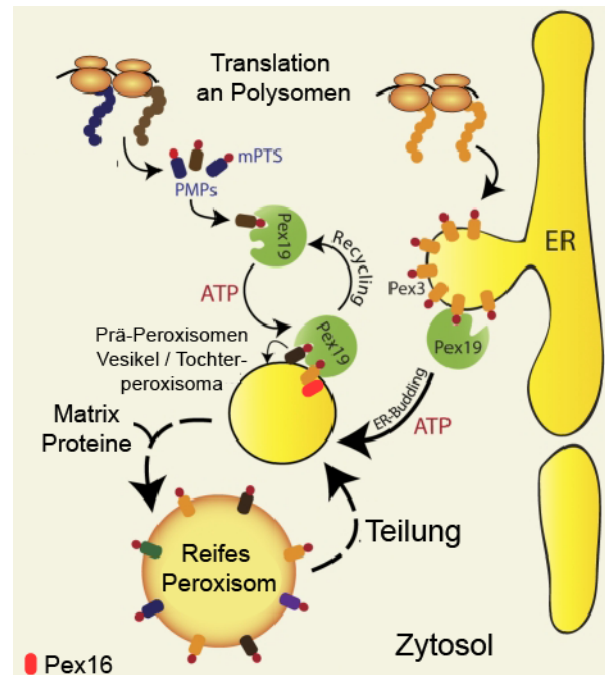


Abb. 1.6: Pex19 vermittelter PMP Transport (nach Ma et al, 2011). Eine essentielle Pex19 Funktion bei der Peroxisomen-Biogenese und dem PMP-Import ist unumstritten. Dennoch ist der Mechanismus nach wie vor nicht aufgeklärt. Zwei alternative Mechanismen werden für den Pex19 vermittelten PMP-Import diskutiert. Ein Mechanismus beschreibt die Pex19 Funktion in einer posttranslationalen Insertion von im Zytoplasma gebundenen PMPs in die Peroxisomenmembran. Hierbei dient Pex19 als Chaperon sowie Rezeptor und transportiert die PMPs zum Peroxisom. Dort interagiert Pex19 mit dem PMP Pex3, entlässt das Cargo-PMP und wird für eine erneute PMP-Bindung recycelt. In den meisten Organismen interagiert Pex3 in der peroxisomalen Membran mit Pex16. Das zweite Modell beschreibt die Pex19 Funktion in der Abschnürung von PMP haltigen Prä-Peroxisomenvesikeln, die ihren Ursprung im ER haben. Hierfür werden die PMPs Pex19 unabhängig in die ER Membran inseriert und anschließend über Pex19 vermittelte Vesikelabschnürung zu den Peroxisomen transportiert.

Für dieses Modell spricht die duale subzelluläre Pex19 Lokalisation im Zytosol und an den Peroxisomen und die Tatsache, dass Pex19 *in vitro* und *in vivo* PMPs bindet. Obwohl Pex16 in der Hefe *S. cerevisiae* nicht vorkommt, übernimmt es in anderen Hefen, Vertebraten und Invertebraten genauso wie Pex19 und Pex3 eine essentielle Rolle bei der Peroxisomen-Biogenese und dem Typ-I PMP-Import. Pex16 ist verantwortlich für die Pex3 Insertion in die ER- und Peroxisomen-Membran und bildet damit eine wichtige Voraussetzung für den Typ-I PMP-Import (Kim et al, 2006; Matsuzaki & Fujiki, 2008). Ist die Funktion einer dieser *PEX* Gene beeinträchtigt, findet

man keine peroxisomalen Strukturen. Die PMPs zeigen eine Fehllokalisierung im Cytosol oder in den Mitochondrien und werden degradiert (Hettema et al, 2000; Sacksteder et al, 2000; Ghaedi et al, 2000; South et al, 2000).

Das Modell des direkten posttranslationalen PMP-Imports war bis vor kurzem die am meisten verbreitete und akzeptierte Vorstellung, wird aber durch jüngste Publikationen in Frage gestellt (siehe Kapitel 1.3.2.2).

1.3.2.2 ER-vermittelter PMP-Import

Pex3, Pex16 und auch das am peroxisomalen Matrixproteinimport beteiligte Pex22 sind Vertreter der wenigen Typ II-PMPs. Sie besitzen Targetingsignale, die nicht mit Pex19 interagieren, und werden über das ER zum Peroxisom transportiert (Tam et al, 2005; Kragt et al, 2005; Mullen & Trelease, 2006). Dieser lange als Nebenzweig angesehene PMP-Import wurde in den letzten Jahren genauer beschrieben und wird nun zumindest in *S. cerevisiae* als bedeutende Route des PMP-Imports diskutiert. Sowohl Zand als auch Lam und Kollegen haben Hinweise für eine bis dato unbekannt neue Rolle von Pex3 und Pex19 bei der Entstehung von peroxisomalen PMP-beladenen Vesikeln aus dem Membransystem des ERs (van der Zand et al, 2010; Lam et al, 2010). Sie zeigen, dass neben den Typ-II auch Typ-I PMPs über das ER zu den Peroxisomen transportiert werden (Abb. 1.6). Da in Wildtyp, *pex3Δ* und *pex19Δ* Hefezellen einige PMPs in die ER-Membran inseriert und ER-vermittelt posttranslational modifiziert sind, beschreiben sie die Rolle von Pex3 und Pex19 nicht im direkten PMP-Import, sondern in der Separierung der PMPs von den sekretorischen Proteinen im ER und der Abschnürung von entstehenden Peroxisomen (van der Zand et al, 2010; Lam et al, 2010). Eine Konsensussequenz für den ER-Import von PMPs ist nicht bekannt. Nur für Pex15 konnte man eine Region, welche die Transmembrandomäne beinhaltet, als ER-Targetingdomäne identifizieren (Elgersma et al, 1997; Nuttall et al, 2011). In diesem Szenario bindet Pex19 an die mPTS der in die ER-Membran inserierten PMPs und bewirkt die Abschnürung PMP-haltiger prä-peroxisomaler Vesikel vom ER (Lam et al, 2010). Diese werden darauffolgend durch den Import von peroxisomalen Matrixenzymen zu reifen Peroxisomen (Ma et al, 2011). Weitere Hinweise für den PMP-Transport über Prä-Peroxisomenvesikel, die vom ER abgeschnürt werden, lieferten „pulse chase“ fluoreszenzmikroskopische Studien an peroxisomendefizienten *pex19* mutanten Hefezellen. Die Induktion der *de novo* Synthese von Peroxisomen durch *pex19* Transformation in *pex19* mutanten Zellen führte in der ER-Membran zur Bildung von Prä-Peroxisomenvesikeln, die durch

fluoreszenzmarkiertes Pex3, welches zuvor im ER lokalisierte, beobachtet werden konnten (Hoepfner et al, 2005). Nuttall und Kollegen diskutieren die Frage, ob alle PMPs über das ER und einen Abschnürungsprozess von Vesikeln zu den Peroxisomen gelangen, und wenn nicht, ob dieser PMP Transportweg simultan mit dem vorher beschriebenen Typ-I PMP-Transport abläuft. Sie spekulieren, dass der Ursprung des alternativen PMP-Transports in *S. cerevisiae* am Fehlen von Pex16 liegen könnte (Nuttall et al, 2011). In Anbetracht der beobachteten abweichenden PMP- und Peroxisomen-Biogenese-Kinetik wird diskutiert, ob der PMP-Transport vom ER zum Peroxisom in Wildtypzellen schneller als in den peroxisomendefizienten Mutanten funktioniert oder ob dies ein Hinweis für den direkten PMP-Import ist (Nuttall et al, 2011).

Abschließend bleibt festzustellen, dass der Ursprung von Peroxisomen, insbesondere in wildtypischen Zellen mit existierenden Peroxisomen, nicht abschließend geklärt ist. Außerdem ist die molekulare Funktion von Pex19 während der *de novo* Peroxisomensynthese und beim PMP-Import nicht eindeutig verstanden und daher im Fokus des wissenschaftlichen Interesses.

1.4 Peroxisomale Krankheiten

Obwohl Peroxisomen bereits vor über 60 Jahren erstmals identifiziert wurden (Rhodin, 1954), wurde erst 1973 von Dr. Sidney Goldfischer ein Zusammenhang zwischen Peroxisomen und einer als Zellweger-Syndrom bezeichneten Krankheit hergestellt (Goldfischer et al, 1973). Weitere 20 Jahre später konnte der erste *PEX*-Gendefekt identifiziert werden, der eine peroxisomale Krankheit verursacht (Shimozawa et al, 1992). Die *PEX* Gene kodieren für eine Gruppe von Proteinen, die an der Peroxisomen-Biogenese beteiligt sind (siehe Kapitel 1.3). Die essentielle Bedeutung von Peroxisomen für den Stoffwechsel zeigen neben dem Zellweger-Syndrom weitere autosomal rezessiv und X-chromosomal vererbte peroxisomale Krankheiten. Diese mit einer heterogenen Symptomatik einhergehenden Krankheiten werden anhand ihrer molekularen Ursache in zwei Hauptgruppen eingeteilt.

Die erste Gruppe ist durch eine Beeinträchtigung der Peroxisomen-Biogenese gekennzeichnet. Die daher auch als Peroxisomen-Biogenese-Krankheiten (PBDs, abgeleitet aus dem Englischen „peroxisomal biogenesis disorders“) bezeichneten Erkrankungen führen zu Defekten diverser peroxisomaler Funktionen. Patienten, die an

einer peroxisomalen Krankheit der zweiten Gruppe leiden, haben hingegen - bei funktionierender Biogenese der Peroxisomen - einen Gendefekt, der zu einem Funktionsverlust eines einzelnen peroxisomalen Enzyms führt. Der hervorgerufene Funktionsverlust eines einzelnen Enzyms kann bei diesen mit SED („single enzyme deficiency“, Defizienz eines einzigen Enzyms) abgekürzten Krankheiten z.B. die β -Oxidation der Fettsäuren, die Etherphospholipid-Biosynthese oder einen anderen in Kapitel 1.2 beschriebenen Stoffwechselweg beeinträchtigen.

Die X-chromosomal rezessiv vererbte Adrenoleukodystrophie (X-ALD) ist mit einer Prävalenz von 1:20.000 die häufigste SED (Moser et al, 2007). Die Patienten tragen Mutationen im *ABCD1* Gen. Das früher in Anlehnung an die Adrenoleukodystrophie *ALDP* genannte Gen kodiert für einen in die Peroxisomenmembran inserierten Fettsäuretransporter. Ein Anstieg von sehr langkettigen Fettsäuren in allen Körperflüssigkeiten und Geweben geht hiermit einer in früher Kindheit beginnenden Neuropathie in Form von Leukodystrophie und der Schädigung der Nebenniere einher (Thoms et al, 2009). Die Inzidenz einzelner peroxisomaler Krankheiten wird auf 1:20.000 bis 1:100.000 geschätzt (Lentze et al, 2007). In den folgenden Kapiteln werden Peroxisomen-Biogenese-Krankheiten und als Beispiel das Zellweger-Syndrom genauer beschrieben.

1.4.1 Peroxisomen-Biogenese-Krankheiten (PBDs)

Die PBDs gehören mit den vier Krankheiten Zellweger-Syndrom, neonatale Adrenoleukodystrophie (NALD), infantiler Morbus Refsum (IR) und der rhizomalen Chondrodysplasia punctata (RCDP) Typ I zu den schwersten peroxisomalen Krankheiten. Die genetisch heterogenen PBDs werden autosomal rezessiv vererbt. Aufgrund ähnlicher klinischer und biochemischer Befunde werden die ersten drei Krankheiten Zellweger-Syndrom, NALD und IR dem Zellweger-Syndrom-Spektrum (ZSS) zugeordnet (Krause et al, 2009).

Die klinischen Symptome des ZSS reichen von schwerwiegenden neurologischen Fehlfunktionen (Muskelhypotonie, Gedeihstörung, Krampfanfälle) über typische morphologische Anomalien (vergrößerte Fontanelle, breite Schädelnaht, hohe Stirn, Hypertelorismus, Missbildung der Außenohren) bis hin zu Hepatomegalie und Zystenbildung in der Niere (Steinberg et al, 2006; Krause et al, 2009). Die Lebenserwartung der an ZSS leidenden Patienten ist zum Teil sehr variabel. So sterben Zellweger-Syndrom Patienten meist innerhalb der ersten Monate nach der

Geburt (Wanders et al, 1993). NALD Patienten können bis zu 10 Jahre alt werden. Patienten, die an IR leiden, zeigen weniger stark ausgeprägte Symptome und können bis zu 30 Jahre alt werden (Krause et al, 2006). In allen unter ZSS leidenden Patienten akkumulieren die ausschließlich peroxisomal metabolisierbaren sehr langkettigen Fettsäuren. Obwohl der Gehalt an sehr langkettigen Fettsäuren im Blut, Urin und Geweben in ZSS Patienten variiert und daher nicht zu einer eindeutigen Diagnose führt, akkumulieren die sehr langkettigen Fettsäuren am stärksten in Zellweger-Syndrom Patienten, weniger stark in NALD und am geringsten in IR Patienten (Wanders & Waterham, 2006b). In allen ZSS Patienten ist ein Defekt in der Plasmalogensynthese diagnostizierbar (Krause et al, 2009).

Die RCDP Typ I Symptomatik grenzt sich durch charakteristische morphologische Anomalien, wie eine Verkürzung der proximalen Gliedmaßen, von dem ZSS ab. Außerdem zeigen Untersuchungen, dass in RCDP Patienten der Stoffwechsel der sehr langkettigen Fettsäuren funktioniert, die Plasmalogensynthese aber wie in den ZSS Patienten defekt ist. RCDP wird durch einen Defekt im *PEX7* Gen (siehe Kapitel 1.3) verursacht. Die Patienten sterben meist in der ersten Lebensdekade (White et al, 2003; Steinberg et al, 2006).

Obwohl 60 Prozent der PBD Patienten Mutationen im *PEX1* Genlocus tragen, gibt es eine steigende ZSS Patientenzahl mit Mutationen in anderen *PEX* Genen (Rosewich 2005, Steinberg 2004). Außerdem konnten Krause und Kollegen die Hypothese stützen, dass Variationen der klinischen und zellulären PBD-typischen Phänotypen durch Unterschiede in der Art und des Schweregrads einer *PEX* Mutation verursacht sein können (Krause et al, 2006; Gärtner, 2003). In einer jüngeren Studie an über 600 PBD Patienten konnte gezeigt werden, dass nahezu alle ZSS verursachenden *PEX* Gene bekannt sind. Mutationen in den folgenden 12 *PEX* Genen führen zu ZSS: *PEX1*, *PEX2*, *PEX3*, *PEX5*, *PEX6*, *PEX10*, *PEX12*, *PEX13*, *PEX14*, *PEX16*, *PEX19* und *PEX26* (Ebberink et al, 2011). Inklusiv des *PEX7* Gendefektes repräsentieren die 13 genannten *PEX* Gendefekte jeweils eine Komplementationsgruppe (Powers & Moser, 1998). Frühe Komplementationsstudien weisen darauf hin, dass ein Gendefekt in einem der ZSS verursachenden *PEX* Gene zu Zellweger-Syndrom, NALD oder IR führen kann (Steinberg et al, 2006). Die molekularen Ursachen für die unterschiedlich ausgeprägte Symptomatik trotz gleichen Gendefekts sind bis heute nicht abschließend geklärt. Im Folgenden wird als Beispiel einer PBD das Zellweger-Syndrom, die schwerste peroxisomale Krankheit beschrieben.

1.4.2 Zellweger-Syndrom

Das auch als cerebro-hepato-renale Syndrom bezeichnete Zellweger-Syndrom wurde 1964 erstmals von Hans Ulrich Zellweger beschrieben (BOWEN et al, 1964). Zellweger-Syndrom stellt den stärksten klinischen Phänotyp unter den PBDs dar und wird auch als PBD Prototyp bezeichnet (Moser et al, 1991). Gekennzeichnet durch das Fehlen von funktionellen Peroxisomen und dem daraus resultierenden Aktivitätsverlust peroxisomaler Enzyme verursacht das Zellweger-Syndrom in nahezu allen Organen Anomalien und Defekte (Abb. 1.7).



Abb. 1.7: Zellweger-Syndrom Patienten (nach Miller, 2003). In A sind die craniofacialen Fehlbildungen eines Zellweger-Syndrom Patienten gezeigt. In B ist ein weiterer Zellweger-Syndrom-Patient dargestellt. Schwere Hypotonie und multiple Dysmorphien sind zu erkennen. C und D zeigen Immunfluoreszenzaufnahmen von Fibroblasten eines Zellweger-Syndrom-Patienten (D) und einer Kontrollgruppe (C). Zur Identifizierung der Peroxisomen wurde ein anti-Katalase Antikörper verwendet. Abb. B-D nach (Fujiki, 2011).

Morphologische Anomalien der Zellweger-Syndrom Patienten reichen von craniofacialen Fehlbildungen wie einem charakteristischen Turmschädel mit hoher Stirn, vergrößerter Fontanelle und breiter Schädelnaht, Hypertelorismus, Epikanthus, einer tiefen und breiten Nasenwurzel und Deformationen des Außenohres bis zu pathologischen Veränderungen der Leber (Hepatomegalie) und Zystenbildung der Nieren (Abb. 1.7 A). Weitere Zellweger-Syndrom charakteristische Symptome sind Migrationsdefekte und Hypomyelinisierung von Neuronen in der Groß- und Kleinhirnrinde, die zu Blind- und Taubheit führen. Damit einhergehend sind Krampfanfälle, eine psychomotorischen Retardierung und Muskelhypotonie (Abb. 1.7 B). Innerhalb der ersten Monate nach der Geburt entwickeln, die oft als Frühgeburt geborenen Zellweger-Syndrom Patienten, degenerative Defekte wie eine starke Nebennierenrindeninsuffizienz, Leberzirrhose, Leydigzell-Degeneration im Interstitium des Hodens und neurodegenerative Defekte (Evrard et al, 1978; Wilson et al, 1986; Shimozawa, 2011; Krause et al, 2009).

Biochemisch führt das Fehlen der Peroxisomen (Abb. 1.7 C und D) und somit der Ausfall des peroxisomalen Metabolismus zu einer Konzentrationserhöhung der sehr langkettigen Fettsäuren, der verzweigt-kettigen Phytan- und Pristansäure und der Intermediate der Gallensäuresynthese. Im Gegensatz dazu ist die Konzentration des Plasmalogens verringert (Heymans et al, 1984; Wanders et al, 1988; Purdue & Lazarow, 2001).

Unter den 12 Genen der oben genannten ZSS Komplementationsgruppen können sämtliche Gendefekte zu dieser schwersten PBD führen. Jedoch können ausschließlich Mutationen in den für die peroxisomale Membransynthese verantwortlichen *PEX3*, *PEX16* und *PEX19* Genen zu einem kompletten Fehlen von peroxisomalen Strukturen führen. Alle weiteren ZSS verursachenden *PEX* Gendefekte führen zu einem Funktionsverlust des peroxisomalen Matrixproteinimports und somit zur Bildung von Geisterperoxisomen (siehe Kapitel 1.3, Shimozawa, 2011).

1.5 Zellweger-Syndrom-Tiermodelle

Zur *in vivo* Analyse der Peroxisomen-Biogenese und der Pathogenese von PBDs wie dem Zellweger-Syndrom wurden in den letzten Jahren unterschiedliche murine und *Drosophila* Tiermodelle generiert.

Durch konstitutiven und zum Teil konditionalen „knock out“ (KO) der *PEROXINE PEX2*, *PEX5* und *PEX13* konnten Mausmodelle für das Zellweger-Syndrom generiert werden. Da diese drei Peroxine am Import von peroxisomalen Matrixenzymen beteiligt sind, zeigen die Modelle mit Ausnahme der craniofacialen Dismorphien und der Zystenbildung in der Niere zwar einen Großteil der Zellweger-Syndrom Symptome (siehe Kapitel 1.4.2), peroxisomale Reste (Geisterperoxisomen) in Fibroblasten weisen aber auf eine funktionierende PMP-Biogenese hin. Neuronale Migrationsdefekte in den KO Modellen führen zu einer veränderten Verteilung kortikaler Neurone (Faust & Hatten, 1997; Baes et al, 1997; Maxwell et al, 2003). In *PEX5* KO Mäusen ist die Differenzierung von Neuronen verzögert und erhöhter apoptotischer Zelltod wird beobachtet (Baes et al, 1997). In *PEX5* und *PEX13* mutanten Mäusen wurden außerdem eine veränderte Mitochondrien- und glatte ER- (sER; s für smooth: glatt) Morphologie beobachtet (Baes et al, 1997; Maxwell et al, 2003). Ähnliche Anomalien findet man auch in Zellen von Zellweger-Syndrom Patienten (Goldfischer et al, 1973). Im Blutplasma und im Gewebe aller drei Mausmodelle sind die Konzentrationen der

sehr langkettigen Fettsäuren, wie für Zellweger-Syndrom beschrieben, erhöht und die Plasmalogenkonzentration erniedrigt (Faust & Hatten, 1997; Baes et al, 1997; Maxwell et al, 2003). Für die Untersuchung der gewebsspezifischen *PEX5*- und somit Peroxisomenfunktion wurden konditionale *PEX5* KO Mäuse generiert. In Abhängigkeit des *PEX5* KO Gewebes zeigten die Mäuse erhebliche Lebertumore oder Hodenatrophie mit Spermatogenesedefekten und einhergehender Sterilität (Dirkx et al, 2005; Huyghe et al, 2006). Murine Zellweger-Syndrom Modelle, in denen die Peroxisomen-Biogenese so beeinträchtigt ist, dass keine Peroxisomen und keine „peroxisomal ghosts“ gebildet werden, sind bisher nicht publiziert.

In den letzten zwei Jahren sind mit *pex1*, *pex2*, *pex3*, *pex10*, *pex12*, *pex13* und *pex16* Mutanten die ersten *Drosophila* Zellweger-Syndrom Modelle untersucht worden. Obwohl Mutationen in allen der genannten *PEX* Gene zu peroxisomalen Biogenesedefekten führen, unterscheiden sich die Modelle bezüglich ihrer Phänotypen zum Teil erheblich. So zeigen *pex1* Mutanten eine embryonale Entwicklungsverzögerung und schwere Anomalien des peripheren und zentralen Nervensystems, die aber nicht zur embryonalen Letalität führen. Die *pex1* mutanten Larven fressen wenig und sterben in L1 oder L2 (Mast et al, 2011). *Drosophila pex2*, *pex10* und *pex12* Mutanten erreichen hingegen das Adultstadium. Erhöhte Konzentrationen der sehr langkettigen Fettsäuren führen zu Spermatogenesedefekten und zur Sterilität der lebensfähigen Männchen. Die homozygoten Weibchen beider Fliegenmutanten zeigen keine Phänotypen (Chen et al, 2010).

Drosophila pex3 Nullmutanten haben keine Peroxisomen und sind larval letal. Maternal zygotische *pex16* Mutanten besitzen eine reduzierte Anzahl an Peroxisomen und zeigen erhöhte Konzentrationen der sehr langkettigen Fettsäuren. Darüber hinaus sind sie lebensfähig, haben allerdings eine reduzierte Lebenserwartung. Desweiteren sind *pex16* Mutanten steril und weisen Nervensystem- und Bewegungsdefekte auf (Nakayama et al, 2011).

1.6 Pex19 und Pex19 orthologe Proteine

Das erste beschriebene *PEX19* Gen wurde vor knapp 20 Jahren in humanen Zellen auf dem ersten Chromosom identifiziert und als Haushaltsgen (HK33) mit ubiquitärer Expression bezeichnet (Braun et al, 1994). Das N-terminale Ende des Pex19 Proteins interagiert mit dem peroxisomalen Membranprotein Pex3 und ist damit für eine

Assoziation von Pex19 an die Peroxisomen verantwortlich. Der aus drei antiparallel orientierten α -Helices aufgebaute C-Terminus interagiert mit den mPTS1 der Typ-I PMPs. Am Ende des C-Terminus besitzt das Pex19 Protein ein konserviertes Farnesylierungsmotiv, dass nach posttranslationaler Prenylierung die Interaktion mit der hydrophoben Peroxisomenmembran ermöglicht (Fransen et al, 2005; Schueller et al, 2010). Die Pex19 Funktionen sind in Kapitel 1.3 beschrieben.

Das auf dem zweiten Chromosom lokalisierte *PEX19* orthologe *Drosophila* Gen CG5325 kodiert für zwei vorhergesagte Transkripte (CG5325-RA: 1208 bp und CG5325-RB: 1274 bp; Abb. 4.1), die in zwei putative Proteine (CG5325-PA: 31 kDa und CG5325-PB 18 kDa) translatiert werden. Aufgrund der konservierten Aminosäuresequenz und der homologen Domänenstruktur kann man davon ausgehen, dass CG5325 für ein Pex19 orthologes Protein kodiert und wird daher als *Drosophila* Pex19 (dPex19) bezeichnet.

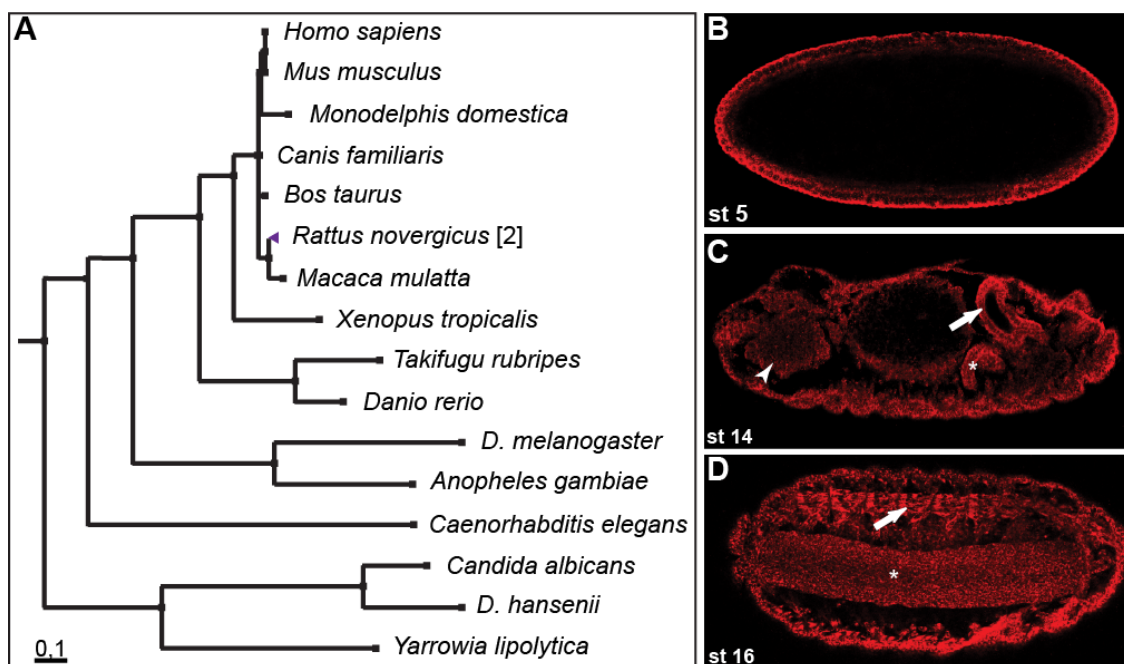


Abb. 1.8: dPex19 Orthologe und embryonale dPex19 Lokalisation (modifiziert nach Wingen, 2006). Der phylogenetische Stammbaum (<http://www.peroxisomedb.org>) in A zeigt die dPex19 Orthologen von der Hefe (*Y. lipolytica*) bis zum Menschen (*H. sapiens*). dPex19 Immunmarkierungen in *w* Embryonen zeigen eine zeitlich und räumlich ubiquitäre dPex19 Lokalisation (B-D) mit Anreicherung im Gehirn (Pfeilspitze in C), Hinterdarm (Pfeil in C), in den Malpighischen Gefäßen (Stern in C), den Muskeln (Pfeil in D) und dem ventralen Nervenstrang (Stern in D).

Stammbaumanalysen zeigen, dass es von der Hefe bis zum Menschen meist einzelne konservierte Pex19 Orthologe gibt (Abb. 1.8 A). Eine konservierte Funktion während der Peroxisomen-Biogenese ist bereits aus Hefe und Säugerzellkultur bekannt (siehe

Kapitel 1.3). Die Aminosäuresequenzhomologie zwischen dPex19 und dem humanen Pex19 wird mit einer Identität von 33 Prozent und einer Ähnlichkeit von über 50 Prozent beziffert (Wingen, 2006).

Die *dpex19* mRNA und das dPex19 Protein sind, wie *in situ* Hybridisierungen und Immunfluoreszenzfärbungen zeigen, während der Embryogenese räumlich und zeitlich ubiquitär exprimiert. Von der Zellularisierung im frühen Embryo bis ans Ende der Embryonalentwicklung ist dPex19 in allen Organen detektierbar. Angereichert ist das dPex19 Protein im ZNS, in den Muskeln, in den Malpighischen Gefäßen und im Hinterdarm. Subzellulär lokalisiert dPex19 in einem für Peroxisomen charakteristischen punktförmigen Muster mit partieller ER Kolokalisation (Wingen, 2006, Abb. 1.8 B-D).

1.7 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist die funktionelle Charakterisierung der dPex19 Funktion in *Drosophila*. Da humane *PEX19* Mutationen zu der schwersten PBD, dem Zellweger-Syndrom führen, bislang Pex19 allerdings vorwiegend in Hefe und Säugetier-Zellkultur untersucht wurde, soll hier ein *dpex19* mutantes *Drosophila* Tiermodell erzeugt werden. Die *dpex19* Mutanten sollen anschließend auf Peroxisomen-Biogenese-Defekte und Anomalien des peroxisomalen Metabolismus untersucht werden. Abschließend soll der Einfluss verschiedener Diäten auf putative Phänotypen der *dpex19* Mutanten Gegenstand dieser Arbeit sein.

Ein weiteres Ziel stellt die funktionelle Untersuchung der *Drosophila* Gene *wurst*, *clathrin* und *obst-A*, die an der Tracheenmorphogenese und -physiologie beteiligt sind dar. Hierzu sollen Ultrastrukturanalysen, biochemische Interaktionsstudien sowie Transkript- und Proteinexpressionsstudien durchgeführt werden.

2 Material

2.1 Allgemeine Materialien

2.1.1 Chemikalien

Soweit nicht anders angegeben, sind alle verwendeten Verbrauchskemikalien von der Qualität *pro analysis* und wurden von folgenden Firmen bezogen: La Roche, Promega, Merck, Roth, Invitrogen, Sigma-Aldrich, Bio-Rad, Stratagene, Qiagen, Machery-Nagel und Fermentas.

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

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

2.1.3 Geräte

Autoklav	H+P Varioklav Dampfsterilisator EP-2 H+P Varioklav Dampfsterilisator Typ25 T
Bakterienbrutschrank	Memmert Model 400
Binokular	Olympus S2X 12/Olympus SZ 40 Zeiss Stemi 2000/ Zeiss SteREO Discovery
Blotapparatur	Bio-Rad
Drehrad	Snijders test-tube-rotator
Elektropipette	Accu-Jet, Brand
Fotometer	PeqLab NanoDrop 2000
Gaschromatograf	Agilent Technology 5975C inert mit Triple Axis-Detector

	Agilent Technology 7890A CG System Agilent Technology 7683B Series Injector
Gel-Dokumentation	Biozym Alpha Digi Doc
Mikroskope	Olympus S2 40 Olympus SZX 12 Leica DM IRB (LSM) Zeiss LSM-710 Zeiss Libra 120 (TEM)
Mikrotom	Leica RM2255
Mikrowelle	Panasonic NN-E235M
PCR-Cycler	Bio-Rad C1000 Thermal Cycler Bio-Rad S1000 Thermal Cycler
pH-Messgerät	Mettler Toledo FiveEasy FE20
Pipetten	Eppendorf Research
Real-time PCR-Cycler	Bio-Rad Cycler mit optischer Einheit IQ5
Rotoren	Beckman Coulter AV-720 x P: JA-10 Beckman Coulter Optima LE-80 K Ultrazentrifuge: 70 Ti; SW55 Ti
Spannungsgerät	Bio-Rad Power Pac Basic: Agarosegelelektrophorese
Thermomixer	Eppendorf Thermomixer comfort
Thermoschüttler	Unitron HT Schüttler, Infors AG
Ultra-turrax	Ultra-Turrax T25 basic, IKA
Vakuumtrockner	Savant Speed-Vac SPD 111 V
Vortexer	Vortex Genie2
Waagen	Sartorius BL 1500 S Sartorius B211 D Kern & Sohn EW 4200-2NM
Wasserbad	Memmert VNB
Wirbelstrommischer	Vortex Genie 2, Scientific Industries
Zentrifugen	Avanti J-26 XP Allegra X 15R Beckmann Coulter AV-720

Eppendorf Centrifuge 5415 R
Eppendorf Centrifuge 5424 R
Heraeus Megafuge 1.0R
Beckman Coulter Optima LE-80 K UZ
(Ultrazentrifuge)

2.1.4 Software

Adobe Illustrator CS5
Adobe Photoshop CS5
Alpha Digi Doc
CellF Olympus
iQ5-Optical System Software Bio-Rad
Microsoft Office 2007
Zen Light 09 Zeiss

2.1.5 Standards und Kits

DIGoxygenin RNA Labeling Kit	Roche (Mannheim)
Nucleobond AX 100 Plasmid Midi Kit	Macherey-Nagel (Düren)
Nucleospin Extract II	Macherey-Nagel (Düren)
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen (Hilden)
Random Primed DNA Labeling Kit	Roche (Mannheim)
Vectashield	Vectorlabs
Gene Ruler DNA Ladder Mix	Fermentas, Heidelberg

2.2 Puffer und Lösungen

Falls nicht anders angegeben, wurden alle Puffer, Lösungen und Medien mit doppelt deionisiertem und autoklaviertem Wasser hergestellt. Bei Lösungen, die als konzentrierte Stammlösung angesetzt wurden, ist der Konzentrationsfaktor angegeben. Bei Lösungen, die nicht bei Raumtemperatur aufbewahrt wurden, ist die Lagertemperatur angegeben. Alle Prozentangaben sind in Masse pro Volumen angegeben.

Agarose	1-1,5% Agarose in TAE
Ampicillin-Lösung	50 µg/ml (-20 °C)
AP-Puffer	100mM NaCl; 50mM MgCl ₂ ; 10mM Tris, pH 9,5; 0,1% Tween 20; A. bidest.
BBS (10x, pH 6,95)	100mM Tris 550mM NaCl 400mM KCl 70mM MgCl ₂ 50mM CaCl ₂ 200mM D(+)-Glucose 500mM Saccharose (-20 C)
BBT	BBS (1x) 0,1% Rinderserumalbumin 0,1% Tween 20 (4 °C)
Chlorix 50%	äquivalent zu 2,5% Natriumhypochlorit-Lsg.
DAB-Stocklösung (5%)	500 mg DAB in 10 ml A. bidest (-20 °C)
DAB-Vorinkubationslösung (0,2%) (pH 7,2)	40 µl DAB-Stock 760 µl A. bidest 200 µl Teorell Stenhagen Puffer (0,05 M)
DAB-Inkubationslösung (pH 7,2)	40 µl DAB-Stock 755 µl A. bidest 200 µl Teorell Stenhagen Puffer (0,05 M) 5 µl H ₂ O ₂ (30%ig)
Denaturierungspuffer	1,5 M NaCl 0,5 M NaOH
Durcupan	7 Teile A/M 6 Teile B 2% Beschleuniger (2,4,6 Tris(dimethylaminomethyl)phenol)
DEPC behandeltes Wasser	0,1% DEPC (mind. 3h Inkubation bei 37°C)
DNA-Ladepuffer (5x)	0,1% Bromphenolblau 0,1% Xylen Cyanol FF 30% Glycerin
EDTA	0,5 M EDTA, pH 8,0
SYBR Safe	10 mg/ml (4 °C; lichtgeschützt)
Extraktionspuffer	10 mM Tris pH 8,2 1 mM EDTA pH 8,0 25 mM NaCl
Fixierungslösung	4% Paraformaldehyd in PBS (4 °C)
Karnovsky Fixans (50%)	160 µl 25%iges Glutaraldehyd 50 µl 10%iges Paraformaldehyd in PB 810 µl 0,1 M PB 1 ml Heptan
Lithiumchlorid	4 M LiCl (-20 °C)
Lysozym	10 mg/ml Lysozym in A. bidest

Natriumacetat pH 6,0 (bzw. 7,0)	3 M NaAc
Neutralisierungspuffer	1,5 M NaCl 0,5 M Tris pH 8
Nipagin-Lsg. 10% (4-Hydroxomethylbenzoesäure)	100 g Nipagin in 1 l 70% Ethanol
PB-Puffer (pH 7,2)	36 ml Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O (0,2 M) 14 ml NaH ₂ PO ₄ 2H ₂ O (0,2 M) 50 ml A.bidest
PBS 20x	2,6 M NaCl 140 mM Na ₂ HPO ₄ 60 mM NaH ₂ PO ₄ pH 7, autoklaviert
PBT	0,3% Triton X-100 in PBS
PBTN	5% Eseserum in PBT
Permeabilisierungslösung	0,2% Triton X-100 in PBS (4 °C)
TAE-Puffer (pH 8,0)	40 mM Tris-Acetat 1 mM EDTA
TE -Puffer	10 mM Tris-HCl pH 8,0 1 mM EDTA
TELT	50 mM Tris-HCl pH 8.0 62,5 mM EDTA 2.5 M LiCl 0,4 % Triton X-100
Teorell-Stenhagen Puffer (0,05 M; pH 10,5)	50 mM Phosphorsäure 75 mM Borsäure 35 mM Zitronensäure 345 mM NaOH

2.3 Enzyme und Puffer

Complete Protease-Inhibitoren	Roche (Mannheim)
DNase I	Roche (Mannheim)
Go Taq Polymerase	Promega (Madison, USA)
Go Taq Polymerase 5x Puffer	Promega (Madison, USA)
T4-Ligase	Roche (Mannheim)
Lysozym	Roth (Karlsruhe)
Proteinase K	Roth (Karlsruhe)
Restriktionsendonukleasen	New England BioLabs (Frankfurt am Main)
RNase A	Sigma Aldrich (Steinheim)

2.4 Antikörper

Die verwendeten Antikörper wurden von folgenden Firmen bezogen und in den angegebenen Konzentrationen eingesetzt.

2.4.1 Primärantikörper

Bezeichnung	Spezies	Hersteller	Konzentration
anti-dPex19 997	Kaninchen	Eurogentec	1:100
anti-FasciclinIII	Maus	DSHB	1:10
anti-Spectrin	Maus	DSHB	1:10
anti-GFP	Maus	Santa Cruz	1:500
anti-GFP	Huhn	Santa Cruz	1:500
anti-DIG	Schaf	Dianova	1:500
anti-Mega	Maus	PSL	1:10
anti-HA	Ratte	Roche	1:100

2.4.2 Sekundärantikörper

Bezeichnung	Herkunft	Hersteller	Konzentration
anti-Kaninchen ^{Cy3}	Esel	Dianova	1:100
anti-Maus ^{Alexa488}	Ziege	Molecular Probes	1:100
anti-Schaf ^{AP}	Esel	Santa Cruz	1:100
anti-Huhn ^{Alexa488}	Ziege	Molecular Probes	1:100
anti-Maus ^{Cy3}	Esel	Dianova	1:100
anti-Ratte ^{Cy3}	Esel	Dianova	1:200

2.5 Oligonukleotide

2.5.1 PCR Primer

Bezeichnung	5' – 3'-Sequenz	Hersteller
<i>fill_GE15012_up</i>	gtc taa gcc cta acc gaa act ga	Metabion (Berlin)
<i>fill_GE15012_down</i>	tgg gcg att gac tca cat g	Metabion (Berlin)
<i>genFillfwlong</i>	aac gta tgg cag acg caa gg	Invitrogen
<i>genFillrv</i>	cca tta gcg acc gcc gta t	Invitrogen
<i>genFillfwshort</i>	cag aga acc gac tga ccg aag	Invitrogen
Pry 2	ctt gcc gac ggg acc acc tta tgt tat t	Metabion (Berlin)
Plac1	cac cca agg ctc tgc tcc cac aat	Metabion (Berlin)
Pwht1	gta acg cta atc act ccg aac agg tca ca	Invitrogen
Pry4	caa tca tat cgc tgt ctc act ca	Invitrogen
Pry1	cct tag cat gtc cgt ggg gtt tga at	Invitrogen

2.5.2 qRT-PCR Primer

Bezeichnung	5' – 3'-Sequenz	Hersteller
dpex19 RT fw	cct tga gcg gcg aaa att c	Metabion (Berlin)
dpex19 RT rv	cca aac atg ctg gct atg tcg	Metabion (Berlin)
dpex3 RT fw	ggg tat cct act tta tag cag g	Invitrogen
dpex3 RT rv	tag aac acc agc atg ttt gac	Invitrogen
dpex5 RT fw	tct tta tca ctg ctt tgg ga	Invitrogen
dpex5 RT rv	cga gag gga atg att aca ctc	Invitrogen
cyp4AE1 RT fw	gcg tct tta tcc gcc tat tc	Invitrogen
cyp4AE1 RT rv	tgc cag aga agt acg acc ac	Invitrogen
ugt86di RT fw	cca aga tca tgg cat ttg tg	Invitrogen

ugt86di RT rv	taa tcc gct cga ttg ctt t	Invitrogen
sod2 RT fw	aga aca agc gaa ata acg ag	Invitrogen
sod2 RT rv	cta ata agg cta agt ccc ga	Invitrogen
rpr RT w	aga aca aag tga acg aac tc	Invitrogen
rpr RT rv	aca caa ctg gta gta ctc	Invitrogen
grim RT fw	ctg aaa cct cga gag aac	Invitrogen
grim RT rv	gaa aac gaa cga gga aac ttg	Invitrogen
4ebp RT fw	cat gca gca act gcc aaa tc	Invitrogen
4ebp RT rv	ccg aga gaa caa aca agg tgg	Invitrogen
srebp RT fw	cgc agt ttg tcg cct gat g	Invitrogen
srebp RT rv	cag act cct gtc caa gag ctg tt	Invitrogen
hmg-CoAredRTfw	ttg cgt caa tca ggt cca gtt	Invitrogen
hmg-CoAredRTrv	ttt tcc tgt tca acg tgc tct tc	Invitrogen
acCoA snthRTfw	aaa tcc cat gga ccg atg ac	Invitrogen
acCoA snthRTrv	tgt aga gca tga aca atg gat cct	Invitrogen
acCoA carbRTfw	gtg caa ctg ttg gca gat cag t	Invitrogen
acCoA carbRTrv	ttt ctg atg acg acg ctg gat	Invitrogen
lipase3 RT fw	tga gta cgg cag cta ctt ccc t	Invitrogen
lipase3 RT rv	tca act tgc gga cat cgc t	Invitrogen
gstd2 RT fw	caa gaa gcg tgc cgt gat c	Invitrogen
gstd2 RT rv	gag aca ttg gag tac tt	Invitrogen
abca1 RT fw	gac caa cac gag att atg aac g	Invitrogen
abca1 RT rv	tga agc agt cgt cga att tct c	Invitrogen
abcd2 RT fw	tta aga cat ata cac tcc cgc a	Invitrogen
abca2 RT rv	gca ttt cca cct tat gac ct	Invitrogen
cyp4g1 RT fw	tat att gtc cac tcc acc ga	Invitrogen

cyp4g1 RT rv	tcc aac gag aca ttg aat cc	Invitrogen
cyp6d5 RT fw	tgg aga caa gtt ggt gga c	Invitrogen
cyp6d5 RT rv	cgt ggc aat aat gtc gat gg	Invitrogen
nlaz RT fw	gtg gta gac acg aag tca t	Invitrogen
nlaz RT rv	atc gat act gtt cag aag aa	Invitrogen
npc2 RT fw	aca gca cgc caa tta gac aa	Invitrogen
npc2 RT rv	cgt cga ttt gca cca tca	Invitrogen
carnOoct RT fw	gat gat acg ctc aag aac ga	Invitrogen
carnOoct RT rv	cat aaa gtc ctt gcc gta gtc	Invitrogen
act5c fw	gtg cac cgc aag tgc ttc taa	Invitrogen
act5c fw	tgc tgc act cca aac ttc cac	Invitrogen
rpL32RTfw (rp49)	gct aag ctg tcg cac aaa tg	Invitrogen
rpL32RTrv (rp49)	gtt cga tcc gta acc gat gt	Invitrogen

2.6 Kultivierung von Fliegen

2.6.1 Verwendete Fliegenlinien

dpex19 Mutanten und *white*⁻

Bezeichnung	Genotyp	Herkunft
w ⁻	w ¹¹¹⁸ ; +; + (als Wildtyp verwendet)	Bloomington
GE15012/CyO	w ⁻ ; GE15012/ CyO; +	Aprogen (Korea)
GE15012/Twist GFP	w ⁻ ; GE15012/Twist GFP CyO; +	(Wingen, 2006)
GE15012/ GE15012	w ⁻ ; GE15012; +	Diese Arbeit
EY21383/CyO	w ⁻ ; EY21383/ CyO; +	Bloomington #22476
EY21383/Twist GFP	w ⁻ ; EY21383/Twist GFP CyO; +	Diese Arbeit

R111/R111	w ⁻ ; EY21383; +	Diese Arbeit
R127/R127	w ⁻ ; EY21383; +	Diese Arbeit
ΔEY	w ⁻ ; ΔEY21383/CyO; +	Diese Arbeit
dF7 od. dpex19 ^{ΔF7} / CyO	w ⁻ ; dpex19 ^{ΔF7} /CyO; +	Diese Arbeit
dpex19 ^{ΔF7} /CyO	w ⁻ ; dpex19 ^{ΔF7} /CyO; +	Diese Arbeit
dpex19 ^{ΔF7} /twiGFP ^{CyO}	w ⁻ ; dpex19 ^{ΔF7} /twiGFP CyO; +	Diese Arbeit
dpex19 ^{ΔF7} /CyO; UAS GFP.SKL 12	w ⁻ ; dpex19 ^{ΔF7} /CyO; UAS GFP.SKL	Diese Arbeit
dpex19 ^{ΔF7} /TwigGFP ^{CyO} ; UAS GFP.SKL 12	w ⁻ ; dpex19 ^{ΔF7} /TwigGFP ^{CyO} ; UAS GFP.SKL	Diese Arbeit
dpex19 ^{ΔF7} /TwigGFP ^{CyO} ; UAS dpex3HA	w ⁻ ; dpex19 ^{ΔF7} /TwigGFP ^{CyO} ; UAS dpex3HA	Diese Arbeit
dpex19 ^{ΔF7} FRT40A/CyO	w ⁻ ; dpex19 ^{ΔF7} FRT40A/CyO; +	Diese Arbeit
dpex19i	w ⁻ ; +; UASdpex19RNAi	VDRC (Wien)
UAS dpex19 Früher UAS fill3	w ⁻ ; +; UASdpex19	Behr (hier umbenannt von UAS fill3)
Df(2L) ^{esc-P3-0} /CyO	Df(2L) ^{esc-P3-0} /Cy[1] amos [Roi-1] <P>	Bloomington
Df(2L)/Twist GFP ^{CyO}	Df(2L) ^{esc-P3-0} / Twist GFP CyO; +/+; +/+	(Wingen, 2006)

Gal 4-Fliegenlinien

Bezeichnung	Genotyp	Herkunft
twi Gal4	w ⁻ ; twiGal4; +	Stammsammlung
da Gal4	w ⁻ ; da ^{G32} Gal4; +	Stammsammlung
ppl Gal4	w ⁻ ; +; pumplessGal4	Stammsammlung
elav Gal4	w ⁻ ; +; elavGal4	Stammsammlung
cg Gal4	w[1118]; P(w[+mC]=Cg-GAL4.A)2	Bloomington #7011

tub Gal4/twiGFP ^{CyO}	w ⁻ ; +; tubulinGal4/twiGFP CyO	Stammsammlung
OK107 Gal4	w[*]; P(w[+mW.hs]=GawB)ey[OK107]/In(4)ci[D], ci[D] pan[ciD] sv[spa-pol]	Bloomington #854
XB30 Gal4	w ⁻ ; +; XB30Gal4	Stammsammlung
AB Gal4	y[1] w[*]; P(w[+mW.hs]=GawB)AB1	Bloomington #1824
DJ646 Gal4	w[1118]; P(w[+mW.hs]=GawB)DJ646	Bloomington #1869
DJ626 Gal4	w[1118]; P(w[+mW.hs]=GawB)DJ626	Bloomington #8166
drm Gal4	w ⁻ ; P(w[+mC]=drm-GAL4.7.1)1.1/TM3, Sb[1]	Bloomington #7098
sli Gal4	w[*]; P(w[+mC]=GAL4-sli.S)3	Bloomington #9580
sgs Gal4	w[1118]; P(w[+mC]=Sgs3-GAL4.PD)TP1	Bloomington #6870
lsp2 Gal4	y[1] w[1118]; P(w[+mC]=Lsp2-GAL4.H)3	Bloomington #6357
31-1 Gal4	w[*]; P(w[+mW.hs]=GawB)(3)31-1[31-1]/TM6C, Sb[1] Tb[1]	Bloomington #5820
repo Gal4	w[1118]; P(w[+m*]=GAL4)repo/TM3, Sb[1]	Bloomington #7415
BO Gal4	w[*]; P(w[+mW.hs]=GawB)OK72	Bloomington #6486
c135 Gal4	w[1118]; P(w[+mW.hs]=GawB)c135	Bloomington #6978

dpex19 „Rescue“-Fliegenlinien

Bezeichnung	Genotyp	Herkunft
dF7_UASdpex19/CyO	w ⁻ ; dF7_UASdpex19/CyO; +	Diese Arbeit
dF7/CyO; pplGal4	w ⁻ ; dF7/CyO; pplGal4	Diese Arbeit
dF7/CyO; tubGal4/TM3 ^{Sb}	w ⁻ ; dF7/CyO; tubGal4/TM3 ^{Sb}	Diese Arbeit
dF7/CyO; XB30 Gal4	w ⁻ ; dF7/CyO; XB30Gal4	Diese Arbeit
dF7/CyO; OK107 Gal4	w ⁻ ; dF7/CyO; OK107 Gal4	Diese Arbeit
dF7/CyO; elavGal4	w ⁻ ; dF7/CyO; elavGal4	Diese Arbeit

dF7_cg Gal4/CyO;	w ⁻ ; dF7_cg Gal4/CyO; +	Diese Arbeit
dF7/CyO; AB Gal4	w ⁻ ; dF7/CyO; AB Gal4	Diese Arbeit
dF7/CyO; DJ646 Gal4	w ⁻ ; dF7/CyO; DJ646 Gal4	Diese Arbeit
dF7/CyO; DJ626 Gal4	w ⁻ ; dF7/CyO; DJ626 Gal4	Diese Arbeit
dF7/CyO; drm Gal4/ TM3 ^{Sb}	w ⁻ ; dF7/CyO; drm Gal4/ TM3 ^{Sb}	Diese Arbeit
dF7/CyO; sli Gal4	w ⁻ ; dF7/CyO; sli Gal4	Diese Arbeit
dF7/CyO; sgs Gal4	w ⁻ ; dF7/CyO; sgs Gal4	Diese Arbeit
dF7/CyO; lsp2 Gal4	w ⁻ ; dF7/CyO; lsp2 Gal4	Diese Arbeit
dF7/CyO; 31-1 Gal4/ TM6c ^{Sb}	w ⁻ ; dF7/CyO; 31-1 Gal4/ TM6c ^{Sb}	Diese Arbeit
dF7/CyO; repo Gal4	w ⁻ ; dF7/CyO; repo Gal4	Diese Arbeit
dF7/CyO; c135 Gal4	w ⁻ ; dF7/CyO; c135 Gal4	Diese Arbeit
dF7_BO Gal4/CyO	w ⁻ ; dF7_BO Gal4/CyO; +	Diese Arbeit

Sonstige Fliegenlinien

Bezeichnung	Genotyp	Herkunft
UAS GFP.SKL III	w[*]; P(w[+mC]=UAS-GFP.SKL)3	Bloomington #28882
UAS dpex3HA II	w ⁻ ; UAS dpex3HA; +	(Bujupi, 2011)
UAS dpex3HA III	w ⁻ ; +; UAS dpex3HA	(Bujupi, 2011)
Noc ^{Sco} FRT40A/CyO	w[*]; noc[Sco] P(neoFRT)40A/CyO	Bloomington #5759
Gla/twiGFP ^{CyO}	w ⁻ ; Cu(2LR) Gla, wg Gla-1/CyO, twiGal4, 2x UAS EGFP; +	Stammsammlung
wg/CyO; Δ2-3/TM6	wg[Sp-1]/CyO; ry[506] Sb[1] P(ry[+t7.2] =Delta2-3)99B/TM6	Bloomington #2535
Sco neoFRT40A/CyO	w[*]; sna[Sco] P(ry[+t7.2]=neoFRT)40A/CyO	Bloomington #5759

2.6.2 Fliegenfutter

Das Fliegenfutter besteht aus folgenden Komponenten: 80 g Fadenagar, 165 g Trockenhefe, 815 g Maismehl, 1 l Zuckerrübensirup und 200 ml 10%ige NIPAGIN-Lösung in 11 l

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

2.6.3 Apfelsaftagarplatten

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

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 DNA-Plasmidisolierung im analytischen Maßstab (Minipräparation)

3 ml Antibiotika-haltiges LB-Medium wurden mit einer *E. coli* Bakterienkolonie von einer LB-Antibiotika-Platte angeimpft und über Nacht (ü.N.) bei 37 °C in einem Schüttler inkubiert. Nach einer 1-minütigen Zentrifugation bei 16.000 UpM wurde der Überstand verworfen und das Bakterienpellet in 200 µl TELT und 20 µl Lysozym durch Vortexen resuspendiert. Zum Bakterienaufschluss wurde die Suspension 5 min bei RT und anschließend 5 min bei 97 °C inkubiert bevor sie 5-10 min auf Eis abgekühlt wurde. Zur Pelletierung der präzipitierten genomischen DNA sowie der Proteine wurde 20 min bei 13.200 UpM und 4 °C zentrifugiert, anschließend der Überstand mit der Plasmid-DNA abgenommen und mit 100 µl Isopropanol versetzt und gemischt. Die gefällte Plasmid-DNA wurde für 5 min bei 13.000 UpM und 4 °C pelletiert und der Überstand verworfen. Mit 500 µl 70 %igem Ethanol wurde das Pellet gewaschen und bei 13.000 UpM und 4 °C für 5 min zentrifugiert. Nach Abnahme des Ethanols und einer 10-minütigen Trocknungszeit wurde das Plasmid-DNA Pellet in 50 µl autoklaviertem TE-Puffer gelöst.

3.1.2 DNA-Plasmidisolierung im mittleren Maßstab (Midipräparation)

Mit Hilfe des Nucleobond AX 100 Kits (Macherey-Nagel) wurde die Isolierung von Plasmid-DNA im mittleren Maßstab vollzogen. 50 ml LB-Antibiotikum-Medium wurden mit einer vereinzelter Bakterienkolonie angeimpft und ü. N. bei 37 °C im Schüttler inkubiert. Die Bakterienkultur wurde am nächsten Tag in 50 ml Falcon-Zentrifugenröhrchen überführt, für 15 min bei 4 °C und 4.300 UpM pelletiert und nach Anleitung des Herstellers die DNA isoliert. Das Pellet wurde je nach Anwendung in 100 µl autoklaviertem VE- oder TE-Wasser gelöst. Nach photometrischer Konzentrationsbestimmung der DNA Menge wurde die Plasmid-DNA bei -20 °C im Gefrierschrank gelagert.

3.1.3 Transformation chemisch kompetenter *E. coli* Zellen

100 µl chemisch kompetente Zellen wurden auf Eis aufgetaut und mit 7 µl DNA versetzt. Der Ansatz wurde 30 min auf Eis inkubiert und dann 1 min einem Hitzeschock bei 42 °C ausgesetzt, bei dem sich die Poren der Bakterien öffnen und die Bakterien so zur DNA-Aufnahme befähigen. Das Reaktionsgefäß wurde dann sofort 2-3 min auf Eis gestellt. Anschließend wurde 250 µl LB-Medium hinzugegeben und 1 h auf dem Drehrad bei Raumtemperatur inkubiert. Die transformierten Bakterien wurden entsprechend des geeigneten Selektionssystems auf einer Agarplatte (Ampicillin, Chloramphenicol) ausplattiert und ü. N. bei 37 °C inkubiert. Gewachsene Kolonien enthalten den Vektor, da sie durch die vom Vektor vermittelte Resistenz auf dem Selektionsmedium wachsen können.

3.1.4 Natriumacetat-Präzipitation

Zur Fällung von DNA wurden 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 2,5 Volumen 100 %iges Ethanol zugegeben. Der Ansatz wurde gevortext und 30 min bei -20 °C gefällt. Es folgte eine 30 minütige Zentrifugation bei 13000 UpM bei 4°C. Nach Abnahme des Überstandes wurde das Pellet mit 70 %igem Ethanol gewaschen (10 min, 13000 UpM, 4°C). Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und das Pellet getrocknet (Speedvac 5 min, 37°C). Die getrocknete DNA wurde in dem gewünschten Volumen *A. bidest* resuspendiert.

3.1.5 Ligation

Durch Ligation kann man zwei DNA Moleküle wie z.B. einen linearisierten und dephosphorylierten Vektor und ein PCR DNA-Fragment durch eine Veresterung verbinden. Dabei entstehen ringförmige, fremd-DNA-haltige Plasmide, die an den Insertionsstellen nur über einen durchgehenden Einzelstrang miteinander verbunden sind. Die für die Ligrationsreaktion einzusetzende Menge an DNA-Fragmenten ist abhängig vom Größenverhältnis zwischen Vektor- und Passagier-DNA. In ein maximales Endvolumen des Ligrationsansatzes von 20 µl (optimal 15 µl) wurde 1 U der T4-Ligase zugegeben. Die Ligrationsreaktion wurde ü. N. bei 18 °C durchgeführt.

3.1.6 TOPO-Klonierung

Die TOPO-Klonierung ist eine effiziente Methode, bei der ein PCR-Amplifikat direkt in den Plasmidvektor inseriert wird. Die *Taq*-Polymerase besitzt eine terminale Transferase-Aktivität, die ein einzelnes dATP an das PCR-Produkt hängt. Gleichzeitig trägt der linearisierte pCRII-TOPO Vektor (TOPO TA Cloning Kit, Invitrogen) ein einzelnes überhängendes dTTP. Durch die an den linearisierten Vektor gebundene Topoisomerase I wird das PCR-Produkt effizient mit dem Plasmidvektor ligiert. Die TOPO Ligationsreaktion, die Transformation der Bakterien und das weitere Vorgehen wurden nach Herstellerangaben durchgeführt. Die weißen Kolonien enthalten vollständige Plasmid-DNA inklusive Insert, da durch die Insertion des PCR-Produktes das *lacZ*-Gen zerstört wurde und nicht mehr abgelesen werden kann. Einzelne weiße Kolonien wurden in 3 ml LB-Medium überführt und ü. N. bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die DNA via Mini Präparation extrahiert (siehe Kapitel 3.1.1).

3.1.7 Genomische DNA Präparation aus adulten Fliegen

3-5 männliche Fliegen wurden in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß in flüssigen Stickstoff überführt bevor sie mit 200 µl Lysispuffer und einem Pistill zerkleinert wurden. Nach Zugabe von weiteren 200 µl Lysispuffer wurde das Lysat weiter homogenisiert bis nur noch Kutikulareste ersichtlich waren. Nach 30 min Inkubation bei 65 °C wurden 230 µl 5 M KAc und 570 µl einer 6 M LiCl Lösung zugeben, auf Eis wurde das Lysat 10 min inkubiert und 15 min bei RT und 13.200 UpM zentrifugiert. In ein neues Eppendorf Röhrchen wurde 1 ml des Überstandes pipettiert, 600 µl Isopropanol zur Fällung der DNA hinzugegeben und für 15 min bei 13.200 UpM pelletiert. Nach dem Waschen des DNA Pellet mit 70 %igem Ethanol wurde es an der Luft getrocknet und in 50-100 µl *A. bideft* gelöst. So kann die genomische DNA bei -20 °C aufbewahrt werden. Zu beachten ist allerdings, dass mehrmaliges einfrieren und auftauen die DNA beschädigen kann und somit eine nachfolgende PCR erschwert.

3.1.8 Genomische DNA Präparation aus Einzelembryonen

Diese Methode eignet sich um aus einem *Drosophila* Embryo oder L1 Larve genomische DNA zu präparieren. Ein einzelner Embryo wurde mit einer Präpariernadel oder Mikropipettenspitze in ein mit 10 µl Extraktionspuffer gefülltes 0,5 ml Reaktionsgefäß überführt und am Gefäßrand zerdrückt. Der Extraktionspuffer wurde

vor der Benutzung mit 1 µl Proteinase K (20 mg/ml) pro 100 µl Puffer ergänzt. Da bei der Überführung in die Gefäße Embryonen verloren gehen können sollten mind. 3 Embryonen eines Genotyps in 3 Reaktionsgefäße transferiert werden. Unter dem Binokular wurde anhand von Geweberesten überprüft ob der Embryo überführt und zerdrückt wurde. Die Proben wurden 30 min auf 37 °C und anschließend 5 min auf 95 °C inkubiert. Mit 2 µl und 40 PCR Zyklen erlangt man genug PCR-Produkt um es auf einem Gel zu analysieren.

3.1.9 Photometrische Nukleinsäure Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung von DNA wurde mit Hilfe des NanoDrop 2000 nach Anleitung des Herstellers photometrisch ermittelt. Hierbei entspricht eine optische Dichte von 1.0 der DNA-Konzentration von 50 µg/ml.

3.1.10 Restriktion von DNA durch Endonukleasen

Um DNA zu linearisieren oder ein DNA-Fragment aus einem Vektor zu schneiden wurden 5 U Restriktionsendonukleasen (TypII) pro µg DNA verwendet. Die nur wenige Basenpaare lange palindromische Erkennungs- bzw. Schnittstellen-Sequenz ist für jede Restriktions-endonuklease spezifisch. 1 µg DNA bzw. 0,5 µg Plasmid DNA wurden mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen in einem Endvolumen von 30 µl ± 10 µl für etwa 2 Std. bei 37 °C inkubiert. Zu präparativen Zwecken wurde entsprechend mehr DNA verwendet und die Restriktionszeit auf 2-5 h erhöht. Der auf die verwendeten Enzyme abzustimmende Puffer wurde nach Herstellerangaben zum Endvolumen hinzugegeben.

3.1.11 Polymerase-Kettenreaktion zur Amplifizierung von DNA

Angewendet um kleine Mengen DNA *in vitro* zu vervielfältigen wird bei der Polymerasen-Kettenreaktion (PCR) vorerst die Matrizen-DNA denaturiert, so dass sich ausgewählte Oligonukleotide (Primer) an den antisense Strang des DNA-Fragments von Interesse komplementär anlagern können. Diese 5' bzw. 3' zu dem zu amplifizierenden Fragment liegenden Primer dienen als Erkennungssequenz für die hitzestabile *Taq*-Polymerase aus dem Bakterium *Thermus aquaticus*, die eine Transkription des Gens oder DNA-Abschnitts vollzieht. Die PCR besteht aus drei sich

wiederholenden Zyklen: Zuerst wurde die dsDNA bei 94 °C denaturiert. Diese generierten Einzelstränge dienen als Matrize zur Anlagerung der Oligonukleotide bei 50-70 °C (primer spezifisch) und zur anschließenden DNA Synthese bei 72 °C durch die *Taq*-Polymerase. Bei jedem neuen Durchlauf des Zyklus dient das zuvor synthetisierte DNA-Fragment als Matrize. Dies erklärt die exponentielle Amplifizierung des DNA-Bereichs von Interesse. Nach 30-40 Zyklen (anwendungsabhängig) schließt sich eine mehrminütige Elongationsphase bei 72 °C an, während dieser noch unvollständig synthetisierte DNA Fragmente fertig gestellt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde die PCR zur Verifizierung einer P-Element Insertion und Lokalisation im Genom einer mutanten Fliegenlinie bzw. zum Nachweis des induzierten Herausspringens des P-Elementes angewendet. Der PCR-Ansatz wurde wie folgt zusammengesetzt:

Reagenz	Menge
Matrizen-DNA	100 – 200 ng
5' Oligonukleotid	20 pm
3' Oligonukleotid	20 pm
5 x Green Go <i>Taq</i> -Puffer	10 µl
dNTP-Lösung (je 10 mM)	1 µl
Go- <i>Taq</i> Polymerase	0,25 µl
A. bidest (autoklaviert)	ad 50 µl

Phase	Temp.	Zeit
1. Initiale Denaturierung	94 °C	5 min
2. Denaturierung (zyklisch)	94 °C	45 Sek.
3. Primer Anlagerung (zyklisch)	52-58 °C	45 Sek.
4. Elongation (zyklisch)	72 °C	1-3 min
5. 2.-5. Phase 30-34 x wiederholen		
6. Terminale Elongation	72 °C	5-10 min
7. Kühlung	4 °C	dauerhaft

Zur Erhöhung der PCR Stringenz wurden Anlagerungstemperatur/-zeit der Primer, sowie die Anzahl der Zyklen variiert.

3.1.12 DNA-Gelelektrophorese

In unterschiedlich konzentrierten Agarosegelen (1-1,6 % Agarose in TAE-Puffer) wurden DNA-Fragmente ihrer Länge nach getrennt. Doppelsträngige, linearisierte DNA wandert pro Zeiteinheit umgekehrt proportional zum dekadischen Logarithmus ihres Molekulargewichtes. Daraus folgt, dass lange DNA-Fragmente langsamer durch die Poren der Agarose wandern als kurze Nukleinsäuremoleküle. Bedingt durch ein angelegtes elektrisches Feld wandert die durch Phosphatgruppen negativ geladene DNA Richtung Anode.

Die Agarose, die als Matrix der wandernden DNA je nach Konzentration einen mehr oder weniger großen Widerstand entgegensetzt, wurde durch Aufkochen in TAE Puffer gelöst und mit SYBR Safe bis zu einer Endkonzentration von 1 µl/ml ergänzt. SYBR Safe interkaliert ähnlich wie Ethidiumbromid in die DNA und fluoresziert bei Anregung unter UV-Licht, wodurch DNA sichtbar gemacht werden kann. Die leicht abgekühlte Agaroselösung wurde dann in eine Gelwanne gegossen, in welche ein Kamm gesteckt wird, der während des Auspolymerisierens der Agarose Geltaschen hinterlässt. In diese Taschen wurde später die DNA pipettiert.

Vorher wurde die Kammer mit dem Gel in eine Elektrophoresekammer gelegt, die bis zum Bedecken des Gels mit TAE-Puffer gefüllt ist. 1/10 Volumen Auftragspuffer, zum Beschweren der DNA, werden zu den DNA-Proben hinzugegeben bevor sie dann in die Taschen gefüllt wurden (im Green Go *Taq* Puffer ist DNA-Beschwerer enthalten). Die Elektrophorese wurde in einem Spannungsbereich von 70-130 Volt durchgeführt. Zur Abschätzung der Fragmentlänge wurde 10 µl Längenmarker (1 kb Ladder-Mix) mit aufgetrennt.

Die DNA wurde auf einem UV-Transilluminator bei 366 nm in Form eines Bandenmusters sichtbar gemacht. Das Gel mit dem Bandenmuster wurde zur Dokumentation mit Hilfe eines digitalen Fotoapparates fotografiert und dann über ein Bildbearbeitungsprogramm im Computer gespeichert.

3.1.13 Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die DNA-Bande von Interesse wurde unter dem UV-Licht (302 nm) einer Handlampe mit einem sauberen Skalpell aus dem Gel geschnitten und in ein 1,5 ml Eppendorf Röhrchen gegeben. Die weitere Aufreinigung erfolgte mit dem Nucleospin Extract II Kit (Machery-Nagel) und wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

3.1.14 DNA-Sequenzierung

Die über PCR amplifizierten genomischen DNA-Fragmente wurden zur Bestimmung der P-Element Lokalisation (inverse-PCR) und zur Bestimmung der P-Element Exzisionen in „Jump-out“ Mutanten von der Firma SeqLab sequenziert. Als Sequenzierprimer wurden die Primer verwendet, die an die entsprechende Vektorsequenz anlagern (inverse-PCR) bzw. die auch für die entsprechende PCR verwendet wurden. Die Vorbereitung der Proben inklusive das Einstellen der „Template“-Konzentration wurde nach Angaben von SeqLab durchgeführt.

3.1.15 RNA-Isolierung aus Embryonen, Larven und Puppen

Um RNA aus Embryonen, Larven oder Puppen zu isolieren wurden 50-100 Embryonen, 50 L1 Larven, 5-10 L3 Larven, 5-10 Puppen oder 5-10 adulte Fliegen in ein mit Ethanol gesäubertes Sieb gespült und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Tiere wurden dann in 600 µl RA1 Lysepuffer (NucleoSpin RNA II Kit, Machery-Nagel) inklusive 6 µl β-Mercaptoethanol mit einem Ultra Turrax 60 s bei maximaler Umdrehung homogenisiert. Nach Anleitung des NucleoSpin RNA II Kits von Machery-Nagel wurde die RNA-Isolierung durchgeführt. Die RNA kann so, nach photometrischer Konzentrationsbestimmung bei -80 °C gelagert werden.

3.1.16 cDNA-Synthese

Die cDNA wurde durch reverse Transkription aus isolierter RNA synthetisiert. Hierzu wurde das QuantiTect Reverse Transcription Kit der Firma Qiagen verwendet. Da abweichend zu den Herstellerangaben nur jeweils ein halber Ansatz verwendet wurde wird im Folgenden das Vorgehen beschrieben. Die möglicherweise mit DNA kontaminierte, aufgereinigte RNA wurde einem Verdau mit DNasen im „wipeout“ Puffer (7x) unterzogen. Hierzu wurden 2 µl „wipeout“ Puffer zu 1 µg Gesamt-RNA gegeben und bis auf 14 µl mit RNase freiem Wasser aufgefüllt. Nach einer Inkubation von 2 min bei 42 °C wurden die Proben auf Eis gestellt. Für jede neu isolierte RNA wurde im Folgenden eine Reaktion ohne Reverse Transkriptase (-RT-Kontrolle) und eine mit Reverser Transkriptase (RT-Reaktion) angesetzt. Mit der -RT-Kontrolle wurden die Proben auf eine mögliche gDNA Kontamination untersucht. Für beide Reaktionsansätze wurden jeweils 7 µl DNase behandelte RNA, 2 µl RT-Puffer (5x) und 0,5 µl Primer-Mix zusammen pipettiert. Zu der RT-Reaktion wurde 0,5 µl Reverse

Transkriptase hinzugegeben und zu der -RT-Reaktion lediglich 0,5 µl RNase freies Wasser. Die Reverse Transkription wurde für 30 min bei 42 °C, gefolgt von einer 3 minütigen Inkubation bei 95 °C, durchgeführt. Nach Auffüllen mit *A. bidest* auf 50 µl wurden die cDNA-Proben bei -20 °C gelagert oder sofort für eine darauffolgende qRT-PCR verwendet (siehe Kapitel 3.1.17).

3.1.17 Real-time PCR Analyse (qRT-PCR)

Zur Untersuchung des Transkriptlevels unterschiedlicher Markergene (siehe Material 2.5.2) wurde die aus Gesamt-RNA generierte cDNA als Matrize verwendet. Während der Amplifizierung via qRT-PCR wird in jedem Zyklus die bereits synthetisierte DNA Menge gemessen. Die Genexpressionsstudien wurden mittels iQ5-Optical System Software von BioRad analysiert.

Jede cDNA wurde in Triplikaten pro Primerpaar auf einer 96 „well“ Platte (Eppendorf) gemessen. Das Gesamtvolumen von 25 µl pro „well“ setzte sich aus Anteilen zweier Mastermixe zusammen. Zur Herstellung des Primer-Mastermixes wurde 1 µl Primer-Mix (jeder Primer 5 µM) mit 12,5 µl SYBR Green (QuantiTect SYBR Green PCR Kit, Qiagen) pro „well“ oder Reaktion vermischt. Der cDNA-Mastermix setzte sich pro „well“ aus 1 µl cDNA und 10,5 µl RNase freiem *A. bidest* zusammen. Zuerst wurden 11,5 µl des cDNA-Mastermixes in jedes „well“ vorgelegt und anschließend mit 13,5 µl des Primer-Mastermixes ergänzt. Dies wurde auch zur Kontrolle möglicher Verunreinigungen mit gDNA mit jeder -RT-Kontrolle mittels eines Primerpaares durchgeführt. Die Expression ist immer relativ zu den beiden Haushaltsgenen RpL32 (Rp49) und actin5C (siehe Material 2.5.2) angegeben. Das PCR-Programm wurde wie folgt durchgeführt bzw. angewendet:

Phase	Temperatur (°C)	Zeit (s)	Zyklen
Aktivierung d. Polymerase	95	300	1
Denaturierung d. DNA	95	30	40
Primer Anlagerung	59	30	
Elongation	72	30	
Schmelzkurve	55-95	30	81

3.1.18 Inverse PCR (Plasmid-Rescue)

Die inverse-PCR zur Lokalisationsbestimmung des EY21383 P-Elementes in den entsprechenden *dpex19* Mutanten wurde nach dem Protokoll von E. Jay Rehm durchgeführt (veröffentlicht unter <http://www.fruitfly.org/about/methods/inverse.pcr.html> des BDGP).

Nach Präparation (siehe Kapitel 3.1.7) wurde die genomischen DNA von *w* (Kontrolle) und EY21383 Mutanten mittels Sau3AI bzw. MSPI für 2,5 h bei 37 °C restringiert (siehe Kapitel 3.1.10). Anschließend wurden die Restriktionsansätze durch 20minütiges Erhitzen auf 65 °C inaktiviert und 10 µl davon auf ein 0,8 %iges Agarosegel zur Kontrolle des Verdauens aufgetragen. Weitere 10 µl der verdauten DNA wurden für 3 h bei RT mit Hilfe der Ligase ligiert, anschließend via Natriumacetat-Präzipitation gefällt und in 50 µl *A. bidest* gelöst. Als Primerkombinationen für die darauffolgende PCR wurden Pwht1 und Plac1 bzw. Pry4 und Pry1 verwendet (siehe Material 2.5.1).

Die amplifizierten DNA-Fragmente wurden über Gelelektrophorese (siehe Kapitel 3.1.12) aufgetrennt, im Anschluss aus dem Gel eluiert (siehe Kapitel 3.1.13) und in den TOPO Vektor kloniert (siehe Kapitel 3.1.6). Nach Kontrollrestriktionen (siehe Kapitel 3.1.10) und Retransformation (siehe Kapitel 3.1.3) wurden Midikulturen (siehe Kapitel 3.1.2) angeimpft und die aufgereinigte DNA sequenziert (siehe Kapitel 3.1.14).

3.2 Arbeiten mit *Drosophila melanogaster*

3.2.1 Fliegenhaltung

Zur Haltung und Vermehrung aller verwendeten *Drosophila* Fliegenlinien wurden Standardmethoden verwendet (Roberts, 1986). Die Fliegen wurden, wenn nicht anders beschrieben, zur Lagerung bei einer Temperatur von 18 °C und für Experimente bei 25 °C mit einem Tag-Nacht-Rhythmus von jeweils 12 h gehalten. Die Bestimmung der Embryonalstadien wurde nach Campos-Ortega und Hartenstein (Campos-Ortega & Hartenstein, 1985) durchgeführt. Das Umsetzen der Fliegen in frische Futterröhrchen wurde bei 18 °C alle 5-6 Wochen und bei 25 °C alle 3-4 Wochen durchgeführt.

3.2.2 Sammeln von Embryonen, Larven oder Puppen

Zum Sammeln von Embryonen wurden ca. 100 max. eine Woche alte Fliegen in Ablagekäfige überführt, welche einseitig mit einem Gitternetz versehen und auf der anderen Seite geöffnet sind. Die offene Seite wurde nachdem die Fliegen in den Käfig überführt wurden durch eine Apfelsaftagarplatte, auf welche etwas Trockenhefe als Futter gestreut wurde, verschlossen. Die Fliegen wurden maximal 14 Tage bei 25 °C in den Käfigen gehalten. Die Ablagezeit (die Zeit die eine Apfelsaftagarplatte als Ablagefläche diente) variierte je nach Experiment und dem gewünschten Alter der Embryonen, Larven oder Puppen. Die Embryonen wurden bis zur Fixierung (siehe Kapitel 3.2.3) auf 4 °C aufbewahrt und spätestens nach zwei Tagen fixiert.

3.2.3 Fixieren von Embryonen

Die Embryonen wurden von der Apfelsaftagarplatte gesammelt und in einem feinen Sieb mit *A. bidest* gewaschen. Zur Auflösung der Chorionhülle wurden die Embryonen in 2 ml 4 %iger Natriumhypochloridlösung für 2-3 min inkubiert. Nach Ablauf der 3 min wurden die Embryonen mit *A. bidest* gewaschen und in ein Glasszintillationsgefäß mit 5 ml n-Heptan überführt. Nach Zugabe von 5 ml 4 %igem Paraformaldehyd wurden die Embryonen 20 min in der Fixierlösung geschüttelt. Zur Entfernung der Vitellinmembran und zur Dehydrierung der Embryonen wurden diese nach Absaugen der unteren PFA-Phase (Embryonen sammeln sich an der Interphase) und Zugabe von 10 ml Methanol weitere 5 min geschüttelt. Durch zweimalige Zugabe von 5 ml Methanol und Abnahme des Überstandes wurden die Embryonen gewaschen und die abgeplatze Vitellinmembran entfernt. Die fertig fixierten und dehydrierten Embryonen können bei Bedarf mehrere Monate in Methanol oder Ethanol bei -20 °C gelagert werden. Alternativ kann dieses Protokoll anstelle von Methanol auch mit Ethanol durchgeführt werden.

3.2.4 Fluoreszenz-Antikörperfärbung an Embryonen

Zur Analyse der dPex19 Lokalisation in wildtypischen und mutanten Embryonen wurden Antikörperfärbungen durchgeführt. Alle Wasch- und Inkubationsschritte wurden bei RT auf dem Drehrad durchgeführt. Zuerst wurden die in Ethanol aufbewahrten Embryonen in einer Verdünnungsreihe rehydriert und dazu jeweils 5 min in folgenden Verdünnungen in BBT auf dem Drehrad inkubiert: 95 % Methanol, 60 % Methanol, 40

% Methanol, 20 % Methanol. Danach wurden die Embryonen 4 x 10 min in BBT gewaschen und dann für 30 min in BBTS blockiert. Dann wurden die Embryonen ü. N. bei 4 °C mit dem Primärantikörper in BBTS inkubiert und am nächsten Tag 4 x 10 min in BBT gewaschen um unspezifisch oder nicht gebundenen Primärantikörper zu entfernen. Darauf wurden die Embryonen 20 min mit BBTS blockiert und mit dem präabsorbierten Alexa-Fluor®-Sekundärantikörper-Konjugat in 200 µl BBTS für 1 h im Dunkeln inkubiert. Als nächstes wurden die Embryonen 6 x 10 min mit PBT gewaschen (abgedunkelt), der PBT Überstand möglichst ganz abgenommen, die Embryonen in 1-2 Tropfen Vectashield eingebettet und bei 4 °C ü. N. absinken gelassen. Am nächsten Tag wurden die Embryonen auf einen Objektträger gebracht und mit einem Deckgläschen eingedeckt. Mittels konfokaler Lasermikroskopie wurden die Embryonen analysiert.

3.2.5 Fixierung und Fluoreszenz-Antikörperfärbung an larvalen Geweben

Zur Analyse des dPex19-Expressionsmusters in WT und mutanten Larven wurden Antikörperfärbungen durchgeführt. Alle Wasch- und Inkubationsschritte wurden bei RT auf einer Wippe durchgeführt. Zuerst wurden die Larven mit zwei Pinzetten vorsichtig in PBS geöffnet. Hierzu wurden unter dem Binokular mit einer Pinzette die Mundhaken fixiert und mit der zweiten Pinzette die Larve in der Körpermitte festgehalten. Durch entgegengesetztes Ziehen der Pinzetten erhielt man einerseits anteriore Gewebe wie z. B. Gehirn, Speicheldrüsen mit assoziiertem Fettkörper sowie posteriore Gewebe wie den Darm inklusive der Malpighischen Gefäßen.

Nach dem Öffnen wurden beide Enden der Larven in Glasgefäße mit 4 %iger PFA-PBS Lösung überführt. Nach einstündiger Fixierung wurden die Gewebe für 3 x 20 min mit 2 ml PBT gewaschen und dann für 1 h zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen in PBTN inkubiert. Nur an den Epitopen, an die die Paratope des Antikörpers binden, ist die Affinität so groß, dass der Antikörper dort die blockierenden Serumproteine verdrängen kann. Nun wurden die Gewebe ü. N. oder über 24-72 h bei 4 °C mit dem Primärantikörper in PBT inkubiert und am nächsten Tag 4 x 20 min in PBT gewaschen um unspezifisch oder nicht gebundenen Primärantikörper zu entfernen. Anschließend wurden die Gewebe 20 min mit PBTN blockiert und mit Sekundärantikörpern in 200 µl PBT für 1 h im Dunkeln inkubiert. Als nächstes wurde 4 x 20 min mit PBT gewaschen (abgedunkelt), der PBT Überstand möglichst ganz abgenommen, die Gewebe in Fluoromount auf dem Objektträger unter dem Binokular

freipräpariert und eingedeckt. Die Präparate können so einige wenige Tage im Dunkeln bei 4 °C überdauern. Die Qualität der Färbung nimmt aber durch Ausbleichen der Fluorophore mit der Zeit ab. Die Larvenpräparate wurden mittels konfokaler Lasermikroskopie analysiert und aufgenommen.

3.2.6 Ektopische Expression mittels UAS-Gal4 System

Durch die Kreuzung von zwei transgenen Fliegenlinien, von denen die eine ein ins Genom inseriertes Gal4-Konstrukt (Induktorkonstrukt) und die andere ein UAS-Konstrukt mit einklonierter Transkriptionseinheit (Effektorkonstrukt) besitzt, kommt es in den Nachkommen zur ektopischen Expression der Transkriptionseinheit im Induktorkonstrukt Muster (Brand & Perrimon, 1993). Das Gal4-Induktorkonstrukt wird durch einen gewebsspezifischen Enhancer induziert und bewirkt die Gal4-Protein-Expression in dem Enhancer Muster. Dieses ektopisch exprimierte Gal4 bindet an Gal4-Bindungsstellen, die auch als „Upstream Activation Sequence“ (UAS) bezeichnet werden. Durch die Gal4-Bindung an UAS wird dann die Expression der Transkriptionseinheit des Effektorkonstrukts ebenfalls im Enhancer typischen Muster induziert. Da das UAS-Gal4 System aus der Hefe stammt ist die Induktion in *Drosophila* am effektivsten bei 25-28 °C. Noch höhere Temperaturen z.B. 37 °C (ideal für Hefen) sind zwar für die Induktion förderlich bewirken aber in *Drosophila* Letalität.

3.2.7 P-Element-Mutagenese

In *Drosophila* stellen P-Elemente die wichtigsten transposablen Elemente dar, die zur Mutagenese genutzt werden können. Genetisch modifizierte P-Elemente dienen in *Drosophila* als Transformationsvektoren (Rubin & Spradling, 1982, Spradling & Rubin, 1982). Um eine sich wiederholende Translokation des P-Elements im Genom zu verhindern, verwendet man zur Transformation oder Mutagenese von *Drosophila* zwei P-Elemente. Auf einem der beiden ist die Transposase kodiert. Diesem als Helferplasmid bezeichneten P-Element fehlen die zur Genominserion notwendigen „inverted repeats“. Dadurch wird die Weitergabe des Transposasegens an die Tochterzellen während der Zellteilung verhindert. Nur in der Zelle, in die das Helferplasmid transformiert wurde, wird das Transposasegen transkribiert, translatiert und damit aktiv. Die Transposase kann in dieser Zelle die Insertion des zweiten P-Elementes, welches die flankierenden „inverted repeats“ aber keine eigene

Transposasequelle besitzt, katalysieren. Ein zwischen den „inverted repeats“ lokalisiertes DNA-Fragment von Interesse (z.B. Gen, UAS RNAi-Konstrukt) und ein Markergen können so in das *Drosophila*-Genom inseriert werden. Um eine erwünschte Keimbahntransformation zu erhalten werden beide P-Elemente in das embryonale posteriore Polplasma im Stadium des syncytialen Blastoderms injiziert. Da sich aus dem posterioren Polplasma die Polzellen entwickeln und diese die Vorläufer der Keimbahnzellen sind soll die Transposase eine einmalige P-Element Insertion in der Keimzellbahn hervorrufen, die an die Nachkommen vererbt wird. Häufig dient der Augenmarker *white* als Marker für eine erfolgreich durchgeführte P-Element Mutagenese. Der *white* Marker bewirkt eine Rotfärbung der *Drosophila* Augen in einem genetischen Hintergrund (*white*⁻) der ohne erfolgreiche Keimbahntransformation Fliegen mit weißen Augen hervorbringt.

3.2.8 Rekombination zur Entfernung einer Mutation

Zur Entfernung der Letalität vermittelnden *dpex19* unabhängigen Mutation (+2.Mut.) der Fliegenlinie EY21383+2.Mut./CyO wurden Jungfrauen dieser Linie mit *white*⁻ Fliegen gekreuzt. In der F1-Generation wurden dann Jungfrauen mit dem Genotyp EY21383+2.Mut./+ (+ bedeutet Wildtyp-Chromosom) mit Männchen der „Balancer“-Fliegenlinie Tft/CyO gekreuzt. Da in Männchen des Genotyps EY21383+2.Mut./+ kein „Balancer“-Chromosom eine mögliche Rekombination zwischen den beiden Chromosomen verhindert, kann bei der Keimzellbildung die ungewünschte Mutation segregieren. Die Nachkommen dieser Kreuzung mit CyO und roten Augen, die entweder den Genotyp EY21383+2.Mut./CyO oder den Genotyp EY21383/CyO aufweisen, wurden in Einzelkreuzungen gegen den ursprünglichen EY21383 Fliegenstock (EY21383+2.Mut./CyO) mit der letalen Mutation weiter gekreuzt. Nur die Männchen, welche nach dieser Kreuzung Nachkommen hervorbringen, die kein CyO tragen haben die Letalität vermittelnde Mutation verloren. Nach fünf Tagen Befruchtungszeit wurden die einzelnen Männchen nochmal einzeln mit Jungfrauen der „Balancer“-Fliegenlinie *Gla/twiGFP^{CyO}* gekreuzt um stabile Fliegenstämme mit dem Genotyp EY21383/EY21383 zu etablieren. Damit man die Männchen weiterhin zuordnen konnte, wurde eine einheitliche Beschriftung verwendet.

3.2.9 Transposase vermittelte P-Element Exzision

Um eine *dpex19* Nullmutante zu generieren wurde das P-Element der homozygot lebensfähigen Linie *EY21383*, die zuvor von einer letalen *dpex19* unabhängigen Mutation gereinigt wurde (siehe Kapitel 3.2.8), durch das Einkreuzen eines „jump starter chromosoms“ mobilisiert. Die eingekreuzte Transposasequelle bewirkt die Mobilisierung des P-Elements aus dem Insertionsort. In wenigen Fällen entsteht ein unpräzises Ausschneiden des P-Elements, was Deletionen der flankierenden genomischen Region zur Folge haben kann (Robertson et al, 1988). Die hierfür verwendete „jump starter“-Linie trägt das Transposasegen auf dem dritten Chromosom und hat den Genotyp $wg[Sp-1]/CyO; Sb \Delta 2-3/TM6$. Jungfrauen dieser Linie wurden mit homozygoten *EY21383* Männchen gekreuzt und die männlichen Nachkommen der F1-Generation mit den Markern rote Augen (Mosaik), *CyO* und *Sb* gesammelt. Die gesammelten Männchen mit dem Genotyp *EY21383/CyO; Sb $\Delta 2-3/+$* wurden dann mit Jungfrauen der „Balancer“-Fliegenlinie *Tft/CyO* gekreuzt. In der F2-Generation wurden weißäugige *CyO* Männchen, die wahrscheinlich kein P-Element mehr besitzen, gesammelt. Diese Männchen des Genotyps $\Delta EY21383/CyO; +/+$ wurden dann in ca. 320 Einzelkreuzungen mit Jungfrauen der Linie *Tft/CyO* gekreuzt. Zum Schluss wurden die weißäugigen *CyO* Nachkommen ohne *Tft* mit dem Genotyp $\Delta EY21383/CyO; +/+$ untereinander gekreuzt. Produzieren die Kreuzungen weißäugige, lebensfähige Fliegen ohne *CyO* kann man davon ausgehen, dass das P-Element präzise aus dem Genom geschnitten wurde und ein wildtypischer *dpex19* Locus vorliegt. Man spricht dann von Revertanten mit dem Genotyp $\Delta EY21383/\Delta EY21383$ (siehe Anhang 7.5 und 7.8). Besitzen hingegen alle Nachkommen einer Kreuzung Fliegen mit *CyO*, ist eine unpräzise P-Element Exzision wahrscheinlich und kann damit zu einer Deletion im *dpex19* Locus geführt haben. Eine erste Verifizierung möglicher *dpex19* Deletions-Fliegenlinien wurde mittels Komplementationstest durchgeführt (siehe Kapitel 3.2.10).

3.2.10 Komplementationstest

Komplementationstests wurden durchgeführt um zu überprüfen ob die während der P-Element Exzision generierten $\Delta EY21383$ Fliegenlinien aufgrund einer Mutation im *dpex19* Genlocus letal sind. Hierfür wurden die homozygot letalen $\Delta EY21383/CyO$ Fliegen mit der Defizienz-Fliegenlinie (*Df(2L)^{esc-P3-0}/CyO*) gekreuzt. Diese Fliegen besitzen eine Deletion auf dem zweiten Chromosom, die unter anderem das *dpex19* Gen beinhaltet. Tragen alle Nachkommen den Marker *CyO* kann man davon ausgehen, dass die Letalität vermittelnde Mutation der $\Delta EY21383/CyO$ Fliegenlinie in dem

genomischen Bereich liegt, der von der Defizienz $Df(2L)^{esc-P3-0}$ abgedeckt wird. Daraus folgt, dass die Mutation der letalen $\Delta EY21383/CyO$ Fliegen im *dpex19* Genlocus liegen kann. Nachkommen ohne CyO müssen den Genotyp $\Delta EY21383/Df(2L)^{esc-P3-0}$ haben. Daraus folgt, dass die Letalität vermittelnde Mutation dieser $\Delta EY21383/CyO$ Fliegenlinien nicht durch eine *dpex19* Mutation hervorgerufen werden konnte.

3.2.11 Generierung maternaler Nullmutanten

Um mutante Keimbahnklone mit der *dpex19*^{ΔF7} Deletion zu erhalten und damit neben der zygotischen auch die maternale Komponente des *dpex19* Gens zu deletieren, wurde zunächst das *dpex19*^{ΔF7} Allel auf ein FRT-Chromosom rekombiniert. Hierzu wurden *dpex19*^{ΔF7}/CyO Jungfrauen mit Männchen der Linie *sna*^{ScO} (neoFRT)40A/CyO gekreuzt. Die gesammelten Jungfrauen ohne CyO des Genotyps *dpex19*^{ΔF7}/*sna*^{ScO} (neoFRT)40A, in denen eine Rekombination aufgrund des fehlenden „Balancer“-Chromosoms stattfinden kann, wurden dann mit Männchen der „Balancer“-Fliegenlinie Tft/CyO gekreuzt. Diese Kreuzung wurde auf Fliegenfutter mit Neomycin (final 0,5 mg/ml) angesetzt, damit nur Fliegen überleben die das FRT40A tragen. Um stabile Fliegenlinien zu etablieren, die FRT40A und *dpex19*^{ΔF7} auf dem zweiten Chromosom tragen wurden die überlebenden Nachkommen ohne Tft, allerdings mit CyO und Neomycinresistenz einzeln mit Tft/CyO Fliegen gekreuzt. Sie wurden mit *dpex19*^{ΔF7}FRT40A/CyO (siehe Material 2.7.1.1) bezeichnet (Chou & Perrimon, 1992).

Bevor die generierte stabile *dpex19*^{ΔF7}FRT40A/CyO Fliegenlinie zur Generierung von Keimbahnklonen verwendet werden konnte, wurden Fliegen die für eine durch Hitzeshock induzierbare Flippase kodieren (*hsFlp/hsFlp; noc*^{ScO}/CyO) mit Fliegen des Genotyps *ovoD FRT40A/CyO* gekreuzt. Hieraus resultierende Männchen mit dem Genotyp *hsFlp/y; ovoD FRT40A/CyO* (*noc*^{ScO} negativ) wurden anschließend mit Jungfrauen der Linie *dpex19*^{ΔF7}FRT40A/CyO gekreuzt. Die ca. 12 h, 36h und 60 h alten Larven, die als Nachkommen dieser Kreuzung schlüpften, wurden in den Fliegenröhrchen zur Induktion der Flippase Genaktivität einem 2 stündigen Hitzeshock im Wasserbad unterzogen. Adulte Jungfrauen dieser Kreuzung mit dem Genotyp *ovoD FRT40A/dpex19*^{ΔF7}FRT40A wurden anschließend mit Männchen der Fliegenlinie *dpex19*^{ΔF7}/*TwigFP*^{CyO} gekreuzt. Alle produzierten Nachkommen exprimieren keine maternale *dpex19* Komponente und zusätzlich ist in allen GFP negativen Tieren auch die zygotische *dpex19* Komponente deletiert. Einige *hsFlp/y; ovoD FRT40A/CyO* Männchen wurden zur *ovoD* Kontrolle gegen *white*⁻ Jungfrauen gekreuzt. Die

Jungfrauen der Nachkommen ohne CyO wurden dann auf eine verhinderte Eiablage untersucht.

3.2.12 Negativer Geotaxis-Versuch

Mit Hilfe eines negativen Geotaxis-Versuchs wurde die Klettergeschwindigkeit von adulten Fliegen bestimmt. Bei diesem Versuch wurden pro Genotyp 5 Fliegen getestet. Jede Fliege wurde bei drei Kletterversuchen beobachtet. Hierzu wurde jeweils eine Fliege in einen 100 ml Messzylinder aus Kunststoff überführt und das Gefäß mit einem Wattestopfen abgedichtet. Hierbei wurde darauf geachtet, dass in einem gegebenen Zylinder immer nur Männchen und in einem weiteren Zylinder die Weibchen beobachtet wurden. Eine Lichtquelle wurde zur Beleuchtung des oberen Zylinderbereiches ausgerichtet. Der verschlossene Zylinder inklusive einer Versuchsflye wurde so auf den Tisch geklopft, dass die Fliege auf den Boden fällt. Dann wurde die Zeit gemessen, die die Fliege benötigte um die 100 ml Marke zu erreichen. Aus der gemessenen Zeit und der vorgegebenen Testdistanz wurde dann die Geschwindigkeit in mm/s errechnet. Die drei Kletterversuche jeder Fliege wurden gemittelt. Anschließend wurden die 5 gemittelten Werte von Fliegen des gleichen Genotyps erneut gemittelt und in einem Balkendiagramm aufgetragen. Dabei wurden Männchen und Weibchen getrennt dargestellt.

3.2.13 Versuch zur Bestimmung der Flugfähigkeit

Um die Flugfähigkeit von Mutanten und Kontrollfliegen zu quantifizieren, wurde ein 1 l Messzylinder mit Paraffin beschichtet und in 7 gleich große Zonen unterteilt. Pro Versuch wurden zwischen 15 und 30 Fliegen in den Messzylinder geklopft. Entsprechend ihrer Flugfähigkeit bleiben die Fliegen in bestimmten Zonen des Messzylinders kleben. Zeigen die Fliegen ein wildtypisches Flugverhalten bleiben sie in den oberen Zonen kleben. Weisen die Fliegen Flugdefizite auf, findet man sie in den unteren Zonen, bzw. auf dem Zylinderboden. Der Versuch wurde wie von Nakayama und Kollegen beschrieben durchgeführt (Nakayama et al, 2011).

3.2.14 Fütterungsexperimente

Zur Modulation des Phänotyps von *dpex19* Mutanten wurden wildtypische und homozygote *dpex19* Mutanten mit verschiedenen Diäten gefüttert. Ein erster Versuch durch Zugabe von freien Fettsäuren zu Fliegenstandardfutter (Jazz-Mix) den Phänotyp zu beeinflussen wurde nach den Angaben von Chen und Kollegen durchgeführt (Chen et al, 2010). Hierzu wurden Futterlösungen hergestellt, die eine finale Konzentration von 0,25 % bzw. 2,5 % der jeweiligen Fettsäure enthielten. Verwendet wurden Palmitinsäure (C16:0), Ölsäure (C18:1), Behensäure (C22:0) und Lignocerinsäure (C24:0).

Für einen weiteren Versuch wurden Nahrungsfette wie Butter (Deutsche Markenbutter, Gut und Günstig), Olivenöl (Bertolli extra vergine) und Kokosnussöl (nativ Bio Planete) in Hefepaste gerührt. Fettkonzentrationen im Hefefutter von 2,5 % bis 20 % wurden getestet. Die angerührte Hefe wurde auf eine Apfelsaftagarplatte gegeben und 40-50 L1 Larven (Startpopulation) eines Genotyps damit gefüttert. Nach 5, 6 und 8 Tagen auf 25 °C und einem 12 h Tag-Nacht Rhythmus wurden die verpuppten Tiere gezählt. Als prozentualer Anteil der Startpopulation wurde die Puppenanzahl in einem Balkendiagramm dargestellt. Nach weiteren 5, 6 und 8 Tagen wurde die Anzahl geschlüpfter Fliegen bestimmt und so wie oben beschrieben als prozentualer Wert der L1 Startpopulation grafisch dargestellt. Um zu zeigen, dass die Larven beider Genotypen (*w* und *dpex19^{ΔF7}* Mutanten) das Futter fressen und dieses auch den Körper passiert wurde das Futter in einem Experiment mit Carminrot angefärbt. Auf den Platten wurden nur homozygote Tiere gehalten um die Konkurrenz mit heterozygoten Tieren zu vermeiden.

In einem weiteren, ähnlich aufgebauten Versuch wurden Triacylglyceride (TAG) in einer Endkonzentration von 2,5 % bis 5 % in Hefepaste gemischt und den Larven verabreicht. Verwendet wurden hierfür die TAGs Glycerin-tricaprylat (C8:0) und Glycerin-tridodecanoat (C12:0). Eine Imitation der TAG Zusammensetzung von Kokosnussöl wurde durch Mischung von verschiedenen TAGs erzielt (siehe Anhang 7.10). Hierzu wurden folgende TAGs in Hefepaste gemischt:

TAG	Endkonzentration in %
Glycerin tricaprylat (C8:0)	6
Glycerin tridecanoat (C10:0)	6
Glycerin tridodecanoat (C12:0)	45
Glycerin trimyrstat (C14:0)	20

Glycerin tripalmitat (C16:0)	10
Glycerin tristearat (C18:0)	4
Glycerin trioleat (C18:1)	7
Glycerin trilinoleat (18:2)	2

Alle verwendeten Fettsäuren und TAGs wurden von der Firma Sigma-Aldrich bezogen.

3.2.15 Histologische Analyse von *Drosophila* Gehirnen

Die Semidünnschnitte von adulten *Drosophila* Gehirnen wurden unter Berücksichtigung einiger Modifikationen wie von Tepass und Hartenstein beschrieben angefertigt (Tepass & Hartenstein, 1994). Hierzu wurden Fliegenköpfe in 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,4) inklusive 25 % Glutaraldehyd fixiert. Anschließend wurden die Köpfe in 1 % Osmiumtetroxid- und 2 % Glutaraldehyd fixiert und kontrastiert. Nach einer weiteren Kontrastierung mit 2 % Osmiumtetroxid wurden die Präparate dehydriert und die Köpfe in Araldite eingebettet. Mittels eines Mikrotoms wurden die Köpfe in Semidünnschnitte der Dicke 2,5 µm geschnitten. Nach einer Toluidin Färbung wurden die Schnitte lichtmikroskopisch aufgenommen und mit Adobe Photoshop bearbeitet.

3.3 Gaschromatografie / Massenspektrometrie (GC/MS)

Zur Analyse des Fettsäureprofils von wildtypischen und homozygoten *dpex19^{ΔF7}* Mutanten wurden jeweils 3 x 100 Puppen gesammelt, die als Nachkommen von maximal sieben Tage alten Eltern auf Jazz-Mix Instantfutter (Fisher Scientific) herangewachsen waren. Sowohl die wildtypischen als auch die *dpex19^{ΔF7}* mutanten Puppen wurden nach Berücksichtigung der Entwicklungsverzögerung der Mutanten 12-24 h nach Verpuppung gesammelt und deren Masse durch Wiegen bestimmt.

Die Puppen wurden in 2 ml Reaktionsgefäßen mit Hilfe von kleinen Plastikugeln (Peqlab) in 1 ml 1 N methanolischer Salzsäure (MeHCl) homogenisiert. Hierzu wurden die Reaktionsgefäße 2 x im „Precellys 24“ der Firma Peqlab bei 4 °C für 20 s und 6500 Upm geschüttelt. Der gesamte Inhalt wurde anschließend quantitativ in Glasröhrchen überführt. Nach dem Dekantieren wurden die 2 ml Reaktionsgefäße noch 2 x mit 500 µl 1 N MeHCl gefüllt, kurz zentrifugiert und der gesamte Inhalt in das entsprechende Glasröhrchen überführt. Die Glasröhrchen wurden mit einem Schraubverschluss (inklusive frischer Kunststoffdichtung) verschlossen. Zwei zusätzliche Glasgefäße mit 2

m MeHCl mit Deckel wurden für die Standards präpariert. Als Standard für die Quantifizierung der mittelkettigen- und langkettigen Fettsäuren wurde Pentadecansäure (C15:0) verwendet. Heptacosansäure (C27:0) wurde für die Messung der sehr langkettigen Fettsäuren eingesetzt. Nach Zugabe der Standards wurden die Proben vorsichtig geschüttelt und anschließend zur Bildung von Methylestern für 45 min in einem 80 °C heißen Wasserbad inkubiert. Nach einer mindestens einstündigen Abkühlzeit bei RT wurde 2 ml Hexan und 2 ml 0,9 % NaCl-Lösung zu jeder Probe hinzugegeben. Die Methylester lösen und sammeln sich in der Hexanphase. Bei einer darauf folgenden Zentrifugation bei 3200 Upm für 3 min wurden die Phasen getrennt. Die Hexanphase wurde in ein neues Glasgefäß überführt.

Die Proben wurden dann durch Verdampfung konzentriert. Hierzu wurde ein „Techne Sample Concentrator“ verwendet. Nach Zugabe von 75 µl Hexan zu den Lipidproben wurden diese durch Auf- und Abpipettieren gemischt. Hiervon wurden dann jeweils 50 µl in GC/MS Reaktionsgefäße überführt. Nach Vermessung der Proben wurden die Konzentrationen der einzelnen Fettsäuren von Interesse anhand eines Vergleiches mit den Standards bestimmt. Zur grafischen Darstellung wurden mit Microsoft Excel Balkendiagramme angefertigt.

3.4 Elektronenmikroskopie

Das hier verwendete Transmissionselektronenmikroskop (TEM) ähnelt im prinzipiellen Aufbau einem Lichtmikroskop. Mehrere hintereinander geschaltete, vergrößernde Linsen erzeugen ein Durchlicht-Elektronenbild mit einer 100 bis 500.000 fachen Vergrößerung und einem Auflösungsvermögen von 0,2 nm (lichtmikroskopische Auflösungsgrenze liegt bei 0,3 µm). Der abgebildete Schwärzungsgrad spiegelt die Elektronendichte, die auf Atommassenunterschieden beruht, im durchstrahlten Präparat wider.

3.4.1 Fixierung, Kontrastierung und DAB-Färbung von Embryonen

Eine Fixierung erfüllt den Zweck der Stabilisierung und Konservierung biologischer Strukturen auf zellulärer und subzellulärer Ebene, die es ermöglicht die biologischen Objekte im TEM anzuschauen.

Mindestens 40 st 17 Embryonen eines Genotyps wurden gesammelt, 3 min mit 50 %igem Chlorix dechorioniert und gut mit *A. bidest.* gewaschen. Die Embryonen wurden anschließend in 50 %igem Karnovsky Fixans 20 min (nicht länger) geschüttelt. Die Embryonen wurden auf ein Sieb überführt, auf einem Agarosestreifen (mit PB Puffer gegossen) aufgereiht und auf einen Objektträger mit doppelseitigem Klebeband transferiert. Nachdem die Embryonen zügig mit PB Puffer (oder mit Fixans) überschichtet wurden, wurden die Embryonen mit Hilfe einer Glaskapillare unter einem Binokular mechanisch devitellinisiert. Die dechorionierten und devitellinisierten Embryonen wurden dann mit 5 %igem Glutaraldehyd in PB Puffer 1-2 h bei RT postfixiert. Die Embryonen wurden anschließend 3 mal 5 min mit PB Puffer 1 mal 5 min mit *A. bidest* und 3 mal 3 min mit 0,01 M Teorell Stenhagen Puffer gewaschen. Danach wurden die Embryonen zuerst 30 min bei RT in der DAB-Vorinkubationslösung, dann 2 h in der DAB-Inkubationslösung inkubiert. Daraufhin wurden die Embryonen 2 mal 3 min bei RT, 1 mal ü. N. bei 4 °C mit 0,01 M Teorell Stenhagen Puffer gewaschen und anschließend mit 2 %iger Osmiumtetroxidlösung für 1 h bei RT zur Kontrastierung inkubiert. Anschließend wurden die Embryonen 3 mal 10 min mit *A. bidest* gewaschen und zur Postfixierung für 30 min in einer 1 %igen Uranylacetat Lösung (wässrig) inkubiert. Um Schrumpfungs- bzw. Deformationsartefakte zu reduzieren wurden die Embryonen nach 3 x 10 minütigem Waschen mit *A. bidest* mit der folgenden Entwässerungsreihe dehydriert und in Durcupan überführt.

Reagenz	Einwirkzeit bei RT	Wiederholungen
30 % EtOH	5 min	1 x
50 % EtOH	5 min	1 x
70 % EtOH	5 min	2 x
90 % EtOH	5 min	2 x
98 % EtOH	5 min	1 x
100 % EtOH	10 min	2 x
100 % Aceton	10 min	2 x
Aceton/Durcupan (1:1)	Ü.N. bei 4°C	1 x
Durcupan	bis Embryonen abgesunken	3 x

Nach dem dritten Durcupan (Kunstharz) Austausch, wurden die Embryonen in eine Form eingebettet und 12-24 h bei 40 °C, dann 12-24 h bei 50 °C und daraufhin bei 60 °C für 12-24 h ausgehärtet.

3.4.2 Trimmen der in Durcupan eingebetteten Embryonen

Damit möglichst wenig Kunststoff den Embryo umgibt wurde das ausgehärtete Durcupan an der Schnittfläche getrimmt. Auf diese Weise wurde die Schnittfläche klein gehalten, wodurch die Messer zum Schneiden der Embryonen nicht so schnell stumpf und die Stauchungsartefakte verringert wurden.

Mit Ethanol gereinigte Rasierklingen wurden benutzt um das Kunstharz in eine stumpfe Pyramide, welche die Probe nach unten ausreichend stabilisiert, zu schneiden. Die Anschnittsfläche wurde trapezförmig oder rechteckig zugetrimmt, so dass mindestens zwei parallele Kanten erzeugt wurden, die dann parallel zur Messerkante des Mikrotoms ausgerichtet wurden.

3.4.3 Glasmesserherstellung für Semi- und Ultradünnschnitte

Zur Herstellung eines Glasmessers wurde zunächst ein Glasstreifen mit Spülmittel und heißem Wasser gereinigt und getrocknet. Hierbei ist darauf zu achten, dass nicht an der zukünftigen Schneidekante gerieben wird. Nach dem Brechen von Quadraten mit dem „Knifemaker“ wurden diese erneut so geteilt, dass Dreiecke mit einer scharfen Schnittkante und einer stumpfen Kante entstehen. Die höchste Schärfe und Qualität weist die Schnittkante im linken Drittel auf, an dieser Stelle wurden Ultradünnschnitte angefertigt. Die restlichen 2/3 der Schnittkante wurden für Semidünnschnitte oder Antrimmarbeiten verwendet.

Mit erhitztem Paraffin wurden Kunststofftröge an die Schnittkante der gebrochenen Glasmesser angebracht, die mit Wasser gefüllt wurden. Dies verhindert während des Scheidens die Zusammenfaltung der Schnitte.

3.4.4 Schneiden und Färben von Semidünnschnitten

Um die Fixierung und Position des Embryos im getrimmten Durcupanblock auf hinreichende Qualität für mögliche Ultradünnschnitte zu beurteilen, wurden mit dem Mikrotom Semidünnschnitte (ca. 1 μm dick) angefertigt, die nach Färbung unterm Lichtmikroskop analysiert wurden. Die hierzu verwendeten Glasmesser liefern pro Schnittstelle ca. 6-10 Schnitte mit ausreichender Qualität. Danach wurde die Schnittstelle gewechselt. Mit einer Pferdewimper wurden die Schnitte auf einen Objektträger transferiert. Durch Erwärmen (60-70 °C) wurden die Schnitte auf dem

Objektträger gestreckt und angetrocknet. Eine Färbelösung aus Methylenblau und Azurblau (1:1) wurde auf die Schnitte getropft und für 1-3 min bei 60-70 °C erwärmt. Nachdem die gefärbten Schnitte mit *A. bides* gewaschen und erneut getrocknet wurden, wurde mit Hilfe eines Lichtmikroskops ihre Qualität beurteilt.

3.4.5 Schneiden und Vorbereiten von Ultradünnschnitten für das TEM

Da Schnitte für Ultrastrukturanalysen mittels TEM wesentlich dünner (ca. 100 nm) als Semidünnschnitte sein müssen, ist beim Schneiden mit höchster Sorgfalt zu arbeiten. Hierbei ist es beispielsweise wichtig einen konvexen Meniskus des Wasserspiegels im Messertrog zu vermeiden, da dieser an der Messerschneide zu Verschmutzungen der Schnitte führen kann. Ein zu niedriger Wasserstand hingegen kann zu Faltungen der Schnitte führen.

Die Ultradünnschnitte wurden mit Hilfe eines Diamantmessers angefertigt. Bei der Ultramikrotomie ist es von Vorteil Schnittbänder zu generieren, da diese leichter auf dem Objektträger aufgenommen und orientiert werden können. Hierzu wurden zwei präzise getrimmte, parallele Kanten der Anschnittsfläche erzeugt. Beim Schneiden wurden ebenfalls beide Kanten parallel zur Messerkante ausgerichtet.

Mit Hilfe der Interferenzfarben, die sich auf den Schnitten abzeichnen kann die Schnittdicke bestimmt werden. Die Dicke, der in dieser Arbeit am TEM aufgenommenen Ultradünnschnitte lag im Bereich von 70-150 nm. Mit einer Pferdewimper wurden die Schnittbänder auf kleine Gitter aufgeschwemmt, welche genau in den Präparatstab des TEMs passen. Die Schnitte wurden anschließend 10 min an der Luft getrocknet und an nummerierte Positionen einer Aufbewahrungsbox gelegt.

4 Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Themenkomplexe bearbeitet. Ein Themenkomplex beschäftigt sich mit der Charakterisierung von Genen, die für Morphogenese und Physiologie des Tracheensystems von *Drosophila* essentiell sind. Hierzu konnten mehrere Autorenschaften in Publikationen erzielt werden. Nachfolgend werden diese Projekte zusammenfassend dargestellt und mein Anteil herausgearbeitet. Anschließend wird der zweite Themenkomplex beschrieben, der sich mit der genetischen und molekularen Charakterisierung von dPex19 im Rahmen der Peroxisomen-Biogenese und -Physiologie befasst. Hierzu erzeugte *Drosophila dpex19* Mutanten wurden auf Zellweger-Syndrom charakteristische Phänotypen untersucht und speziellen Diäten unterzogen.

4.1 Charakterisierung von Genen, die an der Tracheenmorphogenese und -Physiologie beteiligt sind

4.1.1 Wurst: Ein neuer Endozytose Regulator der für die tracheale Luftfüllung essentiell ist

Unter dem Titel „Wurst is essential for airway clearance and respiratory-tube size control“ wurde 2007 von Behr und Kollegen in „Nature Cell Biology“ das *Drosophila wurst* Gen als Schlüsselregulator der Tracheenmorphogenese und -physiologie beschrieben. Die an dieser Arbeit beteiligten Autoren in der korrekten Reihenfolge heißen M. Behr, C. Wingen, C. Wolf, R. Schuh und M. Hoch. Es konnte gezeigt werden, dass das hauptsächlich in Epithelien exprimierte *Drosophila wurst* Gen (CG9089) für ein hoch konserviertes Transmembranprotein, mit einzelnen Orthologen im Reich der Metazoa, kodiert. *Wurst* mutante Stadium (st) 16 Embryonen zeigten verlängerte und im Durchmesser mit segmentalen Restriktionen versehene Tracheenäste. Die am Ende der Embryogenese stattfindende und für die Atmung essentielle Beseitigung der flüssigen und festen Substanzen („airway clearance“) aus dem Tracheenlumen war in *wurst* Mutanten defekt. Als essentieller zellbiologischer Prozess für die „airway clearance“ und die Größendetermination der Tracheenäste konnte die Clathrin vermittelte Endozytose und Wurst als neuer Regulator identifiziert werden. Von mir

beigetragen wurden Ultrastrukturanalysen an späten *white⁻* (*w⁻*) und *wurst* mutanten Embryonen. In letzteren wurde ein veränderter Chitin Abbau, Strukturanomalien des luminalen Chitinzyllinders, Veränderungen der Plasmamembran und EZM von Tracheenzellen detektiert (Wingen, 2006). Biochemisch via „Pulldown-Assay“ konnte ich eine direkte Wurst Clathrin Interaktion nachweisen. Ein von mir angefertigte „Northern Blot“ zeigte, dass auch das humane *wurst* Ortholog *DNAJC22* in Epithelien exprimiert wird. Darüber hinaus habe ich durch Diskussion der Ergebnisse und Korrekturlesen des Manuskripts beigetragen (Behr et al, 2007).

Eine darauffolgenden Publikation mit dem Titel „The Wurst protein - A novel endocytosis reulator involved in airway clearance and respiratory tube size control“ wurde 2009 in „Cell Adhesion & Migration“ veröffentlicht. Zusammen mit Anna C. Aschenbrenner als gleichberechtigte Erstautorin, Birgit Stümpges, Michael Hoch und Matthias Behr wurde hier ein Modell zur konservierten Funktion von Wurst/DNAJC22 bei der Clathrin vermittelten Endozytose diskutiert (Wingen et al, 2009).

4.1.2 Clathrin heavy chain (Chc) Expressionsprofil in *Drosophila*

Zur weiteren Analyse der Wurst Funktion bei der Clathrin vermittelten Endozytose wurde ein spezifischer anti-Clathrin heavy chain (Chc) Antikörper generiert. Die Chc Funktion wurde in den letzten Jahren auch in *Drosophila* intensiv untersucht. Durch Clathrin vermittelte Endozytose können Nährstoffe und andere Moleküle, die an einer Vielzahl von biologischen Prozessen beteiligt sind in die Zelle gelangen. Chc und Clathrin light chain bilden zusammen die Hauptkomponente der Clathrin beschichteten Endozytosevesikel, die an der Zellmembran abgeschnürt werden (Fischer et al, 2006). Mit Hilfe des Chc Antikörpers in Immunfluoreszenzfärbungen und mittels *in situ* Hybridisierung an Embryonen und Larvengewebe konnten wir zeigen, dass *chc* Transkript und Protein ubiquitär aber mit Akkumulation in spezifischen Geweben wie z.B. dem Darm, dem Tracheensystem, der Epidermis, den nephrozytenartigen „garland cells“ und dem Fettkörper detektierbar ist. Subzellulär war Chc im Zytoplasma, an der Zellmembran und in Assoziation mit dem trans-Golgi Netzwerk und frühen Endosomen lokalisiert. 2009 wurden diese Ergebnisse unter dem Titel „Expression and localization of clathrin heavy chain in *Drosophila melanogaster*“ in „Gene Expression Patterns“ veröffentlicht. Die Autoren sind: C. Wingen, B. Stümpges, M. Hoch und M. Behr (Wingen et al, 2009). Meine Aufgaben waren, die Aufreinigung und ersten Spezifitätstests des Chc Antikörpers, die *chc* mRNA Expressionsstudien mittels *in situ* Hybridisierung an Embryonen und die Immunfluoreszenzaufnahmen an larvalen

„garland cells“, Fettkörperzellen, Speicheldrüsenzellen und Gehirnzellen. Neben einer in Zusammenarbeit mit Matthias Behr angefertigten Schemazeichnung des *chc* Gens und Proteins wurde eine weitere Schemazeichnung der larvalen Organe von mir angefertigt. Desweiteren konnte ich durch Diskussion der Ergebnisse und Korrekturlesen des Manuskriptes zur Veröffentlichung beitragen (Wingen et al, 2009).

Eine Erweiterung der Chc Expression und subzellulären Lokalisation wurde 2012 unter dem Titel „Clathrin Heavy Chain Expression and Subcellular Distribution in Embryos of *Drosophila melanogaster*“ in dem Buch „Embryogenesis“ veröffentlicht (Petkau et al). Die Autorenliste des oben genannten Beitrages lautet: G. Petkau*, C. Wingen*, B. Stümpges* und Matthias Behr (* geteilte Erstautorenschaft). Neben der detaillierten Darstellung der asymmetrischen Chc Lokalisation an der apikalen Zellmembran tubulärer Organe wurde gezeigt, dass die Chc Lokalisation von Crumbs abhängig ist. Crumbs ist bei der Festlegung der apikalen Zellpolarität, Wachstum der apikalen Zellmembran, Invagination und Interkalation von Zellen, Größenkontrolle von tubulären Epithelien und bei der „airway clearance“ beteiligt (Kerman et al, 2008; Laprise et al, 2010; Letizia et al, 2011; Stümpges & Behr, 2011). Meine Hauptaufgabe bei diesem Projekt lag in der Unterstützung des Schreibprozesses durch Korrekturlesen und Diskutieren der Ergebnisse (Petkau et al, 2012).

4.1.3 Obstructor-A vermittelt die Integrität der chitinösen EZM

Mit dem Chitin bindenden Obstructor-A (Obst-A) konnte ein weiteres Protein identifiziert und analysiert werden, das in Epithelien lokalisiert ist und in den entsprechenden *obst-A* Nullmutanten Defekte im Tracheensystem aber auch in anderen Chitin produzierenden Geweben wie der Epidermis verursacht. Es konnte gezeigt werden, dass Obst-A den Schutz der chitinösen EZM vor verfrühter Degradation koordiniert und dabei mit Chitin modifizierenden Enzymen wie Knickkopf und Serpentine interagiert (Petkau et al, 2012). Veröffentlicht wurden diese Ergebnisse 2012 im „Journal of biological chemistry“ unter dem Titel „Obstructor-A is required for epithelial extracellular matrix dynamics, exoskeleton function and tubulogenesis.“ Die an dieser Publikation beteiligten Autoren sind: Georg Petkau, Christian Wingen, Laura C. Jussen, Tina Radtke und Matthias Behr. Die Ultrastrukturanalysen des Chitins mittels TEM (in Zusammenarbeit mit Georg Petkau) und die *obst-A* mRNA Expressionsanalyse mittels „Northern Blot“ wurden von mir beigetragen. Desweiteren habe ich die Ergebnisse mit den Autoren diskutiert und Korrekturfunktionen beim Verfassen des Manuskripts übernommen (Petkau et al, 2012).

4.2 Charakterisierung der dPex19 Funktion während der Peroxisomen-Biogenese in *Drosophila*

Um die Pex19 Funktion während der Biogenese von Peroxisomen *in vivo* in einem Tiermodell zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit *dpex19* mutante *Drosophila* Fliegenlinien generiert und analysiert. Wie in der Einleitung geschildert wurden Mutationen im humanen *PEX19* Gen als Ursache der Peroxisomen-Biogenese-Krankheit Zellweger-Syndrom identifiziert (siehe Einleitung 1.4). Im Rahmen dieser Studie sollten daher *dpex19* Mutanten auf mögliche Parallelen zu der humanen Erkrankung untersucht werden. Dazu sollte eine zellbiologische, phänotypische und physiologische Charakterisierung der Mutante erfolgen und grundlegende Erkenntnisse über die molekulare Funktion von dPex19 ermöglichen.

4.2.1 Charakterisierung der *dpex19* mutanten Fliegenlinien

Das *dpex19* Gen liegt in *Drosophila* auf dem zweiten Chromosom im Genombereich 33C4 und kodiert aufgrund vorhergesagter, alternativer Spleißvorgänge zwei Transkripte. Das *CG5325-RA* Transkript besteht aus 1208 bp und kodiert das volle Länge dPex19 Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 31 kDa. Das zweite Transkript *CG5325-RB* ist 1274 bp lang und kodiert eine kleinere, C-terminal trunke dPex19 Isoform von ca. 18 kDa (Abb. 4.1; siehe Anhang 7.1; www.flybase.org).

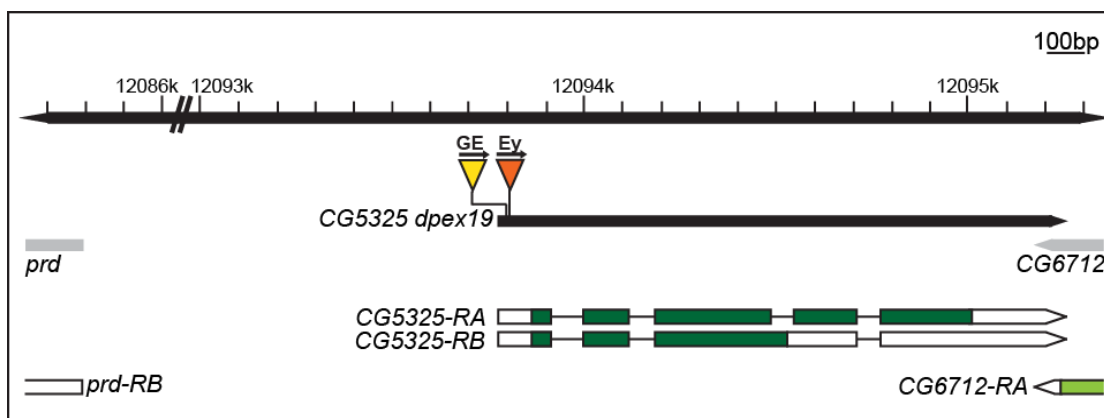


Abb. 4.1: Genomische Organisation des *Drosophila dpex19* Lokus. Das auf dem zweiten Chromosom lokalisierte *dpex19* Gen (schwarzer nach rechts gerichteter Pfeil) kodiert für zwei putative Transkripte mit einer vorhergesagten Länge von 1208 bp (*CG5325-RA*) und 1274 bp (*CG5325-RB*) (www.flybase.org). Der offene Leserahmen (OLR) ist in grün gekennzeichnet und erstreckt sich über alle 5 Exons des *RA* Transkriptes mit Aussparung der 5' und 3' untranslatierte Region (UTR). Das aus nur 4 Exons aufgebaute *RB* Transkript besitzt einen kürzeren OLR, welcher im ersten Exon beginnt und im dritten Exon endet. Die benachbarten Gene *paired* und *CG6712* sind in grau gekennzeichnet. Sie sind beide auf dem Gegenstrang lokalisiert. In Gelb und Orange sind die P-Elemente der kommerziell erhältlichen P-Element-Linien und deren Lokalisation in der 5' UTR dargestellt.

Um die *dpex19* Funktion in *Drosophila* zu untersuchen, sollten zunächst die kommerziell erhältlichen *dpex19* RNAi-, Defizienz- und P-Element-Mutanten analysiert werden. Darüber hinaus sollte eine neue Mutante generiert und charakterisiert werden, in der *dpex19* spezifisch deletiert ist.

4.2.1.1 Eine Inhibierung der *dpex19* Expression verursacht keine Letalität

Um erste Einblicke in die Funktion des *dpex19* Gens zu erhalten wurde die *dpex19* Expression in *Drosophila* mittels RNA Interferenz (RNAi) ubiquitär reprimiert („knock down“). Hierbei bewirkt eine Anlagerung von kurzen, der Ziel mRNA komplementären RNA Stücken deren Degradation und führt somit zu einer Herunterregulation der Genexpression. Bei diesen „knock down“-Studien wird mit Hilfe des binären UAS-Gal4 Systems ein DNA-Konstrukt von Interesse (hier UAS*dpex19*RNAi) überexprimiert (siehe Methoden 3.2.6; Brand & Perrimon, 1993). Durch das Einkreuzen einer gewebes- oder zeitspezifischen Gal4 Treiberfliegenlinie kann der „knock down“ räumlich und zeitlich gesteuert werden.

Die UAS*dpex19*RNAi Fliegenlinie (im Folgenden mit *dpex19i* bezeichnet) wurde vom „Vienna *Drosophila* RNAi Center“ bezogen (Transformant ID 22064, Dietzl et al, 2007). Um eine möglichst ubiquitäre Transkriptinhibierung zu erzielen, wurden die *dpex19i* Fliegen mit den Treiberlinien *twist (twi)*Gal4 und *daughterless (da)*Gal4 gekreuzt. Die „knock down“-Effizienz wurde mittels „Real Time“-PCR (qRT-PCR) bestimmt (siehe Methoden 3.1.17). Hierzu wurden st 1-17 Embryonen mit den Genotypen *dpex19i/twi*Gal4 bzw. *dpex19i/da*Gal4 verwendet. Im Vergleich zu den Kontrolltieren mit den Genotypen *da*Gal4/+ oder *twi*Gal4/+ ergab sich in beiden Fällen eine Herunterregulierung der *dpex19* Expression auf 20-35 %. Heterozygote *dpex19i*/+ Embryonen zeigten, ohne das Einkreuzen einer Gal4 Treiberfliegenlinie, in beiden Experimenten eine leicht verringerte *dpex19* Genaktivität auf ca. 80-85 %, was auf eine geringe Aktivität des UAS Promotors ohne Gal4-Bindung hindeutet (Abb. 4.2 A und B).

Obwohl eine deutliche *dpex19* Transkriptreduktion auf 20-35 % detektiert werden konnte, zeigten die Fliegen keine erhöhte Letalität, Fertilitätsdefizite oder sonstige offensichtliche Phänotypen (Tab. 4.1).

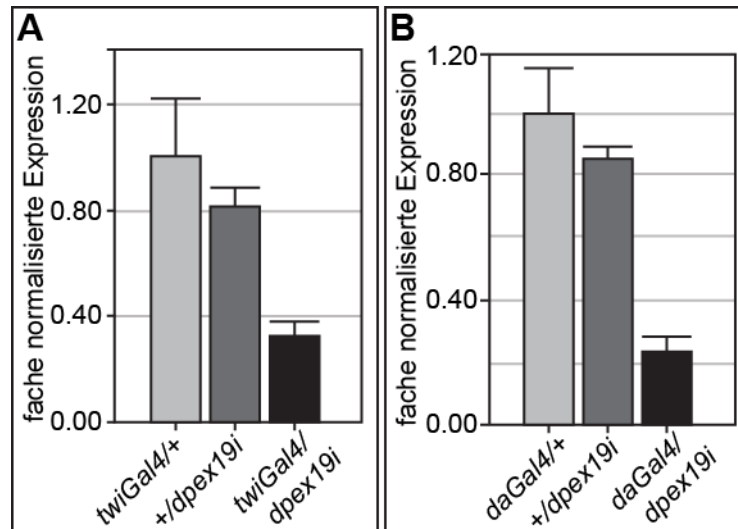


Abb. 4.2: *dpex19* Transkriptreduktion in *dpex19i* Mutanten. Das UAS*dpex19*RNAi Konstrukt wurde mit den ubiquitären Treibern *twiGal4* (A) und *daGal4* (B) überexprimiert. In den Abbildungen A und B erkennt man eine *dpex19* Transkriptreduktion auf 20-30 % (schwarz) im Vergleich zu den Kontrolltieren (hell- und dunkelgrau). Zur Expressionsanalyse der RNAi vermittelten *dpex19* Transkriptinhibierung wurden st 1-17 Embryonen verwendet.

4.2.1.2 Homozygote *dpex19* Defizienz-Mutanten sind embryonal letal

Um einen vollständigen *dpex19* Genfunktionsverlust in *Drosophila* zu untersuchen wurde eine Defizienz-Linie *Df(2l)esc³⁻⁰/CyO* verwendet (siehe Material 2.7.1.1). Als Defizienz-Fliegenlinie bezeichnet man eine *Drosophila* Linie, in der ein meist mehrere Gene überspannender DNA Abschnitt deletiert ist. Laut Annotation erstreckt sich die Deletion der *Df(2l)esc³⁻⁰/CyO* Fliegenlinie über den Genombereich 33A1-33E, der damit neben dem *dpex19* Genlocus auch weitere Gene beinhaltet (Abb. 4.1, siehe FlyBase). Die Deletion von *dpex19* wurde durch *in situ* Hybridisierung und Immunhistochemie verifiziert (Wingen, 2006). Die homozygoten *dpex19* Defizienz-Mutanten waren embryonal letal (Tab. 4.1; Wingen, 2006).

4.2.1.3 *dpex19* P-Element-Fliegenlinien zeigen widersprüchliche Letalitätsprofile

Da es wahrscheinlich ist, dass die embryonale Letalität der *Df(2l)esc³⁻⁰* Tiere auch am Funktionsverlust der ebenfalls deletierten *dpex19* Nachbargene liegen kann, wurden zudem die genspezifischen, transgenen *dpex19* P-Element-Linien *EY21383/CyO* (Bloomington *Drosophila* stock center; USA) und *GE15012* (Aprogen früher *GenExel*, Korea) analysiert (Abb. 4.1). P-Elemente gehören zu den DNA-Transposons und werden in *Drosophila* zur Mutagenese verwendet. Man findet nahezu für jedes Gen ein oder mehrere öffentlich verfügbare Fliegenlinien mit einer P-Element-Insertion. Das P-

Element in der Fliegenlinie *GE15012* ist in der 5' untranslatierten Region (UTR) 80 bp vor dem *dpex19*-Startkodon lokalisiert (Abb. 4.1). Fliegen der P-Element-Linie *GE15012* waren homozygot lebensfähig und zeigten neben den bereits beschriebenen schwachen embryonalen Tracheenphänotypen keine weiteren offensichtlichen Defekte (Tab. 4.1; Wingen, 2006). Im Gegensatz zur *GE15012*-Linie waren die homozygoten *EY21383*-Fliegen nicht lebensfähig (Tab. 4.1). Sie zeigten eine geringe embryonale sowie hohe larvale Letalität mit offensichtlichen Phänotypen am Ende des dritten Larvenstadiums (L3). Im Vergleich zur Kontrolle verpuppten sich die homozygoten *EY21383* L3-Larven nicht, sondern schollen innerhalb von zwei bis fünf Tagen bis auf die zweifache Größe an (Tab. 4.1). Da die *EY21383*-Fliegenlinie einen w^1 mutanten genetischen Hintergrund besitzt, wurden w^1 Fliegen als Wildtypkontrolle verwendet.

Um die P-Element-Insertion der homozygot letalen *EY21383* Fliegenlinie genauer zu lokalisieren, wurde eine Inverse PCR mit anschließender Sequenzierung durchgeführt (siehe Anhang 7.2 und Methoden 3.1.18). Hierbei wurde die P-Element-Insertion auf 69 bp vor dem offenen Leserahmen (OLR) determiniert und inseriert daher in der 5' (UTR) des *dpex19* Gens (Abb. 4.1; siehe Anhang 7.3).

4.2.1.4 Die *EY21383* Fliegenlinie trägt eine Letalität vermittelnde, *dpex19* unabhängige Mutation

Ein Komplementationstest (siehe Methoden 3.2.10), bei welchem die *dpex19* Defizienz-Fliegenlinie *Df(2l)esc³⁻⁰/CyO* und die P-Element-Linie *EY21383/CyO* verkreuzt wurden, zeigte, dass die heterozygoten Nachkommen mit dem Genotyp *EY21383/Df(2l)esc³⁻⁰* nicht larval letal waren (Tab. 4.1). Daraus folgte, dass die homozygoten *EY21383/EY21383* Larven den beschriebenen Phänotyp nicht alleine wegen des Funktionsverlusts von *dpex19* aufwiesen. Die beobachtete Letalität musste daher ihren Ursprung in einer weiteren Mutation haben, die außerhalb des deletierten Genombereichs der Defizienz-Linie lag. Roegiers und Kollegen fanden heraus, dass das *lethal giant larvae (lgl)* Gen in einigen Defizienz- und (EY) P-Element-Mutanten, die das zweite Chromosom betreffen, ein „Hot spot“ für Mutationen ist (Roegiers et al, 2009). Da der beobachtete Phänotyp der *EY21383* Mutante dem *lgl* Phänotyp glich (Karlson & Hanser, 1952), wurde eine putative *lgl* Mutation in der *EY21383* Fliegenlinie angenommen, die mittels PCR und anschließender Sequenzierung bestätigt werden konnte (persönliche Mitteilung Birgit Stümpges).

Genotyp	Letalität	Fertilität	Phänotypen
<i>Df(2l) esc³⁻⁰/Df(2l) esc³⁻⁰</i>	Ja; embryonal	/	Verlängerte Tracheen
<i>EY21383/EY21383</i>	Ja; larval	/	Große L3 Larven
<i>EY21383/Df(2l) esc³⁻⁰</i>	Nein	Ja	Nein
<i>EY21383R/EY21383</i>	Nein	Ja	Nein
<i>GE15012/GE15012</i>	Nein	Ja	Nein
<i>twiG4/+; dpex19i/DCR 2</i>	Nein	Ja	Nein
<i>+/+; dpex19i/daGal4</i>	Nein	Ja	Nein
<i>+/+; dpex19i/actGal4</i>	Nein	Ja	Nein
<i>UASdpex19/+; tubGal4/+</i>	Nein	Ja	Nein
<i>UASdpex19/+; daGal4/+</i>	Nein	Ja	Nein

Tab. 4.1: Letalität, Fertilität und sonstige Phänotypen der *dpex19* mutanten Fliegenlinien. Der Tabelle ist zu entnehmen, dass die ubiquitäre Überexpression von *dpex19* und *dpex19* RNAi sowie die Lokalisation des P-Elements im *dpex19* Genlocus der *GE15012*-Fliegen keine Letalität, Fertilitätsprobleme oder sonstige offensichtlichen Phänotypen verursacht (grauer Hintergrund). Die homozygoten Tiere der Defizienz-Linie *Df(2l) esc³⁻⁰* und der P-Element-Fliegenlinie *EY21383* sind nicht lebensfähig (weißer Hintergrund).

4.2.1.5 Die Entfernung der letalen *dpex19* unabhängigen Mutation führt zu lebensfähigen *EY21383*-Fliegen

Mittels Rekombination konnte die *IgI* Mutation in der *EY21383*-Fliegenlinie durch einen wildtypischen Genomabschnitt ausgetauscht werden (siehe Methoden 3.2.8). Aus insgesamt 192 generierten Fliegenlinien wurden zwei homozygot lebensfähige und fertile Stämme etabliert und mit *EY21383R111* bzw. *EY21383R127* bezeichnet. Das Vorhandensein des P-Elements im *dpex19* Gen in diesen Fliegenstämmen sollte nun durch PCR nachgewiesen werden (Abb. 4.3). Mit der Primerkombination fwP2 und rvP1 (Abb. 4.3 A; siehe Anhang 7.4) konnte in der PCR mit *w* DNA als Matrize, ein vorhergesagtes Fragment von 540 bp amplifiziert werden (Abb. 4.3 B). Aufgrund einer vorhergesagten Amplikongröße von 11,4 kb und einer hierfür zu kurzen Elongationszeit wurde bei Vorhandensein des P-Elements in den *EY21383R*-Linien kein Amplifikationsprodukt erwartet. Die erwartete Amplikongröße setzte sich aus der Summe der P-Element Basenpaare (10,9 kb) und der Anzahl an Basenpaaren des

dpex19 Amplifikationsbereichs (540 bp) zusammen. In der PCR mit genomischer DNA (gDNA) aus den homozygoten P-Element-Fliegen (*EY21383R*) als Matrize konnte in der Tat kein Fragment amplifiziert werden (Abb. 4.3 B). Die PCR mit DNA der heterozygoten P-Element-Mutante als Matrize lieferte aufgrund der wildtypischen Genomsequenz des „Balancer“-Chromosoms, wie die *w* Kontrolle, ein erwartetes ca. 540 bp großes Fragment (Abb. 4.3 B).

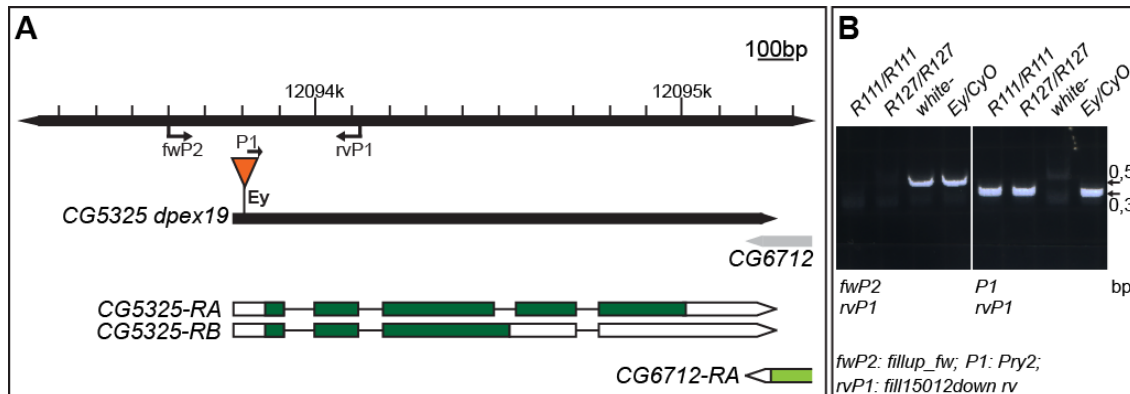


Abb. 4.3: Verifizierung der *EY21383* P-Element Lokalisation im *dpex19* Genlocus. Das P-Element *EY21383* (orange) kann mit den Primerkombinationen fwP2 und rvP1 bzw. P1 und rvP1 mittels PCR analysiert werden (A). Wie man anhand der Größenangaben in A erkennen kann, wird durch die Primerkombination fwP2 und rvP1 ein ca. 540 bp langes PCR-Fragment mit wildtypischer DNA als Matrize amplifiziert (Spur 3 und 4 in B). Liegt das ca. 10 kb große P-Element innerhalb der von den Primern flankierten Sequenz wird kein PCR Amplifikat gebildet (Spur 1 und 2 in B). Da der Primer P1 am 3' Ende der P-Element Sequenz anlagert wird während der PCR mit der Primerkombination P1 und rvP1 (A) ein ca. 300 bp langes Amplifikat nur dann gebildet wenn das P-Element an der vorhergesagten Stelle lokalisiert ist (Spur 5, 6 und 8 in B). Rechts neben den Gelbildern (Pfeile in B) sind die Basenpaare in kb angegeben.

Bei der zweiten Primerkombination P1 und rvP1 wurde bei der PCR mit *w* DNA kein Fragment gebildet, da sich die P1 Primersequenz spezifisch im 3' Bereich des P-Elements komplementär anlagerten. Die Präsenz des P-Elements in den beiden *EY21383R*-Fliegenlinien konnte durch das gebildete Fragment mit der erwarteten Größe von 300 bp bestätigt werden. Als Positivkontrolle wurde die PCR auch mit gDNA der ursprünglichen *EY21383*/CyO Fliegen durchgeführt (Abb. 4.3 B).

Im Folgenden wurde die mRNA Expression der *EY21383R111* und *GE15012* P-Element-Fliegenlinien mittels qRT-PCR charakterisiert (siehe Methoden 3.1.17). Die *dpex19* Expression in homozygoten *EY21383R111* Larven des zweiten Larvenstadiums (L2) zeigte im Vergleich zu L2 Larven der *w* Kontrolle eine über 50 prozentige Reduktion. In den homozygoten *GE15012* L2 Larven war die *dpex19* Expression über 50 % höher als in der Kontrolle (Abb. 4.4).

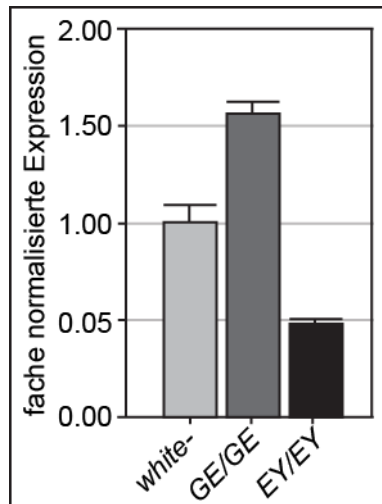


Abb. 4.4: dpex19 Expression in P-Element-Mutanten. Gezeigt ist eine im Vergleich zur *w* Kontrolle um 50 % erhöhte *dpex19* Expression in L2 Larven der *GE15012(GE)*-Fliegenlinie. In L2 Larven der *EY21383R111(EY)*-Fliegen ist das Transkriptlevel um 50 % reduziert.

Die Analysen zeigten, dass keine der Mutanten eine gewünschte Nulldeletion von *dpex19* erreichte. Für eine weitere Analyse der *dpex19* Funktion wurde daher eine Nullmutante generiert (siehe Kapitel 4.2.1.6).

4.2.1.6 *EY21383R* Exzision verursacht unterschiedliche *dpex19* Deletionen

Um eine spezifische *dpex19* Nullmutante zu generieren, wurde eine Transposase vermittelte P-Element Exzision („jump out“) durchgeführt. Die eingekreuzte Transposasequelle sollte hierbei die Mobilisierung des P-Elements aus dem Insertionsort bewirken. In wenigen Fällen entsteht dabei eine unpräzise Exzision des P-Elements, was Deletionen der flankierenden genomischen Region zur Folge hat (Robertson et al, 1988). Zu diesem Zweck wurde die P-Element-Linie *EY21383R111* mit einer Transposase exprimierenden Fliegenlinie verkreuzt (siehe Methoden 3.2.9). Insgesamt wurden 320 Fliegenstämme etabliert, in denen das P-Element mobilisiert wurde und nicht erneut ins Genom inserierte. 28 dieser *deltaEY21383* (ΔEY) Fliegenstämme waren homozygot letal (9 %), davon zeigten 16 Linien eine Letalität in heterozygoter Situation mit dem *Df(2l)esc³⁻⁰* Allel (5 %). Da sich in diesen Fliegenlinien die mutanten Allele nicht gegenseitig komplementierten (siehe Methoden 3.2.10 und Anhang 7.5) und der Phänotyp der heterozygoten $\Delta EY/Df(2l)esc^{3-0}$ dem der homozygoten $\Delta EY/\Delta EY$ Fliegen gleich (siehe Abb. 4.15), konnte davon ausgegangen werden, dass putative *dpex19* Deletionen in den ΔEY Fliegenlinien generiert worden sind. Die einzelnen homozygot letalen ΔEY Fliegenlinien, ihre Bezeichnungen und die Ergebnisse der Komplementationstests sind tabellarisch im Anhang 7.5 dargestellt.

Die mittels „jump out“ generierten ΔEY Mutationen wurden durch PCRs der genomischen Region auf Deletionen im *dpex19* Genlocus untersucht. Hierzu wurden Primer verwendet, die das P-Element im 3' und 5' Bereich flankierten. Um möglichst viele ΔEY Fliegenlinien der 320 erhaltenen Kandidaten mit verschiedenen *dpex19* Deletionen in einem ersten PCR-„Screen“ identifizieren zu können, wurden Primer ausgewählt, die ca. 1 kb stromaufwärts (fwP1) bzw. 1 kb stromabwärts (rvP2) vom P-Element Insertionsort lagen (Abb. 4.5 A; siehe Anhang 7.4). Als Positivkontrolle wurde hierfür gDNA von *w* Fliegen verwendet, bei der ein Amplifikat von ca. 2,5 kb erwartet wurde. Als Negativkontrolle wurde eine PCR mit gDNA homozygoter *EY21383R* Fliegen als Matrize durchgeführt (Abb. 4.5 B). Hier konnte aufgrund der errechneten Fragmentgröße von ca. 10 kb und der zu kurzen PCR Elongationszeit kein Amplifikat entstehen.

Bei präziser Exzision des P-Elements erwartete man nach der PCR ein Fragment der Größe, das der Positivkontrolle entspricht (2,5 kb). Lieferte die PCR mit ΔEY gDNA als Matrize kürzere Fragmente als die in der *w* Kontrolle, ist eine unpräzise Exzision des P-Elements erfolgt, die zu einer Deletion im *dpex19* Genlocus geführt haben muss. Anhand der Größendifferenz der PCR-Fragmente von *w* und ΔEY Kandidaten konnte die Deletionsgröße abgeschätzt werden. So konnten Fliegen mit unterschiedlich großen Deletionen im *dpex19* Genombereich identifiziert werden (Abb. 4.5 B).

Um die Deletionen der ΔEY Fliegenlinien genauer lokalisieren zu können, wurden zwei weitere PCR Primerkombinationen verwendet. Anhand der Kombination fwP2 und rvP2 wurden Deletionen stromabwärts des P-Elements, also im *dpex19* OLR, detektiert (Abb. 4.5 A und C; siehe Anhang 7.4). Die Linie *dF7* ist ein Beispiel für eine Fliegenlinie mit einer *dpex19* Deletion im OLR. Die Primerkombination fwP1 und rvP1 ist für die Identifikation von Deletionen stromaufwärts des P-Elements, also in der *dpex19* Promotorregion, verwendet worden. Die ΔEY Fliegenlinie *dG12* ist ein Beispiel für eine detektierte Deletion im *dpex19* Promotorbereich (Abb. 4.5 A und D; siehe Anhang 7.4). Die Deletion der *dD10* Fliegenlinie erstreckt sich sowohl in die 5' als auch in die 3' Richtung des P-Elements (Abb. 4.5).

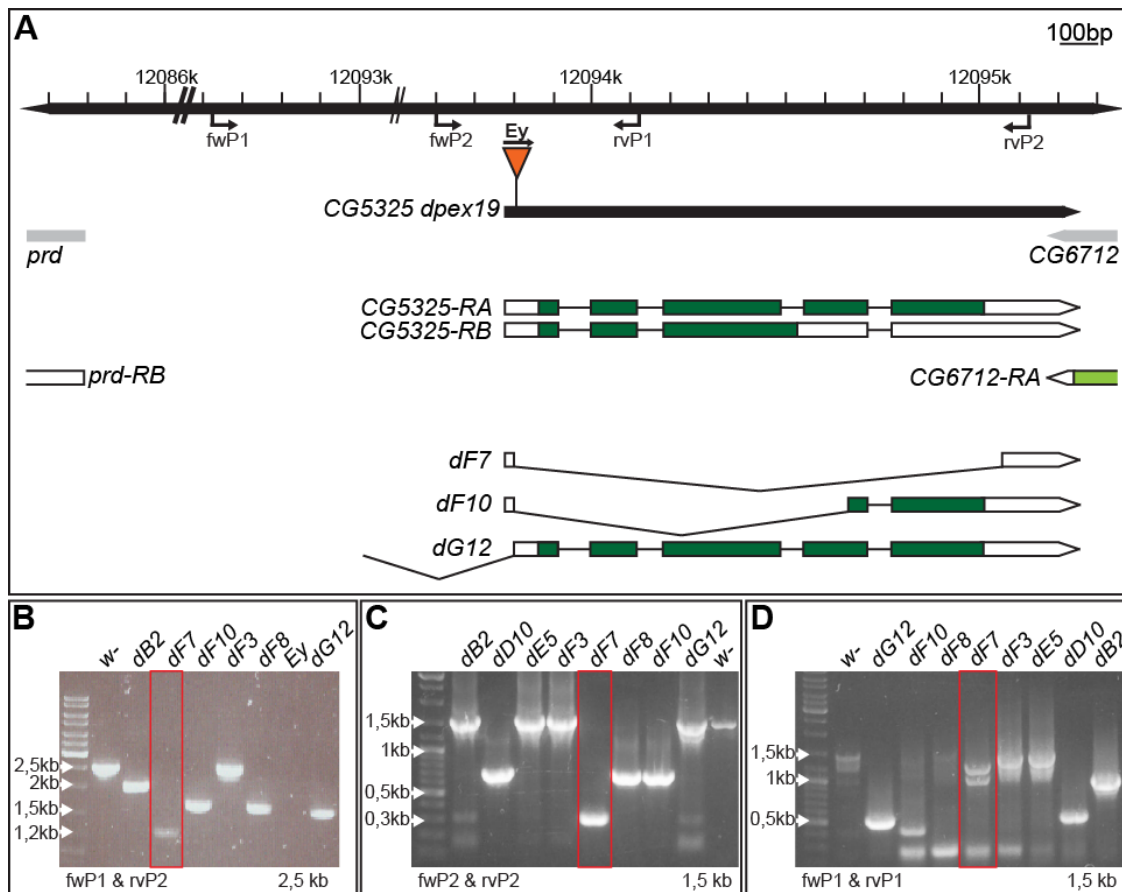


Abb. 4.5: PCR Nachweis verschiedener mutanter *dpex19* P-Element Exzisions Allele. Mit drei unterschiedlichen Primerkombinationen (A) wurden die generierte homozygot letalen Fliegenlinien mittels PCR analysiert. (B, C und D) Agarosegelbilder von den PCR Fragmenten einiger Exzisionskandidaten. Die verwendeten Primerkombinationen sind unter den jeweiligen Fotos beschrieben. In allen Bildern ist der DNA Standard links abgebildet. Man erkennt durch die Wahl der PCR Primer Allele, die verschieden große Deletionen im stromauf- oder stromabwärts der vorigen P-Element Lokalisation vorweisen. Die DNA des mit einem roten Kasten versehenen *dF7* Kandidaten zeigt nach den PCRs, dass eine Nulldeletion des OLR im *dpex19* OLR vorliegt. Eine Auswahl der generierten, durch PCR und Sequenzierung analysierten *dpex19* Allele ist im unteren Teil der Abbildung A dargestellt. Der Deletionsbereich ist mit einem offenen nach unten gerichteten Dreieck dargestellt.

Die erhaltenen PCR Fragmente der Linien *dF7*, *dF8*, *dF10* und *dD10* wurden sequenziert und mit der *w* Sequenz verglichen (siehe Anhang 7.6 und 7.7). Hierbei wurde ersichtlich, dass die Deletionen der Linien *dF8*, *dF10* und *dD10* von der *dpex19* 5' UTR bis zum vierten Exon des *CG5325-RA* Transkriptes reichten (Abb. 4.5 A). Die größte Deletion wurde im genomischen Bereich der *dF7* Fliegenlinie gefunden, diese erstreckt sich über das gesamten *dpex19* OLR (Abb. 4.5 A). Die angrenzende Nachbargensequenz wird nicht beeinträchtigt. Zusätzlich wurden unter den homozygot lebensfähige ΔEY Fliegenlinien (Revertanten) sieben Linien durch PCR und Sequenzierung näher charakterisiert (siehe Anhang 7.5 und 7.8). Zusammenfassend wurde mit Hilfe des „jump out“ Experiments eine gewünschte Deletion des *dpex19*

OLRs generiert. Die *dF7* Fliegenlinie, im Folgenden mit *dpex19^{ΔF7}* bezeichnet, wurde für alle weiteren Analysen verwendet.

4.2.1.7 *dpex19^{ΔF7}* ist eine Transkript-Nullmutante

Zur Überprüfung der *dpex19* mRNA und Protein Expression in den *dpex19^{ΔF7}* Mutanten wurden qRT-PCRs und Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt. Die Expressionsanalyse via qRT-PCR (siehe Methoden 3.1.17) zeigte, dass die *dpex19* mRNA in L2- und L3-Larven nicht detektierbar ist (Abb. 4.6 A). Für die Auswertung wurde auf das *dpex19* Expressionsniveau der *w* L3-Larven normalisiert. Als Resultat kann also davon ausgegangen werden, dass es sich bei *dpex19^{ΔF7}* Mutante um eine *dpex19* Transkript Nullmutante handelt.

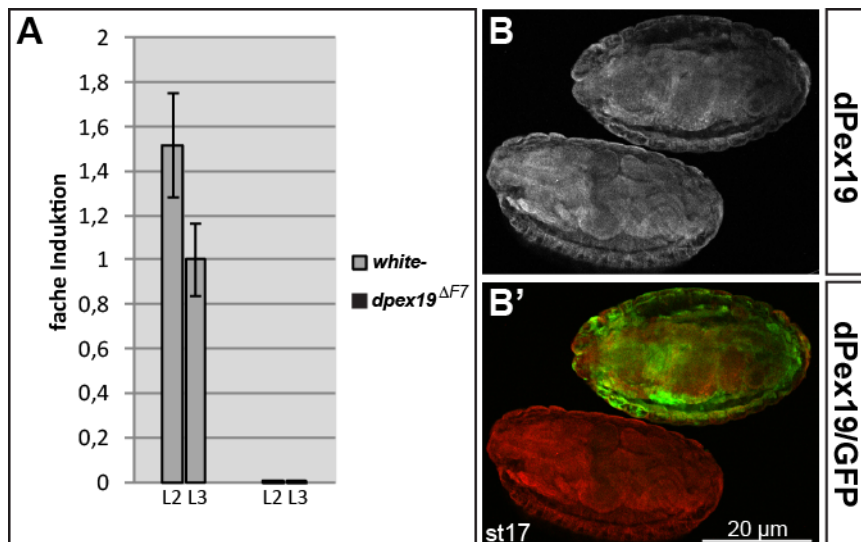


Abb. 4.6: *dpex19* Transkript „knock out“ in *dpex19^{ΔF7}* mutanten Embryonen und Larven. A: Die *dpex19* mRNA Expression wurde mittels qRT-PCR in *w* und *dpex19^{ΔF7}* L2- und L3-Larven ermittelt und auf den L3 *w* Wert normalisiert. Die Expression von *dpex19* ist in den homozygoten Larven der *dpex19^{ΔF7}* Fliegenlinie nicht detektierbar. B: Die homozygoten *dpex19^{ΔF7}* Embryonen (unterer Embryo) zeigen wie die heterozygoten Kontrolltiere (oberer Embryo) nach erfolgter Immunfluoreszenzfärbung in konfokalen Aufnahmen eine anti-dPex19 Antikörperfärbung. In B ist das anti-dPex19 Antikörpersignal dargestellt und in B' sieht man eine Co-Markierung von anti-dPex19 (rot) und anti-GFP (grün). Anhand der GFP Färbung können die heterozygoten (*dpex19^{ΔF7}/CyO twistGFP*) Kontrollembryonen von den homozygoten *dpex19^{ΔF7}* Mutanten unterschieden werden. Die abgebildeten Embryonen sind in st 17.

Die dPex19 Protein Expression in heterozygoten und homozygoten *dpex19^{ΔF7}* mutanten Embryonen wurde mittels eines anti-dPex19 Antikörpers (Wingen, 2006) ermittelt (Abb. 4.6 B). Die heterozygoten Embryonen waren anhand der „Balancer“-Chromosom vermittelten *twistGFP*-Expression identifizierbar. Die GFP negativen homozygoten *dpex19^{ΔF7}* Embryonen zeigten bis zum Ende der Embryogenese eine

wildtypische dPex19 Proteinverteilung (Abb. 4.6 B). Zusammenfassend dargestellt, konnte in homozygoten *dpex19^{ΔF7}* Larven keine *dpex19* mRNA, in Embryonen allerdings dPex19 Protein detektiert werden (siehe Diskussion 5.2.1). Das Vorhandensein des dPex19 Proteins in den *dpex19^{ΔF7}* Mutanten könnte durch eine maternale *dpex19* Komponente bedingt sein. Maternale Komponenten werden durch maternal exprimierte Gene in Form von mRNA oder Protein in der Eizelle deponiert (Janning & Knust, 2004). Um diese ebenfalls auszuschalten, sollten nun *dpex19^{ΔF7}* mutante Keimbahnklone generiert werden (siehe Kapitel 4.2.1.8).

4.2.1.8 Maternal-zygotische *dpex19^{ΔF7m-z-}* Mutanten sind Transkript- und Protein-Nullmutanten

Zur Erzeugung von maternal-zygotischen *dpex19^{ΔF7}* (*dpex19^{ΔF7m-z-}*) Mutanten wurde das *dpex19^{ΔF7}* Allel mit einem FRT40A rekombiniert. Mit Hilfe einer in den Keimzellen aktiven Flippase sollte so neben der zygotischen auch die maternale *dpex19* Komponente ausgeschaltet werden (siehe Methoden 3.2.11).

Mittels qRT-PCR und Immunfluoreszenzfärbungen wurde das Ausschalten der *dpex19* Genfunktion in *dpex19^{ΔF7m-z-}* mutanten Embryonen auf Transkript- bzw. Proteinebene untersucht (siehe Methoden 3.1.17 und 3.2.4). Die Transkriptanalyse via qRT-PCR wurde mit cDNA von st 10-17 Embryonen durchgeführt. Normalisiert wurde auf das wildtypische *dpex19* Transkriptlevel der *w* Embryonen. Als weitere Kontrolle wurde die cDNA von Embryonen verwendet, die keine maternale aber eine zygotische *dpex19* Komponente (im Folgenden mit *dpex19^{ΔF7m-z+}* bezeichnet) enthielten. In diesen Tieren ist *dpex19* im Vergleich zur *w* Kontrolle um ca. 60 Prozent reduziert. Die *dpex19^{ΔF7m-z-}* Mutanten zeigten keine *dpex19* mRNA Expression und außer einer unspezifischen Hintergrundfärbung der Speicheldrüsen kein dPex19 Antikörpersignal im Vergleich zu *dpex19^{ΔF7m-z+}* Kontrollembryonen (Abb. 4.7 A-C). Als zellulärer Marker, der gleichzeitig eine Aussage über die epitheliale Zellpolarität zulässt, wurde Megatrachea (Mega) mittels eines anti-Mega Antikörpers detektiert (Behr et al, 2003). Es konnten allerdings keine offensichtlichen Phänotypen betreffend der epithelialen Zellpolarität oder Organmorphologie identifiziert werden (Abb. 4.7 B' und C').

Mittels qRT-PCR und Immunmarkierung konnte das Ausschalten der *dpex19* Genfunktion auf Transkript- und Proteinebene in *dpex19^{ΔF7m-z-}* mutanten Embryonen bestätigt werden (Abb. 4.7 A-C).

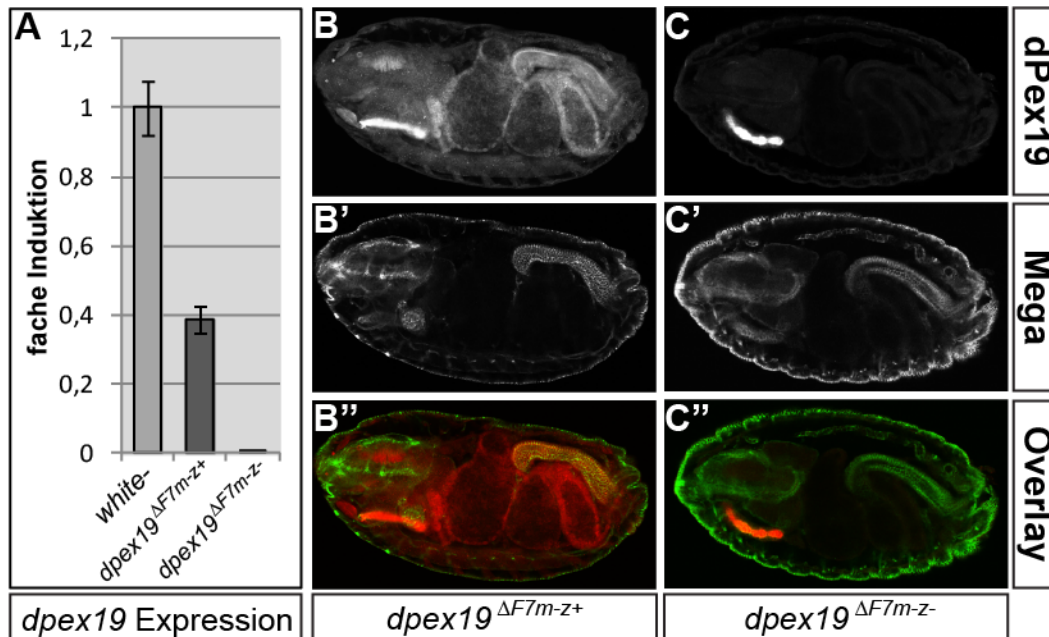


Abb. 4.7: dPex19 Transkript und Protein „knock out“ in maternalen $dpex19^{\Delta F7m-z-}$ Nullmutanten. A: Dargestellt sind die durch qRT-PCR analysierten $dpex19$ Transkriptmengen in w (hellgrau), maternal-zygotischen $dpex19^{\Delta F7}$ nullmutanten ($dpex19^{\Delta F7m-z-}$) Embryonen (schwarz) und mutanten Embryonen ohne maternale aber mit zygotischer $dpex19$ Komponente ($dpex19^{\Delta F7m-z+}$; dunkelgrau). In Abbildung B und C sind konfokale Aufnahmen immunhistochemischer Fluoreszenzfärbungen mit den Antikörpern anti-dPex19 (B und C) und anti-Mega (B' und C') an st 17 Embryonen dargestellt. Der anti-Mega Antikörper wurde zur Markierung der apiko-lateralen Zellmembran verwendet. In der Überlagerung (Overlay) ist das dPex19 Signal in rot, das Mega Signal in grün dargestellt (B'' und C''). Im Vergleich zu den $dpex19^{\Delta F7m-z+}$ Kontrollembryonen (B und B'') zeigen die $dpex19^{\Delta F7m-z-}$ Nullmutanten ein verringertes anti-dPex19 Signal (C und C'').

4.2.1.9 Der Zeitpunkt des $dpex19$ Genfunktionsverlusts beeinflusst das Letalitätsprofil

Um die mutanten Fliegenlinien $dpex19^{\Delta F7}$ und $dpex19^{\Delta F7m-z-}$ phänotypisch zu vergleichen, wurde ein Letalitätstest durchgeführt. Hierzu wurden jeweils 160 w , $dpex19^{\Delta F7}$, $dpex19^{\Delta F7m-z-}$ und $dpex19^{\Delta F7m-z+}$ mutante Embryonen gesammelt und deren Entwicklung sowie Überlebensrate dokumentiert (Abb. 4.8). Die Überlebensrate der w Kontrolltiere lag am 20. Tag nach der Eiablage (EL) bei ca. 95 % (Abb. 4.8 A). Die embryonale Letalität von w betrug 2 %. Weitere 3 % starben während der larvalen und pupalen Entwicklung. Die das Adultstadium erreichenden 95 % überlebten mindestens zehn Tage als Imago.

Die zygotischen $dpex19^{\Delta F7}$ Mutanten zeigten im Vergleich zu der zuvor geschilderten w Kontrolle ein sehr heterogenes Letalitätsprofil. Ungefähr 15 % starben während der Embryonalentwicklung, weitere 15 % waren in den ersten Stunden nach dem Schlüpfen aus der Eihülle letal. Die Überlebensrate blieb dann während der $dpex19^{\Delta F7}$ Larvalentwicklung relativ konstant. 5 % starben vor der Verpuppung. Während der Metamorphose erreichte die Letalität mit knapp 50 % ein Maximum. Ca. 20 % der

$dpex19^{\Delta F7}$ Tiere wurden Adult, wobei weitere 10 % während des Schlüpfens aus der Puppenhülle starben. Diese Fliegen blieben mit dem Abdomen oder Thorax in der Hülle stecken und starben innerhalb von einem bis drei Tagen (Abb. 4.8 und Abb. 4.15 C und D). Die vollständig geschlüpften (10 %) zygotischen $dpex19^{\Delta F7}$ Mutanten starben innerhalb der ersten fünf bis sieben Tage im Adultstadium (Abb. 4.8 A).

Desweiteren zeigten die $dpex19^{\Delta F7}$ Mutanten eine in der Embryogenese beginnende und sich über die Larvalentwicklung fortsetzende Entwicklungsverzögerung. Die Embryonalentwicklung war im Vergleich zur w^- Kontrolle um zwei Stunden, die larvale Entwicklung um zwei Tage verlängert. Die Metamorphosegeschwindigkeit war in den Mutanten hingegen nicht beeinträchtigt (Abb. 4.8 B).

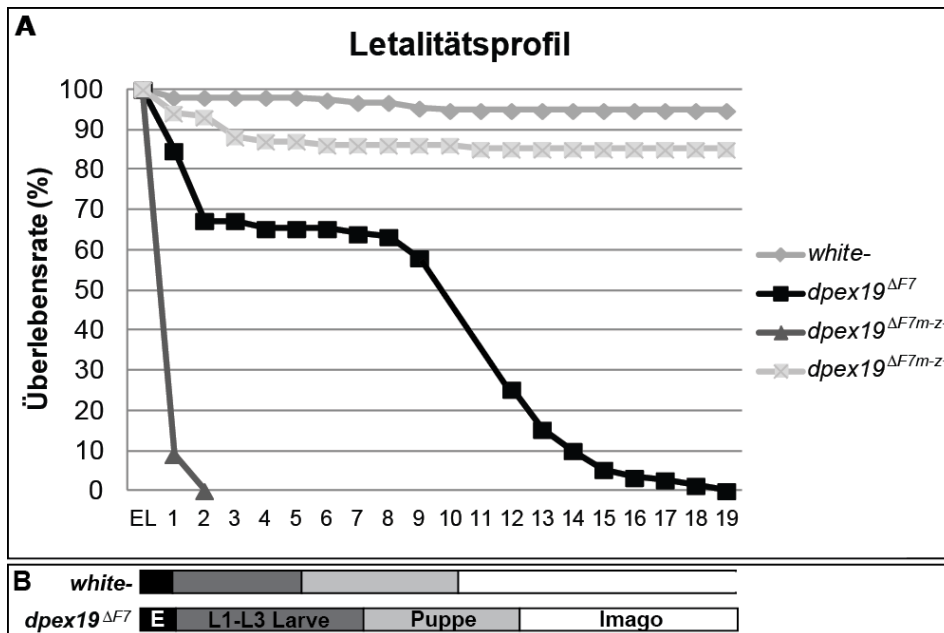


Abb. 4.8: $dpex19^{\Delta F7}$ Mutanten zeigen ein heterogenes Letalitätsprofil und sind Entwicklungsverzögert. A: Aufgetragen ist die Überlebensrate (Ordinate) in Prozent von w^- Tieren (graue Rauten), $dpex19^{\Delta F7}$ (schwarze Quadrate), $dpex19^{\Delta F7m-z^-}$ (hellgraue Quadrate) und $dpex19^{\Delta F7m-z^+}$ (dunkelgraue Dreiecke) Mutanten in Abhängigkeit der Zeit in Tagen nach Eiablage (EL, Abszisse). Die Entwicklungsverzögerung während der embryonalen und larvalen Entwicklung der $dpex19^{\Delta F7}$ Mutante im Vergleich zur w^- Kontrolle ist in Form eines Entwicklungszeitstreifens in B dargestellt. E steht für Embryo.

Der Verlust der maternalen $dpex19$ Komponente in einem ansonsten heterozygoten $dpex19$ mutanten genetischen Hintergrund ($dpex19^{\Delta F7m-z^+}$; Abb. 4.6) führte zu einer im Vergleich zur Kontrolle leicht erhöhten embryonalen und frühen larvalen Letalität. Ca. 15 % der Tiere starben vor dem Erreichen des zweiten Larvenstadiums. Die diese Phase überlebenden 85 % der Mutanten wurden Adult und zeigten, wie die w^- Kontrolle, keine offensichtlichen Phänotypen, waren fertil und lebten länger als 20 Tage nach der Eiablage (Abb. 4.8 A).

Die Deletion der maternalen und zygotischen *dpex19* Komponente in den *dpex19^{ΔF7m-z}* Mutanten hingegen führte zur Letalität im frühen L1. Die embryonale Letalität lag mit 20 % auf dem Niveau der zygotischen *dpex19^{ΔF7}* Mutanten. Die Mehrheit (80 %) schlüpfte als L1 Larve, starb jedoch im Gegensatz zu *dpex19^{ΔF7}* Mutanten innerhalb der ersten Stunde in unmittelbarer Nähe der Eihülle (Abb. 4.8 A).

Zusammenfassend ist die *dpex19* Expression für das Überleben und die Entwicklung der Tiere notwendig. Darüber hinaus ist die maternale *dpex19* Komponente essentiell für die frühe Larvalentwicklung. Je früher die *dpex19* Genaktivität ausgeschaltet wurde, desto früher starben die Tiere (Abb. 4.6, Abb. 4.7 und Abb. 4.8).

Abschließend bleibt noch festzustellen, dass die Überlebensrate sehr stark in Abhängigkeit der Futterbedingungen, der Temperatur und den Konkurrenzbedingungen variierte. So erreichten mehr als 50 % der zygotischen *dpex19* Mutanten das Puppenstadium wenn sie ohne Konkurrenz ihrer heterozygoten Geschwister auf nicht zu engem Raum mit einem Maismehl Standardfliegenfutter bei 25°C gehalten wurden (Abb. 4.8 A und B). Das Halten der Larven auf Apfelsaftagarplatten mit Hefefutter, eine Veränderung der Temperatur auf 21°C bzw. 29°C oder die Konkurrenz durch heterozygote Geschwistertiere führte zu einer erhöhten larvalen Letalität und damit zur Verringerung der Überlebensrate der homozygoten *dpex19^{ΔF7}* Mutanten.

4.2.1.10 Die *dpex19^{ΔF7}* vermittelte Letalität kann durch ektopische *dpex19* Expression gerettet werden

Durch Komplementationstests, qRT-PCRs und Antikörperfärbungen konnte gezeigt werden, dass *dpex19^{ΔF7}* eine Nullmutante ist. Weitere Untersuchungen zeigten, dass homozygot mutante *dpex19^{ΔF7}* Tiere nicht lebensfähig waren (siehe Kapitel 4.2.1.6-4.2.1.9). Um neben dem *dpex19* Funktionsverlust einen *dpex19* Funktionsgewinn („gain of function“) zu untersuchen, wurde eine UAS*dpex19* Fliegenlinie generiert (kloniert von Dr. Matthias Behr; Wingen, 2006; Brand & Perrimon, 1993). Die Kreuzung dieser Linie mit den ubiquitären Gal4-Treiberlinien *tubGal4* und *daGal4* zeigte, dass eine *dpex19* Überexpression keine Letalität verursacht. Außerdem zeigten die *dpex19* überexprimierenden Fliegen keine offensichtlichen Anomalien wie beispielsweise Fertilitätsprobleme (Tab. 4.1).

Diese Tatsache eröffnete die Möglichkeit, durch ektopische *dpex19* Expression Rettungsexperimente der *dpex19^{ΔF7}* vermittelten Letalität basierend auf dem UAS-

Gal4-System durchzuführen. Hierzu wurde eine stabile Fliegenlinie erzeugt, die neben der *dpex19^{ΔF7}* Mutation auch ein UAS*dpex19* Konstrukt besitzt. Das anschließende Kreuzen mit verschiedenen Gal4-Treiberlinien, die ebenfalls die *dpex19^{ΔF7}* Mutation trugen, bewirkte eine zeit- und gewebsspezifische *dpex19* Expression in heterozygoten aber auch homozygoten *dpex19^{ΔF7}* Nullmutanten (siehe Methoden 3.2.6).

Treiberlinie	Ort der <i>dpex19</i> Expression	Rettung	Phänotypen
<i>ppl</i> Gal4	I FB, SG, GT, PV, MP	Ja	fertil
<i>tubulin</i> Gal4	ubiquitär	Ja	Männchen steril
<i>XB30</i> Gal4	e MP, GT	Nein	/
<i>P(GawB)Ok107</i>	I MB	Nein	/
<i>elav</i> Gal4	NS nach st12	Nein	/
<i>cg</i> Gal4	H	Nein	/
<i>AB</i> Gal4	SG	Nein	/
<i>DJ 646</i> Gal4	a SN, OE, T	Nein	/
<i>DJ 626</i> Gal4	a NS, C, OE	Nein	/
<i>drm</i> Gal4	e PV, MG, MP, SI	Nein	/
<i>sli</i> Gal4	e MGC, MP1 N	Nein	/
<i>sgs</i> Gal4	SG	Nein	/
<i>Isp2</i> Gal4	I (3rd instar) FB	Nein	/
<i>31-1</i> Gal4	e CNS, PNS	Nein	/
<i>repo</i> Gal4	GL	Nein	/
<i>BO</i> Gal4	I OE	Nein	/
<i>c135</i> Gal4	e PV; I B, ED, GT, FB; a OS, PTFC, MAG, SV, EJD, CC, SC	Nein	/

Tab. 4.2: Ektopische *dpex19* Expression rettet die *dpex19^{ΔF7}* vermittelte Letalität. Abkürzungen: a=Adult, b=Gehirn ("brain"), C=Herz ("cardia"), CC=Zellen der Testis ("cyst cells"), CNS=Zentrales Nervensystem ("central nervous system"), e=Embryo ("embryonic"), ED Augenimaginalscheibe („eye disc“), EJD=Ejakulationsdrüse („ejaculate duct“), FB=Fettkörper („fatbody“), GL=Gliazellen („glial cells“), GT=Darm („gut“), H=Hämozyten (hemocytes), HG=Hinterdarm („hindgut“), I=Irraval, MAG=männliche akzessorische Geschlechtsdrüsen („male accessory gland“), MB=Pilzkörper („mushroombody“), MG=Mitteldarm („midgut“), MGC=Gliazellen des ZNS („midline glial cells“), MP1 N= MP1 Neurone, MP=Malpighische Gefäße, NMJ=Neuromuskuläre Synapse („neuromuscular junction“), NS=Nervensystem, OE= Oenozyten, OS=Ovar Epithelgewebe („ovarian squamous“), PNS=Peripheres Nervensystem, PV=Proventriculus, SG=Speicheldrüse („salivary gland“), SC=Spermatozyten („spermatocytes“), SI=Dünndarm („small intestine“), SN=Sensorische Neurone, T=Testis. Die gewebsspezifische Expression der Treiberlinie ist mit Ausnahme der *ppl*Gal4 Linie (persönliche Mitteilung Dr. Mélanie Richard) und der *XB30*Gal4 (Stammsammlung Arbeitsgruppe Hoch) Linie der Internetseite des „Bloomington Stock Center“ (USA, Indiana) entnommen.

Wie man der Tabelle 4.2 entnehmen kann, führte neben der ubiquitären *dpex19* Expression mittels *tubGal4* nur die *pumpless (ppl)Gal4* vermittelte *dpex19* Expression zur Rettung der kompletten Entwicklung der *dpex19^{ΔF7}* mutanten Tiere bis zur Imago. Das *ppl* Gen wird spezifisch im Fettkörper exprimiert (Zinke et al, 1999). Der verwendete *pplGal4* Treiber exprimiert Gal4 und damit auch UAS-*dpex19* im larvalen Fettkörper (von L1 bis L3), den Speicheldrüsen und den Malpighischen Gefäßen (Colombani et al, 2003, persönliche Mitteilung Dr. Mélisande Richard). Eine Rettung der *dpex19^{ΔF7}* vermittelten Letalität durch weitere Gal4-Linien, die z.B. im Fettkörper (*lspGal4*, *c135Gal4*) oder in den Malpighischen Gefäßen (*XB30Gal4*, *drmGal4*) eine UAS*dpex19* Expression bewirken, konnte nicht erreicht werden. Die Analysen bestätigten, dass die Letalität der *dpex19^{ΔF7}* Nullmutanten auf einen *dpex19* Genfunktionsverlust zurück zu führen ist und zeigten, dass die gewebsspezifische *dpex19* Expression im Fettkörper, den Speicheldrüsen und den Malpighischen Gefäßen zu einer Rettung der *dpex19^{ΔF7}* induzierten Letalität führt (siehe Diskussion 5.3.1).

4.2.2 Zellbiologische Analyse der dPex19 Funktion

Mit der Erzeugung der *dpex19^{ΔF7}* Nullmutante steht nun ein *in vivo* Model zur Untersuchung der *dpex19* Genfunktion während der *Drosophila* Entwicklung zur Verfügung. In diesem Kapitel wird die *Drosophila* dPex19 Funktion zellbiologisch analysiert und die generierten *dpex19^{ΔF7}* Mutanten in Bezug auf Zellweger-Syndrom charakteristische zelluläre Defekte untersucht.

4.2.2.1 dPex19 kolokalisiert mit dem peroxisomalen Marker GFP.SKL

Aus früheren dPex19 Lokalisationsstudien ist bekannt, dass dPex19 während der Embryogenese räumlich und zeitlich ubiquitär exprimiert wird und partiell mit dem ER-Marker PDI-GFP kolokalisiert (Bobinnec et al, 2003; Wingen, 2006). Zur vertiefenden Analyse der subzellulären dPex19 Lokalisation wurde der anti-dPex19 Antikörper für Immunfluoreszenzfärbungen an *Drosophila* L3 Larvengewebe verwendet. Die Zellen der Säugetierleber und der Niere besitzen zahlreiche Peroxisomen (siehe Einleitung 1.1 und 1.2). Entsprechend wurde die dPex19 Lokalisationsstudie in den larvalen leber- und nierenanalogen Organen, dem Fettkörper bzw. den Malpighischen Gefäßen durchgeführt (siehe Einleitung 1.2.2).

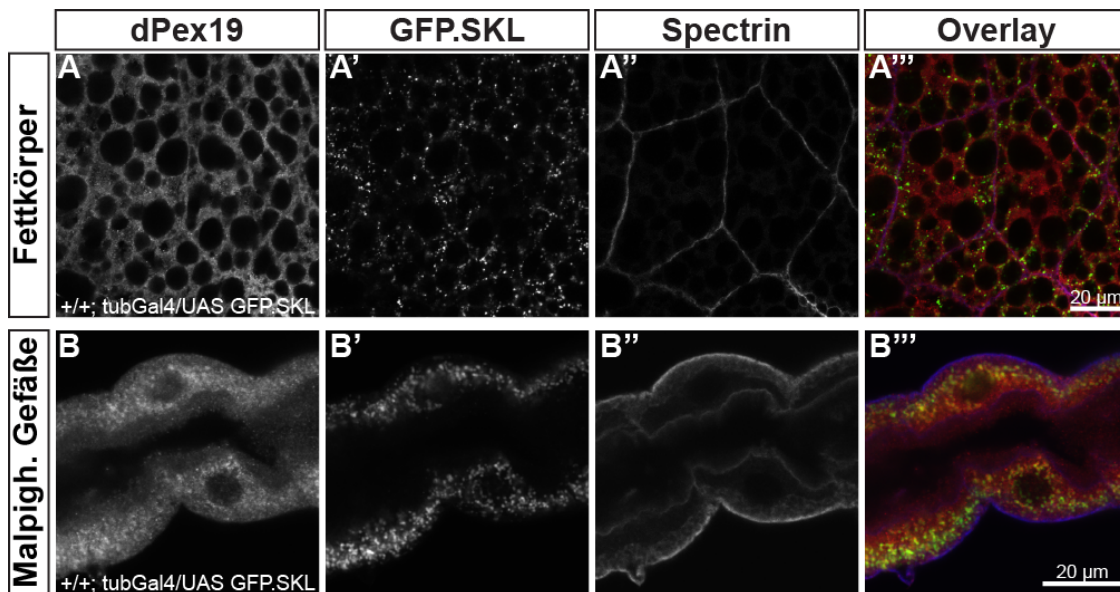


Abb. 4.9: Das vorwiegend zytoplasmatisch lokalisierte dPex19 kolokalisiert partiell mit GFP.SKL positive Peroxisomen. Die konfokalen Aufnahmen der Immunfluoreszenzmarkierungen an larvalen Fettkörper- (A) und Malpighischen Gefäßzellen (B) mit den Antikörpern anti-dPex19 (rot), anti-GFP (grün) und anti-Spectrin (blau) zeigen eine Zytoplasmatische dPex19 Lokalisierung (A und B) einschließlich einer partiellen Kolokalisation (A''' und B''') mit dem peroxisomalen Marker GFP.SKL (A' und B'). In A'' und B'' werden die Zellgrenzen durch einen anti- α -Spectrin Antikörper visualisiert.

Die Visualisierung der Peroxisomen in den Zellen des *Drosophila* Fettkörpers (Abb. 4.9 A-A''') und der Malpighischen Gefäße (Abb. 4.9 B-B''') wurde durch die UAS-Gal4 System vermittelte ubiquitäre Expression von GFP.SKL mit anschließender GFP-Antikörperfärbung erzielt (Brand & Perrimon, 1993). Das Tripeptid Serin (S), Lysin (K), Leucin (L) entspricht dem peroxisomalen Targetingsignal-1 (PTS1; siehe Einleitung 1.2.1). Das GFP.SKL Fusionsprotein wurde hier mit dem Treiber *tubGal4* in einem wildtypischen genetischen Hintergrund exprimiert (Abb. 4.9 A' B') (Kural et al, 2005; Chen et al, 2010; Nakayama et al, 2011). Zur Markierung der Zellmembranen wurde ein anti- α -Spectrin Antikörper verwendet (Abb. 4.9 A'' und B'', Dubreuil et al, 1987). Sowohl der Fettkörper als auch die Malpighischen Gefäße wiesen zahlreiche Peroxisomen sowie eine Anreicherung des anti-dPex19 Antikörpersignals auf (Abb. 4.9). In beiden untersuchten Organen zeigte sich eine weitestgehend zytoplasmatische dPex19 Verteilung (Abb. 4.9 A und B). Hierbei kolokalisierte dPex19 zum Teil mit dem GFP.SKL Signal (Abb. 4.9 A''' und B'''). Die konfokalen Analysen zeigten daher, dass dPex19 am ER, im Zytoplasma und an Peroxisomen lokalisiert ist (siehe Diskussion 5.1.2).

4.2.2.2 dPex19 und dPex3 kolokalisieren und zeigen eine Lokalisationsabhängigkeit

Aus Hefe und Säugerzellkultur ist bekannt, dass Pex3 der direkte Interaktionspartner von Pex19 ist. Beide interagieren beim Transport von essentiellen peroxisomalen Transmembranproteinen (siehe Einleitung 1.3.2). Um dPex3 analysieren zu können, wurden in dieser Arbeit in Kooperation mit Fatmire Bujupi UAS*dPex3HA* Fliegenlinien generiert (Bujupi, 2011). Eine auf Funktionalität verifizierte *dpex3HA* Fliegenlinie (Bujupi, 2011) wurde nun für immunhistochemische dPex3 und dPex19 Kolokalisationsstudien verwendet. Darüber hinaus wurde diese genutzt, um eine subzelluläre dPex3 Lokalisationsstudie in *dpex19^{ΔF7}* mutanten L3 Larvengeweben durchzuführen. So sollte eine mögliche Interaktion dieser Proteine auch in *Drosophila* untersucht werden.

Anhand von *tubGal4* vermittelter ubiquitärer dPex3HA und GFP.SKL (siehe Kapitel 4.2.2.1) Koexpression mit anschließender anti-HA und anti-GFP Antikörperfärbung an Zellen der Malpighischen Gefäße wurde die subzelluläre dPex3 Lokalisation analysiert. Wie man in Abb. 4.10 A erkennt, kolokalisierte dPex3HA mit dem Peroxisomenmarker GFP.SKL in den Malpighischen Gefäßzellen des dritten Larvenstadiums. Das dPex3HA Signal (Abb. 4.10 A') war im Vergleich zum Signal des GFP.SKLs (Abb. 4.10 A) randständig und damit vermutlich in der Membran der Peroxisomen lokalisiert (Abb. 4.10 A Pfeile). So lokalisierte das HA markierte dPex3, ähnlich den Orthologen aus Hefe und Säugerzellen, in der peroxisomalen Membran (Höhfeld et al, 1991; Soukupova et al, 1999; Matsuzaki & Fujiki, 2008). Bei genauerer Betrachtung des GFP.SKL Signals in den dPex3HA exprimierenden Malpighischen Gefäßzellen (Abb. 4.10 A) fielen im Vergleich zu den wildtypischen Kontrollen, in denen ausschließlich GFP.SKL exprimiert wurde (Abb. 4.9 B und Abb. 4.10 A), vergrößerte und in ihrer Anzahl minimierte GFP positiv gefärbte Peroxisomen auf. Dieses Phänomen wird im nächsten Abschnitt (siehe Kapitel 4.2.2.3) weiter ausgeführt.

Die Expression von dPex3HA in *dpex19^{ΔF7}* Mutanten wies hingegen via anti-HA Immunfluoreszenz eine dPex3HA Mislokalisierung auf. Das Signal war nicht wie in den Kontrolltierzellen auf die vergrößerten Peroxisomen beschränkt (Abb. 4.10 A), sondern zeigte eine gleichmäßige Verteilung im gesamten Zytoplasma der Malpighischen Gefäßzellen (Abb. 4.10 B). Nur wenige punktförmige dPex3HA Anreicherungen konnten identifiziert werden (Abb. 4.10 B Pfeile). Eine Rettung der beobachteten Letalität in *dpex19^{ΔF7}* Mutanten konnte durch die ubiquitäre dPex3HA Expression nicht beobachtet werden.

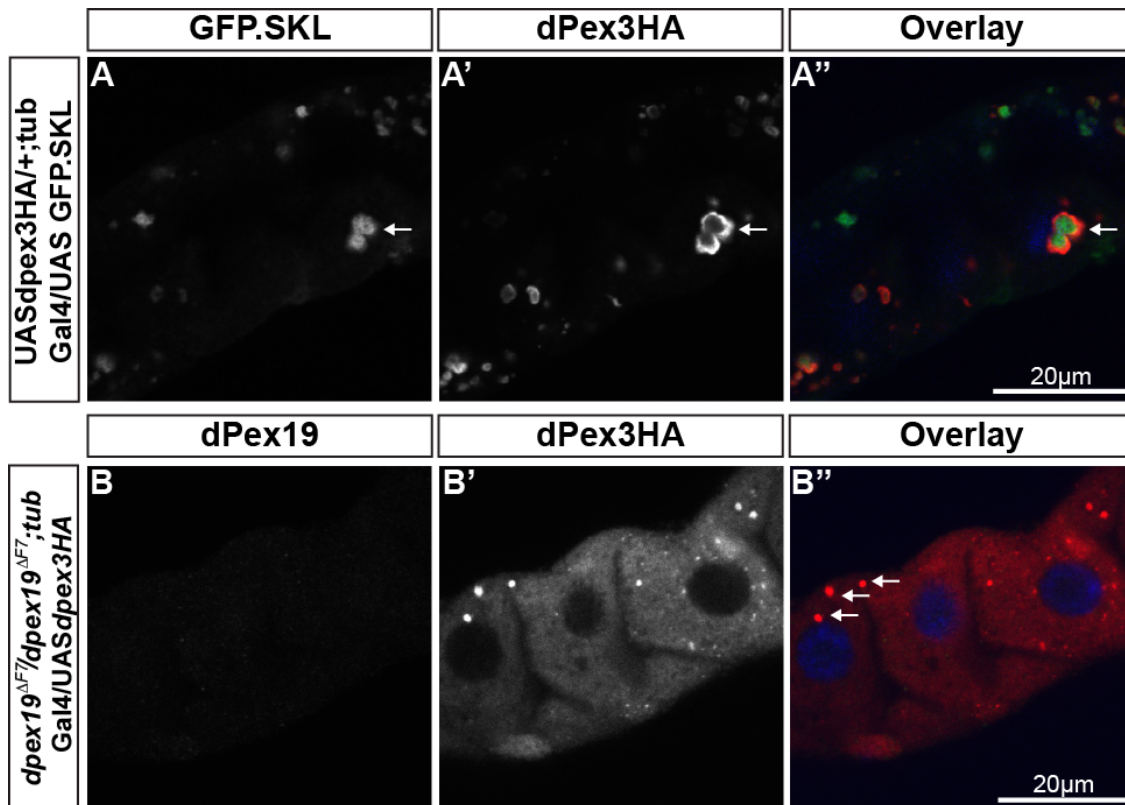


Abb. 4.10: dPex3HA Lokalisation in wildtypischen und *dPex19*^{ΔF7} mutanten Malpighischen Gefäßzellen. Konfokale Aufnahmen von immunfluoreszent gefärbten Malpighischen Gefäßzellen des dritten Larvenstadiums. Das Gewebe der dPex3HA und GFP.SKL überexprimierenden Kontrolltiere (A) wurde mit Hilfe von einem anti-GFP Antikörper (A, im Overlay grün) und einem anti-HA Antikörper (A', im Overlay rot) gefärbt. Die Pfeile deuten auf ein vergrößertes GFP.SKL und Pex3HA positives Peroxisom. B: Anti-dPex19 und anti-HA Antikörperfärbungen an malpighischen Gefäßzellen in *dPex19*^{ΔF7} zeigen neben dem Nachweis der *dPex19* Deletion (B, im Overlay grün) eine Mislokalisierung von dPex3HA im gesamten Zytoplasma (B', im Overlay rot) mit Anreicherung in wenigen vesikulären Strukturen (Pfeile in B').

4.2.2.3 dPex3HA Überexpression verursacht eine dPex19 Mislokalisierung

Um eine weitere Lokalisationsabhängigkeit von dPex3 und dPex19 zu überprüfen, wurde eine anti-dPex19 Antikörperfärbung an dPex3HA exprimierenden Malpighischen Gefäßzellen durchgeführt. Wie bereits in Kapitel 4.2.2.1 beschrieben ist dPex19 in wildtypischen Zellen an Peroxisomen, in Assoziation mit dem ER aber überwiegend im Zytoplasma verteilt.

Das dPex19 Signal zeigte in Malpighischen Gefäßzellen, die dPex3 überexprimieren, keine homogene zytoplasmatische Färbung, sondern war in punktförmigen Strukturen, die zum Teil mit den GFP.SKL positiven Peroxisomen kolokalisieren, angereichert (Pfeile in Abb. 4.11 A und A''). Wie im vorigen Kapitel erwähnt führte die Überexpression von dPex3HA im Vergleich zur wildtypischen Situation zu einer verringerten Peroxisomenanzahl. Die vorhandenen Peroxisomen waren deutlich größer als die Peroxisomen in den Kontrollgeweben (Abb. 4.11 A und B). Die

Peroxisomengröße, die laut Literatur in Wildtyp-Zellen zwischen 0,1 und 1 μm liegt (Schrader & Fahimi, 2008), war nach dPex3HA Überexpression im Bezug auf den größeren Wert bis zu verfünffacht (ca. 5 μm ; Abb. 4.11 C).

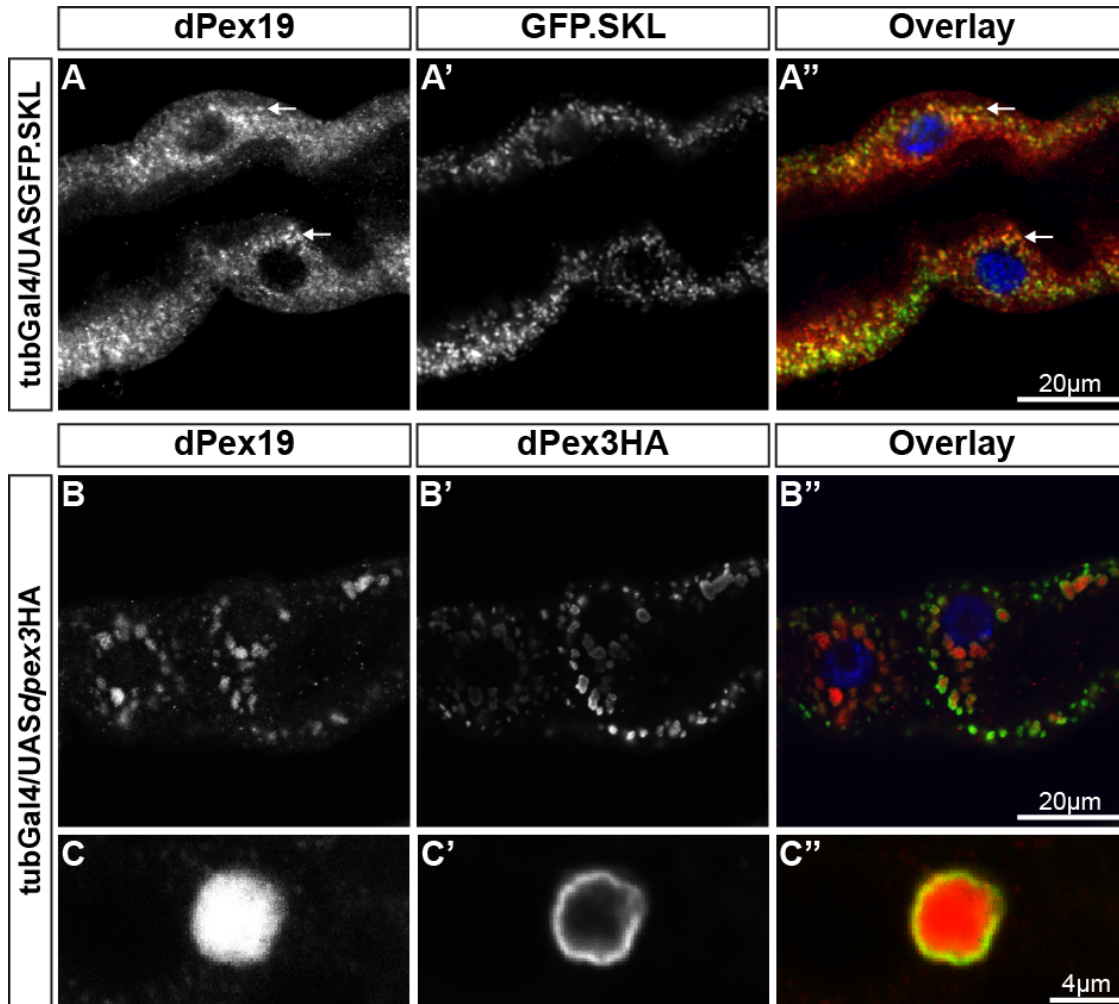


Abb. 4.11: dPex19 Lokalisation in wildtypischen und dPex3HA exprimierenden Malpighischen Gefäßzellen. Konfokalmikroskopische Aufnahmen von anti-dPex19 (A,B und C), anti-GFP.SKL (A') und anti-HA (B' und C') Immunfluoreszenzen an Malpighischen Gefäßzellen von L3 Larven. dPex19 kolokalisiert partiell in wildtypischen Zellen mit dem peroxisomalen Marker GFP.SKL (A-A''). Mit Hilfe der ubiquitären, *tubGal4* vermittelten UAS GFP.SKL Überexpression und anschließender anti-GFP Antikörperfärbung wurden die Peroxisomen markiert (A' und A''). In Zellen die dPex3HA überexprimieren (B-C'') bilden sich vergrößerte Peroxisomen, in denen randständig, vermutlich in der peroxisomalen Membran dPex3HA (B', B'', C' und C'') und in der Matrix dPex19 (B, B'', C und C'') detektiert werden kann.

Neben diesem Effekt wurde nach der dPex3 Überexpression und anschließender Immunfluoreszenz mit den Antikörpern anti-HA und anti-dPex19 eine weitere Auffälligkeit in den Malpighischen Gefäßzellen offensichtlich. Der anti-dPex19 Antikörper zeigte nicht wie in den Kontrolltieren eine punktförmige zytoplasmatische dPex19 Verteilung (Abb. 4.11 A). Das dPex19 Signal lokalisierte nahezu ausschließlich in den dPex3HA positiven Peroxisomen (Abb. 4.11 B). Detailaufnahme zeigten, dass

dPex3HA in der Peripherie und somit wahrscheinlich in der Membran der vergrößerten Peroxisomen lokalisiert ist (Abb. 4.11 C). Desweiteren wurde das dPex19 Signal vom dPex3HA Signal begrenzt, was vermutlich einer dPex19 Lokalisation in der Peroxisomenmatrix entspricht (Abb. 4.11 C und C“).

Zusammenfassend ergaben die Lokalisationsstudien, dass die dPex19 Lokalisation von der dPex3HA Expression abhängig war und umgekehrt, dass die dPex3HA Lokalisation von der dPex19 Expression beeinflusst wurde.

4.2.2.4 *dpex19*^{ΔF7} mutante L3 Larven haben keine GFP.SKL positiven Peroxisomen

Die Untersuchung der gegenseitigen dPex19-dPex3 Lokalisationsabhängigkeit deutet auf einen konservierten Mechanismus der beiden Partner zur Bildung der Peroxisomen hin. Um zu überprüfen, ob die *dpex19*^{ΔF7} Mutante als ein Modell für das humane Zellweger-Syndrom dienen kann und die Tiere ähnlich wie Zellweger-Syndrom Patienten Defekte bei der Peroxisomen-Biogenese zeigen, wurde deren Bestand an Peroxisomen mit dem von wildtypischen Zellen verglichen (siehe Einleitung 1.4.2). In diesem Experiment wurden daher die Peroxisomen mit Hilfe einer durch das UAS-Gal4 System induzierten ubiquitären GFP.SKL Expression und anschließender anti-GFP Antikörperfärbung sichtbar gemacht (Abb. 4.12 A-D). Das gebildete Fusionsprotein aus GFP und SKL (Kural et al, 2005; Chen et al, 2010) wurde mit dem Treiber *tubGal4* in homozygoten *dpex19*^{ΔF7} Mutanten (Abb. 4.12 B und D) und als Kontrolle in heterozygoten *dpex19*^{ΔF7} Fliegen (Abb. 4.12 A und C) exprimiert. Als Membranmarker wurde ein anti- α -Spectrin Antikörper verwendet (Abb. 4.12 A'-D'; Dubreuil et al, 1987).

Die heterozygoten *dpex19*^{ΔF7} mutanten *Drosophila* Zellen des L3 Fettkörpers (Abb. 4.12 A) und der Malpighischen Gefäße (Abb. 4.12 C) wiesen eine mit dem Wildtyp (Abb. 4.9) vergleichbare Anzahl Peroxisomen auf und wurden als wildtypische Kontrolle betrachtet. In den Zellen des homozygot *dpex19*^{ΔF7} mutanten Fettkörpers (Abb. 4.12 B) und der Malpighischen Gefäßen (Abb. 4.12 D) hingegen war das GFP.SKL im gesamten Zytoplasma verteilt und akkumulierte nicht wie in der heterozygoten Kontrolle in den GFP.SKL positiv gefärbten Peroxisomen (Abb. 4.12 A und C). Die Analyse zeigte, dass dPex19 essentiell für die Lokalisation des Peroxisomenmarkers GFP.SKL ist. Ob der *dpex19* Genfunktionsverlust zur Eliminierung der Peroxisomen führte oder lediglich zur GFP.SKL Mislokalisierung, ist durch diese Analysen nicht eindeutig feststellbar und wurde im weiteren Verlauf der Arbeit mit Hilfe der Elektronenmikroskopie untersucht (siehe Diskussion 5.2.3).

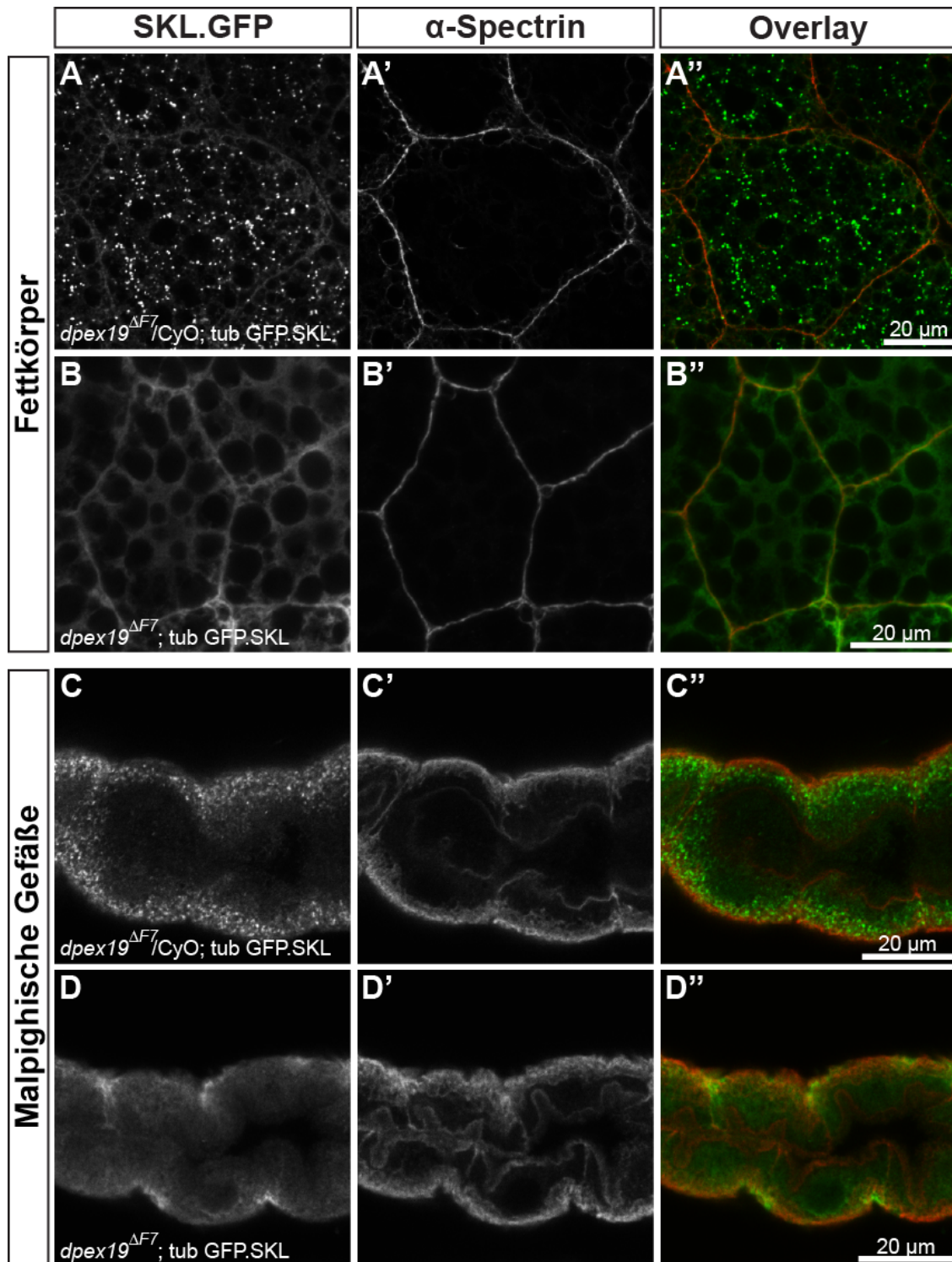


Abb. 4.12: In *dpex19^{ΔF7}* mutanten Zellen des Fettkörpers und der Malpighischen Gefäße ist der peroxisomale Marker GFP.SKL mislokalisiert. Die konfokale Aufnahmen von immunfluoreszenz gefärbten Zellen des *Drosophila* Fettkörpers (A und B) und der Malpighischen Gefäße (C und D) von L3 Larven zeigen, dass GFP.SKL (A-D) in homozygoten *dpex19^{ΔF7}* Mutanten im Zytoplasma mislokalisiert (B und D) und nicht wie in den heterozygoten Kontrolltieren in den Peroxisomen lokalisiert (A und C). Die Genotypen sind im unteren Bildabschnitt der Aufnahmen A-D dargestellt: *dpex19^{ΔF7}/CyO; tub GFP.SKL* ist die Kurzschreibweise für *dpex19^{ΔF7}/CyO; tubGal4/UAS GFP.SKL* und *dpex19^{ΔF7}; tub GFP.SKL* steht für *dpex19^{ΔF7}/ dpex19^{ΔF7}; tubGal4/UAS GFP.SKL*. In A' bis D' sind die Zellgrenzen durch den anti- α -Spectrin Antikörper markiert. In den Overlay Aufnahmen (A''-D'') ist Spectrin in rot und GFP.SKL in grün angezeigt.

Desweiteren wurde beobachtet, dass die Zellen der Malpighischen Gefäße von *dpex19^{ΔF7}* mutanten L3 Larven eine im Vergleich zur Kontrolle veränderte Morphologie aufwiesen. Die durch anti- α -Spectrin Antikörperfärbung visualisierten Zellgrenzen waren in den homozygoten *dpex19^{ΔF7}* Mutanten (Abb. 4.12 D') weniger distinkt und die apikale Zellmembran zeigte im Vergleich zu den Kontrolltieren (Abb. 4.12 C') Einstülpungen.

4.2.2.5 Maternal zygotische *dpex19^{ΔF7m-z-}* Mutanten zeigen eine verringerte Peroxisomenanzahl

Durch Ultrastrukturanalyse an st 17 Embryonen maternal zygotischer *dpex19^{ΔF7m-z-}* Mutanten soll die im vorigen Abschnitt aufgeworfene Frage beantwortet werden, ob die Peroxisomenzahl oder lediglich der Import des SKL.GFP beeinträchtigt ist. Die Embryonen wurden zuvor zum Nachweis des Peroxisomen-Identifikationsenzym Katalase mit Diaminobenzidin (DAB) behandelt, fixiert und in Kunstharz eingebettet (LeHir et al, 1979). Die in der peroxisomalen Matrix lokalisierte Katalase oxidiert das DAB in alkalischer Lösung und ermöglicht so die Identifikation der Katalase, wodurch indirekt die Peroxisomen markiert werden (siehe Methoden 3.4).

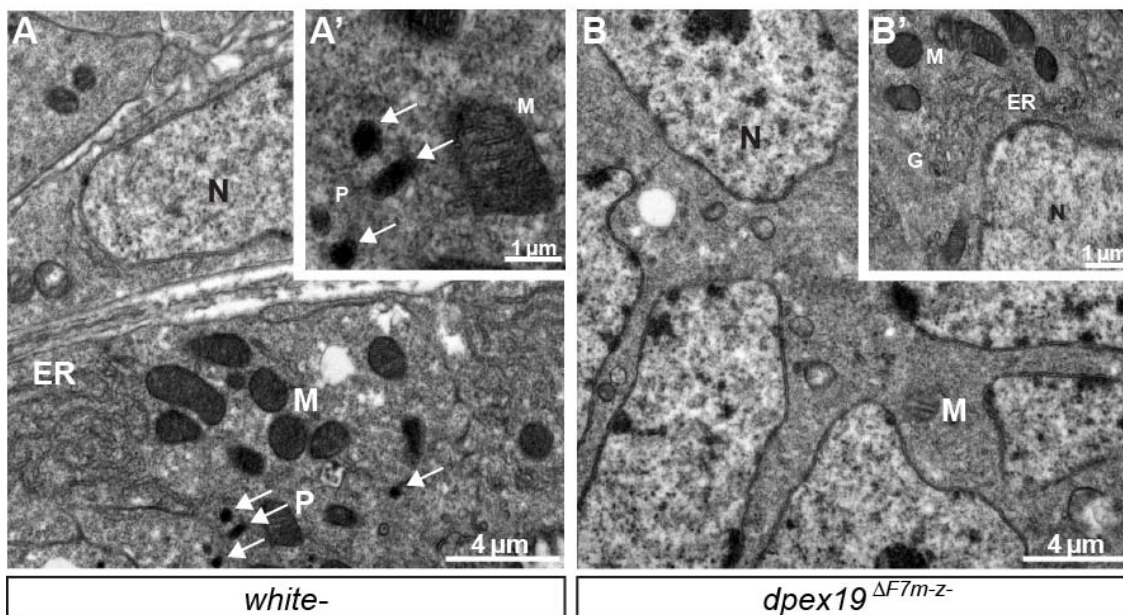


Abb. 4.13: Peroxisomen-Biogenese-Defekte in maternal zygotischen *dpex19^{ΔF7m-z-}* Mutanten. Dargestellt sind transmissions-elektronenmikroskopische Aufnahmen der Ultradünnschnitte von st 17 Embryonen. Die Katalase vermittelte DAB Farbreaktion in den Peroxisomen der Darmzellen zeigt eine nahezu vollständige Reduktion der Peroxisomenanzahl in den *dpex19^{ΔF7m-z-}* Mutanten (B und B'). Im Vergleich sind in den Zellen der *w* Positivkontrolle (A und A') Peroxisomen (Pfeile; P) identifizierbar. Die Zellorganellen wie ER, Golgi Apparat (G), Nukleus (N) und Mitochondrien (M) zeigen morphologisch keine offensichtlichen Veränderungen (B und B').

In *w* Embryonen der Kontrollgruppe konnten zahlreiche DAB positive Peroxisomen in unterschiedlichen Organen, wie z.B. in Zellen des Mitteldarms identifiziert werden (Abb. 4.13 A). Die Peroxisomen befanden sich oft in der Nähe von Mitochondrien oder dem ER (Abb. 4.13 A und A'). Im Vergleich hierzu waren in *dpex19^{ΔF7m-z}* mutanten Embryonen nahezu keine DAB positiven Peroxisomen detektierbar (Abb. 4.13 B und B'). In seltenen Fällen waren vereinzelte leicht kontraststärkere Strukturen zu erkennen, die häufig mit dem Membransystem des Golgi-Apparates und des ERs assoziiert waren (siehe Diskussion 5.2.3). Die sonstige Morphologie der Zellen und deren Organellen wie Nukleus, ER, Golgi-Apparat und Mitochondrien erschien unverändert (Abb. 4.13 B und B'). Zusammenfassend zeigte die Mislokalisierung von dPex3HA (Abb. 4.10) und GFP.SK1 (Abb. 4.12) in *dpex19^{ΔF7}* und die Abwesenheit von DAB-positiven Peroxisomen in der TEM-Analyse, dass dPex19 essentiell für die Peroxisomen-Biogenese in *Drosophila* ist.

Somit konnte gezeigt werden, dass *dpex19^{ΔF7}* Mutanten Peroxisomen-Biogenese-Defekte aufwiesen, die auch für das humane Zellweger-Syndrom beschrieben sind.

4.2.3 Phänotypische Untersuchung der *dpex19^{ΔF7}* Nullmutanten

Wie in der Einleitung beschrieben sterben Zellweger-Syndrom Patienten innerhalb der ersten Monate nach der Geburt, zeigen diverse morphologische Auffälligkeiten und leiden unter degenerativen Defekten des zentralen Nervensystems, der Leber und der Nebennierenrinde. Außerdem leiden die Patienten unter einer psychomotorischen Retardierung mit Mobilitätsverlust, Blind- und Taubheit sowie einer Unfähigkeit zu Schlucken (siehe Einleitung 1.4.2). Im Folgenden werden die *dpex19^{ΔF7}* *Drosophila* Mutanten im Hinblick auf Zellweger-Syndrom charakteristische, phänotypische Anomalien untersucht.

4.2.3.1 Bewegungsdefekte in *dpex19^{ΔF7}* Mutanten

Neben der beschriebenen Letalitätsrate und der Entwicklungsverzögerung zeigten *dpex19^{ΔF7}* mutante Larven und adulte Fliegen starke Bewegungsdefekte.

Wildtypische *w* *Drosophila* Larven entfernten sich am Ende des dritten und somit letzten Larvenstadiums von der Hefe-Futterquelle und gruben Gänge in das Apfelsaftagarmedium („digging behavior“) (Abb. 4.14 A). *dpex19^{ΔF7}* mutante L3 Larven

entfernten sich zwar am Ende der larvalen Entwicklung aus der Hefe, bewegten sich aber weniger und langsamer als *w* Kontrolllarven und zeigten dieses Grabverhalten nicht (Abb. 4.14 B).

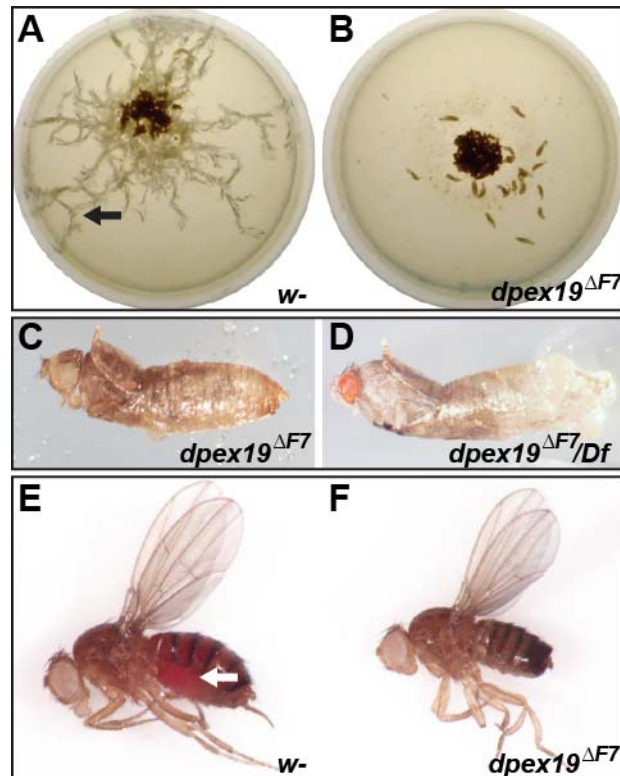


Abb. 4.14: Bewegungsdefekte in $dpex19^{\Delta F7}$ mutanten L3 Larven und adulten Fliegen. A und B: Apfelsaftagarplatten mit jeweils 25 Larven. Wildtypische *w* L3 Larven graben am Ende des dritten Larvenstadiums, kurz vor der Verpuppung Gänge in den Apfelsaftagar (Pfeil in A). $dpex19^{\Delta F7}$ mutante L3 Larven entfernen sich aus dem Futter, zeigen aber kein Grabverhalten (B). C und D: Homozygote $dpex19^{\Delta F7}$ und $dpex19^{\Delta F7}/Df(2)esc^{3-0}$ Adulte sterben während des Schlüpfens aus der Puppenhülle. E und F: Die Verfütterung Carminrot gefärbter Hefe an adulte Fliegen zeigt, dass $dpex19^{\Delta F7}$ Mutanten (F) im Vergleich zu *w* Tieren (Pfeil in E) keine Nahrung aufnehmen.

Weitere Bewegungseinschränkungen zeigten sich im Adultstadium der $dpex19^{\Delta F7}$ Mutanten. Einige Fliegen schlüpften nur mit dem Kopf oder Thorax und versuchten sich zum Teil über mehrere Stunden bis zu drei Tagen mit Hilfe ihrer vorderen Beinpaare aus der Puppenhülle zu befreien (Abb. 4.14 C und D). Diese unkoordinierten Versuche schlugen in etwa 50 % der Fälle fehl und die homozygoten $dpex19^{\Delta F7}$ (Abb. 4.14 C) sowie die $dpex19^{\Delta F7}/Df(2)esc^{3-0}$ (siehe Kapitel 4.2.1.6) Fliegen (Abb. 4.14 D) starben mit dem Abdomen in der Puppenhülle. Die restlichen zehn Prozent der homozygoten $dpex19^{\Delta F7}$ mutanten Fliegen schlüpften aus der Puppenhülle (Abb. 4.14 A), nahmen aber keine Nahrung auf. Dies wurde durch Fütterung Carminrot gefärbter Hefe an *w* und $dpex19^{\Delta F}$ mutanten Fliegen getestet. Die Kontrolltiere zeigten aufgrund der Aufnahme gefärbter Hefe einen roten Bereich im Abdomen, der dem Darm entspricht

(Abb. 4.14 E, Pfeil). Die *dpex19^{ΔF7}* mutanten Fliegen zeigten hingegen ein kleineres Abdomen, in welchem keine rote Hefe detektierbar war. Bei genauerer Beobachtung fiel auf, dass die *dpex19^{ΔF7}* Fliegen ihren Rüssel (Labium) nicht zur Futterquelle bewegten und daher nicht fressen bzw. trinken konnten (Abb. 4.14 F, eigene Beobachtung).

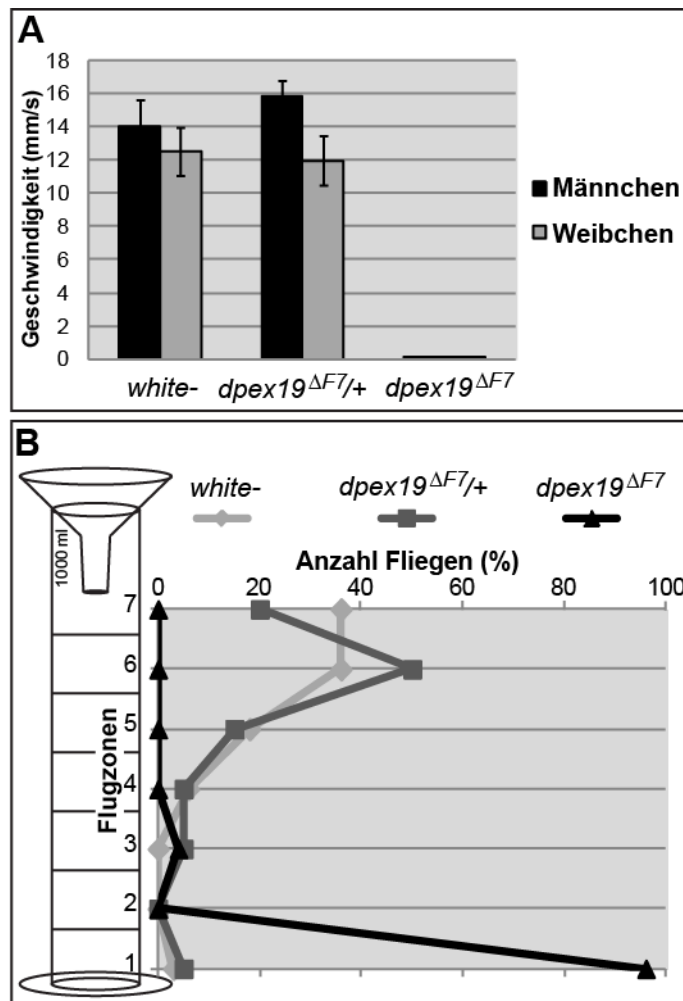


Abb. 4.15: Eingeschränkte Kletter- und Flugfähigkeit *dpex19^{ΔF7}* mutanter Fliegen. A: Grafische Darstellung der Klettergeschwindigkeit von 24 h alten adulten Fliegen. Auf der Abszisse sind die Genotypen aufgetragen. Die Geschwindigkeit der Männchen ist in schwarz, die der Weibchen in grau in mm/s dargestellt. B: Grafische Darstellung der Flugeigenschaft von 24 h alten *w⁻*, heterozygoten *dpex19^{ΔF7/+}* und homozygoten *dpex19^{ΔF7}* Fliegen. Links ist eine Skizze des in sieben Zonen (Ordinate) eingeteilten und innen mit klebrigem Paraffinöl benetzten Messzylinders dargestellt. Die oben abgebildete Abszisse zeigt wie viele Fliegen in Prozent pro Zone gelandet sind.

Darüber hinaus zeigten *dpex19^{ΔF7}* adulte Fliegen eine Beeinträchtigung der Kletter- sowie Flugfähigkeit, die im Folgenden näher untersucht wurde.

Im Rahmen eines Tests auf negatives Geotaxis-Verhalten (siehe Methoden 3.2.12) zur Bestimmung der Kletterfähigkeit wurde die Klettergeschwindigkeit ermittelt und in

einem Diagramm aufgetragen. Gemessen und anschließend gemittelt wurden jeweils drei Kletterversuche von fünf *w* Fliegen, fünf heterozygoten *dpex19^{ΔF7}* Fliegen und fünf homozygoten *dpex19^{ΔF7}* Fliegen. Des Weiteren wurde zwischen 24 h alten Männchen und Weibchen unterschieden. Die Kontrollfliegen mit den Genotypen *w* und *dpex19^{ΔF7}/+* kletterten mit einer Geschwindigkeit von 12-16 mm/s die Gefäßwand herauf. Die Geschwindigkeit der Kontrolltiere und der Geschlechter unterschied sich untereinander nur gering. Die homozygoten *dpex19^{ΔF7}* mutanten Fliegen kletterten hingegen nicht und blieben auch nach mehreren Versuchen auf dem Zylinderboden sitzen (Abb. 4.15 A).

Die Flugfähigkeit der Fliegen wurde ebenfalls durch einen speziellen Versuch quantifiziert. Hierzu wurden Fliegen in einen ein Liter Messzylinder überführt und die Höhe gemessen, in der sie an der mit Paraffinöl beschichteten Zylinderwand kleben blieben (siehe Methoden 3.2.13). Zeigten sie eine gute Flugfähigkeit, wie 24 h alte *w* und *dpex19^{ΔF7}/+* Kontrollfliegen, landeten die Tiere in den oberen beiden von insgesamt sieben Zonen auf der inneren Zylinderwand (Abb. 4.15 B). Die ebenfalls 24 h alten homozygoten *dpex19^{ΔF7}* Fliegen fielen ohne die Zylinderwand zu erreichen auf den klebrigen Boden des Messzylinders in Zone eins und zeigten damit, wie auch schon mit bloßem Auge zu beobachten, eine Flugunfähigkeit (Abb. 4.15 B).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass *dpex19^{ΔF7}* mutante Larven und adulte Fliegen erhebliche Bewegungsbeeinträchtigungen aufwiesen.

4.2.3.2 Neurodegenerative Defekte in *dpex19^{ΔF7}* mutanten Fliegen

Da Bewegungsdefekte, insbesondere eingeschränkte Klettereigenschaften in *Drosophila* häufig durch Neurodegeneration hervorgerufen werden, wurden adulte Gehirne von ein bis vier Tage alten *w* und *dpex19^{ΔF7}* mutanten Fliegen histologisch untersucht. Die fixierten und in Epoxidharz eingebetteten Gehirne wurden nach dem Anfertigen von Semidünnschnitten mit Toluidinblau gefärbt und lichtmikroskopisch in Kooperation mit Dr. Mélisande Richard analysiert (siehe Methoden 3.2.15).

In Übersichtsaufnahmen des unterhalb der Retina gelegenen optischen Lobus von Kontrollfliegen des Genotyps *w* wurde eine Differenzierung in unterschiedliche Bereiche wie Lobula, Medulla, Lobula Platte und Lamina offensichtlich (Abb. 4.16 A). Umgeben und voneinander abgegrenzt sind diese Bereiche durch Ganglienzellen. Die Gehirne *dpex19^{ΔF7}* mutanter Fliegen (Abb. 4.16 B und B') wiesen diese Bereiche ebenfalls auf. Auffällig war aber ein Anreicherung Toluidinblau-positiver Strukturen vor

allem in den Zellkernen der Ganglienzellen, die in den Gehirnen der *w* Kontrollfliegen (Abb. 4.16 A und A') nicht vorkamen. Diese Farbstoffakkumulation deutet auf apoptotische Zellen hin und wird als Indiz für Neurodegeneration in *Drosophila* verwendet (Botella et al, 2004).

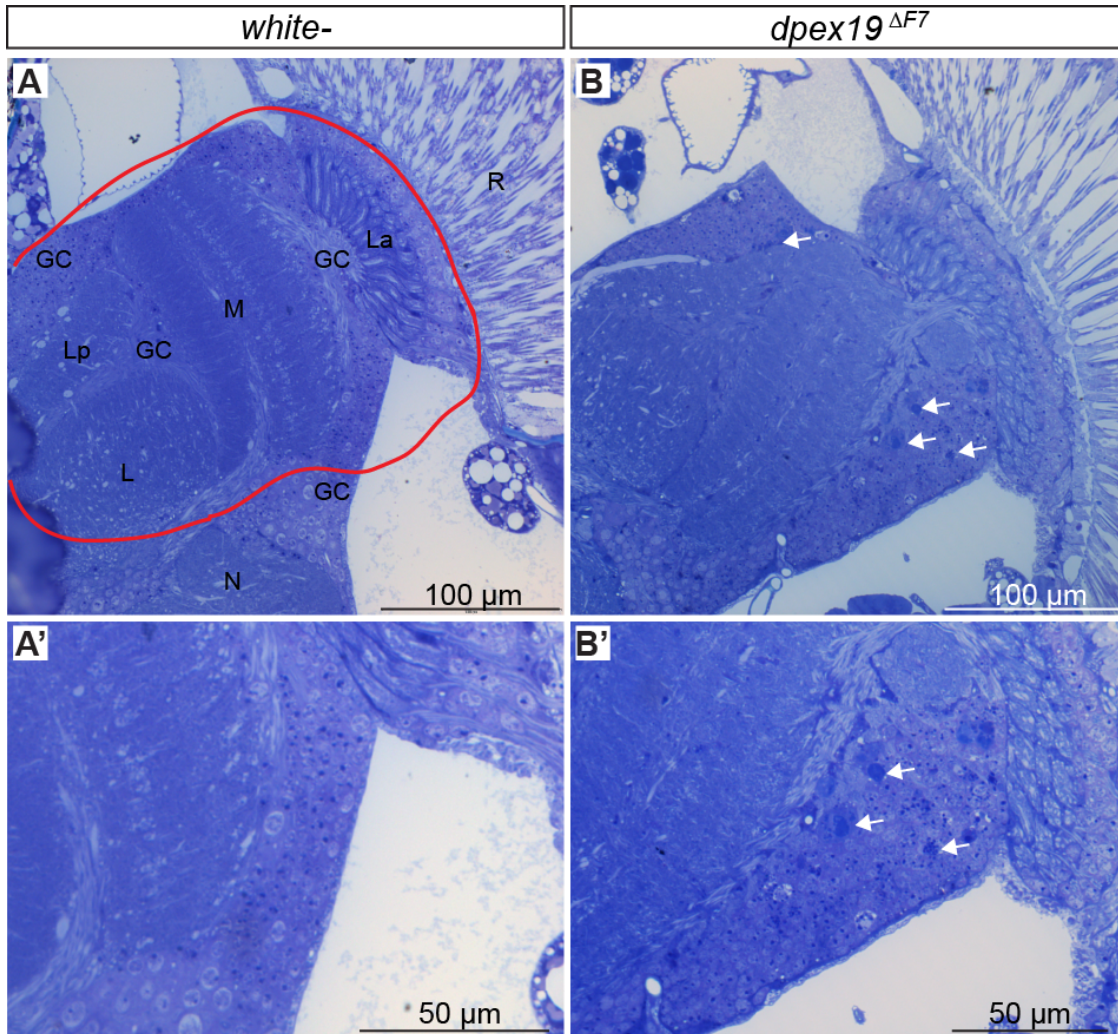


Abb. 4.16: Neurodegenerative Defekte in $dpex19^{\Delta F7}$ mutanten Fliegengehirnen (in Kooperation mit Dr. Mélisande Richard). Die mit Toluidinblau gefärbten Semidünnschnitte des Gehirns (rot umrandet) der *w* (A und A') und $dpex19^{\Delta F7}$ mutanten Fliegen (B und B') zeigen eine Unterteilung des optischen Lobus in: Lamina (La), Ganglienzellen (GC), Lobula (L) und Lobula Platte (Lp). Oberhalb des optischen Lobus ist die Retina (R) partiell abgebildet. Die Pfeile in B und B' zeigten eine Akkumulierung Toluidinblau positiv gefärbter Zellkerne in Gehirnen von $dpex19^{\Delta F7}$ Mutanten. Diese Aggregate sind Anzeichen apoptotischer Zellen und deuten auf eine beginnende Neurodegeneration hin (Botella et al, 2004).

4.2.3.3 $dpex19^{\Delta F7}$ Mutanten entwickeln melanotische Knoten

Bei makroskopischer Betrachtung einiger $dpex19^{\Delta F7}$ Larven, Puppen und adulten Fliegen wurden braune bis schwarze Verfärbungen ersichtlich, die nicht in den *w* Kontrollen auftraten. Diese melanotischen Knoten (Markovic et al, 2009) konnten in

etwa 25 % der *dpex19^{ΔF7}* mutanten L3 Larven beobachtet werden. Erkennbar wurden dann braune oder schwarze unterschiedlich große Knoten unterhalb der Epidermis (Abb. 4.17 A-C). Sie traten in verschiedenen Bereichen und ohne Assoziation zu einem bestimmten Organ auf. Nach Präparation dieser Knoten wurde ersichtlich, dass sie in Form, Größe und Farbe ein heterogenes Erscheinungsbild hatten (Abb. 4.17 L).

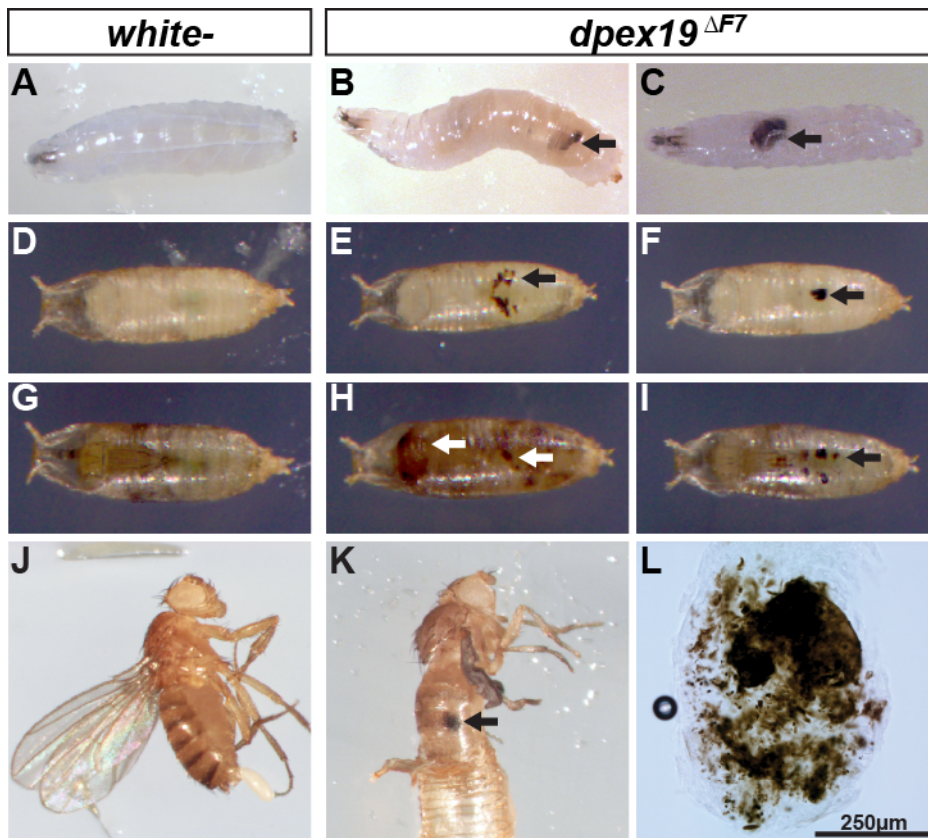


Abb. 4.17: Melanotische Knoten in *dpex19^{ΔF7}* Mutanten. Die Fotos zeigen *w⁺* Kontrolltiere (links) und zygotische *dpex19^{ΔF7}* Mutanten (Mitte und rechts), die in unterschiedlichen Entwicklungsstadien melanisierte Knoten bilden. In A-C sind L3 Larven, in D-F einen Tag alte Puppen, in G-I drei bis vier Tage alte Puppen und in J bzw. K adulte Fliegen dargestellt. Die Knoten in den Mutanten sind mit Pfeilen gekennzeichnet. In L ist ein freipräparierter Knoten einer *dpex19^{ΔF7}* mutanten L3 Larve abgebildet.

Vor allem während der Metamorphose zeigte ein Großteil der *dpex19^{ΔF7}* Mutanten melanisierte Knoten (Abb. 4.17 E-I). Die meisten Tiere mit melanotischen Knoten starben während des Puppenstadiums (Abb. 4.8 A). Nur wenige *dpex19^{ΔF7}* Mutanten schlüpfen trotz Knotenbildung aus der Puppenhülle (Abb. 4.17 K). In *w⁺* Kontrolltieren konnten derartige Strukturen in keinem Entwicklungsstadium festgestellt werden (Abb. 4.17 A, D, G und J).

Die melanotischen Knoten traten überwiegend bei *dpex19^{ΔF7}* Mutanten auf, die mit Standard Instant Futter (Jazz-Mix, Fisher Scientific) gefüttert wurden. Die Fütterung

von Hefe auf Apfelsaftagarplatten führte nur in unter 5 % der *dpex19^{ΔF7}* mutanten Tiere zur Bildung von melanotischen Knoten (siehe Diskussion 5.2.2).

4.2.4 Physiologische Untersuchungen der *dpex19^{ΔF7}* Mutanten

Da *dpex19^{ΔF7}* Mutanten, ähnlich wie Zellweger-Syndrom Patienten, keine Peroxisomen ausbilden und entsprechende phänotypische Anomalien aufweisen, soll in diesem Kapitel untersucht werden, ob der Verlust von Peroxisomen in *Drosophila* auch zu ähnlichen Beeinträchtigungen des Metabolismus führt.

4.2.4.1 *dpex19^{ΔF7}* Mutanten leiden unter oxidativem Stress

Eine mögliche Ursache für die reduzierte Lebensdauer, die gemessenen Bewegungsdefekte, die beobachteten melanotischen Knoten und die Neurodegeneration in *dpex19^{ΔF7}* Mutanten könnte oxidativer Stress sein. Wie in der Einleitung geschildert, katalysieren peroxisomale Enzyme die Detoxifikation von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), die oxidativen Stress verursachen und zellschädigend wirken (siehe Einleitung 1.2.1). Da in *dpex19^{ΔF7}* Mutanten die Biogenese der Peroxisomen defekt ist (siehe Kapitel 4.2.2.4 und 4.2.2.5) und sich dadurch ROS anreichern könnten, wurden via qRT-PCR oxidative Stressmarker in *dpex19^{ΔF7}* Mutanten analysiert.

Für diese Transkriptanalyse wurde neben oxidativen Stressmarkern auch die mRNA Expression einiger Peroxin-, Apoptose- und Metabolismogene untersucht. Die Expression dieser Gene in *dpex19^{ΔF7}* Mutanten wurde auf die wildtypische *w* Expression in den jeweiligen Entwicklungsstadien normalisiert (rote Gerade Abb. 4.18 A und B). Als Referenzgene wurden *rp49* und *actin* verwendet.

Die Expressionsanalyse wurde mit der in cDNA umgeschriebenen mRNA aus *w* und *dpex19^{ΔF7}* mutanten L2, L3 und adulten *Drosophila* durchgeführt. Obwohl die *dpex19* Expression in allen gemessenen Entwicklungsstadien der *dpex19^{ΔF7}* Mutanten unterhalb der Detektionsgrenze und damit bei null lag, offenbarte die analysierte Markergenexpression in Abhängigkeit des Stadiums relativ große Schwankungen. Hierzu zählt vor allem die Expression der Markergene für den Stoffwechsel und für Apoptose (Abb. 4.18 A).

Die Expression der am Fettmetabolismus beteiligten und unter Hunger induzierbaren Gene *4E-BP* (Teleman, 2005) und *lipase3* (Zinke et al, 2002) stieg mit dem

Fortschreiten der Entwicklungsstadien in den *dpex19^{ΔF7}* Mutanten bis auf das Dreifache bzw. Achtfache an (Abb. 4.18 A). Hierzu sei erwähnt, dass die *dpex19^{ΔF7}* mutanten L3 Larven und vor allem die adulten Fliegen kaum bzw. nicht fraßen (siehe Kapitel 4.2.3.1). Die *sterol regulatory element binding protein (SREBP)* Expression war in *dpex19^{ΔF7}* mutanten L3 Larven und in der Imago doppelt so hoch wie in der Kontrolle (Abb. 4.18 A). Es ist an der Fettsäurehomöostase beteiligt und aktiviert die Transkription von Genen, dessen Genprodukte essentielle Teilschritte im Fettsäuremetabolismus ausführen (Seegmiller AC, 2002). Zu diesen SREBP Zielgenen zählen die in *dpex19^{ΔF7}* mutanten L3 Larven induzierten Gene *HMG-CoA-Reduktase*, *acetyl-CoA-Synthetase* und *acetyl-CoA Carboxylase* (Abb. 4.18 A, Bauer et al, 2009). Die HMG-CoA-Reduktase katalysiert in Säugetieren den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Cholesterinsynthese (Berg et al, 2003). Die Acetyl-CoA-Synthetase spielt ebenfalls eine essentielle Rolle im Fettsäureanabolismus (Montooth et al, 2006). Die Acetyl-CoA-Carboxylase (Zinke et al, 2002) katalysiert den ersten und geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Fettsäuresynthese (Berg et al, 2003).

Die pro-apoptischen Markergene *reaper (rpr)* und *grim* (Goyal et al, 2000) unterlagen in *dpex19^{ΔF7}* Mutanten Schwankungen ohne erkennbare Tendenz (Abb. 4.18 A). Die Expression für den oxidativen Stressmarker *sod2* (Kirby et al, 2002) und *cyp4A1* war in späteren Stadien ausgeprägter als im L2 Stadium, in welchem noch keine Phänotypen offensichtlich waren (Abb. 4.18 A). Sie reichte von einer 50 prozentigen Repression im Falle von *sod2* im L2 Stadium bis zu einer vierfachen Induktion im Falle von *cyp4A1* in L3 Larven. Die Genprodukte der *cytochrom P450 (cyp450)* Superfamilie sind an der oxidativen Detoxifikation verschiedener endogener und exogener (Xenobiotika) Substanzen beteiligt (Falckh et al, 1997). *cyp450* Gene werden ebenfalls durch oxidativen Stress aktiviert (Christoph Grünewald, 2006). Die *ugt86di* Expression, ein weiterer Marker, der durch oxidativen Stress reguliert wird, stieg im Laufe der Entwicklung von L2 über L3 bis zur Imago an und lag mit einer drei- bis viereinhalb fachen Induktion im Vergleich zur *w* Kontrolle auf einem konstant hohen Niveau (Abb. 4.18 A). Ugt86di ist eins der insgesamt 33 bekannten UDP-Glycosyltransferasen (UGTs) in *Drosophila*. Diese Enzyme übernehmen eine wichtige Rolle in der Detoxifikation einer Auswahl von endogenen und exogenen Substanzen (Mourikis et al, 2006).

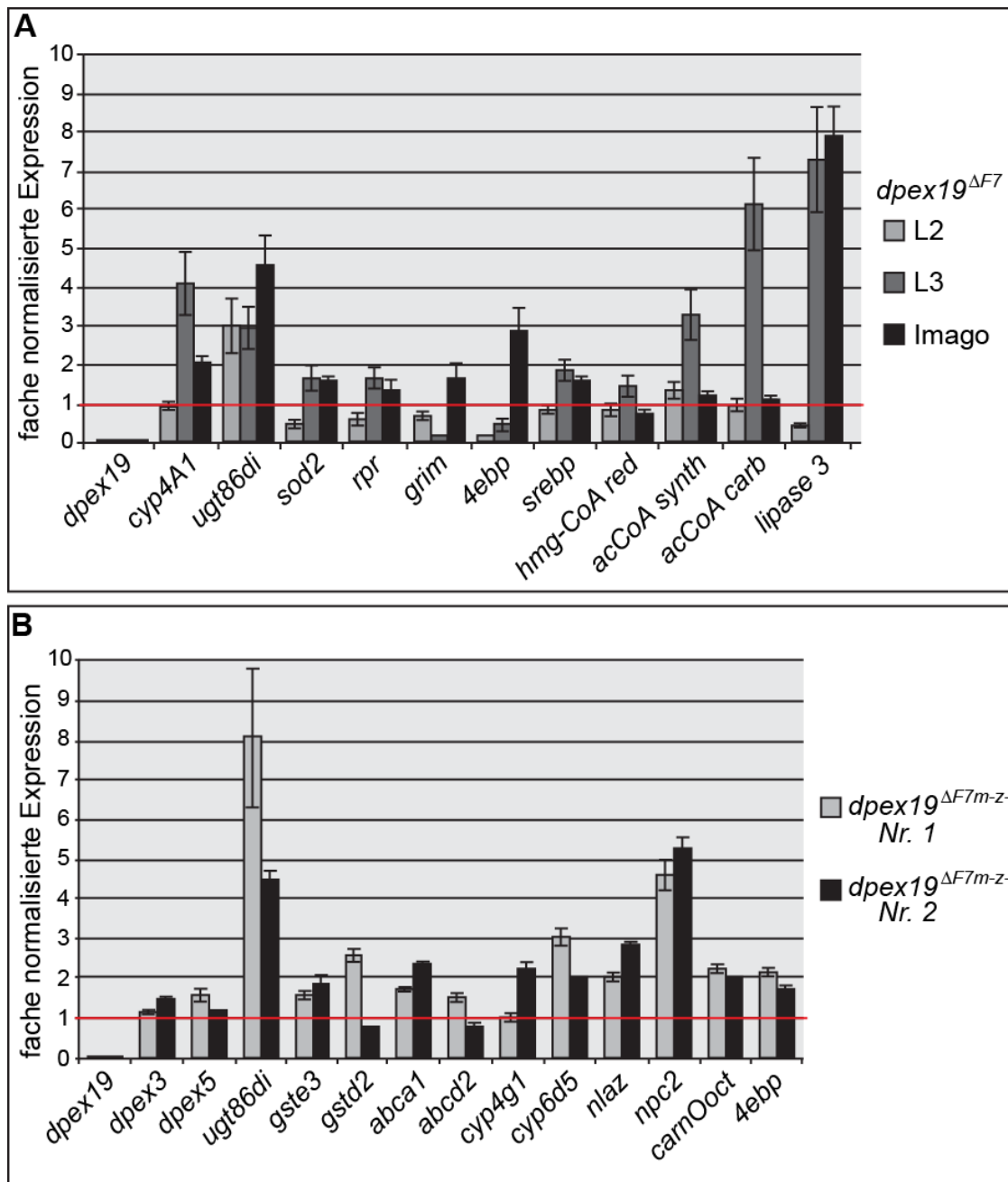


Abb. 4.18: qRT-PCR Expressionsanalyse in *dpex19*^{ΔF7} Mutanten. A: Dargestellt sind die auf den entsprechenden \bar{w} Wert (rote Gerade) normalisierten Expressionslevel verschiedener Gene, die eine wichtige Funktion im Metabolismus, der Apoptose, der Detoxifikation und bei oxidativem Stress in *dpex19*^{ΔF7} mutanten L2 Larven, L3 Larven und Adulten (Imago) übernehmen. B: Das Balkendiagramm zeigt das normalisierte (rote Gerade) Expressionslevel von Markergenen der Peroxisomen-Biogenese, des Metabolismus, der Detoxifikation und bei oxidativem Stress in maternal zygotischen *dpex19*^{ΔF7m-z} mutanten st 17 Embryonen. *cytochrom P450 (cyp)*, *UDP-glykosyltransferase (Ugt)*, *superoxid dismutase (sod)*, *reaper (rpr)*, „*sterol regulatory biniding protein*“ (*SREBP*) *glutathion-S-transferase (gst)*, *neural lazarrillo (nlaz)*, *niemann pick krankheit Typ C1 (npc1)*, *carnetin-O-oktanyltransferase (carnOoct)*, „*ATP-binding cassette transporter*“ (*abc*).

Um die Auswirkungen des *dpex19* Funktionsverlustes im Kontext des oxidativen Stress näher zu analysieren und um die vom Entwicklungsstadium und Fressverhalten abhängigen Schwankungen der Genexpression zu umgehen, wurde die

Expressionsanalyse mittels qRT-PCR mit der cDNA aus maternalen zygotischen *dpex19^{ΔF7m-z-}* nullmutanten st 17 Embryonen wiederholt und erweitert. Dazu wurde die Expressionsanalyse einiger weniger stark regulierten Gene durch weitere oxidative Stress- bzw. Detoxifikationsmarker und die *peroxine dpex3* und *dpex5* ersetzt. Außerdem wurde die qRT-PCR simultan mit je zwei unabhängig gewonnenen embryonalen cDNAs sowohl für die *dpex19^{ΔF7m-z-}* Mutanten als auch für die *w* Kontrollembryonen durchgeführt. Die Expressionsanalyse der Transkript und Protein nullmutanten *dpex19^{ΔF7m-z-}* Embryonen im Vergleich zu den *w* Kontrollembryonen zeigte, dass die *dpex3* und *dpex5* Expression nicht reguliert war (Abb. 4.18 B). Die Expression der *Carnitin-O-Oktanyltransferase (COT)* war ca. zweifach induziert (Abb. 4.18 B). Ihr Genprodukt ist für den Fettsäuretransport vom Zytosol in die mitochondriale Matrix essentiell. Dort werden die Fettsäuren durch β -Oxidation metabolisiert (Berg et al, 2003). Das in den zygotischen *dpex19^{ΔF7}* mutanten Larven und Adulten induzierte *4e-bp* zeigte auch in maternal zygotischen *dpex19^{ΔF7m-z-}* mutanten Embryonen eine zweifache Induktion (Abb. 4.18 B).

Die Expression von *neural lazarell* (*nlaz*), einem Ortholog des Vertebraten Apolipoprotein D, war zwei- bis dreifach erhöht in *dpex19^{ΔF7m-z-}* Mutanten (Abb. 4.18 B). *Nlaz* ist an der oxidativen Stressantwort und an der Triacylglycerid (TAG) und Kohlenhydrat Homöostase beteiligt (Hull-Thompson et al, 2009).

Das *Niemann Pick Krankheit Typ C2 (npc2)* Gen war fünffach induziert (Abb. 4.18 B). Es ist in *Drosophila* in die Cholesterinhomöostase, Erinnerung und Alterung involviert (Niwa & Niwa, 2011; Huang et al, 2007).

Verschiedene an der Entgiftung von endogenen und xenobiotischen Substanzen beteiligte und bei oxidativem Stress regulierte Gene wiesen in der *dpex19^{ΔF7m-z-}* Mutante eine erhöhte Expression auf. Hierzu zählen die Enzyme der Glutathion-S-Transferase-Familie *GstE3* und *GstD2*, deren Expression in etwa zweifach induziert war (Abb. 4.18 B). GSTs bilden eine Familie multifunktionaler Enzyme, die neben der Detoxifikation und dem Schutz vor oxidativem Stress an der Hormonbiosynthese beteiligt sind (Enayati et al, 2005). Das in zygotischen *dpex19^{ΔF7}* mutanten Larven und Adulten induzierte *Ugt86di* war auch in *dpex19^{ΔF7m-z-}* mutanten Embryonen mit viereinhalb bis achtfacher Induktion deutlich hochreguliert (Abb. 4.18 B). UGTs übertragen zwecks Detoxifikation UDP-Zucker auf zellschädigende endogene oder exogene Moleküle, verringern so deren Hydrophobizität und erleichtern damit deren Ausscheidung aus der Zelle (Luque & O'Reilly, 2002). Die in *dpex19^{ΔF7m-z-}* Mutanten hochregulierten Gene *Cyp4g1* und *Cyp6d5* sind Mitglieder der großen Cytochrom P450 (Cyp 450) Familie (Abb. 4.18 B). Sie kodieren für Monooxygenasen mit breiter

Substratspezifität. Sie sind ebenfalls an der Entgiftung toxischer Substanzen beteiligt, katalysieren Teilschritte der Steroid- und Gallensäuresynthese und sind durch oxidativen Stress induzierbar (Lewis, 2004; Ingelman-Sundberg, 2005; Ferguson & Tyndale, 2011).

Zusammenfassend ergab die Expressionsanalyse der *dpex19^{ΔF7}* Mutanten, dass neben verschiedenen Genen des Fettsäurestoffwechsels vor allem Marker der Detoxifikation und des oxidativen Stress erhöht waren.

4.2.4.2 In *dpex19^{ΔF7}* Mutanten akkumulieren sehr langkettige Fettsäuren

Da Peroxisomen in unterschiedlichen Modellorganismen als Ort der β -Oxidation der sehr langkettigen Fettsäuren beschrieben werden, wurde die Fettsäurezusammensetzung von *w* und *dpex19^{ΔF7}* mutanten Puppen analysiert und verglichen. Ob die in *dpex19^{ΔF7}* Mutanten defekte Peroxisomen-Biogenese (Abb. 4.10, Abb. 4.12 und Abb. 4.13) ähnlich wie auch in Zellweger-Syndrom Patienten (siehe Einleitung 1.4.2.) zu einer Akkumulation von sehr langkettigen Fettsäuren führt, wurde durch Gaschromatografie mit anschließender Massenspektrometrie (GCMS) untersucht (siehe Methoden 3.3). Um ausreichendes Ausgangsmaterial für die Messung der äußerst gering konzentrierten sehr langkettige Fettsäuren zu erhalten, wurden jeweils 100 *w* und homozygote *dpex19^{ΔF7}* Puppen analysiert. Für die Analysen wurden 24-28 h alte Puppen verwendet. Jeder gemessene Wert für eine Fettsäure wurde als prozentualer Anteil der gemessenen Fettsäure an allen Fettsäuren der jeweiligen Probe ermittelt (Abb. 4.19 A). Anschließend wurden die Werte der *dpex19^{ΔF7}* mutanten Puppen auf den Prozentwert der *w* Probe normalisiert. Somit wird in Abb. 4.19 B das Verhältnis jeder gemessenen Fettsäure zwischen *dpex19^{ΔF7}* mutanten und *w* Puppen dargestellt.

Die Darstellung der prozentualen Anteile einer jeden gemessenen Fettsäure an den Anteilen der insgesamt ermittelten Fettsäuren zeigt, dass die verschiedenen Fettsäuren in *w* und *dpex19^{ΔF7}* mutanten Tieren unterschiedlich stark vertreten waren. Mit jeweils über 15 % machten die Myristinsäure (C14:0), die Palmitinsäure (C16:0), die Palmitoleinsäure (C16:1) und die Ölsäure (C18:1) den Großteil der Fettsäuren in beiden Genotypen aus. Die gesättigten Fettsäuren (C12:0) und (C18:0) waren hingegen mit jeweils unter 2 % relativ gering konzentriert (Abb. 4.19 A). Die zu den langkettigen bzw. sehr langkettigen zählenden gesättigten Fettsäuren mit den Kettenlängen C20–C28 waren mit 0,0005 bis 0,05 % um einen Faktor von bis zu

50.000 fach geringer konzentriert als die oben genannten vorherrschenden vier Fettsäuren (Abb. 4.19 A).

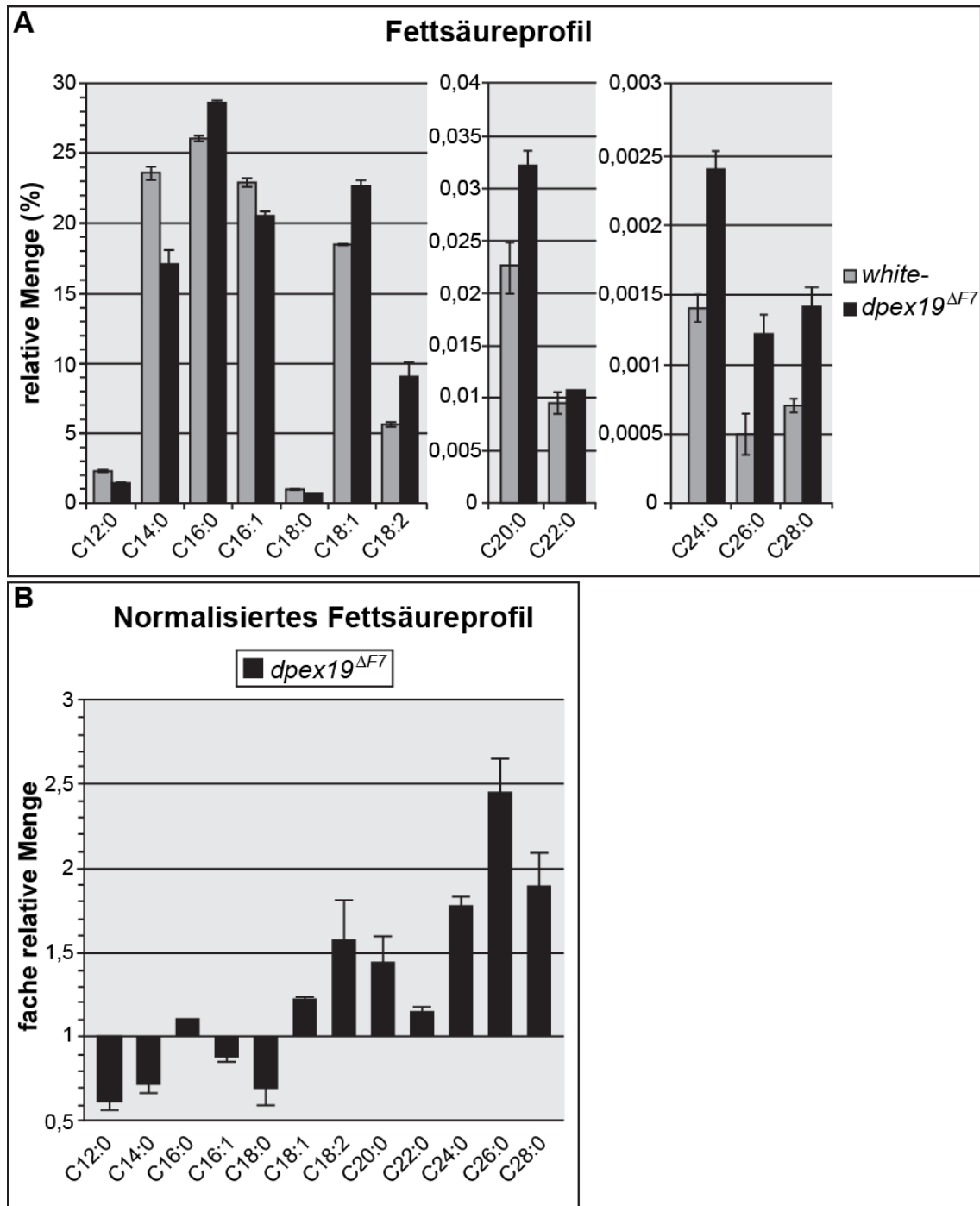


Abb. 4.19: Sehr langkettige Fettsäuren akkumulieren in *dpex19*^{ΔF7} Mutanten. Grafische Auswertung des durch GC/MS erhaltenen Fettsäureprofils von *w* und *dpex19*^{ΔF7} Tag 1 Puppen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Proben. In A und B sind die Fettsäuren der Länge und des Sättigungsgrades nach auf der Abszisse dargestellt. Die drei Ordinaten des Säulendiagramms in A ermöglichen die Darstellung der sehr variablen Konzentrationen der unterschiedlichen Fettsäuren und stellen das relative prozentuale Mengenverhältnis jeder einzelnen Fettsäure zu den insgesamt gemessenen Fettsäuren der entsprechenden Probe dar. In B wurden die gemittelten relativen prozentualen Werte jeder Fettsäure der *dpex19*^{ΔF7} Probe auf das entsprechende Niveau der *w* Werte normalisiert.

Nach Normalisierung der relativen Prozentwerte einer jeden Fettsäure auf den entsprechenden relativen w Fettsäurewert ergab sich eine deutliche Anreicherung der sehr langkettigen Fettsäuren in den $dpex19^{\Delta F7}$ mutanten Puppen. So waren die Lignocerin- (C24:0), Cerotin- (C26:0), und Montansäure (C28:0) in den $dpex19^{\Delta F7}$ mutanten Puppen im Vergleich zu den w Tieren zwischen 1,7-2,5 fach angereichert (Abb. 4.19 B). Die meisten anderen gemessenen gesättigten Fettsäuren wurden nicht in einem ähnlich hohen Maße angereichert. Auffallend ist allerdings, dass die Konzentration an Laurin- (C12:0) und Myristinsäure (C14:0) in $dpex19^{\Delta F7}$ Mutanten stark reduziert war. Darüber hinaus war eine Anreicherung der mehrfach ungesättigten Fettsäure C18:2 zu verzeichnen (Abb. 4.19 B).

Zusammenfassend ergab sich eine abweichende Fettsäurezusammensetzung der homozygoten $dpex19^{\Delta F7}$ Puppen von den w Kontrollpuppen mit drei Auffälligkeiten. Erstens waren in $dpex19^{\Delta F7}$ Mutanten ähnlich wie im Blutserum von Zellweger-Syndrom Patienten die sehr langkettigen Fettsäuren erhöht. Zweitens war die mehrfach ungesättigte Linolsäure erhöht und drittens waren die Konzentrationen der mittelkettigen und langkettigen Fettsäuren erniedrigt.

4.2.5 Untersuchung des Nahrungseinflusses auf den $dpex19^{\Delta F7}$ mutanten Phänotyp

Wie aus einer Veröffentlichung von Chen und Kollegen hervorgeht, gibt es einen kausalen Zusammenhang zwischen der Schwere der Phänotypen von *Drosophila pex* Mutanten und der Konzentration von Fettsäuren im Futter. So führte die Verfütterung sehr langkettiger freier Fettsäuren zu einer Verstärkung der beobachteten Phänotypen, während der Zusatz von kürzeren freien Fettsäuren keinen Einfluss zeigte (Chen et al, 2010).

Um nun zu untersuchen, ob die Verfütterung von Fettsäuren ebenfalls einen Einfluss auf die $dpex19^{\Delta F7}$ Mutation vermittelten Phänotypen hat, wurden im Folgenden verschiedene Futterexperimente durchgeführt.

4.2.5.1 Ein Futterzusatz von Kokosnussöl oder Butter rettet die $dpex19^{\Delta F7}$ vermittelte Letalität

Wie von Chen und Kollegen beschrieben, wurden 2,5 % der freien Fettsäuren Palmitinsäure (C16:0), Ölsäure (C18:1), Behensäure (C22:0) und Lignocerinsäure

(C24:0) ins Futter gemischt und *w* bzw. *dpex19^{ΔF7}* Mutanten Larven verabreicht (Chen et al, 2010). Hier zeigte sich, dass die Verfütterung freier Fettsäuren bereits in *w* Kontrolltieren zu einer hohen Letalität führte (siehe Anhang 7.9). Im Falle der *dpex19^{ΔF7}* Mutanten wirkte sich die Verfütterung der Fettsäuren entgegen den Erwartungen aus. So wurde die Überlebensrate der *dpex19^{ΔF7}* Mutanten durch die Verfütterung der sehr langkettigen Fettsäuren C22:0 und C24:0 weniger stark beeinträchtigt als durch die Verfütterung der Fettsäuren C16:0 und C18:1 (siehe Anhang 7.9). Auch nach mehrmaligen Konzentrationsänderungen bis auf ein Zehntel (0,25 %) der veröffentlichten Fettsäurekonzentration bewirkten die freien Fettsäuren sowohl bei *w* Tieren als auch bei *dpex19^{ΔF7}* Mutanten eine erhöhte Letalität, weshalb dieser Ansatz nicht weiter verfolgt wurde.

Um dennoch den Einfluss verschiedener Nahrungsfette auf den *dpex19^{ΔF7}* Phänotyp untersuchen zu können, wurden herkömmliche Fette und Öle für die Fütterungsexperimente verwendet. Hierzu wurden 10 % Butter, Olivenöl oder Kokosnussöl in Frischhefepaste gemischt. Hefe ohne Zusatz von Nahrungsfetten wurde als Kontrolle verwendet. Als fünfte Bedingung wurde eine Hefepaste inklusive 5 % Olivenöl und 5 % Kokosnussöl hergestellt. Die verschiedenen Hefepasten wurden dann auf Apfelsaftagarplatten an jeweils 50 *w* und 50 homozygote *dpex19^{ΔF7}* mutante L1 Larven verfüttert. Ausgewertet wurden die prozentualen Anteile der verpuppten bzw. adulten Fliegen in Bezug auf die Ausgangspopulation von 50 L1 Larven pro Genotyp und Nahrungsbedingung.

Auf allen fünf Futterbedingungen erreichten ca. 90 bis 98 % der *w* Kontrolltiere das Puppen- und Adultstadium (Abb. 4.20). Hingegen entwickelten sich *dpex19^{ΔF7}* Mutanten abhängig von den Futterbedingungen unterschiedlich weit. Auf Hefekontrollfutter ohne Zusatz von Fett verpuppten sich 30 %, auf dem mit 10 % Olivenöl versetzten Hefefutter 40 % der *dpex19^{ΔF7}* Mutanten (Abb. 4.20 A). Ca. 10 % der mit Hefe und Hefe plus Olivenöl gefütterten mutanten Larven wurden adulte Fliegen (Abb. 4.20 B). Die Zugabe von 10 % Butter, 10 % Kokosnussöl oder 5 % Kokosnussöl plus 5 % Olivenöl zum Hefefutter führte zu einem Rettungseffekt der *dpex19^{ΔF7}* Mutation vermittelten Letalität im späten Larven- und Puppenstadium. So verpuppten sich auf den drei Futterbedingungen über 80 % der *dpex19^{ΔF7}* mutanten Larven und 45 % (Hefe + 10 % Butter) bis über 85 % (Hefe + 10 % Kokosnussöl) wurden adult. Das 10%ige Kokosnussölfutter zeigte dabei den größten Rettungseffekt. Mit nahezu 90 % wurden fast gleich viele *dpex19^{ΔF7}* mutante Tiere adult wie in der *w* Kontrolltiergruppe. Das Verfüttern der mit 5 % Olivenöl plus 5 % Kokosnussöl

versetzten Hefepaste führte in ca. 75 Prozent der *dpex19^{ΔF7}* Mutanten zum Überleben bis zur Imago (Abb. 4.20 B).

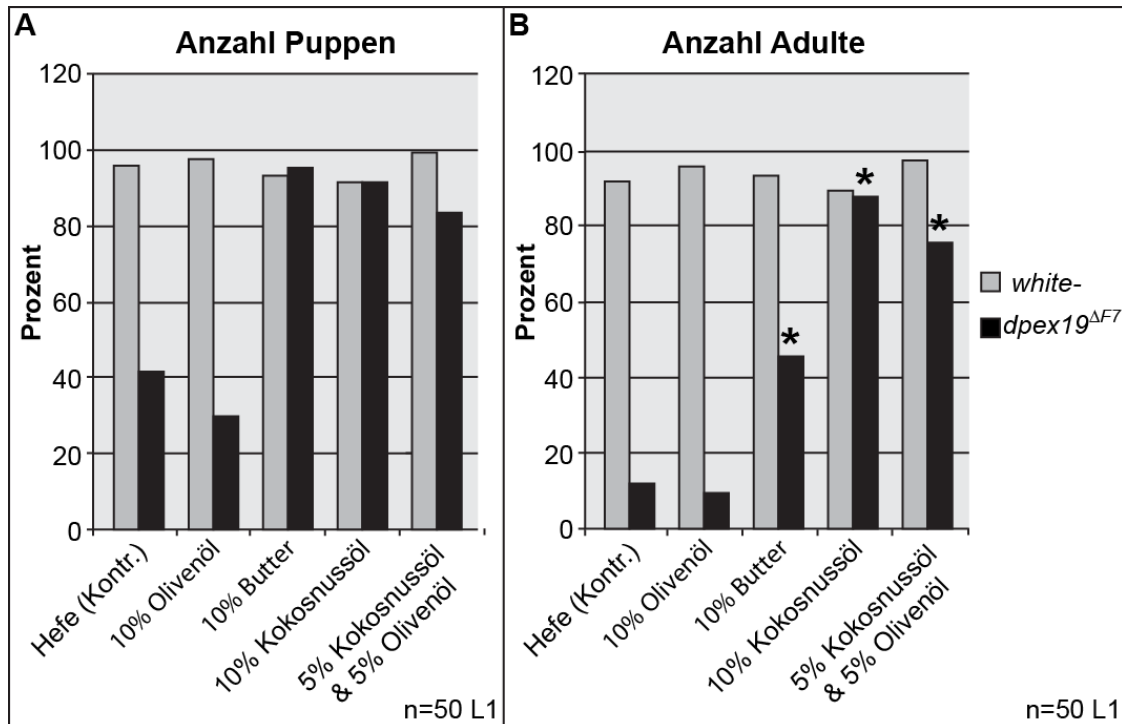


Abb. 4.20: Nahrungsabhängige Rettung der larvalen und pupalen Letalität von *dpex19^{ΔF7}* Mutanten. Dargestellt ist der prozentuale Anteil von *w* (graue Balken) und *dpex19^{ΔF7}* mutanten Tieren (schwarze Balken) die sich von einer Startpopulation von jeweils 50 L1 Larven verpuppen (A) bzw. Adulte (B) werden. Auf der Abszisse sind die unterschiedlichen Futterbedingungen angegeben. Angegeben ist der prozentuale Anteil der jeweiligen Fettquelle in Frischhefepaste. * Die geschlüpften Fliegen können fliegen, werden älter als fünf Tage sind aber steril.

Die geschlüpften mit Butter oder Kokosnussöl gefütterten *dpex19^{ΔF7}* mutanten Fliegen waren wie die auf Kontrollfutter gehaltenen Tiere steril, wurden aber zum Teil älter als zehn Tage, waren agiler als die mit Hefe gefütterten Tiere und konnten Klettern und Fliegen. Dieser Effekt der verbesserten Agilität wurde bereits im Larvenstadium offensichtlich (Abb. 4.21). So zeigten die mit Butter oder Kokosnuss gefütterten *dpex19^{ΔF7}* mutanten L3 Larven ein wildtypisches „digging behavior“ und gruben Gänge in den Apfelsaftagar (Abb. 4.21 A, B, C und F). Im Vergleich dazu gruben die nur mit Hefe gefütterten *dpex19^{ΔF7}* mutanten Larven (Abb. 4.21 B und E), genauso wie jene, die mit Hefe plus 10 % Olivenöl (Abb. 4.21 A und D) gefüttert wurden, nur sehr wenige bis keine Gänge in den Apfelsaftagar.

Zusammenfassend ergaben die Futterexperimente, dass die Verfütterung freier Fettsäuren nach Chen *et al.* nicht die erwarteten Effekte zeigten. Hingegen konnten durch Verfütterung von Fetten und Ölen, in denen die Fettsäuren als TAGs gebunden

vorlagen, die Letalitätsrate sowie einige Phänotypen moduliert werden (siehe Diskussion 5.3.2). Dabei zeigte der Zusatz von Kokosnussöl zum Futter den stärksten Rettungseffekt.

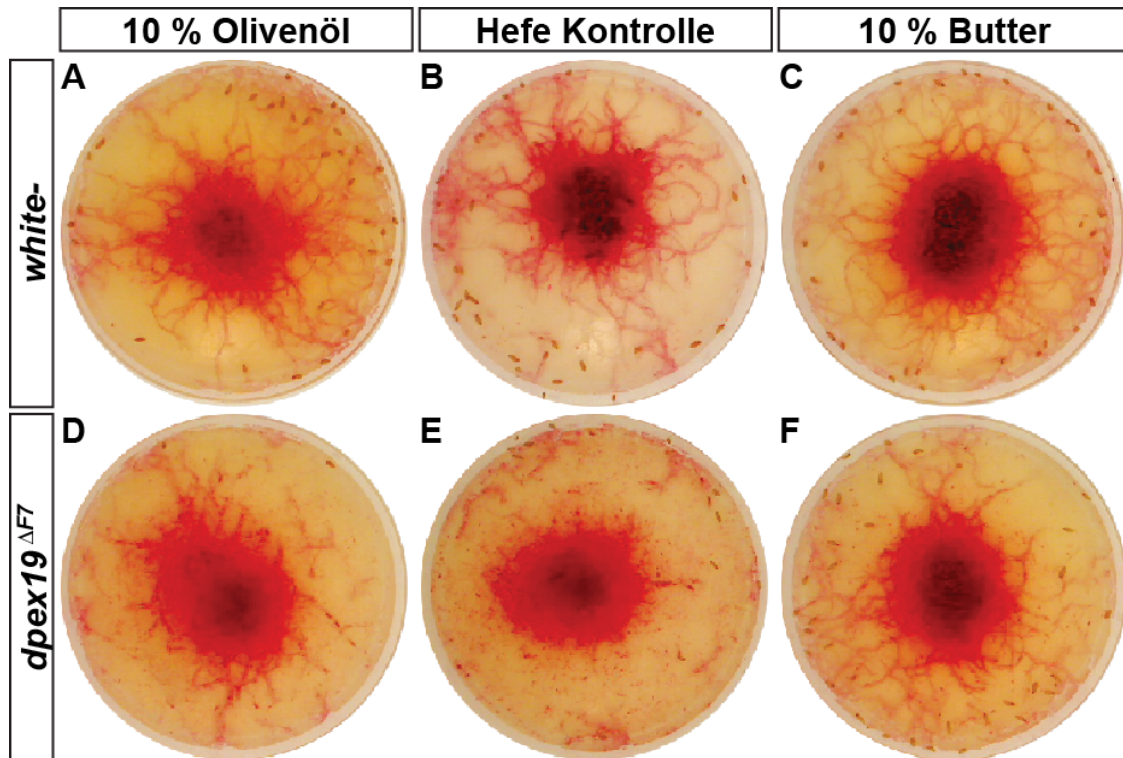


Abb. 4.21: Rettung der $dpex19^{\Delta F7}$ vermittelten Bewegungsdefekte mit Butter. w- L3 Larven entfernen sich am Ende der larvalen Entwicklung aus der Hefefutterquelle (Carminrot gefärbt) und graben unabhängig ob die Hefe ohne Zusatz (E) oder mit Zusatz von Olivenöl (D) oder Butter (F) verabreicht wurde, Gänge in den Apfelsaftagar. $dpex19^{\Delta F7}$ mutante L3 Larven, die mit Hefe oder Hefe plus Olivenöl gefüttert wurden entfernen sich zwar auch aus der Hefe, graben aber nur wenige oder keine Gänge in den Apfelsaftagar. Die Verfütterung von Hefe plus Butter bewirkt eine Rettung des eingeschränkten Grabverhaltens von $dpex19^{\Delta F7}$ Mutanten.

4.2.5.2 Mittelkettige Nahrungs-TAGs retten $dpex19^{\Delta F7}$ vermittelte Letalität

Um genauer zu spezifizieren welche Komponente in Kokosnussöl und Butter die Rettung der Letalität von $dpex19^{\Delta F7}$ Mutanten bewirkte, wurde die Zusammensetzung von Kokosnussöl, Butter und Olivenöl recherchiert. Bei einem Vergleich der Triacylglycerid (TAG) Fettsäurezusammensetzung wurde ersichtlich, dass Kokosnussöl und Butter zu großen Teilen aus kurz- (Butter) und mittelkettigen Fettsäuren (Butter und Kokosnussöl) bestehen. Im Vergleich waren keine kurz- oder mittelkettigen dafür überwiegend langkettige und sehr langkettige Fettsäuren in Olivenöl zu identifizieren (siehe Anhang 7.10). Aus der Beobachtung, dass sowohl Butter als auch Kokosnussöl aber nicht Olivenöl zu einer höheren Überlebensrate der $dpex19^{\Delta F7}$ Mutanten führte,

wurde die Hypothese aufgestellt, dass das Verfüttern mittelkettiger Fettsäuren für die erhöhte Überlebensrate der *dpex19^{ΔF7}* Mutanten verantwortlich sein könnte und den beschriebenen Rettungseffekt hervorruft.

Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden die mittelkettigen Fettsäuren Capryl- (C8:0) und Laurinsäure (C12:0) als TAGs in das Hefefutter gemischt und verfüttert. Als Startpopulation wurden je 40 *w* und 40 *dpex19^{ΔF7}* mutante L1 Larven auf Apfelsaftagarplatten sortiert. Als Negativkontrolle wurde Hefe ohne Zusatz zusätzlicher Nahrungslipide und als Positivkontrolle Hefe inklusive 5 % Kokosnussöl verabreicht. Als TAG Hefefutter wurde 5 % Caprylsäure TAG, 5 % Laurinsäure TAG, 2,5 % von beiden TAGs und ein selbstgemischtes Kokosnussölimitat verfüttert (siehe Methoden 3.2.14). Das Verfüttern dieser mit Kokosnussöl oder TAGs angereicherten Hefe wirkte sich in *w* Kontrolltieren nicht auf die Überlebensrate aus. Über 90 % der Fliegen verpuppten sich am Ende der Larvalentwicklung (Abb. 4.22 A) und schlüpfen anschließend als Imago (Abb. 4.22 B) aus der Puppenhülle.

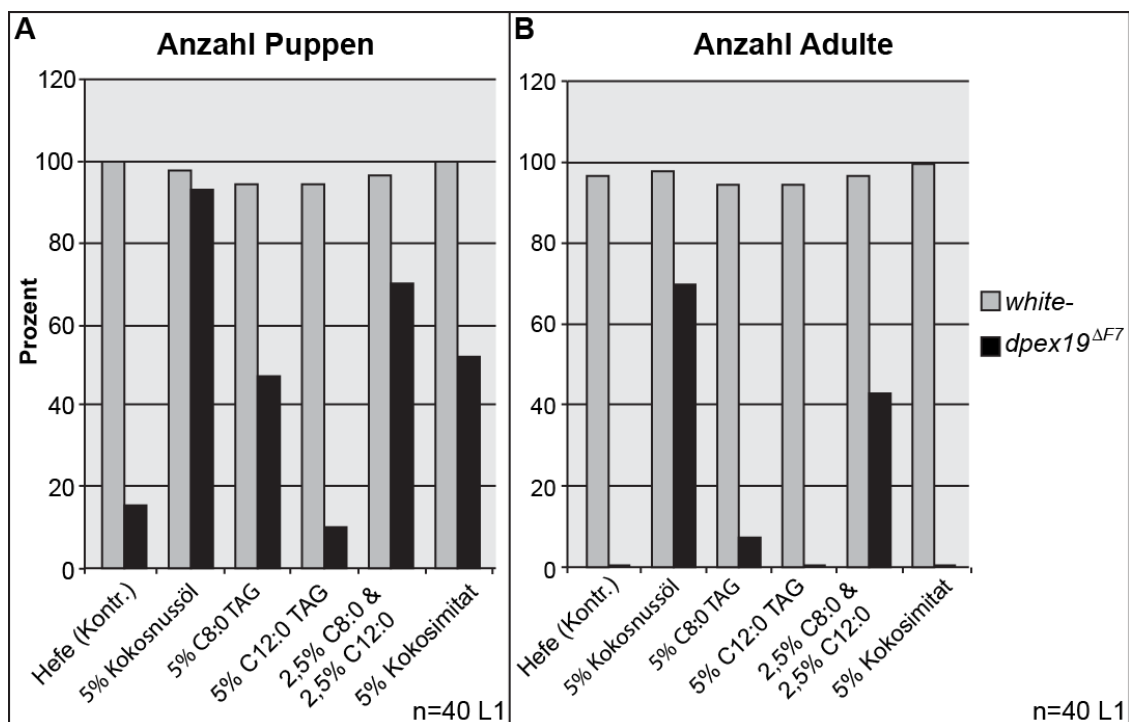


Abb. 4.22: Rettung der larvalen und pupalen Letalität von *dpex19^{ΔF7}* Mutanten durch mittelkettige TAGs. Gezeigt ist der prozentuale Anteil von *w* (grau) und *dpex19^{ΔF7}* mutanten (schwarz) Tieren die das Puppenstadium (A) bzw. das Adultstadium (B) erreichen und mit unterschiedlichen Fetten als Nahrungszusatz gefüttert wurden. Pro Fütterungsbedingung und Genotyp wurden jeweils 40 frühe L1 Larven verwendet. C8:0 TAG = Glyceryl trioctanoate, C12:0 TAG = Glyceryl tridodecanoate.

Das mit 5 % Kokosnussöl versetzte Hefefutter bewirkte, wie im vorigen Experiment, eine Rettung der Letalität von *dpex19^{ΔF7}* mutanten Larven und Puppen. Über 90 % der

Tiere verpuppten sich, ca. 70 % wurden adult (Abb. 4.22 A und B). Obwohl mit keiner der TAG Hefefutterbedingungen ein derartiger Rettungseffekt wie mit Kokosnussöl erreicht werden konnte, stieg die Überlebensrate der *dpex19^{ΔF7}* Fliegen, die mit Caprylsäure TAG Hefefutter oder mit einer Mischung von Caprylsäure und Laurinsäure TAG Hefefutter gefüttert wurden, im Vergleich zur Negativkontrolle deutlich an.

Über 45 % der Tiere die mit 5 % Caprylsäure TAG gefüttert wurden verpuppten sich und knapp 10 % schlüpfen als Imago (Abb. 4.22 A und B). Im Vergleich hierzu verpuppten sich in diesem Experiment nur ca. 15 % der *dpex19^{ΔF7}* Mutanten auf dem Hefekontrollfutter, adulte Fliegen schlüpfen nicht (Abb. 4.22 A und B). Das 5 %ige Laurinsäure TAG Hefefutter hatte keinen Einfluss auf die Überlebensrate der *dpex19^{ΔF7}* Mutanten. Mit einem prozentualen Anteil von ca. 10 % Puppen und 0 % adulten Fliegen entspricht die Überlebensrate der mit Laurinsäure TAG gefütterten *dpex19^{ΔF7}* Mutanten der von *dpex19^{ΔF7}* Mutanten die mit Hefekontrollfutter gefüttert wurden (Abb. 4.22 A und B).

Die größte Auswirkung des TAG Futterzusatzes auf das Überleben der *dpex19^{ΔF7}* Mutanten zeigte sich durch die Verfütterung von Hefepaste, die mit 2,5 % Caprylsäure TAG und 2,5 % Laurinsäure TAG versetzt wurde. Nahezu 70 % der Tiere verpuppten sich und über 40 % entwickelten sich bis zur adulten Fliege (Abb. 4.22 A und B).

Das Kokosnussöl limitat wurde mit Hefepaste in einer finalen Konzentration von 5 % verfüttert. Obwohl sich über 50 % der mit Kokosnussöl limitat gefütterten *dpex19^{ΔF7}* Mutanten verpuppten schlüpfen keine adulten Fliegen (Abb. 4.22 A und B). Zusammenfassend zeigte die Mischung der beiden mittelkettigen Fettsäuren (2,5 % C8:0 und 2,5 % C12:0) den größten Rettungseffekt in Bezug auf die larvale und pupale Letalität der *dpex19^{ΔF7}* Mutanten.

Die Fütterungsexperimente ergaben, dass Nahrungslipide die *dpex19^{ΔF7}* Mutation vermittelten Phänotypen modulieren bzw. mildern konnten. So entwickelten sich *dpex19^{ΔF7}* mutante Fliegen wesentlich besser wenn sie mit Kokosnussöl oder mittelkettigen Fettsäuren gefüttert wurden. Neben der erhöhten Überlebensrate konnte beobachtet werden, dass die mit Kokosnussöl gefütterten Larven und adulten Fliegen weniger starke Bewegungsphänotypen zeigten als die mit Kontrollfutter gefütterten Tiere.

Betrachtet man alle gewonnenen Erkenntnisse kann man zusammenfassend feststellen, dass die generierten *dpex19* nullmutanten Fliegen ähnlich wie Zellweger-Syndrom Patienten eine defekte Peroxisomen-Biogenese, neurodegenerative und lokomotorische Defizite zeigten. Die Konzentration sehr langkettiger Fettsäuren war in

dpex19 Drosophila Mutanten wie in Zellweger-Syndrom Patienten erhöht. Darüber hinaus war in *dpex19* Mutanten oxidativer Stress detektierbar. Das Verfüttern einer speziellen Diät aus kurz- und mittelkettigen Fettsäuren an *dpex19* mutanten Larven und Fliegen bewirkte eine deutliche Erhöhung der Überlebensrate und eine Reduktion der Mobilitätsdefizite.

5 Diskussion

Peroxisomen sind durch eine Lipiddoppelschicht vom Zytoplasma abgetrennte, für Eukaryoten obligatorische Zellorganellen. Über 50 peroxisomale Oxidasen katalysieren den oxidativen Katabolismus von Fettsäuren, Aminosäuren, Alkohol und weiteren Verbindungen. Als Co-Substrat verwenden diese Enzyme molekularen Sauerstoff. Die hierbei gebildete radikalen Sauerstoffspezies werden in den Peroxisomen durch das peroxisomale Leitenzym Katalase und durch Peroxidasen detoxifiziert (siehe Einleitung 1.2).

Die essentielle Bedeutung der Peroxisomen für den Stoffwechsel und das Überleben wird durch verschiedene letal verlaufende PBDs deutlich. Innerhalb der PBDs ist das Zellweger-Syndrom, die Erkrankung mit den schwerwiegendsten Symptomen und der frühesten Sterblichkeit. Mutationen in unterschiedlichen Genen, die für peroxisomale Proteine kodieren verursachen das Zellweger-Syndrom. Es wird unter Anderen durch Mutationen in den *PEROXIN* Genen *PEX3*, *PEX16* oder *PEX19* verursacht (siehe Einleitung 1.4.1). Wie man aus Zellkulturdaten von Säugetierzellen und Hefen weiß, sind die Genprodukte dieser drei *PEROXINE* an der Peroxisomen *de novo* Synthese und am Import der peroxisomalen Membranproteine beteiligt (siehe Einleitung 1.3). Daher besitzen transgene Hefe- und Säugetierzellen mit Mutationen in den entsprechenden *PEROXINEN* keine Peroxisomen (siehe Einleitung 1.3.2). Ebenso bilden die Zellen von Zellweger-Syndrom Patienten keine Peroxisomen aus, was zu einem Ausfall des peroxisomalen Metabolismus und damit zu zahlreichen schwerwiegenden Symptomen in unterschiedlichen Organen führt und die Sterblichkeit in den ersten Lebensmonaten begründet (siehe Einleitung 1.4.2).

Die Peroxisomen-Biogenese und -Funktion in einem *in vivo* Modell zu untersuchen kann dazu beitragen, die Pathophysiologie des Zellweger-Syndroms zu verstehen. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit ein *Drosophila* Tiermodell zur Funktionsanalyse von dPex19 generiert und untersucht.

5.1 Analyse der dPex19 mRNA und Proteinexpression

5.1.1 dPex19 wird ubiquitär, mit zeitlicher und räumlicher Dynamik exprimiert

Pex19 Proteine sind bei Eukaryoten weitverbreitet und in ihrer Domänenstruktur hoch konserviert (Wingen, 2006; Shibata et al, 2004; Götte et al, 1998; Matsuzono et al, 2006). Über die molekulare *in vivo* Pex19 Funktion in multizellulären Organismen ist jedoch nur wenig bekannt. Um einen ersten Einblick in die Funktion von dPex19 in *Drosophila* zu erhalten wurden mRNA und Proteinexpressionsstudien durchgeführt. Diese zeigten eine ubiquitäre dPex19 Verteilung während der gesamten *Drosophila*-Entwicklung (siehe Anhang 7.11 und Wingen, 2006). Bereits während den ersten Stunden der Embryogenese, bevor die zygotische Genexpression beginnt, konnten dPex19 mRNA und Protein in Embryonen detektiert werden (siehe Einleitung 1.6 und Wingen, 2006). Die frühe dPex19 Expression lässt auf eine maternal deponierte dPex19 Komponente schließen, die ebenfalls in einer unabhängigen *Drosophila* Transkriptomanalyse identifiziert werden konnte (Graveley et al, 2011). Während der weiteren *Drosophila* Ontogenese konnte *dpex19* mRNA verstärkt in der ersten Hälfte des dritten Larvenstadiums und während der Metamorphose im Puppenstadium detektiert werden (siehe Anhang 7.11).

In Embryonen zeigten fluoreszente Immunmarkierungen eine dPex19 Akkumulation in Malpighischen Gefäßen, Hinterdarm, Nervensystem und Muskeln (siehe Einleitung 1.6 und Wingen, 2006). Auch in Larven (L3) konnte eine erhöhte Expression in Malpighischen Gefäßen und Nervensystem festgestellt werden. Darüber hinaus zeigte sich eine dPex19 Anreicherung in Fettkörperzellen (siehe Ergebnisse 4.2.2.1). Meta Analysen zeigen außerdem, dass die *dpex19* Expression in adulten Fliegen ebenfalls in Malpighischen Gefäßen, Fettkörper, Darm und Nervensystem induziert ist (Chintapalli et al, 2007). Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass dPex19 *in vivo* ubiquitär mit einer Anreicherung in metabolisch aktiven Geweben exprimiert wird.

5.1.2 dPex19 ist partiell mit dem ER und Peroxisomen assoziiert

Subzellulär war dPex19 in allen untersuchten Geweben und Entwicklungsstadien überwiegend in einem punktförmigen Muster im Zytoplasma lokalisiert. Zusätzlich kolokalisierte dPex19 partiell mit dem ER und war im Zytoplasma teilweise mit Peroxisomen assoziiert. Dies wurde durch eine punktförmige Kolokalisation mit dem peroxisomalen Marker GFP.SKL ersichtlich (siehe Ergebnisse 4.2.2 und Wingen, 2006).

Die dPex19 Expressions- und Lokalisationsmuster sind daher mit den bekannten Orthologen aus Hefe und Vertebratenzellen vergleichbar (Wingen, 2006; Jones et al, 2004; Sacksteder et al, 2000; Snyder et al, 1999). Somit entspricht die beobachtete dPex19 Lokalisation auch den aus Hefe und Zellkultur bekannten Pex19 Funktionen zur Peroxisomen *de novo* Synthese am ER und als potentieller Transport-Rezeptor für PMPs, die im Zytoplasma gebunden und zu den Peroxisomen transportiert werden (Heiland & Erdmann, 2005; Nuttall et al, 2011). Es ist daher zu vermuten, dass dPex19 vergleichbare Funktionen wie seine orthologen Proteine besitzt.

5.2 Charakterisierung *dpex19* mutanter Fliegen

5.2.1 Ein *dpex19* Genfunktionsverlust vermittelt Letalität

Um die molekulare dPex19 Funktion in *Drosophila* analysieren zu können, wurden mit Hilfe einer P-Element Exzision unterschiedliche *dpex19* Deletionsmutanten erzeugt. Bei der *dpex19^{ΔF7}* Mutante konnte der gesamte *dpex19* OLR deletiert werden ohne ein Nachbargen zu beeinträchtigen (siehe Ergebnisse 4.2.1.6). Die in dieser Arbeit generierten *dpex19^{ΔF7}* nullmutanten Fliegen zeigten eine Letalität in Abhängigkeit vom Zeitpunkt des Genfunktionsverlustes. Zygotische *dpex19^{ΔF7}* Mutanten, die eine maternale *dpex19* Komponente exprimieren (siehe Ergebnisse 4.2.1.7), starben im dritten Larvenstadium und während der nachfolgenden Pupalentwicklung. Separierte man homozygote *dpex19^{ΔF7}* Mutanten von ihren heterozygoten Geschwistertieren wurden jedoch, aufgrund fehlender Konkurrenz, wenige Tiere adult (ca. 5 %). Diese sogenannten „Escaper“ lebten maximal fünf Tage. Maternal zygotische *dpex19^{ΔF7m-z}* Mutanten hingegen starben direkt nach dem Schlüpfen aus der Eihülle als frühe L1 Larven (siehe Ergebnisse 4.2.1.9).

In den zygotischen *dpex19^{ΔF7}* Mutanten könnten maternale dPex19 Proteine zu Beginn der Embryogenese die Peroxisomen *de novo* Synthese ermöglichen. Weitere Peroxisomen könnten dann dPex19 unabhängig durch Teilung entstehen und die Entwicklung bis zur Puppe erklären. Tatsächlich wird die Teilung bereits existierender Peroxisomen in Hefezellen als hauptsächlicher Peroxisomen Biogeneseweg diskutiert (Mast et al, 2010). Die spät in der Entwicklung auftretende Letalität der *dpex19^{ΔF7}* Mutanten (siehe Ergebnisse 4.2.1.9) könnte in einem Defekt der zweiten beschriebenen Pex19 Funktion liegen, dem PMP Transport vom Zytoplasma zu den Peroxisomen (siehe Einleitung 1.3.2). In *dpex19^{ΔF7}* Mutanten können PMP- und

Matrixproteinimport nur funktionieren solange dPex19 Proteine vorhanden sind (siehe Einleitung 1.3). Nach Abbau der maternalen dPex19 Proteine können vermutlich keine funktionellen Peroxisomen mehr gebildet werden, wodurch die späte Letalität der Mutanten erklärt werden kann. Ein zusätzliches Fehlen der maternalen *dpex19* Komponente in *dpex19^{ΔF7m-z-}* Mutanten ist somit vermutlich für die frühere Letalität bereits zu Beginn der Larvalentwicklung verantwortlich (siehe Ergebnisse 4.2.1.9).

Unterstützt wird diese Hypothese durch die Tatsache, dass *dpex19^{ΔF7}* Mutanten (vgl. Abb. 4.5 und 4.6 A) in dPex19 Antikörperfärbungen eine wildtypische dPex19 Verteilung bis zum Ende der Embryogenese aufwiesen (vgl. Abb. 4.6 B). Maternal zygotische *dpex19^{ΔF7m-z-}* Mutanten zeigten hingegen kein dPex19 Signal (vgl. Abb. 4.7).

Diese Arbeit zeigt außerdem, dass sich weder die ubiquitäre *dpex19* Überexpression noch eine bis zu 80 prozentige Reduktion der *dpex19* Genaktivität negativ auf die *Drosophila* Entwicklung und das Überleben auswirkte. Erst der komplette *dpex19* Genfunktionsverlust verursachte eine Entwicklungsverzögerung und Letalität (siehe Ergebnisse 4.2.1.4 und 4.2.1.9).

Im Gegensatz zu *dpex19^{ΔF7}* Nullmutanten, sind *Drosophila pex2*, *pex10* und *pex12* Mutanten homozygot lebensfähig und phänotypisch unauffällig mit Ausnahme von Spermatogenesedefekten (Chen et al, 2010 vgl. Abb. 4.8). Aus Hefen und Vertebraten ist bekannt, dass die RING Finger Domänen Proteine Pex2, Pex10 und Pex12 einen für die Pex5 Ubiquitinierung essentiellen RING-Komplex bilden (Agne et al, 2003; Chang et al, 1999; Fan et al, 2005). Damit sind alle drei Peroxine am Import von peroxisomalen Matrixenzymen beteiligt, in *Drosophila* jedoch nicht für das Überleben notwendig (Rucktäschel et al, 2011). dPex19 ist hingegen ein PMP Importrezeptor (siehe Ergebnisse 4.2.2.2), fungiert außerdem als Regulator der Peroxisomen *de novo* Synthese (siehe Ergebnisse 4.2.2.4 und 4.2.2.5) und ist im Vergleich zu dPex2, 10 und 12 für das Überleben notwendig.

Zusammengefasst bedeutet dies, dass dPex19 eine essentielle Funktion während der Entwicklung von *Drosophila* besitzt. Diese Tatsache ist kongruent mit Daten aus anderen Organismen. Von der Hefe bis zum Menschen ist Pex19 für die Peroxisomen-Biogenese und das Überleben essentiell (Rucktäschel et al, 2011).

5.2.2 *dpex19*^{ΔF7} Mutanten zeigen Bewegungsdefekte, Neurodegeneration und melanotische Knoten

Neben der beschriebenen Letalität zeigten zygotische *dpex19*^{ΔF7} Mutanten verschiedene motorische Auffälligkeiten und morphologische Phänotypen. Bewegungsdefekte konnten hierbei ab dem L3 Stadium identifiziert werden. Im Vergleich zu den Kontrolltieren zeigten *dpex19*^{ΔF7} mutante L3 Larven ein eingeschränktes Grabverhalten. Die wenigen adulten „Escaper“ blieben über 24 h in der Puppenhülle stecken und starben. Die vereinzelt geschlüpften Adulten waren sehr lethargisch. Sie nahmen keine Nahrung auf und konnten weder Klettern noch Fliegen (siehe Ergebnisse 4.2.3.1).

Da Fliegen mit eingeschränkter Bewegungsfähigkeit oftmals degenerative Anomalien im ZNS aufweisen, wurde eine mögliche Neurodegeneration in *dpex19*^{ΔF7} Mutanten untersucht (Hirth, 2010; Nakayama et al, 2011). In adulten *dpex19*^{ΔF7} Mutanten konnten neurologische Anomalien in Form von apoptotische Zellen im Gehirn detektiert werden (siehe Ergebnisse 4.2.3.2, Botella et al, 2004; Saitoh et al, 2007). Wie auch im murinen Zerebellum findet in Abwesenheit von funktionellen Peroxisomen vermehrt Apoptose im *Drosophila* Gehirn statt (Krysko et al, 2007).

Desweiteren zeigten morphologische Untersuchungen, dass *dpex19*^{ΔF7} mutante Larven, Puppen und adulte Fliegen melanotische Knoten entwickelten (siehe Ergebnisse 4.2.3.3). Diese dunklen Zellcluster könnten sich wie von Markovic und Kollegen beschrieben durch autoimmune Einkapselungen von körpereigenem Gewebe entwickeln (Markovic et al, 2009). Untersuchungen von Dixit und Kollegen an humanen Zellen zeigten, dass neben Mitochondrien die Peroxisomen an der antiviralen Signaltransduktion beteiligt und damit für Immunreaktionen essentiell sind (Dixit et al, 2010). Eine mögliche Erklärung für das Auftreten der melanotischen Knoten in *dpex19*^{ΔF7} Mutanten könnte daher eine beeinträchtigte Immunabwehr aufgrund des Fehlens von Peroxisomen liefern.

5.2.3 *dpex19*^{ΔF7} Mutanten besitzen keine funktionellen Peroxisomen

Die beobachtete Lokalisation von dPex19 im ER und an den Peroxisomen lässt vermuten, dass auch dPex19, wie seine Orthologen eine essentielle Funktion bei der Peroxisomen-Biogenese einnimmt (siehe Ergebnisse 4.2.2.1 Wingen, 2006). Immunfluoreszenzmikroskopische Analysen zeigten, dass in zygotischen *dpex19*^{ΔF7} Mutanten der peroxisomale Matrixmarker GFP.SK1 mislokalisierte. Das Fusionsprotein

GFP.SKL war im Zytoplasma verteilt und lokalisierte nicht wie in wildtypischen Zellen in einem punktförmigen Muster, das die Peroxisomen markiert (vgl. Ergebnisse 4.2.2.1 und 4.2.2.4). Da SKL das peroxisomale „Targeting“-Signal für Matrixproteine ist (siehe Einleitung 1.4.1), könnte die Mislokalisierung von GFP.SKL in einem gestörten Import der PMPs begründet sein oder alternativ durch ein Fehlen von Peroxisomen verursacht werden.

Hier durchgeführte Ultrastrukturanalysen maternal zygotischer *dpex19^{ΔF7}* Mutanten belegten, dass in den Mutanten keine Katalase positiven und damit funktionellen Peroxisomen gebildet werden (siehe Ergebnisse 4.2.2.5). Allerdings konnten einige Katalase positive Areale in Assoziation mit dem Golgi Apparat oder dem ER detektiert werden. Ähnliche Katalasemislokalisierungen konnten auch in verschiedenen *PEX* Mutanten und gealterten Zellen beobachtet werden. Die Ursache hierfür bleibt unklar (Terlecky et al, 2006).

Ein *pex19* Gendefekt führt somit in *Drosophila* wie in allen bisher beschriebenen Organismen zu Peroxisomen defizienten Zellen (siehe Einleitung 1.3). Im Menschen ist ein *PEX19* Genfunktionsverlust Ursache der Peroxisomen-Biogenese-Krankheit Zellweger-Syndrom (Matsuzono et al, 1999; Ebberink et al, 2011).

5.2.4 *dpex19^{ΔF7}* mutante Fliegen zeigen einen veränderten Fettsäuremetabolismus

Peroxisomen besitzen eine entscheidende Rolle beim Fettsäuremetabolismus (siehe Einleitung 1.2). So werden sehr langkettige Fettsäuren ausschließlich in Peroxisomen oxidiert (Moser & Moser, 1996; Baes & van Veldhoven, 2006). In dieser Arbeit durchgeführte GC/MS-Analysen der Fettsäurezusammensetzung von Peroxisomen defizienten *dpex19^{ΔF7}* mutanten Puppen zeigten, dass dPex19 für den Fettsäure-Metabolismus essentiell ist. So akkumulierten in den Mutanten sehr langkettige Fettsäuren wie C24:0, C26:0 und C28:0 (siehe Ergebnisse 4.2.4.2). Damit zeigten sie ein ähnliches Bild, wie die Nullmutanten von *dpex19* Orthologen und deren Interaktionspartnern in unterschiedlichen Organismen wie der Hefe und dem Menschen (Moser & Moser, 1996; Wanders & Tager, 1998; Baes & van Veldhoven, 2006).

Auch in *pex16* mutanten Fliegen führt das Fehlen funktioneller Peroxisomen zu einer erhöhten Konzentration sehr langkettiger Fettsäuren (Nakayama et al, 2011). Pex16 ist in einigen Hefen und in Säugetieren als Interaktionspartner von Pex3 beschrieben, das

wiederum mit Pex19 assoziierten ist (Ma et al, 2011). Zusammen mit Pex19 sind Pex3 und Pex16 für den Import von Klasse 1 PMPs verantwortlich (siehe Einleitung 1.4.2). Die Deletion von *Drosophila pex3* und *dpex19* (Nakayama et al, 2011 siehe Ergebnisse 4.2.2.4 und 4.2.2.5) führt genauso zu Peroxisomen defizienten Zellen wie Mutationen im *PEX3* und *PEX19* Genlocus von Hefen und Menschen (Höhfeld et al, 1991; Hoepfner et al, 2005; Kim et al, 2006; Tabak et al, 2008; Nakayama et al, 2011).

Ferner konnte in *dpex19^{ΔF7}* mutanten Puppen eine im Vergleich zur Kontrolle verringerte Konzentration von gesättigten Fettsäuren mit Kettenlängen kleiner als C20:0 detektiert werden (siehe Ergebnisse 4.2.4.2). Eine mögliche Kompensation der nicht mehr funktionierenden peroxisomalen β -Oxidation durch mitochondriale β -Oxidation der kürzerkettigen Fettsäuren (\leq C22:0) kann die verringerte Konzentration der mittel- und langkettigen Fettsäuren erklären (Wanders & Tager, 1998). Dies könnte neben der Beobachtung, dass die *COT* Genexpression in *dpex19^{ΔF7}* Mutanten erhöht war (siehe Ergebnisse 4.2.4.1) und dessen Genprodukt Fettsäuren in die Mitochondrien transportiert wo sie zur Energiegewinnung oxidiert werden, ein weiteres Indiz für einen kompensatorischen Mechanismus der Mitochondrien sein (Berg et al, 2003).

Zusammenfassend kann man feststellen, dass das Fehlen funktioneller Peroxisomen auch in *Drosophila* zu einem gestörten Fettsäuremetabolismus führt. Bei gleichzeitiger Anreicherung sehr langkettiger Fettsäuren ist die Konzentration mittelkettiger und langkettiger Fettsäuren in *dpex19^{ΔF7}* Mutanten verringert.

5.2.5 *dpex19^{ΔF7}* Mutanten leiden unter oxidativem Stress

Neben dem Fettmetabolismus sind Peroxisomen auch für die Detoxifikation von ROS essentiell. Daher wurde die Expression von Markergenen für den Fettsäure- und ROS-Metabolismus mittels qRT-PCR analysiert. Diese Genexpressionsstudie zeigte in *dpex19^{ΔF7}* Mutanten eine Induktion der am Fettmetabolismus beteiligten und unter Hunger induzierten Gene *4E-BP*, *HMG-CoA-Reduktase*, *acetyl-CoA-Synthetase*, *acetyl-CoA Carboxylase* und *lipase3* (siehe Ergebnisse 4.2.4.1). Die beobachtete Regulation könnte eine Folge des eingeschränkten Fressverhaltens von *dpex19^{ΔF7}* mutanten L3 Larven und Adulten darstellen (Teleman, 2005; Zinke et al, 2002; Seegmiller AC, 2002; Bauer et al, 2009).

Das Gen *Carnitin-O-Oktanyltransferase (COT)*, das für ein Protein kodiert, das den Fettsäuretransport über die mitochondriale Membran in die Matrix vermittelt, war in

dpex19^{ΔF7} Mutanten ebenfalls induziert (siehe Ergebnisse 4.2.4.1, Berg et al, 2003). Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass die peroxisomale Oxidation der Fettsäuren in den Mutanten aufgrund des Fehlens von Peroxisomen beeinträchtigt ist (siehe Ergebnisse 4.2.4.1) und durch eine verstärkte Oxidation von Fettsäuren in den Mitochondrien kompensiert wird. Ein wichtiger Schritt wäre hierzu, dass die vor allem in den Mitochondrien metabolisierbaren mittel- und langkettigen Fettsäuren mittels COT in die Mitochondrienmatrix gelangen um dort dem Fettsäurekatabolismus zur Energiegewinnung zugeführt werden zu können.

In den Stadien, in denen die ersten Phänotypen der *dpex19* Mutanten offensichtlich wurden, bei *dpex19*^{ΔF7} in L3, bei *dpex19*^{ΔF7m-z} in L1, war die Genexpression diverser Marker für oxidativen Stress und Detoxifikationsreaktionen induziert. Die *superoxid-dismutase 2 (sod2)* kodiert für eine in den Peroxisomen lokalisierte Superoxid-Dismutase, die eine Detoxifikation von ROS durchführt (siehe Einleitung 1.2.1). *dpex19*^{ΔF7} Mutanten zeigten eine verstärkte Expression der *sod2*, was demnach auf oxidativen Stress hindeutet. Darüber hinaus war die Expression verschiedener Gene aus den Superfamilien der *cytochrome P450 (cyp450)*, *glutathion-S-transferasen (GSTs)* und *UDP-Glycosyltransferasen (UGTs)*, die durch oxidativen Stress induziert werden, erhöht (siehe Ergebnisse 4.2.4.1, Kirby et al, 2002; Falckh et al, 1997; Christoph Grünewald, 2006; Mourikis et al, 2006; Enayati et al, 2005; Luque & O'Reilly, 2002). Die Genprodukte der *UGTs*, *GSTs* und auch der *cyp450* Gene sind in die Detoxifikation von endogenen, zellschädigenden Metaboliten und exogenen Xenobiotika involviert. Eine durch das Fehlen von Peroxisomen bedingte ROS Akkumulation in den Zellen *dpex19*^{ΔF7} mutanter Tiere könnte in Analogie zu den Erkenntnissen aus Vertebratenstudien zu oxidativem Stress und damit einhergehender Peroxidation von Lipiden, Proteinen und zur mutagenen DNA-Veränderung führen (Fransen et al, 2012). Die Induktion der *GSTs*, *UGTs* und *cyp450* Expression könnte damit eine direkte Reaktion auf eine Anreicherung von ROS und peroxidierten Lipiden darstellen (siehe Ergebnisse 4.2.4.1).

Ein ebenfalls durch oxidativen Stress induzierbares und in *dpex19*^{ΔF7} Mutanten transkriptionell hochreguliertes Gen ist *neural lazarusillo (nlaz)*, (siehe Ergebnisse 4.2.4.1). Das dem vertebraten Apolipoprotein D orthologe Nlaz Protein ist an der Triacylglycerid (TAG) sowie der Kohlenhydrat Homöostase beteiligt (Hull-Thompson et al, 2009) und übernimmt eine neuronale Schutzfunktion (Ruiz et al, 2011). In *dpex19*^{ΔF7} Mutanten war außerdem *npc2* transkriptionell hochreguliert. Die humane lysosomale Speicherkrankheit Niemann Pick Krankheit Typ2 wird durch *npc2* Mutationen verursacht und zählt zu den neurodegenerativen Erkrankungen. Die *npc2 Drosophila*

Mutanten zeigen ähnlich wie *dpex19^{ΔF7}* neurodegenerative Anomalien (vgl. Abb. 4.17; Niwa & Niwa, 2011; Huang et al, 2007).

Die beobachteten Bewegungsdefekte mit einhergehender Neurodegeneration bei *dpex19^{ΔF7}* Mutanten (siehe Ergebnisse 4.2.3) könnten damit durch oxidativen Stress verursacht werden, der wiederum als Folge des Fehlens der Peroxisomen (siehe Ergebnisse 4.2.2.4 und 4.2.2.5) erklärt werden kann. Botella und Kollegen konnten bereits einen direkten Zusammenhang zwischen oxidativem Stress und Neurodegeneration in *Drosophila* zeigen (Botella et al, 2004). Neurone als lipidreiche Zellen sind besonders anfällig für ROS vermittelte Lipidperoxidation (Martin et al, 2011, Martin et al, 2011). Oxidativer Stress spielt eine wesentliche Rolle bei der Initiation von Apoptose und der Pathogenese verschiedener metabolischer und neurodegenerativer Erkrankungen (Fransen et al, 2012). Beispielsweise stehen die Krankheiten Alzheimer, Huntington, Creutzfeld-Jakob und Parkinson in Zusammenhang mit oxidativem Stress (Sayre et al, 2001; Dawson & Dawson, 2003; Butterfield et al, 2001; Butterfield & Kanski, 2001). Außerdem konnte in einer kürzlich veröffentlichten Studie gezeigt werden, dass PBD Patienten unter oxidativem Stress leiden. El-Bassyouni und Kollegen schlagen daher eine PBD Behandlung mit Antioxidationsmitteln vor, um die Neurodegeneration aufzuhalten (El-Bassyouni et al, 2012).

Zusammenfassend kann man feststellen, dass *dpex19^{ΔF7}* Mutanten unter oxidativem Stress leiden und dies möglicherweise eine Ursache für die beobachtete Neurodegeneration und die damit einhergehenden Bewegungsdefekte darstellt.

5.3 Genetische und diätische Rettungsexperimente von *dpex19^{ΔF7}* Mutanten

5.3.1 Eine ektopische dPex19 Expression rettet *dpex19^{ΔF7}* Mutanten

Die Spezifität der *dpex19^{ΔF7}* Mutante wurde durch Rettungsexperimente mittels einer UAS*dpex19* Linie verifiziert (siehe Ergebnisse 4.2.1.10). Die ubiquitäre *dpex19* Expression rettete die Letalität der homozygoten *dpex19^{ΔF7}* Mutanten und zeigte, dass diese durch den *dpex19* Genfunktionsverlust verursacht wurde. Neben der ubiquitären führte auch eine gewebsspezifische gleichzeitige *dpex19* Expression im Fettkörper und den Malpighischen Gefäßen mit Hilfe der *pp1/Gal4* Treiberfliegenlinie zu einer Rettung der Letalität. Hierbei wurden neben der Letalität auch die Bewegungsdefekte gerettet. Die Larven zeigten ein wildtypisches Grabverhalten, die adulten Fliegen schlüpfen aus

der Puppenhülle, waren fertil, konnten Nahrung aufnehmen, Klettern und Fliegen (siehe Ergebnisse 4.2.1.10 und eigene Beobachtung). Hingegen konnte weder eine *dpex19* Expression im Nervensystem noch die alleinige *dpex19* Expression in den Malpighischen Gefäßen oder dem Fettkörper eine Rettung erzielen (siehe Ergebnisse 4.2.1.10).

Bei Säugetieren ist bekannt, dass in Leber und Niere überdurchschnittlich viele Peroxisomen vorkommen und dass beide Organe in Patienten mit Peroxisomen-Biogenese-Krankheiten Defekte aufweisen (siehe Einleitung 1.2.2 und 1.4 Hajra & Wu, 1985). Die Wichtigkeit der Peroxisomen in diesen Geweben konnte hier auch in *Drosophila* gezeigt werden, da eine Expression von *dpex19* in Fettkörper und Malpighischen Gefäßen, die analog zu Leber bzw. Niere in Säugetieren sind, zur Rettung der Letalität von *dpex19*^{ΔF7} Mutanten führte (Pandey & Nichols, 2011).

Neben *dpex19* übernimmt auch *pex16* eine entscheidende Funktion im Fettkörper von *Drosophila*. So konnten Nakayama und Kollegen zeigen, dass die gewebsspezifische *pex16* Expression in Fettkörperzellen und Neuronen von homozygoten *pex16* *Drosophila* Mutanten zu einer Rettung der Bewegungsphänotypen und der um ein Drittel verkürzten Lebensdauer führte (Nakayama et al, 2011).

Fasst man die Ergebnisse dieser Studie und der von Nakayama zusammen, scheint die Peroxisomenfunktion in Fettkörperzellen essentiell für die Entwicklung und das Überleben von *Drosophila* zu sein.

5.3.2 Eine spezielle Lipiddiät rettet *dpex19*^{ΔF7} mutante Phänotypen

In *dpex19*^{ΔF7} Mutanten konnte ein veränderter Fettsäuremetabolismus festgestellt werden. Während sehr langkettige Fettsäuren erhöht waren, konnte eine Reduktion der kurz- und mittelkettigen Fettsäuren detektiert werden (siehe Ergebnisse 4.2.4.2). Um das gestörte Fettsäureverhältnis von *dpex19*^{ΔF7} Mutanten zu normalisieren und so die beobachteten Phänotypen zu modulieren wurden spezielle Diäten verabreicht. Durch Zugabe von herkömmlichen Fetten, Ölen oder einzelnen Triacylglyceriden (TAGs) in das Fliegenfutter konnten Letalität und lokomotorische Beeinträchtigungen *dpex19*^{ΔF7} mutanter Tiere gerettet werden. Hierbei konnte die stärkste Verbesserung der Überlebensrate sowie Milderung der Phänotypen durch Kokosnussöl oder Butter erzielt werden (siehe Ergebnisse 4.2.5). Diese beinhalten vorwiegend TAGs mit kurz- und mittelkettigen Fettsäuren (siehe Anhang 7.10). Das diese Fettsäuren für den hier beobachteten Rettungs-Effekt verantwortlich sind, zeigten Experimente dieser Studie in

denen reine TAGs mit mittelkettigen Fettsäuren als Futterzusatz ebenfalls zu einer besseren Überlebensrate der *dpex19^{ΔF7}* Mutanten führte (siehe Ergebnisse 4.2.5.2).

Eine Diät mit Olivenöl angereichertem Futter, das auch sehr langkettige Fettsäuren beinhaltet, führte hingegen zu keiner Verbesserung der Überlebensrate oder der Phänotypen (siehe Ergebnisse 4.2.5). Hingegen konnte durch die Verfütterung eines Gemisches aus Olivenöl und Kokosnussöl ein ähnlicher Rettungseffekt wie durch Kokosnussöl alleine erzielt werden (siehe Ergebnisse 4.2.5.1). Diese Tatsache zeigt, dass sich die sehr langkettigen Fettsäuren nicht negativ auf den Phänotyp auswirken. Dies widerspricht allerdings bisherigen Studien in denen die Verfütterung sehr langkettiger Fettsäuren zu einer Verschlechterung der Phänotypen von peroxisomendefizienten Fliegen führte (Chen et al, 2010). Im Vergleich dazu konnte in dieser Arbeit ein positiver Einfluss auf Überlebensrate und Phänotypen *dpex19^{ΔF7}* mutanter Tiere durch kurz- und mittelkettige Fettsäuren im Futter festgestellt werden. Da in *dpex19^{ΔF7}* Mutanten die Konzentration von kurz- und mittelkettigen Fettsäuren stark erniedrigt ist (siehe Ergebnisse 4.2.4.2), könnte die Zufütterung genau dieser Fettsäuren die Konzentration kurz- und mittelkettiger Fettsäuren auf ein wildtypisches Niveau heben und so der Entstehung der beobachteten Phänotypen entgegenwirken (siehe Ergebnisse 4.2.3).

Es konnte also gezeigt werden, dass die spezielle Diät einen positiven Effekt auf *dpex19^{ΔF7}* Mutanten ausübt und somit Parallelen zur diätischen Therapie der PBD X-ALD mit Lorenzos Öl aufweist (siehe Einleitung 1.4). Die X-ALD ist eine peroxisomale Krankheit die biochemisch durch eine Anreicherung von sehr langkettigen Fettsäuren in Geweben und Körperflüssigkeiten von betroffenen Patienten charakterisiert wird (siehe Einleitung 1.4). Obwohl die erhöhte Konzentration an sehr langkettigen Fettsäuren durch eine Diät mit Lorenzos Öl, einer 4:1 Mischung aus Ölsäure- (C18:1) und Erucasäure-Glycerinestern (C22:1), gesenkt werden kann und die Symptomatik verbessert oder zumindest zeitlich aufgeschoben werden kann, ist die klinische Wirksamkeit des Öls aufgrund fehlender Kontrollgruppen nicht bewiesen und wird seit über 20 Jahren kontrovers diskutiert (Rizzo et al, 1989; Moser et al, 2005; van Geel et al, 1999; Aubourg et al, 1993). X-ALD und Zellweger-Syndrom Patienten zeigen, wie *dpex19* Mutanten eine Akkumulation von sehr langkettigen Fettsäuren. Klinisch gehen beide PBDs mit einer Beeinträchtigung des Nervensystems einher, der zugrundeliegende gehirnschädigende Mechanismus ist aber bis heute nicht aufgeklärt (Deon et al, 2006).

Jüngere Studien zeigten allerdings, dass oxidativer Stress an der Pathophysiologie von neurodegenerativen Erkrankungen im Allgemeinen und auch von X-ALD im Speziellen

involviert sein könnte (Deon et al, 2006). Ein Indiz, dass nicht die Anreicherung der sehr langkettigen Fettsäuren per se die Symptome der X-ALD oder Zellweger-Syndrom Patienten verursacht, zeigten Untersuchungen an *PEX11 β* -KO Mäusen. Obwohl diese Zellweger-Syndrom typische Merkmale aufweisen, konnten keine Defekte im Metabolismus der sehr langkettigen Fettsäuren detektiert werden (Li et al, 2002). Zudem korreliert der Schweregrad der klinischen Befunde von X-ALD Patienten nicht direkt mit der Konzentration von sehr langkettigen Fettsäuren (Berger et al, 2010).

Die hier durchgeführten Fütterungsexperimente lassen vermuten, dass die Anreicherung sehr langkettiger Fettsäuren wahrscheinlich nicht direkt für die beobachtete Neurodegeneration der *dpex19 Δ ^{F7}* Mutanten verantwortlich ist. Der in dieser Studie ebenfalls beschriebene oxidative Stress in *dpex19 Δ ^{F7}* Mutanten scheint somit eher die Ursache für das Absterben von Neuronen darzustellen. Diese neurodegenerativen Defekte könnten wiederum für die lokomotorischen Anomalien und in letzter Konsequenz für die frühe Letalität von *dpex19 Δ ^{F7}* Mutanten verantwortlich sein.

5.4 dPex19/dPex3 Interaktionsstudien

5.4.1 dPex19 und dPex3 zeigen eine partielle Kolokalisation

Pex19 ist eine wichtige Komponente für den PMP-Import. Als zytoplasmatische Komponente benötigt es hierfür jedoch einen membranständigen Interaktionspartner. In Hefen und Säugetieren wurde das Transmembranprotein Pex3 als Interaktionspartner von Pex19 beschrieben (Höhfeld et al, 1991; Soukupova et al, 1999). Pex3 gelangt ebenfalls via Pex19 als Transportrezeptor zu den Peroxisomen (Matsuzaki & Fujiki, 2008). Zur Lokalisation von dPex3 ist in *Drosophila* bislang nichts bekannt. Aufgrund einer vorhergesagten Transmembrandomäne ist es jedoch wahrscheinlich, dass dPex3 wie seine Orthologen in der peroxisomalen Membran verankert ist (Höhfeld et al, 1991; Soukupova et al, 1999).

Durch eine in dieser Arbeit durchgeführte Lokalisationsstudie konnte HA-markiertes dPex3 in der Tat in Assoziation mit Peroxisomen detektiert werden. dPex3HA war wie erwartet, an der Peripherie der Peroxisomen und somit in der peroxisomalen Membran lokalisiert (siehe Ergebnisse 4.2.2.2). Diese Analysen bestätigten somit, dass sowohl dPex19 als auch dPex3 partiell mit Peroxisomen assoziiert sind und zeigten eine zum Teil übereinstimmende Lokalisation.

5.4.2 Eine *dpex3HA* Überexpression führt zu vergrößerten Peroxisomen und einer dPex19 Fehllokalisation

Die dPex3HA Überexpressionsstudien in Malpighischen Gefäßzellen zeigten außerdem stark vergrößerte Peroxisomen. Hierbei war nahezu das gesamte dPex19 innerhalb vergrößerter Peroxisomen eingeschlossen und nicht wie in wildtypischen Zellen überwiegend zytoplasmatisch oder an wesentlich kleineren Peroxisomen lokalisiert (siehe Ergebnisse 4.2.2.3). Ein möglicher Grund für die die Bildung der vergrößerten Peroxisomen könnte darin liegen, dass durch die Überexpression von dPex3HA die Plattform des ER-Abschnittes der für die Peroxisomen *de novo* Synthese verantwortlich ist vergrößert wird und so größere Peroxisomen gebildet werden (siehe Einleitung 1.3.2). Hierbei entstehende dPex3 reiche Peroxisomen würden viele Bindungsstellen für dPex19 PMP Rezeptor Komplexe aufweisen. Dies könnte dazu führen, dass ein Großteil der dPex19 Proteine an den Peroxisomen fehllokalisiert und ungewöhnlich viele PMPs als Zielproteine des Pex3/Pex19-vermittelten Transportmechanismus in die peroxisomale Membran inseriert werden. Da in diesem Szenario die Peroxisomen einen PMP Überschuss besitzen und einige davon für den Import von Matrixproteinen essentiell sind könnte ein vermehrter Import von Matrixproteinen folgen und die Expansion des Organells beschleunigen.

5.4.3 dPex3 mislokalisiert in *dpex19^{ΔF7}* Mutanten

Auch in *dpex19^{ΔF7}* Nullmutanten wurde eine Lokalisationsabhängigkeit von dPex3HA und dPex19 detektiert. Das peroxisomale Membranprotein dPex3HA lokalisierte in *dpex19^{ΔF7}* mutanten Fliegenzellen nicht wie in wildtypischen Zellen in Assoziation mit GFP.SKL positiven Peroxisomen sondern mislokalisierte im gesamten Zytoplasma (siehe Ergebnisse 4.2.2). Diese Mislokalisation bestätigt, dass in *dpex19^{ΔF7}* Mutanten keine funktionellen Peroxisomen gebildet werden. Außerdem lässt die dPex19/dPex3HA Lokalisationsabhängigkeit zusammen mit der beobachteten Kolo-kalisation auf eine Interaktion der beiden Peroxine schließen. Diese Annahme entspricht Erkenntnissen, die aus Interaktionsstudien der jeweiligen Orthologen aus Hefen und Säugetieren hervorgehen (Snyder et al, 1999; Fang et al, 2004; Muntau et al, 2003).

6 Zusammenfassung

Peroxisomen sind obligatorische Zellorganellen der Eukaryoten. Neben α - und β -Oxidation von Fettsäuren, vermitteln sie den Abbau von Purinen und reaktiven Sauerstoffspezies. Defekte der Peroxisomen-Biogenese können zu schwerwiegenden humanen Erkrankungen wie dem Zellweger-Syndrom beim Menschen führen, das durch einen vollständigen Verlust der Peroxisomen charakterisiert ist. Symptome dieser Krankheit sind eine Akkumulation sehr langkettiger Fettsäuren, neurologische Defekte und Fehlbildungen während der Embryonalentwicklung, die zu einer Letalität im Kindesalter führen. Die Entschlüsselung der molekularen Mechanismen der Biogenese und Physiologie von Peroxisomen ist Gegenstand langjähriger Forschung und hat zur Identifizierung eines komplexen Proteinnetzwerkes geführt, das für die Funktion des Zellorganells essentiell ist. *In vivo* Modelle für die verschiedenen Komponenten dieses Netzwerkes in komplexen, genetisch zugänglichen Organismen liegen jedoch nur vereinzelt vor.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit dPex19 ein Schlüsselfaktor für die *Drosophila* Peroxisomen-Biogenese identifiziert und charakterisiert. Zur Funktionsanalyse von dPex19 wurden eine Reihe genetischer und molekularer Werkzeuge hergestellt, wie *dpex19* Nullmutanten, Überexpressionsfliegenlinien und spezifische Antikörper gegen das dPex19 Protein. Immunfluoreszenzmarkierungen zeigten, dass dPex19 während der *Drosophila*-Entwicklung weitgehend ubiquitär exprimiert wird. Subzellulär lokalisierte dPex19 zytoplasmatisch und war partiell mit Peroxisomen- und dem ER assoziiert. Genetische Studien belegten, dass dPex19 eine maternale und eine zygotische Komponente aufweist: zygotische *dpex19* Mutanten waren vornehmlich pupal letal, wenige erreichten das Adultstadium; wenn zusätzlich die maternale Komponente deletiert wurde, starben die Tiere im frühen Larvenstadium. Die gezielte Expression von *dpex19* im Fettkörper und in den Malpighischen Gefäßen im Hintergrund der Nullmutante führte zur Rettung der Letalität. Neben Immunfluoreszenzmarkierungen bestätigten Ultrastrukturanalysen einen Verlust funktioneller Peroxisomen in *dpex19* Mutanten.

Die Analyse homozygoter Tiere zeigte, dass der *dpex19* Funktionsverlust bereits im Larvenstadium zu Bewegungsdefekten führt. Ursache dieser Defekte könnte eine durch oxidativen Stress verursachte Neurodegeneration darstellen. Indizien hierfür lieferten Transkriptanalysen, die eine erhöhte Expression oxidativer Stressmarker

zeigten. Histologische Untersuchungen bestätigten neurodegenerative Veränderungen des Gehirns adulter *dpex19* Mutanten.

Biochemische Analysen des Fettsäureprofils von *dpex19* Mutanten offenbarten eine Akkumulation sehr langkettiger Fettsäuren bei gleichzeitiger Reduktion kurz- und mittelkettiger Fettsäuren. Dies kann durch den Verlust der Peroxisomen in *dpex19* Mutanten und dem damit verbundenen Abbaufekt sehr langkettiger Fettsäuren erklärt werden. Wurden *dpex19* Mutanten mit einer speziellen Lipid-Diät gefüttert, die vornehmlich kurz- und mittelkettige Fettsäuren enthielt, führte dies erstaunlicherweise zur Rettung der Letalität und Milderung der Mobilitätsdefekte. Zusammenfassend konnte mit dPex19 ein Schlüsselregulator der Peroxisomen-Biogenese im *Drosophila* Modellsystem charakterisiert werden. Die *dpex19* Nullmutante wird in Zukunft die Möglichkeit eröffnen, Teilaspekte der Ätiologie des Zellweger-Syndroms an einem Tiermodell untersuchen zu können.

Ein weiterer Teil der Dissertation befasst sich außerdem mit der Charakterisierung von Schlüsselfaktoren der späten Entwicklung des Tracheensystems, dem tubulären Atmungsorgan von Fruchtfliegen. Diese umfassen die Endozytoseregulatoren Wurst, Clathrin heavy chain (Chc) und das extrazelluläre Matrixproteine Obst-A, welche für die Morphogenese und die Physiologie des *Drosophila* Tracheensystems essentiell sind. Ultrastrukturanalysen sowie Expressions- und biochemische Interaktionsstudien konnten hierbei wesentliche Teile zu wissenschaftlichen Veröffentlichungen beitragen.

7 Anhang

7.1 *dpex19* Transkripte

Genomische *dpex19* Sequenz mit Markierung für RA-CG5325

GAACGGTCCCACTGATTGATTCAGTCAGTCTTTATTTTTTACCATTTCCC 5'UTR Exon 1
ACCCACCACGAAATCAAGGAAAAGCATCCCGAAATTGCACA**ATG**TCCGAA **ORF Start**
GAAAAGAAGAATGGCGATGAATTAACGACTTGCTGGACAGTGAGTACAG
CCCGGAAATGCCTTTGGCGATCCCTTCTCGACCCCTTACATAAATGCGCAC
TGCGTCGTCCACTTTTCGCACAGGTGCTCTCCAGGATTTTCGATAAAAAGTG Exon 2
GTGCCGGTGACCAAAGGAGCCGTCCGCATCATCGGATGTGGCGACCAAC
GCTGGACCTGAGGGCTCCGAGGATCCAGATGCGTTTTTTCATGTGAGTCAA
TGCGCCAGTGCAACGCGGCACTTGAACTTTGTATTCTGACCTGTTATCCG
CCTTCAGTGAGCAGGCCAAGGTGCTGGCCGATCGCATGAACACGCTCTTC Exon 3
GGAGGTCCGGACACGCCAGTGGCGATATTCCGCCGCTGCCCCAGGATCC
CGACCAGATCATGGCCGGTTTTCAAAAAGATGGCCGAAGCGGCAGCGCTCA
CCTTGAGCGGCGAAAATTCGGCCACCGACGAGGATGTCTCCAAGTATTCT
GATAGCATTTCCAGGCTCTCAAGGGTCTGCAAGAGGGCTCCGAGAACCT
GGCTGCTCCCGCCTCGGAGAACGACATAGCCAGCATGTTTGGTTCACTGA
ATCTTGAAGGGGTATGCATCCTGAAAATGAAATATGAATTCTCCTTGCTC
AATCATTAAACAATCCCCGTTTGACAGGCTGGCGAGGGTGATGGAAACAT Exon 4
GTTTCCTACCATTTCATGGAGGGCATGATGCAGAGCCTGCTCTCGGCGGAGA
TTCTGTTGCCCAGCATCCGGGAGCTGCTGGAGAAGTACCCCAAGTACCTC
GAGGAGAACGACGCCAAGCTCTCCGCTGAGGACAAGGAAAGGTATGCTCG
AAATCAACTCGCAATAAGATACTTTTATTGAGAAACCAATACATACAGGT Exon 5
ACCAGAAGCAGATGGAGCTGTACAAGGTGATTGAGGGGCATTTACAGAGC
GAGAAGACCGAGGATTCGGCCGCCGTGAAGCGAGAGAAGTTCCGCGTCGT
GCTGGACGACATGCGCAAAGTCAAGACTACGGCCAGCCGCCAGAGA
TTCTGGCCGAGACGGGCGGCGACTTGCCCTTCGGCGATCCCACTGCCGGC
GTAGCAGCCGGCGGTCCCGTCCCAGTGCCCAACCATG**TAG**TGGCTGAC **ORF Ende** 3'UTR
GGAGCAGATAGTCTCGTGGTGTGCCAATTGGTTAACTGTTGAGTGTTGC
ACATTTTTTAGGCTAAGGCAAATTTGTATTTTATTTTATCACCGACAAAA
CAATACGGCGGTGCTAATGGTTATCACCTCTCTTCAATCAAGCTATT
ATTTTCGTATTAACTGTTGGTTTATTAAGTAGTTCTATACCTAAATACAA
TGCCTCGAAATACACCTAGAGGAAGAAGCG

Genomische *dpex19* Sequenz mit Markierung für RB-CG5325

GAACGGTCCCCTGATTGATTTCAGTCAGTCTTTATTTTTTACCATTTCCC 5'UTR Exon 1
ACCCACCACGAAATCAAGGAAAAGCATCCCAGAAATGCACA **ATG** TCCGAA **ORF Start**
GAAAAGAAGAATGGCGATGAATTAACGACTTGCTGGACA GTGAGTACAG
CCCGGAAATGCCTTTGGCGATCCCTTCTCGACCCCTTACATAATGCGCAC
TGCGTTCGTCCTACTTTTTCGCACAG GTGCTCTCCAGGATTTTCGATAAAAGTG Exon 2
GTGCCGGTGACCAAAGGAGCCGTCCGCATCATCGGATGTGGCGACCAAC
GCTGGACCTGAGGGCTCCGAGGATCCAGATGCGTTTTTCAT GTGAGTCAA
TGCGCCAGTGCAACGCGGCACCTTGAACCTTTGTATTCTGACCTGTTATCCG
CCTTCAGTGAGCAGGCCAAGGTGCTGGCCGATCGCATGAACACGCTCTTC Exon 3
GGAGGTCCGGACACGCCAGTGGCGATATTCCGCCGCTGCCCCAGGATCC
CGACCAGATCATGGCCGGTTTTCAAAAAGATGGCCGAAGCGGCAGCGCTCA
CCTTGAGCGGGCAAAAATTCGGCCACCGACGAGGATGTCTCCAAGTATTCT
GATAGCATTTCAGGCTCTCAAGGGTCTGCAAGAGGGCTCCGAGAACCCT
GGCTGCTCCCCTCGGAGAACGACATAGCCAGCATGTTTGGTTCCTGA
ATCTTGAAGGGGTATGCATCCTGAAAATGAAATATGAATTCTCCTTGCTC
AATCAT **TAA** ACAATCCCCGTTTGACAGGCTGGCGAGGGTGATGGAAACAT **ORF Ende** 3'UTR
GTTCCTACCATTCATGGAGGGCATGATGCAGAGCCTGCTCTCGGCGGAGA
TTCTGTTGCCAGCATCCGGGAGCTGCTGGAGAAGTACCCCAAGTACCTC
GAGGAGAACGACGCCAAGCTCTCCGCTGAGGACAAGGAAAG GTATGCTCG
AAATCAACTCGCAATAAGATACTTTTATTGAGAAAACCAATACATACAGT Exon 4
ACCAGAAGCAGATGGAGCTGTACAAGGTGATTGAGGGGCATTTACAGAGC
GAGAAGACCGAGGATTCGGCCGCCGTGAAGCGAGAGAAGTTCCGCGTCGT
GCTGGACGACATGCGCAAACCTGCAAGACTACGGCCAGCCGCCAGAGA
TTCTGGCCGAGACGGGCGGGCAGCTTGCCCTTCGGCGATCCCACTGCCGGC
GTAGCAGCCGGCGGTCCCGGTCCCCAGTGCCCAACCATGTAGTGGCTGAC
GGAGCACGATAGTCTCGTGGTGTGCCAATTGGTAACTGTTGAGTGTTC
ACATTTTTTAGGCTAAGGCAAATTTGTATTTTATTTATACCCGACAAAA
CAATACGGCGGTGCTAATGGTTATCACCTCTCTTCAATCAAGCTATT
ATTTTCGTATTAAGTGTGGTTTATTAAGTAGTTCTATACCTAAATACAA
TGCCTCGAAATACACCTAGAGGAAGAAGCG

7.2 Sequenzierung inverse PCR mit genomischer DNA der EY21383 Linie

braun = *dpex19* Gensequenz ; blau = P-Element, schwarz = Vektorsequenz

>E11_fill1a_T7.ab1

ATGcAT **G**CTCGAGCGGCCCCAGTGTGATGGATATCTGCAGAATTCGCCCTTGTAAACGCTAATCACTCCGAACAGGTCAC
 AAAAAATTACCTTAAAAAGTCATAATATTAATTAAGAATAAATATAGCTGTGAGGGAAATATATACAAATATATTGGAGC
 AAATAAATGTACATACAAATATTACTAATTTCTATTGAGACGAAATGAACCACTCGGAACCATTTGAGCGAACCG
 AATCGCGCGAACTAACGACAGTCGCTCCAAGGTGCTCGAACAAGGTGAAATGTGTTGCGGAGAGCGGGTGGGAGACAG
 CGAAAGACAACTACGAAACGTGGTGTGGTGGAGGTGAATTATGAAGAGGGCGCGCATTTGAAAAGTATGTATATAAAA
 AATATATC **CCGGGCCG**TACTCACTGTCCAGCAGGTCGTTTAAATTCATCGCCATTCTTCTTTCTTCGGACATTGTGCAAT
 GTCGGGATGCTTTTCCTTGATTTTCGTTGGTGGGGAATGGTAAAAATAAAGACTGACT **CATGATGAAATAACATAAG**
GTGGTCCCGTCGATAGCCGAAGCTTACCGAAGTATACACTTAAATT **CAGTGCACGTTTGCTTGGTGGAGAGGAAAGGTTGT**
 GTGCGGACGAAATTTTTTTTAAAAACATTAACCTTACGTGGAATAAAAAAATGAAATATTGCAAAATTTGCTGCAAA
 GCTGTGACTGGAGTAAATTAATTCACGTGCCGAAAGTGTGCTATTAAGAGAAaATTGTTGGAGCAGAGCCTTGGGTGAAG
 GGCGAATTCAGCACACTGGCGGCCGTTACTAGTGGATCCGAGCTCGGTAcCAAGCTTGATGCATAGCT

7.3 EY21383 Insertion in genomischer *dpex19* Sequenz mit Markierung für RA-CG5325

GAACGGTCCCCTGATTGATTC*AGTCAGTCTTTATTTTTTACCATTTCCC 5' UTR Exon 1
ACCCACCACGAAATCAAGGAAAAGCATCCCGAAATTGCACAATGTCGGAA *EY21
GAAAAGAAGAATGGCGATGAATTAACGACTTGCTGGACAGTGAGTACAG
CCCGGAAATGCCTTTGGCGATCCCTTCTCGACCCCTTACATAAATGCGCAC
TGCGTCGTCCACTTTTCGCACAGGTGCTCTCCAGGATTTTCGATAAAAAGTG Exon 2
GTGCCGGTGACCAAAGGAGCCGTCCGCATCATCGGATGTGGCGACCAAC
GCTGGACCTGAGGGCTCCGAGGATCCAGATGCGTTTTTTCATGTGAGTCAA
TGCGCCAGTGCAACGCGGCACCTTGAACCTTTGTATTCTGACCTGTTATCCG
CCTTCAGTGAGCAGGCCAAGGTGCTGGCCGATCGCATGAACACGCTCTTC Exon 3
GGAGGTCCGGACACGCCAGTGGCGATATTCGCCGCTGCCCCAGGATCC
CGACCAGATCATGGCCGGTTTTCAAAAAGATGGCCGAAGCGGCAGCGCTCA
CCTTGAGCGGCGAAAATTCGGCCACCGACGAGGATGTCTCCAAGTATTCT
GATAGCATTTCAGGCTCTCAAGGGTCTGCAAGAGGGCTCCGAGAACCT
GGCTGCTCCCGCCTCGGAGAACGACATAGCCAGCATGTTTGGTTCACTGA
ATCTTGAAGGGGTATGCATCCTGAAAATGAAATATGAATTCTCCTTGCTC
AATCATTAA*ACAATCCCCGTTTGACAGGCTGGCGAGGGTGTGGAAACAT *UTR RB Exon 4
GTTCTACCATTTCATGGAGGGCATGATGCAGAGCCTGCTCTCGGCGGAGA
TTCTGTTGCCAGCATCCGGGAGCTGCTGGAGAAGTACCCCAAGTACCTC
GAGGAGAACGACGCCAAGCTCTCCGCTGAGGACAAGGAAAGGTATGCTCG
AAATCAACTCGCAATAAGATACTTTTATTGAGAAAACCAATACATACAGGT Exon 5
ACCAGAAGCAGATGGAGCTGTACAAGGTGATTGAGGGGCATTTACAGAGC
GAGAAGACCGAGGATTCGGCCGCCGTGAAGCGAGAGAAGTTCCGCGTCGT
GCTGGACGACATGCGCAAACCTGCAAGACTACGGCCAGCCGCCAGAGA
TTCTGGCCGAGACGGGCGGCGACTTGCCCTTCGGCGATCCCACTGCCGGC
GTAGCAGCCGGCGGTCCCGGTCCCCAGTGCCCAACCATGTAGTGGCTGAC 3' UTR
GGAGCACGATAGTCTCGTGGTGTGCCAATTGGTTAACTGTTGAGTGTTC
ACATTTTTTAGGCTAAGGCAAATTTGTATTTTATTTTATCACCGACAAAA
CAATACGGCGGTGCTAATGGTTATCACCTCTCTTCAATCAAGCTATT
ATTTTCGTATTAAGTGTGGTTTATTAAGTAGTTCTATACCTAAATACAA
TGCCTCGAAATACACCTAGAGGAAGAAGCG

7.4 Primer Anlagerungssequenz im *dpex19* Genlocus zur Verifikation des EY21383 P-Elements in *dpex19*

```

cggtttggtccaccctaagccgcaaaataaaaacaccaaattatgcattatctcagtcgaa
gctccgcccattgctgacatcttcagagaaaccgactgaccgaagaaaactccgcccacaata fwP1
gtggaaatagaggaaaaaacacaaaatttaccacaatacttcgctgctggggtgagccgaa
tcgaagattcggtttgctctctggttaaacgctgctggttaaagtcgcaagagcacagcc
catcccagcccagccatttgaccatatgagcgggaattgaggaaaccaagcgggggtcctc
cgcagcgggtgacctcggggcgggagtgacactagagctggacgcctactgcaaaatcca
tgtgtcccgtccatgggtgtgacgttctggtttcgggaattggtcgcgcacagcgtcgcg
ccgtgaccttgatgggtttgacgacctccctcaccactcagtatgtgctggtttgggtc
tggtcgcagtttggtcgcgcatctcgtccgcgcacagcgggtgacctcccggggaga
ttggctgagagtttcgcagaagatgctgtaaatatcttgggtgattatcttagataatctt
cgactaatgtccttggtttgctctcaagacaggaggatattgagggtgcttcgaattta
agtttattagctgatgtaggcctagatttaaatatgtacactattatattgtagatggg
tgtactgatgacttggttggtgtaagacatataatcttaaatcaaaactcgaaatctc
attgacaataaatatattgattatgaattaaatggctagacatcttcacacttatgtgta
gtccacaataataatgcatccagattatctgaaataggatctgaacttggtttgaa
ctttatataatagtaacaaataagaattcttaatttaaggaatatactactaaaaatta
aacaaaatagctatctttcttaaaaaaacattaaatgcatcttaaaagtgttttaagt
aatatgaatcttgcctaagccctaaccgaaaactgaaatcttaaaattaaaaccaacaatt fwP2
atatagaaaagtttaatttttaaatctttcttatcatttcgcatccttttaaaagccg
ttacgaatgctggctgcactaagatgtgagtcagtgtagccacacctggtcagctgactgc
ggatgaccagcagcagatGAACGGTCCCCTGATTGATTC*AGTCAGTCTTTATTTTTT
ACCATTTCCCACCCACCACGAAATCAAGGAAAAGCATCCCAGAAATGACACAATGTCCGAA
GAAAAGAAGAATGGCGATGAATTAACGACTTGCTGGACAgtgagtacagcccggaaatg
cctttggcgatcccttctcagaccttacataatgctgactgctgctccacttttcgca
cagGTGCTCTCCAGGATTTTCGATAAAAGTGGTGCCGGTGACCAAAGGAGCCGTCCGCAT
CATCGGATGTGGCGACCAACGCTGGACCTGAGGGCTCCGAGGATCCAGATGCGTTTTTCA
Tgtgagtcagtgcgccaagtgaacgcggcacttgaactttgtattctgacctgtatccg rvP1
ccttcagTGAGCAGGCCAAGGTGCTGGCCGATCGCATGAACACGCTCTTCGGAGGTCCGG
ACACGCCAGTGGCGATATTCGCCCGCTGCCCCAGGATCCCAGCAGATCATGGCCGGTT
TCAAAAAGATGGCCGAAGCGGCAGCGCTCACCTTGAGCGGGCGAAAATTCGGCCACCGACG
AGGATGTCTCCAAGTATTCTGATAGCATTTCACAGGCTCTCAAGGGTCTGCAAGAGGGCT
CCGAGAACCTGGCTGCTCCCGCCTCGGAGAACGACATAGCCAGCATGTTTGGTTCACTGA
ATCTTGAAGGGGTATGCATCCTGAAAATGAAATATGAATTCTCCTTGCTCAATCATTAAA
CAATCCCCTTTGACAGGCTGGCGAGGGTGTATGGAACATGTTTCTACCATTTCATGGAGG
GCATGATGCAGAGCCTGCTCTCGGCGAGATTCTGTTGCCAGCATCCGGGAGCTGCTGG
AGAAGTACCCCAAGTACTCTCGAGGAGAACGACGCAAGCTCTCCGCTGAGGACAAGGAAA
GgtatgctcgaaatcaactcgcaataagatacttttattgagaaaccaatacacacagGT
ACCAGAAGCAGATGGAGCTGTACAAGGTGATTGAGGGGCATTTACAGAGCGAGAAGACCG
AGGATTCGGCCCGCGTGAAGCGAGAGAAGTTCCGCGTCTGCTGGACGACATGCGCAAAC
TGCAAGACTACGGCCAGCCGCGCCAGAGATTCTGGCCGAGACGGGCGGGGACTTGCCCT
TCGGCGATCCCCTGCGGGCTAGCAGCCGGCGGTCCCAGTCCCAGTGCCCAACCATGT
AGTGGCTGACGGAGCACGATAGTCTCGTGGTGTGCCAATTGGTTAACTGTTGAGTGTTC
ACATTTTTTAGGCTAAGGCAAATTTGTATTTTTATTTTATCACCACAAAACAATACGGCG rvP2
GTCGCTAATGGTTATCACCTCTCTCTCAATCAAGCTATTATTTTCGTATTAAGTGTGG
TTTATTAAGTAGTTCTATACCTAAATACAATGCCTCGAAATACACCTAGAGGAAGAAGCG
AC

```

fwP2 = fill15012up_fw
rvP1 = fill15012do_rv
fwP2 & rvP1 = 545 bp

Primerkombination für "Jump out screen"

fwP1 = genFillfwshort
rvP2 = genFillrev
fwP1 & rvP2 = 2509 bp

Primerkombination für Deletionen stromabwärts des P-Elementes

fwP2 = fill15012up_fw
 rvP2 = genFillrev
 fwP2 & rvP2 = 1559 bp

Primerkombination für Deletionen stromaufwärts des P-Elementes

fwP1 = genFillfwshort
 rvP1 = fill15012do_rv
 fwP1 & rvP1 = 1495 bp

7.5 EY21383 “Jump out Screen”

Bezeichnung der letalen Allele	Letalität (Δ EY/ Δ EY)	Letalität Δ EY/Df(2l)esc ³⁻⁰	PCR Fragment im Vergleich zu w-	Sequenziert
dB2	Ja	Ja	Kürzer	
dC3	Ja	Nein	/	
dC8	Ja	Nein	/	
dD10	Ja	Ja	Kürzer	Ja
dE1	Ja	Ja	Normal	
dE2	Ja	Semi-letal (2%)	/	
dE5	Ja	Nein	Normal	
dE7	Ja	Ja	Normal	
dF3	Ja	Nein	Normal	
dF7	Ja	Ja	Kürzer	Ja
dF8	Ja	Ja	Kürzer	Ja
dF10	Ja	Ja	Kürzer	Ja
dG5	Ja	Nein	Kein Amplikon	
dG8	Ja	Ja	Normal	
dG12	Ja	Ja	Kürzer	
dH6	Ja	Ja	Kürzer	
dH10	Ja	Ja	Normal	

dI6	Ja	Ja	Kürzer	
dI7	Ja	Nein	/	
dI11	Ja	Nein	/	
dI12	Ja	Ja	Kürzer	
dJ5	Ja	Ja	Normal	
dJ12	Ja	Ja	Normal	
dL3	Ja	Semi-letal (2%)	Kürzer	
dL4	Ja	Semi-letal (4%)	Normal	
dM5	Ja	Ja	Normal	
dM6	Ja	Ja	Normal	
dN9	Ja	Ja	Kürzer	

Revertanten lebensfähige Allele	Letalität ($\Delta EY/\Delta EY$)	Letalität $\Delta EY/Df(2I)esc^{3-0}$	PCR Fragment im Vergleich zu w-	Sequenziert
dH11	Nein	Nicht getestet	Normal	Ja
dK3	Nein	Nicht getestet	Normal	Ja
dL6	Nein	Nicht getestet	Normal	Ja
dG6	Nein	Nicht getestet	Normal	Ja
dI2	Nein	Nicht getestet	Normal	Ja
dG2	Nein	Nicht getestet	Normal	Ja
dN7	Nein	Nicht getestet	Normal	Ja

7.6 Genomische *dpex19* Sequenz mit Markierung für RA-CG5325, EY21383 Insertion & Deletion dF7

siehe dF7 Sequenzierung

GAACGGTCCCCTGATTGATTG*AGTCAGTCTTTATTTTTTACCATTTCCTCC 5'UTR Exon 1
 *EY21
 ACCCACCACGAAATCAAGGAAAAGCATCCCAGAAATTGCACAATGTCGGAA
 GAAAAGAAGAATGGCGATGAATTAACGACTTGCTGGACAAGTGTGAGTACAG
 CCCGGAAATGCCTTTGGCGATCCCTTCTCGACCCCTTACATAATGCGCAC
 TGCGTTCGTCCTACTTTTTCGCACAGGTGCTCTCCAGGATTTTCGATAAAAGTG Exon 2
 GTGCCGGTGACCAAAAGGAGCCGTCCGCATCATCGGATGTGGCGACCAAC
 GCTGGACCTGAGGGCTCCGAGGATCCAGATGCGTTTTTTCATGTGAGTCAA
 TGCGCCAGTGAACGCGGCACCTTGAACCTTGTATTCTGACCTGTTATCCG
 CCTTCAGTGAGCAGGCCAAGGTGCTGGCCGATCGCATGAACACGCTCTTC
 GGAGGTCCGGACACGCCAGTGGCGATATTCCGCCGCTGCCCCAGGATCC
 CGACCAGATCATGGCCGGTTTTCAAAAAGATGGCCGAAGCGGCAGCGCTCA
 CCTTGAGCGGCGAAAATTCGGCCACCGACGAGGATGTCTCCAAGTATTCT
 GATAGCATTTCAGGCTCTCAAGGTCTGCAAGAGGGCTCCGAGAACCT
 GGCTGCTCCCGCCTCGGAGAACGACATAGCCAGCATGTTTGGTTCACTGA
 ATCTTGAAGGGGTATGCATCCTGAAAATGAAATATGAATTCTCCTTGCTC
 AATCATTAA*ACAATCCCCGTTTGACAGGCTGGCGAGGGTGATGGAAACAT *UTR RB Exon 4
 GTTCCTACCATTTCATGGAGGGCATGATGCAGAGCCTGCTCTCGGCGGAGA
 TTCTGTTGCCAGCATCCGGGAGCTGCTGGAGAAGTACCCCAAGTACCTC
 GAGGAGAACGACGCCAAGCTCTCCGCTGAGGACAAGGAAAAGGTATGCTCG
 AAATCAACTCGCAATAAGATACTTTTATTGAGAAAACCAATACATACAGGT
 ACCAGAAGCAGATGGAGCTGTACAAGGTGATTGAGGGGCATTTACAGAGC
 GAGAAGACCGAGGATTCGGCCGCCGTGAAGCGAGAGAAGTTCCGCGTCGT
 GCTGGACGACATGCGCAAACGCAAGACTACGGCCAGCCGCCAGAGA
 TTCTGGCCGAGACGGGCGGCGACTTGCCTTCCGGCGATCCCACTGCCGGC
 GTAGCAGCCGGCGGTCCCGTCCCGAGTGCCCAACCATGTAGTGGCTGAC
 GGAGCAGATAGTCTCGTGGTGTGCCAATTGGTTAACGTGTGAGTGTTCG
 ACATTTTTTAGGCTAAGGCAAATTTGTATTTTTATTTTATCACCGACAAAA
 CAATACGGCGGTTCGCTAATGGTTATCACCTCTCTCTTCAATCAAGCTATT
 ATTTTCGTATTAAGTGTGGTTTATTAAGTAGTTCTATACCTAAATACAA
 TGCCTCGAAATACACCTAGAGGAAGAAGCG

Deletionsbereich = grau schattiert

Sequenzierung des dF7/dF7 PCR Fragments

Sequenzierprimer: fillup_fw

“GATC1-F7-fill_up sequence exported from chromatogram file”

TTTAAATTTAAACCAACCATTATATAGAAAAGTTAATTTTTAAAATATTTTCTTATCATT
 TCGCATCCTTTTAAAAGCCGTTACGAAGGCGGTTCGCACTAAGATGGGAGTCAGTGTAGC
 CACACCTGTTTCACTGACTGCGGTATGCACACCAGCAGATGAACGGTCCCCTGATTGA
 TTCGGTCAATCCATGATGAAATAATGTTGAGTGTTCACATTTTTTAGGCTAAGGGAAAT
 TTGTATTTTTATTTTATCACCGACAAAAACAATACGGCGGTCCGCAATTTGGAGTTCCTTCCA
 AACAATAGGAAATCAATCATAACCCATAACAAAATAGTTTTTTTTCTCCCTTTTGG

Chromatogram unsauber

P-Element Sequenz

dpex19 Sequenz siehe gelb unterlegte Bereiche oben

Anfang und Ende der *dpex19* Sequenz

7.7 Genomische *dpex19* Sequenz mit Zeichnung für RA-CG5325, EY21383 Insertion & Deletion dF8; dF10; dD10

siehe dF8; dF10 und dD10 Sequenzierung

GAACGGTCCCCTGATTGATTC*AGTCAGTCTTTATTTTTTACCATTTCCTCC 5'UTR Exon1
 ACCCACCACGAAATCAAGGAAAAGCATCCCCGAAATTGCACAATGTCGGAA *EY21 Startcodon
 GAAAAGAAGAATGGCGATGAATTAACGACTTGCTGGACAAGTGAGTACAG
 CCCGGAAATGCCTTTGGCGATCCCTTCTCGACCCCTTACATAATGCGCAC
 TGCGTTCGTCCTACTTTTTCGCACAGGTGCTCTCCAGGATTTTCGATAAAAGTG Exon 2
 GTGCCGGTGACCAAAGGAGCCGTCCGCATCATCGGATGTGGCGACCAAC
 GCTGGACCTGAGGGCTCCGAGGATCCAGATGCGTTTTTTCATGTGAGTCAA
 TGCGCCAGTGAACGCGGCACCTTGAACCTTTGTATTCTGACCTGTTATCCG
 CCTTCAGTGAGCAGGCCAAGGTGCTGGCCGATCGCATGAACACGCTCTTC Exon 3
 GGAGTCCGGACACGCCAGTGGCGATATTCCGCCGTGCCCCAGGATCC
 CGACCAGATCATGGCCGGTTTCAAAAAGATGGCCGAAGCGGCAGCGCTCA
 CCTTGAGCGGCCAAAATTCGGCCACCGACGAGGATGTCTCCAAGTATTCT
 GATAGCATTTCCAGGCTCTCAAGGGTCTGCAAGAGGGCTCCGAGAACCCT
 GGCTGCTCCCCTCGGAGAACGACATAGCCAGCATGTTTGGTTCACTGA
 ATCTTGAAGGGGTATGCATCCTGAAAATGAAATATGAATTCTCCTTGCTC
 AATCATTAA*ACAATCCCCGTTTGACAGGCTGGCGAGGGTGATGGAAACAT *UTR RB Exon 4
 GTTCCTACCATTTCATGGAGGGCATGATGCAGAGCCTGCTCTCGGCGGAGA
 TTCTGTTGCCAGCATCCGGGAGCTGCTGGAGAAGTACCCAAAGTACCTC siehe dF8, dF10
 GAGGAGAACGACGCCAAGCTCTCCGCTGAGGACAAGGAAAGGTATGCTCG dD10 und
 AAATCAACTCGCAATAAGATACTTTTATTGAGAAACCAATACATACAGGT Sequenzierung
 ACCAGAAGCAGATGGAGCTGTACAAGGTGATTGAGGGGCATTTACAGAGC Exon5
 GAGAAGACCGAGGATTCGGCCGCCGTGAAGCGAGAGAAGTTCCGCGTCGT
 GCTGGACGACATGCGCAAACCTGCAAGACTACGGCCAGCCGCCAGAGA
 TTCTGGCCGAGACGGGCGGCGACTTGCCTTCCGGCGATCCCCTGCCC
 GTAGCAGCCGGCGGTCCCGTCCCGAGTGCCTAACCATGTAGTGGCTGAC 3'UTR
 GGAGCAGATAGTCTCGTGGTGTGCCAATTGGTTAACTGTTGAGTGTGTC
 ACATTTTTTGGGCTAAGGCAAATTTGTATTTTATTTTATCACCAGACAAA
 CAATACGGCGGTGCTAATGGTTATCACCTCTCTCTTCAATCAAGCTATT
 ATTTTCGTATTAAGTGGTTTATTAAGTAGTTCTATACTAAATACAA
 TGCCTCGAAATACACCTAGAGGAAGAAGCG

Sequenzierung des dF8/dF8 PCR Fragments

Sequenzierprimer: fwP2

“GATC1-F8-fill_up sequence exported from chromatogram file”

CATTATTAAACCAACACTTATCTAGAAAAGTTAATTTTTAAAATATTTTCTTATCATTTTC
 GCATCCTTTTTAAAAGCCGTTACGAATGCGGTGCACTAAGATGTGAGTCAGTGTAGCCA
 CACCTGTTTCAGATGACTGCGGTATGCACCAGCAGCAGATGAACGGTCCCCTGATTGATT
 CAGTCAGTCTTGTGAAATAACCTACTACTCTCGAGGAGAACGAGGCCAAGCTCTCCGCT
 GAGGACAAGGAAAGGTATGCACGAAACCAACTCGCAATAAGATACTTTTTTTGAGAAAAC
 AATACCTACAGGTACCAGAACCAATGGAGCTGTACAAGGTGATTGAGGGGCATTTACAG
 ACCGAGAAGACCGAGGATTCGGCCCCGTGAAGCGAGAGAAGTTCCGCGTCGTGCTGGAC
 GACATGCCCAAACCTTCAAAACTACGGCCAGCCGCCCAAATATTCTGGCCAATACGGGC
 GGCGACTTGCCTTTCGGCGATCCCCTGCGGACATAGCAGCCGGCGTCCCGGTCCCAG
 CGCCAACCATGCAGTGGAA

Sequenzierung des dF10/dF10 PCR Fragments

Sequenzierprimer: fwP2

“GATC1-F10-fill_up sequence exported from chromatogram file”

```
GTATTAATTAACCAAATTATATAGAAAAGTTAATTTTTTAAATTTTTTCTTATCATT
CGCATCCTTTTTAAAAGCCGTTACGAATGCGGTGCGACTAAGATGTGAGTCAGTGTAGCC
ACACCTGTTTCAGCTGACTGCGGTATGCACCAGCAGCAGATGAACGGTCCCCTGATTGAT
TCAGTCAGTCTTGATGAAATAACCTAGTACCTCAAGGAGAACGAGGCCAAGCTCTCCGC
TGAGGACAAGGAAAGGTATGCTCGAAACCAACTCGCAATAAGATACTTTTTATTGAGAAAC
CAATACCTACAGGTACCAGAAGCAGATGGAGCTGTACAAGGTGATTGAGGGGCATTTACA
GAGCGAGAAGACCGAGGATTCGGCCGCCGTGAAGCGAGAGAAGTTCCGCGTCGTGCTGGA
CGACATGCGCAAACCTGCAAGACTACGGCCAGCCGCCAGAGATTCTGGCCGAGACGGG
CGGCGACTTGCCCTTCGGCGATCCCCTGCGGGCGTAGCAGCCGGCGGTCCCCTCCCA
GTGCCAACCATGTATTGGCTGACGAACCACGATAGTCTCGAGGTGTGCCAATTGGTTAA
CTGTTGACTGTTGCACATTTTTTATGCTAAGCAAATTAGTATTTTTATTTATCATCAATA
AAACAAAACGGCGGCCGCTA
```

Sequenzierung des dD10/dD10 PCR Fragments

Sequenzierprimer: fwP2

“GATC1-D10-fill_up sequence exported from chromatogram file”

```
CCCTAAATTAAACCAACAATTATATAGAAAAGTTAATTTTTTAAATTTTTTCTTATCATT
TCGCATCCTTTTTAAAAGCCGTTACGAATGCGGTCCCCTAAAATGGGAGTCAGGGTAGC
CACCCCTGTTTCAGCTGACTGCGGTATGCACCAGCAGCAGATGAACGGTCCCCTGATTGA
TTCAGTCAGTCCATGATGAAATAACCTAGTACCTCGAGGAGAACGAGGCCAAGCTCTCCG
CTGAGGACAAGGAAAGGTATGCTCGAAACCAACTCGCAATAAGATACTTTTTTTGAGAAA
CCAATACCTACAGGTACCAGAAGCAAATGGAGCTGTACAAGGTGATTGAGGGGCATTTAC
AAAGCGAGAAGACCGAGGATTCGGCCGCCGTGAAGCGAGAGAAGTTCCGCGTCGTGCTGG
ACAACATGCGCAAACCTGAAAACTACGGCCAGCCGCCAGAGATTTGGCCGAAACGG
GGGGCGACTTGCCCTTCGGCGATCCCCTGCGGGCGTAGCAGCCGGTGGACCCGGCCCCC
AGTGCCCCCTTTGTAATGGCTGACGAAGCACGTTAGTCTCGTGGGGTGCCAATTGATTAA
TTGTTGAATGTCACATTTTTTATTTAAGGAAAATTTGTATTTTTTTTTTTCCCTTAAT
TGATTATATGGAGTGGATATGGTGAATTAGCAGGTTATCGAAATCAAAGTATATCCA
```

P-Element Sequenz

dpex19 Sequenz siehe gelb unterlegte Bereiche oben

Anfang und Ende der *dpex19* Sequenz

7.8 Sequenzvergleich Δ EY Revertanten und white⁻

white- Sequenz oben; K3/K3 Revertante Sequenz unten

Score = 887 bits (480), Expect = 0.0, Identities = 483/484 (99%), Gaps = 1/484 (0%), Strand=Plus/Plus

```

Query 71  TCGCACTAAGATGTGAGTCAGTGTAGCCACACCTGTTTCAGCTGACTGCGGTATGCACCAG 130
          |||
Sbjct 61  TCGCACTAAGATGTGAGTCAGTGTAGCCACACCTGTTTCAGCTGACTGCGGTATGCACCAG 120

Query 131 CAGCAGATGAACGGTCCCCTGATTGATTC*AGTCAGTCTTTATTTTACCATTGCCAC 190 *EY21
          |||
Sbjct 121 CAGCAGATGAACGGTCCCCTGATTGATTC*AGTCAGTCTTTATTTTACCATTGCCAC 180

Query 191 CCACCACGAAATCAAGGAAAAGCATCCCGAAATTGCACAATGTCCGAGAAAAGAAGAAAT 250
          |||
Sbjct 181 CCACCACGAAATCAAGGAAAAGCATCCCGAAATTGCACAATGTCCGAGAAAAGAAGAAAT 240

```

white- Sequenz oben; L6/L6 Revertante Sequenz unten

Score = 876 bits (474), Expect = 0.0; Identities = 479/482 (99%), Gaps = 1/482 (0%), Strand=Plus/Plus

```

Query 60  TACGAATGCGGTGCGCACTAAGATGTGAGTCAGTGTAGCCACACCTGTTTCAGCTGACTGCG 119
          |||
Sbjct 61  TACGAATGCGGTGCGCACTAAGATGTGAGTCAGTGTAGCCACACCTGTTTCAGCTGACTGCG 120

Query 120 GTATGCACCAGCAGCAGATGAACGGTCCCCTGATTGATTC*AGTCAGTCTTTATTTTFTA 179 *EY21
          |||
Sbjct 121 GTATGCACCAGCAGCAGATGAACGGTCCCCTGATTGATTC*AGTCAGTCTTTATTTTFTA 180

Query 180 CCATTTCCCACCCACCACGAAATCAAGGAAAAGCATCCCGAAATTGCACAATGTCCGAAAG 239
          |||
Sbjct 181 CCATTTCCCACCCACCACGAAATCAAGGAAAAGCATCCCGAAATTGCACAATGTCCGAAAG 240

```

white- Sequenz oben; H11/H11 Revertante Sequenz unten

Score = 878 bits (475), Expect = 0.0, Identities = 480/483 (99%), Gaps = 1/483 (0%), Strand=Plus/Plus

```

Query 60  TACGAATGCGGTGCGCACTAAGATGTGAGTCAGTGTAGCCACACCTGTTTCAGCTGACTGCG 119
          |||
Sbjct 62  TACGAATGCGGTGCGCACTAAGATGTGAGTCAGTGTAGCCACACCTGTTTCAGCTGACTGCG 121

Query 120 GTATGCACCAGCAGCAGATGAACGGTCCCCTGATTGATTC*AGTCAGTCTTTATTTTFTA 179 *EY21
          |||
Sbjct 122 GTATGCACCAGCAGCAGATGAACGGTCCCCTGATTGATTC*AGTCAGTCTTTATTTTFTA 181

Query 180 CCATTTCCCACCCACCACGAAATCAAGGAAAAGCATCCCGAAATTGCACAATGTCCGAAAG 239
          |||
Sbjct 182 CCATTTCCCACCCACCACGAAATCAAGGAAAAGCATCCCGAAATTGCACAATGTCCGAAAG 241

```

white- Sequenz oben; G2/G2 Revertante Sequenz unten

Score = 883 bits (478), Expect = 0.0; Identities = 483/485 (99%), Gaps = 2/485 (0%); Strand=Plus/Plus

```

Query 59  CGTTACGAATGCGGTGCGACTAAGATGTGAGTCAGTGTAGCCACACCTGTTTCAGCTGACT 118
          |||
Sbjct 61  CGTTACGAATGCGGTGCGACTAAGATGTGAGTCAGTGTAGCCACACCTGTTTCAGCTGACT 120

Query 119 GCGGTATGCACCAGCAGCAGATGAACGGTCCCCTGATTGATTC*AGTCAGTCTTTATTTT 178 *EY21
          |||
Sbjct 121 GCGGTATGCACCAGCAGCAGATGAACGGTCCCCTGATTGATTC*AGTCAGTCTTTATTTT 180

Query 179 TTACCATTTCCCACCCACCACGAAATCAAGGAAAAGCATCCCAGAAATGCACAATGTCCG 238
          |||
Sbjct 181 TTACCATTTCCCACCCACCACGAAATCAAGGAAAAGCATCCCAGAAATGCACAATGTCCG 240

```

white- Sequenz oben; G6/G6 Revertante Sequenz unten

Score = 824 bits (446), Expect = 0.0; Identities = 446/446 (100%), Gaps = 0/446 (0%); Strand=Plus/Plus

```

Query 98  GCCACACCTGTTTCAGCTGACTGCGGTATGCACCAGCAGCAGATGAACGGTCCCCTGATT 157
          |||
Sbjct 61  GCCACACCTGTTTCAGCTGACTGCGGTATGCACCAGCAGCAGATGAACGGTCCCCTGATT 120

Query 158 GATTC*AGTCAGTCTTTATTTTACCATTTCCCACCCACCACGAAATCAAGGAAAAGCAT 217 *EY21
          |||
Sbjct 121 GATTC*AGTCAGTCTTTATTTTACCATTTCCCACCCACCACGAAATCAAGGAAAAGCAT 180

Query 218 CCCGAAATTGCACAATGTCCGAAAGAAAAGAAGTGGCGATGAATTAACGACTTGCTGG 277
          |||
Sbjct 181 CCCGAAATTGCACAATGTCCGAAAGAAAAGAAGTGGCGATGAATTAACGACTTGCTGG 240

```

white- Sequenz oben; I2/I2 Revertante Sequenz unten

Score = 883 bits (478), Expect = 0.0; Identities = 482/484 (99%), Gaps = 1/484 (0%); Strand=Plus/Plus

```

Query 60  GTTACGAATGCGGTGCGACTAAGATGTGAGTCAGTGTAGCCACACCTGTTTCAGCTGACTG 119
          |||
Sbjct 61  GTTACGAATGCGGTGCGACTAAGATGTGAGTCAGTGTAGCCACACCTGTTTCAGCTGACTG 120

Query 120 CGGTATGCACCAGCAGCAGATGAACGGTCCCCTGATTGATTC*AGTCAGTCTTTATTTT 179 *EY21
          |||
Sbjct 121 CGGTATGCACCAGCAGCAGATGAACGGTCCCCTGATTGATTC*AGTCAGTCTTTATTTT 180

Query 180 TACCATTTCCCACCCACCACGAAATCAAGGAAAAGCATCCCAGAAATGCACAATGTCCGA 239
          |||
Sbjct 181 TACCATTTCCCACCCACCACGAAATCAAGGAAAAGCATCCCAGAAATGCACAATGTCCGA 240

```


white- Sequenz oben; N7/N7 Revertante Sequenz unten

Score = 907 bits (491), Expect = 0.0; Identities = 496/498 (99%), Gaps = 2/498 (0%); Strand=Plus/Plus

```

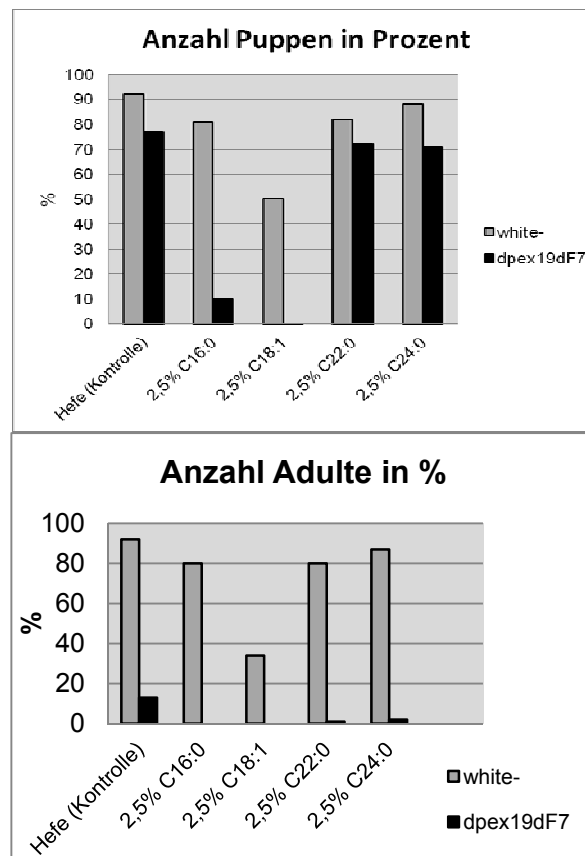
Query  59  CGTTACGAATGCGGTGCGACTAAGATGTGAGTCAGTGTAGCCACACCTGTTTCAGCTGACT  118
      |||
Sbjct  63  CGTTACGAATGCGGTGCGACTAAGATGTGAGTCAGTGTAGCCACACCTGTTTCAGCTGACT  122

Query  119 GCGGTATGCACCAGCAGCAGATGAACGGTCCCAGTATTGATTC*AGTCAGTCTTTATTTT  178 *EY21
      |||
Sbjct  123 GCGGTATGCACCAGCAGCAGATGAACGGTCCCAGTATTGATTC*AGTCAGTCTTTATTTT  182

Query  179 TTACCATTTCCACCCACCACGAAATCAAGGAAAAGCATCCCGAAATTGCACAATGTCCG  238
      |||
Sbjct  183 TTACCATTTCCACCCACCACGAAATCAAGGAAAAGCATCCCGAAATTGCACAATGTCCG  242

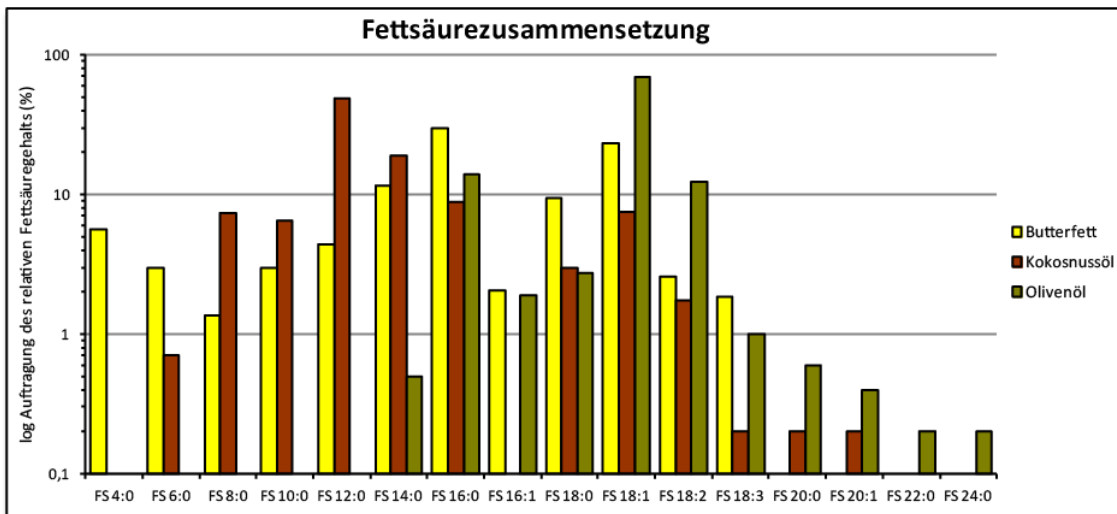
```

7.9 Verfütterung von freien Fettsäuren



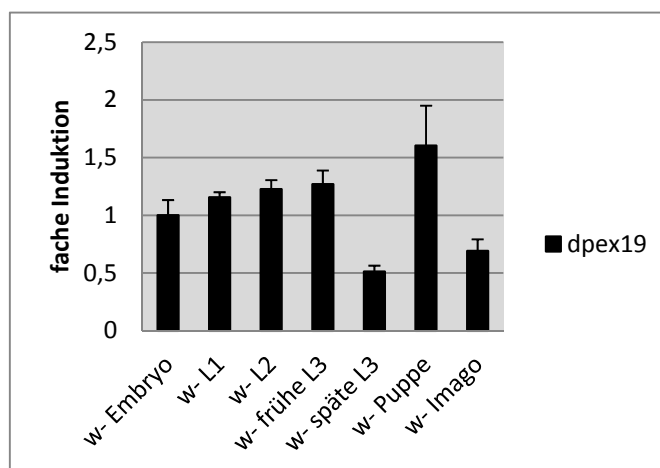
Dargestellt ist die Anzahl an Tieren in Prozent die das Puppenstadium (links) und das Adultstadium (rechts) erreichen. Die Startpopulation beträgt pro Bedingung und Genotyp 100 frühe L1 Larven. Die freien Fettsäuren wurden mit einem Pürierstab in Instant-Standardfliegenfutter (Jazz Mix) gemischt. Die freien Fettsäuren bewirken auch in Kontrolltieren (w-) Letalität in den Larvenstadien oder während der Metamorphose. Die adulten Fliegen leben nur wenige Tage.

7.10 Fettsäurezusammensetzung der Speisefette und -öle



Dargestellt und logarithmisch aufgetragen ist der relative Fettsäuregehalt von Speisefetten und -ölen. Quelle: Deutsche Gesellschaft für Fettwissenschaften e.V. (www.dgfett.de) Fettsäurezusammensetzung wichtiger pflanzlicher und tierischer Speisefette und -öle. 21.12.2011 Autor: Hans-Jochen Fiebig (Münster). Auffallend ist, dass Butter und Kokosnussöl keine sehr langkettigen Fettsäuren aber mittelkettige Fettsäuren besitzen. Olivenöl hat keine mittelkettigen Fettsäuren aber dafür viele langkettige, ungesättigte und sehr langkettige Fettsäuren.

7.11 *dpex19* Expression während der Ontogenese



Dargestellt ist die *dpex19* Expression während der Ontogenese. Die Expressionsanalysen mittels qRT-PCR zeigen eine ubiquitäre *dpex19* Expression, die in ihrer Ausprägung variiert. In der ersten Hälfte des dritten Larvenstadiums und während der Pupalentwicklung konnte die höchste, in der zweiten Hälfte des dritten Larvenstadiums und in der adulten Fliege die niedrigste *dpex19* Expression detektiert werden.

8 Literaturverzeichnis

Agne B, Meindl NM, Niederhoff K, Einwächter H, Rehling P, Sickmann A, Meyer HE, Girzalsky W & Kunau WH (2003) Pex8p: an intraperoxisomal organizer of the peroxisomal import machinery. *Mol. Cell* **11**: 635–646

Angermüller S, Leupold C, Völkl A & Fahimi HD (1986) Electron microscopic cytochemical localization of alpha-hydroxyacid oxidase in rat liver. Association with the crystalline core and matrix of peroxisomes. *Histochemistry* **85**: 403–409

Aubourg P, Adamsbaum C, Lavallard-Rousseau MC, Rocchiccioli F, Cartier N, Jambaqué I, Jakobezak C, Lemaitre A, Boureau F & Wolf C (1993) A two-year trial of oleic and erucic acids ("Lorenzo's oil") as treatment for adrenomyeloneuropathy. *N. Engl. J. Med.* **329**: 745–752

Baes M & van Veldhoven PP (2006) Generalised and conditional inactivation of Pex genes in mice. *Biochim. Biophys. Acta* **1763**: 1785–1793

Baes M, Gressens P, Baumgart E, Carmeliet P, Casteels M, Fransen M, Evrard P, Fahimi D, Declercq PE, Collen D, van Veldhoven PP & Mannaerts GP (1997) A mouse model for Zellweger syndrome. *Nat. Genet.* **17**: 49–57

Bauer R, Voelzmann A, Breiden B, Schepers U, Farwanah H, Hahn I, Eckardt F, Sandhoff K & Hoch M (2009) Schlank, a member of the ceramide synthase family controls growth and body fat in *Drosophila*. *EMBO J* **28**: 3706–3716

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

Behr M, Wingen C, Wolf C, Schuh R & Hoch M (2007) Wurst is essential for airway clearance and respiratory-tube size control. *Nat. Cell Biol* **9**: 847–853

Berg JM, Tymoczko JL & Stryer L (2003) *Biochemie*. Spektrum Akad. Verl., Heidelberg [u.a.]

Berger J, Pujol A, Aubourg P & Forss-Petter S (2010) Current and future pharmacological treatment strategies in X-linked adrenoleukodystrophy. *Brain Pathol.* **20**: 845–856

Bobinnec Y, Marcaillou C, Morin X & Debec A (2003) Dynamics of the endoplasmic reticulum during early development of *Drosophila melanogaster*. *Cell Motil. Cytoskeleton* **54**: 217–225

Botella JA, Ulschmid JK, Gruenewald C, Moehle C, Kretzschmar D, Becker K & Schneuwly S (2004) The *Drosophila* carbonyl reductase sniffer prevents oxidative stress-induced neurodegeneration. *Curr. Biol.* **14**: 782–786

BOWEN P, LEE CS, ZELLWEGER H & LINDENBERG R (1964) A FAMILIAL SYNDROME OF MULTIPLE CONGENITAL DEFECTS. *Bull Johns Hopkins Hosp* **114**: 402–414

Brand AH & Perrimon N (1993) Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* **118**: 401–415

Braun A, Kammerer S, Weissenhorn W, Weiss EH & Cleve H (1994) Sequence of a putative human housekeeping gene (HK33) localized on chromosome 1. *Gene* **146**: 291–295

- Breidenbach RW & Beevers H (1967) Association of the glyoxylate cycle enzymes in a novel subcellular particle from castor bean endosperm. *Biochem. Biophys. Res. Commun* **27**: 462–469
- Bujupi F (2011) *Generation and examination of transgenic fly lines for manipulating Peroxins Pex3, Pex16 and Pex19 function in Drosophila melanogaster: Bachelor thesis*, Bonn
- Butterfield DA & Kanski J (2001) Brain protein oxidation in age-related neurodegenerative disorders that are associated with aggregated proteins. *Mech. Ageing Dev.* **122**: 945–962
- Butterfield DA, Howard BJ & LaFontaine MA (2001) Brain oxidative stress in animal models of accelerated aging and the age-related neurodegenerative disorders, Alzheimer's disease and Huntington's disease. *Curr. Med. Chem.* **8**: 815–828
- Campos-Ortega JA & Hartenstein V (1985) *The embryonic development of Drosophila melanogaster*. Springer-Verlag, Berlin ;, New York
- Chang CC, Warren DS, Sacksteder KA & Gould SJ (1999) PEX12 interacts with PEX5 and PEX10 and acts downstream of receptor docking in peroxisomal matrix protein import. *J. Cell Biol.* **147**: 761–774
- Chen H, Liu Z & Huang X (2010) Drosophila models of peroxisomal biogenesis disorder: peroxins are required for spermatogenesis and very-long-chain fatty acid metabolism. *Hum. Mol. Genet* **19**: 494–505
- Chintapalli VR, Wang J & Dow JAT (2007) Using FlyAtlas to identify better Drosophila melanogaster models of human disease. *Nat. Genet.* **39**: 715–720
- Chou TB & Perrimon N (1992) Use of a yeast site-specific recombinase to produce female germline chimeras in Drosophila. *Genetics* **131**: 643–653
- Christoph Grünewald (2006) *Oxidativer Stress und Neurodegeneration in Drosophila melanogaster: Dissertation*
- Colombani J, Raisin S, Pantalacci S, Radimerski T, Montagne J & Léopold P (2003) A nutrient sensor mechanism controls Drosophila growth. *Cell* **114**: 739–749
- Cooper TG & Beevers H (1969) Mitochondria and glyoxysomes from castor bean endosperm. Enzyme constituents and catalytic capacity. *J. Biol. Chem* **244**: 3507–3513
- Dawson TM & Dawson VL (2003) Molecular pathways of neurodegeneration in Parkinson's disease. *Science* **302**: 819–822
- Deon M, Wajner M, Sirtori LR, Fitarelli D, Coelho DM, Sitta A, Barschak AG, Ferreira GC, Haeser A, Giugliani R & Vargas CR (2006) The effect of Lorenzo's oil on oxidative stress in X-linked adrenoleukodystrophy. *J. Neurol. Sci.* **247**: 157–164
- Dietzl G, Chen D, Schnorrer F, Su K, Barinova Y, Fellner M, Gasser B, Kinsey K, Oettel S, Scheiblauer S, Couto A, Marra V, Keleman K & Dickson BJ (2007) A genome-wide transgenic RNAi library for conditional gene inactivation in Drosophila. *Nature* **448**: 151–156
- Dirkx R, Vanhorebeek I, Martens K, Schad A, Grabenbauer M, Fahimi D, Declercq P, van Veldhoven PP & Baes M (2005) Absence of peroxisomes in mouse hepatocytes causes mitochondrial and ER abnormalities. *Hepatology* **41**: 868–878
- Dixit E, Boulant S, Zhang Y, Lee ASY, Odendall C, Shum B, Hacohen N, Chen ZJ, Whelan SP, Fransen M, Nibert ML, Superti-Furga G & Kagan JC (2010) Peroxisomes are signaling platforms for antiviral innate immunity. *Cell* **141**: 668–681

- Douglas KT (1987) Mechanism of action of glutathione-dependent enzymes. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **59**: 103–167
- Dubreuil R, Byers TJ, Branton D, Goldstein LS & Kiehart DP (1987) Drosophila spectrin. I. Characterization of the purified protein. *J. Cell Biol.* **105**: 2095–2102
- Duve C de & Baudhuin P (1966) Peroxisomes (microbodies and related particles). *Physiol. Rev* **46**: 323–357
- Ebberink MS, Mooijer PAW, Gootjes J, Koster J, Wanders RJA & Waterham HR (2011) Genetic classification and mutational spectrum of more than 600 patients with a Zellweger syndrome spectrum disorder. *Hum. Mutat.* **32**: 59–69
- Eitzen GA, Szilard RK & Rachubinski RA (1997) Enlarged peroxisomes are present in oleic acid-grown *Yarrowia lipolytica* overexpressing the PEX16 gene encoding an intraperoxisomal peripheral membrane peroxin. *J. Cell Biol.* **137**: 1265–1278
- El-Bassyouni HT, Abdel Maksoud SA, Salem FA, Badr El-Deen R, Abdel Aziz H & Thomas MM (2012) Evidence of oxidative stress in peroxisomal disorders. *Singapore Med J* **53**: 608–614
- Elgersma Y, Kwast L, van den Berg M, Snyder WB, Distel B, Subramani S & Tabak HF (1997) Overexpression of Pex15p, a phosphorylated peroxisomal integral membrane protein required for peroxisome assembly in *S.cerevisiae*, causes proliferation of the endoplasmic reticulum membrane. *EMBO J.* **16**: 7326–7341
- Enayati AA, Ranson H & Hemingway J (2005) Insect glutathione transferases and insecticide resistance. *Insect Mol. Biol* **14**: 3–8
- Erdmann R & Schliebs W (2005) Peroxisomal matrix protein import: the transient pore model. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**: 738–742
- Evrard P, Caviness VS, Prats-Vinas J & Lyon G (1978) The mechanism of arrest of neuronal migration in the Zellweger malformation: an hypothesis bases upon cytoarchitectonic analysis. *Acta Neuropathol* **41**: 109–117
- Falckh PH, Balcombe W, Haritos VS & Ahokas JT (1997) Isolation and identification of a cytochrome P450 sequence in an Australian termite, *Mastotermes darwiniensis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun* **241**: 579–583
- Fan J, Quan S, Orth T, Awai C, Chory J & Hu J (2005) The Arabidopsis PEX12 gene is required for peroxisome biogenesis and is essential for development. *Plant Physiol.* **139**: 231–239
- Fang Y, Morrell JC, Jones JM & Gould SJ (2004) PEX3 functions as a PEX19 docking factor in the import of class I peroxisomal membrane proteins. *J. Cell Biol* **164**: 863–875
- Farooqui AA & Horrocks LA (2001) Plasmalogens: workhorse lipids of membranes in normal and injured neurons and glia. *Neuroscientist* **7**: 232–245
- Faust PL & Hatten ME (1997) Targeted deletion of the PEX2 peroxisome assembly gene in mice provides a model for Zellweger syndrome, a human neuronal migration disorder. *J. Cell Biol.* **139**: 1293–1305
- Ferguson CS & Tyndale RF (2011) Cytochrome P450 enzymes in the brain: emerging evidence of biological significance. *Trends Pharmacol. Sci* **32**: 708–714
- Fischer JA, Eun SH & Doolan BT (2006) Endocytosis, endosome trafficking, and the regulation of Drosophila development. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol* **22**: 181–206
- Fransen M, Nordgren M, Wang B & Apanasets O (2012) Role of peroxisomes in ROS/RNS-metabolism: Implications for human disease. *Biochim. Biophys. Acta* **1822**: 1363–1373

- Fransen M, Vastiau I, Brees C, Brys V, Mannaerts GP & van Veldhoven PP (2005) Analysis of human Pex19p's domain structure by pentapeptide scanning mutagenesis. *J. Mol. Biol.* **346**: 1275–1286
- Fujiki Y (2011) *Peroxisome Biogenesis Disorders*. In: eLS. John Wiley & Sons Ltd, Chichester.
- Gärtner J (2003) Is there a phenotype/genotype correlation in peroxisome biogenesis disorders (PBDs)? *Adv. Exp. Med. Biol.* **544**: 59–65
- Ghaedi K, Tamura S, Okumoto K, Matsuzono Y & Fujiki Y (2000) The peroxin pex3p initiates membrane assembly in peroxisome biogenesis. *Mol. Biol. Cell* **11**: 2085–2102
- Girzalsky W, Saffian D & Erdmann R (2010) Peroxisomal protein translocation. *Biochim. Biophys. Acta* **1803**: 724–731
- Goldfischer S, Moore CL, Johnson AB, Spiro AJ, Valsamis MP, Wisniewski HK, Ritch RH, Norton WT, Rapin I & Gartner LM (1973) Peroxisomal and mitochondrial defects in the cerebro-hepato-renal syndrome. *Science* **182**: 62–64
- Gonzalez E & Beevers H (1976) Role of the endoplasmic reticulum in glyoxysome formation in castor bean endosperm. *Plant Physiol.* **57**: 406–409
- Gorgas K, Teigler A, Komljenovic D & Just WW (2006) The ether lipid-deficient mouse: tracking down plasmalogen functions. *Biochim. Biophys. Acta* **1763**: 1511–1526
- Götte K, Girzalsky W, Linkert M, Baumgart E, Kammerer S, Kunau WH & Erdmann R (1998) Pex19p, a farnesylated protein essential for peroxisome biogenesis. *Mol. Cell. Biol.* **18**: 616–628
- Gould SJ, Keller GA, Hosken N, Wilkinson J & Subramani S (1989) A conserved tripeptide sorts proteins to peroxisomes. *J. Cell Biol.* **108**: 1657–1664
- Goyal L, McCall K, Agapite J, Hartwig E & Steller H (2000) Induction of apoptosis by *Drosophila* reaper, hid and grim through inhibition of IAP function. *EMBO J* **19**: 589–597
- Graveley BR, Brooks AN, Carlson JW, Duff MO, Landolin JM, Yang L, Artieri CG, van Baren MJ, Boley N, Booth BW, Brown JB, Cherbas L, Davis CA, Dobin A, Li R, Lin W, Malone JH, Mattiuzzo NR, Miller D & Sturgill D et al (2011) The developmental transcriptome of *Drosophila melanogaster*. *Nature* **471**: 473–479
- Hajra AK & Wu D (1985) Preparative isolation of peroxisomes from liver and kidney using metrizamide density gradient centrifugation in a vertical rotor. *Anal. Biochem.* **148**: 233–244
- Heiland I & Erdmann R (2005) Biogenesis of peroxisomes. Topogenesis of the peroxisomal membrane and matrix proteins. *FEBS J.* **272**: 2362–2372
- Hettema EH, Girzalsky W, van den Berg M, Erdmann R & Distel B (2000) *Saccharomyces cerevisiae* pex3p and pex19p are required for proper localization and stability of peroxisomal membrane proteins. *EMBO J* **19**: 223–233
- Heymans HS, vd Bosch H, Schutgens RB, Tegelaers WH, Walther JU, Müller-Höcker J & Borst P (1984) Deficiency of plasmalogens in the cerebro-hepato-renal (Zellweger) syndrome. *Eur. J. Pediatr* **142**: 10–15
- Higgins LG & Hayes JD (2011) Mechanisms of induction of cytosolic and microsomal glutathione transferase (GST) genes by xenobiotics and pro-inflammatory agents. *Drug Metab. Rev.* **43**: 92–137
- Hirth F (2010) *Drosophila melanogaster* in the study of human neurodegeneration. *CNS Neurol Disord Drug Targets* **9**: 504–523

- Hoepfner D, Schildknecht D, Braakman I, Philippsen P & Tabak HF (2005) Contribution of the endoplasmic reticulum to peroxisome formation. *Cell* **122**: 85–95
- Höhfeld J, Veenhuis M & Kunau WH (1991) PAS3, a *Saccharomyces cerevisiae* gene encoding a peroxisomal integral membrane protein essential for peroxisome biogenesis. *J. Cell Biol* **114**: 1167–1178
- Honsho M, Tamura S, Shimozawa N, Suzuki Y, Kondo N & Fujiki Y (1998) Mutation in PEX16 is causal in the peroxisome-deficient Zellweger syndrome of complementation group D. *Am. J. Hum. Genet.* **63**: 1622–1630
- Huang X, Warren JT, Buchanan J, Gilbert LI & Scott MP (2007) *Drosophila* Niemann-Pick type C-2 genes control sterol homeostasis and steroid biosynthesis: a model of human neurodegenerative disease. *Development* **134**: 3733–3742
- Hull-Thompson J, Muffat J, Sanchez D, Walker DW, Benzer S, Ganfornina MD & Jasper H (2009) Control of metabolic homeostasis by stress signaling is mediated by the lipocalin NLaz. *PLoS Genet* **5**: e1000460
- Huyghe S, Schmalbruch H, Gendt K de, Verhoeven G, Guillou F, van Veldhoven PP & Baes M (2006) Peroxisomal multifunctional protein 2 is essential for lipid homeostasis in Sertoli cells and male fertility in mice. *Endocrinology* **147**: 2228–2236
- Ingelman-Sundberg M (2005) The human genome project and novel aspects of cytochrome P450 research. *Toxicol. Appl. Pharmacol* **207**: 52–56
- Islinger M, Cardoso MJR & Schrader M (2010) Be different—the diversity of peroxisomes in the animal kingdom. *Biochim. Biophys. Acta* **1803**: 881–897
- Jakobs BS & Wanders RJ (1995) Fatty acid beta-oxidation in peroxisomes and mitochondria: the first, unequivocal evidence for the involvement of carnitine in shuttling propionyl-CoA from peroxisomes to mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun* **213**: 1035–1041
- Janning W & Knust E (2004) *Genetik: Allgemeine Genetik, molekulare Genetik, Entwicklungs-genetik*. G. Thieme, Stuttgart ;, New York
- Jansen GA & Wanders RJA (2006) Alpha-oxidation. *Biochim. Biophys. Acta* **1763**: 1403–1412
- Jones JM, Morrell JC & Gould SJ (2004) PEX19 is a predominantly cytosolic chaperone and import receptor for class 1 peroxisomal membrane proteins. *J. Cell Biol* **164**: 57–67
- Kammerer S, Arnold N, Gutensohn W, Mewes HW, Kunau WH, Höfler G, Roscher AA & Braun A (1997) Genomic organization and molecular characterization of a gene encoding HsPXF, a human peroxisomal farnesylated protein. *Genomics* **45**: 200–210
- Karlson P & Hanser G (1952) Über die Wirkung des Puparisierungshormons bei der Wildform und der Mutante Igl von *Drosophila melanogaster*. *Z. Naturf.*: 80–83
- Kerman BE, Cheshire AM, Myat MM & Andrew DJ (2008) Ribbon modulates apical membrane during tube elongation through Crumbs and Moesin. *Dev. Biol.* **320**: 278–288
- Kim PK, Mullen RT, Schumann U & Lippincott-Schwartz J (2006) The origin and maintenance of mammalian peroxisomes involves a de novo PEX16-dependent pathway from the ER. *J. Cell Biol* **173**: 521–532
- Kirby K, Hu J, Hilliker AJ & Phillips JP (2002) RNA interference-mediated silencing of Sod2 in *Drosophila* leads to early adult-onset mortality and elevated endogenous oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **99**: 16162–16167

- Kobayashi S, Tanaka A & Fujiki Y (2007) Fis1, DLP1, and Pex11p coordinately regulate peroxisome morphogenesis. *Exp. Cell Res.* **313**: 1675–1686
- Kragt A, Voorn-Brouwer T, van den Berg M & Distel B (2005) Endoplasmic reticulum-directed Pex3p routes to peroxisomes and restores peroxisome formation in a *Saccharomyces cerevisiae* pex3Delta strain. *J. Biol. Chem.* **280**: 34350–34357
- Krause C, Rosewich H & Gärtner J (2009) Rational diagnostic strategy for Zellweger syndrome spectrum patients. *Eur. J. Hum. Genet.* **17**: 741–748
- Krause C, Rosewich H, Thanos M & Gärtner J (2006) Identification of novel mutations in PEX2, PEX6, PEX10, PEX12, and PEX13 in Zellweger spectrum patients. *Hum. Mutat.* **27**: 1157
- Krysko O, Hulshagen L, Janssen A, Schütz G, Klein R, Bruycker M de, Espeel M, Gressens P & Baes M (2007) Neocortical and cerebellar developmental abnormalities in conditions of selective elimination of peroxisomes from brain or from liver. *J. Neurosci. Res.* **85**: 58–72
- Kural C, Kim H, Syed S, Goshima G, Gelfand VI & Selvin PR (2005) Kinesin and dynein move a peroxisome in vivo: a tug-of-war or coordinated movement? *Science* **308**: 1469–1472
- Lam SK, Yoda N & Schekman R (2010) A vesicle carrier that mediates peroxisome protein traffic from the endoplasmic reticulum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**: 21523–21528
- Laprise P, Paul SM, Boulanger J, Robbins RM, Beitel GJ & Tepass U (2010) Epithelial polarity proteins regulate *Drosophila* tracheal tube size in parallel to the luminal matrix pathway. *Curr. Biol.* **20**: 55–61
- Leaver M & George S (1998) A piscine glutathione S-transferase which efficiently conjugates the end-products of lipid peroxidation. *Marine Environmental Research* **46**: 71–74
- LeHir M, Herzog V & Fahimi HD (1979) Cytochemical detection of catalase with 3,3'-diaminobenzidine. A quantitative reinvestigation of the optimal conditions. *Histochemistry* **64**: 51–66
- Lentze MJ, Schulte FJ, Schaub J & Spranger J (eds) (2007) *Pädiatrie*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg
- Léon S, Goodman JM & Subramani S (2006) Uniqueness of the mechanism of protein import into the peroxisome matrix: transport of folded, co-factor-bound and oligomeric proteins by shuttling receptors. *Biochim. Biophys. Acta* **1763**: 1552–1564
- Letizia A, Sotillos S, Campuzano S & Llimargas M (2011) Regulated Crb accumulation controls apical constriction and invagination in *Drosophila* tracheal cells. *J. Cell. Sci.* **124**: 240–251
- Lewis DFV (2004) 57 varieties: the human cytochromes P450. *Pharmacogenomics* **5**: 305–318
- Li X & Gould SJ (2003) The dynamin-like GTPase DLP1 is essential for peroxisome division and is recruited to peroxisomes in part by PEX11. *J. Biol. Chem.* **278**: 17012–17020
- Li X, Baumgart E, Morrell JC, Jimenez-Sanchez G, Valle D & Gould SJ (2002) PEX11 beta deficiency is lethal and impairs neuronal migration but does not abrogate peroxisome function. *Mol. Cell. Biol.* **22**: 4358–4365
- Lingard MJ, Gidda SK, Bingham S, Rothstein SJ, Mullen RT & Trelease RN (2008) Arabidopsis PEROXIN11c-e, FISSION1b, and DYNAMIN-RELATED PROTEIN3A

- cooperate in cell cycle-associated replication of peroxisomes. *Plant Cell* **20**: 1567–1585
- Litwack G, Ketterer B & Arias IM (1971) Ligandin: a hepatic protein which binds steroids, bilirubin, carcinogens and a number of exogenous organic anions. *Nature* **234**: 466–467
- Lüers GH, Thiele S, Schad A, Völkl A, Yokota S & Seitz J (2006) Peroxisomes are present in murine spermatogonia and disappear during the course of spermatogenesis. *Histochem. Cell Biol* **125**: 693–703
- Luque T & O'Reilly DR (2002) Functional and phylogenetic analyses of a putative *Drosophila melanogaster* UDP-glycosyltransferase gene. *Insect Biochem. Mol. Biol* **32**: 1597–1604
- Ma C, Agrawal G & Subramani S (2011) Peroxisome assembly: matrix and membrane protein biogenesis. *J. Cell Biol* **193**: 7–16
- Manjithaya R & Subramani S (2011) Autophagy: a broad role in unconventional protein secretion? *Trends Cell Biol.* **21**: 67–73
- Mano S, Nakamori C, Kondo M, Hayashi M & Nishimura M (2004) An Arabidopsis dynamin-related protein, DRP3A, controls both peroxisomal and mitochondrial division. *Plant J.* **38**: 487–498
- Markovic MP, Kylsten P & Dushay MS (2009) *Drosophila* lamin mutations cause melanotic mass formation and lamellocyte differentiation. *Mol. Immunol.* **46**: 3245–3250
- Martin H, Ziemba M, Kisiela M, Botella JA, Schneuwly S & Maser E (2011) The *Drosophila* carbonyl reductase sniffer is an efficient 4-oxonon-2-enal (4ONE) reductase. *Chem. Biol. Interact.* **191**: 48–54
- Mast FD, Fagarasanu A, Knoblach B & Rachubinski RA (2010) Peroxisome biogenesis: something old, something new, something borrowed. *Physiology (Bethesda)* **25**: 347–356
- Mast FD, Li J, Virk MK, Hughes SC, Simmonds AJ & Rachubinski RA (2011) A *Drosophila* model for the Zellweger spectrum of peroxisome biogenesis disorders. *Dis Model Mech* **4**: 659–672
- Matsuzaki T & Fujiki Y (2008) The peroxisomal membrane protein import receptor Pex3p is directly transported to peroxisomes by a novel Pex19p- and Pex16p-dependent pathway. *J. Cell Biol* **183**: 1275–1286
- Matsuzono Y, Kinoshita N, Tamura S, Shimosawa N, Hamasaki M, Ghaedi K, Wanders RJ, Suzuki Y, Kondo N & Fujiki Y (1999) Human PEX19: cDNA cloning by functional complementation, mutation analysis in a patient with Zellweger syndrome, and potential role in peroxisomal membrane assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **96**: 2116–2121
- Matsuzono Y, Matsuzaki T & Fujiki Y (2006) Functional domain mapping of peroxin Pex19p: interaction with Pex3p is essential for function and translocation. *J. Cell. Sci.* **119**: 3539–3550
- Maxwell M, Bjorkman J, Nguyen T, Sharp P, Finnie J, Paterson C, Tonks I, Paton BC, Kay GF & Crane DI (2003) Pex13 inactivation in the mouse disrupts peroxisome biogenesis and leads to a Zellweger syndrome phenotype. *Mol. Cell. Biol.* **23**: 5947–5957
- McCartney AW, Greenwood JS, Fabian MR, White KA & Mullen RT (2005) Localization of the tomato bushy stunt virus replication protein p33 reveals a peroxisome-to-endoplasmic reticulum sorting pathway. *Plant Cell* **17**: 3513–3531

- McNew JA & Goodman JM (1994) An oligomeric protein is imported into peroxisomes in vivo. *J. Cell Biol.* **127**: 1245–1257
- Miller BF (2003) *Encyclopedia & dictionary of medicine, nursing, and allied health*. Saunders, Philadelphia
- Montooth KL, Siebenthal KT & Clark AG (2006) Membrane lipid physiology and toxin catabolism underlie ethanol and acetic acid tolerance in *Drosophila melanogaster*. *J. Exp. Biol.* **209**: 3837–3850
- Moser HW & Moser AB (1996) Very long-chain fatty acids in diagnosis, pathogenesis, and therapy of peroxisomal disorders. *Lipids* **31**: S141-4
- Moser HW, Bergin A & Cornblath D (1991) Peroxisomal disorders. *Biochem. Cell Biol.* **69**: 463–474
- Moser HW, Mahmood A & Raymond GV (2007) X-linked adrenoleukodystrophy. *Nat Clin Pract Neurol* **3**: 140–151
- Moser HW, Raymond GV, Lu S, Muenz LR, Moser AB, Xu J, Jones RO, Loes DJ, Melhem ER, Dubey P, Bezman L, Brereton NH & Odone A (2005) Follow-up of 89 asymptomatic patients with adrenoleukodystrophy treated with Lorenzo's oil. *Arch. Neurol.* **62**: 1073–1080
- Mourikis P, Hurlbut GD & Artavanis-Tsakonas S (2006) Enigma, a mitochondrial protein affecting lifespan and oxidative stress response in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**: 1307–1312
- Mullen RT & Trelease RN (2006) The ER-peroxisome connection in plants: development of the "ER semi-autonomous peroxisome maturation and replication" model for plant peroxisome biogenesis. *Biochim. Biophys. Acta* **1763**: 1655–1668
- Müller WH, van der Krift TP, Krouwer AJ, Wösten HA, van der Voort LH, Smaal EB & Verkleij AJ (1991) Localization of the pathway of the penicillin biosynthesis in *Penicillium chrysogenum*. *EMBO J* **10**: 489–495
- Muntau AC, Roscher AA, Kunau W & Dodt G (2003) The interaction between human PEX3 and PEX19 characterized by fluorescence resonance energy transfer (FRET) analysis. *Eur. J. Cell Biol.* **82**: 333–342
- Nagan N & Zoeller RA (2001) Plasmalogens: biosynthesis and functions. *Prog. Lipid Res* **40**: 199–229
- Nakayama M, Sato H, Okuda T, Fujisawa N, Kono N, Arai H, Suzuki E, Umeda M, Ishikawa HO & Matsuno K (2011) *Drosophila* carrying pex3 or pex16 mutations are models of Zellweger syndrome that reflect its symptoms associated with the absence of peroxisomes. *PLoS ONE* **6**: e22984
- Niwa R & Niwa YS (2011) The Fruit Fly *Drosophila melanogaster* as a Model System to Study Cholesterol Metabolism and Homeostasis. *Cholesterol* **2011**: 176802
- Novikoff PM & Novikoff AB (1972) Peroxisomes in absorptive cells of mammalian small intestine. *J. Cell Biol.* **53**: 532–560
- Nuttall JM, Motley A & Hettema EH (2011) Peroxisome biogenesis: recent advances. *Curr. Opin. Cell Biol.* **23**: 421–426
- Pandey UB & Nichols CD (2011) Human disease models in *Drosophila melanogaster* and the role of the fly in therapeutic drug discovery. *Pharmacol. Rev.* **63**: 411–436
- Peterson LJ & Flood PM (2012) Oxidative stress and microglial cells in Parkinson's disease. *Mediators Inflamm.* **2012**: 401264

- Petkau G, Wingen C, Jussen LCA, Radtke T & Behr M (2012) Obstructor-A is required for epithelial extracellular matrix dynamics, exoskeleton function and tubulogenesis. *The Journal of biological chemistry*
- Petkau G, Wingen C, Stümpges B & Behr M Clathrin Heavy Chain Expression and Subcellular Distribution in Embryos of *Drosophila melanogaster*
- Pinto MP, Grou CP, Alencastre IS, Oliveira ME, Sá-Miranda C, Fransén M & Azevedo JE (2006) The import competence of a peroxisomal membrane protein is determined by Pex19p before the docking step. *J. Biol. Chem* **281**: 34492–34502
- Poirier Y, Antonenkov VD, Glumoff T & Hiltunen JK (2006) Peroxisomal beta-oxidation—a metabolic pathway with multiple functions. *Biochim. Biophys. Acta* **1763**: 1413–1426
- Powers JM & Moser HW (1998) Peroxisomal disorders: genotype, phenotype, major neuropathologic lesions, and pathogenesis. *Brain Pathol* **8**: 101–120
- Purdue PE & Lazarow PB (2001) Peroxisome biogenesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol* **17**: 701–752
- Reiter LT, Potocki L, Chien S, Gribskov M & Bier E (2001) A systematic analysis of human disease-associated gene sequences in *Drosophila melanogaster*. *Genome Res* **11**: 1114–1125
- Rhodin J (1954) *Correlation of ultrastructural organization and function in normal experimentally changed convoluted tubule cells of the mouse kidney*. Doktorarbeit
- Rizzo WB, Leshner RT, Odone A, Dammann AL, Craft DA, Jensen ME, Jennings SS, Davis S, Jaitly R & Sgro JA (1989) Dietary erucic acid therapy for X-linked adrenoleukodystrophy. *Neurology* **39**: 1415–1422
- Roberts DB (1986) *Drosophila: A practical approach*. IRL Press, Oxford [Oxfordshire] ;, Washington, DC
- Robertson HM, Preston CR, Phillis RW, Johnson-Schlitz DM, Benz WK & Engels WR (1988) A stable genomic source of P element transposase in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **118**: 461–470
- Roegiers F, Kavalier J, Tolwinski N, Chou Y, Duan H, Bejarano F, Zitserman D & Lai EC (2009) Frequent unanticipated alleles of lethal giant larvae in *Drosophila* second chromosome stocks. *Genetics* **182**: 407–410
- Rottensteiner H, Kramer A, Lorenzen S, Stein K, Landgraf C, Volkmer-Engert R & Erdmann R (2004) Peroxisomal membrane proteins contain common Pex19p-binding sites that are an integral part of their targeting signals. *Mol. Biol. Cell* **15**: 3406–3417
- Rubin GM & Spradling AC (1982) Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors. *Science* **218**: 348–353
- Rucktäschel R, Girzalsky W & Erdmann R (2011) Protein import machineries of peroxisomes. *Biochim. Biophys. Acta* **1808**: 892–900
- Rucktäschel R, Thoms S, Sidorovitch V, Halbach A, Pechlivanis M, Volkmer R, Alexandrov K, Kuhlmann J, Rottensteiner H & Erdmann R (2009) Farnesylation of pex19p is required for its structural integrity and function in peroxisome biogenesis. *J. Biol. Chem.* **284**: 20885–20896
- Ruiz M, Sanchez D, Canal I, Acebes A & Ganfornina MD (2011) Sex-dependent modulation of longevity by two *Drosophila* homologues of human Apolipoprotein D, GLaz and NLaz. *Exp. Gerontol* **46**: 579–589
- Sacksteder KA, Jones JM, South ST, Li X, Liu Y & Gould SJ (2000) PEX19 binds multiple peroxisomal membrane proteins, is predominantly cytoplasmic, and is required for peroxisome membrane synthesis. *J. Cell Biol* **148**: 931–944

- Saitoh M, Sakakihara Y, Mizuguchi M, Itoh M, Takashima S, Iwamori M, Kamoshita S & Igarashi T (2007) Increase of ceramide mono-hexoside and dipalmitoyl glycerophospholipids in the brain of Zellweger syndrome. *Neurosci. Lett.* **417**: 165–170
- Sayre LM, Smith MA & Perry G (2001) Chemistry and biochemistry of oxidative stress in neurodegenerative disease. *Curr. Med. Chem.* **8**: 721–738
- Schlüter A, Fourcade S, Ripp R, Mandel JL, Poch O & Pujol A (2006) The evolutionary origin of peroxisomes: an ER-peroxisome connection. *Mol. Biol. Evol.* **23**: 838–845
- Schrader M & Fahimi HD (2006) Peroxisomes and oxidative stress. *Biochim. Biophys. Acta* **1763**: 1755–1766
- Schrader M & Fahimi HD (2008) The peroxisome: still a mysterious organelle. *Histochem. Cell Biol.* **129**: 421–440
- Schueller N, Holton SJ, Fodor K, Milewski M, Konarev P, Stanley WA, Wolf J, Erdmann R, Schliebs W, Song Y & Wilmanns M (2010) The peroxisomal receptor Pex19p forms a helical mPTS recognition domain. *EMBO J.* **29**: 2491–2500
- Seegmiller AC DIGJHYBM (2002) The SREBP Pathway in Drosophila: Regulation by Palmitate, Not Sterols. *Dev Cell.* 229–238
- Shibata H, Kashiwayama Y, Imanaka T & Kato H (2004) Domain architecture and activity of human Pex19p, a chaperone-like protein for intracellular trafficking of peroxisomal membrane proteins. *J. Biol. Chem.* **279**: 38486–38494
- Shimozawa N (2011) Molecular and clinical findings and diagnostic flowchart of peroxisomal diseases. *Brain Dev.* **33**: 770–776
- Shimozawa N, Tsukamoto T, Suzuki Y, Orii T, Shirayoshi Y, Mori T & Fujiki Y (1992) A human gene responsible for Zellweger syndrome that affects peroxisome assembly. *Science* **255**: 1132–1134
- Snyder WB, Faber KN, Wenzel TJ, Koller A, Lüers GH, Rangell L, Keller GA & Subramani S (1999) Pex19p interacts with Pex3p and Pex10p and is essential for peroxisome biogenesis in *Pichia pastoris*. *Mol. Biol. Cell* **10**: 1745–1761
- Snyder WB, Koller A, Choy AJ & Subramani S (2000) The peroxin Pex19p interacts with multiple, integral membrane proteins at the peroxisomal membrane. *J. Cell Biol.* **149**: 1171–1178
- Soukupova M, Sprenger C, Gorgas K, Kunau WH & Dodt G (1999) Identification and characterization of the human peroxin PEX3. *Eur. J. Cell Biol.* **78**: 357–374
- South ST, Sacksteder KA, Li X, Liu Y & Gould SJ (2000) Inhibitors of COPI and COPII do not block PEX3-mediated peroxisome synthesis. *J. Cell Biol.* **149**: 1345–1360
- Spradling AC & Rubin GM (1982) Transposition of cloned P elements into Drosophila germ line chromosomes. *Science* **218**: 341–347
- Steinberg SJ, Dodt G, Raymond GV, Braverman NE, Moser AB & Moser HW (2006) Peroxisome biogenesis disorders. *Biochim. Biophys. Acta* **1763**: 1733–1748
- Steinberg SJ, Wang SJ, McGuinness MC & Watkins PA (1999) Human liver-specific very-long-chain acyl-coenzyme A synthetase: cDNA cloning and characterization of a second enzymatically active protein. *Mol. Genet. Metab.* **68**: 32–42
- Stümpges B & Behr M (2011) Time-specific regulation of airway clearance by the Drosophila J-domain transmembrane protein Wurst. *FEBS Lett.* **585**: 3316–3321
- Swinkels BW, Gould SJ, Bodnar AG, Rachubinski RA & Subramani S (1991) A novel, cleavable peroxisomal targeting signal at the amino-terminus of the rat 3-ketoacyl-CoA thiolase. *EMBO J.* **10**: 3255–3262

- Tabak HF, van der Zand A & Braakman I (2008) Peroxisomes: minted by the ER. *Curr. Opin. Cell Biol* **20**: 393–400
- Tam YYC, Fagarasanu A, Fagarasanu M & Rachubinski RA (2005) Pex3p initiates the formation of a preperoxisomal compartment from a subdomain of the endoplasmic reticulum in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem* **280**: 34933–34939
- Teleman AA (2005) 4E-BP functions as a metabolic brake used under stress conditions but not during normal growth. *Genes & Development* **19**: 1844–1848
- Tepass U & Hartenstein V (1994) Epithelium formation in the *Drosophila* midgut depends on the interaction of endoderm and mesoderm. *Development* **120**: 579–590
- Terlecky SR, Koepke JI & Walton PA (2006) Peroxisomes and aging. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1763**: 1749–1754
- Thoms S & Erdmann R (2005) Dynamin-related proteins and Pex11 proteins in peroxisome division and proliferation. *FEBS J.* **272**: 5169–5181
- Thoms S, Grønborg S & Gärtner J (2009) Organelle interplay in peroxisomal disorders. *Trends Mol Med* **15**: 293–302
- Till A, Lakhani R, Burnett SF & Subramani S (2012) Pexophagy: the selective degradation of peroxisomes. *Int J Cell Biol* **2012**: 512721
- Titorenko VI & Rachubinski RA (2001) The life cycle of the peroxisome. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**: 357–368
- Titorenko VI & Terlecky SR (2011) Peroxisome metabolism and cellular aging. *Traffic* **12**: 252–259
- van den Bosch H, Schutgens RB, Wanders RJ & Tager JM (1992) Biochemistry of peroxisomes. *Annu. Rev. Biochem* **61**: 157–197
- van der Zand A, Braakman I & Tabak HF (2010) Peroxisomal membrane proteins insert into the endoplasmic reticulum. *Mol. Biol. Cell* **21**: 2057–2065
- van Geel BM, Assies J, Haverkort EB, Koelman JH, Verbeeten B, Wanders RJ & Barth PG (1999) Progression of abnormalities in adrenomyeloneuropathy and neurologically asymptomatic X-linked adrenoleukodystrophy despite treatment with "Lorenzo's oil". *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr.* **67**: 290–299
- van Roermund CW, van den Berg M & Wanders RJ (1995) Localization of peroxisomal 3-oxoacyl-CoA thiolase in particles of varied density in rat liver: implications for peroxisome biogenesis. *Biochim. Biophys. Acta* **1245**: 348–358
- Walton PA & Pizzitelli M (2012) Effects of peroxisomal catalase inhibition on mitochondrial function. *Front Physiol* **3**: 108
- Wanders RJ & Tager JM (1998) Lipid metabolism in peroxisomes in relation to human disease. *Mol. Aspects Med* **19**: 69–154
- Wanders RJ, Heymans HS, Schutgens RB, Barth PG, van den Bosch H & Tager JM (1988) Peroxisomal disorders in neurology. *J. Neurol. Sci* **88**: 1–39
- Wanders RJ, Schutgens RB, Barth PG, Tager JM & van den Bosch H (1993) Postnatal diagnosis of peroxisomal disorders: a biochemical approach. *Biochimie* **75**: 269–279
- Wanders RJA & Waterham HR (2006a) Biochemistry of mammalian peroxisomes revisited. *Annu. Rev. Biochem* **75**: 295–332
- Wanders RJA & Waterham HR (2006b) Peroxisomal disorders: the single peroxisomal enzyme deficiencies. *Biochim. Biophys. Acta* **1763**: 1707–1720

- Wanders RJA, Ferdinandusse S, Brites P & Kemp S (2010) Peroxisomes, lipid metabolism and lipotoxicity. *Biochim. Biophys. Acta* **1801**: 272–280
- Watkins PA, Howard AE, Gould SJ, Avigan J & Mihalik SJ (1996) Phytanic acid activation in rat liver peroxisomes is catalyzed by long-chain acyl-CoA synthetase. *J. Lipid Res* **37**: 2288–2295
- White AL, Modaff P, Holland-Morris F & Pauli RM (2003) Natural history of rhizomelic chondrodysplasia punctata. *Am. J. Med. Genet. A* **118**: 332–342
- Wiese S, Gronemeyer T, Ofman R, Kunze M, Grou CP, Almeida JA, Eisenacher M, Stephan C, Hayen H, Schollenberger L, Korosec T, Waterham HR, Schliebs W, Erdmann R, Berger J, Meyer HE, Just W, Azevedo JE, Wanders RJA & Warscheid B (2007) Proteomics characterization of mouse kidney peroxisomes by tandem mass spectrometry and protein correlation profiling. *Mol. Cell Proteomics* **6**: 2045–2057
- Wilson GN, Holmes RG, Custer J, Lipkowitz JL, Stover J, Datta N & Hajra A (1986) Zellweger syndrome: diagnostic assays, syndrome delineation, and potential therapy. *Am. J. Med. Genet* **24**: 69–82
- Wingen C (2006) *Molekulare Charakterisierung der an der Drosophila-Tracheenmorphogenese beteiligten Gene firewall (fill), obstructor (obst) und wurst (wus)*. Diplomarbeit
- Wingen C, Aschenbrenner AC, Stümpges B, Hoch M & Behr M The Wurst protein: a novel endocytosis regulator involved in airway clearance and respiratory tube size control. *Cell Adh Migr* **3**: 14–18
- Wingen C, Stümpges B, Hoch M & Behr M (2009) Expression and localization of clathrin heavy chain in *Drosophila melanogaster*. *Gene Expr. Patterns* **9**: 549–554
- Wojcik M, Burzynska-Pedziwiatr I & Wozniak LA (2010) A review of natural and synthetic antioxidants important for health and longevity. *Curr. Med. Chem.* **17**: 3262–3288
- Zaar K & Fahimi HD (1991) Immunoelectron microscopic localization of the isozymes of L-alpha-hydroxyacid oxidase in renal peroxisomes of beef and sheep: evidence of distinct intraorganellar subcompartmentation. *J. Histochem. Cytochem* **39**: 801–808
- Zinke I, Kirchner C, Chao LC, Tetzlaff MT & Pankratz MJ (1999) Suppression of food intake and growth by amino acids in *Drosophila*: the role of pumppless, a fat body expressed gene with homology to vertebrate glycine cleavage system. *Development* **126**: 5275–5284
- Zinke I, Schütz CS, Katzenberger JD, Bauer M & Pankratz MJ (2002) Nutrient control of gene expression in *Drosophila*: microarray analysis of starvation and sugar-dependent response. *EMBO J* **21**: 6162–6173

9 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin
Abb.	Abbildung
A. bidest	zweifach destilliertes Wasser
AK	Antikörper
Amp	Ampizilin
APS	Ammoniumperoxidsulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (engl.: bovine serum albumin)
bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration
C	Cytidin
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cDNA	komplementäre (copy) DNA
CyO	Curly of Oyster (Balancerchromosom)
C-Terminus	Carboxyterminus
Da	Dalton (1 Da = $1,7 \times 10^{-24}$ g)
da	daughterless
DIG	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
et al.	Et aliter
ECL	engl.: "enhanced chemiluminescence"
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EtOH	Ethanol
g	Gramm
G	Guanosin
Gal	Galaktose
GC/MS	Gaschromatografie/Massenspektrometrie
gDNA	genomische DNA
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde
HRP	engl.: "horseradish peroxidase" Meerrettich-Peroxidase
IR	Infantiler Morbus Refsum
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KO	engl.: "knock out" Mutation die zum Verlust der Genfunktion führt
l	Liter
LB	Luria Broth
L1	Erstes Larvenstadium (analog L2 und L3)
μ	Mikro
m	Milli
M	Molar (mol/l)
Mega	Megatrachea

min	Minute
mPTS	Targeting Signal für peroxisomale Membranproteine
mRNA	Boten-RNA
NALD	Neonatale Adrenoleukodystrophie
n	Nano
NBT	4-Nitro-blue-tetrazolium-chlorid
OD	optische Dichte
OLR	Offener Leserahmen
PBD	Peroxisomen-Biogenese-Krankheit (disease)
PBS	engl.: „phosphate buffered saline“ Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
Pex	Peroxin
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PMP	peroxisomales Membranprotein
PTS	engl.: „peroxisomal targeting sequence“ peroxisomale Zielerkennungssequenz
qRT-PCR	quantitative „real time-PCR“
RCDP	Rhizomele Chondrodysplasia punctata
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA Interferenz
ROS	engl.: „reactive oxygen species“ reactive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SED	engl.: „single enzyme deficiency“ Defizienz eines einzigen Enzymes
sER	engl.: „smooth“ glattes Endoplasmatisches Retikulum
st	Stadium
T	Thymidin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TAG	Triacylglycerole
TEMED	Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
tRNA	Transfer-RNA
Tween20	Polyoxyethylensorbitan-Monolaurat
Twist	Twist
UAS	Upstream activating sequence
ÜN	über Nacht
UpM	Umdrehungen pro Minute
UTR	Untranslatierte Region
UV	Ultraviolett
V	Volt
vgl.	vergleiche
VLCFA	engl.: „very long chain fatty acid“ sehr langkettige Fettsäuren
v/v	engl.: „volume to volume“ Volumen zu Volumen Verhältnis
w	<i>white</i>
w/v	engl.: „weight to volume“ Verhältnis Masse zu Volumen
X-ALD	X-chromosomal vererbte Adrenoleukodystrophie
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem
ZSS	Zellweger-Syndrom-Spektrum
+	Wildtypchromosom

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig angefertigt habe und keine unerlaubten Hilfsmittel oder Quellen verwendet wurden. Ferner erkläre ich, dass diese Arbeit bei keiner anderen Hochschule als Dissertation eingereicht wurde.

Bonn, Januar 2013

Nachname: _____

Vorname: _____

Unterschrift: _____