

Institut für Biochemie und Biologie  
Arbeitsgruppe Zoophysiologie

---

**Rhabdomerorganisation und –morphogenese  
im Komplexauge von *Drosophila***

- Dissertation -

zur Erlangung des akademischen Grades  
„doctor rerum naturalium“  
(Dr. rer. nat.)  
in der Wissenschaftsdisziplin Zoophysiologie

eingereicht an der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Universität Potsdam

von

JEANNINE WITTE

Potsdam, November 2009

Dieses Werk ist unter einem Creative Commons Lizenzvertrag lizenziert:  
Namensnennung - Keine kommerzielle Nutzung - Weitergabe unter gleichen Bedingungen 3.0  
Deutschland  
Um die Bedingungen der Lizenz einzusehen, folgen Sie bitte dem Hyperlink:  
<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/de/>

Online veröffentlicht auf dem  
Publikationsserver der Universität Potsdam:  
URL <http://opus.kobv.de/ubp/volltexte/2010/4184/>  
URN <urn:nbn:de:kobv:517-opus-41847>  
<http://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:kobv:517-opus-41847>

Teilergebnisse dieser Arbeit wurden in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

## Publikationen

**Witte J, Baumann O.** Rhabdomere Twisting of the *Drosophila* R1-R6 visual cells is influenced by MAP kinase ERK. *Manuskript in Vorbereitung.*

**Witte J, Baumann O.** Rhabdomere Twisting of the *Drosophila* R1-R6 visual cells depends on R8. *Manuskript in Vorbereitung.*

## Konferenzbeiträge

**Witte J, Baumann O (2007)** Is MAP kinase involved in the establishment of rhabdomere twisting in the *Drosophila* compound eye? *20<sup>th</sup> European Drosophila Research Conference, Vienna 2007, Poster D074.*

**Witte J, Baumann O (2008)** MAP kinase rolled is involved in the establishment of rhabdomere twisting in the *Drosophila* compound eye. *31st Annual Meeting of the DGZ, Marburg 2008, Poster MS3-1.*

**Witte J, Baumann O (2008)** Rhabdomere twisting in the *Drosophila* compound eye is influenced by MAP kinases ERK and JNK. *The Second International Conference on Invertebrate Vision, Bäckaskog Castle Sweden 2008, Poster 12.*

**Witte J, Baumann O (2009)** Rhabdomere twisting of *Drosophila* photoreceptors is influenced by MAP kinases ERK and JNK. *16<sup>th</sup> International Society of Developmental Biologists congress, Edinburgh 2009, Poster 8-P005.*





## Zusammenfassung

Sehzellen von Insekten sind epitheliale Zellen mit einer charakteristischen, hochpolaren Morphologie und Organisation. Die molekularen Komponenten der Sehkaskade befinden sich im Rhabdomer, einem Saum dicht gepackter Mikrovilli entlang der Sehzelle. Diese hochspezialisierten Zellen entstehen während der Organogenese aus den relativ einfach gebauten Epithelzellen. Bereits in den 70er Jahren des letzten Jahrhunderts wurde beschrieben, dass die Mikrovilli entlang einer Sehzelle eine unterschiedliche Ausrichtung besitzen, oder in anderen Worten, die Rhabdomere entlang der Sehzell-Längsachse verdreht sind. So sind in den Sehzellen R1-R6 bei dipteren Fliegen (*Calliphora*, *Drosophila*) die Mikrovilli im distalen und proximalen Bereich eines Rhabdomers etwa rechtwinkelig zueinander angeordnet. Dieses Phänomen wird in der Fachliteratur als *rhabdomere twisting* bezeichnet und reduziert die Empfindlichkeit für polarisiertes Licht. Es wurde für das *Drosophila*-Auge gezeigt, dass diese strukturelle Asymmetrie der Sehzellen mit einer molekularen Asymmetrie in der Verteilung phosphotyrosinierter Proteine an die Stielmembran (einem nicht-mikrovillären Bereich der apikalen Plasmamembran) einhergeht. Zudem wurde gezeigt, dass die immunocytochemische Markierung mit anti-Phosphotyrosin (anti-PY) als lichtmikroskopischer Marker für das *rhabdomere twisting* verwendet werden kann. Bisher wurde hauptsächlich die physiologische Bedeutung der Rhabdomerverdrehung untersucht. Es ist wenig über die entwicklungs- und zellbiologischen Grundlagen bekannt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Identität der phosphotyrosinierten Proteine an der Stielmembran zu klären und ihre funktionelle Bedeutung für die Entwicklung des *rhabdomere twisting* zu analysieren. Zudem sollte untersucht werden, welchen Einfluss die inneren Sehzellen R7 und R8 auf die Verdrehung der Rhabdomere von R1-R6 haben.

Für die zwei Proteinkinasen Rolled (ERK) und Basket (JNK) vom Typ der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) konnte ich zeigen, dass sie in ihrer aktivierten (= phosphorylierten) Form (pERK bzw. pJNK) eine asymmetrische Verteilung an der Stielmembran aufweisen vergleichbar der Markierung mit anti-PY. Weiterhin wurde diese asymmetrische Verteilung von pERK und pJNK ebenso wie die von PY erst kurz vor Schlupf der Fliegen (bei ca. 90% pupaler Entwicklung) etabliert. Durch Präinkubationsexperimente mit anti-PY wurde die Markierung mit anti-pERK bzw. anti-pJNK unterbunden. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass pERK und pJNK zu den Proteinen gehören, die von anti-PY an der Stielmembran erkannt werden.

Da es sich bei ERK und JNK um Kinasen handelt, ist es naheliegend, dass diese an der Entwicklung des *rhabdomere twisting* beteiligt sein könnten. Diese Hypothese wurde durch die

Analyse von Mutanten überprüft. In der hypermorphen Mutante *rl<sup>SEM</sup>* mit erhöhter Aktivität der Proteinkinase ERK erfolgte die asymmetrische Positionierung von pERK an der Stielmembran sowie die Mikrowillkippung schon zu einem früheren Zeitpunkt in der pupalen Entwicklung. Im adulten Auge war die anti-PY-Markierung im distalen Bereich der Sehzellen intensiver sowie der Kippwinkel vergrößert. In der hypomorphen ERK-Mutante *rl<sup>1</sup>/rl<sup>10a</sup>* mit reduzierter ERK-Aktivität waren die anti-PY-Markierung und der Kippwinkel im proximalen Bereich der Sehzellen verringert. Die Proteinkinase ERK hat somit einen Einfluss auf die zeitliche Etablierung des *rhabdomere twisting* wie auch auf dessen Ausprägung im Adulttier.

Für die Experimente, bei denen die JNK-Aktivität reduziert bzw. erhöht wurde, lässt sich zusammenfassend sagen, dass sie zu ähnlichen Ergebnissen bezüglich des *rhabdomere twisting* führten. Bei reduzierter wie auch bei erhöhter JNK-Aktivität war die anti-PY-Markierung im distalen Bereich leicht verstärkt. Dementsprechend zeigten ultrastrukturelle Untersuchungen, dass der Kippwinkel der Mikrowilli distal erhöht war.

Die Rhabdomerverdrehung sowie die Änderung im anti-PY-Markierungsmuster erfolgen an den Sehzellen R1-R6 relativ abrupt auf halber Ommatidienlänge, dort wo das Rhabdomer von R7 endet und das von R8 beginnt. Es stellte sich deshalb die Frage, ob die Rhabdomerverdrehung an R1-R6 durch die Sehzelle R7 und/oder R8 beeinflusst wird. Um dieser Frage nachzugehen wurden Mutanten analysiert, denen die R7- oder die R8-Photorezeptoren bzw. R7 und R8 fehlten. Das wichtigste Ergebnis dieser Untersuchungen war, dass bei Fehlen von R8 die Rhabdomerverdrehung bei R1-R6 nach keinen erkennbaren Regeln erfolgt. R8 ist somit Voraussetzung für die Etablierung der Rhabdomerverdrehung in R1-R6. Folgendes Modell wurde auf Grundlage dieses und weiterer Ergebnisse erarbeitet: Im dritten Larvenstadium rekrutiert R8 die Sehzellpaare R2/R5, R3/R4 und R1/R6. Dabei werden R1-R6 durch den Kontakt zu R8 „polarisiert“. Abschließend wird R7 durch R8 rekrutiert. Dies führt zu einer Fixierung der Polarität von R1-R6 durch R7. Die Ausführung der Mikrowillkippung anhand der festgelegten Polarität erfolgt in der späten Puppenphase. Die Proteinkinase ERK ist an diesem letzten Morphogeneseprozess beteiligt.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	I
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	III
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	V
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	VI
<b>1. Einleitung</b> .....	1
1.1 Das Komplexauge von <i>Drosophila</i> .....	1
1.2 <i>rhabdomere twisting</i> – Die morphologische Polarisierung der Photorezeptoren.....	3
1.3 Phosphotyrosin - Die molekulare Polarisierung der Photorezeptoren.....	6
1.4 Zielstellung.....	7
<b>2. Material und Methoden</b>	
2.1 Versuchstiere und Präparation.....	8
2.2 Lösungen und Puffer.....	9
2.3 Antikörper	
2.3.1 Verwendete Antikörper.....	10
2.3.2 Spezifität der Antikörper.....	11
2.4 Immuncytochemie.....	12
2.5 Lichtmikroskopie und Bildbearbeitung.....	13
2.6 Elektronenmikroskopie	
2.6.1. Fixierung, Herstellung von Ultradünnschnitten und Kontrastierung.....	14
2.6.2. Dokumentation und Bildbearbeitung.....	15
2.6.3. Ausmessen der Mikrovilli-Kippwinkel und statistische Analyse.....	15
<b>3. Ergebnisse</b>	
3.1 Identifizierung und Charakterisierung der phosphotyrosinierten Proteine an der Stielmembran der äußeren Sehzellen.....	17
3.1.1 Zwei aktivierte (= phosphorylierte) Proteinkinasen sind asymmetrisch an der Stielmembran verteilt.....	17
3.1.2 Zeitliche Entwicklung der asymmetrischen Verteilung von pERK und pJNK....	20
3.1.3 Erkennen anti-PY und anti-pERK/anti-pJNK dieselben Proteine?.....	22
3.2 Verteilung der Proteinkinasen in einer Mutante mit reduziertem <i>rhabdomere twisting</i> .....	23

---

3.3	Analyse der Rhabdomerverdrehung in ERK- und JNK-Mutanten.....	24
3.3.1	Analyse der ERK-Mutanten.....	25
3.3.2	Analyse der JNK-Mutanten.....	35
3.4	Der Einfluss der inneren Schzellen auf das <i>rhabdomere twisting</i> von R1-R6.....	39
3.4.1	Analyse von Ommatidien ohne R7.....	39
3.4.2	Analyse von Ommatidien ohne R8.....	42
<b>4.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>55</b>
4.1	Identität der mit anti-PY an der Stielmembran lokalisierten Proteine.....	55
4.2	Einfluss von ERK- und JNK-Mutanten auf das <i>rhabdomere twisting</i> .....	58
4.3	Vor- und Nachteile des GAL4-UAS-Systems.....	60
4.4	Modell zum Einfluss der zentralen Schzellen R7 und R8 auf die Verdrehung der Rhabdomere.....	63
<b>5.</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>70</b>
<b>6.</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>82</b>

Danksagung

Curriculum vitae

Eidesstattliche Erklärung

# Abbildungsverzeichnis

1.1	Aufbau des Komplexauges von <i>Drosophila</i> .....	2
1.2	Funktionelle Bedeutung des <i>rhabdomere twisting</i> .....	4
1.3	Anti-Phosphotyrosin (anti-PY) – ein Marker für die Verdrehung der Rhabdomere.....	5
2.1	Präinkubation mit Antigen verhinderte Markierung mit anti-pJNK.....	12
2.2	Bestimmung der Kippwinkel.....	16
3.1	Die Markierung mit anti-pERK.....	18
3.2	Die Markierung mit anti-pJNK.....	19
3.3	Zeitliche Entwicklung der Asymmetrie an der Stielmembran.....	20
3.4	Die pERK-positiven vesikulären Strukturen kolokalisieren mit Rhodopsin-haltigen Vesikeln.....	21
3.5	Präinkubation mit anti-PY verhinderte Markierung mit anti-pERK an der Stielmembran.....	22
3.6	Die Markierung mit anti-pERK in $fz^{15}$ -Augen.....	24
3.7	Immunfluoreszenzfärbung mit anti-pERK wird in der $rl^1/rl^{10a}$ -Mutante nicht detektiert.....	26
3.8	Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Querschnitten durch den proximalen Bereich eines adulten Wildtyp-Ommatidiums (a) und von $rl^1/rl^{10a}$ -Ommatidien (b-d)...	27
3.9	Analyse der Mikrowillikippwinkel in den äußeren Sehzellen adulter Wildtyp- und $rl^1/rl^{10a}$ -Augen.....	28
3.10	Die Markierung mit anti-PY in adulten $rl^{SEM}$ -Augen.....	30
3.11	Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Querschnitten durch den distalen Bereich eines adulten Wildtyp- und $rl^{SEM}$ -Ommatidiums.....	31
3.12	Analyse der Mikrowillikippwinkel in den äußeren Sehzellen adulter Wildtyp- und $rl^{SEM}$ -Augen.....	31
3.13	Zeitliche Entwicklung der Asymmetrie an der Stielmembran in $rl^{SEM}$ -Augen.....	32
3.14	Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Querschnitten durch den distalen (a, b) und proximalen (a', b') Bereich eines WT- (a, a') und eines $rl^{SEM}$ -Ommatidiums (b, b') bei 90% pd.....	34
3.15	Analyse der Mikrowillikippwinkel in den äußeren Sehzellen bei 90% pd für Wildtyp- und $rl^{SEM}$ -Augen.....	35
3.16	Die Markierung mit anti-PY in adulten $rh1/bsk.DN$ -Augen.....	36
3.17	Analyse der Mikrowillikippwinkel in den äußeren Sehzellen der $rh1/bsk.DN$ -Kreuzung und den Elternlinien.....	37
3.18	Die Markierung mit anti-PY in adulten $rh1/bsk.A-Y$ -Augen.....	38

---

3.19	Analyse der Mikrowillkippwinkel in den äußeren Sehzellen der <i>rb1/bsk.A-Y</i> -Kreuzung und den Elternlinien.....	38
3.20	Das räumliche Markierungsmuster von pERK in der <i>sev<sup>14</sup></i> -Mutante.....	41
3.21	Die Markierung mit anti-PY in <i>GMR/sens-RNAi</i> -Augen.....	43
3.22	Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Querschnitten durch den distalen (a) und proximalen (b) Bereich eines <i>GMR/sens-RNAi</i> -Ommatidiums.....	44
3.23	Die verschiedenen Ommatidientypen in <i>sca/svp</i> -Augen.....	45
3.24	Die Markierung mit anti-PY in <i>sca/svp</i> -Augen.....	46
3.25	Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Querschnitten durch den distalen (a) und proximalen (b) Bereich derselben <i>sca/svp</i> -Retina.....	48
3.26	Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Querschnitten durch den distalen (a) und proximalen (b) Bereich desselben <i>sca/svp</i> -Ommatidiums des Typ I.....	49
3.27	Die Verdrehung der Rhabdomere in Typ I-Ommatidien.....	49
3.28	Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Querschnitten durch den distalen (a) und proximalen (b) Bereich desselben <i>sca/svp</i> -Ommatidiums des Typ II.....	50
3.29	Die Verdrehung der Rhabdomere in Typ II-Ommatidien.....	51
3.30	Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Querschnitten durch den distalen (a) und proximalen (b) Bereich desselben <i>sca/svp</i> -Ommatidiums des Typ III.....	52
3.31	Die Verdrehung der Rhabdomere in Typ III-Ommatidien.....	52
3.32	Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Querschnitten durch den distalen (a) und proximalen (b) Bereich desselben <i>sca/svp</i> -Ommatidiums des Typ IV.....	53
3.33	Die Verdrehung der Rhabdomere in Typ IV-Ommatidien.....	54
4.1	Schematische Darstellung der vier Ommatidientypen in <i>sca/svp</i> -Augen.....	62
4.2	Schematische Darstellung der Differenzierung der Photorezeptoren in der Augen- imaginalscheibe von <i>Drosophila</i> .....	66
4.3	Modell für die Rolle von R7 und R8 bei der molekularen Polarisierung von R1-R6.....	68
6.1	Zeitliche Entwicklung der Asymmetrie an der Stielmembran.....	82
6.2	Die pJNK-positiven vesikulären Strukturen kolokalisieren mit Rhodopsin-haltigen Vesikeln.....	83
6.3	Präinkubation mit anti-PY verhindert Markierung mit anti-pJNK an der Stiel- membran.....	83
6.4	Die Markierung mit anti-pJNK in <i>fz<sup>15</sup></i> -Augen.....	84
6.5	Die Markierung mit anti-PY in adulten <i>rb1/bsk.K53R</i> -Augen.....	84
6.6	Analyse der Mikrowillkippwinkel in den äußeren Sehzellen der <i>rb1/bsk.DN</i> - und der <i>rb1/bsk.K53R</i> -Kreuzung.....	85
6.7	Das räumliche Markierungsmuster von pJNK in der <i>sev<sup>14</sup></i> -Mutante.....	85

## Tabellenverzeichnis

2.1	Verwendete Fliegenstämme.....	9
2.2	Primäre Antikörper.....	10
2.3	Sekundäre Antikörper.....	11
2.4	Zeitlicher Ablauf der Immunfluoreszenzfärbung.....	13
2.5	Übersicht der verwendeten Filter.....	14
2.6	Zeitlicher Ablauf der Fixierung, Entwässerung und Einbettung für die Elektronenmikroskopie.....	15
3.1	Die verschiedenen Markierungsmuster mit pERK und pJNK in <i>sev</i> <sup>14</sup> -Mutanten.....	41

## Abkürzungsverzeichnis

1°	primär
2°	sekundär
3°	tertiär
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
anti-PY	anti-Phosphotyrosin
Aqua bidest.	bidestilliertes Wasser
BP	Bandpassfilter
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
DER	<i>Drosophila</i> EGF-Rezeptor
EGF	<i>epidermal growth factor</i> (epidermaler Wachstumsfaktor)
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
<i>et al.</i>	et alii (und andere)
Fz	Frizzled
h	Stunde
IgG	Immunglobulin G
IL-1	Interleukin-1
JNK/SAPK	<i>c-Jun-N-terminal kinase / stress-activated protein kinase</i>
LP	Langpassfilter
min	Minuten
M	Molar, Mol je Liter
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i> (Mitogen-aktivierte Proteinkinase)
mM	Millimolar
µm	Mikrometer
NGF	<i>nerve growth factor</i> (Nervenwachstumsfaktor)
nm	Nanometer
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (Phosphatgepufferte Salzlösung)
PCP	<i>planar cell polarity</i> (planare Zellpolarität)
pd	<i>pupal development</i> (Puppenentwicklung)
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i> (Blutplättchen-Wachstumsfaktor)
PIC	Phosphatase-Inhibitor-Cocktail
PP	Kaliumphosphatpuffer
Rh	Rhodopsin
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinasen
SD	<i>standard deviation</i> (Standardabweichung)
Tab.	Tabelle
TNFα	Tumornekrosefaktor
v. a.	vor allem
VDRC	Vienna <i>Drosophila</i> RNAi Center
WT	Wildtyp
u. a.	unter anderem
ü. N.	über Nacht
z. B.	zum Beispiel



# 1. Einleitung

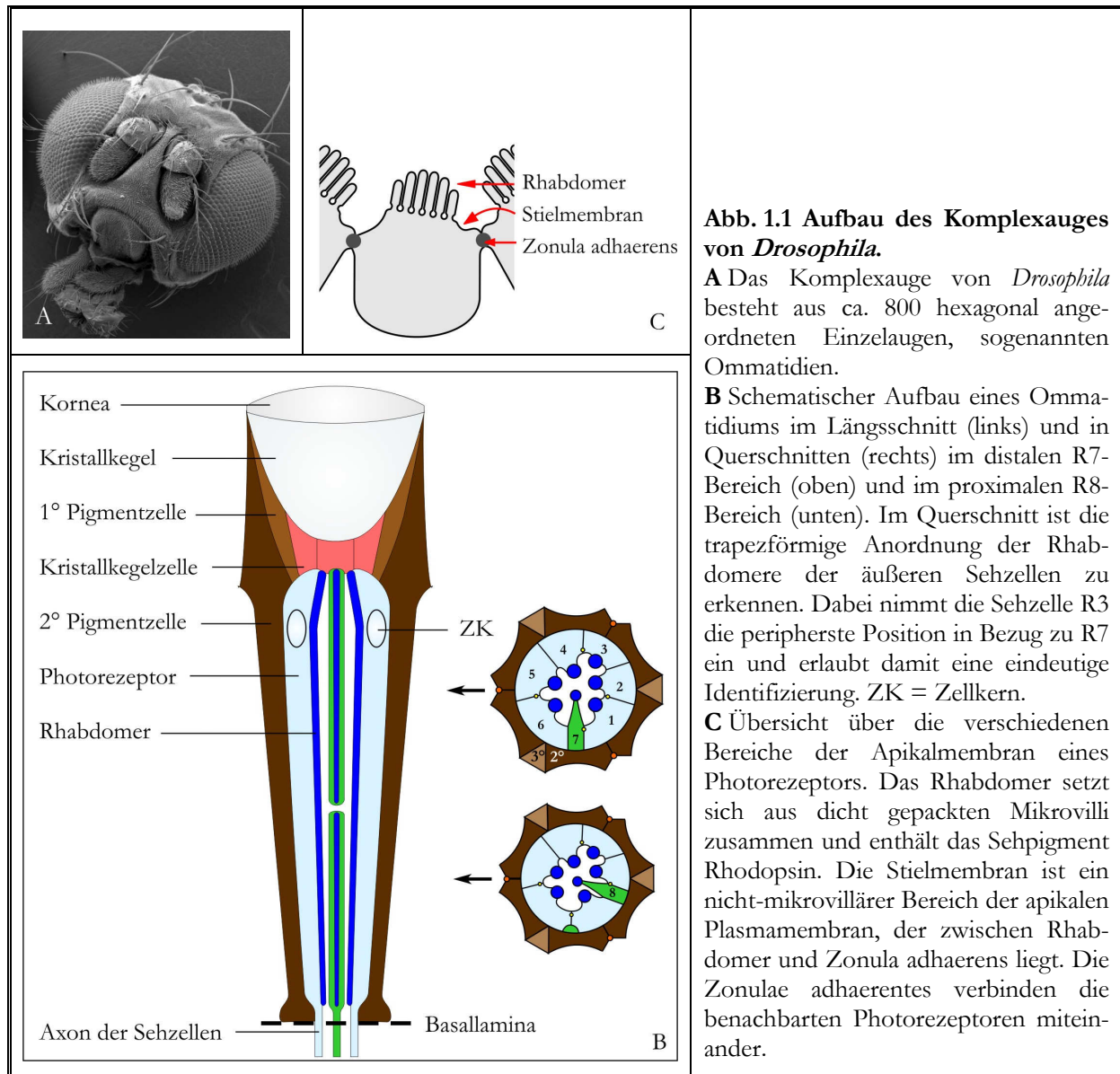
Die Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* ist einer der bestuntersuchten Modellorganismen. Besonders das Komplexauge ist ausgezeichnet geeignet um Mechanismen und Signalwege aufzuklären, die an der Zelldifferenzierung und -morphogenese (Cagan & Ready, 1989; Freeman, 1997; Frankfort & Mardon, 2002; Sang & Ready, 2002; Moses, 2002) sowie an der Ausbildung von Zellpolarität beteiligt sind (Strutt & Mlodzik, 1995; Baker 2001; Pickup et al., 2002; Fanto & McNeill, 2004; Schweisguth, 2005). Ein morphologisches Phänomen, das bereits in den 70er Jahren des letzten Jahrhunderts entdeckt wurde, ist die Verdrehung der Rhabdomere, des lichtempfindlichen Zellkompartiments der Sehzellen, entlang der Zell-Längsachse (Wehner et al., 1975). Dieses wird in der Fachliteratur als *rhabdomere twisting* bezeichnet. Bisher ist jedoch nichts darüber bekannt, welche Signalwege daran beteiligt sind, die notwendigen morphologischen Veränderungen zu vermitteln. Diese Arbeit soll einen Beitrag dazu leisten, die beteiligten Prozesse aufzuklären.

## 1.1 Das Komplexauge von *Drosophila*

Das Komplexauge von *Drosophila* ist aus ca. 800 Einzelaugen, sogenannten Ommatidien aufgebaut (siehe Abb. 1.1 A), die in einem hexagonalen Muster angeordnet sind. Jedes Ommatidium besteht aus acht Photorezeptorzellen sowie verschiedenen akzessorischen Zellen (Hardie, 1986; siehe Abb. 1.1 B). Zu den akzessorischen Zellen gehören 4 Kristallkegelzellen, 2 primäre Pigmentzellen sowie sekundäre und tertiäre Pigmentzellen, die allerdings zu mehreren benachbarten Ommatidien gehören und diese optisch voneinander abschirmen. Nach außen grenzt die Kornea das Ommatidium ab. Sie ist ein Sekretionsprodukt der Kristallkegel- und Pigmentzellen und erfüllt die Funktion einer Linse (Waddington & Perry, 1960; Tomlinson, 1985). Unter der Kornea befindet sich der Kristallkegel, eine extrazelluläre Matrix, die von den Kristallkegelzellen sezerniert wird und als zweite Linse dient (Cagan & Ready, 1989). Zusammen werden Kornea und Kristallkegel auch als dioptrischer Apparat bezeichnet.

Bei den Photorezeptoren eines Ommatidiums können zwei funktionelle Gruppen unterschieden werden. Die Zellkörper der äußeren Sehzellen R1-R6 ziehen über die gesamte Länge der Retina von den Kristallkegelzellen bis zur Basallamina. Ihre Axone projizieren durch die Basallamina weiter ins Gehirn bis zum ersten optischen Ganglion, der Lamina (Hardie, 1985). Im Querschnitt bilden die Rhabdomere der äußeren Sehzellen ein charakteristisches, asymmetrisches Trapez aus, welches es ermöglicht, die einzelnen Photorezeptoren zu identifizieren und zu nummerieren

(siehe Abb. 1.1 B). Alle äußeren Photorezeptoren enthalten den Sehfärbstoff Rhodopsin 1 (Rh1 = *ninaE*; Harris et al., 1976; O'Tousa et al., 1985; Zuker et al., 1985; Feiler et al., 1988). Sie sind hauptsächlich für die Bilderzeugung und die Detektion von Bewegungen verantwortlich (Hardie, 1985). Im Vergleich zum menschlichen Auge fungieren sie analog den hochsensitiven Stäbchen.



Die Zellkörper der inneren Photorezeptoren R7 und R8 reichen nur über die Hälfte der Retina, wobei R7 distal von R8 sitzt (siehe Abb. 1.1 B). Die Rhabdomere haben zudem einen geringeren Durchmesser und nehmen eine zentrale Position im Ommatidium ein (Tomlinson, 1988). Die Axone von R7 und R8 ziehen durch die Lamina bis in die Medulla, einem anderen Bereich der optischen Loben (Hardie, 1985; Kunes & Steller, 1993). R7 und R8 sind für das Farbsehen verantwortlich, analog den menschlichen Zapfen, und exprimieren jeweils verschiedene

Rhodopsine. In den R7-Photorezeptoren wird entweder Rh3 oder Rh4 gebildet (Fryxell & Meyerowitz, 1987; Montell et al., 1987; Zuker et al., 1987), während die R8 Photorezeptoren Rh5 oder Rh6 enthalten (Chou et al., 1996; Huber et al., 1997; Papatsenko et al., 1997). Die Expression des Rhodopsins in R7 ist dabei streng an die Expression des Rhodopsins in R8 gekoppelt. Rh3 tritt nur in Kombination mit Rh5 auf, Rh4 nur in Kombination mit Rh6. Je nach Zusammensetzung werden die Ommatidien *pale* (Rh3/Rh5) und *yellow* (Rh4/Rh6) unterschieden (Chou et al., 1996, 1999; Papatsenko et al., 1997). Ursprünglich wurde diese Einteilung aufgrund der Erscheinung der Ommatidien unter blauer Beleuchtung vorgenommen (Kirschfeld et al., 1978; Franceschini et al., 1981).

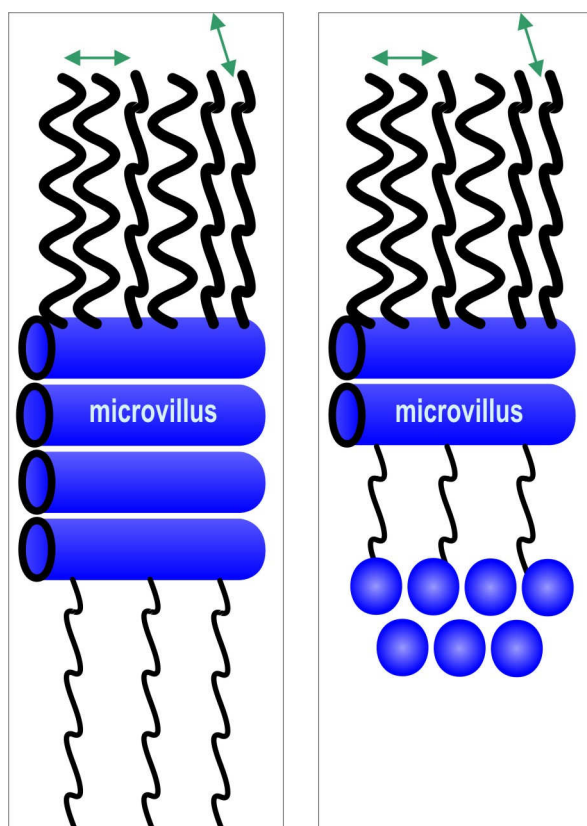
Eine Ausnahme bilden die inneren Photorezeptoren in der dorsalen Randregion (*dorsal rim area* = DRA); hier exprimieren sowohl R7 als auch R8 Rh3 (Fortini & Rubin, 1990; Feiler et al., 1992). Sie übernehmen eine besondere Funktion und vermitteln das Polarisationssehen (siehe 1.2).

## 1.2 *rhabdomere twisting* – Die morphologische Polarisierung der Photorezeptoren

Die Rhabdomere der Photorezeptoren sind dicht gepackte Mikrovilli, die der Vergrößerung der apikalen Membranoberfläche dienen (Carlson & Chi, 1979; Fernald, 2000). Sie sind über die Stielmembran, einem nicht-mikrovillären Bereich der apikalen Plasmamembran, mit den Zellkörpern verbunden (Abb. 1.1 C). In der Mikrovillusmembran befinden sich das Sehpigment Rhodopsin sowie die weiteren Komponenten der Phototransduktionskaskade (Review: Wang & Montell, 2007). Die Mikrovilli sind senkrecht zur optischen Achse der Sehzellen orientiert. Diese Geometrie der Mikrovilli sowie auch die geordnete kristalline Packung der Rhodopsinmoleküle in der Mikrovillusmembran ermöglichen den Mikrovilli Licht mit einem bestimmten e-Vektor bevorzugt zu detektieren und sind somit Grundlage für das Polarisationssehen (Laughlin, 1981; Suzuki et al., 1993) (Abb. 1.2). Die Fähigkeit, die Schwingungsebene des polarisierten Lichtes wahrzunehmen, bietet eine Möglichkeit der visuellen Orientierung (von Fritsch, 1949; Wehner, 1989).

Nicht alle Ommatidien eines Komplexauges sind in der Lage polarisiertes Licht zu detektieren. In verschiedenen Insektenarten ist diese Fähigkeit auf die Ommatidien der DRA des Auges beschränkt (Biene: Wehner & Strasser, 1985; Heuschrecken: Brunner & Labhart, 1987; Fliegen: von Philipsborn & Labhart, 1990; Review: Labhart & Meyer, 1999). Sie sind durch bestimmte physiologische und morphologische Eigenschaften besonders dafür geeignet, u. a. durch die oben genannte Anordnung der Mikrovilli (Wunderer & Smola, 1982a). Diese sind in Sehzellen, die das Polarisationssehen vermitteln, über die gesamte Länge des Rhabdomers parallel ausgerichtet. In den Sehzellen außerhalb der DRA besitzen die Rhabdomere jedoch ungleich ausgerichtete

Mikrovilli. Dies kann durch das Verdrehen ganzer Photorezeptoren, das Verdrehen von Rhabdomeren oder *random misalignment* zustande kommen (Labhart & Meyer, 1999). Wehner et al. (1975) zeigten zuerst für die Honigbiene, dass es sowohl drehende als auch nicht-drehende Rhabdomere gibt. Später wurde diese Verdrehung der Rhabdomere auch für andere Insektenarten nachgewiesen (Smola & Tschardtke, 1979; Williams, 1981; Altner & Burkhardt, 1981). Durch die Verdrehung wird die Polarisations sensitivität der Photorezeptoren stark vermindert bzw. beseitigt und das Licht aller Schwingungsebenen wahrgenommen (siehe Abb. 1.2). Folglich wird die Absorption unpolarisierten Lichtes erhöht (Snyder & McIntyre, 1975; Wehner et al., 1975; Smola & Tschardtke, 1979; Nilsson et al., 1987).



**Abb. 1.2 Funktionelle Bedeutung des *rhabdomere twisting***

In nicht-drehenden Rhabdomeren sind die Mikrovilli über die gesamte Länge der Retina parallel angeordnet (links). Diese Anordnung sowie die Orientierung der Rhodopsinmoleküle in den Mikrovilli bewirken, dass Licht mit einem e-Vektor parallel zur Längsachse der Mikrovilli (waagerechter Doppelpfeil) bevorzugt absorbiert wird. Der Lichteinfall erfolgt bei diesem Schema von oben. Sind die Rhabdomere hingegen verdreht (rechts), wird das Licht unabhängig von seinem e-Vektor detektiert. Infolgedessen wird die Empfindlichkeit der Photorezeptoren für polarisiertes Licht vermindert und die Sensitivität für unpolarisiertes Licht erhöht.

Tiere mit der Fähigkeit zur Detektion von polarisiertem Licht umgehen durch das Verdrehen der Rhabdomere auch das Problem von Falschfarben. Pflanzen mit wachsigen Oberflächen polarisieren teilweise das reflektierte Licht. Nimmt ein Farbwahrnehmungssystem (= Photorezeptoren R7 und R8) nun polarisiertes Licht wahr, verändert sich die spektrale Information des Lichtes, d. h. die Farbwahrnehmung verändert sich und somit die Informationen über die Umwelt (Wehner & Bernard, 1993). In der DRA hingegen, die auf das Polarisationssehen spezialisiert ist und daher keine Verdrehung der Rhabdomere von R7 und R8 wie im restlichen Auge aufweist, exprimieren beide Sehzellen das gleiche Rhodopsin, sind folglich

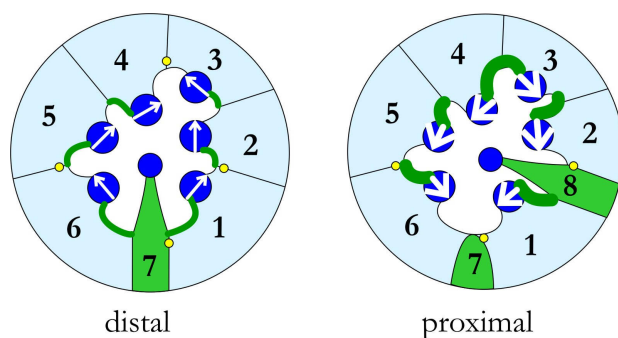
monochromatisch, und können deshalb keine Farben wahrnehmen (Fortini & Rubin, 1990, 1991).

Elektronenmikroskopische Untersuchungen von Smola und Tschardtke (1979) an den Komplexaugen von *Calliphora vicina*, einer mit *Drosophila* nah verwandten dipteren Fliege, zeigten, dass die Verdrehung der Rhabdomere der äußeren Sehzellen R1-R6 nicht gleichmäßig verläuft. Stattdessen können drei Regionen unterschieden werden. Diese sind durch verschiedene Richtungen und den Grad der Verdrehung der Mikrovilli gekennzeichnet. Im Detail bedeutet das, dass die Mikrovilli im distalen und proximalen Bereich des Rhabdomers etwa senkrecht zueinander orientiert sind und dort kaum eine Drehung je Längeneinheit zeigen. Stattdessen ist die Verdrehung im mittleren Bereich des Rhabdomers sehr stark ausgeprägt. Die Rhabdomere von R1-R3 drehen dabei in die gleiche Richtung, während R4-R6 in die entgegengesetzte Richtung kippen. Die inneren Sehzellen R7 und R8 zeichnen sich hingegen durch eine hohe Variabilität des *rhabdomere twisting* aus. Die Verdrehung erfolgt graduell über die gesamte Längsachse, wobei einige Photorezeptoren keine Verdrehung zeigen, während in anderen eine starke Kippung mit mehreren Richtungswechseln sichtbar wird (Wunderer & Smola, 1982b). Untersuchungen von Smola und Tschardtke (1979) an den Komplexaugen von *Drosophila* deuteten an, dass die Verdrehung der Rhabdomere in ähnlicher Art und Weise wie in *Calliphora* erfolgt.

Eine genauere Untersuchung der Verhältnisse in den Photorezeptoren R1-R6 in *Drosophila* bestätigte und erweiterte die an *Calliphora* erhaltenen Ergebnisse (Baumann und Lutz, 2006). So zeigte sich, dass im distalen Bereich die Rhabdomere nur um wenige Grad entlang der apikal-basalen Zellachse kippen, wobei die Kipprichtung zum R3/R4-Kontaktbereich weist (Abb. 1.3). R1, R2 und R3 kippen somit in die gleiche Richtung in Bezug zu ihrer apikal-basalen Zellachse, R4, R5 und R6 kippen in die entgegengesetzte Richtung. Im proximalen Bereich der Ommatidien sind die Kippwinkel größer. Außerdem weisen die Rhabdomere von R1-R6 in die entgegengesetzte Richtung im Vergleich zum distalen Bereich, d. h. weg von der R3/R4-Kontaktstelle. Erstmals wurde durch Baumann und Lutz (2006) auch untersucht, wann diese Verdrehung der Rhabdomere in der Entwicklung erfolgt. Die Kippung der Mikrovilli tritt erst kurz vor Schlupf der Fliegen auf. Zu diesem Zeitpunkt ist die Augenmorphogenese nahezu vollständig abgeschlossen. Die Rhabdomere haben ihre endgültige Form weitgehend angenommen und die Stielmembranen sowie der interrhabdomere Raum sind voll entwickelt (Cagan & Ready, 1989; Kumar & Ready, 1995). Zu diesem Zeitpunkt sind die Sehzellen schon lichtempfindlich, jedoch erfolgt der Prozess der Rhabdomerverdrehung unabhängig von Licht (Baumann & Lutz, 2006).

### 1.3 Phosphotyrosin - Die molekulare Polarisierung der Photorezeptoren

Der Nachweis für die Verdrehung der Rhabdomere beruhte bisher ausschließlich auf der Analyse von elektronenmikroskopischen Daten. Baumann und Lutz (2006) konnten zeigen, dass die regelmäßige Verdrehung der Rhabdomere von R1-R6 sich auch in einer molekularen Polarisierung der Photorezeptoren ausdrückt. Phosphotyrosin-(PY) haltige Proteine zeigen eine asymmetrische Verteilung in den äußeren Sehzellen (Abb. 1.3). Die immuncytochemische Markierung mit anti-PY findet sich nur auf einer Seite der Stielmembran. Vom distalen zum proximalen Bereich wechselt diese von einer Seite des Rhabdomers auf die andere. Weiterhin wechselt von distal zu proximal auch die Intensität der Markierung. Während distal die Markierung sehr schwach ist, ist sie im proximalen Bereich sehr stark ausgeprägt. Diese molekulare Asymmetrie stimmt mit der morphologischen Asymmetrie, also der Verdrehung der Rhabdomere, überein (Abb. 1.3). So kippen die Mikrovilli immer von der Seite weg, an der die phosphotyrosinierten Proteine an der Stielmembran angereichert vorkommen. Außerdem spiegelt sich der Wechsel in der Markierungsintensität vom distalen zum proximalen Bereich in den verschieden ausgeprägten Kippwinkeln wider. Zusammenfassend lässt sich daher sagen, dass im distalen Bereich der Kippwinkel klein und die Markierungsintensität für anti-PY schwach ist. Die Mikrovilli kippen in Richtung der R3/R4-Kontaktstelle, die Markierung liegt auf der gegenüberliegenden Seite. Im proximalen Bereich des Ommatidiums ist der Kippwinkel groß und die Markierungsintensität stark. Die Mikrovillikippung weist weg von der R3/R4-Kontaktstelle, gleichzeitig ist die anti-PY-Markierung zu dieser Seite ausgerichtet.



**Abb. 1.3 Anti-Phosphotyrosin (anti-PY) – ein Marker für die Verdrehung der Rhabdomere.**

Schema des Markierungsmusters von anti-PY im distalen und proximalen Bereich eines Ommatidiums. Grüne Linien zeigen die PY-positiven Bereiche, die weißen Pfeile deuten die Kipprichtung der Rhabdomere an. Die Pfeildicke entspricht dabei dem Grad der Mikrovillikippung. Die PY-Markierung ist nur auf der Seite der Stielmembran zu finden, von der die Mikrovilli wegkippen. Weiterhin sind Markierungsintensität von anti-PY und der Kippwinkel im proximalen Bereich der Retina größer als distal.

Eine weitere Gemeinsamkeit von molekularer und morphologischer Asymmetrie in den äußeren Sehzellen zeigt sich in deren Etablierung während der Entwicklung. Bei 75% pupaler Entwicklung ist die Markierung mit anti-PY an der Spitze der Mikrovilli lokalisiert. Erst bei ca. 90% pupaler Entwicklung kann eine Begrenzung von PY-haltigen Proteinen zu einer Seite der Stielmembran beobachtet werden. Das endgültige Markierungsmuster mit anti-PY wird bei

Schlupf der Fliegen erreicht. Übereinstimmend damit beginnt auch die Verdrehung der Rhabdomere erst kurz vor Schlupf der Fliegen (Baumann & Lutz, 2006). Der Nachweis von PY-haltigen Proteinen an der Stielmembran kann folglich als lichtmikroskopischer Marker für das *rhabdomere twisting* dienen. Die Identität dieser Proteine ist bislang jedoch unbekannt.

## 1.4 Zielstellung

Obwohl das Phänomen der Verdrehung der Rhabdomere seit mittlerweile mehreren Jahrzehnten bekannt ist (Wehner et al., 1975; Menzel & Blakers, 1975), wurde bisher fast ausschließlich die physiologische Bedeutung untersucht. Durch Baumann und Lutz (2006) wurde erstmals der Versuch gemacht, die entwicklungs- und zellbiologischen Grundlagen der Rhabdomerverdrehung zu erforschen. So konnte nachgewiesen werden, dass es zu einer asymmetrischen Anreicherung von phosphotyrosinierten Proteinen an der Stielmembran kommt. Diese spiegelt die morphologischen Veränderungen durch die Verdrehung der Rhabdomere wider. In etwa zeitgleich zur molekularen Polarisierung der Zelle findet die Kippung der Rhabdomere statt. Diese Daten implizieren, dass ein direkter Zusammenhang zwischen der asymmetrischen Verteilung der PY-haltigen Proteine an die Stielmembran und der Etablierung des *rhabdomere twisting* besteht.

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Identität der phosphotyrosinierten Proteine an der Stielmembran zu klären. Des Weiteren sollte mit Hilfe von *loss-of-function*- und *gain-of-function*-Mutanten die funktionelle Bedeutung dieser Proteine für die Entwicklung des *rhabdomere twisting* untersucht werden. Die Änderung der Intensität und des räumlichen Musters der PY-Markierung erfolgt am Übergang von R7 zu R8. Korrelierend damit wechseln die Kipprichtung der Mikrovilli und die Stärke der Kippung in diesem Bereich. Ein weiterer Aspekt, der im Zuge dieser Arbeit deshalb untersucht werden sollte, ist der Einfluss der inneren Sehzellen R7 und R8 auf die Verdrehung der Rhabdomere von R1-R6. Dazu sollten Mutanten ohne R8 und/oder ohne R7 analysiert werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Versuchstiere und Präparation

Für die Versuche wurden Tiere der Art *Drosophila melanogaster* (Diptera, Drosophilidae) aus laboreigener Zucht verwendet. Die Fliegen wurden in einem Hell-Dunkel-Rhythmus von 12:12 Stunden bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 70% und einer Temperatur von 21 °C gehalten. Sie wurden in luftdurchlässig verschlossenen Plastikröhrchen auf Fliegenmedium (Maismehl, Zucker, Trockenhefe, Agar) kultiviert. Abweichend davon wurden Kreuzungen von transgenen Fliegen mit den entsprechenden GAL4- bzw. UAS-Konstrukten bei 26 °C angesetzt, da dieses System temperaturabhängig funktioniert. Eine erhöhte Temperatur von 26°C hatte eine erhöhte Aktivität des GAL4-UAS-Systems zur Folge (Review: Duffy, 2002). Eine Ausnahme bildete die Kreuzung *GAL4-sca* x *UAS-syb1*. Aufgrund der hohen Mortalitätsrate bei 21 °C wurden diese Fliegen bei 19 °C kultiviert.

Für die Experimente wurden zwei pupale Entwicklungsstadien sowie Imagines verwendet. Für die Präparation der Retinen von Imagines wurden die betäubten Tiere in einer mit Sylgard beschichteten Präparierschale unter Rotlicht dekapitiert. In diesem Wellenlängenbereich reagieren die Photorezeptoren nicht auf Licht (Kirschfeld & Vogt, 1986; Hardie, 1986). Anschließend wurde durch einen Schnitt entlang des Medians der Kopf geteilt, um ein besseres Eindringen der Fixierlösung zu gewährleisten. Die 75% und 90%igen Puppenstadien wurden nach den von Cagan und Ready (1989) beschriebenen Kriterien bestimmt. Bei der Präparation wurde die Puppe in der Puppenhülle mittig durchtrennt. Die vordere Körperhälfte wurde mit Hilfe einer Pinzette aus der Hülle herausgezogen. Danach wurde der Kopf abgetrennt und fixiert.

Die Augen des rotäugigen Wildstamms von *Drosophila* zeigten in der Fluoreszenzmikroskopie eine intensive Autofluoreszenz, insbesondere bei einer Anregungswellenlänge von 543 nm. Weißäugige Fliegen (*w<sup>1118</sup>*) zeigten hingegen keine wesentliche Autofluoreszenz bei Anregung mit Wellenlängen im sichtbaren Spektralbereich. Vorversuche ergaben, dass weißäugige Fliegen das gleiche Markierungsmuster mit anti-PY aufweisen wie der rotäugige Wildtyp (Daten nicht dargestellt). Für die immunocytochemischen Untersuchungen wurden deshalb, soweit möglich, weißäugige Fliegen mit dem Allel *w<sup>1118</sup>* verwendet. Diese Fliegen werden im Ergebnisteil auch als Wildtyp bezeichnet. In Tabelle 2.1 sind alle verwendeten Fliegenstämme aufgeführt.



**Tabelle 2.1: Verwendete Fliegenstämme**

Stamm	Genotyp	Herkunft
GAL4-GMR	w*; P{Gal4-ninaE.GMR}12	Bloomington Stock Center #1104
GAL4-rh1	P{rh1-Gal4}3; ry <sup>506</sup>	Bloomington Stock Center #8691
GAL4-sca	y <sup>1</sup> w*; P{GawB}sca <sup>109-68</sup>	Bloomington Stock Center #6479
lt <sup>1</sup> rl <sup>1</sup>	lt <sup>1</sup> rl <sup>1</sup>	Bloomington Stock Center #1051
Oregon R-S	Wildtyp	Bloomington Stock Center #4269
Oregon R <sub>white</sub>	w <sup>1118</sup>	Armin Huber
rl <sup>10a</sup>	Df(2R)rl10a, lt <sup>1</sup> rl <sup>10a</sup> cn <sup>1</sup> /In(2LR)bw <sup>V1</sup> , ds <sup>33k</sup> bw <sup>V1</sup>	Bloomington Stock Center #742
rl <sup>SEM</sup>	rl <sup>SEM</sup> /CyO/Dp(?;2)bw <sup>D</sup> , S <sup>1</sup> wg <sup>Sp-1</sup> Ms(2)M <sup>1</sup> bw <sup>D</sup>	Drosophila Genetic Resource Center (Kyoto Institute of Technology) #108365
sens-RNAi	w <sup>1118</sup> ; P{GD4585}v11690	VDRC #11690
sev <sup>D2</sup>	w <sup>1118</sup> ; sev <sup>14</sup>	G. Rubin
sevRAS1	w <sup>1118</sup> ; b <sup>1</sup> so <sup>+2</sup> cn <sup>1</sup> /CyO, P{sevRas1.V12}FK1	Bloomington Stock Center #402
UAS-bsk.A-Y	y <sup>1</sup> w <sup>1118</sup> ; P{UAS-bsk.A-Y}1	Bloomington Stock Center #6407
UAS-bsk.DN	w <sup>1118</sup> ; P{UAS-bsk.DN}2	Bloomington Stock Center #6409
UAS-bsk.K53R	w*; P{UAS-bsk.K53R}20.1a	Bloomington Stock Center #9311
UAS-svp1	w <sup>1118</sup> ; P{UAS-svp1}	Yash Hiromi
w fz <sup>H51</sup>	w <sup>1118</sup> ; fz <sup>15</sup> /TM3 Sb	D. Strutt

## 2.2 Lösungen und Puffer

### Immuncytochemie

Kaliumphosphatpuffer (PP):

0,2 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; pH 7,0

PIC (Phosphatase-Inhibitor-Cocktail):

100 mM Natriumfluorid; 100 mM β-Glycero-phosphat; 100 mM Natriumpyrophosphat; 250 mM Natriumorthovanadat

Fixierlösung 1:

3% *para*-Formaldehyd; 1 mM Dithio-bis-succinimidylpropionat in 0,1 M PP

Fixierlösung 2:

3% *para*-Formaldehyd; 1 mM Dithio-bis-succinimidylpropionat; 2 mM K<sub>2</sub>-EGTA, PIC 1:10 in 0,1 M PP

Blockierlösung:

1% Normales Ziegenserum; 0,8% Rinder-serumalbumin; 0,5% Triton-X 100 in PBS

Mowiol 16,6% (w/v) Mowiol 4.88; 2% n-Propylgallat in Glycerin/PBS (Verhältnis 1:2)

## Elektronenmikroskopie

1. Fixierlösung: 2% Glutaraldehyd, 3% *para*-Formaldehyd, 10 mM K<sub>2</sub>-EGTA, 2 mM MgCl<sub>2</sub> in 75 mM Na-Cacodylatpuffer (pH 7,4)

2. Fixierlösung: 2% OsO<sub>4</sub> in 75 mM Na-Cacodylatpuffer (pH 7,4)

Spurr's Einbettmedium (Standardzusammensetzung) 23,6% Vinylcyclohexendioxid (VCHD, ERL 4206); 14,2% Diglycidether (DER 736); 61,5% Nonenylsuccinicanhydrid (NSA); 0,7% Dimethylaminoethanol (DMAE)

## 2.3 Antikörper

### 2.3.1 Verwendete Antikörper

In Tabelle 2.2 sind die in dieser Arbeit verwendeten primären Antikörper zusammengefasst. Die sekundären Antikörper sowie das Farbstoff-gekoppelte Phalloidin sind in Tabelle 2.3 aufgelistet.

**Tabelle 2.2: Primäre Antikörper**

Antikörper	Antigen (Immunogen)	Spezies/Typ	Quelle/ Bestell-Nr.	Verdünnung
PY99	Phosphotyrosin-KLH-Konjugat	Maus/monoklonal IgG2b	Santa Cruz/ #sc-7020	1:200
pERK	synthetisches Phosphopeptid im Bereich* der AS-Reste Thr202/Tyr204 von humaner p44 MAPK, KLH gekoppelt	Kaninchen/polyklonal	CST/#9101	1:400
pSAPK/JNK	synthetisches Phosphopeptid im Bereich* der AS-Reste Thr183/Tyr185 von humaner SAPK/JNK, KLH gekoppelt	Kaninchen/polyklonal	CST/#9251	1:200
Blockierungspeptid für pJNK			CST/#1215	Peptid:AK = 2:1

4C5	<i>Drosophila</i> Rhodopsin-1	Maus/mono- klonal IgG1	DSHB	1:100
Rh6	<i>Drosophila</i> Rhodopsin-6, C-Terminus (AS 331-369) gekoppelt an Dihydrofolat- Reduktase	Kaninchen/ polyklonal	A. Huber	1:200

\* = genaue Sequenz wird vom Hersteller nicht mitgeteilt

KLH = *Keyhole Limpet Hemocyanin*, Hämocyanin der marinen Schlüssellochschnecke

CST = Cell Signaling Technology

DSHB = *Developmental Studies Hybridoma Bank*

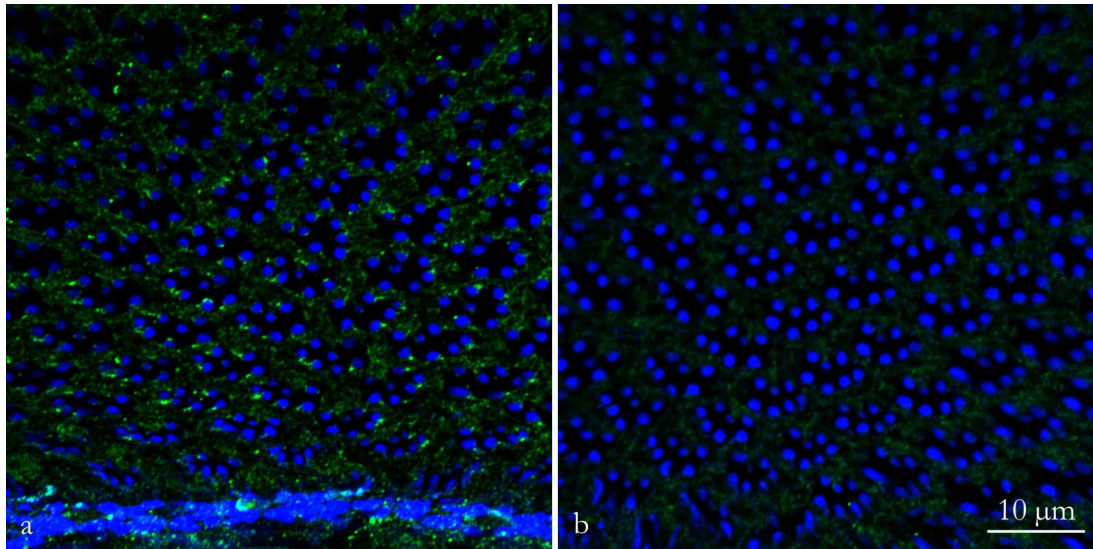
**Tabelle 2.3: Sekundäre Antikörper**

Antikörper	Quelle	Verdünnung	Verwendete Anregungswellenlänge
Cy <sup>TM</sup> 3-konjugierter Ziege anti- Kaninchen IgG	Jackson Immuno Research Laboratories	1:200	543 nm
Cy <sup>TM</sup> 3-konjugierter Ziege anti- Maus IgG	Jackson Immuno Research Laboratories	1:400	543 nm
Cy <sup>TM</sup> 5-konjugierter Ziege anti- Kaninchen IgG	Jackson Immuno Research Laboratories	1:100	633 nm
Cy <sup>TM</sup> 5-konjugierter Ziege anti- Maus IgG	Jackson Immuno Research Laboratories	1:100	633 nm
AlexaFluor® 488 Ziege anti- Maus IgG	Molecular Probes	1:400	488 nm
AlexaFluor® 488 Ziege anti- Kaninchen IgG	Molecular Probes	1:100	488 nm
AlexaFluor® 488 Phalloidin	Molecular Probes	1:200	488 nm
AlexaFluor® 633 Phalloidin	Molecular Probes	1:200	633 nm

### 2.3.2 Spezifität der Antikörper

Für die Antikörper PY99, 4C5 und Rh6 wurde die spezifische Reaktion mit den entsprechenden Proteinen in *Drosophila* bereits nachgewiesen (PY99: Glenney et al., 1988; Baumann & Lutz, 2006; 4C5: de Couet & Tanimura, 1987; Suzuki & Hirose, 1991; Rh6: Chou et al., 1999). Im Gegensatz dazu wurde die spezifische Reaktion der Antikörper mit den beiden aktivierten Proteinkinasen pERK und pJNK noch nicht für *Drosophila* beschrieben. Im Zuge dieser Arbeit wurde deshalb für anti-pJNK die Spezifität der Markierung überprüft. Für diesen Antikörper stand das Antigen in Form eines Blockierungspeptids zur Verfügung. So konnten

Präinkubationsexperimente durchgeführt werden. Der Antikörper pJNK wurde mit dem Blockierungspeptid für 30 min inkubiert und dann auf Gefrierschnitte von *Drosophila* WT-Retina gegeben. Die mit anti-pJNK markierten Strukturen (Abb. 2.1 a) konnten nach der Präinkubation des Antikörpers mit dem Antigen nicht mehr detektiert werden (Abb. 2.1 b). Lediglich eine schwache Markierung des Cytoplasmas war noch zu detektieren. Der Antikörper schien somit spezifisch das entsprechende Protein in *Drosophila* zu erkennen. Für anti-pERK bestand nicht die Möglichkeit das Blockierungspeptid zu erwerben.



**Abb. 2.1 Präinkubation mit Antigen verhinderte Markierung mit anti-pJNK**

Doppelmarkierung an Gefrierschnitten von *Drosophila* WT-Retina mit anti-pJNK (grün) und Phalloidin (blau). Übersichtsaufnahmen der mit anti-pJNK erhaltenen Markierung **a** ohne Präinkubation des Antikörpers mit dem Antigen und **b** nach Präinkubation des Antikörpers mit dem Antigen. Bis auf eine schwache Markierung des Cytoplasmas konnte nach der Präinkubation keine Immunreaktivität detektiert werden.

## 2.4 Immuncytochemie

Für die Herstellung von Gefrierschnitten wurden *Drosophila*-Köpfe für eine Stunde bei Raumtemperatur in Fixierlösung 1 inkubiert. Dieses Standard-Fixierungsprotokoll für die immuncytochemischen Experimente erwies sich für den Nachweis von phosphorylierten Proteinen nur als bedingt geeignet, da das Immunfluoreszenzsignal teilweise sehr schwach bzw. an der Detektionsgrenze war. Eine mögliche Ursache könnte die Dephosphorylierung der Proteine durch Phosphatasen während der Probenvorbereitung sein. Um dies zu reduzieren, wurde die Fixierlösung so modifiziert, dass das Phosphorylierungssignal durch Zugabe von Phosphatase-Inhibitoren möglichst intensiv erhalten blieb (Fixierlösung 2). Da durch die Zugabe von Phosphatase-Inhibitoren das erhaltene Immunfluoreszenzsignal verstärkt wurde, wurden alle Proben mit Fixierlösung 2 inkubiert. Nach der Fixierung wurde das Präparat 3 x 10 min mit PBS

gewaschen. Anschließend erfolgte die Entwässerung des Gewebes in 10%iger Sucrose-Lösung (in 0,1 M PP) für 1 h bei 4 °C und in 25%iger Sucrose-Lösung (in 0,1 M PP) über Nacht ebenfalls bei 4 °C. Im nächsten Schritt wurde der Kopf in zwei Hälften geteilt und die Kopfhälften, mit der Retina nach oben ausgerichtet, in einem Block aus 2%iger Agarose eingebettet, mit *Tissue-Tek*® aufgeklebt und in 2-Methylbutan bei -155 °C eingefroren. Die Präparate wurden anschließend an einem Gefriermikrotom (Kryostat HM 500 OM, MICROM) geschnitten. Die 10 µm dicken Schnitte wurden mit Poly-L-Lysin beschichteten Deckgläsern aufgenommen, getrocknet und anschließend für die Immunfluoreszenzfärbung entsprechend Tab 2.4 verwendet oder bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

**Tabelle 2.4: Zeitlicher Ablauf der Immunfluoreszenzfärbung**

Permeabilisierung (0,01% Tween20 in PBS)	5 min
Blockierung freier Aldehydgruppen (50 mM NH <sub>4</sub> Cl in PBS)	5 min
Waschen mit PBS	5 min
Blockierung unspezifischer Bindungsstellen (Blockierlösung)	15 min
Inkubation mit dem primären Antikörper in Blockierlösung	ü. N., 4 °C
Waschen mit PBS	3 x 5 min
Inkubation mit dem sekundären Antikörper in PBS	1 h, RT
Waschen mit PBS	3 x 5 min

Im Anschluss an dieses Protokoll wurden die Schnitte kurz in bidestilliertes Wasser getaucht, trocken getupft und in Mowiol eingedeckelt.

## 2.5 Lichtmikroskopie und Bildbearbeitung

Die Analyse der Immunfluoreszenzfärbungen erfolgte mit einem Konfokalen Laser-Rastermikroskop (LSM 510, Carl Zeiss) und einem Zeiss Plan-Apochromat x63/1,4 NA Ölimmersionsobjektiv. Angeregt wurde mit einem Argon-Laser der Wellenlänge 488 nm und zwei Helium-Neon-Lasern mit den Wellenlängen 543 und 633 nm. Die dabei verwendeten Filter sind in Tabelle 2.5 aufgeführt. Bei Doppel- und Dreifachmarkierungen erfolgte die Aufnahme sequentiell, um die teilweise überlappenden Emissionsspektren der einzelnen Farbstoffe strikt voneinander zu trennen. Zuerst wurden die Präparate bei 488 nm bzw. 488/633 nm angeregt und anschließend bei 543 nm.

**Tabelle 2.5: Übersicht der verwendeten Filter**

Anregungswellenlänge in nm	488	543	633
Einfachmarkierung	-	LP 560 nm	-
Doppelmarkierung	BP 505 – 530 nm	LP 560 nm	-
Dreifachmarkierung	BP 505 – 530 nm	BP 560 – 615 nm	LP 650 nm

BP = Bandpassfilter; LP = Langpassfilter

Bildbearbeitung in Form von Rauschreduzierung, Optimierung von Kontrast und Helligkeit sowie eine Veränderung der Farbgebung bei Mehrfachmarkierungen erfolgte mit dem Programm COREL PHOTO PAINT 14.

## 2.6 Elektronenmikroskopie

### 2.6.1 Fixierung, Herstellung von Ultradünnschnitten und Kontrastierung

Nach der Präparation (siehe 2.1) wurden die Köpfe dem in Tabelle 2.6 aufgeführten Protokoll unterzogen, um sie für die Herstellung von Ultradünnschnitten vorzubereiten. Für die Untersuchung der Mikrovillikippwinkel im Wildtyp und in verschiedenen Mutanten ist es wichtig, möglichst viele Querschnitte durch Ommatidien zu erhalten, in denen die Mikrovilli in gesamter Länge längs geschnitten sind. Aufgrund der natürlichen, gebogenen Form des Auges wird beim Schneiden generell immer nur ein Teil der Ommatidien quer geschnitten, während die restlichen schräg angeschnitten werden und somit nicht für die Auswertung genutzt werden können. In dieser Arbeit sollte die Analyse möglichst im Bereich der Äquatorregion des Auges stattfinden. Deshalb musste das Auge beim Einbetten richtig ausgerichtet werden. Da die Retina in flüssigem Einbettmedium jedoch nicht in eine definierte Position gebracht werden kann bzw. beim Aushärten die Position noch einmal verändert, erfolgte die Einbettung nur in einer dünnen Harzschicht. Diese wurde nach der Aushärtung zurechtgeschnitten und mit Sekundenkleber (Roth) auf einem neuen Harzblock befestigt. Hierbei konnte jetzt die Retinaausrichtung optimiert werden, d. h. mit der Kornea im Bereich des Augenäquators nach oben. Anschließend wurden die Präparate zurechtgetrimmt. Die Herstellung der 60 nm dicken Schnitte erfolgte mit einem Diamantmesser (Diatome 45°) an einem ULTRACUT UCT von Leica. Die auf Aqua bidest. schwimmenden Schnitte wurden mit Chloroformdampf gestreckt, abgenommen und auf mit Pioloform beschichtete Kupfer-Lochgrids übertragen. Die getrockneten Schnitte wurden für 15 min mit Uranylacetat (2% in 50% Ethanol) und danach für 5 min mit Bleicitrat kontrastiert.

**Tabelle 2.6: Zeitlicher Ablauf der Fixierung, Entwässerung und Einbettung für die Elektronenmikroskopie**

1. Fixierung	2 h, RT
Waschen mit 0,075 M Na-Cacodylatpuffer (pH 7,4)	3 x 10 min, RT
2. Fixierung	1 h, RT
Waschen mit Aqua bidest.	10 min, RT
Dehydrierung über eine Alkoholreihe: 50% - 70% - 90% - 2 x 100% Ethanol - 2 x Aceton	je 10 min, RT
Inkubation in einem Aceton-Spurr´s-Gemisch im Verhältnis 3:1	1 h, RT
Inkubation in einem Aceton-Spurr´s-Gemisch im Verhältnis 1:3 auf einem Drehtisch	ü. N., RT
Überführung in reines Spurr´s Einbettmedium und Inkubation	1 h, RT
Einbetten in Spurr´s Einbettmedium und Polymerisation	ü. N., 60 °C

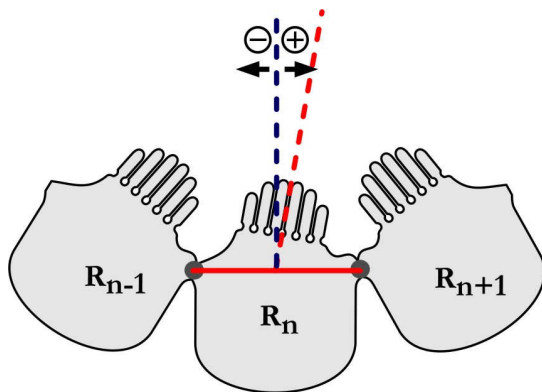
## 2.6.2 Dokumentation und Bildbearbeitung

Die Auswertung der Schnitte erfolgte mit dem Transmissions-Elektronenmikroskop PHILIPS CM 100 bei einer Beschleunigungsspannung von 80 kV. Für die Analyse der Kippwinkel der Rhabdomere wurden sowohl für den distalen als auch den proximalen Bereich pro Retina ca. 15 bis 20 querschnittene Ommatidien mit der Digitalkamera *BioScan Camera* von GATAN (1024 x 1024 Pixel) aufgenommen. Die Bilddokumentation erfolgte auf 6 x 9 cm Negativfilm. Die Optimierung von Helligkeit und Kontrast erfolgte mit dem Programm COREL PHOTO PAINT 14.

## 2.6.3 Ausmessen der Mikrovilli-Kippwinkel und statistische Analyse

Durch Baumann & Lutz (2006) wurde ein Verfahren entwickelt, das die Analyse des Kippwinkels jedes einzelnen Photorezeptors ermöglicht. Dazu wird eine Referenzlinie zwischen die Zonulae adhaerentes der jeweiligen Sehzelle gelegt (Abb. 2.2). Diese Achse steht senkrecht zur apikal-basalen Zellachse. Im nächsten Schritt wird die Längsachse der Mikrovilli in Bezug zur Referenzachse gesetzt. Bei Mikrovilli, die senkrecht zur Referenzachse stehen, wird der Kippwinkel mit 0° festgelegt. Ist die Längsachse der Mikrovilli in Richtung des nächst höher nummerierten Photorezeptors ausgerichtet, wird der Kippwinkel als positiv definiert. Revers

dazu wird er als negativ definiert, wenn die Mikrovilli in Richtung des niedriger nummerierten Photorezeptors kippen.



### Abb. 2.2 Bestimmung der Kippwinkel

Referenzlinie durch die Zonulae adhaerentes der zu analysierenden Sehzelle (—), Längsachse der Mikrovilli (---), Senkrechte zur Referenzachse (---).

Eine Kippung der Mikrovilli in Richtung der höher nummerierten Sehzelle wird als positiver Kippwinkel gedeutet, eine Kippung in entgegengesetzter Richtung als negativer Kippwinkel.

Es kommt bei dieser Art der Analyse aber zu leichten Ungenauigkeiten, da die Zonulae adhaerentes nicht vollkommen geradlinig verlaufen sondern leicht gewellt (Baumann, 2004). Deshalb variiert die Lage der Referenzachse in unterschiedlichen Schnittebenen geringfügig um wenige Grad. Dies führt zu einer Datenstreuung und folglich zu einer größeren Standardabweichung. Diese Methode ist trotz dieser leichten Ungenauigkeit vor allem für die Untersuchung von Mutanten wichtig, bei denen die Anordnung der Sehzellen in einem Ommatidium oder die Ausrichtung des gesamten Ommatidiums in der Retina verändert ist. Da dies im Zuge dieser Arbeit geschehen sollte, wurden alle Ommatidien nach diesem Schema ausgewertet.

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm SigmaPlot 11.0 (Systat Software GmbH). Das Signifikanzniveau für die statistische Auswertung lag bei  $P < 0,05$ . Die Datensätze wurden mit dem Shapiro-Wilk Test auf Normalverteilung getestet. Da die Kippwinkel keine Normalverteilung aufwiesen, wurde zum Vergleich von zwei Datensätzen der Mann-Whitney-U-Test verwendet.



## 3. Ergebnisse

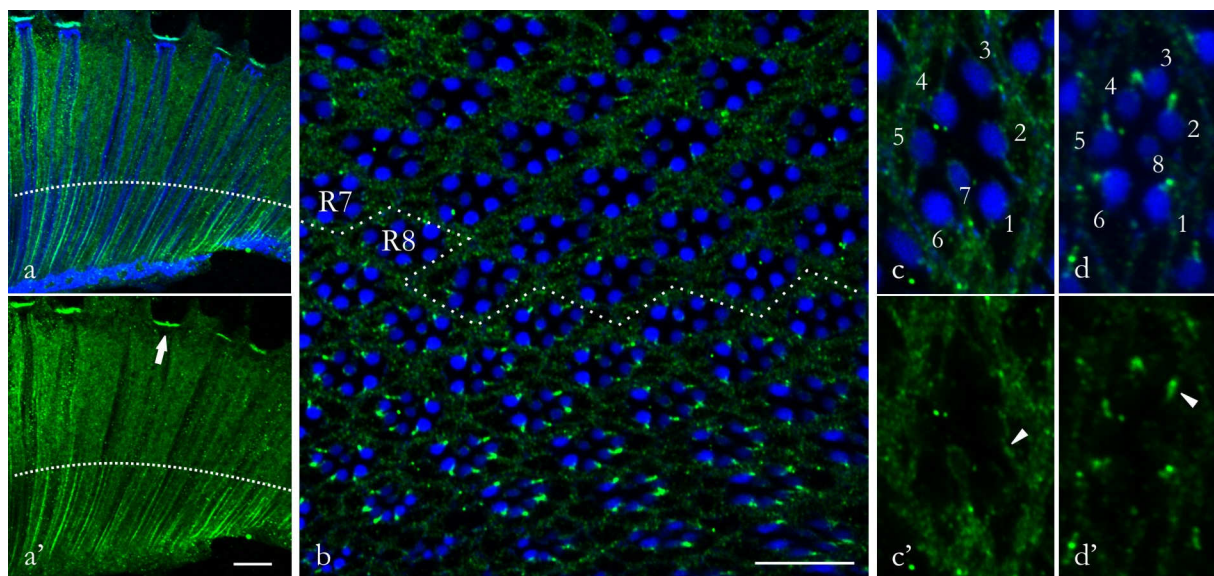
### 3.1 Identifizierung und Charakterisierung der phosphotyrosinierten Proteine an der Stielmembran der äußeren Sehzellen

Die Arbeit von Baumann und Lutz (2006) belegt eine Korrelation zwischen Rhabdomer-Verdrehung und der asymmetrischen Verteilung phosphotyrosinierter Proteine an der Stielmembran. Es stellt sich die Frage nach der molekularen Identität dieser Proteine. Ein erster Ansatz einer biochemischen Charakterisierung durch Immunpräzipitation war allerdings nicht erfolgreich (Führer, 2004). Ursache ist vermutlich die geringe Menge dieser Proteine in der Retina. Durch eine befreundete Arbeitsgruppe (A.K. Satoh, D.F. Ready, Department of Biological Sciences, Purdue University, USA) habe ich jedoch Hinweise erhalten, die möglicherweise zur Identifizierung dieser Proteine führen könnten. A. Satoh hat bei Immunfluoreszenzfärbungen der *Drosophila*-Retina mit Antikörpern gegen die aktivierten (= phosphorylierten) Formen von Rolled (ERK) und Basket (JNK), beides Proteinkinasen vom Typ der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK), ein asymmetrisches Markierungsmuster an der Stielmembran der äußeren Sehzellen erhalten ähnlich der Markierung mit anti-Phosphotyrosin (anti-PY). Mit Einverständnis der Arbeitsgruppe habe ich deshalb überprüft, ob Antikörper gegen diese Proteinkinasen tatsächlich das Markierungsmuster von anti-PY imitieren.

#### 3.1.1 Zwei aktivierte (= phosphorylierte) Proteinkinasen sind asymmetrisch an der Stielmembran verteilt

Abbildung 3.1 zeigt das Markierungsmuster mit dem Antikörper gegen phosphoryliertes ERK (pERK) an Kryostatschnitten von adulten Augen. Die Präparate wurden zudem mit Fluorochrom-gekoppeltem Phalloidin markiert, um die Organisation des Auges sichtbar zu machen und eine Orientierung in den Ommatidien zu ermöglichen. Phalloidin bindet spezifisch an Aktinfilamente, die in den Rhabdomeren der Photorezeptoren hochgradig organisiert vorkommen (Dancker et al., 1975; Arikawa et al., 1990; Wolfrum, 1991). Im Längsschnitt der Ommatidien konnten zwei markant markierte Strukturen identifiziert werden (Abb. 3.1 a). Zum einen war im Bereich der Kristallkegelzellen (Abb. 3.1 a Pfeil) eine intensive Markierung mit anti-pERK zu beobachten. Diese Strukturen dienen vor allem bei der Analyse von Mutanten als Kontrolle (siehe unten). Zum anderen fand sich die Markierung entlang der Rhabdomere der Photorezeptoren. Auffällig war dort der Wechsel der Markierungsintensität auf ca. der Hälfte der Photorezeptorlänge. Es wurde bereits für anti-PY gezeigt, dass dieser Wechsel nahe des

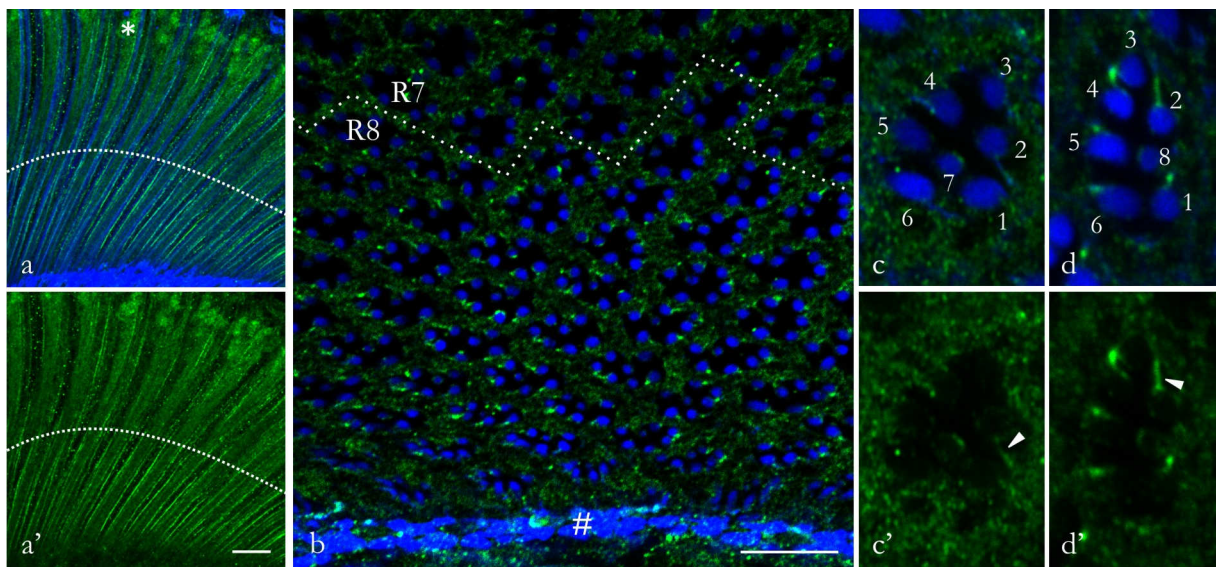
Übergangs von R7 zu R8 stattfindet (Baumann & Lutz, 2006). Schrägschnitte der Retina, die sowohl Ommatidien mit R7 im distalen Bereich als auch Ommatidien mit R8 im proximalen Bereich zeigen, bestätigten, dass auch bei anti-pERK die Änderung der Markierungsintensität am Übergang von R7 zu R8 erfolgte (Abb. 3.1 b). Detailaufnahmen vom distalen und proximalen Bereich der Retina zeigten, dass nur eine Seite der Stielmembran der äußeren Sehzellen mit anti-pERK markiert wurde (Abb. 3.1 c, d). Die Markierung war im distalen Bereich an der Stielmembran sehr schwach und kaum von der Cytoplasmafärbung zu unterscheiden. In manchen Zellen war sie nicht sichtbar. Wenn die Markierung nachgewiesen werden konnte, entsprach das Muster aber dem, welches mit anti-PY erhalten wurde. Im proximalen Bereich war die Markierung an der Stielmembran intensiv. Des Weiteren verdeutlichten diese Detailaufnahmen, dass nicht nur die Intensität am Übergang R7/R8 wechselte, sondern auch die Seite der Stielmembran, die markiert wurde. Während distal die Markierung auf der Seite der Stielmembran lag, die von der R3/R4-Kontaktstelle weg wies, war sie im proximalen Bereich auf der gegenüberliegenden Seite (Abb. 3.1 c', d' Pfeilspitzen). Das Cytoplasma der Zellkörper aller Photorezeptoren wies ebenfalls eine schwache und gleichmäßig verteilte Markierung auf. Gelegentlich wurden auch die Mikrovillispitzen der inneren Sehzellen R7 und R8 markiert.



**Abb. 3.1 Die Markierung mit anti-pERK**

Doppelmarkierung an Gefrierschnitten von *Drosophila* WT-Retina mit anti-pERK (grün) und Phalloidin (blau). **a, a'** Im Längsschnitt ist eine Markierung von pERK an den Kristallkegelzellen (Pfeil) und entlang der Rhabdomere der Photorezeptoren zu erkennen. Etwa auf halber Ommatidienlänge (···) ändert sich die Intensität der Markierung sehr deutlich von distal sehr schwach zu proximal sehr stark. **b** Im Schrägschnitt sind sowohl der distale (R7) als auch der proximale (R8) Bereich der Retina zu sehen. Der Wechsel der Markierungsintensität erfolgt etwa am Übergang von R7 zu R8. **c, c'** Detailaufnahme eines Ommatidiums im distalen Bereich und **d, d'** im proximalen Bereich der Retina. pERK-Immunreaktivität liegt asymmetrisch auf einer Seite der Stielmembran der äußeren Photorezeptoren (1-6). Diese markierte Seite wechselt von distal zu proximal (Pfeilspitzen). Balken = 10 µm.

Ein ähnliches Markierungsmuster konnte auch mit anti-pJNK beobachtet werden (Abb. 3.2). Hier wurde ebenfalls in der adulten Retina im Bereich der Kristallkegelzellen (nicht mit abgebildet) und entlang der Rhabdomere Immunreaktivität detektiert. Zusätzlich fand sich eine schwache Markierung der Zellkerne (Abb. 3.2 a) und des Cytoplasmas. Ebenso wie bei anti-pERK änderte sich die Intensität der Markierung an der Stielmembran mit anti-pJNK auf halber Ommatidienlänge, im Bereich des Übergangs von R7 zu R8 (Abb. 3.2 a, b). Des Weiteren waren im distalen und proximalen Zellabschnitt unterschiedliche Seiten der Stielmembran markiert, und zwar die identischen Seiten der anti-PY sowie der anti-pERK-Markierung (Abb. 3.2 c, d).



**Abb. 3.2 Die Markierung mit anti-pJNK**

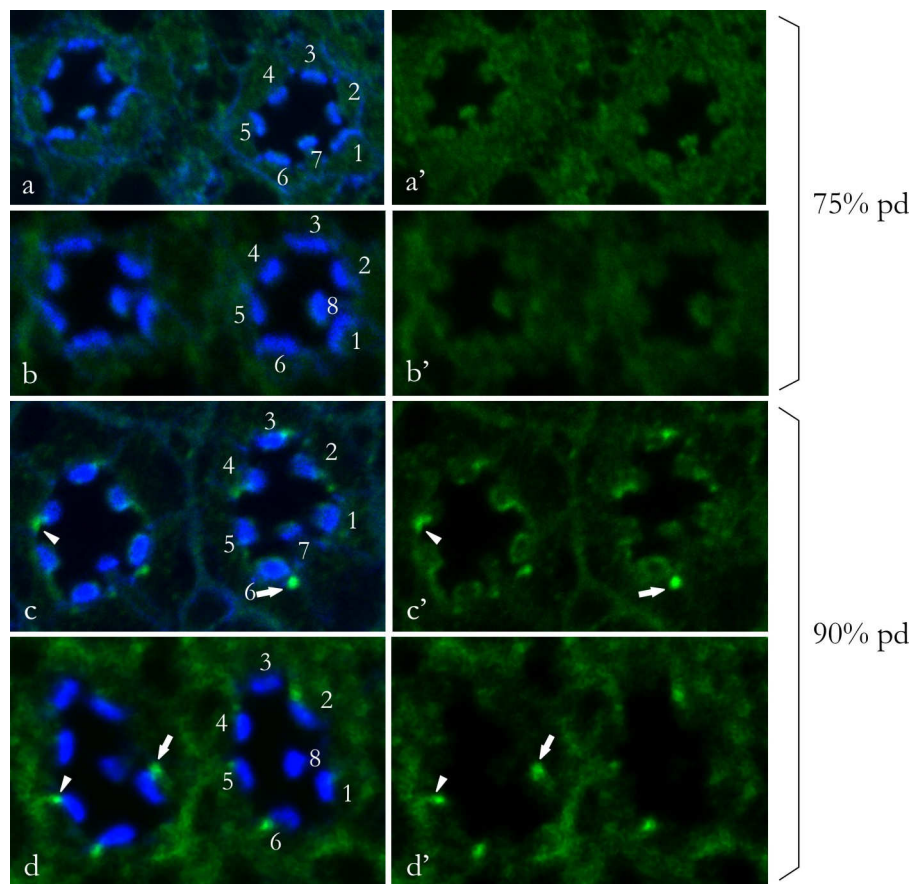
Doppelmarkierung an Gefrierschnitten von *Drosophila* WT-Retina mit anti-pJNK (grün) und Phalloidin (blau). **a, a'** Im Längsschnitt ist eine Markierung für pJNK entlang der Rhabdomere der Photorezeptoren zu erkennen. Etwa auf halber Ommatidienlänge (---) ändert sich die Intensität der Markierung sehr deutlich von distal sehr schwach zu proximal sehr stark. Des Weiteren kann eine Markierung der Zellkerne (\*) beobachtet werden. **b** Im Schrägschnitt sind sowohl der distale (R7) als auch der proximale (R8) Bereich der Retina zu sehen. Der Wechsel der Markierungsintensität erfolgt etwa am Übergang von R7 zu R8. **c, c'** Detailaufnahme eines Ommatidiums im distalen Bereich und **d, d'** im proximalen Bereich der Retina. pJNK-Immunreaktivität findet sich asymmetrisch auf einer Seite der Stielmembran der äußeren Photorezeptoren (1-6). Diese wechselt von distal zu proximal (Pfeilspitzen). # - Basallamina, Balken = 10  $\mu\text{m}$ .

Diese Ergebnisse belegten, dass Antikörper gegen die phosphorylierten Formen beider Proteinkinasen sowie für PY (Baumann & Lutz, 2006) im Bereich der Stielmembran identische Markierungsmuster produzieren. Im Folgenden werde ich mich daher in der Darstellung auf pERK beschränken, auch wenn die Versuche für beide Proteinkinasen durchgeführt wurden. Im Anhang sind die entsprechenden Abbildungen für pJNK zu finden.



### 3.1.2 Zeitliche Entwicklung der asymmetrischen Verteilung von pERK und pJNK

Die Verteilung der aktivierten Proteinkinasen ERK und JNK imitierte die asymmetrische Verteilung von anti-PY an der Stielmembran der äußeren Sehzellen im adulten Komplexauge. Es stellte sich die Frage, ob die asymmetrische Verteilung für diese beiden Proteinkinasen im gleichen Zeitraum wie die für anti-PY etabliert wird. Anti-PY wurde erst kurz vor Schlupf der Fliegen auf einer Seite der Stielmembran detektiert. Deshalb wurden die späten Entwicklungsstadien der Puppe untersucht (Abb. 3.3).

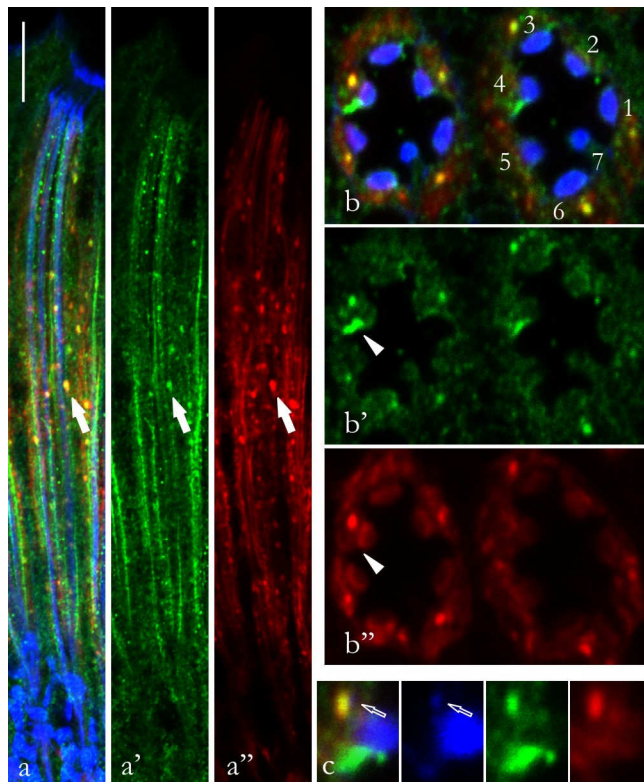


**Abb. 3.3 Zeitliche Entwicklung der Asymmetrie an der Stielmembran**

Doppelmarkierung an Gefrierschnitten von *Drosophila* WT-Retina bei **a, b** 75% pd und bei **c, d** 90% pd mit anti-pERK (grün) und Phalloidin (blau). Während bei 75% pd mit anti-pERK das Cytoplasma sowohl **a'** distal als auch **b'** proximal nur eine schwache Markierung aufweist, kann bei 90% pd **c'** distal und **d'** proximal Immunreaktivität an der Stielmembran detektiert werden (Pfeilspitzen). Des Weiteren sind in diesem Entwicklungsstadium vesikuläre Strukturen im Cytoplasma immunpositiv (Pfeile).

Bei 75% der Puppenentwicklung (pd = *pupal development*) haben die Rhabdomere ihre endgültige Form und Größe noch nicht erreicht. Die Mikrovilli sind noch kurz. So erschienen die Rhabdomere in der Immuncytochemie als schmale Streifen anstatt als annähernd runde Strukturen wie im adulten Tier (Abb. 3.3 a, a'). Sowohl mit anti-pERK als auch mit anti-pJNK (siehe Anhang Abb. 6.1) wurde bei 75% pd im distalen und proximalen Bereich nur eine

schwache und diffuse Markierung des Cytoplasma detektiert (Abb. 3.3 a, b). Hingegen ist bei 90% pd die Morphogenese der Rhabdomere weitgehend abgeschlossen (Cagan & Ready, 1989; Kumar & Ready, 1995). Sie sind in den Fluoreszenzaufnahmen kaum noch von den adulten Strukturen zu unterscheiden. In diesem Entwicklungsstadium war bereits deutlich eine asymmetrische Markierung der Stielmembran zu erkennen (Abb. 3.3 c, d). Diese asymmetrische Markierung konnte distal wie proximal beobachtet werden. Zusätzlich wurden in diesem späteren Entwicklungsstadium vesikuläre Strukturen im Cytoplasma markiert. Dieses Merkmal war auch schon für anti-PY beschrieben worden (Baumann & Lutz, 2006). Die bei 90% pd markierten vesikulären Strukturen waren fast immer in der Nähe der Rhabdomerbasis zu finden und meist mit einem Punkt von F-Aktin assoziiert (Abb. 3.4 c). Ähnliches war für Rhodopsin-enthaltende cytoplasmatische Vesikel berichtet worden (Satoh et al., 2005). Um zu überprüfen, ob es sich bei den mit anti-pERK, anti-pJNK und anti-PY markierten Vesikeln um die gleichen Strukturen handelt, wurden Mehrfachmarkierungen mit einem Antikörper gegen Rhodospin 1 (Rh1), anti-pERK bzw. anti-pJNK sowie Phalloidin durchgeführt. Diese zeigten eine Kolokalisation der aktivierten Proteinkinasen pERK und pJNK mit Rh1 an diesen vesikulären Strukturen (Abb. 3.4 a, b sowie Abb. 6.2). Im Bereich der Stielmembran konnte jedoch keine Rh1-Immunreaktivität detektiert werden (Abb. 3.4 b).



**Abb. 3.4 Die pERK-positiven vesikulären Strukturen kolokalisieren mit Rhodopsin-haltigen Vesikeln**

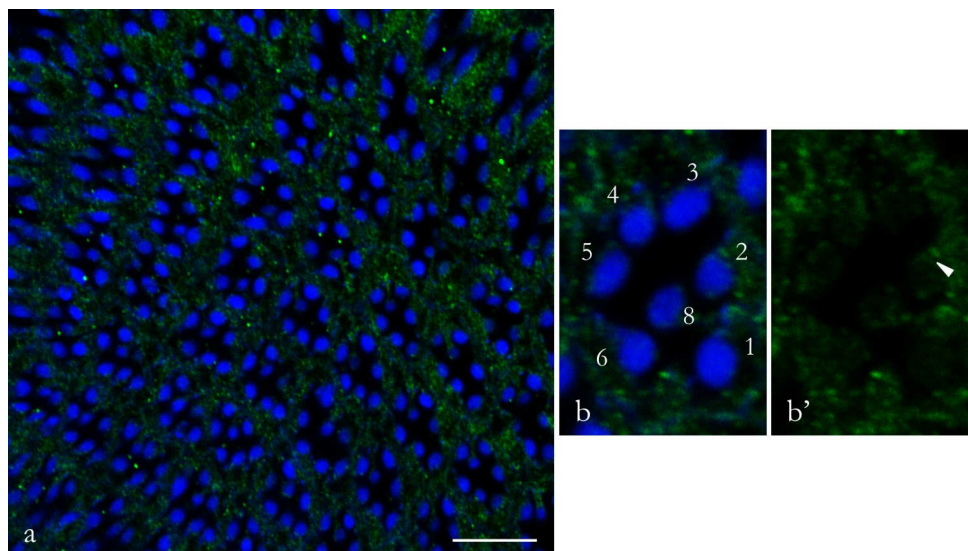
Dreifachmarkierung an Gefrierschnitten von *Drosophila* WT-Retina bei 90% pd mit anti-pERK (grün), anti-Rh1 (rot) und Phalloidin (blau). Da das Epitop für anti-Rh1 bei dieser Fixierung wahrscheinlich durch die kompakte Anordnung der Moleküle in den Rhabdomeren verdeckt ist, kommt es nur zu einer schwachen Markierung der Rhabdomere. **a, a' a''** Die vesikulären Strukturen sind über die gesamte Länge eines Ommatidium verteilt. Sie werden sowohl mit dem Antikörper gegen pERK als auch mit dem Antikörper gegen Rh1 markiert (Pfeil). Deutlich wird dies in der Überlagerung durch die gelb-orange Färbung. **b, b' b''** Im Querschnitt ist zu erkennen, dass die Vesikel meist in der Nähe der Rhabdomerbasis, in der Nähe der Stielmembran zu finden sind. An der Stielmembran selber ist jedoch nur pERK-Immunreaktivität zu detektieren (Pfeilspitze). **c** Die Vesikel sind meist mit einem Punkt F-Aktin assoziiert (offener Pfeil). Balken = 10µm.

Wie Satoh et al. (2005) weiterhin zeigen konnten, entstammen diese Rhodopsin-enthaltenden cytoplasmatischen Vesikel dem Golgi-Apparat (*post-Golgi vesicles*) und transportieren das

Rhodopsin zum Rhabdomer. Die obigen Ergebnisse lassen somit vermuten, dass die aktivierten Proteinkinasen pERK und pJNK mit den gleichen Vesikeln wie Rhodopsin zur Basis des Rhabdomers transportiert werden.

### 3.1.3 Erkennen anti-PY und anti-pERK/anti-pJNK dieselben Proteine?

Die identische räumliche und zeitliche Lokalisation von pERK und pJNK mit anti-PY-immunreaktiven Proteinen implizierte die Frage, ob pERK bzw. pJNK von anti-PY erkannt wurden. Präinkubationsexperimente sollten helfen, diesen Sachverhalt zu klären. Dazu wurden Gefrierschnitte zuerst mit anti-PY inkubiert und anschließend mit pERK bzw. pJNK behandelt. Unter diesen Bedingungen waren an der Stielmembran weder pERK noch pJNK detektierbar (Abb. 3.5 sowie Abb. 6.3). Ebenso war die Markierung mit pERK/pJNK im Bereich der Kristallkegelzellen verschwunden. Unverändert war hingegen die schwache Färbung des Cytoplasmas. Der Antikörper gegen pJNK zeigte eine Färbung in den Zellkernen. Diese ist auch nach der Präinkubation noch zu sehen (Abb. 6.3). Zusammenfassend legten diese Versuche den Schluss nahe, dass pERK und pJNK an der Stielmembran jedoch nicht im Cytoplasma von anti-PY erkannt wurden. Da die schwache Markierung auch nach Präinkubation mit dem Antigen noch detektiert wurde, war sie vermutlich unspezifisch (siehe 2.3.2, Abb. 2.1, S. 11).



**Abb. 3.5 Präinkubation mit anti-PY verhindert Markierung mit anti-pERK an der Stielmembran**  
 Doppelmarkierung an Gefrierschnitten von *Drosophila* WT-Retina mit anti-pERK (grün) und Phalloidin (blau). Gefrierschnitte wurden vor der normalen Antikörperbehandlung mit anti-PY präinkubiert. **a** Im schrägen Anschnitt in der Übersichtsaufnahme ist zu sehen, dass die leichte Hintergrundfärbung im Cytoplasma unverändert ist, während die Markierung an der Stielmembran nicht mehr nachgewiesen werden kann. **b, b'** Detailaufnahmen vom proximalen Bereich eines Ommatidiums. Balken = 10  $\mu\text{m}$ .

### 3.2 Verteilung der Proteinkinasen in einer Mutanten mit reduziertem *rhabdomere twisting*

Die aktivierten Proteinkinasen pERK und pJNK weisen eine asymmetrische Verteilung an der Stielmembran auf, die mit dem Kippverhalten der Mikrovilli korreliert. Es stellt sich die Frage, wie die Verteilung von pERK und pJNK in Mutanten aussieht, von denen bekannt ist, dass die Mikrovillikippung beeinflusst ist. Untersuchungen an *frizzled* ( $fz$ )-Mutanten zeigten, dass in diesen Mutanten die Verdrehung der Rhabdomere ebenso wie die Immunreaktivität mit anti-PY stark reduziert ist (Baumann & Führer, 2003).

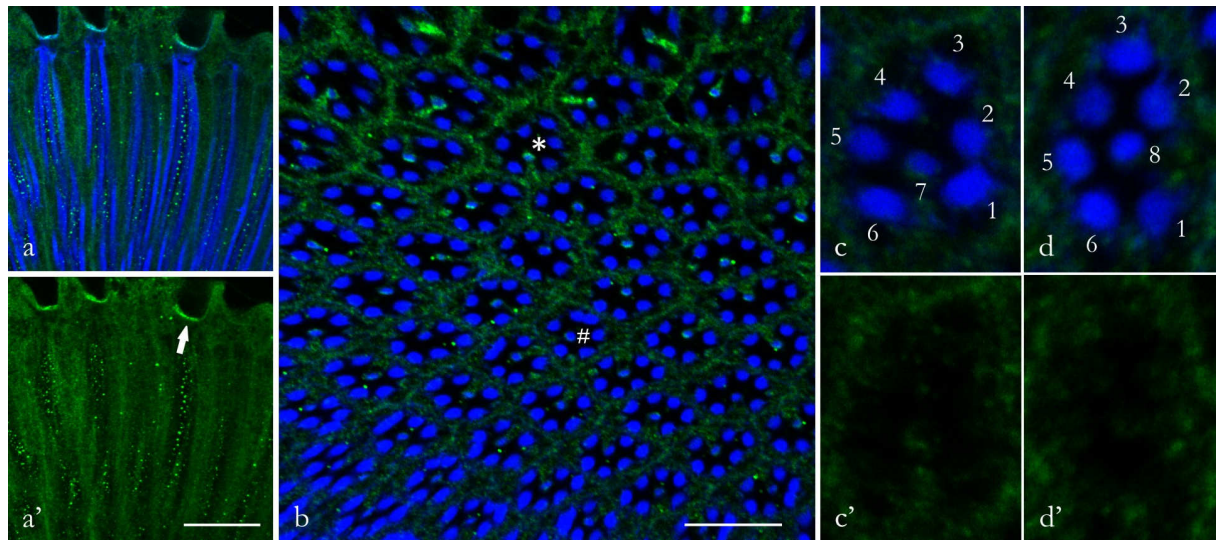
$Fz$  kodiert für einen Rezeptor mit sieben Transmembrandomänen (Vinson et al., 1989). Die Etablierung bzw. Erhaltung der planaren Zellpolarität (*planar cell polarity* =PCP) wird durch den  $fz$ -Signalweg vermittelt (Review: Jenny & Mlodzik, 2006). Als PCP wird die Polarisierung von Zellen in der Ebene des Epithels bezeichnet (Nübler-Jung, 1987). Im Auge von *Drosophila* wird unter anderem das Signal zur Spezifizierung von R3 und R4, welches zur ommatidialen Asymmetrie führt, über den  $fz$ -Rezeptor vermittelt (Vinson & Adler, 1987; Zheng et al., 1995). Bei der Verdrehung der Rhabdomere handelt es sich ebenfalls um eine Form der PCP. Alle Mikrovilli der äußeren Sehzellen eines Ommatidiums kippen in eine definierte Richtung.

Um die Frage zu beantworten, ob die asymmetrische Verteilung von pERK und pJNK in diesen Mutanten ebenfalls beeinflusst ist, wurde die *loss-of-function*-Mutante  $fz^{15}$  analysiert. In dieser Mutante wurde durch eine Punktmutation vorzeitig ein Stop-Codon eingeführt (Jones et al., 1996). In dem für die Untersuchungen verwendeten Stamm lag das Allel nur heterozygot vor. Selten schlüpfen aber auch homozygote Fliegen, erkennbar an den in allen Richtungen angeordneten Haaren auf dem Thorax. Ausschließlich diese homozygoten Fliegen wurden für die Analyse herangezogen. Für diese Mutante wurde bereits beschrieben, dass die Orientierung der Ommatidien gestört ist (Tomlinson et al, 1997).

Die immunocytochemische Untersuchung der Augen dieser Fliegen bestätigte eine Beeinträchtigung in der Organisation der Ommatidien (Abb. 3.6). Zum einen konnte eine unvollständige Rotation bzw. eine Überrotation mancher Ommatidien beobachtet werden. Zum anderen konnte es auch zum Verlust der trapezoidalen Asymmetrie kommen (Abb. 3.6 b). Mit anti-pERK wurde im Bereich der Kristallkegelzellen eine intensive Färbung detektiert. Unbeeinflusst schien auch die Immunreaktivität an den Mikrovillispitzen der inneren Sehzellen R7 und R8. An der Stielmembran konnte jedoch weder distal noch proximal eine Markierung beobachtet werden (Abb. 3.6). Ähnliches galt für anti-pJNK. Während an den Kristallkegelzellen und im Zellkern Immunreaktivität zu erkennen war, konnte sie an der Stielmembran nicht nachgewiesen werden (Abb. siehe Anhang, 6.4).



Die Immunreaktivität mit anti-pERK und anti-pJNK ist in der  $fz$ -Mutante, in der das *rhabdomere twisting* sowie die Markierung mit anti-PY stark reduziert sind, an der Stielmembran nicht mehr nachweisbar.



**Abb. 3.6 Die Markierung mit anti-pERK in  $fz^{15}$ -Augen**

Doppelmarkierung an Gefrierschnitten von *Drosophila fz<sup>15</sup>*-Retina mit anti-pERK (grün) und Phalloidin (blau). **a, a'** Im Längsschnitt ist eine Markierung von pERK an den Kristallkegelzellen (Pfeil) zu erkennen. **b** Im Schrägschnitt ist zu sehen, dass die normale Anordnung der Ommatidien gestört ist. \* - Ommatidium, das nicht vollständig rotiert ist, # - symmetrisches Ommatidium **c, c'** Detailaufnahme eines Ommatidiums im distalen Bereich und **d, d'** im proximalen Bereich der Retina. Im Bereich der Stielmembran der äußeren Photorezeptoren (R1-R6) kann keine pERK-Immunreaktivität detektiert werden. Balken = 10  $\mu$ m.

### 3.3 Analyse der Rhabdomerverdrehung in ERK- und JNK-Mutanten

Die asymmetrische Lokalisation von pERK und pJNK an der Stielmembran der Sehzellen R1-R6 scheint mit der Entwicklung des *rhabdomere twisting* verknüpft zu sein. Zum einen findet sowohl die molekulare als auch die morphogenetische Polarisierung zur gleichen Entwicklungsphase, kurz vor Schlupf der Fliegen statt. Zum anderen spiegelt die molekulare Asymmetrie die morphologische Asymmetrie wieder, d. h. die Rhabdomere kippen immer von der Seite der Stielmembran weg an der die beiden Proteinkinasen in ihrer phosphorylierten Form angereichert sind. Um zu überprüfen, ob ein funktioneller Zusammenhang zwischen asymmetrischer Verteilung von pERK bzw. pJNK und der Ausbildung der Rhabdomerverdrehung besteht, wurden Mutanten mit reduzierter oder erhöhter Kinaseaktivität immunocytochemisch und ultrastrukturell analysiert. Bevor ich auf diese Ergebnisse eingehe, möchte ich eine kurze Einführung zu den beiden Proteinkinasen geben.

In *Drosophila* wird das ERK-Homolog vom *rolled*-Gen kodiert (Biggs & Zipursky, 1992; Biggs et al., 1994). Diese Kinase ist an verschiedenen Prozessen beteiligt, u. a. wurde ihre Bedeutung in



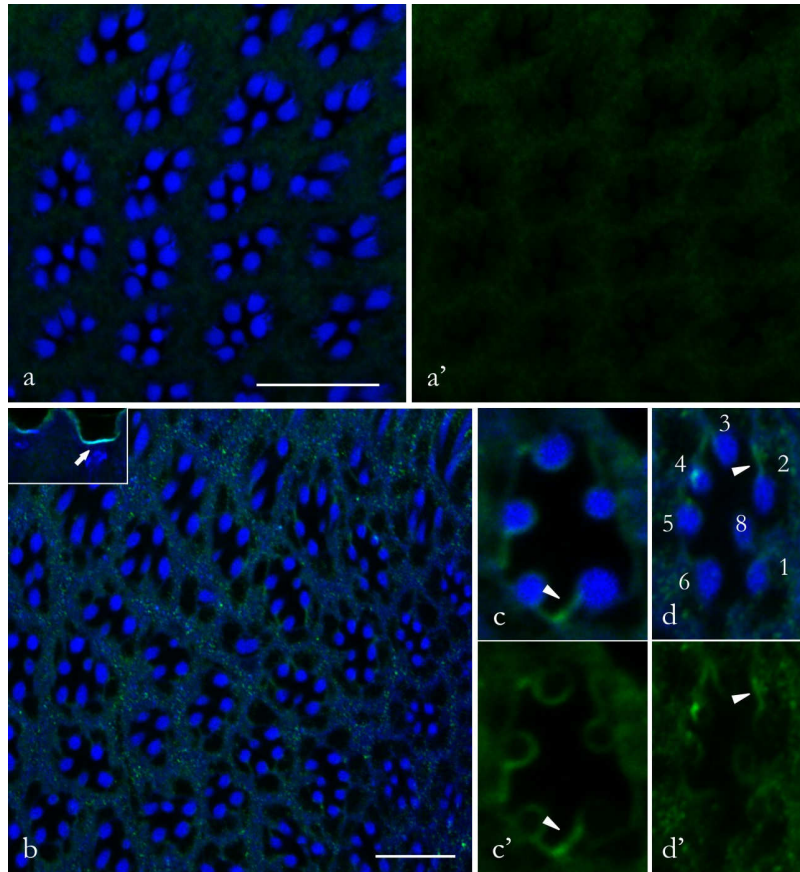
den Signalwegen dreier Rezeptor-Tyrosinkinase (RTK) genetisch untersucht. Diese RTK und damit *rolled* (*rl*) sind an vielfältigen Prozessen beteiligt, u. a. wird die RTK *torso* im Embryo für die Spezifizierung der terminalen Strukturen benötigt (Review: Perrimon, 1993). Der EGF Rezeptor von *Drosophila*, DER, ist wichtig für die Etablierung der dorso-ventralen Polarität des Embryo (Schiipbach, 1987). Im sich entwickelnden Auge ist die Spezifizierung der R7-Sehzellen von der Aktivierung der *sevenless* RTK durch die Nachbarzelle R8 abhängig (Hafen et al., 1987; Krämer et al., 1991).

Die JNK wird in *Drosophila* vom Gen *basket* kodiert (Riesgo-Escovar et al., 1996; Sluss et al., 1996). Diese Proteinkinase ist an der Umsetzung von Entwicklungssignalen wie der Regulierung der epithelialen Morphogenese während des als *dorsal closure* bezeichneten Prozesses oder des Signalweges, der zur Etablierung von planarer Zellpolarität führt, beteiligt (Review: Noselli & Agnes, 1999; Jenny & Mlodzik, 2006). Eine Form der planaren Zellpolarität, die durch die Aktivität der JNK vermittelt wird, ist die ommatidiale Polarität im adulten Auge. Durch die Spezifizierung von R3 und R4 kommt es zur Ausbildung der trapezoidalen Anordnung der Rhabdomere der äußeren Sehzellen R1-R6 (Boutros et al., 1998; Weber et al., 2000). Es ist außerdem gezeigt, dass die JNK an der Regulation der Apoptose (Moreno et al., 2002) und an Stress-bedingten Antworten (Hibi et al., 1993; Dérijard et al., 1994) beteiligt ist.

### 3.3.1 Analyse der ERK-Mutanten

*rl<sup>1</sup>* ist ein hypomorphes Allel, das für ERK mit reduzierter Enzymaktivität kodiert. Hemizygote Fliegen aus Kreuzungen mit der vollständigen *loss-of-function*-Mutante *rl<sup>10a</sup>* wurden für die Analyse verwendet. Für diese Fliegen wurde bereits beschrieben, dass sie rauhe Augen besitzen und der Ommatidienaufbau gestört ist (Brunner et al., 1994; Kumar et al., 2003). Die immunocytochemischen und ultrastrukturellen Untersuchungen der Augen dieser Fliegen bestätigten eine deutliche Beeinträchtigung in der Organisation der Ommatidien (Abb. 3.7). So fanden sich in Querschnitten sehr häufig Ommatidien mit einer geringeren Anzahl an äußeren Photorezeptoren. Oftmals fehlte ihnen auch die Sehzelle R7. Mit anti-pERK konnte in *rl<sup>1</sup>/rl<sup>10a</sup>*-Augen keine Immunfluoreszenz detektiert werden (Abb. 3.7 a, a'). Da pERK im Bereich der Stielmembran auch vom Antikörper gegen Phosphotyrosin erkannt wird, wurden ebenfalls Immunfärbungen mit anti-PY durchgeführt. Es zeigte sich, dass die Markierung mit anti-PY im Bereich der Stielmembran stark reduziert war, während sie im Bereich der Kristallkegelzellen Wildtyp-ähnliche Intensität besaß (Abb. 3.7 b-d). Die Verteilung von pERK zur Stielmembran schien durch die Reduzierung der ERK-Aktivität gestört. Vereinzelt waren auch Ommatidien zu finden, die Anzahl und Anordnung der Photorezeptoren wie im Wildtyp besaßen. Diese zeigten ebenfalls

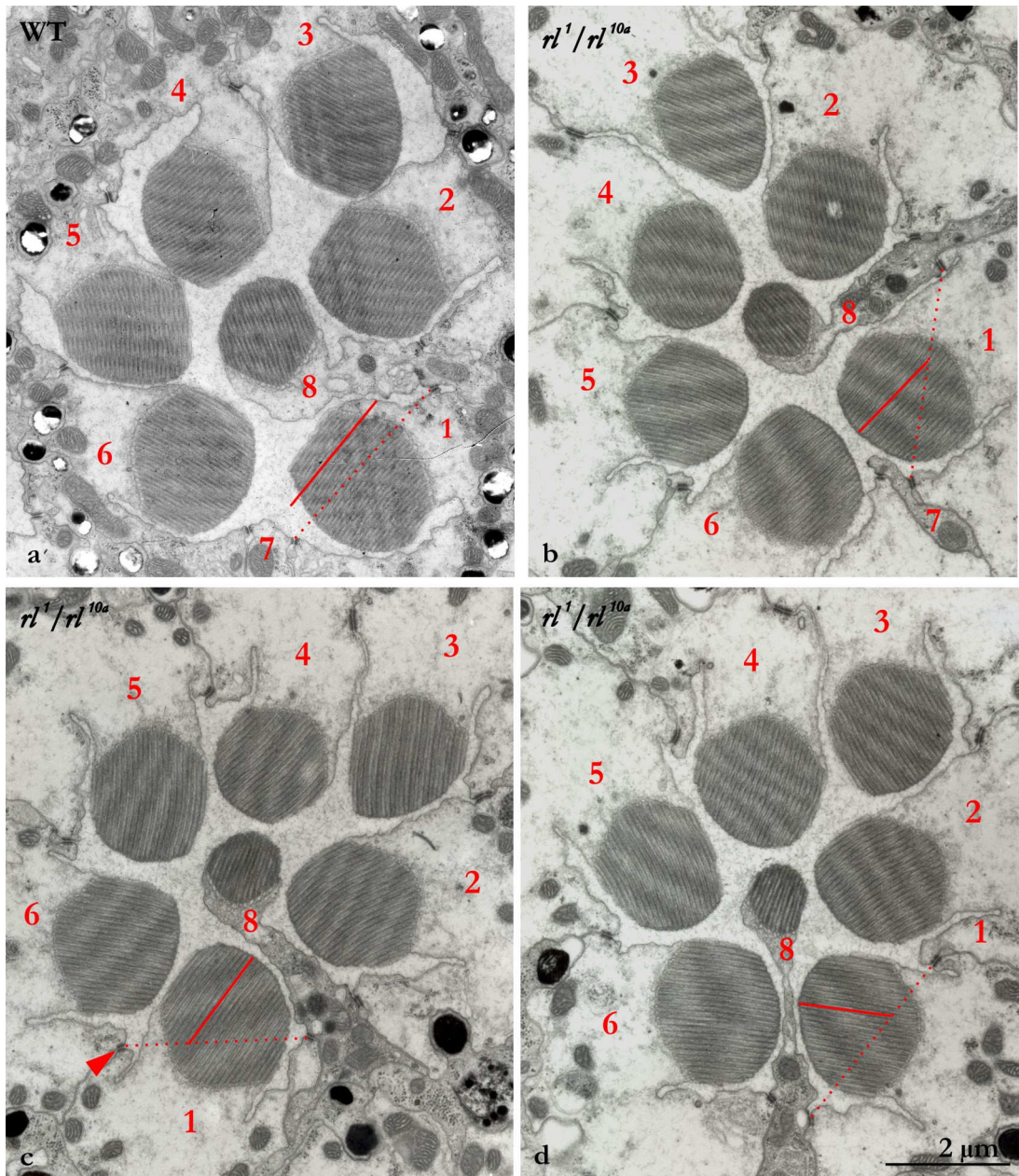
eine reduzierte Markierung mit anti-PY an der Stielmembran. Wenn anti-PY-Markierung detektiert werden konnte, war sie auf der Seite zu finden, die auch im Wildtyp Immunreaktivität aufweist (Abb. 3.7 d).



**Abb. 3.7 Immunfluoreszenz-färbung mit anti-pERK wird in der  $rl^1/rl^{10a}$ -Mutante nicht detektiert**

Doppelmarkierung an Gefrierschnitten von adulten *Drosophila*  $rl^1/rl^{10a}$ -Retina mit **a, a'** anti-pERK (grün) und Phalloidin (blau) bzw. **b-d** mit anti-PY (grün) und Phalloidin (blau). **a, a'** pERK ist immunocytochemisch nicht nachweisbar. **b** Im Schrägschnitt ist eine Übersichtsaufnahme der anti-PY-Markierung zu sehen. Im Bereich der Kristallkegelzellen gibt es eine intensive Markierung (Pfeil, Einsatz). **c, d** Detailaufnahmen des proximalen Retinabereichs. PY-Immunreaktivität ist an der Stielmembran identifizierbar, die Intensität jedoch im Vergleich zum Wildtyp (WT) reduziert (Pfeilspitzen). **d** Ommatidien mit WT-Aussehen weisen ein räumliches Muster der Markierung (wenn detektierbar) wie im WT auf. Balken = 10 µm.

Die ultrastrukturelle Analyse von  $rl^1/rl^{10a}$ -Retinen sollte klären, ob die Reduzierung der Kinaseaktivität einen Einfluss auf das Kippverhalten der Mikrovilli hat. Für die Analyse der Kippwinkel wurden nur Ommatidien mit 6 äußeren Photorezeptoren herangezogen. Auf diese Weise sollte vermieden werden, dass die Auswertung von dem gestörten Ommatidienaufbau und dessen Effekt auf die Verdrehung der Rhabdomere beeinflusst ist. Es ließen sich drei verschiedene Typen von Ommatidien mit 6 äußeren Sehzellen unterscheiden (Abb. 3.8). Zum einen gab es Einzelaugen mit Anzahl und Anordnung der Sehzellen R1-R8 wie im Wildtyp (Abb. 3.8 a, b). Zum anderen gab es die Einzelaugen mit 6 äußeren Sehzellen, aber ohne R7. Diese konnten nach der Position von R8 in zwei Gruppen unterteilt werden. Entweder befand sich R8 wie im Wildtyp zwischen R1 und R2 oder die Sehzelle hatte die Position zwischen R1 und R6 inne, die Position, die normalerweise R7 einnimmt (Abb. 3.8 c, d).

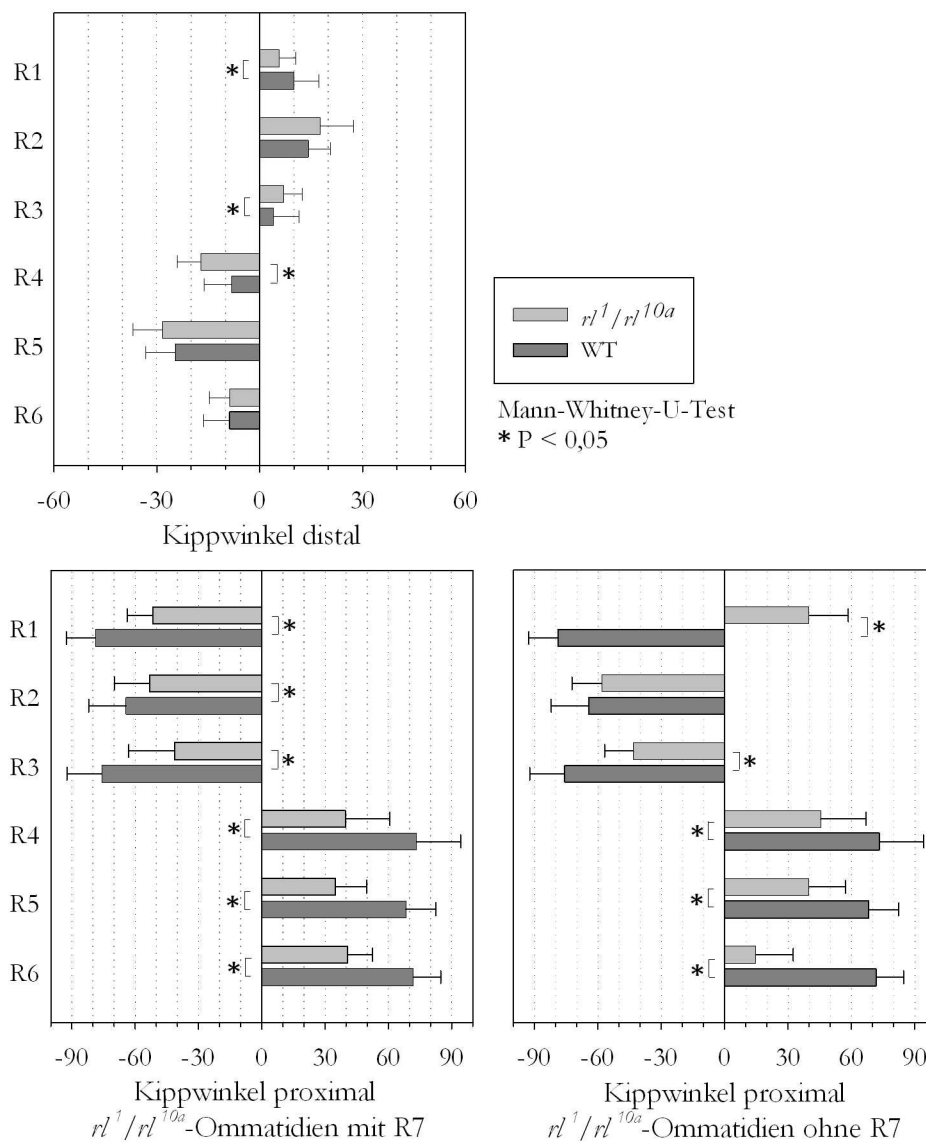


**Abb. 3.8** Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Querschnitten durch den proximalen Bereich eines adulten Wildtyp-Ommatidiums (a) und von  $rl^1/rl^{10a}$ -Ommatidien (b-d)

Beispielhaft ist für die Sehzelle R1 die Bestimmung des Kippwinkels dargestellt. Gekennzeichnet sind die Photorezeptoren, die Referenzachse (▪▪▪) sowie die Mikrovillilängsachse (—). **a** Im Wildtyp kippen die Mikrovilli von R1 sehr stark. Das Rhabdomer von R1 zeigt weg von der R3/R4-Kontaktstelle. **b-d** In der  $rl^1/rl^{10a}$ -Mutante ist die Richtung des Kippwinkels abhängig von der R8-Position. **b** Ommatidien, in denen sich R7 und R8 sich an der gleichen Position wie im WT befinden. R1 kippt wie im Wildtyp weg vom R3/R4-Kontakt. **c** Ommatidien mit fehlender R7 und R8 an Wildtyp-Position zwischen R1 und R2. Die direkte Verbindung der Sehzellen R1 und R6 durch eine Zonula adhaerens belegt das Fehlen von R7 (Pfeilspitze). Die Mikrovilli von R1 zeigen in Richtung R3/R4. **d** Ommatidien ohne R7 und mit R8 an der Position zwischen R1 und R6. R1 kippt weg von der R3/R4-Kontaktstelle. Die Kipprichtung von R2-R5 ist in allen Fällen nicht vom Wildtyp zu unterscheiden. Der Kippwinkel in dieser Mutante ist im Vergleich zum Wildtyp weniger stark ausgeprägt.

Im distalen Bereich der Photorezeptoren war die Kipprichtung der Mikrovilli identisch mit derjenigen im Wildtyp. Der mittlere Kippwinkel aller Mikrovilli lag distal zwischen  $6-28^\circ$  und zeigte somit nur bei der Hälfte der Sehzellen Unterschiede zu den distalen Kippwinkeln der

Mikrovilli von Wildtyp-Sehzellen (5-25°) (Abb. 3.9). Diese Unterschiede waren aber nicht einheitlich. Während in R4 der Kippwinkel in der Mutante größer war als im Wildtyp, war er in R1 kleiner. Im proximalen Bereich erfolgte die Kippung der Mikrovilli von R2-R6 wie im Wildtyp weg von R3/R4. Für R1 war die Kipprichtung jedoch abhängig von der Position, die R8 bei fehlender R7-Sehzelle einnahm. Befand sich R8 an Wildtyp-Position zwischen R1 und R2, kippten die Mikrovilli in Richtung R3/R4. Befand sich R8 jedoch zwischen R1 und R6, zeigte R1 wie im Wildtyp eine Kippung weg von R3/R4 (Abb. 3.8).



**Abb. 3.9 Analyse der Mikrovillikippwinkel in den äußeren Sehzellen adulter Wildtyp- und  $rl^1/rl^{10a}$ -Augen**

Die Daten zeigen die Mittelwerte  $\pm$  SD von Messungen an 121-137 Photorezeptoren (je  $R_n$ ) in sechs Wildtyp-Augen sowie 19-29 Photorezeptoren im distalen Bereich von fünf  $rl^1/rl^{10a}$ -Augen und 31-43 bzw. 20-28 Photorezeptoren im proximalen Bereich von Ommatidien mit bzw. ohne R7 in acht  $rl^1/rl^{10a}$ -Augen. Der Kippwinkel der äußeren Sehzellen unterscheidet sich im distalen Bereich kaum zwischen Wildtyp und Mutante. Im proximalen Bereich ist der Kippwinkel in der  $rl^1/rl^{10a}$ -Mutante signifikant reduziert. In Abhängigkeit von der Anwesenheit von R7 ändert sich die Kipprichtung von R1.



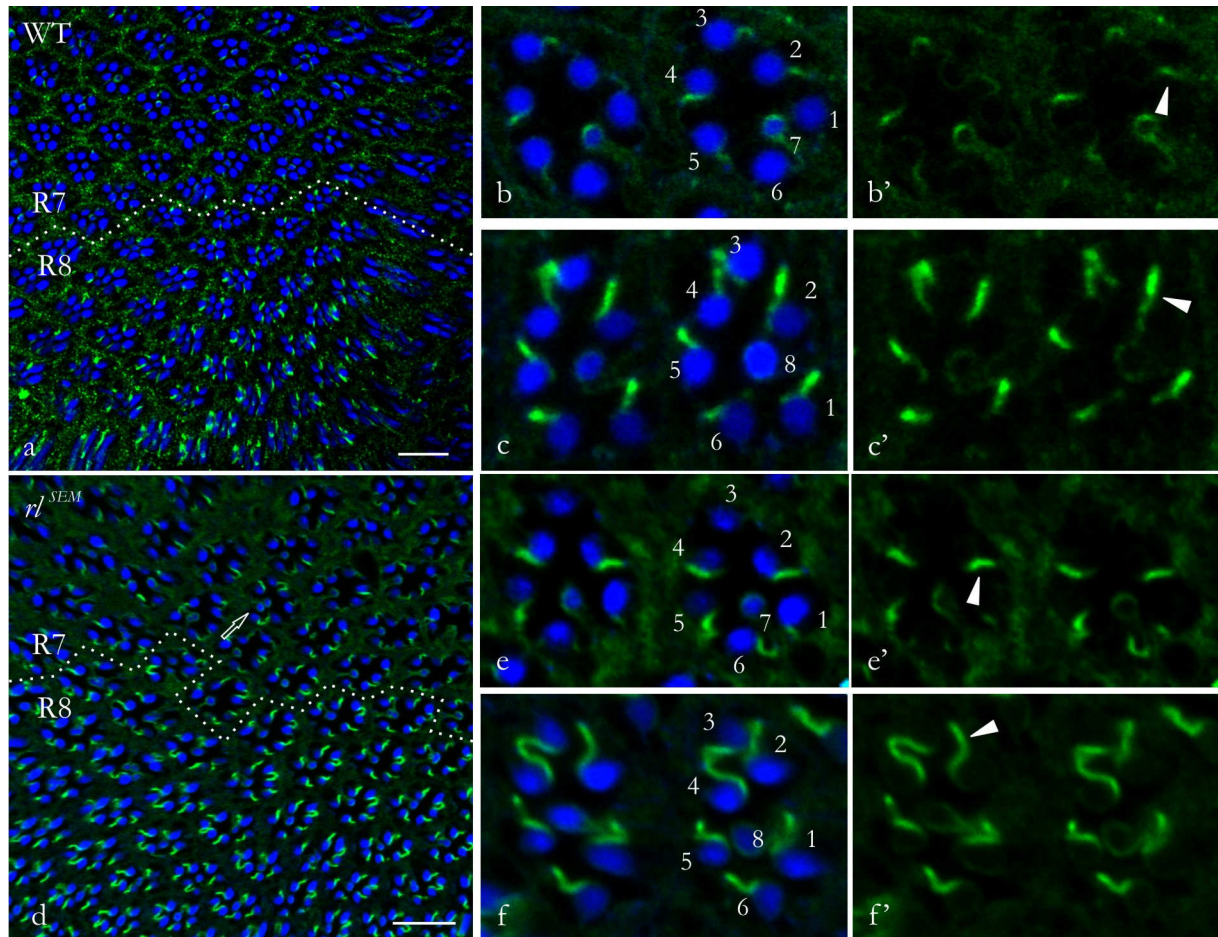
Die quantitative Auswertung für den proximalen Bereich der einzelnen Photorezeptoren in Ommatidien mit und ohne R7 ist in Abbildung 3.9 dargestellt. Für die Einzelaugen ohne R7 wurden ausschließlich die verwendet, in denen R8 sich an seiner Wildtyp-Position zwischen R1 und R2 befand. Von den Ommatidien ohne R7 mit R8 an R7-Position wurden die Kippwinkel der Mikrovilli von R1-R6 nicht bestimmt, da diese nur in sehr geringer Häufigkeit vorkamen. Der mittlere Kippwinkel für alle Mikrovilli im proximalen Bereich betrug im Wildtyp 62-76°. In den Ommatidien mit R7 war dieser hoch signifikant auf 35-53° reduziert, in den Ommatidien ohne R7 auf 15-58°.

In der *gain-of-function*-Mutante  $rl^{SEM}$  ist die Kinaseaktivität durch einen Aminosäureaustausch am C-terminalen Ende der Kinasedomäne XI erhöht (Brunner et al., 1994). Das Enzym kann nach einer Substitution von Asparaginsäure durch Asparagin nicht mehr dephosphoryliert und somit auch nicht deaktiviert werden (Karim & Rubin, 1999). Diese hypermorphe Mutante ist in der Lage, die Differenzierung von R7 auch in der Abwesenheit eines anderen Signals auszulösen, weshalb sie auch als *sevenmaker* (SEM) bezeichnet wird (Basler et al., 1991).

Immuncytochemische Untersuchungen dieser Mutante wurden mit anti-PY durchgeführt, da das Antiserum gegen pERK aufgebraucht war. Neu bestellte Antikörper einer anderen Charge wiesen im Bereich der Stielmembran über die gesamte Länge der Photorezeptoren keine oder nur eine sehr schwache Markierung auf und eigneten sich somit nicht für die Auswertung. Die Markierung mit anti-PY an den Augen adulter Wildtyp-Fliegen zeigte im Bereich der Stielmembran distal eine relativ schwache Immunfluoreszenzfärbung, während sie proximal intensiv ausgeprägt war (Abb. 3.10 a-c). Die Seite der Stielmembran, die markiert wurde, wechselte von distal zu proximal. In der  $rl^{SEM}$ -Mutante fielen zunächst die Ommatidien mit zusätzlichen R7-Sehzellen auf. Diese wurden nicht für die Analyse herangezogen. Die Stielmembran der Ommatidien mit Wildtypaufbau war im distalen Bereich intensiver gefärbt als im Wildtyp, während die Markierung im proximalen Bereich ähnlich intensiv war wie im Wildtyp (Abb. 3.10 d-f). Die Intensitätsänderung auf halber Ommatidienlänge erfolgte graduell. Detailaufnahmen der Mutante zeigten, dass die Markierungsintensität distal ähnlich intensiv wie im proximalen Bereich ist (Abb. 3.10 e, f). Besonders R2, R4 und R5 waren sehr intensiv gefärbt. Das räumliche Muster der anti-PY-Markierung war nicht vom Wildtyp zu unterscheiden.

Die ultrastrukturelle Analyse der Wildtyp-Photorezeptoren zeigte, dass die Mikrovilli im distalen Bereich sehr wenig kippten (Abb. 3.11). Die Mikrovilli einiger Sehzellen waren fast senkrecht zur apikal-basalen Zellachse ausgerichtet. Für die ultrastrukturelle Analyse der  $rl^{SEM}$ -Photorezeptoren wurden wie in der Immuncytochemie ausschließlich Ommatidien herangezogen, die nur eine R7-Sehzelle besaßen. Im Vergleich zum Wildtyp waren die Kippwinkel der Mikrovilli in der Mutante

bei fast allen Sehzellen signifikant größer (Abb. 3.11 und 3.12). Der mittlere Kippwinkel im distalen Bereich betrug beim Wildtyp 5-25° und bei der Mutante 7-39°. Die Photorezeptoren R2, R4 und R5, die in der Immuncytochemie distal besonders intensiv gefärbt waren, zeigten die größten Kippwinkel (Abb. 3.12). Bei der ultrastrukturellen Analyse der *rl<sup>SEM</sup>*-Mutante ist zudem aufgefallen, dass die Stielmembran vergrößert schien (Abb. 3.11). Allerdings wurde die Länge der Stielmembran nicht vermessen und quantitativ ausgewertet.

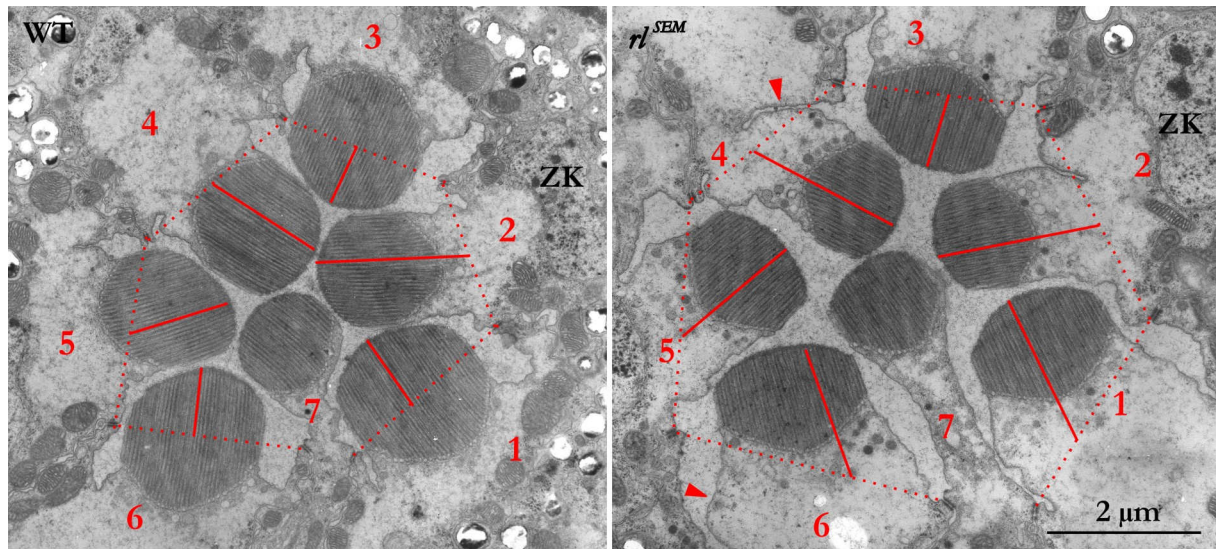


**Abb. 3.10 Die Markierung mit anti-PY in adulten *rl<sup>SEM</sup>*-Augen**

Doppelmarkierung an Gefrierschnitten von adulten *Drosophila* **a-c** WT- und **d-f** *rl<sup>SEM</sup>*-Augen mit anti-PY (grün) und Phalloidin (blau). **a, d** Übersichtsaufnahmen mit Anschnitten von Ommatidien im distalen (R7) und proximalen (R8) Bereich. **a** Im Wildtyp ist eine ziemlich abrupte Änderung der Intensität auf halber Ommatidienlänge (···) zu beobachten, während in der **d** *rl<sup>SEM</sup>*-Mutante die Intensität graduell von distal nach proximal zunimmt. In der Mutante besitzen einige Ommatidien mehrere R7-Photorezeptoren (offener Pfeil). Detailaufnahmen von WT-Ommatidien im **b, b'** distalen und **c, c'** proximalen Bereich der Retina zeigen, dass sich nicht nur die Intensität der Markierung von distal nach proximal ändert, sondern auch die Seite der Stielmembran, die markiert wird (Pfeilspitzen). Detailaufnahmen der *rl<sup>SEM</sup>*-Ommatidien im **e, e'** distalen und **f, f'** proximalen Bereich der Retina zeigen, dass die Intensität der Markierung distal kaum von der proximalen zu unterscheiden ist (Pfeilspitzen). Das räumliche Muster der Markierung ist identisch zum Wildtyp. Balken = 10  $\mu$ m.

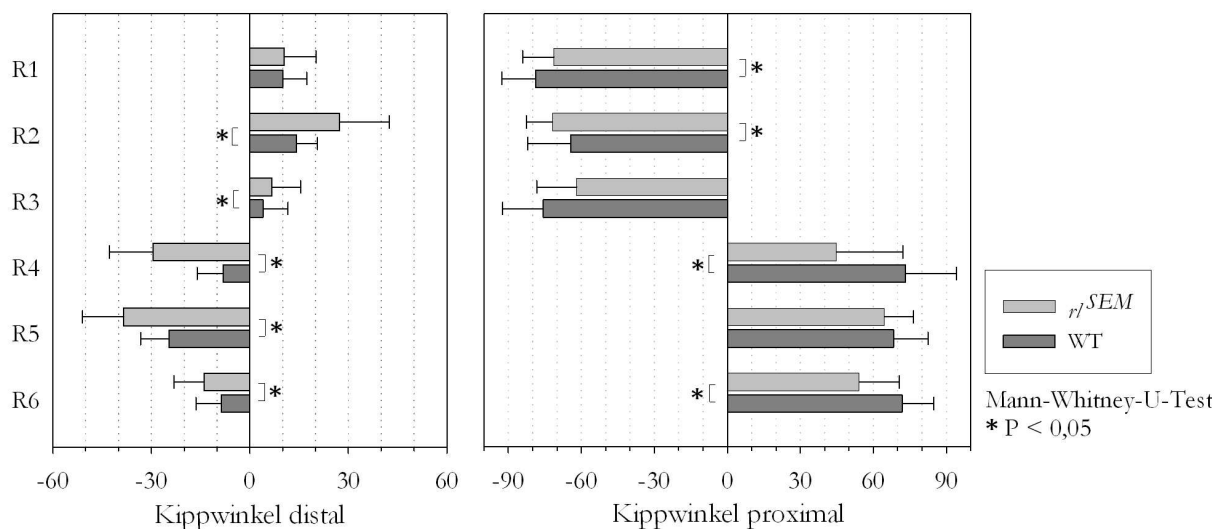
Im proximalen Bereich fielen die Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutante in den meisten Photorezeptoren kleiner aus als im distalen Bereich. So lag der mittlere Kippwinkel zwischen 62-76° im Wildtyp und bei 45-72° in der Mutante. Zudem waren die Effekte in den einzelnen

Sehzellen unterschiedlicher Art. Es konnte z. B. für R3 und R5 kein signifikanter Unterschied festgestellt werden, während R2 einen größeren Kippwinkel in der Mutante aufwies, R4 aber im Wildtyp stärker kippte.



**Abb. 3.11** Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Querschnitten durch den distalen Bereich eines adulten Wildtyp- und  $r1^{SEM}$ -Ommatidiums

Es sind für alle Photorezeptoren die Kippwinkel dargestellt. Gekennzeichnet sind die Photorezeptoren, die Referenzachse (■-■) sowie die Mikrovillilängsachse (—). Im Wildtyp sind die Mikrovilli distal nur sehr leicht gekippt. Im Vergleich dazu sind die Kippwinkel in der  $r1^{SEM}$ -Mutante signifikant stärker ausgeprägt. Zudem scheint die Stielmembran in der Mutante verlängert zu sein (Pfeilspitzen). ZK – Zellkern.

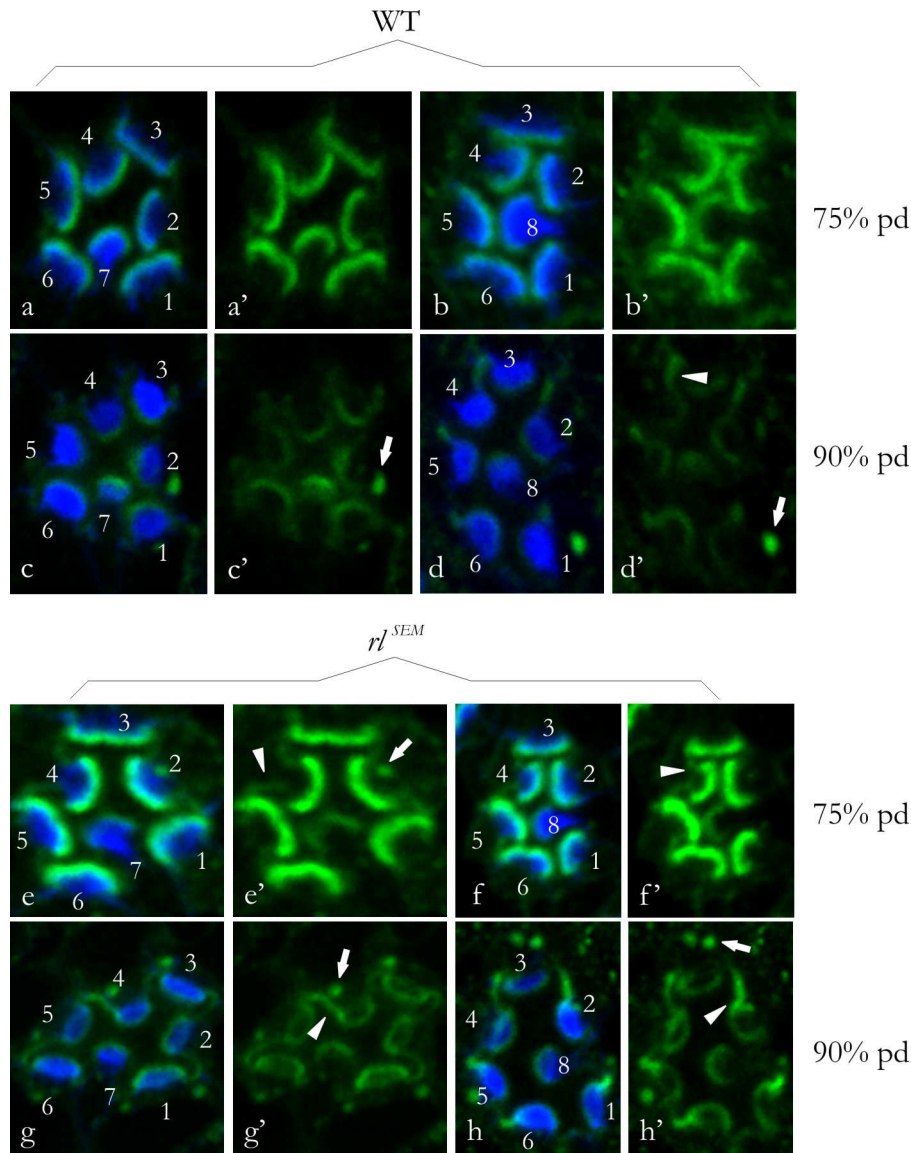


**Abb. 3.12** Analyse der Mikrovillikippwinkel in den äußeren Sehzellen adulter Wildtyp- und  $r1^{SEM}$ -Augen

Die Daten zeigen die Mittelwerte  $\pm$  SD von Messungen an 121-137 Photorezeptoren (je  $R_n$ ) in sechs Wildtyp-Augen und 70-86 Photorezeptoren in fünf  $r1^{SEM}$ -Augen im distalen und proximalen Bereich. Die Kippwinkel der Mikrovilli sind im distalen Bereich in der  $r1^{SEM}$ -Mutante bei fast allen Sehzellen größer als im Wildtyp. Im proximalen Bereich sind die Effekte unterschiedlich. Dementsprechend sind die Kippwinkel in einigen  $r1^{SEM}$ -Sehzellen nicht vom Wildtyp zu unterscheiden (R5), während in anderen der Kippwinkel größer bzw. kleiner ist (R2 bzw. R4).



Im Wildtyp wird pERK erst spät in der Entwicklung an die Stielmembran lokalisiert. Bei einer ständigen Aktivierung von ERK stellt sich die Frage, ob dies möglicherweise zu einer früheren Lokalisation an die Stielmembran und einer zeitigeren Ausbildung des *rhabdomere twisting* führt.



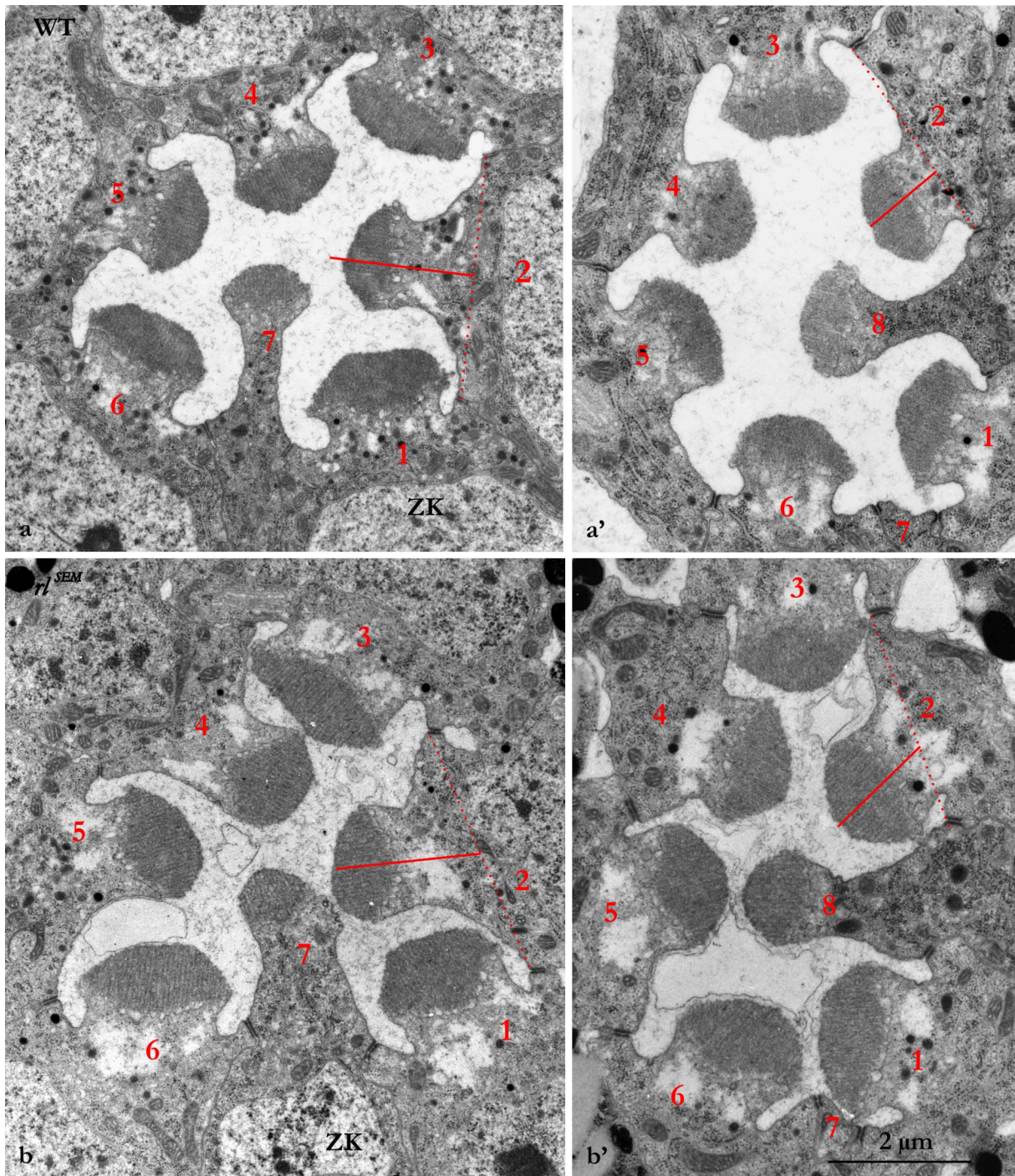
### Abb. 3.13 Zeitliche Entwicklung der Asymmetrie an der Stielmembran in *rl<sup>SEM</sup>*-Augen

Doppelmarkierung an Gefrierschnitten von *Drosophila rl<sup>SEM</sup>*-Augen und WT-Augen bei **a, b, e, f** 75% pd und **c, d, g, h** 90% pd mit anti-PY (grün) und Phalloidin (blau). Um zu gewährleisten, dass die Ergebnisse vergleichbar sind, sind die Aufnahmen bei den gleichen mikroskopischen Einstellungen gemacht worden. Anschließend wurden bei den Bildern in gleicher Weise Kontrast und Intensität bearbeitet. Detailaufnahmen des **a, a'** distalen und **b, b'** proximalen Bereichs in WT-Ommatidien bei 75% pd. Zu diesem Zeitpunkt sind nur die Mikrovilispitzen markiert. Bei **c, d** 90% pd ist eine Markierung der Stielmembran (Pfeilspitze) sowie der vesikulären Strukturen (Pfeil) zu beobachten. Detailaufnahmen der *rl<sup>SEM</sup>*-Mutante im **e, e'** distalen und **f, f'** proximalen Bereich bei 75% pd. Bereits in diesem Entwicklungsstadium ist anti-PY an der Stielmembran nachweisbar (Pfeilspitze). Jedoch ist die Markierung oft schwach und nicht auf eine Seite der Stielmembran beschränkt. Zusätzlich sind die Spitzen der Mikrovilii mit anti-PY markiert. Die für 90% pd charakteristischen vesikulären Strukturen sind in diesem Entwicklungsstadium bereits immunpositiv (Pfeil). Bei 90% pd kann **g** distal und **h** proximal Immunreaktivität an der Stielmembran (Pfeilspitzen) detektiert werden, die im Vergleich zum Wildtyp intensiver ist. Die vesikulären Strukturen sind auch immunpositiv (Pfeil).



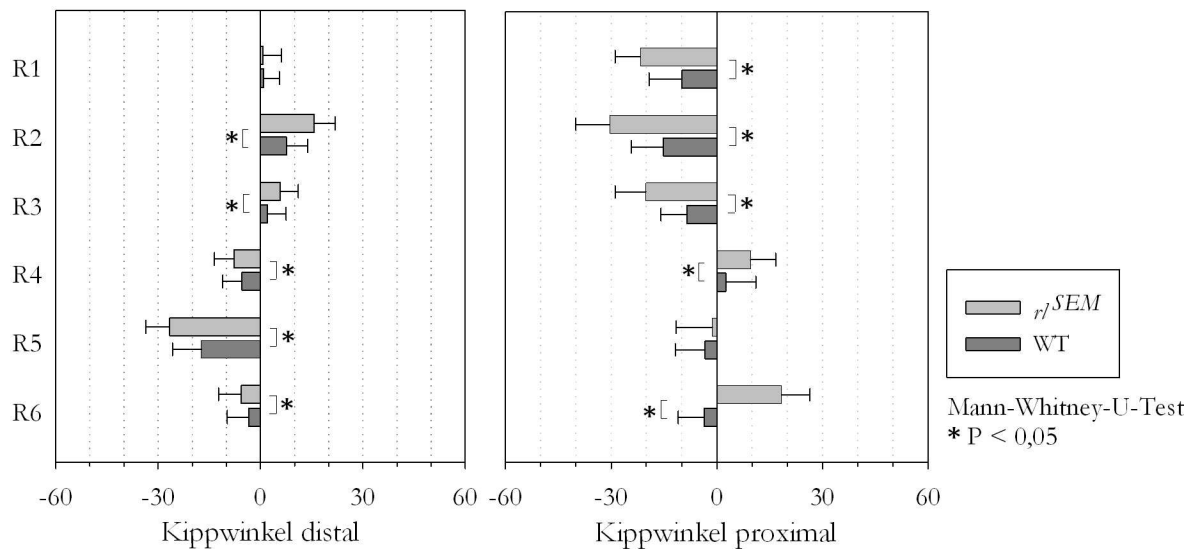
Immunocytochemische Untersuchungen mit anti-PY an Wildtyp-Augen bei 75% pd zeigten, dass ausschließlich die Mikrovillispitzen markiert waren (Abb. 3.13 a, b). Bei 90% pd war diese Markierung hingegen fast vollständig verschwunden. Stattdessen war eine schwache asymmetrische Markierung der Stielmembran zu erkennen. Zusätzliche Immunfluoreszenzfärbung konnte an den für dieses Entwicklungsstadium charakteristischen Vesikeln im Cytoplasma beobachtet werden (Abb. 3.13 c, d). Die Markierung mit anti-PY in der *rl<sup>SEM</sup>*-Mutante zeigte, dass die Immunreaktivität an der Stielmembran zeitlich eher in der pupalen Entwicklung auftrat. Bereits bei 75% pd konnte anti-PY im Bereich der Stielmembran detektiert werden (Abb. 3.13 e, f). Allerdings fand sich die Markierung auf beiden Seiten und war schwach im Vergleich zur intensiven Färbung der Mikrovillispitzen. Oftmals war diejenige Seite der Stielmembran jedoch intensiver gefärbt, die auch später im adulten Tier die Markierung aufwies. Die für 90% pd charakteristische Markierung der Vesikel im Cytoplasma war in der *rl<sup>SEM</sup>*-Mutante bereits bei 75% pd nachweisbar. Es zeigte sich weiterhin, dass die Markierung der Stielmembran bei 90% pd in der Mutante sowohl distal als auch proximal intensiver war als im Wildtyp (Abb. 3.13 c, d, g, h). Im Vergleich dazu ist die Intensität der vesikulären Strukturen in Wildtyp und Mutante nicht zu unterscheiden.

Die ultrastrukturelle Analyse sollte klären, ob eine frühere Lokalisation von pERK an die Stielmembran einen Einfluss auf die Verdrehung der Rhabdomere hat. Problematisch erwies sich die Analyse der Augen bei 75% pd. Die Mikrovilli der Rhabdomere waren zu diesem Zeitpunkt noch sehr kurz und nicht parallel angeordnet sondern aufgefächert. Damit war es nicht möglich, die Mikrovillikippwinkel zu bestimmen, da es keine einheitliche Mikrovillilängsachse gab. Bei 90% pd hingegen waren die Mikrovilli der Rhabdomere parallel angeordnet und ermöglichten eine Auswertung der Kippwinkel. Es zeigte sich, dass die Kippung der Mikrovilli in diesem Entwicklungsstadium im Wildtyp sehr schwach ausgeprägt ist (Abb. 3.14). Oftmals standen die Mikrovilli selbst im proximalen Bereich, der im adulten Auge große Kippwinkel aufweist, noch senkrecht zur apikal-basalen Zellachse. Verglichen mit dem Wildtyp, wies die *rl<sup>SEM</sup>*-Mutante bei 90% pd sowohl distal als auch proximal in fast allen Sehzellen einen signifikant größeren Kippwinkel auf (Abb. 3.14 und 3.15). Im distalen Bereich lag der mittlere Kippwinkel für alle Rhabdomere im Wildtyp zwischen 1-17°. In der *rl<sup>SEM</sup>*-Mutante betrug er 1-27°. Proximal lag der mittlere Kippwinkel aller Rhabdomere im Wildtyp zwischen 3-15° und in der Mutante zwischen 1-30°. Der Kippwinkel war in diesem Entwicklungsstadium im distalen und proximalen Zellbereich in der Mutante größer als im Wildtyp. Mit anderen Worten, die Mikrovilli begannen bei Überaktivierung von ERK eher zu kippen.



**Abb. 3.14** Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Querschnitten durch den distalen (a, b) und proximalen (a', b') Bereich eines WT- (a, a') und eines *rl<sup>SEM</sup>*-Ommatidiums (b, b') bei 90% pd

Die Analyse des Kippwinkels ist beispielhaft für die Sehzelle R2 dargestellt. Gekennzeichnet sind die Photorezeptoren, die Referenzachse (---) sowie die Mikrovillillängsachse (—). **a, a'** Im Wildtyp ist die Kippung der Mikrovilli in diesem Entwicklungsstadium distal und proximal sehr schwach ausgeprägt. **b, b'** In der *rl<sup>SEM</sup>*-Mutante ist sowohl distal als auch proximal eine Kippung der Sehzellen zu erkennen. ZK – Zellkern.



**Abb. 3.15 Analyse der Mikrovillikippwinkel in den äußeren Sehzellen bei 90% pd für Wildtyp- und *r1<sup>SEM</sup>*-Augen**

Die Daten zeigen die Mittelwerte  $\pm$  SD von Messungen an 52-60 Photorezeptoren (je  $R_n$ ) in drei Wildtyp-Augen und 101-117 Photorezeptoren in sechs *r1<sup>SEM</sup>*-Augen im distalen und proximalen Bereich. Es ist ein klarer Unterschied zwischen Wildtyp und Mutante zu erkennen. Der Kippwinkel ist im Wildtyp zu diesem Zeitpunkt in der Entwicklung noch nicht so stark ausgebildet wie bei der *r1<sup>SEM</sup>*-Mutante.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Veränderung der ERK-Aktivität die Verdrehung der Rhabdomere der äußeren Sehzellen R1-R6 beeinflusst. So war die Verteilung von pERK an die Stielmembran bei reduzierter Kinaseaktivität in der *r1<sup>1</sup>/r1<sup>10a</sup>*-Mutante gestört. Der Kippwinkel war im proximalen Bereich reduziert. Bei einer Überaktivierung der Kinase in der *r1<sup>SEM</sup>*-Mutante konnte die phosphorylierte Form während der Entwicklung eher an der Stielmembran nachgewiesen werden. Die Mikrovilli begannen früher zu kippen. In adulten Augen war die Markierungsintensität an der Stielmembran distal erhöht und der Mikrovillikippwinkel war dort in den meisten Sehzellen größer als im Wildtyp.

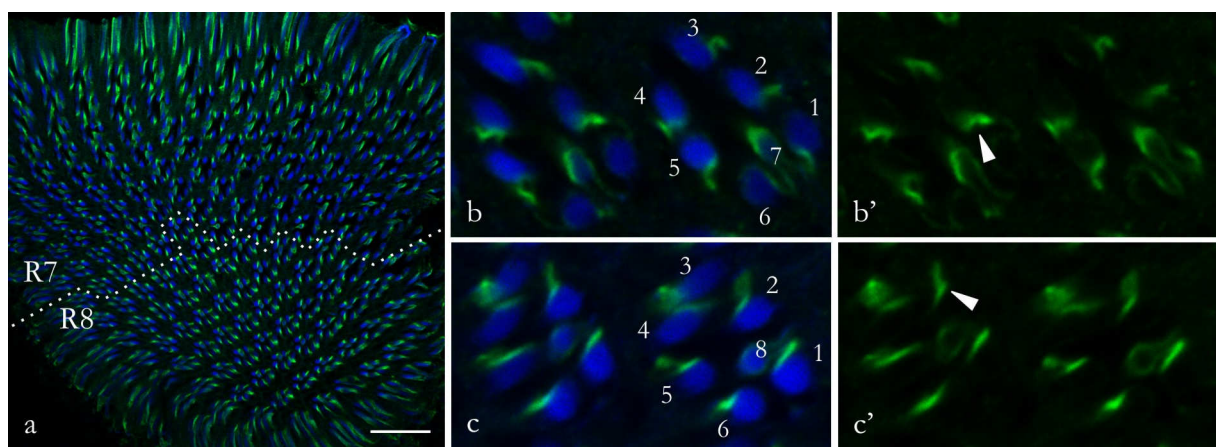
### 3.3.2 Analyse der JNK-Mutanten

Für die Modifizierung der JNK-Aktivität wurden transgene Fliegen verwendet, bei denen mit Hilfe des GAL4-UAS-Systems gewebs- und entwicklungspezifisch die Expression der JNK reguliert wurde. Somit konnte durch die Wahl des Promotors für das Rhodopsin-1 Gen (*GAL4-rh1*) die Aktivität der JNK spezifisch in den Photorezeptoren R1-R6 erhöht bzw. reduziert werden. Rhodopsin-1 wird ab ca. 70% pd exprimiert (Satoh et al., 2005). Damit sollte gewährleistet werden, dass Veränderungen in der Kinaseaktivität keine anderen Vorgänge beeinträchtigen, die eher in der Entwicklung des Auges ablaufen. Zu diesem Zeitpunkt haben die asymmetrische Verteilung der pJNK an die Stielmembran und die Verdrehung der Rhabdomere noch nicht begonnen. Die Treiberlinie *GAL4-rh1* wurde mit den Linien *UAS-bsk.DN*, die für



eine dominant-negative Form der Proteinkinase kodiert (Weber et al., 2000), und *UAS-bsk.A-Y*, die für Wildtyp-Protein kodiert (Adachi-Yamada, 2001.12.13; FBrf0141850), gekreuzt.

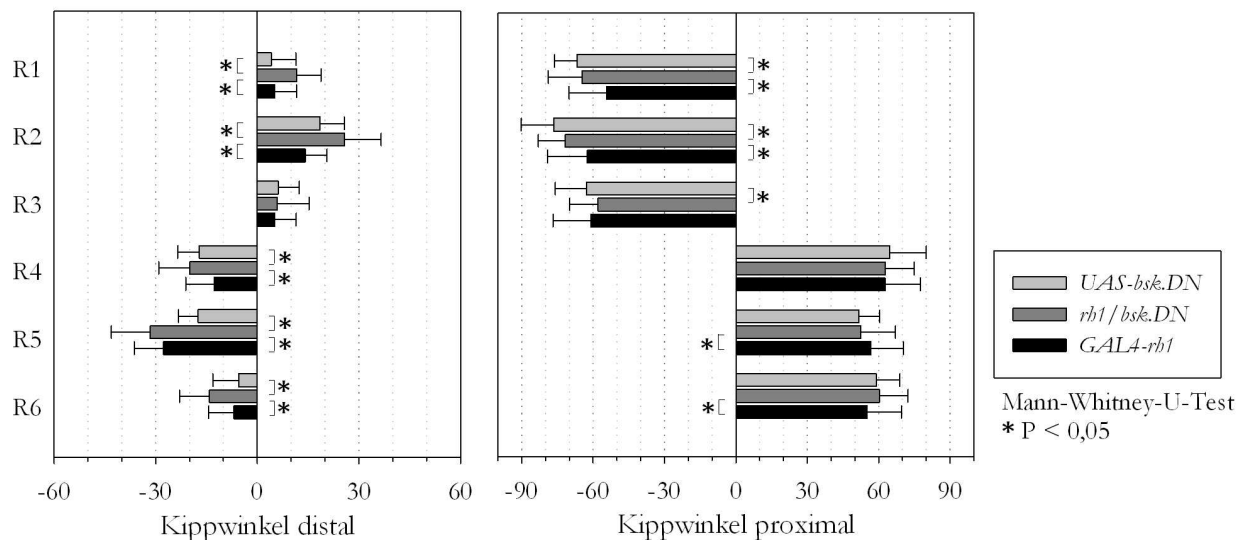
Die Reduzierung der Kinaseaktivität mit Hilfe der dominant negativen Form (*rb1/bsk.DN*) führte in der Immunocytochemie zu einer Markierung der Stielmembran mit anti-PY, deren Intensität im distalen Bereich der Ommatidien kaum vom proximalen Bereich zu unterscheiden war (Abb. 3.16 b, c). Zudem erfolgte die Intensitätsänderung von distal nach proximal graduell (Abb. 3.16 a). Diese Situation unterschied sich demzufolge vom Wildtyp (siehe Abb. 3.10 a-c). Das räumliche Muster der Markierung mit anti-PY war nicht vom Wildtyp zu unterscheiden und wurde nicht durch die reduzierte Kinaseaktivität beeinflusst.



**Abb. 3.16 Die Markierung mit anti-PY in adulten *rb1/bsk.DN*-Augen**

Doppelmarkierung an Gefrierschnitten von adulten *Drosophila rb1/bsk.DN*-Augen mit anti-PY (grün) und Phalloidin (blau). **a** Übersichtsaufnahme mit Anschnitten von Ommatidien im distalen (R7) und proximalen (R8) Bereich. Die Intensitätsänderung der Markierung auf halber Ommatidienlänge (···) erfolgt graduell. Detailaufnahmen von Ommatidien im distalen **b**, **b'** und proximalen **c**, **c'** Bereich der Retina zeigen, dass die Markierungsintensität distal kaum noch von proximal zu unterscheiden ist (Pfeilspitzen). Das räumliche Muster ist hingegen nicht verändert. Balken = 20  $\mu\text{m}$ .

Die ultrastrukturelle Analyse zeigte, dass die *rb1/bsk.DN*-Augen in ihrem ommatidialen Aufbau nicht gestört waren und Wildtyp-Aussehen besaßen. Die Kippwinkel der Mikrovilli von R1-R6 waren distal signifikant größer im Vergleich zu den Kippwinkeln in den Elternlinien (Abb. 3.17). Der mittlere Kippwinkel im distalen Bereich der Rhabdomere betrug in den Elternlinien 5-28° bzw. 4-19° und 6-32° in der Kreuzung. Im proximalen Bereich waren sie hingegen nicht von den Elternlinien zu unterscheiden (Abb. 3.17). Proximal lag der mittlere Kippwinkel aller Mikrovilli in den Elternlinien zwischen 54-63° bzw. 52-77° und in der Kreuzung zwischen 52-72° (Abb. 3.17). Auffällig war, dass in diesen Mutanten besonders R2, R4 und R5 eine intensivere Markierung im distalen Bereich der Stielmembran zeigten und korrelierend damit einen größeren Kippwinkel. Dies war auch schon bei den Untersuchungen der Mutanten mit gesteigerter ERK-Aktivität aufgefallen.

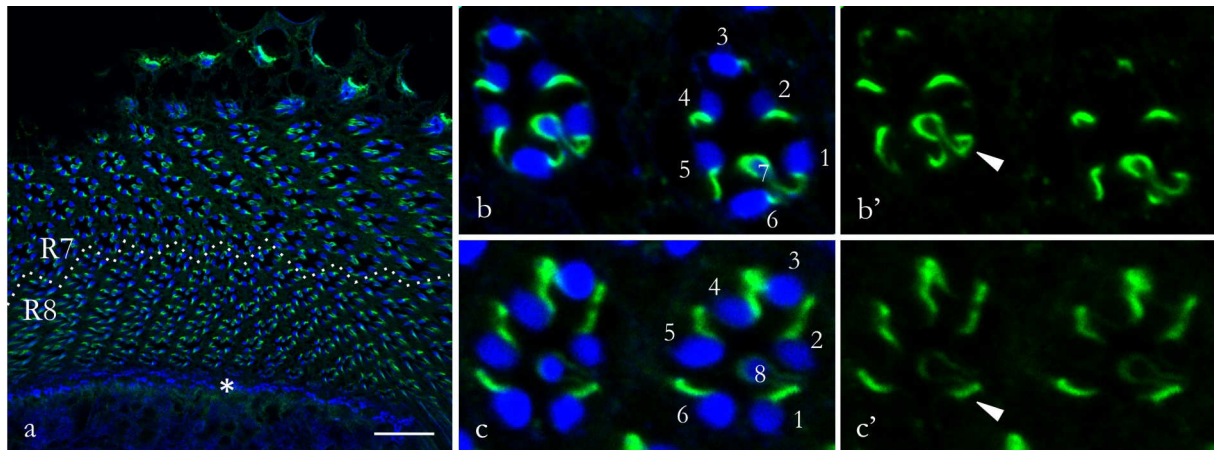


**Abb. 3.17 Analyse der Mikro villikippwinkel in den äußeren Sehzellen der *rh1/bsk.DN*-Kreuzung und den Elternlinien**

Die Daten zeigen die Mittelwerte  $\pm$  SD von Messungen an 112-131 Photorezeptoren (je  $R_n$ ) in sechs *rh1/bsk.DN*-Augen sowie 70-79 Photorezeptoren in vier *UAS-bsk.DN*-Augen und 56-77 Photorezeptoren in fünf *GAL4-rh1*-Augen. Der Kippwinkel im distalen Bereich der Ommatidien ist in der Kreuzung größer als bei den Elternlinien. Die Werte der Kippwinkel im proximalen Bereich liegen für die Kreuzung zwischen denen der Elternlinien.

Diese Ergebnisse wurden durch die Untersuchungen an einer weiteren Kreuzung von *GAL4-rh1* mit *UAS-bsk.K53R* (*rh1/bsk.K53R*), bei der ebenfalls eine dominant-negative Form der JNK exprimiert wird (Adachi-Yamada et al., 1999), unterstützt. Bei dieser Kreuzung erfolgte in der Immunocytochemie die Intensitätsänderung der Markierung mit anti-PY von distal nach proximal ebenfalls graduell (Abb. 6.5 a). Die Markierungsintensität an der Stielmembran war im distalen Bereich erhöht, während das Muster jedoch nicht beeinträchtigt war (Abb. siehe Anhang, 6.5 b, c). Die ultrastrukturelle Analyse der Kippwinkel zeigte, dass die der *rh1/bsk.K53R*-Kreuzung in den meisten Photorezeptoren von denen der *rh1/bsk.DN*-Kreuzung nicht zu unterscheiden waren (Abb. siehe Anhang, 6.6). War in einzelnen Sehzellen doch ein Unterschied zu erkennen, so waren die Kippwinkel der Mikro villi in der *rh1/bsk.K53R*-Kreuzung kleiner als in der *rh1/bsk.DN*-Kreuzung.

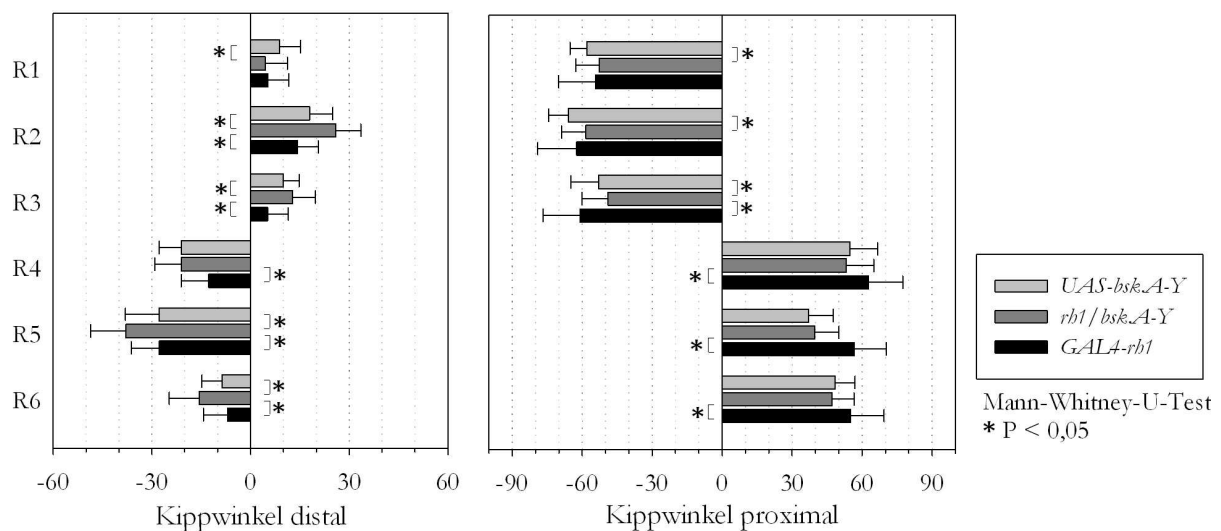
Die Überexprimierung des Wildtyp-Proteins in der Kreuzung *rh1/bsk.A-Y* führte in der Immunocytochemie zu ähnlichen Effekten wie die Reduzierung der Kinaseaktivität. Die Markierung mit anti-PY an der Stielmembran war distal wie proximal sehr stark ausgeprägt (Abb. 3.18 b, c). Es war kaum ein Unterschied in der Markierungsintensität am Übergang von R7 zu R8 zu erkennen (Abb. 3.18 a). Das räumliche Markierungsmuster an der Stielmembran war bei Überaktivierung der JNK unverändert und nicht vom Wildtyp zu unterscheiden. Auch die Intensität der Markierung an den Kristallkegelzellen war nicht vom Wildtyp zu unterscheiden.



**Abb. 3.18 Die Markierung mit anti-PY in adulten *rh1/bsk.A-Y*-Augen**

Doppelmarkierung an Gefrierschnitten von adulten *Drosophila rh1/bsk.A-Y*-Augen mit anti-PY (grün) und Phalloidin (blau). **a** Übersichtsaufnahme mit Anschnitten von Ommatidien im distalen (R7) und proximalen (R8) Bereich. Die Intensitätsänderung der Markierung auf halber Ommatidienlänge (···) erfolgt nicht abrupt, sondern scheint vielmehr von distal nach proximal in einander überzugehen. Detailaufnahmen von Ommatidien im distalen **b, b'** und proximalen **c, c'** Bereich der Retina zeigen, dass die Markierungsintensität distal kaum von proximal zu unterscheiden ist (Pfeilspitzen). Das räumliche Muster der Markierung ist hingegen unverändert. \* - Basallamina. Balken = 20  $\mu$ m.

Die ultrastrukturelle Analyse offenbarte, dass diese Fliegen normal aufgebaute Ommatidien besaßen, die von ihrer Anordnung her nicht vom Wildtyp zu unterscheiden waren. Die Kippwinkel waren entsprechend den Ergebnissen in der Immunocytochemie distal stark ausgeprägt (Abb. 3.19). Demzufolge betrug der mittlere Kippwinkel im distalen Bereich der Rhabdomere in den Elternlinien 5-28° bzw. 8-28° und 5-38° in der Kreuzung.



**Abb. 3.19 Analyse der Mikrovillikippwinkel in den äußeren Sehzellen der *rh1/bsk.A-Y*-Kreuzung und den Elternlinien**

Die Daten zeigen die Mittelwerte  $\pm$  SD von Messungen an 87-94 Photorezeptoren (je  $R_n$ ) in fünf *rh1/bsk.A-Y*-Augen im distalen Bereich und 117-120 Photorezeptoren in sechs *rh1/bsk.A-Y*-Augen im proximalen Bereich sowie 47-57 Photorezeptoren in drei *UAS-bsk.A-Y*-Augen und 56-77 Photorezeptoren in fünf *GAL4-rh1*-Augen. Der Kippwinkel ist in der Kreuzung distal größer als bei den Elternlinien. Im proximalen Bereich zeigt die Kreuzung eine Tendenz zu kleineren Kippwinkel als die Elternlinien.

Im proximalen Bereich zeigte die Kreuzung eine Tendenz zu kleineren Kippwinkeln in Bezug auf die Elternlinien. Proximal lag der mittlere Kippwinkel aller Rhabdomere in den Elternlinien zwischen 54-63° bzw. 37-66° und in der Kreuzung zwischen 40-58°. Diese Tendenz war jedoch oft nicht signifikant verschieden zwischen Kreuzung und Elternlinien (Abb. 3.19).

Für die Experimente, bei denen die JNK-Aktivität reduziert bzw. erhöht wurde, lässt sich zusammenfassend sagen, dass sie zu ähnlichen Ergebnissen führten. Distal war die Markierungsintensität sowohl bei Reduzierung als auch bei Erhöhung der Kinaseaktivität intensiv. Korrelierend damit konnte im distalen Bereich der Photorezeptoren eine geringfügig stärkere Kippung der Mikrovilli beobachtet werden. Proximal gab es hingegen keinen deutlichen Unterschied zwischen Elternlinien und Kreuzungen.

### **3.4 Der Einfluss der inneren Sehzellen auf das *rhabdomere twisting* von R1-R6**

In dem Bereich, wo das Rhabdomer von R7 endet und das Rhabdomer von R8 beginnt, findet die Rhabdomerverdrehung statt (Smola & Tschardtke, 1979). Weiterhin konnte auch für die Markierung mit anti-PY, anti-pERK und anti-pJNK eine Änderung der Intensität und des Musters an diesem Übergang beobachtet werden (Baumann & Lutz, 2006; vorliegende Arbeit). Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass der Übergang von R7 und R8 eine besondere Rolle bei der Entwicklung des *rhabdomere twisting* spielen könnte.

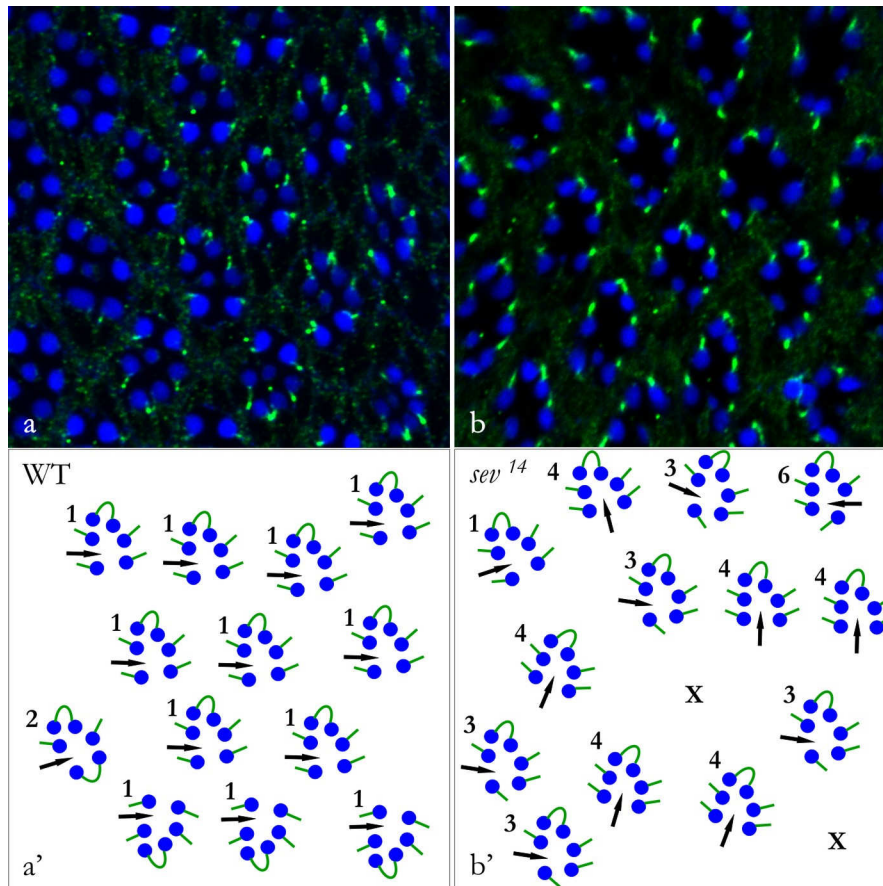
#### **3.4.1 Analyse von Ommatidien ohne R7**

Führer (2004) untersuchte die Bedeutung der kleinen Sehzelle R7 für die Verdrehung der Rhabdomere an R7-losen Mutanten. In der *sevenless*-Mutante (*sev*) verloren die Rhabdomere der äußeren Sehzellen R1-R6 im distalen Bereich oftmals ihre trapezoidale Anordnung. Proximal waren im Querschnitt meist sieben Rhabdomere zu sehen, wobei die Position der Sehzelle R8 variabel war. So waren Ommatidien mit R8 an seiner Wildtyp-Position zwischen R1 und R2, aber auch zwischen R1 und R6 bzw. zwischen R5 und R6 zu finden. In der Immunocytochemie wies die Markierung mit anti-PY in dieser Mutante wie im Wildtyp an der Kontaktstelle R7/R8 eine Zunahme der Intensität von distal nach proximal auf. Durch den Verlust der Asymmetrie ließ sich das räumliche Muster der Markierung im distalen Bereich der Retina nicht auswerten. Bei der Analyse des räumlichen Musters im proximalen Bereich zeigte sich jedoch ein Unterschied zum Wildtyp. In Abhängigkeit von der R8-Position änderte sich das Muster. In den zu R8 benachbarten äußeren Sehzellen war die anti-PY-Markierung fast immer auf der R8 abgewandten Seite lokalisiert. Ultrastrukturell zeigten die Rhabdomere übereinstimmend mit den in der

Lichtmikroskopie gewonnenen Daten im distalen Bereich einen geringen Kippwinkel. Die Kipprichtung konnte aber aus oben genannten Gründen nicht ausgewertet werden. Proximal fiel auf, dass sich die Kippung der Rhabdomere vom Wildtyp unterschied. Dementsprechend erfolgte die Kippung der zu R8 benachbarten Sehzellen in Richtung R8, abhängig von ihrer Position im Ommatidium. Mit Hilfe der *sina*<sup>2</sup>/*sina*<sup>3</sup>-Mutante wurden die in der Immunocytochemie an *sev* erhobenen Daten überprüft (Führer, 2004). Auch hier war distal keine Auswertung möglich, da durch das Fehlen von R7 die Asymmetrie des Ommatidiums aufgehoben wurde. Proximal war die Intensität der anti-PY-Markierung mit der im Wildtyp vergleichbar. Das räumliche Markierungsmuster änderte sich ebenso wie in der *sev*-Mutante in Abhängigkeit von der R8-Position.

Im Zuge dieser Arbeit wurde die räumliche Verteilung für anti-pERK und anti-pJNK an der *sev*-Mutante bestimmt. *Sev* gehört zu den Rezeptor-Tyrosinkinasen (Hafen et al., 1987; Basler & Hafen, 1988; Bowtell et al., 1988) und kontrolliert die Entwicklung von R7 in jedem Ommatidium (Harris et al., 1976; Tomlinson et al., 1987; Review: Nagaraj & Banerjee, 2004). Wie oben beschrieben fehlen der *sev*<sup>14</sup>-Mutante die R7-Photorezeptoren und es kam dadurch distal häufig zu einem Verlust der ommatidialen Asymmetrie. Da die Markierungsintensität mit anti-pERK und anti-pJNK im distalen Bereich nur sehr schwach ausgeprägt war, wurde auf eine Auswertung der Markierung verzichtet. Im Bereich des Übergangs von R7 zu R8 konnte eine Intensitätszunahme der Markierung beobachtet werden. Durch die Anwesenheit von R8 war proximal oftmals eine genaue Zuordnung der äußeren Sehzellen möglich, was eine Untersuchung des proximalen Bereichs hinsichtlich des räumlichen Markierungsmusters gestattete. Es zeigte sich, dass wie bei der Markierung mit anti-PY auch bei anti-pERK und anti-pJNK eine Abhängigkeit des Musters von der Position der Sehzelle R8 bestand (Abb. 3.20 und siehe Anhang, 6.7). So konnte das Wildtyp-Markierungsmuster nur ganz vereinzelt beobachtet werden (Tab. 3.1 Muster 1). Stattdessen wies die Markierung der zu R8 benachbarten Sehzellen in den meisten Fällen von R8 weg unabhängig von deren Position im Ommatidium (Tab. 3.1, Muster 2-7). Die mit anti-pERK und anti-pJNK erhaltenen räumlichen Markierungsmuster waren vergleichbar mit denen von anti-PY.





**Abb. 3.20 Das räumliche Markierungsmuster von pERK in der *sev<sup>14</sup>*-Mutante**

Doppelmarkierung an Gefrierschnitten von adulten **a** *Drosophila* Wildtyp und **b** *sev<sup>14</sup>*-Augen mit anti-pERK (grün) und Phalloidin (blau). Darunter sind die entsprechenden Schemata **a'**, **b'** abgebildet. Der schwarze Pfeil indiziert die Position von R8. Die blauen Kreise entsprechen den Rhabdomeren von R1-R6 während die grünen Striche die Seite der Stielmembran mit pERK-Markierung darstellen. Die Ziffern beziehen sich auf das räumliche Markierungsmuster. Alle aufgetretenen Markierungsmuster sind in Tabelle 3.1 dargestellt. X sind Ommatidien mit weniger als 7 Photorezeptoren im Querschnitt oder einem anderen Markierungsmuster.

**Tab.3.1 Die verschiedenen Markierungsmuster mit pERK und pJNK in *sev<sup>14</sup>*-Mutanten**

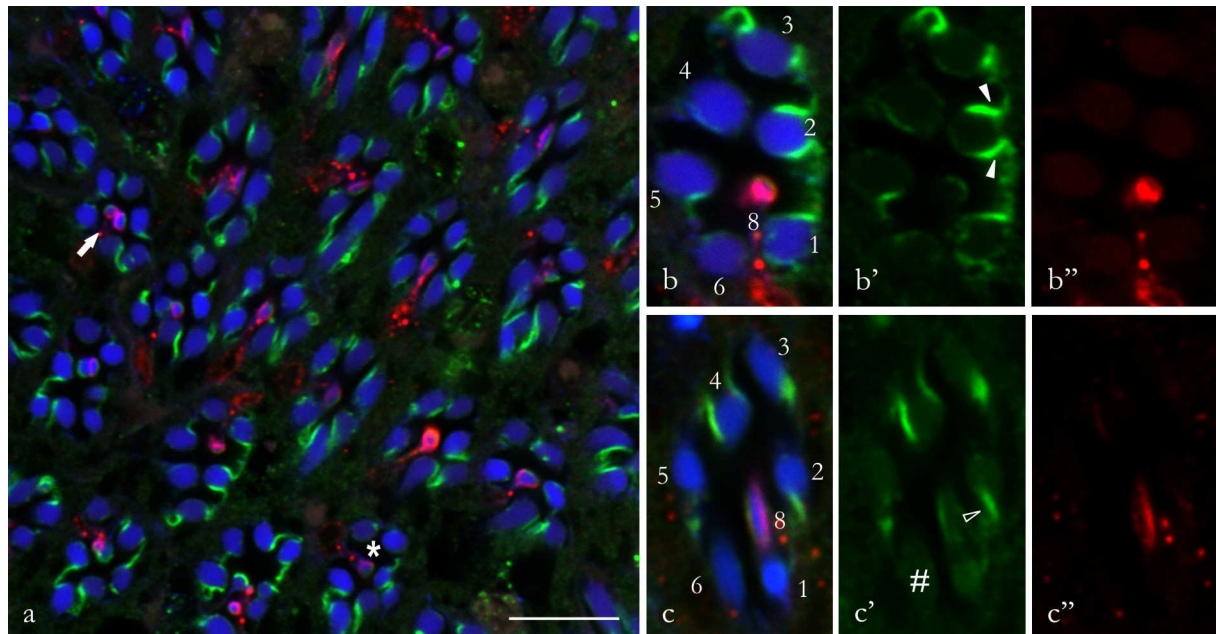
Morphologie und Markierungsmuster	1	2	3	4	5	6	7	X andere Morphologie oder anderes Markierungsmuster	n
WT pERK	96,5	2,5	0	0	0	0	0	1,0	200
WT pJNK	96,6	1,7	0	0	0	0	0	1,7	118
<i>sev<sup>14</sup></i> pERK	5,4	7,3	14,9	36,7	2,5	1,4	0,6	31,2	518
<i>sev<sup>14</sup></i> pJNK	0	8,6	10,7	50,3	0	0,7	0	29,7	187

### 3.4.2 Analyse von Ommatidien ohne R8

Die Versuche mit *sev* haben gezeigt, dass das Fehlen von R7 weder die Intensität noch das räumliche Muster der Markierung mit anti-pERK bzw. anti-pJNK beeinflusst. Hingegen hatte die Position von R8 im Ommatidium einen Einfluss auf das räumliche Muster der zu ihr benachbarten Sehzellen R1 und R6. Führer (2004) hatte bereits gezeigt, dass auch mit anti-PY das Markierungsmuster abhängig von der R8-Position ist. Ultrastrukturelle Analysen zeigten, dass die Mikrovilli von R1 und R6 entsprechend ihre Kipprichtung änderten. Es stellte sich folglich die Frage, welchen Einfluss das Fehlen von R8 auf die Verdrehung der Rhabdomere hat. Da R8 für die Spezifizierung der anderen Sehzellen benötigt wird (Cagan & Ready, 1989), ist es schwierig Mutanten herzustellen, denen die Sehzelle R8 fehlt, die aber trotzdem alle äußeren Sehzellen und R7 besitzen. Eine Möglichkeit besteht darin, die Funktion des Transkriptionsfaktors *Senseless* (*sens*) augen- und entwicklungspezifisch zu reduzieren. *Sens* wird im Auge während der gesamten Entwicklung von R8 exprimiert. Es können zwei Phasen der Regulierung unterschieden werden (Cook et al., 2003; Domingos et al., 2004; Frankfort et al., 2001, 2004). Während der R8-Spezifizierung wird *sens* durch *atonal* aktiviert. Später ist die Expression von *sens* von der Spalt-Genfamilie abhängig. Durch die Kreuzung der *GALA-GMR*-Treiberlinie mit einer *sens-RNAi*-Linie (*GMR/sens-RNAi*) wurde gewährleistet, dass die Aktivität von *sens* in der Entwicklung erst dann reduziert wurde, wenn die anderen Photorezeptoren bereits rekrutiert waren. Überprüft wurde dies durch eine Kontrollkreuzung der *GALA-GMR*-Treiberlinie mit einem *UAS-GFP*-Konstrukt.

Es zeigte sich in der Immunocytochemie, dass der ommatidiale Aufbau der *GMR/sens-RNAi*-Augen vom Wildtyp verschieden war. Die R8-Sehzelle, durch die Rh6-Markierung identifizierbar, war in verschiedenen Positionen zu finden. Entweder befand sie sich zwischen R1 und R2 wie im Wildtyp oder aber zwischen R1 und R6 (Abb. 3.21 b, c). In einigen Ommatidien waren zudem mehrere kleine Sehzellen zu finden bzw. die Anzahl der äußeren Photorezeptoren konnte ebenfalls erhöht sein. Zudem gab es einige Ommatidien, die nicht vollständig oder zu weit rotiert waren (Abb. 3.21 a). Die Markierung mit anti-PY war verschieden vom Wildtyp. An mehreren Sehzellen eines Ommatidiums waren beide Seiten der Stielmembran mit gleicher Intensität markiert oder gar keine Seite. War nur eine Seite immunpositiv, konnte es sowohl die Seite sein, die im Wildtyp Markierung aufwies, aber auch die entgegengesetzte Seite (Abb. 3.21 b, c). Die Mikrovillispitzen der inneren Sehzellen wurden gelegentlich mit anti-PY gefärbt. Die Markierungsintensität war proximal nur etwas intensiver als distal.

Anhand der ausgewerteten Schnitte war es schwierig eine Regelmäßigkeit bei der Markierung zu erkennen. So waren die verschiedenen Möglichkeiten des räumlichen Markierungsmusters variabel auf alle Sehzellen verteilt.



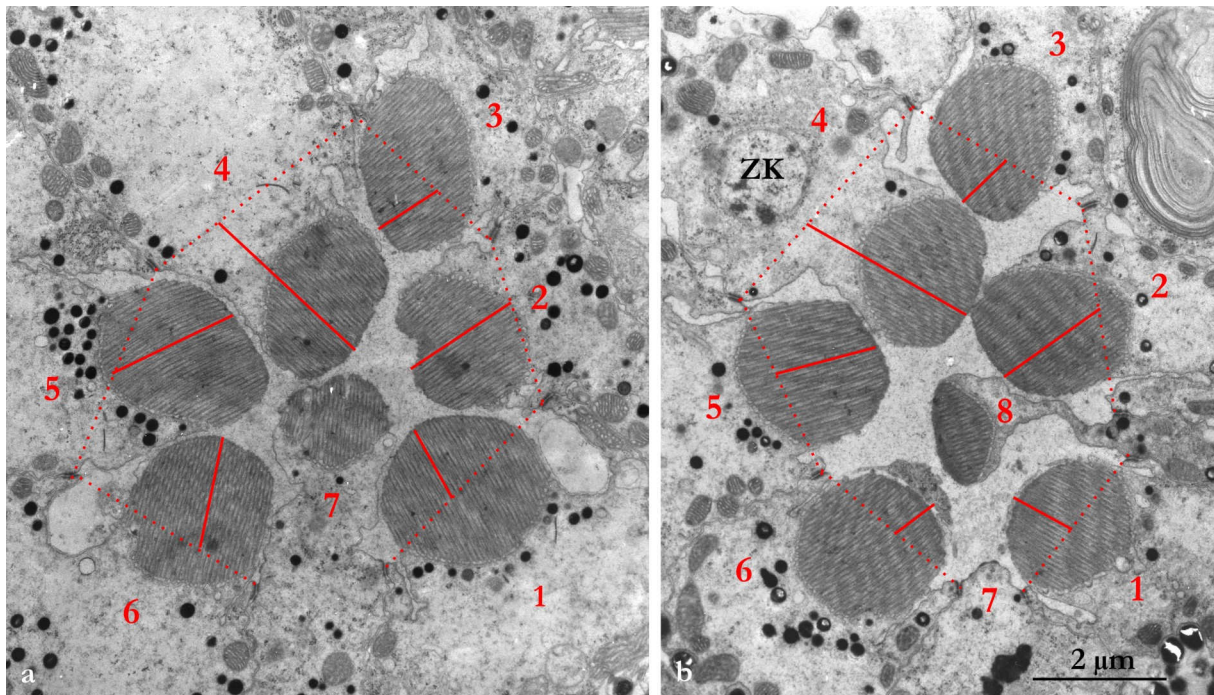
**Abb. 3.21 Die Markierung mit anti-PY in *GMR/sens-RNAi*-Augen**

Dreifachmarkierung an Gefrierschnitten von *Drosophila GMR/sens-RNAi*-Retina mit anti-PY (grün), anti-Rhodopsin 6 (rot) und Phalloidin (blau). **a** Die Übersichtsaufnahme der proximalen Retina zeigt, dass die regelmäßige Anordnung der Ommatidien gestört ist. Zum einen kann die Rotation der Ommatidien beeinträchtigt sein. Zum anderen kann die Anzahl der äußeren Photorezeptoren (\*) oder der zentralen Sehzellen (Pfeil) erhöht sein. Detailaufnahmen eines Ommatidiums im proximalen Bereich der Retina mit **b, b', b''** R8 an R7-Position zwischen R1 und R6 und **c, c', c''** an WT-Position zwischen R1 und R2. Unabhängig von der R8-Position ist die Immunreaktivität mit anti-PY in beiden Ommatidientypen auf beiden Seiten (Pfeilspitzen), auf einer Seite (offene Pfeilspitze) oder auf gar keiner Seite der Stielmembran zu finden. Balken = 10  $\mu\text{m}$ .

Die ultrastrukturelle Analyse der *GMR/sens-RNAi*-Augen bestätigte, dass der Aufbau der Retina stark gestört war. Die Ommatidien zeigten ein willkürliches Rotationsverhalten. Es war aber auch die Organisation in den Ommatidien beeinträchtigt. Dementsprechend fanden sich Ommatidien mit einer erhöhten Anzahl von inneren Sehzellen. Es gab aber auch einige Ommatidien, bei denen die Anzahl der äußeren Sehzellen verändert war. Für die Analyse der Kippwinkel wurden ausschließlich Ommatidien verwendet, die eine normale Anzahl und Anordnung von Sehzellen hatten. Diese kamen sehr selten vor. Eine quantitative Auswertung dieser Mutante war somit nicht möglich. Qualitativ zeigte sich jedoch, dass die reduzierte Aktivität von *Sens* das Kippverhalten der äußeren Sehzellen beeinflusste (Abb. 3.22). Zum einen war besonders auffällig, dass die Kippwinkel im proximalen Retinabereich stark reduziert waren. Zum anderen schien es so zu sein, dass einige der Photorezeptoren ihre Kipprichtung von distal nach proximal nicht änderten (Abb. 3.22 z.B. R2 und R3). Um dies aber mit Sicherheit festzustellen, wären



Serienschnitte notwendig, die an dieser Kreuzung nicht durchgeführt wurden. Es ließ sich jedoch sagen, dass einige der Sehzellen eine vom Wildtyp verschiedene Kipprichtung aufwiesen.



**Abb. 3.22 Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Querschnitten durch den distalen (a) und proximalen (b) Bereich eines *GMR/sens-RNAi*-Ommatidiums**

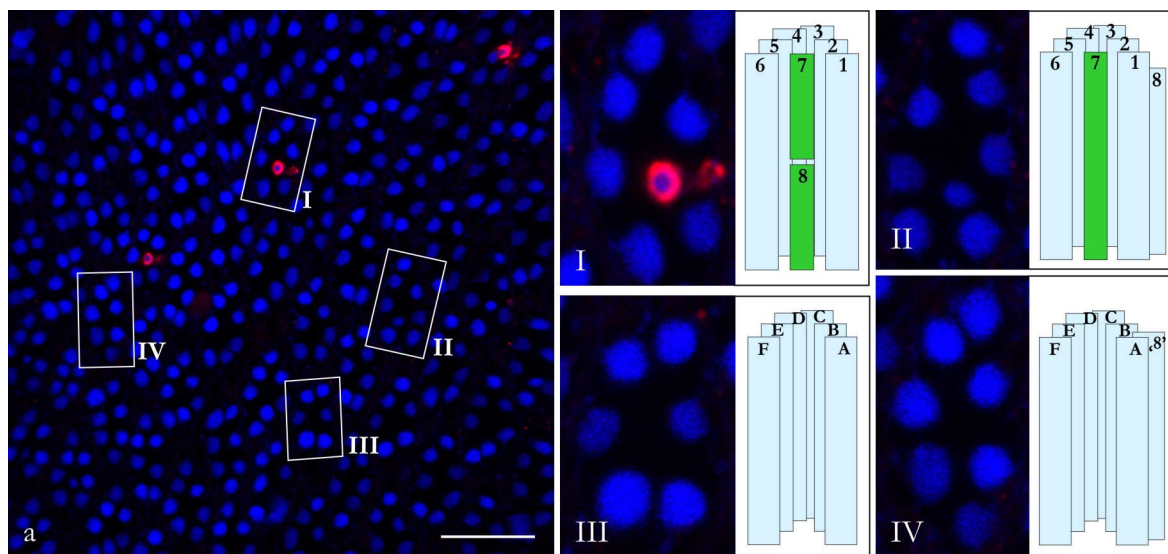
Beispielhaft sind die Kippwinkel der Photorezeptoren von Ommatidien mit Anzahl und Anordnung der Photorezeptoren wie im Wildtyp dargestellt. Gekennzeichnet sind die Photorezeptoren, die Referenzachse (■ ■ ■) sowie die Mikrovillillängsachse (—). **a** Im distalen Bereich der Retina weisen die Sehzellen einen kleinen Kippwinkel auf. Die Sehzelle R2 kippt weg von der R3/R4-Kontaktstelle, was einen Unterschied zum Wildtyp darstellt. **b** Im proximalen Bereich der Retina sind die Unterschiede zum Wildtyp deutlicher. Die Kippwinkel sind sehr klein (vergleichbar mit denen im distalen Bereich) und einige der Sehzellen scheinen ihre Kipprichtung nicht zu ändern (z. B. R2 und R3).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es mit der *GMR/sens-RNAi*-Kreuzung nicht möglich war, Ommatidien ohne R8 herzustellen. Die Ergebnisse an dieser Kreuzung gaben jedoch Hinweise, dass eine funktionell intakte R8-Sehzelle für die Ausbildung des *rhabdomere twisting* benötigt wird.

Es wurde deshalb versucht, durch die Expression von *seven-up* (*svp*) nach der Induzierung von R1-R6 aber vor der Rekrutierung von R7 in den R8-Vorläuferzellen unter der Kontrolle von *scab-GAL4* (*scab/svp*), Ommatidien ohne R8 zu erzeugen. Diesen Ommatidien fehlt dann allerdings auch die Sehzelle R7 (Hiromi et al., 1993; Kramer et al., 1995; Chou et al., 1999). *Svp* kodiert für zwei Orphan-Kernrezeptoren, die sich in ihrer Liganden-Bindungsdomäne unterscheiden (Mlodzik et al., 1990). *Svp* wird für die Spezifizierung von R3 und R4 sowie R1 und R6 benötigt. Die gezielte Missexpression von *svp* in verschiedenen Vorläuferzellen des Ommatidiums kann zum späten Verlust der R8-Identität führen (Kramer et al., 1995). *Scabrous* (*scab*) kodiert für ein

fibrinogen-ähnliches Protein, das für die normale räumliche Anordnung der Ommatidien benötigt wird (Baker et al., 1990).

Die Auswertung der immunocytochemischen Daten zeigte, dass die meisten *sca/svp*-Ommatidien nur aus äußeren Sehzellen bestanden (Abb. 3.23 a). Es gab aber auch Ommatidien, die zentrale Photorezeptoren besaßen. Diese konnten aufgrund der Anzahl ihrer äußeren Sehzellen und der Rh6-Markierung in zwei Typen unterschieden werden (Abb. 3.23 I-IV). Typ I-Ommatidien besaßen sechs äußere Sehzellen und zwei zentrale Photorezeptoren, die in ihrer Anordnung nicht vom Wildtyp zu unterscheiden waren. Die zentrale Photorezeptorzelle im proximalen Bereich war Rh6-positiv und konnte somit als R8 identifiziert werden. Diese Typ I-Ommatidien traten nur vereinzelt auf und wurden als interne Kontrolle genutzt. Bei den Typ II-Ommatidien fanden sich 7 äußere Sehzellen und eine zentrale Sehzelle, die über die gesamte Länge der Retina zog. Diese kleine Sehzelle war Rh6-negativ und wurde deshalb und aufgrund ihrer Lage im Ommatidium (zwischen R1 und R6) als R7 angesehen. Die äußeren Sehzellen konnten aufgrund ihrer trapezoidalen Anordnung identifiziert werden. Die zusätzliche große Sehzelle befand sich an R8-Position zwischen R1 und R6 (R8?, siehe auch Abb. 3.28). Diese Ommatidien waren etwas häufiger zu finden als die Typ I-Ommatidien.



**Abb. 3.23 Die verschiedenen Ommatidientypen in *sca/svp*-Augen**

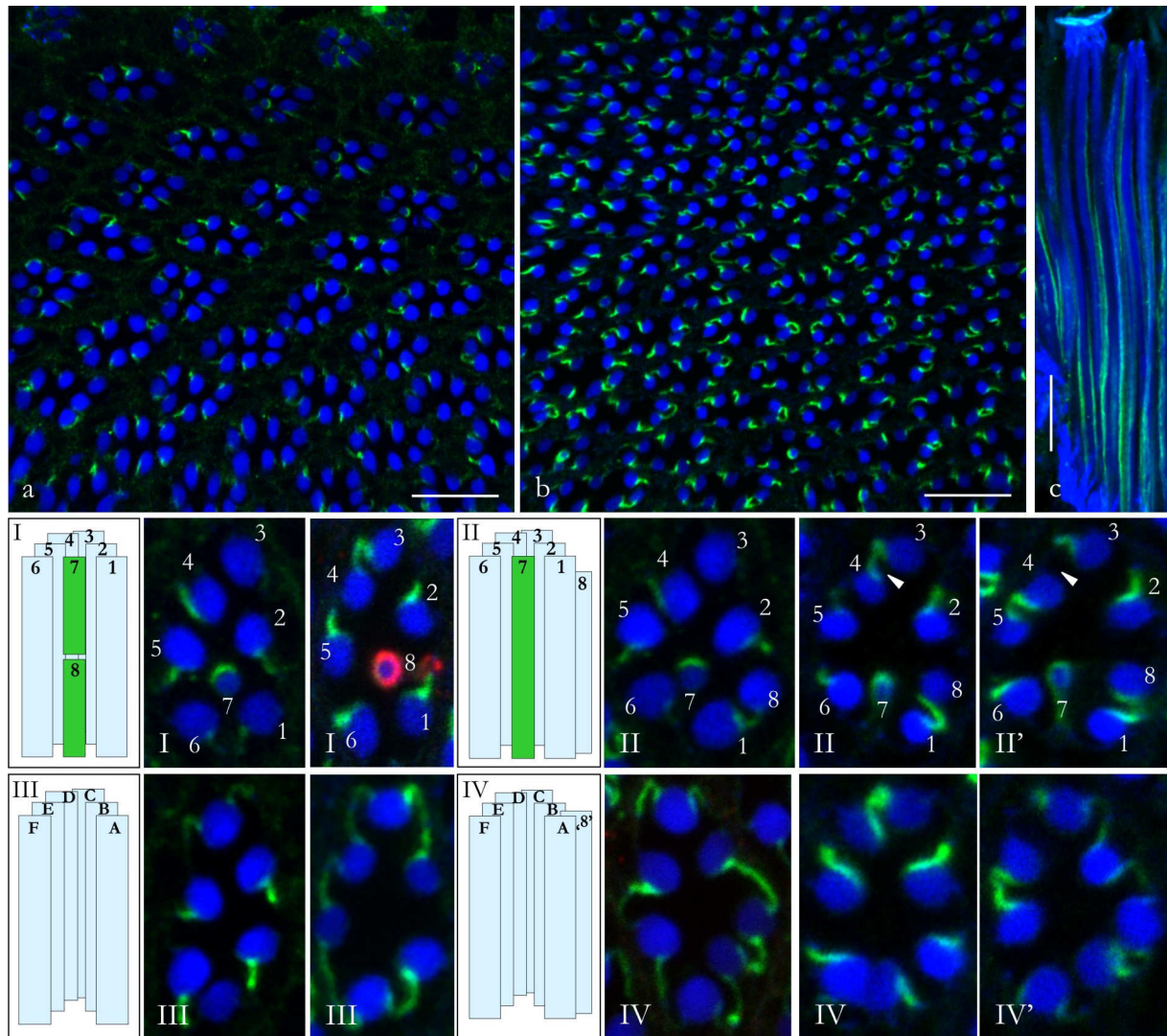
Doppelmarkierung an Gefrierschnitten von *Drosophila sca/svp*-Augen mit anti-Rhodopsin 6 (rot) und Phalloidin (blau). Übersichtsaufnahme des **a** proximalen Bereich der Retina. **I-IV** Detailaufnahmen verschiedener Ommatidientypen und deren schematische Darstellung. **I** Wildtyp-Anzahl und -Anordnung der Photorezeptoren. **II** 7 äußere und eine innere Sehzelle. Die innere Sehzelle befindet sich an R7-Position. **III** 6 äußere im distalen und proximalen Bereich der Retina. **IV** 7 äußere Sehzellen distal und proximal. Balken = 10  $\mu$ m.

Die Einzelaugen, die ausschließlich aus äußeren Sehzellen bestanden, konnten ebenfalls in zwei Gruppen unterteilt werden. So fanden sich Ommatidien mit 6 äußeren Photorezeptoren (Typ III) bzw. 7 äußeren Photorezeptoren (Typ IV). Sie machten den Großteil der Ommatidien in den



*sca/svp*-Augen aus. Die Anzahl der verschiedenen Ommatidientypen variierte zwischen den einzelnen Augen

Die Immunfluoreszenzfärbung mit anti-PY zeigte in den unterschiedlichen Ommatidientypen verschiedene Markierungsmuster. In den Typ I-Ommatidien entsprach das Markierungsmuster mit anti-PY dem Wildtyp (Abb. 3.24 I). Die Intensität war distal schwach und proximal intensiv. Die Seite der Stielmembran mit Markierung wechselte von distal nach proximal.



**Abb. 3.24 Die Markierung mit anti-PY in *sca/svp*-Augen**

Dreifachmarkierung an Gefrierschnitten von *Drosophila sca/svp*-Retinen mit anti-PY (grün), anti-Rhodopsin 6 (rot) und Phalloidin (blau). Übersichtsaufnahmen vom **a**, distalen und **b** proximalen Bereich der Retina. **c** Längsschnitt durch die Retina. Die Intensitätsänderung der Markierung erfolgte nicht so abrupt. **I-IV** Schemata verschiedener Ommatidientypen und Detailaufnahmen im distalen und proximalen Bereich der Retina. **I** Wildtyp-Anzahl und -Anordnung der Photorezeptoren. **II** 7 äußere und eine innere Sehzelle. Die innere Sehzelle befindet sich an R7-Position. Gelegentlich ist eine Abweichung im räumlichen Muster zu sehen (Pfeilspitzen). **III** 6 äußere im distalen und proximalen Bereich der Retina. **IV** 7 äußere Sehzellen distal und proximal mit verschiedenen Markierungsmustern. Für die Typen III und IV sind nur einige der möglichen Markierungsmuster dargestellt. Balken = 10  $\mu$ m.

Für die Typ II-Ommatidien zeigte sich mit anti-PY für R1-R6 in den meisten Fällen ein räumliches Muster und eine Intensität der Markierung wie im Wildtyp (Abb. 3.24 II). Die zusätzliche große Sehzelle, mit R8-Position zwischen R1 und R6 (R8?), wies eine Markierung auf, die distal schwach und meist von R3/R4 weggerichtet war. Proximal war die Markierung intensiver und wies immer weg von der R3/R4-Kontaktstelle. Gelegentlich kam es im proximalen Bereich der Retina bei einzelnen Sehzellen zu Abweichungen im räumlichen Muster (Abb. 3.24 II').

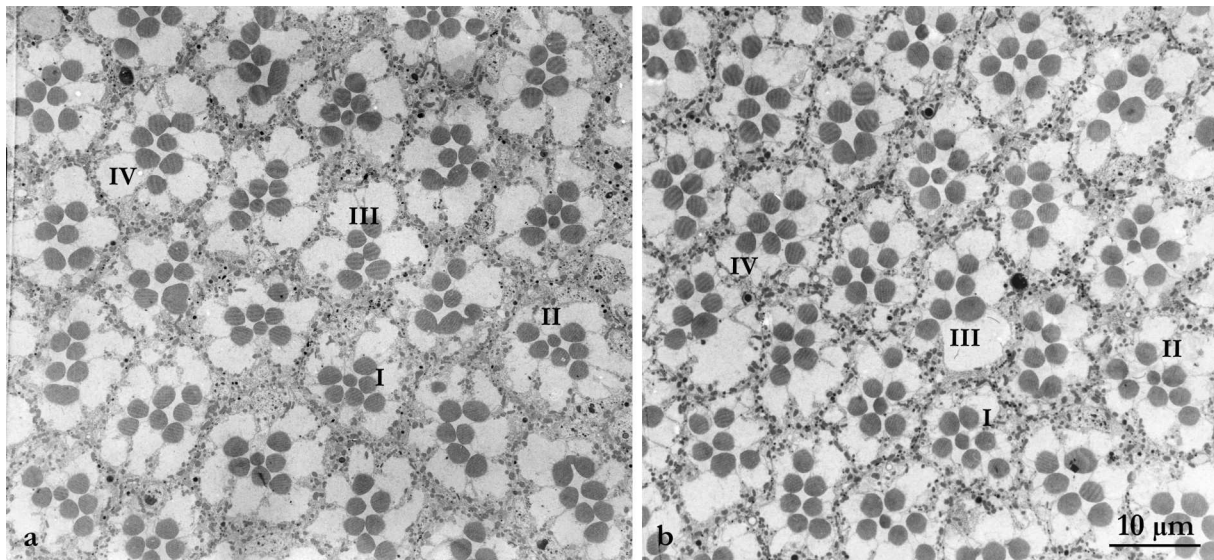
Wenn R8 keinen Einfluss auf die Verdrehung der Rhabdomere von R1-R6 hat, sollte die Markierung mit anti-PY in Ommatidien ohne R8 jeweils in drei benachbarten Sehzellen auf einer Seite und in den anderen drei Sehzellen auf der gegenüberliegenden Seite zu finden sein. Dies ist in den Typ III-Ommatidien der *sca/svp*-Mutante nicht der Fall. Die Markierung mit anti-PY konnte asymmetrisch auf einer Seite der Stielmembran nachgewiesen werden, aber auch beidseitig oder gar nicht, wie es bereits in den *GMR/sens-RNAi*-Augen beobachtet wurde. Eine generelle Regel im Markierungsmuster ließ sich nicht erkennen. Die Intensität der Markierung war distal nicht wesentlich schwächer als proximal (Abb. 3.24 III).

Für die Typ IV-Ommatidien galt ähnliches. Auch hier konnten beide, eine oder gar keine Seite der Stielmembran markiert sein, die sich in ihrer Markierungsintensität im distalen und proximalen Bereich der Retina nicht wesentlich unterschieden (Abb. 3.24 IV).

Die *sca/svp*-Augen wiesen zudem eine reduzierte Retinadicke von ca. 50  $\mu\text{m}$  auf (Abb. 3.24 c). Im Wildtyp beträgt die Dicke der Retina über 100  $\mu\text{m}$  (siehe Abb. 3.1 und 3.2, Cagan & Ready, 1989).

Da sich in der Analyse der *GMR/sens-RNAi*-Augen die Möglichkeit angedeutet hatte, dass einzelne Sehzellen ihre Kipprichtung über die gesamte Länge der Retina nicht ändern, wurden für die ultrastrukturelle Analyse der *sca/svp*-Augen Serienschritte angefertigt. Es wurden alle 5  $\mu\text{m}$  Schritte genommen und analysiert. Da die Ommatidien nicht wie im Wildtyp alle gleich aussahen und ausgerichtet waren, konnten sie durch ihre Lage zu den umgebenden Ommatidien eindeutig zugeordnet werden. Somit war es möglich, die einzelnen Sehzellen über die gesamte Länge zu verfolgen und auf diese Weise festzustellen, ob diese die Kipprichtung von distal nach proximal ändern. Außerdem bestätigten die Serienschritte, dass die Retina eine reduzierte Dicke von etwa 40-60  $\mu\text{m}$  aufwies. Übersichtsaufnahmen des distalen und proximalen Bereichs zeigten, dass sich auch auf ultrastrukturellem Niveau die verschiedenen Typen von Ommatidien unterscheiden lassen (Abb. 3.25). Es stellte sich jedoch heraus, dass es auch Zwischenformen der Typ III- und Typ IV-Ommatidien gab. Diese besaßen distal 6 und proximal 7 äußere Sehzellen. Es gab zudem auch Ommatidien, die distal und proximal 6 Photorezeptoren besaßen, die jedoch im Bereich dazwischen noch eine zusätzliche verkürzte äußere Sehzelle aufwiesen. Bereits in diesen

Übersichtsaufnahmen wurde deutlich, dass sich die generelle Anordnung der Ommatidien von distal nach proximal stark veränderte (Abb. 3.25 z.B. IV).



**Abb. 3.25 Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Querschnitten durch den distalen und proximalen Bereich derselben *sca/svp*-Retina**

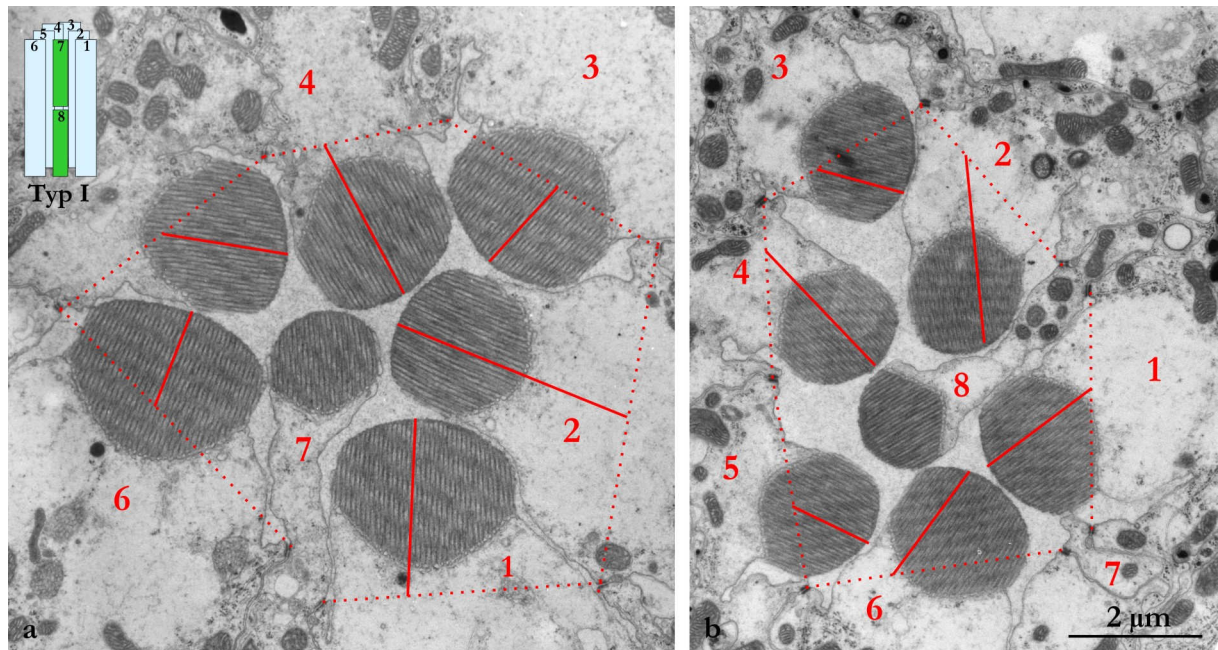
Beispiele der verschiedenen Typen von Ommatidien in dieser Mutante sind mit römischen Ziffern (I-IV) gekennzeichnet. So gibt es Ommatidien, die Wildtyp-Anzahl und -Anordnung der Sehzellen aufweisen (I). Dann gibt es solche, die eine äußere Sehzelle mehr haben und deren kleine Sehzelle von distal bis proximal reicht (II). Außerdem finden sich Ommatidien, die nur äußere Sehzellen besitzen. Bei diesen können Ommatidien mit 6 (III) bzw. 7 äußeren Photorezeptoren (IV) unterschieden werden.

Die Analyse der verschiedenen Ommatidientypen führte zu folgenden Ergebnissen. Typ I-Ommatidien waren auf den ersten Blick nicht von Wildtyp-Ommatidien zu unterscheiden (Abb. 3.26). Anzahl und Anordnung der Photorezeptoren sowie die Kipprichtung erschienen normal. Lediglich die Stärke der Kippung im proximalen Bereich schien leicht reduziert. Aufgrund der geringen Anzahl dieser Ommatidien konnte jedoch keine statistische Auswertung erfolgen. Anhand der Serienschnitte ließ sich die Kipprichtung der Mikrovilli in den verschiedenen Schnittebenen nachvollziehen. Es zeigte sich, dass in den Typ I-Ommatidien die Mikrovilli im R7-Bereich in eine Richtung kippten, die am R7/R8-Übergang ziemlich abrupt wechselte (Abb. 3.27). Weiterhin war zu sehen, dass der R8-Bereich in den *sca/svp*-Augen sehr kurz ausfiel. Möglicherweise führte das zu der geringeren Kippung der Mikrovilli im proximalen Bereich.

Typ II-Ommatidien besaßen eine zusätzliche äußere Sehzelle, die sich an der Position von R8 zwischen R1 und R2 befand (Abb. 3.28). Es kann davon ausgegangen werden, dass R8 in diesen Ommatidien das Schicksal einer äußeren Sehzelle angenommen hat. Allerdings zog sie in den meisten Fällen nicht über die gesamte Länge der Retina. Sie war im distalen Bereich etwas verkürzt und hatte keinen Kontakt zu den Kristallkegelzellen. Sowohl distal als auch proximal

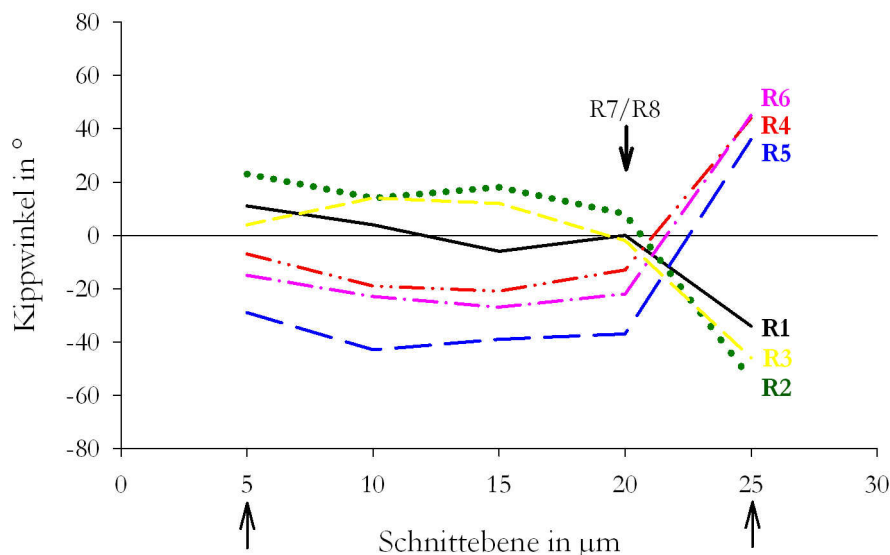


kippte ‚R8‘ in Richtung R3/R4. Der Kippwinkel nahm dabei von distal nach proximal graduell zu (Abb. 3.29).



**Abb. 3.26 Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Querschnitten durch den distalen (a) und proximalen (b) Bereich desselben *sca/svp*-Ommatidiums des Typs I**

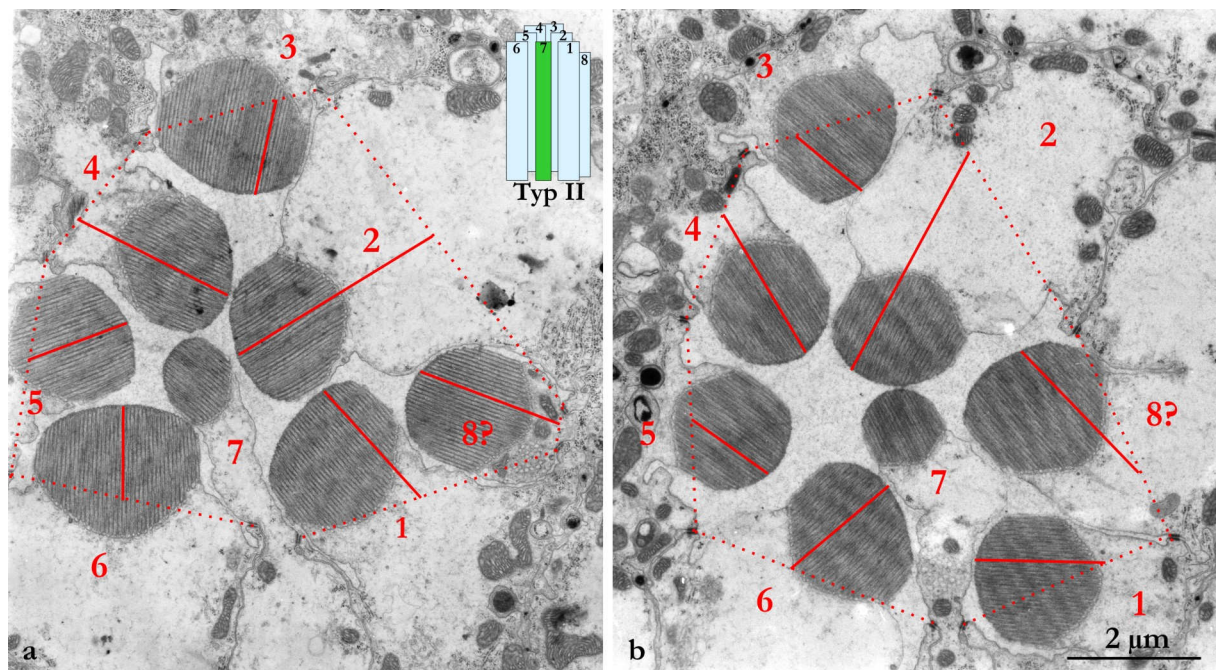
Ommatidien des Typ I weisen Anzahl und Anordnung der Photorezeptoren wie im Wildtyp auf. Es sind für alle Photorezeptoren sowohl **a** distal als auch **b** proximal die Kippwinkel dargestellt. Gekennzeichnet sind die Photorezeptoren, die Referenzachse (▪▪▪) sowie die Mikrovillillängsachse (—). Die Richtung der Verdrehung ist nicht vom Wildtyp zu unterscheiden. Die Stärke der Verdrehung scheint im Vergleich zum Wildtyp im proximalen Bereich jedoch etwas reduziert.



**Abb. 3.27 Die Verdrehung der Rhabdomere in Typ I-Ommatidien**

Am Beispiel der Sehzellen R1-R6 eines Typ I-Ommatidiums ist das Kippverhalten der Mikrovilli über die gesamte Länge einer *sca/svp*-Retina dargestellt. Die Pfeile bei 5 und 25 µm deuten die Schnittebenen des in Abb. 3.26 dargestellten Ommatidiums an. Die µm-Angaben der Schnittebene beziehen sich ausschließlich auf den Bereich der Photorezeptoren. Die Kipprichtung wechselt vom distalen Bereich zum proximalen Bereich der Retina relativ abrupt am Übergang von R7 zu R8.

Die anderen äußeren Sehzellen konnten aufgrund ihrer trapezoidalen Anordnung als R1 bis R6 identifiziert werden. Distal zeigten bis auf R1 alle Photorezeptoren die gleiche Kipprichtung wie Wildtyp-Sehzellen. R1 wies hingegen weg von R3/R4 wie es normal nur im proximalen Bereich der Retina vorkam. Proximal war die Kipprichtung von R1-R6 nicht vom Wildtyp zu unterscheiden. Auch bei den Typ II-Ommatidien schien die Stärke der Kippung etwas reduziert. Anhand der Serienschritte zeigte sich, dass die Sehzellen R2-R5 ihre Richtung im Bereich des Übergangs von R7 zu R8 änderten. Der Wechsel erfolgte in manchen Sehzellen jedoch nicht so abrupt wie in den Typ I-Ommatidien. Die Serienschritte ermöglichten es zudem, die kleine Sehzelle an R7-Position über die gesamte Länge der Retina zu verfolgen. Auf diese Weise konnte festgestellt werden, dass es sich um dieselbe Zelle im distalen und proximalen Bereich handelte.

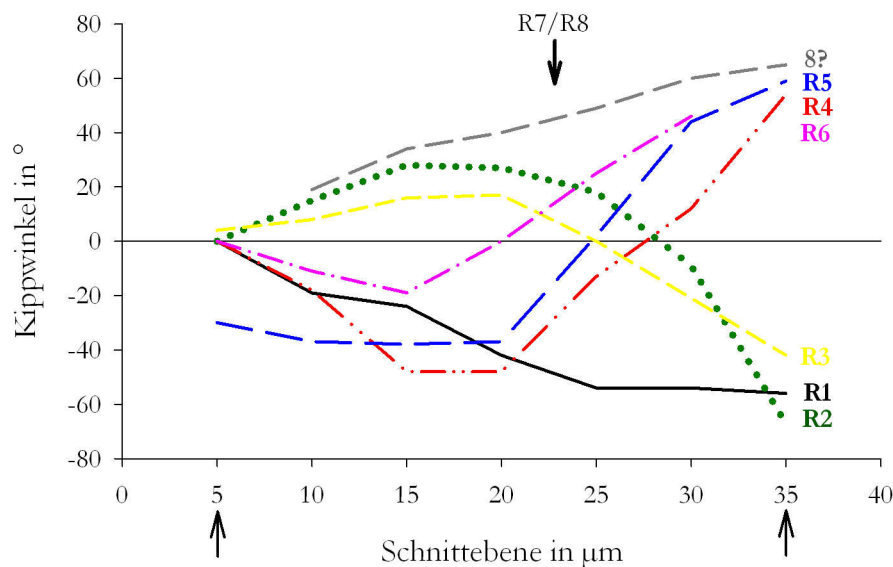


**Abb. 3.28** Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Querschnitten durch den distalen (a) und proximalen (b) Bereich desselben *sca/svp*-Ommatidiums des Typs II

Ommatidien des Typs II bestehen aus 7 äußeren Photorezeptoren und einer kleinen Sehzelle, die über die gesamte Länge der Retina zieht. Es sind für alle Photorezeptoren die Kippwinkel für den **a** distalen und **b** proximalen Bereich dargestellt. Gekennzeichnet sind die Photorezeptoren, die Referenzachse (▪▪▪) sowie die Mikrovillilängsachse (—). Bis auf die Sehzelle R1 zeigen alle Photorezeptoren eine Verdrehung in Wildtyp-Richtung. R1 ist im distalen Bereich bereits in die gleiche Richtung wie proximal ausgerichtet. Die Kippwinkel von R1 bis R6 sind proximal nicht so stark ausgeprägt wie im Wildtyp.

Typ III-Ommatidien besaßen ausschließlich 6 äußere Sehzellen (Abb. 3.30). Da keine genaue Zuordnung der Photorezeptoren R1-R6 möglich war, wurden die Photorezeptoren als  $R_A$ - $R_F$  bezeichnet. Vergleiche von verschiedenen Ommatidien hinsichtlich der Kipprichtung waren folglich mit Zweifeln behaftet. Durch die Serienschritte war es allerdings möglich, eine Zuordnung der Sehzellen im distalen und proximalen Bereich desselben Ommatidiums vorzu-

nehmen. So konnten die Mikrovilli hinsichtlich der Kipprichtung und Kippstärke im distalen und proximalen Bereich miteinander verglichen werden.

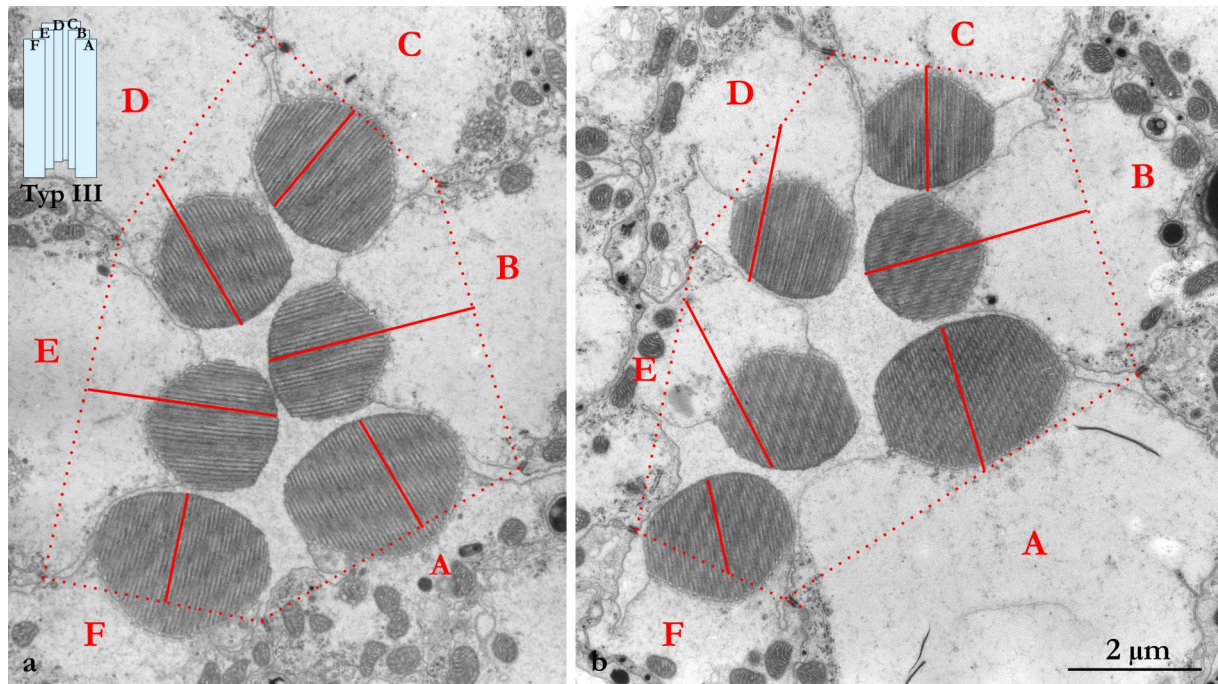


### Abb. 3.29 Die Verdrehung der Rhabdomere in Typ II-Ommatidien

Am Beispiel der Sehzellen R1-R6 und 8? eines Typ II-Ommatidiums ist das Kippverhalten der Mikrovilli über die gesamte Länge einer *sca/syp*-Retina dargestellt. Die Pfeile bei 5 und 35 µm deuten die Schnittebenen des in Abb. 3.28 dargestellten Ommatidiums an. Die µm-Angaben der Schnittebene beziehen sich ausschließlich auf den Bereich der Photorezeptoren. Der Übergang R7/R8 ist anhand der Typ I-Ommatidien in dieser Retina bestimmt worden. R2-R5 wechseln ihre Kipprichtung im Bereich des Übergangs R7/R8. Die Kippwinkel sind proximal stärker ausgeprägt als distal. R1 zeigt keinen Richtungswechsel ebenso wie 8?.

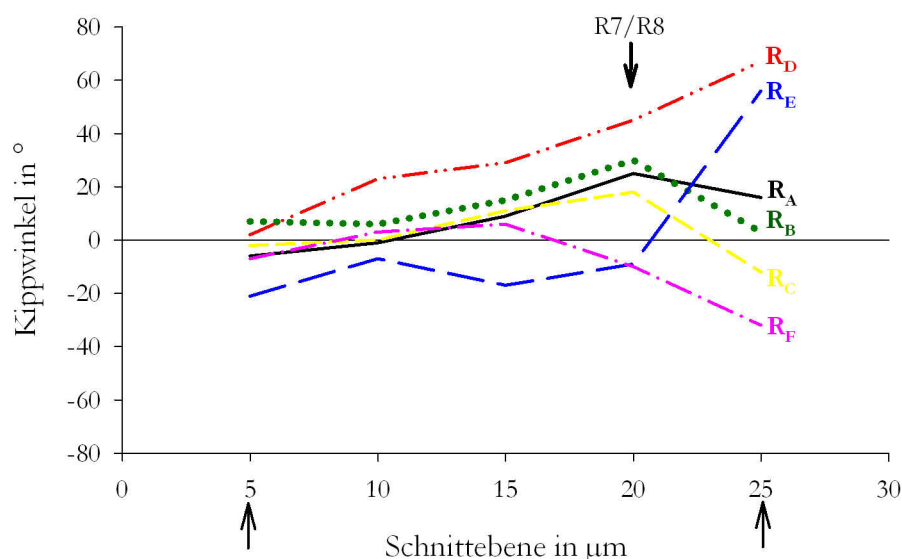
Wenn R8 keinen Einfluss auf die Verdrehung der Rhabdomere von R1-R6 hat, wäre zu erwarten, dass die Mikrovilli in Ommatidien ohne R8 jeweils in drei benachbarten Sehzellen in eine Richtung kippen und in den anderen drei Sehzellen in die andere Richtung. Diese Richtung sollte von distal nach proximal wechseln. Es zeigte sich jedoch, dass einige der Sehzellen ihre Kipprichtung von distal nach proximal nicht änderten (Abb. 3.30 und 3.31 z. B. R<sub>B</sub> und R<sub>D</sub>), während andere Sehzellen ihre Kipprichtung sogar zweimal wechselten (Abb. 3.31 R<sub>F</sub>). Wechsel in der Kippwinkelrichtung waren nicht zwangsläufig mit dem Übergang R7/R8 assoziiert. Der Kippwinkel war im distalen Bereich für alle Sehzellen relativ klein (für das abgebildete Beispiel 0-23°). Proximal variierte er von sehr klein (3-16°) bis groß (32-67°). Es zeigte sich dabei kein Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein eines Wechsels der Kipprichtung und der Größe des Kippwinkels. Im abgebildeten Beispiel (Abb. 3.31) zeigte die als R<sub>B</sub> benannte Sehzelle über die gesamte Länge der Retina keinen Richtungswechsel und nur einen Kippwinkel von 3-30°. R<sub>D</sub> vollführte auch keinen Richtungswechsel, wies aber Winkel von 2-67° auf.





**Abb. 3.30 Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Querschnitten durch den distalen (a) und proximalen (b) Bereich desselben *sca/svp*-Ommatidiums des Typs III**

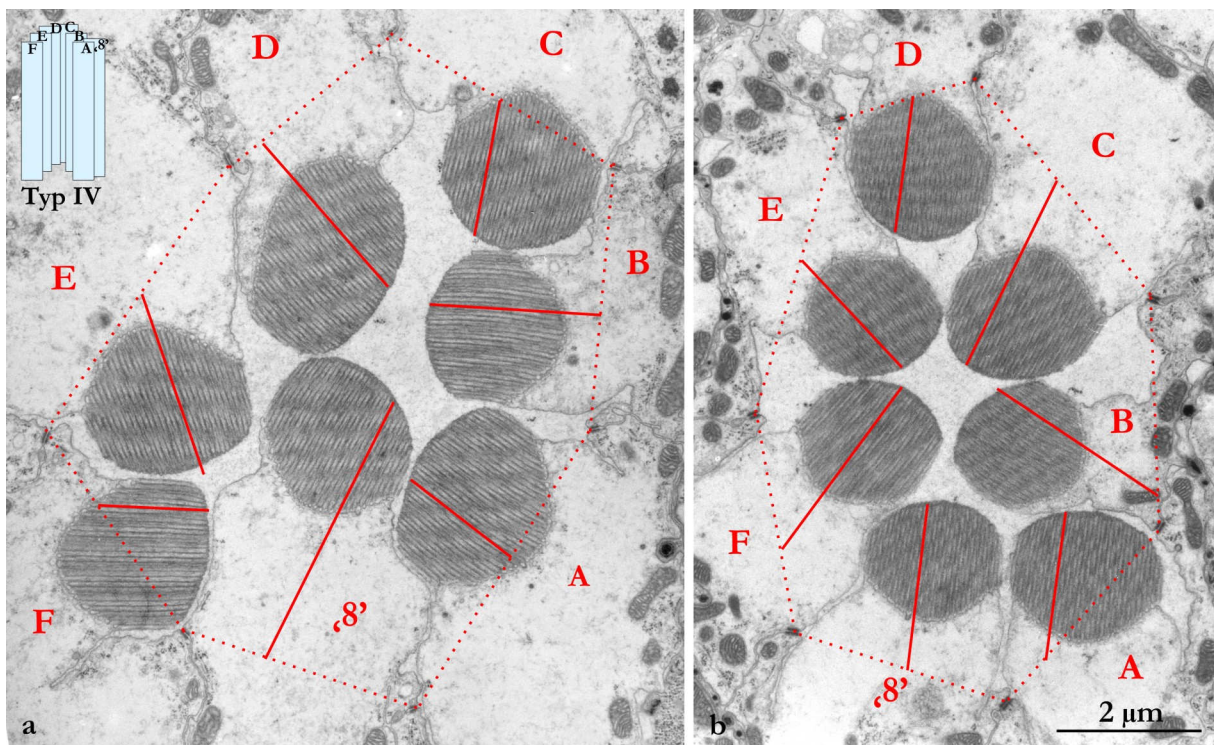
Diese Ommatidien besitzen nur 6 äußere und keine inneren Sehzellen. Es sind für alle Photorezeptoren die Kippwinkel **a** distal und **b** proximal dargestellt. Gekennzeichnet sind die Photorezeptoren, die Referenzachse (— ■ — ■) sowie die Mikrovillilängsachse (—). Da keine genaue Zuordnung der Photorezeptoren möglich war, wurden sie als A-F bezeichnet, um sie von distal nach proximal verfolgen zu können. Die Richtung der Kippwinkel kann somit nur in Bezug von distal zu proximal ausgewertet werden, jedoch nicht im Vergleich zum Wildtyp. Einige der Sehzellen ändern die Kipprichtung nicht über die Länge der Retina (z. B.  $R_B$  und  $R_D$ ). Die Stärke der Kippung variiert von sehr kleinen Kippwinkeln (z. B.  $R_B$  und  $R_C$ ) zu großen Kippwinkeln (z. B.  $R_D$  und  $R_E$ ).



**Abb. 3.31 Die Verdrehung der Rhabdomere in Typ III-Ommatidien**

Am Beispiel der Sehzellen  $R_A$ - $R_F$  eines Typ III-Ommatidiums ist das Kippverhalten der Mikrovilli über die gesamte Länge einer *sca/svp*-Retina dargestellt. Die Pfeile bei 5 und 25 µm deuten die Schnittebenen des in Abb. 3.30 dargestellten Ommatidiums an. Die µm-Angaben der Schnittebene beziehen sich ausschließlich auf den Bereich der Photorezeptoren. Einige der Sehzellen ändern ihre Kipprichtung nicht über die Länge der Retina (z. B.  $R_D$ ), andere hingegen sogar zweimal (z. B.  $R_F$ ). Die Stärke der Kippung variiert von sehr kleinen Kippwinkeln (z. B.  $R_B$ ) zu großen Kippwinkeln (z. B.  $R_E$ ).

Typ IV-Ommatidien besaßen 7 äußere Sehzellen (Abb. 3.32). Da auch hier keine genaue Zuordnung der Photorezeptoren R1-R6 möglich war, wurden die Photorezeptoren anhand ihrer Anordnung im Ommatidium und einer manchmal noch erhalten gebliebenen trapezförmigen Rhabdomerpositionierung als  $R_A$ - $R_F$  bezeichnet. Es wurde davon ausgegangen, dass R8 in diesen Ommatidien das Schicksal einer äußeren Sehzelle angenommen hat; diese wurde als ‚8‘ dargestellt.

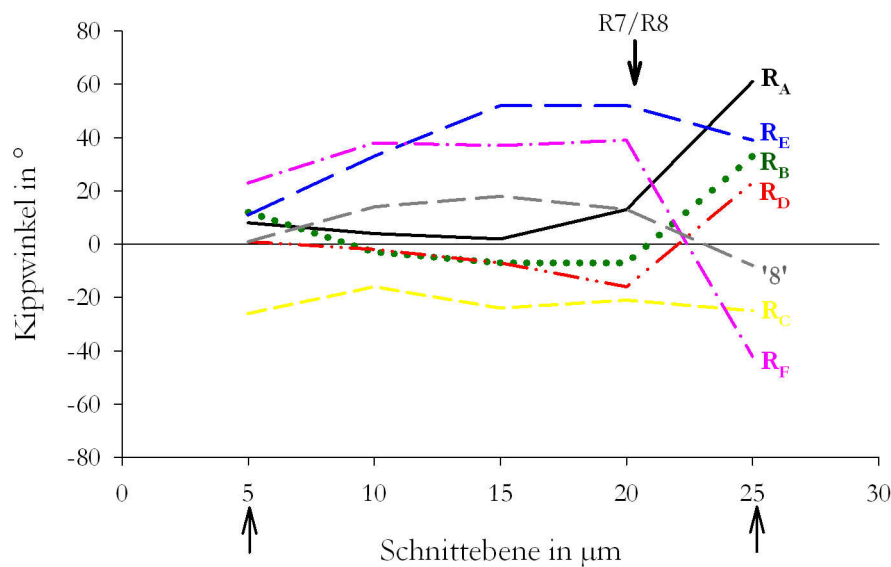


**Abb. 3.32 Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Querschnitten durch den distalen (a) und proximalen (b) Bereich desselben *sca/svp*-Ommatidiums des Typs IV**

Diese Ommatidien haben 7 äußere und keine kleinen Photorezeptoren. Es sind für alle Photorezeptoren die Kippwinkel für den **a** distalen und **b** proximalen Bereich der Retina dargestellt. Gekennzeichnet sind die Photorezeptoren, die Referenzachse (▪▪▪) sowie die Mikrovillilängsachse (—). Aufgrund der Anordnung in der Retina ist eine mögliche Festlegung für die Photorezeptoren getroffen worden, um diese über die gesamte Länge der Retina verfolgen zu können (A-F). Die Richtung der Kippwinkel konnte somit nur in Bezug von distal zu proximal ausgewertet werden, jedoch nicht im Vergleich zum Wildtyp. Einige der Sehzellen ändern ihre Kipprichtung nicht über die Länge der Retina (z. B.  $R_A$  und  $R_C$ ). Die Stärke der Kippung variiert von relativ kleinen Kippwinkeln (z. B.  $R_C$ ) zu großen Kippwinkeln (z. B.  $R_F$ ).

Vergleiche von verschiedenen Ommatidien hinsichtlich der Kipprichtung waren wie in den Typ III-Ommatidien mit Zweifeln behaftet. Durch die Serienschritte konnte jedoch eine Zuordnung der Sehzellen im distalen und proximalen Bereich desselben Ommatidiums vorgenommen werden. Die Mikrovilli konnten somit hinsichtlich der Kipprichtung und Kippstärke im distalen und proximalen Bereich miteinander verglichen werden (Abb. 3.33). Es zeigte sich, dass auch in den Typ IV-Ommatidien einige der Sehzellen ihre Kipprichtung nicht veränderten (für das abgebildete Beispiel z. B.  $R_A$  und  $R_C$ ), andere einmal (z. B.  $R_F$ ) und manche

sogar zweimal (z. B.  $R_B$ ). Wechsel der Kipprichtung im proximalen Bereich der Retina schienen im Bereich des Übergangs von R7/R8 zu erfolgen. Die Kippwinkel waren distal relativ klein (in diesem Beispiel 2-38°). Im proximalen Bereich variierten die Kippwinkel stärker (8-61°). Sehr große Kippwinkel waren aber die Ausnahme. Vielmehr lag der Betrag in einem Bereich, der größer als die durchschnittlichen distalen Kippwinkel und kleiner als die durchschnittlichen proximalen Kippwinkel im Wildtyp war. Es zeigte sich auch für die Typ IV-Ommatidien kein Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein eines Wechsels der Kipprichtung und der Größe des Kippwinkels.



**Abb. 3.33 Die Verdrehung der Rhabdomere in Typ IV-Ommatidien**

Am Beispiel der Sehzellen  $R_A$ - $R_F$  und '8' eines Typ IV-Ommatidiums ist das Kippverhalten der Mikrovilli über die gesamte Länge einer *sca/svp*-Retina dargestellt. Die Pfeile bei 5 und 25  $\mu\text{m}$  deuten die Schnittebenen des in Abb. 3.32 dargestellten Ommatidiums an. Die  $\mu\text{m}$ -Angaben der Schnittebene beziehen sich ausschließlich auf den Bereich der Photorezeptoren. Einige der Sehzellen ändern ihre Kipprichtung nicht über die Länge der Retina (z. B.  $R_E$ ), andere hingegen sogar zweimal (z. B.  $R_B$ ). Die Stärke der Kippung variiert von sehr kleinen Kippwinkeln (z. B.  $R_C$ ) zu großen Kippwinkeln (z. B.  $R_F$ ).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das Fehlen der R8-Sehzelle bzw. deren Umwandlung in eine äußere Sehzelle das Kippverhalten der Photorezeptoren R1-R6 beeinflusste. Einerseits kippten einige der Sehzellen über die gesamte Länge der Retina in eine Richtung, während andere die Kipprichtung einmal oder sogar zweimal wechselten. Andererseits waren die Kippwinkel häufig reduziert.



## 4. Diskussion

Das Auge von *Drosophila* ist für die Untersuchung einer Vielzahl von Prozessen wie Zellspezifizierung, Zellteilung, -wachstum und -tod genutzt worden (Cagan & Ready, 1989; Frankfort & Mardon, 2002; Moses, 2002; Wolff & Ready, 1991; Bonini & Fortini, 1999; Fan & Bergmann, 2008). Zum einen ist für diesen Modellorganismus das Genom schon seit längerer Zeit vollständig sequenziert (Adams et al., 2000). Des Weiteren stehen eine Vielzahl von Mutanten für die Untersuchungen von Proteinfunktionen zur Verfügung. Schließlich sind die an *Drosophila* gewonnenen Ergebnisse häufig auf andere Organismen übertragbar, da sich die Funktionen vieler Gene in verschiedenen Organismen ähneln (Pichaud & Desplan, 2001; Mlodzik, 2002; Dabdoub et al., 2003; Dabdoub & Kelley, 2005).

Ein im Auge besonders gut untersuchtes Merkmal von Epithelien ist die Ausbildung der Zellpolarität sowohl in apikal-basaler Richtung als auch in der Ebene senkrecht dazu. Letztere wird als planare Zellpolarität (PCP) bezeichnet. Ein Beispiel für PCP im Komplexauge ist das asymmetrische Trapez, welches durch die Rhabdomere der äußeren Sehzellen in einem Ommatidium gebildet wird. Zudem ist jedes Ommatidium entlang der anterior-posterioren und der dorso-ventralen Achse in charakteristischer Weise ausgerichtet (Ready et al., 1976; Fanto & McNeill, 2004; Jenny & Mlodzik, 2006). *rhabdomere twisting* kann ebenfalls als eine Form von PCP betrachtet werden, die jedoch nicht auf Gewebeebene sondern an der Einzelzelle etabliert ist. So weisen die Sehzellen eine morphologische Asymmetrie auf, die sich in der Kippung der Mikrovilli ausdrückt und eine molekulare Asymmetrie, die sich in der polaren Verteilung von phosphotyrosinierten Proteinen widerspiegelt (Smola & Tschardtke, 1979; Baumann & Lutz, 2006). Obwohl das Phänomen der Rhabdomerverdrehung seit gut 30 Jahren bekannt ist (Wehner et al., 1975; Smola & Tschardtke, 1979), sind seitdem die Mechanismen, die das Verdrehen der Rhabdomere vermitteln, wenig untersucht. Bei der bisherigen Analyse von Mutanten sind zwei Effekte beobachtet worden. Entweder war der Grad der Kippung beeinflusst oder die Kipprichtung verändert. Es scheinen daher zwei Prozesse an der Entwicklung des *rhabdomere twisting* mitzuwirken. In einem Prozess wird die Richtung, in der die Mikrovilli kippen, festgelegt. Im zweiten Prozess erfolgt dann die Ausführung der Rhabdomerverdrehung.

### 4.1 Identität der mit anti-PY an der Stielmembran lokalisierten Proteine

Mit der vorliegenden Arbeit konnten erstmals Informationen zur Identität der Proteine erbracht werden, die mit anti-PY an der Stielmembran markiert wurden. Mehrere Befunde belegen, dass es

sich um die aktivierten (= phosphorylierten) Formen von zwei Proteinkinasen vom Typ der MAPK handelt. Erstens imitieren die Antikörper gegen pERK und pJNK das Markierungsmuster von anti-PY in der *Drosophila*-Retina. Dementsprechend findet sich die Markierung an den Kristallkegelzellen und im Bereich der Stielmembran der Sehzellen. An der Stielmembran ist die Markierung auf eine Seite begrenzt, die von distal nach proximal in der Nähe des Übergangs von R7 zu R8 wechselt. Zudem ändert sich an diesem Übergang auch die Intensität der Markierung von distal sehr schwach zu proximal sehr intensiv. Zweitens wird dieses Markierungsmuster in der Entwicklung zum gleichen Zeitpunkt etabliert wie das mit anti-PY. So werden die beiden aktivierten Proteinkinasen erst sehr spät in der Entwicklung (ca. 90% pd), kurz vor Schlupf der Fliegen, an der Stielmembran detektiert. Drittens verhindern Präinkubationsexperimente mit anti-PY eine Markierung mit anti-pERK bzw. anti-pJNK an der Stielmembran. Die beiden Proteinkinasen ERK und JNK müssen an zwei Aminosäureresten phosphoryliert werden, damit sie aktiv sind. Diese Aminosäurereste liegen in Form der Phosphorylierungssequenz TXY (ThreoninXTyrosin, X = beliebige Aminosäure) im Protein vor (Sturgill & Wu, 1991; Ahn et al., 1992). pTXpY, umgeben von den für die jeweilige Proteinkinase entsprechenden Aminosäuren, wurde für die Herstellung der Antikörper gegen die aktivierten Proteinkinasen pERK und pJNK verwendet. Es ist davon auszugehen, dass diese Sequenz pTXpY auch von anti-PY erkannt wird. So kommt es durch Bindung dieses Antikörpers an phosphoryliertes Tyrosin (pY) zur Verdeckung des Epitops für anti-pERK bzw. anti-pJNK. In einer Zelle wird eine Vielzahl von Proteinen durch Phosphorylierung an Tyrosinresten modifiziert und damit reguliert (Salomon et al., 2003; Hunter, 2009). Es kann deshalb nicht ausgeschlossen werden, dass anti-PY an der Stielmembran neben pERK und pJNK noch weitere Proteine erkennt.

Bei den beiden an der Stielmembran nachgewiesenen Proteinkinasen handelt es sich um cytoplasmatische Proteine (Biggs & Zipursky, 1992; Riesgo-Escovar et al., 1996; Sluss et al., 1996). Dies wirft die Frage auf, wie es zu dieser hochlokalen Verteilung von pERK und pJNK an die Stielmembran kommt? Für eine alternativ gespleißte Form von ERK2 des Menschen konnte durch Überexpressionsexperimente gezeigt werden, dass diese selektiv an der Membran lokalisiert wird (Gonzales et al., 1992; Gonzales et al., 1993). Weiterhin wurde für Proteine wie Sef oder PEA-15 gezeigt, dass sie ERK1/2 im Cytoplasma zurückhalten (Torii et al., 2004; Formstecher et al., 2001; Whitehurst et al., 2004). Sef reguliert die räumliche Verteilung des Ras/MAPK-Signalweges, indem es spezifisch die Translokation von ERK1/2 in den Zellkern verhindert ohne dabei die Aktivität im Cytoplasma zu inhibieren (Torii et al., 2004). Die Bindung von Sef an den aktivierten MEK/ERK-Komplex beeinflusst weder die Phosphorylierung noch die Kinaseaktivität von ERK1/2. Sef kolokalisiert zusammen mit aktivierter MEK1/2 und aktivierter ERK1/2 hauptsächlich am Golgi-Apparat und zu einem geringen Teil auch an der

Plasmamembran. Diese Ergebnisse präsentieren den Golgi-Apparat als Plattform für Signalwege (Philips, 2004). In diesem Zusammenhang ist es erwähnenswert, dass die während der späten Entwicklung mit anti-pERK und anti-pJNK markierten Vesikel im Cytoplasma vermutlich Abkömmlinge des Golgi-Apparates sind. So kolokalisieren diese Vesikel mit Rhodopsin-enthaltenden, cytoplasmatischen Vesikeln. Von Satoh et al. (2005) wurde bereits beschrieben, dass diese Rhodopsin-enthaltenden cytoplasmatischen Vesikel Abkömmlinge des Golgi-Apparates sind (*post-Golgi vesicles*), die das Rhodopsin zum Rhabdomer transportieren. Eigene Versuche mit einem cis-Golgi-Marker bestätigten, dass die Rh1-immunpositiven Vesikel entweder mit den cis-Golgi-Strukturen kolokalisierten oder oftmals direkt benachbart zu diesen waren (nicht abgebildet).

Die räumliche Begrenzung von pERK scheint für die Funktion dieser Proteinkinase von wesentlicher Bedeutung zu sein. In der morphogenetischen Furche des sich entwickelnden Auges wird pERK für mehrere Stunden im Cytoplasma zurückgehalten und erst danach in den Zellkern transportiert (Kumar et al., 2003). Erfolgt diese Zurückhaltung im Cytoplasma nicht, ist das Entwicklungsmuster der Furche gestört. Eine ähnliche Zurückhaltung von pERK1/2 im Cytoplasma wurde während der Embryogenese der Maus beobachtet (Corson et al., 2003). Neuere Untersuchungen haben zudem gezeigt, dass neben Proteinen auch spezifische Lipide sowohl die subzelluläre Lokalisation der MAPK als auch deren Kinaseaktivität regulieren können. So erfolgt ein Großteil der MAPK-Signalgebung an Endosomen und Störungen der Endocytose führen zu Störungen in den MAPK-Signalwegen (Review: Anderson, 2006). Die von Führer (2004) erbrachten Ergebnisse zusammen mit den Daten dieser Arbeit lassen darauf schließen, dass die räumliche Verteilung der beiden Proteinkinasen ERK und JNK durch Immobilisierung an der Stielmembran genau reguliert ist. Im Zuge dieser Arbeit wurde mit verschiedenen biochemischen Methoden wie *Pelleting Assay*, Immunpräzipitation und Isolierung von Phosphoproteinen versucht, die beiden Proteinkinasen anzureichern. Auf diese Weise sollten mögliche Bindungspartner und Substrate (z. B. Verankerungsproteine, Cytoskelettelemente) an der Stielmembran identifiziert werden. Es war mit verschiedenen Protokollen jedoch nicht möglich, eine ausreichende Menge an Proteinen zu isolieren, um diese mit einem MALDI-TOF Massenspektrometer (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation-Time of Flight*) zu analysieren. Die Frage nach der Verankerung von pERK und pJNK an der Stielmembran bleibt somit weiter ungeklärt.

Ein möglicher Interaktionspartner an der Stielmembran könnte F-Aktin sein. Baumann und Lutz (2006) hatten nachgewiesen, dass F-Aktin asymmetrisch auf die beiden Seiten der Stielmembran verteilt ist. So sind die Aktinfilamente vermehrt auf der Seite der Stielmembran zu finden, auf der auch pERK und pJNK lokalisiert sind. Des Weiteren zieht im Auge nicht-rhabdomerales Aktin

an der lateralen Seite der Rhabdomerbasis von R1-R6, wo das Rhabdomer mit der Stielmembran verknüpft ist, über die gesamte Länge der Sehzelle. Diese Aktinfilamente entlang der Rhabdomerbasis kolokalisieren auf der gesamten Länge mit Myosin-II (Baumann, 2004). In Längsschnitten der Retina scheint die Markierung dieser Aktinfilamente ebenfalls mit der anti-pERK- bzw. anti-pJNK-Immunreaktivität zu kolokalisieren. Interessant ist diesem Zusammenhang, dass der Signalweg, der die planare Zellpolarität etabliert, z. B. über die *Drosophila* Rho-associated kinase (Drok) das Aktincytoskelett beeinflussen kann (Winter et al., 2001). Ein wichtiges Ergebnis der Drok-Aktivierung im Flügel ist die Phosphorylierung von Myosin, genauer der MRLC (*nonmuscle myosin II regulatory light chain* = regulatorische leichte Kette von Myosin-II). Im Auge von *Drosophila* ist der JNK-Signalweg an der Regulierung der ommatidialen Polarität in Abhängigkeit von RhoA, dem Aktivator von Drok, beteiligt (Strutt et al., 1997). Es wäre somit vorstellbar, dass die Wirkung der beiden MAPK auf die Verdrehung der Rhabdomere über das Aktincytoskelett erfolgt. Ein weiterer Hinweis, der diese Hypothese unterstützt, ist die Etablierung der Myosin-II-Verteilung auf die beiden Seiten der Rhabdomerbasis während der Augenentwicklung. Erst spät in der pupalen Entwicklung (90% pd) ist Myosin-II auf die lateralen Seiten der Rhabdomerbasis begrenzt (Baumann, 2004). Dies geschieht etwa zeitgleich zur asymmetrischen Verteilung von pERK und pJNK an die Stielmembran.

## 4.2 Einfluss von ERK- und JNK-Mutanten auf das *rhabdomere twisting*

Proteinkinasen bilden Signalnetzwerke, die an der Vermittlung vieler zellulärer Prozesse beteiligt sind (Review: Pearson et al., 2001; Shvartsman et al., 2009). Charakteristisch für die Proteinfamilie der MAPK ist eine Kaskade aus mindestens drei Kinasen (Errede et al., 1995; Gustin et al., 1998; Lewis et al., 1998). Die grundlegende Organisation der Signalwege, die zu einer Aktivierung der MAPK führen, wurde während der Evolution hoch konserviert. So finden sich diese Proteinfamilien von Hefe bis zu den Säugetieren (Brewster et al., 1993; Lee et al., 1993; Dérijard et al., 1994; Han et al., 1994; Kyriakis et al., 1994; Lee et al., 1994; Rouse et al., 1994). Zu der Vielzahl von Prozessen, die von MAPK reguliert werden, gehören Zellproliferation und -differenzierung sowie auch Apoptose. Die MAPK werden durch die Familie der MAPK/ERK Kinase (MEK) aktiviert. Dies sind dualspezifische Enzyme, die sowohl Serin/Threonin als auch Tyrosin phosphorylieren (Crews et al., 1992; Kosako et al., 1992; Ashworth et al., 1992; Wu et al., 1993). Trotzdem die MEKs aliphatische und aromatische Seitenreste phosphorylieren können, ist ihre Substratspezifität sehr eng. Jede MEK aktiviert nur eine oder wenige MAPK. Die MAPK selber besitzen hingegen überlappende Substratspezifität (Fukunaga & Hunter, 1997; Waskiewicz et al., 1997; Lewis et al., 1998). Dadurch kann das Substrat von verschiedenen MAPK-

Signalwegen beeinflusst werden. Es werden drei MAPK-Signalwege unterschieden (Review: Chang & Karin, 2001; Pearson et al., 2001; Johnson & Lapadat, 2002). Zum einen gibt es die Gruppe der *extracellular signal-regulated kinase* (ERK). Dieses war der erste MAPK-Signalweg, der in Säugerzellen untersucht wurde. Er wird durch eine Vielzahl von Stimuli aktiviert, unter anderem durch die Wachstumsfaktoren EGF, NGF und PDGF. Dann gibt es noch die Familien der *c-Jun-N-terminal kinase/stress-activated protein kinase* (JNK/SAPK) und p38. Diese beiden Signalwege werden durch ähnliche Signale ausgelöst, dazu zählen ebenfalls Wachstumsfaktoren aber auch andere Faktoren wie TNF $\alpha$ , IL-1, osmotischer Stress und UV-Strahlung. Die MAPK-Kaskaden bilden Komplexe, die deren Aktivierung erleichtern, ihre Lokalisation beeinflussen und damit Spezifität und Zielproteine eingrenzen (Choi et al., 1994; Marcus et al., 1994; Yasuda et al., 1999; Review: Dard & Peter, 2006). So können MAPK die Serin- und Threoninreste von nukleären Transkriptionsfaktoren wie z. B. Elk1 oder CREB phosphorylieren. Sie sind aber auch in der Lage cytoplasmatische Proteine wie Komponenten des Cytoskeletts oder andere Proteinkinasen zu aktivieren (Review: Kondoh et al., 2005; Anderson, 2006).

Die Lokalisation der beiden Proteinkinasen pERK und pJNK an die Stielmembran mit charakteristischem räumlich-zeitlichen Muster führte zu der Hypothese, dass pERK und pJNK an der Ausbildung der Rhabdomerverdrehung beteiligt sind. Versuche an Mutanten, in denen die Aktivität der Proteinkinasen reduziert oder erhöht war, sollten Aufschluss darüber geben, welche Rolle die beiden Proteinkinasen ERK und JNK bei der Verdrehung der Rhabdomere haben. Für ERK zeigte sich, dass eine reduzierte Aktivität dieser Kinase zu einem Verlust der Immunreaktivität mit anti-pERK führte. Zudem war die Markierungsintensität mit anti-PY an der Stielmembran der *rl<sup>1</sup>/rl<sup>10a</sup>*-Mutante stark reduziert. Für diese Fliegen wurde proximal ein reduzierter Kippwinkel der Rhabdomere im Vergleich zum Wildtyp bestimmt. Eine erhöhte Aktivität von ERK bewirkte in der Entwicklung eine frühere Lokalisation der phosphorylierten Form an die Stielmembran. In Übereinstimmung mit der Hypothese, dass die asymmetrische Verteilung der Proteinkinase an die Stielmembran für die Etablierung des *rhabdomere twisting* erforderlich ist, begann die Mikrowillkippung in der *rl<sup>SEM</sup>*-Mutante in einer früheren Phase des Puppenstadiums. Außerdem war in den adulten Augen im distalen Bereich der Retina die Intensität der Markierung mit anti-PY erhöht und die Kippwinkel der Mikrowilli größer als im Wildtyp. Versuche mit anti-pERK konnten für die *rl<sup>SEM</sup>*-Mutante nicht durchgeführt werden, da das Antiserum aufgebraucht war (siehe Ergebnisse 3.2.1, S. 28). Die in diesem Zusammenhang von mir erhobenen Daten für die Kippwinkel der Rhabdomere im Wildtyp (adult sowie 90% pd) sind vergleichbar mit denen, die bereits von Baumann und Lutz (2006) ermittelt wurden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sowohl die zeitliche Entwicklung als auch die Ausprägung des *rhabdomere twisting* durch eine Veränderung in der ERK-Aktivität beeinflusst

wurden. Folglich sind nur die Kippwinkel beeinflusst, nicht aber die Kipprichtung. Für pERK kann daher eine Rolle in der Ausführung der Rhabdomerverdrehung postuliert werden. Eine Frage, die sich dennoch stellt, ist: Warum ist bei der  $rl^1/rl^{10a}$ -Mutante die Mikrowillkippung nicht vollkommen aufgehoben? Mit anti-pERK ist keine Immunreaktivität nachweisbar. Die Immunfluoreszenzfärbung mit anti-PY deutet aber an, dass noch phosphotyrosinierte Proteine an der Stielmembran zu finden sind. Dies ist ein Hinweis, warum die Kippwinkel nicht auf  $0^\circ$  reduziert sind. Ob es sich bei den mit anti-PY markierten Proteinen in der  $rl^1/rl^{10a}$ -Mutante sowohl um pERK als auch pJNK handelt, ist nicht mit Sicherheit zu sagen. Allerdings ist mit anti-pJNK wie mit anti-PY in der  $rl^1/rl^{10a}$ -Mutante eine schwache Immunreaktivität detektierbar. Es ist somit auch vorstellbar, dass die Anwesenheit von zwei Proteinkinasen zu einer Redundanz im System führt, so dass die Mikrowillkippung nicht vollständig aufgehoben wird.

Für die JNK zeigen die Ergebnisse mehrdeutige Effekte. Mögliche Ursachen dafür werden im Abschnitt 4.3 diskutiert. So wurde sowohl bei erhöhter als auch bei reduzierter Aktivität der JNK ein ähnlicher Effekt in der Immunocytochemie und auf ultrastruktureller Ebene beobachtet. Die Immunreaktivität mit anti-PY war im distalen Bereich erhöht und kaum noch vom proximalen Bereich zu unterscheiden. Dies war besonders ausgeprägt in den Sehzellen R2 und R5. Die im distalen Bereich ermittelten Kippwinkel der Rhabdomere waren in den Mutanten größer als in den Elternlinien. Auch auf ultrastruktureller Ebene zeigte sich, dass der Effekt in R2 und R5 am deutlichsten ausgebildet war. Im proximalen Bereich der Retina konnte der Kippwinkel im Vergleich zu den Elternlinien stärker, schwächer oder gleich stark ausgeprägt sein. Die Rolle der JNK bleibt somit weiter offen. Eine weitere mögliche Ursache für die mehrdeutigen Effekte mit der JNK könnte auch hier das Vorhandensein von zwei Proteinkinasen an der Stielmembran sein.

### 4.3 Vor- und Nachteile des GAL4-UAS-Systems

Die gezielte Genexpression mit Hilfe des GAL4-UAS-Systems ist eines der besten Beispiele für die genetische Zugänglichkeit des Modellorganismus *Drosophila*. Auf diese Weise konnte die Funktion vieler Gene untersucht werden (Brand & Perrimon, 1994; Gerlitz et al., 2002; Guichard et al., 2002; Gustafson & Boulianne, 1996). Bei GAL4 handelt es sich um ein Protein aus der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*, welches als Transkriptionsaktivator von Genen dient, die durch Galactose induziert werden (Laughon et al., 1984; Laughon & Gesteland, 1984). Es reguliert die Transkription dieser Gene, indem es an DNA-Stellen bindet, die als *upstream activating sequence* (UAS) bezeichnet werden (Giniger et al., 1985). Kopplung des GAL4-Gens an einen bestimmten Promotor ermöglicht dessen gewebs- und/oder entwicklungspezifische Expression. Wird diese sogenannte Treiberlinie mit einem Responder-Stamm gekreuzt, der das zu untersuchende Gen



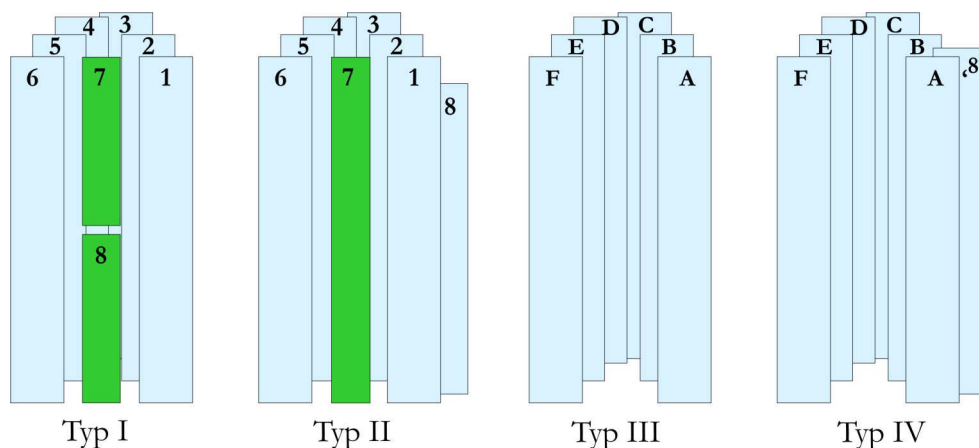
unter der Kontrolle der UAS hat, ist es möglich die Funktion dieses Gens in einem bestimmten Gewebe und/oder zu einem definierten Zeitpunkt in der Entwicklung zu analysieren (Brand & Perrimon, 1993; Review: Duffy, 2002; Elliott & Brand, 2008).

Bei der Bewertung der mit dem GAL4-UAS-System erhaltenen Daten ist zu berücksichtigen, dass das System temperaturabhängig funktioniert. Eine minimale Aktivität des Systems ist bei 16°C gegeben. Mit steigender Temperatur nimmt die Aktivität zu bis sich bei ca. 29°C maximale Aktivität und negative Effekte auf Fertilität und Lebensfähigkeit ausgleichen (Review: Elliott & Brand, 2008). Kontrollkreuzungen der *GAL4-rb1*-Treiberlinie mit einer *UAS-GFP*-Linie zeigten, dass bei 21°C in 73% der äußeren Sehzellen GFP exprimiert wurde, während es bei 26°C 87% waren. Die Kreuzungen wurden bei 26°C angesetzt. Folglich flossen in die Auswertung der Kippwinkel auch Daten von Photorezeptoren ein, die Wildtyp-Aktivität des zu regulierenden Proteins aufwiesen. Auf diese Weise erhöhte sich die Streuung in den Datensätzen. Dies könnte bei kleinen Effekten dazu führen, dass Unterschiede nicht als solche erkannt wurden. Der *GAL4-rb1*-Treiber wurde für die Regulierung der JNK-Aktivität ausgewählt, da zu diesem Zeitpunkt die asymmetrische Verteilung von pJNK an die Stielmembran noch nicht begonnen hat, die Morphogenese der Ommatidien jedoch weitgehend abgeschlossen ist (Cagan & Ready, 1989; Kumar & Ready, 1995). Allerdings ist es möglich, dass eine Beeinflussung der Kinaseaktivität zu diesem Zeitpunkt zu spät ist, um mögliche Effekte der JNK auf das *rhabdomere twisting* nachvollziehen zu können.

Ein weiterer Aspekt, der bei der Arbeit mit dem GAL4-UAS-System berücksichtigt werden muss, ist die zeitliche Varianz in der Aktivierung von GAL4 in unterschiedlichen Zellen. Dies ist besonders auffällig bei der *sca/svp*-Kreuzung anhand der Sehzelle R8. Die Rekrutierung der Photorezeptoren verläuft hoch geordnet. Nach der R8-Spezifizierung in der morphogenetischen Furche werden zunächst R2 und R5 des *preclusters* durch den R8-Vorläufer determiniert, anschließend folgt die Rekrutierung der Paare R3/R4 und R1/R6 und zum Schluss von R7 (Cagan & Ready, 1989, Review: Brennan & Moses, 2000). Dies geschieht in verschiedenen Zonen nach der morphogenetischen Furche (siehe auch 4.4, Abb. 4.2). In der *sca/svp*-Kreuzung sollte der R8-Vorläufer durch die Missexpression von *svp* nach der Induzierung von R1-R6 aber vor der Rekrutierung von R7 seine R8-Identität verlieren, so dass im adulten Tier die Ommatidien nur sechs äußere aber keine inneren Sehzellen besitzen. Es zeigte sich jedoch, dass, je nachdem zu welchem Zeitpunkt das GAL4-UAS-System in den einzelnen Ommatidien aktiviert wurde, verschiedene Ommatidientypen unterschieden werden konnten (Abb. 4.1).

Die Mehrheit der Ommatidien wurde von den Typen III und IV gebildet. Diese besaßen ausschließlich äußere Sehzellen. In den Typ III-Ommatidien waren sechs Photorezeptoren zu finden. Dieser Zustand wäre in allen Ommatidien zu erwarten gewesen, wenn das GAL4-UAS-

System gleichzeitig zum oben beschriebenen Zeitpunkt aktiviert worden wäre. In den Typ IV-Ommatidien fanden sich sieben äußere Sehzellen. Die zusätzliche Sehzelle war durch folgende Merkmale als äußere Sehzelle zu identifizieren. Sie zog über die gesamte Länge der Retina, besaß einen großen Rhabdomerdurchmesser und wies keine Rh6-Markierung auf. Es kann davon ausgegangen werden, dass R8 das Schicksal einer äußeren Sehzelle angenommen hat, bevor er die Sehzelle R7 rekrutieren konnte. Typ I-Ommatidien besaßen sowohl die zentrale Sehzelle R7 als auch R8. Die Zuordnung von R7 und R8 wurde aufgrund der Rhabdomermorphologie, der Lage im Ommatidium und der Immunreaktivität mit anti-Rh6 vorgenommen. Diese Typ I-Ommatidien traten selten auf. Vermutlich erfolgte in diesen Ommatidien die Missexpression so spät oder gar nicht, dass sie sich im Aufbau und in der Anordnung der Photorezeptoren nicht von Wildtyp-Ommatidien unterschieden. In den Typ II-Ommatidien war eine zentrale Sehzelle zu finden, die einen kleinen Rhabdomerdurchmesser besaß, keine Rh6-Markierung besaß und zwischen R1 und R6 positioniert war. Folglich wurde sie als R7 bezeichnet. Allerdings zog sie über die gesamte Länge der Retina. R8 hatte das Schicksal einer äußeren Sehzelle angenommen, erkennbar an dem großen Rhabdomerdurchmesser und der fehlenden Rh6-Markierung. Dieser Ommatidientyp war häufiger als die Typ I-Ommatidien vertreten. Die prozentuale Verteilung der Ommatidien variierte von Retina zu Retina.



**Abb. 4.1 Schematische Darstellung der vier Ommatidientypen in *sca/svp*-Augen**

Die äußeren Sehzellen sind in hellblau dargestellt, die inneren Photorezeptoren in grün. Typ I-Ommatidien besitzen sechs äußere und zwei zentrale Sehzellen in Wildtypanordnung. Typ II-Ommatidien haben eine zusätzliche äußere Sehzelle, die im Vergleich zu den anderen sechs äußeren Sehzellen etwas verkürzt ist, und nur eine zentrale Sehzelle. Diese zieht über die gesamte Länge der Retina. Typ III-Ommatidien besitzen sechs äußere Sehzellen und keine zentrale Sehzelle. Typ IV-Ommatidien haben ebenfalls keine zentrale Sehzelle, jedoch sie 7 äußere Photorezeptoren.

Diese verschiedenen Ommatidientypen waren laut Literatur nicht zu erwarten (Hiromi et al., 1993; Kramer et al., 1995; Chou et al., 1999). Durch diese Abweichung war jedoch eine interne Kontrolle in Form der Typ I-Ommatidien vorhanden.

#### 4.4 Modell zum Einfluss der zentralen Sehzellen R7 und R8 auf die Verdrehung der Rhabdomere

Verschiedene Beobachtungen an Wildtyp-Augen und Mutanten führten zu der Hypothese, dass die kleinen Sehzellen R7 und R8 eine Rolle in der Entwicklung der Rhabdomerverdrehung der äußeren Sehzellen R1-R6 spielen: Erstens ändern die Mikrovilli der Sehzellen R1-R6 in einem engen Bereich auf halber Ommatidienlänge die Kipprichtung, nahe dem Übergang von R7 zu R8 (Smola & Tscharrntke, 1979). Zudem erfolgt am Übergang von R7 zu R8 eine sprunghafte Zunahme der Markierungsintensität mit anti-PY, anti-pERK und anti-pJNK von distal nach proximal. Auch das räumliche Markierungsmuster mit diesen Antikörpern wechselt in diesem Bereich in den äußeren Sehzellen von einer Seite der Stielmembran auf die andere (Baumann & Lutz, 2006; vorliegende Arbeit).

Zweitens zeigen die Untersuchungen der Mutante *sev*<sup>14</sup> (ohne R7), dass sich in Abhängigkeit von der Position, die die Sehzelle R8 im Ommatidium einnimmt, die Kipprichtung der benachbarten Sehzellen ändert. Die Mikrovilli kippen fast immer in Richtung der R8-Sehzelle. Diese Abhängigkeit findet sich auch in einer Veränderung des Markierungsmusters mit anti-PY, anti-pERK und anti-pJNK im proximalen Retinabereich wieder. Der markierte Bereich der Stielmembran wechselt in den benachbarten Sehzellen auf die von R8 abgewandte Seite. Bei Ommatidien der *rl<sup>1</sup>/rl<sup>10a</sup>*-Mutante, denen die Sehzelle R7 fehlt, ist das gleiche Phänomen zu beobachten.

Diese Hypothese sollte in der vorliegenden Arbeit durch Analyse von *sea/syp*-Mutante überprüft werden. Es zeigte sich, dass das Fehlen von R8 zu einer unregelmäßigen Verdrehung der Rhabdomere führt. In dieser Mutante können vier verschiedene Ommatidientypen unterschieden werden (siehe 4.3, Abb. 4.1), die sich nicht nur in ihrer Morphologie sondern auch in der Kippwinkelrichtung und der Ausprägung der Kippwinkel in den äußeren Sehzellen unterscheiden.

In den Typ I-Ommatidien mit Anzahl und Anordnung der Photorezeptoren wie im Wildtyp stimmt auch die Kipprichtung für R1-R6 mit der im Wildtyp überein. Die Kippwinkel im proximalen Bereich der Retina scheinen etwas kleiner zu sein. Die Markierung mit anti-PY korreliert in diesen Ommatidien mit dem Kippverhalten der Mikrovilli.

Typ II-Ommatidien besitzen eine zusätzliche äußere Sehzelle. Diese ist jedoch etwas verkürzt und reicht nicht über die gesamte Länge der Retina. Es ist anzunehmen, dass es sich hierbei um die Sehzelle R8 handelt, die das Schicksal einer äußeren Sehzellen angenommen hat (R8'). Die Mikrovilli dieser ‚R8‘ Sehzellen kippen stets zur Kontaktstelle von R3/R4, wobei eine graduelle Zunahme des Kippwinkels zu beobachten ist. Aufgrund der genannten Besonderheiten dieser zusätzlichen äußeren Sehzelle und der trapezoidalen Anordnung der restlichen sechs äußeren Photorezeptoren ist eine Zuordnung von R1-R6 möglich. Die Analyse der Kippung zeigte, dass

R2-R6 eine Kipprichtung der Mikrovilli wie im Wildtyp aufweisen. Die Sehzelle R1 weist hingegen im Vergleich zum Wildtyp einen Unterschied auf. Die Kipprichtung verändert sich nicht von distal zu proximal, vielmehr kippen die Mikrovilli über die gesamte Länge der Retina weg von der R3/R4-Kontaktstelle (das entspricht der Kipprichtung der Mikrovilli im proximalen Bereich der Wildtyp-Retina). Auch in diesem Ommatidientyp scheinen die Mikrovilli im proximalen Bereich nicht so stark zu kippen. Zusätzlich haben diese Ommatidien eine zentrale Sehzelle, die über die gesamte Länge der Retina zieht. Die anti-PY-Markierung korreliert in den Typ II-Ommatidien, wo eine genaue Zuordnung der Sehzellen vorgenommen werden kann, mit dem Kippverhalten der Mikrovilli.

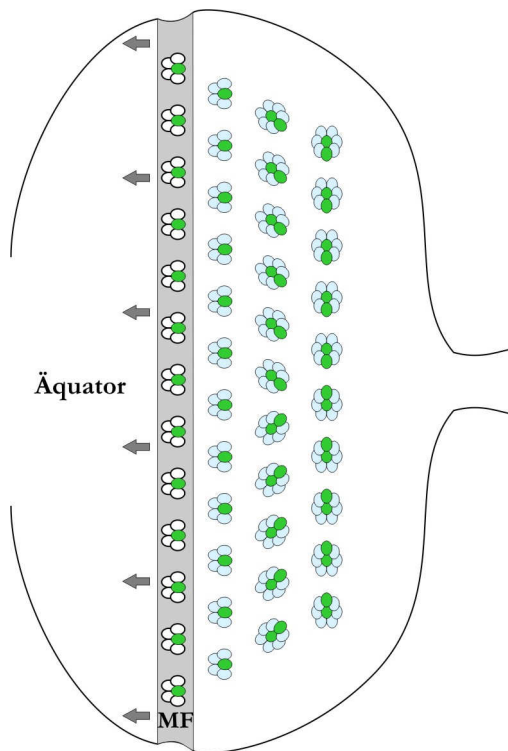
Typ III-Ommatidien besitzen keine zentralen Sehzellen sondern ausschließlich sechs äußere Photorezeptoren. Aufgrund der starken Beeinträchtigung in der ommatidialen Anordnung (meist symmetrisch bzw. wenn asymmetrisch, dann kein Trapez erkennbar) kann keine genaue Zuordnung von R1-R6 getroffen werden. Eine Aussage über die Kipprichtung der einzelnen Sehzellen im Vergleich zum Wildtyp kann somit nicht erfolgen. Für diese Mutante wurden deshalb Serienschritte angefertigt. Da die einzelnen Sehzellen in den verschiedenen Schnittebenen zugeordnet werden konnten, wurde untersucht, ob eine Kippung der Mikrovilli erfolgt und ob bzw. wie sich die Richtung von distal nach proximal ändert. Wenn R8 keinen Einfluss auf die Verdrehung der Rhabdomere von R1-R6 hat, wäre zu erwarten, dass die Mikrovilli in diesen Ommatidien jeweils in drei benachbarten Sehzellen in eine Richtung kippen und in den anderen drei Sehzellen in die andere Richtung. Dies sollte mit einer anti-PY-Markierung einhergehen, die jeweils in drei benachbarten Sehzellen auf einer Seite und in den anderen drei Sehzellen auf der gegenüberliegenden Seite zu finden ist. Es zeigte sich schon in der anti-PY-Markierung, dass das nicht der Fall ist. Anti-PY kann sowohl auf keiner als auch auf einer oder beiden Seiten der Stielmembran detektiert werden. Es wurde dementsprechend beobachtet, dass einzelne Rhabdomere der Sehzellen sich gar nicht verdrehen, während andere einen und manche sogar zwei Richtungswechsel aufweisen. Die Kippwinkel variieren von sehr klein bis groß. Dabei ist kein Zusammenhang zwischen der Anzahl der Wechsel in der Kipprichtung und der Größe der Kippwinkel zu erkennen. Eine Regelmäßigkeit in der räumlichen Markierung mit anti-PY sowie auch in der Kippung der Mikrovilli lässt sich nicht nachvollziehen.

Typ IV-Ommatidien besitzen sieben äußere Sehzellen. In diesen Ommatidien wäre zu erwarten, wenn R8 keinen Einfluss auf die Verdrehung der Rhabdomere von R1-R6 hat, dass die Mikrovilli zumindest in drei benachbarten Sehzellen in eine Richtung kippen. Die anderen drei Sehzellen würden durch die Position, die R8 als äußere Sehzelle einnimmt, getrennt. Dies müsste sich in der anti-PY-Markierung widerspiegeln, die in drei benachbarten Sehzellen auf einer Seite zu finden

sein sollte. Das war nicht der Fall. Auch in den Typ IV-Ommatidien zeigte sich, dass anti-PY sowohl auf keiner als auch auf einer oder beiden Seiten der Stielmembran detektiert werden kann und dass sich einige Rhabdomere gar nicht verdrehen, während andere einen bzw. zwei Richtungswechsel vollziehen. Die Kippwinkel sind unabhängig von der Anzahl der Richtungswechsel unterschiedlich stark ausgeprägt. Eine Regelmäßigkeit bezüglich anti-PY-Markierung und Mikrowillkippung ist nicht zu erkennen.

Auf der Grundlage der hier erbrachten Daten ist ein Modell für die Entwicklung der molekularen und morphologischen Polarisierung der Sehzellen R1-R6 vorstellbar, welches auf den Prozessen während der Entwicklung der Retina beruht. Bevor ich dieses Modell vorstelle, möchte ich deshalb die verschiedenen Schritte in der Augenentwicklung erläutern. Ich möchte vorab auch betonen, dass möglicherweise noch andere Modelle die Ergebnisse erklären können.

Wie oben (4.3) bereits kurz angedeutet, läuft die Rekrutierung der Photorezeptoren während der Entwicklung der Retina nach einem hoch geordneten Schema ab. Die Retina entwickelt sich ab dem dritten Larvenstadium aus einem einschichtigen hochprismatischen Epithel von identischen Zellen, der Augenimaginalscheibe (Ready et al., 1976; Tomlinson, 1985, 1988; Cagan & Ready, 1989; Basler & Hafen, 1991). Eine dorso-ventrale Eindellung der Augenimaginalscheibe, auch als morphogenetische Furche (MF) bezeichnet, trennt diese in einen anterioren, undifferenzierten Bereich und einen posterioren Bereich, in dem die Photorezeptoren bereits determiniert sind (Abb. 4.2). Wie eine Welle bewegt sich die MF von posterior nach anterior über die Augenimaginalscheibe. Die Differenzierung der Photorezeptoren beginnt in der MF mit der Spezifizierung der R8-Vorläuferzelle. Diese R8-Vorläuferzelle rekrutiert paarweise aus den benachbarten, undifferenzierten Zellen über Zell-Zell-Interaktionen zuerst die Sehzellen R2 und R5 und anschließend R3 und R4. Dieser Zustand wird auch als ommatidialer 5-Zell-*precluster* bezeichnet. Dieser *precluster* beginnt bereits mit dem ersten Schritt der Rotation um  $45^\circ$  (Review: Mlodzik, 1999). Ab dem Zeitpunkt der Rotation ist eine Unterscheidung der Ommatidien in dorsaler und ventraler Augenhälfte möglich, da sie sich spiegelbildlich zueinander anordnen mit R3/R4 jeweils in Richtung der Pole. Die Grenze zwischen den verschiedenen ausgerichteten Ommatidientypen wird als Äquator bezeichnet. Nach diesem Stadium des 5-Zell-*precluster* gibt es eine Pause von mehreren Stunden bevor nach der zweiten mitotischen Welle auch die Sehzellen R1 und R6 sowie abschließend R7 rekrutiert werden (Wolff & Ready, 1993). Die vollständige Rotation um  $90^\circ$  ist mittlerweile beendet.



**Abb. 4.2 Schematische Darstellung der Differenzierung der Photorezeptoren in der Augenheimaginalscheibe von *Drosophila***

(Schema nach Mlodzik, 1999)

MF – morphogenetische Furche

Weiß stellt die undifferenzierten Zellen des ommatidialen Clusters, hellblau die determinierten äußeren Sehzellen und grün die determinierten inneren Sehzellen dar. Die Differenzierung der Sehzellen erfolgt in verschiedenen Reihen nach der MF. Zur besseren Übersicht sind nicht alle Reihen dargestellt, sondern nur die mit den charakteristischen Stadien des Differenzierungsprozesses. Der Prozess der Differenzierung beginnt am posterioren Rand der Augenheimaginalscheibe und setzt sich nach anterior fort (Pfeile). Die R8-Sehzellen (grün) werden noch in der MF determiniert. Anschließend werden die Sehzellen R2/R5 und R3/R4 rekrutiert und es entsteht ein ommatidialer 5-Zell-*precluster*, der bereits mit der Rotation beginnt. Es folgt die Determination der Sehzellen R1/R6. Als letztes wird die Sehzelle R7 determiniert (Reihe 7). Die Rotation der Ommatidien ist hier beendet.

Zu diesem Zeitpunkt befindet sich der R8-Vorläufer in zentraler Position zwischen den Sehzellen R1 und R6 (Abb. 4.3). Nach der Differenzierung von R7 verlagert sich R8 in den proximalen Bereich der Sehzellgruppe und positioniert sich zwischen R1 und R2 (Longley & Ready, 1995). An die Determination der Sehzellen schließt sich die Rekrutierung der Kristallkegelzellen und - nach der Verpuppung – die der primären, sekundären und tertiären Pigmentzellen an (Tomlinson, 1988; Basler & Hafen, 1991; Reifegerste & Moses, 1999). Die Zellen der Augenheimaginalscheibe, die bis zu diesem Zeitpunkt nicht determiniert sind, werden durch gezielte Induzierung von Apoptose entfernt (Ready et al., 1976; Cagan & Ready, 1989). Im zweiten Teil der Augenentwicklung findet die Zellmorphogenese statt, bei der augenspezifische Strukturen wie Cornea, Kristallkegel und Rhabdomere gebildet werden. Die Dicke der Retina nimmt dabei von ca. 30  $\mu\text{m}$  auf über 120  $\mu\text{m}$  zu. Während des Wachstums der Retina setzt sich R7 über R8 (Cagan & Ready, 1989).

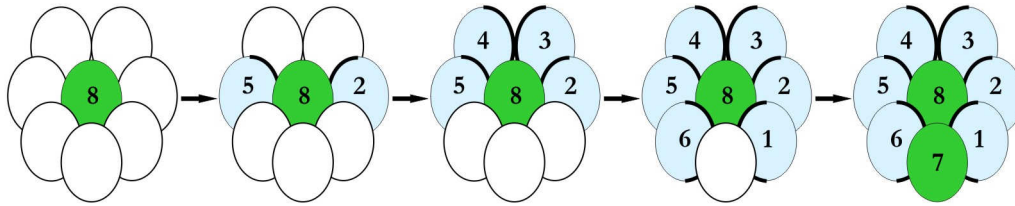
Unter den oben beschriebenen Bedingungen bei der Spezifizierung der Photorezeptoren hat folglich jede R1-R6 Vorläuferzelle auf einer Seite direkten Kontakt zu R8 (Abb. 4.3). Dadurch könnte eine molekulare Polarisierung von R1-R6 erfolgen, die diese in zwei Gruppen teilt. R1-R3 haben auf einer Seite mit R8 Kontakt und R4-R6 auf der anderen Seite (Abb. 4.3 A). Diese molekulare Polarisierung könnte die Grundlage für die spätere asymmetrische Verteilung der aktivierten Proteinkinasen pERK und pJNK und die morphologische Polarisierung in Form der Rhabdomerverdrehung bilden. Dass solch eine molekulare Asymmetrie erfolgen kann und für eine morphologische Polarisierung notwendig ist, ist z. B. für das Flügelepipithel von *Drosophila*



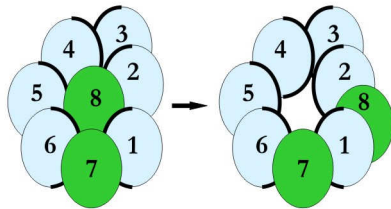
nachgewiesen (Review: Strutt, 2003; Fanto & McNeill, 2004; Jenny & Mlodzik, 2006). Dort reichern sich das integrale Membranprotein Frizzled (Fz) und sein cytoplasmatischer Interaktionspartner Dishevelled (Dsh) während der Epithelentwicklung auf der distalen Seite der Zelle an. Auf der proximalen Seite sind Strabismus (Stbm), ebenfalls ein Transmembranprotein, und Prickle, ein cytoplasmatisches Protein, konzentriert. Keines dieser Proteine ist jedoch an der anterioren oder posterioren Membran zu finden. Diese molekulare Asymmetrie wird für die korrekte Bildung und Ausrichtung eines Härchens am distalen Zellpol benötigt. Auch für das Auge von *Drosophila* ist eine derartige Polarisierung beschrieben (Review: Strutt, 2003; Fanto & McNeill, 2004; Jenny & Mlodzik, 2006). Die Polarität eines einzelnen Ommatidiums wird durch die Spezifizierung von R3 und R4 etabliert. Im 5-Zell-*precluster* ist die spätere R3-Sehzelle dichter an der Mittellinie (Äquator) als R4. Der Fz-Signalweg wird daraufhin in R3 stärker aktiviert als in R4. Dies führt letztendlich zu einer Akkumulation von Fz und Dsh in R3 auf der Membranseite mit R4-Kontakt, während Stbm in R4 an diesem R3/R4-Kontakt angereichert ist. In keiner der anderen Photorezeptoren oder in den umgebenden Zellen ist diese Asymmetrie zu finden.

Die Verlagerung der Sehzelle R8 von der Position zwischen R1 und R6 während der Spezifizierung der Photorezeptoren zu der Position zwischen R1 und R2 verändert für R1 die Seite der Interaktion mit R8 (Abb. 4.3 B). Ausgehend von dem Modell der Polarisierung von R1-R6 durch R8 sollten sich demzufolge für R1 die Seiten ändern und damit auch die molekulare und morphologische Polarisierung. Dies ist in *sev<sup>14</sup>*-Mutanten ohne die Sehzelle R7 der Fall. Verlagert R8 seine Position nicht, sondern bleibt zwischen R1 und R6, ist das Markierungsmuster der Proteinkinasen und die Verdrehung der Rhabdomere wie im Wildtyp. Nimmt R8 aber eine Position zwischen R1 und R2 ein, zeigt R1 eine veränderte molekulare und morphologische Polarisierung, d. h. pERK und pJNK wechseln auf die andere Seite der Stielmembran und die Mikrovilli kippen in die entgegengesetzte Richtung (Abb. 4.3 C). Auch in Ommatidien der *rl<sup>1</sup>/rl<sup>10a</sup>*-Mutante, denen die R7-Zelle fehlt, ist diese Umorientierung von R1 zu beobachten. In den seltenen Fällen wo R8 in den Ommatidien der *sev<sup>14</sup>*-Mutante eine Position zwischen R5 und R6 eingenommen hat, hat sich auch für die Sehzelle R6 eine Umorientierung auf molekularer und morphologischer Ebene gezeigt. Im Wildtyp kann diese Umorientierung nicht beobachtet werden. R1 zeigt keinen Unterschied zu den Photorezeptoren R2 und R3. Sowohl die Markierungen mit anti-pERK und anti-pJNK als auch die Kipprichtung der Mikrovilli sind auf der gleichen Seite wie bei R2 und R3. Auf der Grundlage dieser Ergebnisse ist es vorstellbar, dass die molekulare Polarisierung von R1-R6 durch R8 mit der Differenzierung der Sehzelle R7 beendet und fixiert wird. Eine spätere Verlagerung von R8 zwischen R1 und R2 würde dann keine Umorientierung der Sehzelle R1 zur Folge haben.

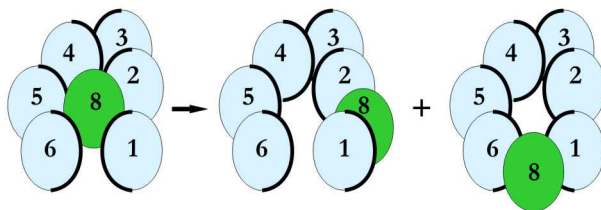
A Spezifizierung der Sehzellen im dritten Larvalstadium und Polarisierung der Sehzellen R1-R6



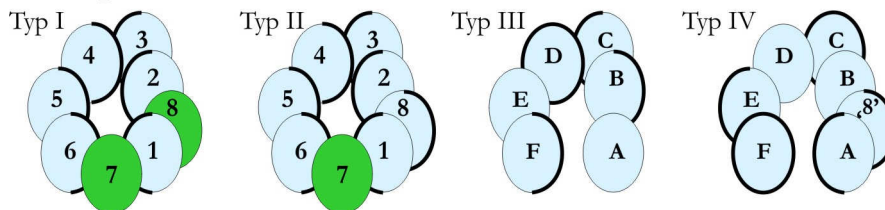
Fixierung der Polarisierung durch R7 und Verlagerung von R8 zwischen R1 und R2



B *sev<sup>14</sup>*-Mutanten ohne R7



C *sca/svp*-Mutanten



**Abb. 4.3 Modell für die Rolle von R7 und R8 bei der molekularen Polarisierung von R1-R6**

Weiß stellt die undifferenzierten Zellen des ommatidialen Clusters, hellblau die determinierten äußeren Sehzellen und grün die determinierten inneren Sehzellen dar. Die dicken schwarzen Linien auf einer Hälfte der äußeren Sehzellen sollen andeuten, dass die Zellen durch den Zell-Zell-Kontakt zu R8 zwei verschiedene Seiten besitzen. **A** Zeitlicher Ablauf der Determination der Sehzellen in der Augenimaginalscheibe. **B** Verlagerung der R8-Sehzelle von der zentralen Position zwischen R1 und R6 zu seiner Position im adulten Auge zwischen R1 und R2. **C** Einfluss des Fehlens von R7. Dargestellt sind die beiden Haupttypen von Ommatidien in *sev<sup>14</sup>*-Mutanten mit R8 zwischen R1 und R2 sowie mit R8 zwischen R1 und R6. **D** Auswirkungen des Fehlens von R8 bzw. wenn R8 das Schicksal einer äußeren Sehzelle annimmt. Es sind die vier Ommatidientypen dargestellt, die in der *sca/svp*-Mutante gefunden wurden.

Die Hypothese, dass R8 für die molekulare Polarisierung der äußeren Sehzellen R1-R6 verantwortlich ist, wird durch die Analyse der *sca/svp*-Mutanten unterstützt. Die vereinzelt Typ I-Ommatidien mit Anzahl und Anordnung der Sehzellen wie im Wildtyp wurden als interne Kontrolle verwendet. Sie zeigen, dass das Wildtyp-Muster hinsichtlich der molekularen als auch der morphologischen Asymmetrie in dieser Mutante ausgebildet werden kann. Typ III-Ommatidien, denen die kleinen Sehzellen R7 und R8 fehlen, weisen eine gestörte molekulare und morphologische Polarisierung auf. So ist mit anti-PY gar keine Markierung, die Markierung einer

Seite der Stielmembran oder beider Seiten zu finden. Ultrastrukturell ist nicht zu unterscheiden, wann es sich um Sehzellen handelt, die in der Immunocytochemie keine PY-Markierung oder eine PY-Markierung auf beiden Seiten der Stielmembran aufweisen. In beiden Fällen ist nämlich zu erwarten, dass die Mikrovilli nicht kippen. Wenn eine asymmetrische Markierung auf einer Seite der Stielmembran vorliegt, wäre zu erwarten, dass die Mikrovilli dieser Sehzellen kippen. Solche Sehzellen konnten auf ultrastruktureller Ebene nachgewiesen werden. Allerdings konnte keine Regelmäßigkeit im Markierungsmuster von anti-PY und dem Kippverhalten der Mikrovilli festgestellt werden.

Daraus lässt sich folgern, dass die Interaktionen der späteren Sehzellen R1-R6 mit R8 bei der Determination nicht ausreichend sind, um eine regelmäßige molekulare Asymmetrie aufzubauen. Vielmehr wird die molekulare Polarisierung von R1-R6 gestört, nimmt R8 vor der Spezifizierung von R7 das Schicksal einer äußeren Sehzelle an. Diese Erklärung wird durch die Typ II-Ommatidien unterstützt. In diesen Ommatidien hat R8 ebenfalls das Schicksal einer äußeren Sehzelle angenommen, aber erst nach der Rekrutierung von R7. Die äußeren Sehzellen R1-R6 zeigen weitestgehend eine normale molekulare und morphologische Polarisierung. Lediglich die Sehzelle R1 kippt abweichend vom Wildtyp im distalen Bereich der Retina in die gleiche Richtung wie im proximalen Bereich. Übereinstimmend damit, ist auch die Markierung mit anti-PY distal und proximal auf der gleichen Seite der Stielmembran. Möglicherweise hängt das mit der R8 Sehzelle zusammen, die fast über die gesamte Länge der Retina zieht.

Die Signale, die die Polarisierung von R1-R6 durch R8 vermitteln, sind bisher völlig unbekannt. Dieses Modell lässt zudem die Frage offen, warum auf halber Ommatidienlänge Intensität und Seite der Markierung wechseln und korrelierend damit die Kippwinkel und -richtung der Mikrovilli. Zusammenfassend lässt sich das Modell in folgende Schritte unterteilen:

1. Rekrutierung der äußeren Sehzellen R1-R6 durch R8
2. Polarisierung von R1-R6 durch R8
3. Rekrutierung der zentralen Sehzelle R7 durch R8
4. Fixierung der Polarität von R1-R6 durch R7 im dritten Larvenstadium.
- :
- n. Ausführung der Mikrovillikippung in der späten Puppenphase

## 5. Literaturverzeichnis

- Adachi-Yamada T, Nakamura M, Irie K, Tomoyasu Y, Sano Y, Mori E, Goto S, Ueno N, Nishida Y, Matsumoto K.** (1999) p38 mitogen-activated protein kinase can be involved in transforming growth factor beta superfamily signal transduction in *Drosophila* wing morphogenesis. *Mol Cell Biol.* 19(3):2322-2329.
- Adams MD, et al.** (2000) The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science.* 287(5461):2185-2195.
- Adler PN.** (1992) The genetic control of tissue polarity in *Drosophila*. *Bioessays.* 14(11):735-741.
- Adler PN, Charlton J, Vinson C.** (1987) Allelic variation at the frizzled locus of *Drosophila*. *Dev. Genet.* 8(2): 99-119.
- Ahn NG, Seger R, Krebs EG.** (1992) The mitogen-activated protein kinase activator. *Curr Opin Cell Biol.* 4(6):992-999.
- Altner I, Burkhardt D.** (1981) Fine structure of the ommatidia and the occurrence of rhabdomeric twist in the dorsal eye of male *Bibio marci* (Diptera, Nematocera, Bibionidae). *Cell Tissue Res.* 215(3):607-623.
- Anderson DH.** (2006) Role of lipids in the MAPK signaling pathway. *Prog Lipid Res.* 45(2):102-119.
- Arikawa K, Hicks JL, Williams DS.** (1990) Identification of actin filaments in the rhabdomeral microvilli of *Drosophila* photoreceptors. *J Cell Biol.* 110(6):1993-1998.
- Ashworth A, Nakielny S, Cohen P, Marshall C.** (1992) The amino acid sequence of a mammalian MAP kinase kinase. *Oncogene.* 7(12):2555-2556.
- Baker NE.** (2001) Cell proliferation, survival, and death in *Drosophila* eye. *Semin Cell Dev Biol.* 12(6):499-507.
- Baker NE, Mlodzik M, Rubin GM.** (1990) Spacing differentiation in the developing *Drosophila* eye: a fibrinogen-related lateral inhibitor encoded by *scabrous*. *Science.* 250:1370-1377.
- Basler K, Hafen E.** (1988) Control of photoreceptor cell fate by the sevenless protein requires a functional tyrosine kinase domain. *Cell.* 54(3):299-311.
- Basler K, Hafen E.** (1991) Specification of cell fate in the developing eye of *Drosophila*. *Bioessays.* 13(12):621-631.
- Baumann O.** (2004) Spatial pattern of nonmuscle myosin-II distribution during the development of the *Drosophila* compound eye and implications for retinal morphogenesis. *Dev Biol.* 269(2):519-533.
- Baumann O, Führer K.** (2003) Rhabdomere Twisting: planar cell polarity of each individual R1-R6 photoreceptor within the *Drosophila* eye. *EUR J Cell Biol.* 82:78-79.

- Baumann O, Lutz K.** (2006) Photoreceptor morphogenesis in the *Drosophila* compound eye: R1-R6 rhabdomeres become twisted just before eclosion. *J Comp Neurol.* 498(1):68-79.
- Biggs WH 3<sup>rd</sup>, Zipursky SL.** (1992) Primary structure, expression, and signal-dependent tyrosine phosphorylation of a *Drosophila* homolog of extracellular signal-regulated kinase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 89(14):6295-6299.
- Biggs WH 3<sup>rd</sup>, Zavitz KH, Dickson B, van der Straten A, Brunner D, Hafen E, Zipursky SL.** (1994) The *Drosophila* rolled locus encodes a MAP kinase required in the sevenless signal transduction pathway. *EMBO J.* 13(7):1628-1635.
- Bonini NM, Fortini ME.** (1999) Surviving *Drosophila* eye development: integrating cell death with differentiation during formation of neural structure. *Bioessays.* 21(12):991-1003.
- Boutros M, Paricio N, Strutt DI, Mlodzik M.** (1998) Dishevelled activates JNK and discriminates between JNK pathways in planar polarity and *wingless* signaling. *Cell.* 94(1):109-118.
- Bowtell DD, Simon MA, Rubin GM.** (1988) Nucleotide sequence and structure of the sevenless gene of *Drosophila melanogaster*. *Genes Dev.* 2(6):620-634.
- Brand AH, Perrimon N.** (1993) Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development.* 118(2):401-415.
- Brand AH, Perrimon N.** (1994) Raf acts downstream of the EGF receptor to determine dorsoventral polarity during *Drosophila* oogenesis. *Genes Dev.* 8(5):629-639.
- Brennan CA, Moses K.** (2000) Determination of *Drosophila* photoreceptors: timing is everything. *Cell Mol Life Sci.* 57(2):195-214.
- Brewster JL, de Valoir T, Dwyer ND, Winter E, Gustin MC.** (1993) An osmosensing signal transduction pathway in yeast. *Science.* 259(5102):1760-1763.
- Britt SG, Feiler R, Kirschfeld K, Zuker CS.** (1993) Spectral tuning of rhodopsin and metarhodopsin in vivo. *Neuron.* 11(1):29-39.
- Brunner D, Labhart T.** (1987) Behavioural evidence for polarization vision in crickets. *Physiol Entomol.* 12(1):1-10.
- Brunner D, Oellers N, Szabad J, Biggs WH 3<sup>rd</sup>, Zipursky SL, Hafen E.** (1994) A gain-of-function mutation in *Drosophila* MAP kinase activates multiple receptor tyrosine kinase signalling pathways. *Cell.* 76(5):875-888.
- Cagan RL, Ready DF.** (1989) The emergence of order in the *Drosophila* pupal retina. *Dev Biol.* 136(2):346-62.
- Carlson SD, Chi C.** (1979) The functional morphology of the insect photoreceptor. *Annu Rev Entomol.* 24:379-416
- Chang L, Karin M.** (2001) Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature.* 410(6824):37-40.
- Choi K-Y, Satterberg B, Lyons DM, Elion EA.** (1994) Ste5 tethers multiple protein kinases in the MAP kinase cascade required for mating in *S. cerevisiae*. *Cell.* 78(3):499-512.

- Chou WH, Hall KJ, Wilson DB, Wideman CL, Townson SM, Chadwell LV, Britt SG.** (1996) Identification of a novel *Drosophila* opsin reveals specific patterning of the R7 and R8 photoreceptor cells. *Neuron*. 17(6):1101-1115.
- Chou WH, Huber A, Bentrop J, Schulz S, Schwab K, Chadwell LV, Paulsen R, Britt SG.** (1999) Patterning of the R7 and R8 photoreceptor cells of *Drosophila*: evidence for induced and default cell-fate specification. *Development*. 126(4):607-616.
- Cook T, Pichaud F, Sonnevile R, Papatsenko D, Desplan C.** (2003) Distinction between color photoreceptor cell fates is controlled by Prospero in *Drosophila*. *Dev Cell*. 4:853-864.
- Corson LB, Yamanaka Y, Lai KM, Rossant J.** (2003) Spatial and temporal patterns of ERK signaling during mouse embryogenesis. *Development*. 130(19):4527-4537.
- Crews C, Alessandrini A, Erikson R.** (1992) The primary structure of MEK, a protein kinase that phosphorylates the ERK gene product. *Science*. 258(5081):478-480.
- Dabdoub A, Donohue MJ, Brennan A, Wolf V, Montcouquiol M, Sassoon DA, Hsieh JC, Rubin JS, Salinas PC, Kelley MW.** (2003) Wnt signaling mediates reorientation of outer hair cell stereociliary bundles in the mammalian cochlea. *Development*. 130(11):2375-2384.
- Dabdoub A, Kelley MW.** (2005) Planar cell polarity and a potential role for a Wnt morphogen gradient in stereociliary bundle orientation in the mammalian inner ear. *J Neurobiol*. 64(4):446-457.
- Dancker P, Löw I, Hasselbach W, Wieland T.** (1975) Interaction of actin with phalloidin: polymerization and stabilization of F-actin. *Biochim Biophys Acta*. 400(2):407-414.
- Dard N, Peter M.** (2006) Scaffold proteins in MAP kinase signaling: more than simple passive activating platforms. *Bioessays*. 28(2):146-156.
- de Couet HG, Tanimura T.** (1987) Monoclonal antibodies provide evidence that rhodopsin in the outer rhabdomeres of *Drosophila melanogaster* is not glycosylated. *Eur J Cell Biol*. 44:50-56.
- Dérjard B, Hibi M, Wu IH, Barrett T, Su B, Deng T, Karin M, Davis RJ.** (1994) JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell*. 76(6):1025-1037.
- Domingos PM, Brown S, Barrio R, Ratnakumar K, Frankfort BJ, Mardon G, Steller H, Mollereau B.** (2004) Regulation of R7 and R8 differentiation by the spalt genes. *Dev Biol*. 273:121-133.
- Duffy JB.** (2002) GAL4 system in *Drosophila*: a fly geneticist's Swiss army knife. *Genesis*. 34(1-2):1-15.
- Eaton S.** (1997) Planar polarization of *Drosophila* and vertebrate epithelia. *Curr Opin Cell Biol*. 9(6):860-866.
- Elliott DA, Brand AH.** (2008) The GAL4 system: a versatile system for the expression of genes. *Methods Mol Biol*. 420:79-95.
- Errede B, Cade RM, Yashar BM, Kamada Y, Levin DE, Irie K, Matsumoto K.** (1995) Dynamics and organization of MAP kinase signal pathways. *Mol Reprod Dev*. 42(4):477-485.



- Fan Y, Bergmann A.** (2008) Apoptosis-induced compensatory proliferation. The cell is dead. Long live the cell! *Trends Cell Biol.* 18(10):467-473.
- Fanto M, McNeill H.** (2004) Planar polarity from flies to vertebrates. *J Cell Sci.* 117(Pt 4):527-533.
- Feiler R, Harris WA, Kirschfeld K, Wehrhahn C, Zuker CS.** (1988) Targeted misexpression of a *Drosophila* opsin gene leads to altered visual function. *Nature.* 333(6175):737-741.
- Feiler R, Bjornson R, Kirschfeld K, Mismer D, Rubin GM, Smith DP, Socolich M, Zuker CS.** (1992) Ectopic expression of ultraviolet-rhodopsins in the blue photoreceptor cells of *Drosophila*: visual physiology and photochemistry of transgenic animals. *J Neurosci.* 12(10):3862-3868.
- Fernald RD.** (2000) Evolution of eyes. *Curr Opin Neurobiol.* 10(4):444-450.
- Formstecher E, Ramos JW, Fauquet M, Calderwood DA, Hsieh JC, Canton B, Nguyen XT, Barnier JV, Camonis J, Ginsberg MH, Chneiweiss H.** (2001) PEA-15 mediates cytoplasmic sequestration of ERK MAP kinase. *Dev Cell.* 1(2):239-250.
- Fortini ME, Rubin GM.** (1990) Analysis of cis-acting requirements of the Rh3 and Rh4 genes reveals a bipartite organization to rhodopsin promoters in *Drosophila melanogaster*. *Genes Dev.* 4(3):444-463.
- Fortini ME, Rubin GM.** (1991) The optic lobe projection pattern of polarization-sensitive photoreceptor cells in *Drosophila melanogaster*. *Cell Tissue Res.* 265(1):185-191.
- Franceschini N, Kirschfeld K, Minke B.** (1981) Fluorescence of photoreceptor cells observed in vivo. *Science* 213:1264-1267.
- Frankfort BJ, Mardon G.** (2002) R8 development in the *Drosophila* eye: a paradigm for neural selection and differentiation. *Development.* 129(6):1295-1306.
- Frankfort BJ, Nolo R, Zhang Z, Bellen H, Mardon G.** (2001) senseless repression of rough is required for R8 photoreceptor differentiation in the developing *Drosophila* eye. *Neuron.* 32:403-414.
- Frankfort BJ, Pepple KL, Mamlouk M, Rose MF, Mardon G.** (2004) Senseless is required for pupal retinal development in *Drosophila*. *Genesis.* 38:182-194.
- Freeman M.** (1994) The spitz gene is required for photoreceptor determination in the *Drosophila* eye where it interacts with the EGF receptor. *Mech. Dev.* 48(1):25-33.
- Freeman M.** (1997) Cell determination strategies in the *Drosophila* eye. *Development.* 124(2):261-270.
- Fryxell KJ, Meyerowitz EM** (1987) An opsin gene that is expressed only in the R7 photoreceptor cell of *Drosophila*. *EMBO J.* 6(2):443-451.
- Fukunaga R, Hunter T.** (1997) MNK1, a new MAP kinase-activated protein kinase, isolated by a novel expression screening method for identifying protein kinase substrates. *EMBO J.* 16(8):1921-1933.

- Führer K.** (2004) Untersuchungen zum „Rhabdomere Twisting“ im Auge von *Drosophila melanogaster* - Charakterisierung von Marker-Proteinen und Analyse von Mutanten. Diplomarbeit, Universität Potsdam.
- Gerlitz O, Nellen D, Ottiger M, Basler K.** (2002) A screen for genes expressed in *Drosophila* imaginal discs. *Int J Dev Biol.* 46(1):173-176.
- Giniger E, Varnum SM, Ptashne M.** (1985) Specific DNA binding of GAL4, a positive regulatory protein of yeast. *Cell.* 40(4):767-774.
- Glenney JR Jr, Zokas L, Kamps MP.** (1988) Monoclonal antibodies to phosphotyrosine. *J Immunol Methods.* 109(2):277-285.
- Grigliatti TA, Hall L, Rosenbluth R, Suzuki DT** (1973) Temperature-sensitive mutations in *Drosophila melanogaster*. XIV. A selection of immobile adults. *Mol. Gen. Genet.* 120: 107-114.
- Gonzalez FA, Raden DL, Rigby MR, Davis RJ.** (1992) Heterogeneous expression of four MAP kinase isoforms in human tissues. *FEBS Lett.* 304(2-3):170-178.
- Gonzalez FA, Seth A, Raden DL, Bowman DS, Fay FS, Davis RJ.** (1993) Serum-induced translocation of mitogen-activated protein kinase to the cell surface ruffling membrane and the nucleus. *J Cell Biol.* 122(5):1089-1101.
- Gubb D, Garcia-Bellido A.** (1982) A genetic analysis of the determination of cuticular polarity during development in *Drosophila melanogaster*. *J Embryol Exp Morph.* 68:37-57.
- Guichard A, Srinivasan S, Zimm G, Bier E.** (2002) A screen for dominant mutations applied to components in the *Drosophila* EGF-R pathway. *Proc Natl Acad Sci USA.* 99(6):3752-3757.
- Gustafson K, Boulianne GL.** (1996) Distinct expression patterns detected within individual tissues by the GAL4 enhancer trap technique. *Genome.* 39(1):174-182.
- Gustin MC, Albertyn J, Alexander M, Davenport K.** (1998) MAP kinase pathways in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev.* 62:1264-1300.
- Hafen E, Basler K, Edstroem JE, Rubin GM.** (1987) *sevenless*, a cell-specific homeotic gene of *Drosophila*, encodes a putative transmembrane receptor with a tyrosine kinase domain. *Science.* 236(4797):55-63.
- Hafen E, Dickson B, Raabe T, Brunner D, Oellers N, van der Straten A.** (1993). Genetic analysis of the *sevenless* signal transduction pathway of *Drosophila*. *Dev Suppl.* 41-6.
- Han J, Lee J-D, Bibbs L, Ulevitch RJ.** (1994) A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science.* 265(5173):808-811.
- Hardie RC.** (1985) Functional organization of the fly retina. In: Progress in sensory physiology. Editors: Autrum H, Ottoson D, Perl ER, Schmidt RF, Shimazu H, Willis WD. Berlin: Springer Verlag. 1-79.
- Hardie RC.** (1986) The photoreceptor array of the dipteran retina. *Trends Neurosci.* 9:419-423.

- Harris WA, Stark WS, Walker JA.** (1976) Genetic dissection of the photoreceptor system in the compound eye of *Drosophila melanogaster*. *J Physiol.* 256(2):415-439.
- Hazelrigg T, Levis R, Rubin GM.** (1984) Transformation of white locus DNA in *Drosophila*: dosage compensation, zeste interaction, and position effects. *Cell.* 36(2):469-81.
- Hibi M, Lin A, Smeal T, Minden A, Karin M.** (1993) Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain. *Genes Dev.* 7(11):2135-2148.
- Hiromi Y, Mlodzik M, West SR, Rubin GM, Goodman CS.** (1993) Ectopic expression of seven-up causes cell fate changes during ommatidial assembly. *Development.* 118:1123-1135.
- Huber A, Schulz S, Bentrop J, Groell C, Wolfrum U, Paulsen R.** (1997) Molecular cloning of *Drosophila* Rh6 rhodopsin: the visual pigment of a subset of R8 photoreceptor cells. *FEBS Lett.* 406 (1-2):6-10.
- Hunter T.** (2009) Tyrosine phosphorylation: thirty years and counting. *Curr Opin Cell Biol.* 21(2):140-146.
- Jenny A, Mlodzik M.** (2006) Planar cell polarity signaling: a common mechanism for cellular polarization. *Mt Sinai J Med.* 73(5):738-750.
- Johnson GL, Lapadat R.** (2002) Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science.* 298(5600):1911-1912.
- Jones KH, Liu J, Adler PN.** (1996) Molecular analysis of EMS-induced *frizzled* mutations in *Drosophila melanogaster*. *Genetics.* 142(1):205-215.
- Karim FD, Rubin GM.** (1999) PTP-ER, a novel tyrosine phosphatase, functions downstream of Ras1 to downregulate MAP kinase during *Drosophila* eye development. *Mol Cell.* 3(6):741-750.
- Kirschfeld K, Feiler R, Minke B.** (1978) The kinetics of formation of metarhodopsin in intact photoreceptors of the fly. *Z Naturforsch C.* 33(11-12):1009-1010.
- Kirschfeld K, Vogt K.** (1986) Does retinol serve a sensitizing function in insect photoreceptors? *Vision Res.* 26(11):1771-7.
- Kondoh K, Torii S, Nishida E.** (2005) Control of MAP kinase signaling to the nucleus. *Chromosoma.* 114(2):86-91.
- Kosako H, Gotoh Y, Matsuda S, Ishikawa M, Nishida E.** (1992) *Xenopus* MAP kinase activator is a serine/threonine/tyrosine kinase activated by threonine phosphorylation. *EMBO J.* 11(8):2903-2908.
- Kramer S, West SR, Hiromi Y.** (1995) Cell fate control in the *Drosophila* retina by the orphan receptor seven-up: its role in the decisions mediated by the ras signaling pathway. *Development.* 121:1361-1372.
- Krämer H, Cagan RL, Zipursky SL.** (1991) Interaction of *bride of sevenless* membrane-bound ligand and the *sevenless* tyrosine-kinase receptor. *Nature.* 352(6332):207-212.

- Kumar JP, Ready DF.** (1995) Rhodopsin plays an essential structural role in *Drosophila* photoreceptor development. *Development*. 121(12):4359-4370.
- Kumar JP, Hsiung F, Powers MA, Moses K.** (2003) Nuclear translocation of activated MAP kinase is developmentally regulated in the developing *Drosophila* eye. *Development*. 130(16):3703-3714.
- Kunes S, Steller H.** (1993) Topography in the *Drosophila* visual system. *Curr Opin Neurobiol*. 3(1):53-59.
- Kyriakis JM, Banerjee P, Nikolakaki E, Dai T, Rubie EA, Ahmad MF, Avruch J, Woodgett JR.** (1994) The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature*. 369(6476):156-160.
- Kühl M, Sheldahl LC, Park M, Miller JR, Moon RT.** (2000) The Wnt/Ca<sup>2+</sup> pathway: a new vertebrate Wnt signaling pathway takes shape. *Trends Genet*. 16(7):279-283.
- Labhart T, Meyer EP.** (1999) Detectors for polarized skylight in insects: a survey of ommatidial specializations in the dorsal rim area of the compound eye. *Microsc Res Tech*. 47(6):368-379.
- Laughlin SB.** (1981) Neural principles in the peripheral visual systems of invertebrates. In: Handbook of sensory physiology, VII:6B. Editor: Autrum H. Berlin: Springer Verlag. 133-280.
- Laughon A, Driscoll R, Wills N, Gesteland RF.** (1984) Identification of two proteins encoded by the *Saccharomyces cerevisiae* GAL4 gene. *Mol Cell Biol*. 4(2):268-275.
- Laughon A, Gesteland RF.** (1984) Primary structure of the *Saccharomyces cerevisiae* GAL4 gene. *Mol Cell Biol*. 4(2):260-267.
- Lee KS, Irie K, Gotoh Y, Watanabe Y, Araki H, Nishida E, Matsumoto K, Levin DE.** (1993) A yeast mitogen-activated protein kinase homolog (Mpk1p) mediates signalling by protein kinase C. *Mol Cell Biol*. 13(5):3067-3075.
- Lee JC, Laydon JT, McDonnell PC, Gallagher TF, Kumar S, Green D, McNulty D, Blumenthal MJ, Heys JR, Landvatter SW, Strickler JE, McLaughlin MM, Siemens IR, Fisher SM, Livi GP, White JR, Adams JL, Young PR.** (1994) A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature*. 372(6508):739-746.
- Lewis TS, Shapiro PS, Ahn NG.** (1998) Signal transduction through MAP kinase cascades. *Adv Cancer Res*. 74:49-139.
- Longley RL Jr., Ready DF.** (1995) Integrins and the development of the three-dimensional structure in the *Drosophila* compound eye. *Dev Biol*. 171(2):415-433.
- Madreperla SA, Edidin M, Adler R.** (1989) Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-adenosine triphosphatase polarity in retinal photoreceptors: a role for cytoskeletal attachments. *J Cell Biol*. 109(4 Pt 1):1483-1493.
- Marais R, Wynne J, Treisman R.** (1993) The SRF accessory protein Elk-1 contains a growth factor-regulated transcriptional activation domain. *Cell*. 73(2):381-393.
- Marcus S, Polverino A, Barr M, Wigler M.** (1994) Complexes between STE5 and components of the pheromone-responsive MAPK-module. *Proc Natl Acad Sci USA*. 91(16):7762-7766.

- McEwen DG, Peifer M.** (2000) Wnt signaling: moving in a new direction. *Curr Biol.* 10(15):R562-R564.
- Menzel R, Blakers M.** (1975) Functional organization of an insect ommatidium with fused rhabdoms. *Cytobiologie.* 11:279-298.
- Mlodzik M, Hiromi Y, Weber U, Goodman CS, Rubin GM.** (1990) The *Drosophila seven-up* gene, a member of the steroid receptor superfamily, controls photoreceptor cell fates. *Cell.* 60:211-224.
- Mlodzik M.** (1999) Planar polarity in the *Drosophila* eye: a multifaceted view of signaling specificity and cross-talk. *EMBO J.* 18(24):6873-6879.
- Mlodzik M.** (2002) Planar cell polarization: do the same mechanisms regulate *Drosophila* tissue polarity and vertebrate gastrulation? *Trends Genet.* 18(11):564-571.
- Montell C, Jones K, Zuker C, Rubin GM.** (1987) A second opsin gene expressed in the ultraviolet-sensitive R7 photoreceptor cells of *Drosophila melanogaster*. *J Neurosci.* 7(5):1558-1566.
- Moreno E, Basler K, Morata G.** (2002) Cells compete for decapentaplegic survival factor to prevent apoptosis in *Drosophila* wing development. *Nature.* 416(6882):755-759.
- Moses K.** (2002) *Drosophila* eye development. Editor: Moses K. Berlin Springer Verlag.
- Nagaraj R, Banerjee U.** (2004) The little R cell that could. *Int J Dev Biol.* 48(8-9):755-760.
- Nelson WJ, Veshnock PJ.** (1986) Dynamics of membrane-skeleton (fodrin) organization during development of polarity in Madin-Darby canine kidney epithelial cells. *J Cell Biol.* 103(5):1751-1765.
- Nilsson DE, Labhart T, Meyer EP.** (1987) Photoreceptor design and optical properties affecting polarization sensitivity in ants and crickets. *J Comp Physiol A.* 161:645-658.
- Noselli S, Agnes F.** (1999) Roles of the JNK signaling pathway in *Drosophila* morphogenesis. *Curr Opin Genet Dev.* 9(4):466-472.
- Nübler-Jung K.** (1987) Insect epidermis: disturbance of supracellular tissue polarity does not prevent the expression of cell polarity. *Roux's Arch Dev Biol.* 196:286-289.
- O'Tousa JE, Baehr W, Martin RL, Hirsh J, Pak WL, Applebury ML.** (1985) The *Drosophila* ninaE gene encodes an opsin. *Cell.* 40(4):839-850.
- Papatsenko D, Sheng G, Desplan C.** (1997) A new rhodopsin in R8 photoreceptors of *Drosophila*: evidence for coordinate expression with Rh3 in R7 cells. *Development.* 124(9):1665-1673.
- Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, Cobb MH.** (2001) Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocrine Reviews.* 22(2):153-183.
- Philips MR.** (2004) Sef: a MEK/ERK catcher on the Golgi. *Mol Cell.* 15(2):168-169.

- Pichaud F, Desplan C.** (2001) A new visualization approach for identifying mutations that affect differentiation and organization of the *Drosophila* ommatidia. *Development*. 128(6):815-826.
- Pickup AT, Lamka ML, Sun Q, Yip ML, Lipshitz HD.** (2002) Control of photoreceptor cell morphology, planar polarity and epithelial integrity during *Drosophila* eye development. *Development*. 129(9):2247-2258.
- Ready DF, Hanson TE, Benzer S.** (1976) Development of the *Drosophila* retina, a neurocrystalline lattice. *Dev Biol*. 53(2):217-240.
- Reifegerste R, Moses K.** (1999) Genetics of epithelial polarity and pattern in the *Drosophila* retina. *Bioessays*. 21(4):275-285.
- Riesgo-Escovar JR, Jenni M, Fritz A, Hafen E.** (1996) The *Drosophila* Jun-N-terminal kinase is required for cell morphogenesis but not for Djun-dependent cell fate specification in the eye. *Genes Devel*. 10(21):2759-2768.
- Rouse J, Cohen P, Trigon S, Morange M, Alonso-Llamazares A, Zamanillo D, Hunt T, Nebreda AR.** (1994) A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins. *Cell*. 78(6):1027-1037.
- Sang TK, Ready DF.** (2002) Eyes closed, a *Drosophila* p47 homolog, is essential for photoreceptor morphogenesis. *Development*. 129(1):143-154.
- Salomon AR, Ficarro SB, Brill LM, Brinker A, Phung QT, Ericson C, Sauer K, Brock A, Horn DM, Schultz PG, Peters EC.** (2003) Profiling of tyrosine phosphorylation pathways in human cells using mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci USA*. 100(2):443-448.
- Satoh AK, O'Tousa JE, Ozaki K, Ready DF.** (2005) Rab11 mediates post-Golgi trafficking of rhodopsin to the photosensitive apical membrane of *Drosophila* photoreceptors. *Development*. 132(7):1487-1497.
- Schweisguth F.** (2005) Temporal regulation of planar cell polarity: insights from the *Drosophila* eye. *Cell*. 121(4):497-499.
- Shvartsman SY, Coppey M, Berezchkovskii AM.** (2009) MAPK signaling in neurons and embryos. *Fly (Austin)*. 3(1):62-67.
- Sluss HK, Han Z, Barrett T, Goberdhan DC, Wilson C, Davis RJ, Ip YT.** (1996) A JNK signal transduction pathway that mediates morphogenesis and an immune response in *Drosophila*. *Genes Dev*. 10(21):2745-2758.
- Smola U, Tscharrntke H.** (1979) Twisted rhabdomeres in the dipteran eye. *J Comp Physiol A*. 133(4):291-297
- Snyder AW, McIntyre P.** (1975) Polarization sensitivity of twisted fused rhabdoms. In: Photoreceptor optics. Editors: Snyder AW, Menzel R. Berlin: Springer Verlag. 388-391.
- Strutt D.** (2003) Frizzled signalling and cell polarisation in *Drosophila* and vertebrates. *Development*. 130(19):4501-4513.



- Strutt DI, Mlodzik M.** (1995) Ommatidial polarity in the *Drosophila* eye is determined by the direction of furrow progression and local interactions. *Development*. 121(12):4247-4256.
- Strutt DI, Weber U, Mlodzik M.** (1997) The role of RhoA in tissue polarity and Frizzled signalling. *Nature*. 387(6630):292-295.
- Sturgill TW, Wu J.** (1991) Recent progress in characterization of protein kinase cascades for phosphorylation of ribosomal protein S6. *Biochim Biophys Acta*. 1092(3):350-357.
- Suzuki E, Hirosawa K** (1991) Immunoelectron microscopic study of the opsin distribution in the photoreceptor cells of *Drosophila melanogaster*. *J Electron Microsc (Tokyo)*. 40(3):187-192.
- Suzuki E, Katayama E, Hirosawa K.** (1993) Structure of photoreceptive membranes of *Drosophila* compound eyes as studied by quick-freezing electron microscopy. *J Electron Microsc (Tokyo)*. 42(3):178-184.
- Tomlinson A.** (1985) The cellular dynamics of pattern formation in the eye of *Drosophila*. *J Embryol Exp Morphol*. 89:313-331.
- Tomlinson A.** (1988) Cellular interactions in the developing *Drosophila* eye. *Development*. 104(2):183-193.
- Tomlinson A, Bowtell DD, Hafen E, Rubin GM.** (1987) Localization of the *sevenless* protein, a putative receptor for positional information, in the eye imaginal disc of *Drosophila*. *Cell*. 51(1):143-150.
- Tomlinson A, Strapps WR, Heemskerk J.** (1997) Linking Frizzled and Wnt signaling in *Drosophila* development. *Development*. 124(22):4515-4521.
- Torii S, Kusakabe M, Yamamoto T, Maekawa M, Nishida E.** (2004) Sef is a spatial regulator for Ras/MAP kinase signaling. *Dev Cell*. 7(1):33-44.
- Vinson CR, Adler PN.** (1987) Directional non-cell autonomy and the transmission of polarity information by the frizzled gene of *Drosophila*. *Nature*. 329(6139):549-551.
- Vinson CR, Conover S, Adler PN.** (1989) A *Drosophila* tissue polarity locus encodes a protein containing seven transmembrane domains. *Nature*. 338(6212):263-264.
- von Frisch K.** (1949) Die Polarisation des Himmelslichtes als orientierender Faktor bei den Tänzchen der Bienen. *Experientia*. 5(4):142-148.
- von Philipsborn A, Labhart T.** (1990) A behavioural study of polarization vision in the fly, *Musca domestica*. *J Comp Physiol A*. 167(6):737-743.
- Waddington CH, Perry MM** (1960) The ultrastructure of the developing compound eye of *Drosophila*. *Proc R Soc London B*. 153:155-178.
- Wang T, Montell C.** (2007) Phototransduction and retinal degeneration in *Drosophila*. *Pflugers Arch*. 454(5):821-847.
- Waskiewicz AJ, Flynn A, Proud CG, Cooper JA.** (1997) Mitogen-activated protein kinases activate the serine-threonine kinase Mnk1 and Mnk2. *EMBO J*. 16(8):1909-1920.

- Weber U, Paricio N, Mlodzik M.** (2000) Jun mediates Frizzled-induced R3/R4 cell fate distinction and planar polarity determination in the *Drosophila* eye. *Development*. 127(16):3619-3629.
- Wehner R.** (1989) Neurobiology of polarization vision. *Trends Neurosci*. 12(9):353-359.
- Wehner R, Bernard GD.** (1993) Photoreceptor twist: a solution to the false-color problem. *Proc Natl Acad Sci USA*. 90(9):4132-4135.
- Wehner R, Bernard GD, Geiger E.** (1975) Twisted and non-twisted rhabdoms and their significance for polarization detection in the bee. *J Comp Physiol*. 104:225-245.
- Wehner R, Strasser S.** (1985) The POL area of the honey bee's eye: behavioural evidence. *Physiol Entomol*. 10(3):337-349.
- Wernet MF, Labhart T, Baumann F, Mazzoni EO, Pichaud F, Desplan C.** (2003) Homothorax switches function of *Drosophila* photoreceptors from color to polarized light sensors. *Cell*. 115(3):267-279.
- Whitehurst AW, Robinson FL, Moore MS, Cobb MH.** (2004) The death effector domain protein PEA-15 prevents nuclear entry of ERK2 by inhibiting required interactions. *J Biol Chem*. 279(13):12840-12847.
- Williams DS.** (1981) Twisted rhabdomeres in the compound eye of a tipulid fly (Diptera). *Cell Tissue Res*. 217(3):625-632.
- Winter CG, Wang B, Ballew A, Royou A, Karess R, Axelrod JD, Luo L.** (2001) *Drosophila* Rho-associated kinase (Drok) links Frizzled-mediated planar cell polarity signaling to the actin cytoskeleton. *Cell*. 105(1):81-91.
- Wodarz A, Nusse R.** (1998) Mechanisms of Wnt signaling in development. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 14:59-88.
- Wolff T, Ready DF.** (1991) Cell death in normal and rough eye mutants of *Drosophila*. *Development*. 113(3):825-839.
- Wolfrum U.** (1991) Distribution of F-actin in the compound eye of the blowfly, *Calliphora erythrocephala* (Diptera, Insecta). *Cell Tissue Res*. 263(2):399-403.
- Wu J, Harrison JK, Vincent LA, Haystead C, Haystead TAJ, Michel H, Hunt DF, Lynch KR, Sturgill TW.** (1993) Molecular structure of a protein-tyrosine/threonine kinase activating p42 mitogen-activated protein (MAP) kinase: MAP kinase kinase. *Proc Natl Acad Sci USA*. 90(1):173-177.
- Wunderer H, Smola U.** (1982a) Fine structure of ommatidia at the dorsal eye margin of *Calliphora erythrocephala* Meigen (Diptera: Calliphoridae): an eye region specialised for the detection of polarized light. *Int J Insect Morphol Embryol*. 11:25-38.
- Wunderer H, Smola U.** (1982b) Morphological differentiation of the central visual cells R7/8 in various regions of the blowfly eye. *Tissue Cell*. 14(2):341-358.
- Yasuda J, Whitmarsh AJ, Cavanagh J, Sharma M, Davis RJ.** (1999) The JIP group of mitogen-activated protein kinase scaffold proteins. *Mol Cell Biol*. 19(10):7245-7254.

**Zheng L, Zhang J, Carthew RW.** (1995) *frizzled* regulates mirror-symmetric pattern formation in the *Drosophila* eye. *Development*. 121(9):3045-3055.

**Zuker CS, Montell C, Jones K, Laverly T, Rubin GM.** (1987) A rhodopsin gene expressed in photoreceptor cell R7 of the *Drosophila* eye: homologies with other signal-transducing molecules. *J Neurosci*. 7(5):1550-1557.

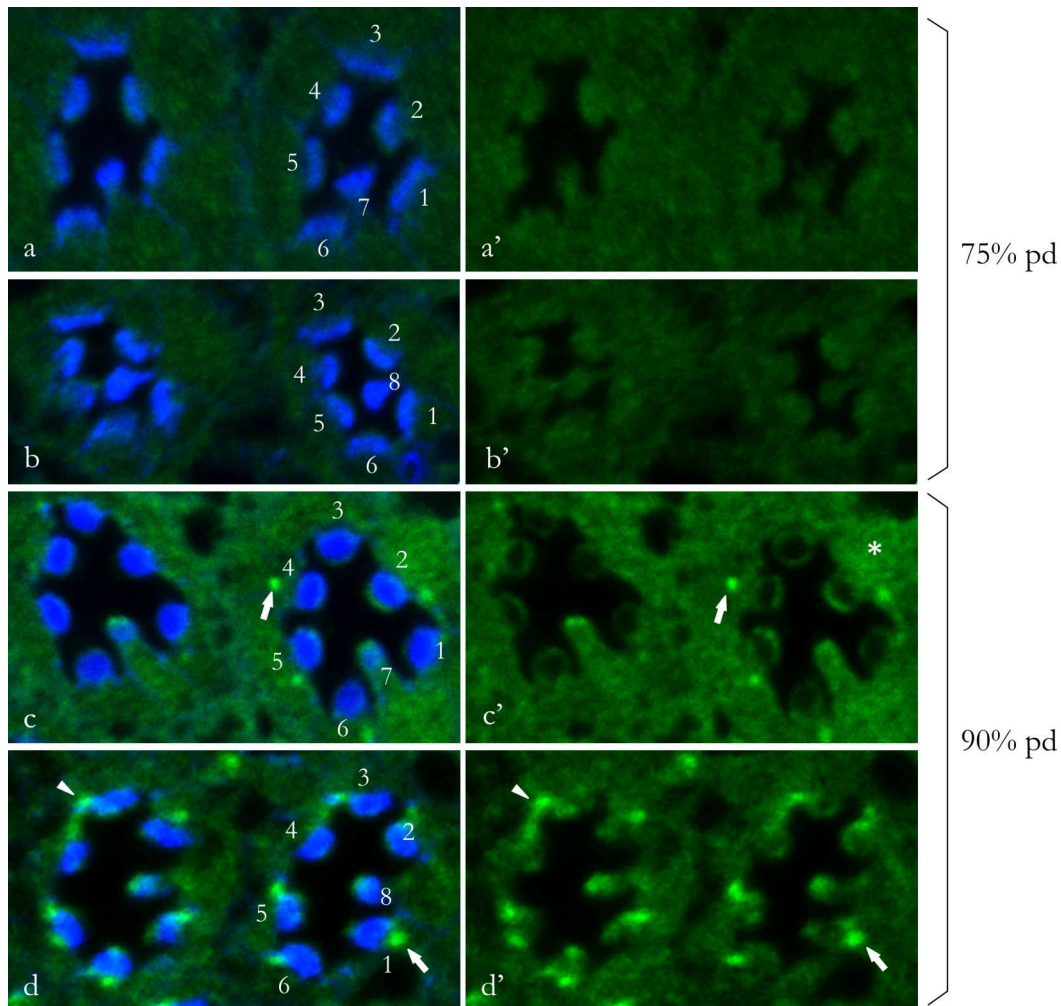
### **Internetadressen**

Flybase Consortium: <http://flybase.org/>

The Interactive Fly: <http://www.sdbonline.org/fly/aimain/1aahome.htm>

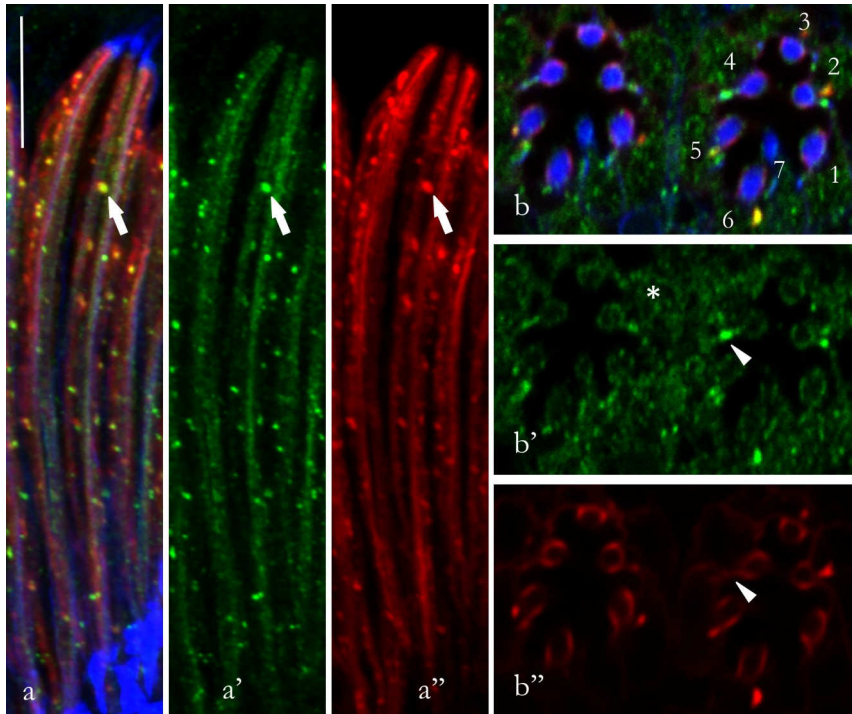
## 6. Anhang

Da die Antikörper gegen die phosphorylierten Formen von ERK und JNK im Bereich der Stielmembran identische Markierungsmuster produzieren, sind im Ergebnisteil nur die Abbildungen mit anti-pERK dargestellt. Im Folgenden sind die entsprechenden Abbildungen für anti-pJNK gezeigt.



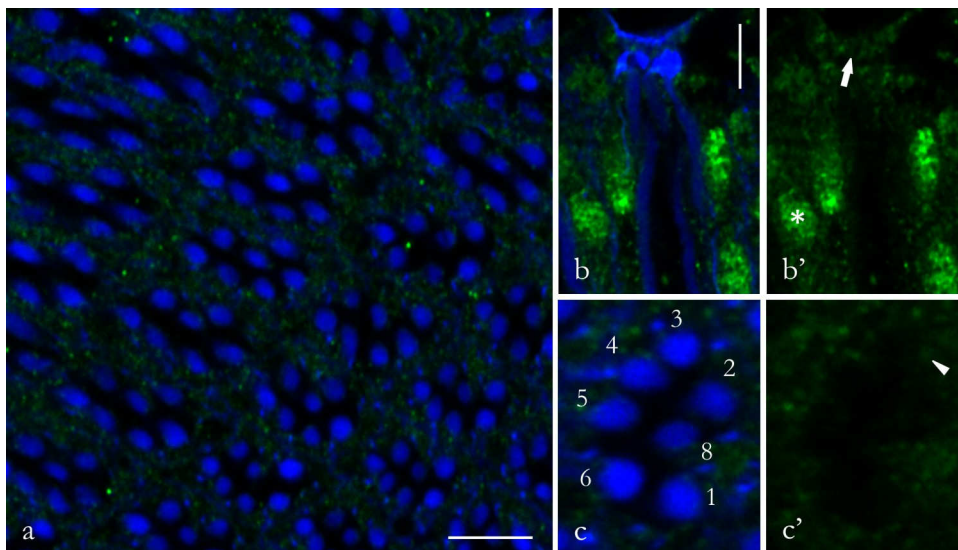
**Abb. 6.1 Zeitliche Entwicklung der Asymmetrie an der Stielmembran**

Doppelmarkierung an Gefrierschnitten von *Drosophila* WT-Retina bei **a, b** 75% pd und bei **c, d** 90% pd mit anti-pJNK (grün) und Phalloidin (blau). Während bei 75% pd mit anti-pJNK das Cytoplasma sowohl **a'** distal als auch **b'** proximal nur eine schwache Markierung aufweist, kann bei 90% pd zumindest **d'** proximal Immunreaktivität an der Stielmembran detektiert werden (Pfeilspitzen). Des Weiteren sind in diesem Entwicklungsstadium **c'** distal und **d'** proximal vesikuläre Strukturen im Cytoplasma immunpositiv (Pfeile). \* - Zellkern.



**Abb. 6.2 Die pJNK-positiven vesikulären Strukturen kolokalisieren mit Rhodopsin-haltigen Vesikeln**

Dreifachmarkierung an Gefrierschnitten von *Drosophila* WT-Retina bei 90% pd mit anti-pJNK (grün), anti-Rhodopsin 1 (rot) und Phalloidin (blau). **a, a' a''** Die für dieses Entwicklungsstadium typischen vesikulären Strukturen sind über die gesamte Länge eines Ommatidium verteilt. Sie werden sowohl mit dem Antikörper gegen pJNK als auch mit dem Antikörper gegen Rhodopsin 1 markiert (Pfeil). Deutlich wird dies in der Überlagerung durch die gelbe Färbung. **b, b' b''** Im Querschnitt ist zu erkennen, dass die Vesikel meist in der Nähe der Rhabdomerbasis, in der Nähe der Stielmembran zu finden sind. An der Stielmembran selber ist jedoch nur pJNK-Immunreaktivität zu detektieren (Pfeilspitze). Da dieser Querschnitt in der Ebene der Zellkerne (\*) liegt, ist für pJNK eine stärkere Färbung des Cytoplasmas zu sehen. Balken = 10  $\mu$ m.

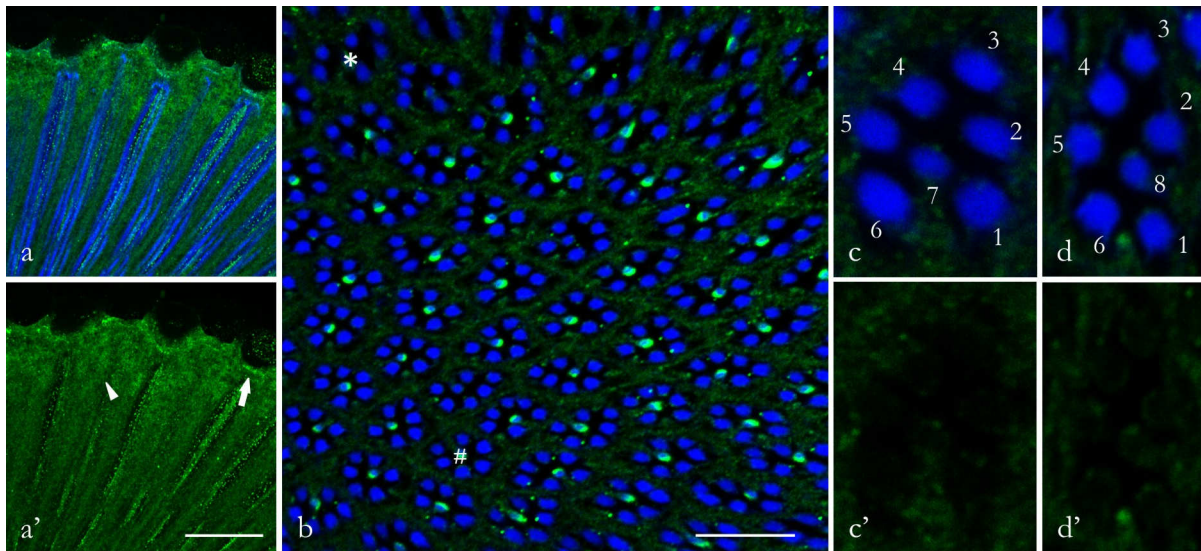


**Abb. 6.3 Präinkubation mit anti-PY verhindert Markierung mit anti-pJNK an der Stielmembran**

Doppelmarkierung an Gefrierschnitten von *Drosophila* WT-Retina mit anti-pJNK (grün) und Phalloidin (blau). Gefrierschnitte wurden vor der normalen Antikörperbehandlung mit anti-PY präinkubiert. **a** Im schrägen Anschnitt in der Übersichtsaufnahme ist zu sehen, dass die leichte Hintergrundfärbung im Cytoplasma unverändert ist, während die Markierung an der Stielmembran nicht mehr nachgewiesen

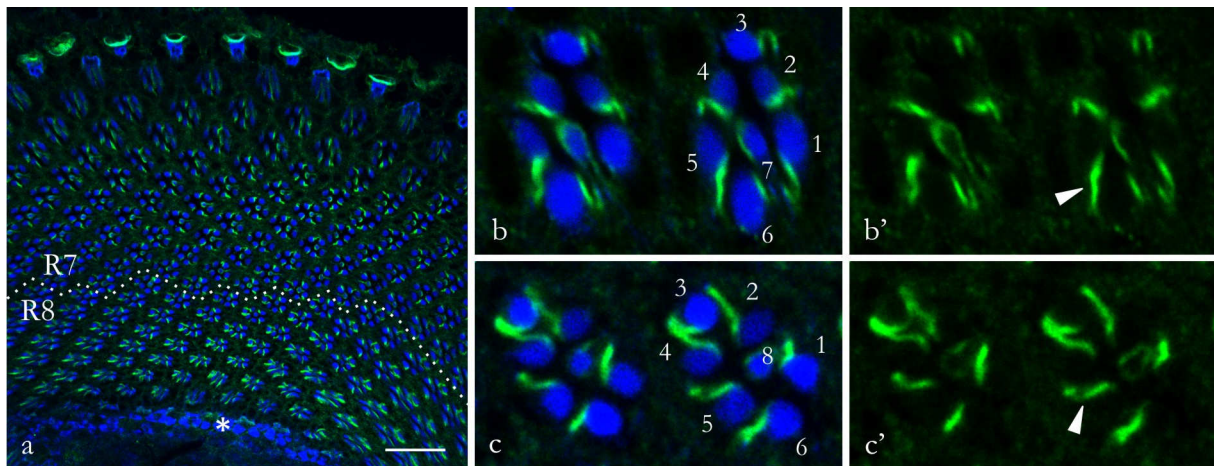


werden kann. **b, b'** Im Längsschnitt ist zu sehen, dass an den Kristallkegelzellen ebenfalls keine Markierung mehr nachgewiesen werden kann, während sie in den Zellkernen (\*) sehr intensiv ist. **c, c'** Detailaufnahmen vom proximalen Bereich eines Ommatidiums. Balken = 5  $\mu\text{m}$



**Abb. 6.4 Die Markierung mit anti-pJNK in *fz*<sup>15</sup>-Augen**

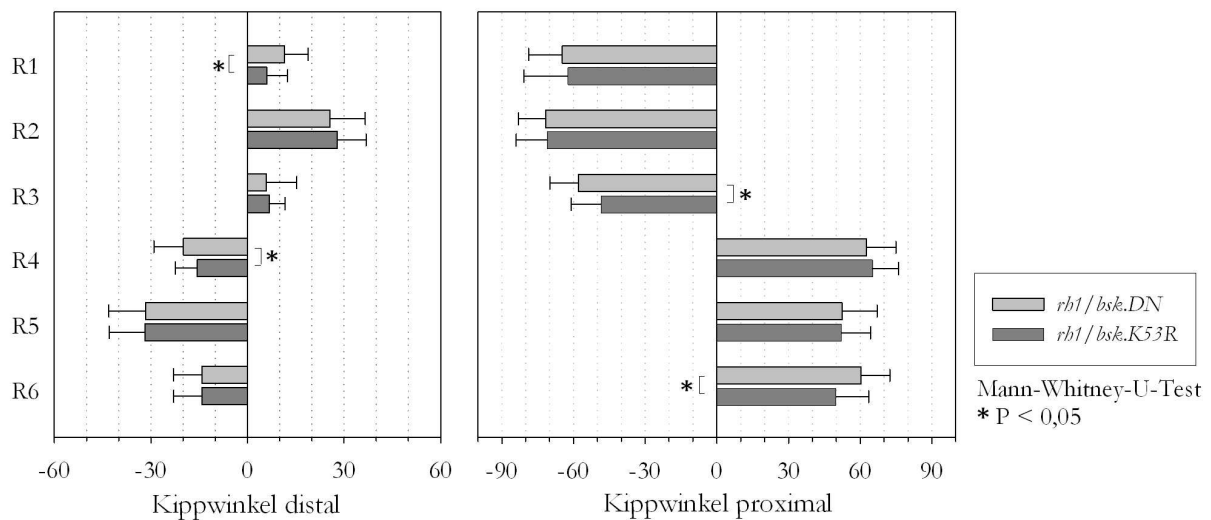
Doppelmarkierung an Gefrierschnitten von *Drosophila fz*<sup>15</sup>-Retina mit anti-pJNK (grün) und Phalloidin (blau). **a, a'** Im Längsschnitt ist eine Markierung von pJNK an den Kristallkegelzellen (Pfeil) und den Zellkernen (Pfeilspitze) zu erkennen. **b** Im Schrägschnitt ist zu sehen, dass die normale Anordnung der Ommatidien gestört ist. \* - Ommatidium, das nicht vollständig rotiert ist, # - symmetrisches Ommatidium. Oftmals sind die Mikrovilli der inneren Sehzellen intensiv gefärbt. **c, c'** Detailaufnahme eines Ommatidiums im distalen Bereich und **d, d'** im proximalen Bereich der Retina. Im Bereich der Stielmembran der äußeren Photorezeptoren (1-6) kann keine pJNK-Immunreaktivität detektiert werden. Balken = 10  $\mu\text{m}$ .



**Abb. 6.5 Die Markierung mit anti-PY in adulten *rh1/bsk.K53R*-Augen**

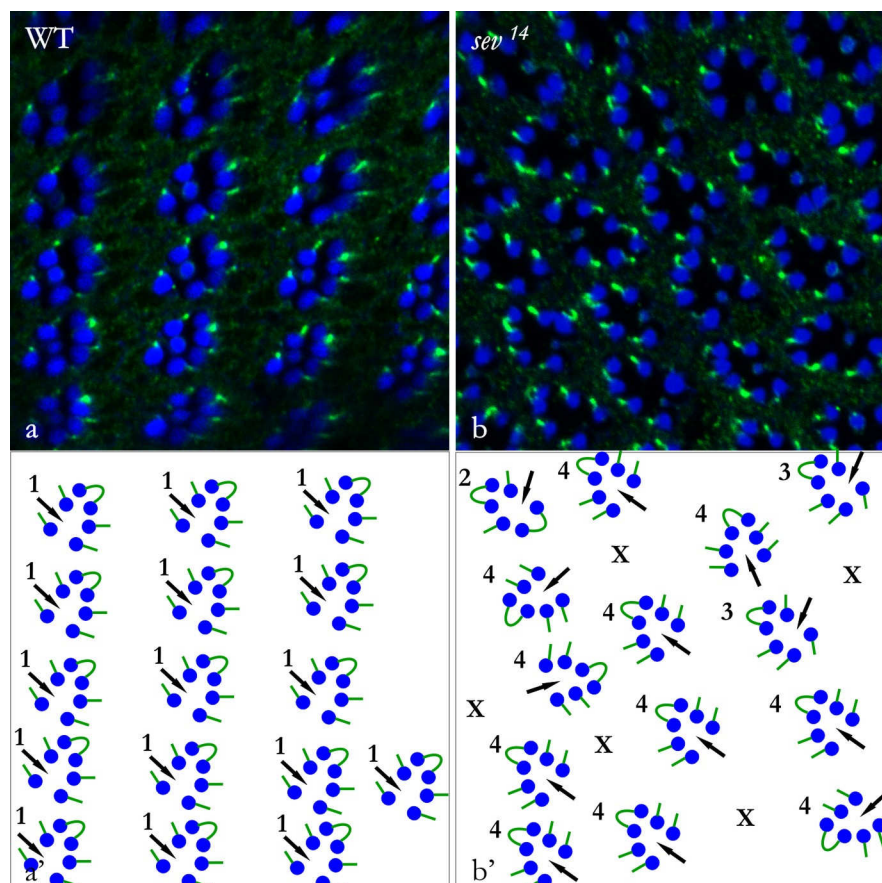
Doppelmarkierung an Gefrierschnitten von adulten *Drosophila rh1/bsk.K53R*-Augen mit anti-PY (grün) und Phalloidin (blau). **a** Übersichtsaufnahme mit Anschnitten von Ommatidien im distalen (R7) und proximalen (R8) Bereich. Die Intensitätsänderung der Markierung auf halber Ommatidienlänge (...) ist nur schwach ausgeprägt. Vielmehr scheint der Übergang von R7 zu R8 ineinander überzugehen. Detailaufnahmen von Ommatidien im distalen **b, b'** und proximalen **c, c'** Bereich der Retina zeigen, dass die Markierungsintensität distal kaum von proximal zu unterscheiden ist (Pfeilspitzen). Das räumliche Muster ist hingegen nicht verändert. Balken = 20  $\mu\text{m}$ .





**Abb. 6.6 Analyse der Mikrovillikippwinkel in den äußeren Sehzellen der *rh1/bsk.DN*- und der *rh1/bsk.K53R*-Kreuzung.**

Die Daten zeigen die Mittelwerte  $\pm$  SD von Messungen an 112-131 Photorezeptoren (je  $R_n$ ) in sechs *rh1/bsk.DN*-Augen sowie 64-80 Photorezeptoren in vier *rh1/bsk.K53R*-Augen. Die Kippwinkel der meisten Photorezeptoren sind sowohl distal als auch proximal nicht zwischen den beiden Kreuzungen, in denen jeweils die Kinaseaktivität reduziert wurde, zu unterscheiden.



**Abb. 6.7 Das räumliche Markierungsmuster von pJNK in der *sev<sup>14</sup>*-Mutante**

Doppelmarkierung an Gefrierschnitten von adulten **a** *Drosophila* Wildtyp und **b** *sev<sup>14</sup>*-Augen mit anti-pJNK (grün) und Phalloidin (blau). Darunter sind die entsprechenden Schemata **a'**, **b'** abgebildet. Der schwarze Pfeil indiziert die Position von R8. Die blauen Kreise entsprechen den Rhabdomeren von R1-R6 während die grünen Striche die Seite der pJNK-Markierung darstellen. X sind Ommatidien mit weniger als 7 Photorezeptoren im Querschnitt. Diese wurden nicht zur Analyse des Markierungsmusters in der Mutante herangezogen.

# Danksagung

Zuallererst möchte ich mich ganz herzlich bei meinen Eltern bedanken, die es mir mit ihrer Unterstützung ermöglicht haben, diesen Weg zu gehen.

Ich danke Prof. Dr. Otto Baumann für die Überlassung dieses spannenden Themas und die ausgezeichnete Betreuung meiner Arbeit. Ausdrücklich möchte ich mich für die stete Gesprächsbereitschaft und die wertvollen Anregungen bedanken, mit denen er mein selbständiges wissenschaftliches Arbeiten förderte.

Des Weiteren möchte ich mich bei Prof. Dr. Uwe Homberg, Prof. Dr. Armin Huber und Prof. Dr. Thomas Labhart für die Bereitschaft meine Dissertation zu begutachten bedanken.

Ein großes Dankeschön geht an die gesamte Arbeitsgruppe Zoophysiologie für die tolle Arbeitsatmosphäre.

Insbesondere danke ich Prof. Dr. Bernd Walz für seine Erklärungsbereitschaft zu allen physiologischen Fragestellungen und PD Dr. Wolfgang Blenau für den tollen Ausgleich beim Tischtennis.

Ich möchte mich bei Bärbel Wuntke für die zahlreichen Tipps und Tricks im Umgang mit dem *Drosophila*-Auge sowie bei technischen Fragestellungen bedanken.

Weiterhin gilt mein Dank meinen Mitstreitern in guten wie in schlechten Zeiten: die Mädels von oben Cathleen Rotte, Bettina Schewe und Britta Troppmann; das Jungsbüro mit Markus Thamm, Lennart Fechner und Kristoffer Heindorff und mein Mädelsbüro mit Stefanie Blankenburg, Katrin Kalitzki und Claudia Röser. Auch außerhalb der Labore haben wir so manche Stunde unvergessen gemacht.

Nicht zu vergessen sind natürlich die „Alt“-Doktoranden, die mit zahlreichen Tipps zur Seite standen: Carsten Hille, Ruth Schmidt, Piotr Kos, Christian Krach, Julia Rein und Martin Voss.

Auch bei den Mitgliedern des Graduiertenkollegs 837 „*Functional Insect Science*“ möchte ich mich für die Gemeinschaft bei Vorträgen, Meetings und Klausurtagungen bedanken. In diesem Zusammenhang sei der *Deutschen Forschungsgemeinschaft* für das Stipendium gedankt.

Ich möchte all meinen Freunden danken, die immer verstanden haben, wenn ich mal wieder knapp mit der Zeit war und mich nicht so oft gemeldet habe, wie ich wollte.

Abschließend möchte ich meinem Freund Michael für seine Unterstützung und sein Verständnis in dieser doch sehr arbeitsreichen Zeit danken.

# Curriculum vitae

## Persönliche Daten

Name	Jeannine Witte
Geburtstag	25.08.1981
Geburtsort	Nauen

## Wissenschaftlicher Werdegang

seit 12/2006	Promotionsstudium in der AG Zoophysiologie der Universität Potsdam Stipendiatin im Graduiertenkolleg 837 „Functional Insect Science“
02/2006 – 11/2006	Diplomarbeit in der AG Zoophysiologie der Universität Potsdam „GABAerge Innervierung der Speicheldrüse von <i>Periplaneta americana</i> “
10/2001 – 11/2006	Studium der Biologie an der Universität Potsdam Abschluss: Diplom-Biologin

## Schulausbildung

08/1994 – 07/2001	Goethe-Gymnasium Nauen Abschluss: Abitur
09/1988 – 07/1994	Wilhelm-Pieck-Grundschule Nauen

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Dissertation selbständig ohne die Hilfe Dritter und nur mit den angegebenen Quellen und Hilfsmitteln angefertigt zu haben. Diese Arbeit hat in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Hochschule vorgelegen.

Potsdam, den 02. Dezember 2009

Jeannine Witte