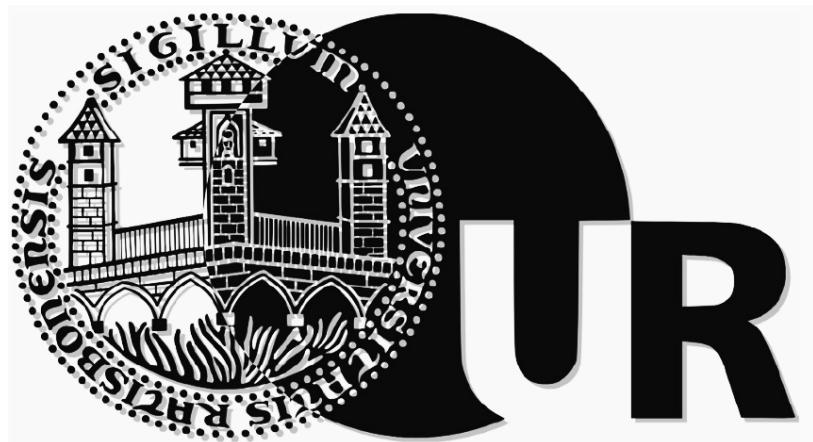


UNTERSUCHUNG ZUR FUNKTION UND BEDEUTUNG DER ABC-TRANSPORTER IN *DROSOPHILA MELANOGASTER*



DISSERTATION ZUR ERLANGUNG
DES DOKTORGRADES DER NATURWISSENSCHAFTEN (DR. RER. NAT.)
DER FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

VORGELEGT VON
ELISABETH OHMANN
AUS REGENSBURG
IM JAHR 2010

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht im September 2010.

Die Arbeit wurde angeleitet von Prof. Dr. Stephan Schneuwly.

Unterschrift:

Prüfungsausschuss: Prof. Dr. Erhard Strohm (Vorsitzender)

Prof. Dr. Stephan Schneuwly (erster Gutachter)

Prof. Dr. Frank Sprenger (zweiter Gutachter)

Prof. Dr. Joachim Ruther (dritter Prüfer)

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	8
1 Einleitung	10
1.1 Funktion und Bedeutung der ABC-Transporter	10
1.2 Die Pigmentierung der Augen in <i>Drosophila melanogaster</i>	12
1.2.1 An der Pigmentierung des Komplexauges beteiligte Enzyme	14
1.2.2 Die ABC-Transporter White, Scarlet und Brown	15
1.2.3 Der AP-3-Komplex und seine Funktion	16
1.2.4 VPS- und Rab-Proteine in <i>Drosophila</i>	17
1.2.5 Sonstige Proteine, welche die Pigmentierung der Augen beeinflussen	18
1.3 Malpighische Gefäße, die Exkretionsorgane von <i>Drosophila melanogaster</i>	19
1.4 Riboflavin, das gelbe Pigment in den Malpighischen Gefäßen	20
1.5 Struktur und Funktion von Lipiden	21
1.5.1 Fettsäuren	21
1.5.2 Triglyceride und Sterole	22
1.5.3 Phospholipide und Sphingomyelin	23
1.5.4 Die Funktion von Lipiden in Biomembranen	25
1.5.5 Möglichkeiten zur Detektion von Lipiden	27
1.5.6 Die Bedeutung von <i>Drosophila melanogaster</i> für die Lipidforschung	27
1.6 Zielsetzung dieser Arbeit	29
2 Material	30
2.1 Organismen	30
2.1.1 Bakterienstämme	30
2.1.2 Fliegenstämme	30
2.1.2.1 Wildtypstämme	30
2.1.2.2 Mutanten	30
2.1.2.3 RNAi-Linien	32
2.1.2.4 Treiber, Balancer und weitere Stämme	33
2.2 Medien	34
2.3 Vektoren	34
2.4 Oligonukleotide	35
2.5 Antikörper	36
2.6 Kitsysteme	36
2.7 Puffer und Lösungen	36
2.8 Größenstandards und Enzyme	37
2.9 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	37
3 Methoden	38
3.1 Molekularbiologische Methoden	38
3.1.1 Plasmid-Minipräparation (alkalische Lyse)	38
3.1.2 Spaltung von DNA durch Restriktionsenzyme	38
3.1.3 Dephosphorylierung von Vektoren	38
3.1.4 Elektrophoretische Auftrennung von DNA	38
3.1.5 Ligation	38
3.1.6 Hitzeschocktransformation von <i>E. coli</i>	39

3.1.7 Polymerasekettenreaktion (PCR).....	39
3.1.7.1 Standard-PCR	39
3.1.7.2 Sequenzierung.....	39
3.1.8 RNA-Isolierung	39
3.1.9 Qualitätskontrolle der RNA	40
3.1.10 Reverse Transkription	40
3.1.11 TaqMan-PCR	40
3.2 Keimbahntransformation	41
3.2.1 Mikroinjektion	41
3.2.2 Selektion der transformierten Fliegen.....	41
3.2.3 Balancierung der Fliegenstämme.....	41
3.3 Histologie.....	41
3.3.1 Präabsorption der primären Antikörper.....	41
3.3.2 Antikörperfärbung von Ganzpräparaten (<i>whole mounts</i>)	41
3.3.2.1 Larvale Gewebe.....	41
3.3.2.2 Gehirne adulter Fliegen	42
3.3.3 Antikörperfärbung von Kryostatschnitten.....	42
3.3.4 Paraffinschnitte	42
3.3.5 DAPI-Färbung	43
3.4 Pigment-Extraktion	43
3.4.1 Extraktion von Xanthommatin	43
3.4.2 Extraktion von Drosopterin	43
3.5 Lipidanalysen	43
3.5.1 Homogenisierung und Proteinbestimmung	43
3.5.2 Dünnschichtchromatographie (DC).....	44
3.5.3 Gaschromatographie (GC)	44
3.5.4 Massenspektrometrie (MS).....	45
3.6 Riboflavin-Experimente	45
3.6.1 Messung des Riboflavingehalts.....	45
3.6.1.1 <i>Bacillus subtilis</i> Wachstumstest	45
3.6.1.2 Fluorimeter	46
3.6.2 Riboflavintransport	46
3.6.3 Lebensspanne	46
3.7 Auswertung	46
4 Ergebnisse.....	47
4.1 Charakterisierung der ABC-Transporter White, Scarlet und Brown	47
4.1.1 Pigmentanalysen von <i>white</i> -, <i>scarlet</i> - und <i>brown</i> -Mutanten.....	47
4.1.2 Herstellung von p[UAS- <i>brown</i>] und p[UAS- <i>white</i>]	48
4.1.3 Rettung der Augenpigmentierung	49
4.1.4 Charakterisierung von RNAi- <i>white</i> , - <i>scarlet</i> und - <i>brown</i>	51
4.1.5 Expression von White, Scarlet und Brown	52
4.1.6 Funktion von White, Scarlet und Brown in den Malpighischen Gefäßen	54
4.1.7 Lebensspanne auf Riboflavin-freiem Medium.....	58
4.1.8 Weitere Phänotypen von <i>white</i> -, <i>scarlet</i> - und <i>brown</i> -Mutanten.....	59
4.1.9 Charakterisierung von ABCG2 als humanes Homolog von White	60
4.1.9.1 Klonierung von ABCG2-Konstrukten	61
4.1.9.2 Funktionelle Überprüfung der ABCG2-Konstrukte	63
4.2 Etablierung von Lipidanalysemethoden für <i>Drosophila melanogaster</i>.....	65
4.2.1 Dünnschichtchromatographie	65
4.2.2 Gaschromatographie	68

4.2.3 Massenspektrometrie	70
4.2.4 Lipidanalysen von Wildtypstämmen	71
4.2.5 Lipidanalysen von Futtervarianten	74
4.3 Charakterisierung der ABC-Transporter White, Scarlet und Brown - Lipidanalysen	76
4.3.1 Lipidanalysen der Larven von ABC-Transporter-Mutanten	76
4.3.2 Lipidanalysen von adulten ABC-Transporter-Mutanten	78
4.3.3 Analyse von CS, <i>st</i>¹ und <i>w</i>¹¹⁸ auf <i>instant</i>-Medium	80
4.3.4 Rettung und Verifizierung der Lipidphänotypen	83
4.3.4.1 Der <i>brown</i> -Phänotyp.....	83
4.3.4.2 Der <i>white</i> -Phänotyp	84
4.3.5 Lipidphänotyp von RNAi-<i>white</i>, -<i>scarlet</i> und -<i>brown</i>.....	86
4.4 Analyse von Augenpigmentierungsmutanten.....	89
4.4.1 Analyse von Enzym-Mutanten	89
4.4.1.1 Pigmentanalysen von Enzym-Mutanten.....	89
4.4.1.2 Lipidanalysen der Larven von Enzym-Mutanten	91
4.4.1.3 Lipidanalysen von adulten Enzym-Mutanten	93
4.4.1.4 Lipidphänotyp von RNAi- <i>cinnabar</i> , RNAi- <i>karmoisin</i> und RNAi- <i>CG9542</i>	95
4.4.2 Analyse von AP-3-Mutanten.....	97
4.4.2.1 Pigmentanalysen von AP-3-Mutanten	97
4.4.2.2 Lipidanalysen der Larven von AP-3-Mutanten	98
4.4.2.3 Lipidanalysen von adulten AP-3-Mutanten	100
4.4.3 Analyse von VPS- und Rab-Mutanten	102
4.4.3.1 Pigmentanalysen von VPS- und Rab-Mutanten	102
4.4.3.2 Lipidanalysen der Larven von VPS- und Rab-Mutanten	103
4.4.3.3 Lipidanalysen von adulten VPS- und Rab-Mutanten	105
4.4.4 Analyse von sonstigen Mutanten	107
4.4.4.1 Pigmentanalysen von sonstigen Mutanten	107
4.4.4.2 Lipidanalysen von Larven der sonstigen Mutanten	108
4.4.4.3 Lipidanalysen der adulten sonstigen Mutanten	110
4.5 Charakterisierung von ABCA- und ABCG-Transportern.....	112
4.5.1 Lipidanalysen von ABCA-Transportern	112
4.5.1.1 Lipidanalysen der Larven von RNAi- <i>ABCA</i>	113
4.5.1.2 Lipidanalysen der Adulten von RNAi- <i>ABCA</i>	115
4.5.2 Lipidanalysen von ABCG-Transportern	117
4.5.2.1 Lipidanalysen der Larven von RNAi- <i>ABCG</i>	117
4.5.2.2 Lipidanalysen der Adulten von RNAi- <i>ABCG</i>	119
5 Diskussion	122
5.1 Die ABC-Transporter White, Scarlet und Brown	122
5.1.1 Die Funktion von White, Scarlet und Brown im Komplexauge	122
5.1.2 Neuronale Funktion von White und Scarlet	123
5.1.3 White und Scarlet kolokalisieren in den Malpighischen Gefäßen	124
5.1.4 Die Funktion von White, Scarlet und Brown in den Malpighischen Gefäßen	125
5.1.5 Riboflavin und seine Bedeutung für <i>Drosophila melanogaster</i>	127
5.1.6 Bedeutung der intrazellulären Speicherung von Stoffwechselintermediaten	129
5.1.7 ABCG1 und ABCG2 als humane Homologe von White	130
5.2 Etablierung von Lipidanalysemethoden	130
5.2.1 Analyse der Lipide im Wildtyp Canton S	131
5.2.2 Die Variabilität der Lipide in Wildtypstämmen	134
5.2.3 Lipidanalysen nach Aufzucht auf verschiedenen Futterquellen	136

5.2.4 Der Einfluss von <i>white</i> , <i>scarlet</i> und <i>brown</i> auf Lipidgehalt und Lipidzusammensetzung	137
5.3 Phänotypen von Augenpigmentierungsmutanten	139
5.3.1 Phänotypen von Enzym-Mutanten	139
5.3.2 Phänotypen von AP-3-Mutanten	140
5.3.3 Phänotypen von VPS- und Rab-Mutanten	141
5.3.4 Phänotypen von sonstigen Mutanten	142
5.3.5 Interaktionen von Rab-Proteinen, dem AP-3-, dem BLOC-2- und dem HOPS-Komplex	143
5.4 Charakterisierung der ABC-Transporter Familien ABCA und ABCG	145
5.4.1 ABCA-Transporter und der Lipidmetabolismus	145
5.4.2 ABCG-Transporter und der Lipidmetabolismus	146
6 Literaturverzeichnis	148
7 Anhang	159
7.1 Verzeichnis der Abbildungen	159
7.2 Verzeichnis der Tabellen	161
7.3 Verzeichnis der Abkürzungen	162
7.4 Danksagung	164

Zusammenfassung

Die vorliegende Dissertation befasst sich mit Analysen zur Funktion und Bedeutung der ABC-Transporter in der Taufliege *Drosophila melanogaster*. Dazu wurden die Aufgaben dieser Proteine in der Augenpigmentierung, im Vitamintransport und im Lipidmetabolismus genauer charakterisiert. Außerdem wurden Enzyme und Proteine, die an der Pigmentierung der Komplexaugen beteiligt sind, analysiert.

Es konnte gezeigt werden, dass die ABC-Transporter White (W), Scarlet (St) und Brown (Bw) in subzellulären Kompartimenten der Malpighischen Gefäße von *Drosophila melanogaster* lokalisiert sind. Dort sind die Proteine funktionell voneinander abhängig, denn für die Stabilisierung und Integration in die Membran der intrazellulären Vesikel wird ein Dimerisierungspartner benötigt. Analog zum Komplexauge existieren in den Malpighischen Gefäßen die Heterodimere W/St und W/Bw. Eine bisher noch nicht beschriebene Funktion von W/Bw in den Exkretionsorganen ist der aktive Transport des essentiellen Vitamins Riboflavin zur intrazellulären Speicherung, woran auch W/St partiell beteiligt ist. Offensichtlich ist diese Akkumulierung unter Laborkonditionen nicht wichtig für das Überleben der Taufliege. Solange durch die Nahrungsquelle genügend Riboflavin zur Verfügung steht, sind auch entsprechende Mutanten ausreichend versorgt.

ABCG2, ein humanes Homolog von *Drosophila* White, das ebenfalls als Riboflavin-Transporter beschrieben wurde, ist weder im Komplexauge noch in den Malpighischen Gefäßen in der Lage, die Funktion von White zu übernehmen.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde erstmals eine detaillierte Untersuchung von Lipidgehalt und -verteilung in *Drosophila melanogaster* vorgenommen. Durch die Verwendung der drei Methoden Dünnschichtchromatographie, Gaschromatographie und Massenspektrometrie konnten Neutrallipide, Phospholipide und die Verteilung der Fettsäuren dargestellt werden. Zahlreiche Lipidanalysen zeigen, dass das Lipidmuster in *Drosophila* durch unterschiedliche Faktoren beeinflusst wird. Von besonderer Bedeutung sind die unerwartete Variabilität in Wildtypstämmen und der Einfluss des ABC-Transporters White, welcher bei der Verwendung des UAS-GAL4-Systems fehlexprimiert wird. Daher ist es wichtig, die erhaltenen Ergebnisse durch mehrere experimentelle Ansätze zu überprüfen, um sie richtig interpretieren zu können.

Zu beachten ist, dass ein reduzierter Lipidgehalt das Verhalten von *Drosophila* in vielen Experimenten beeinflussen kann, auch wenn es sich dabei aufgrund von unterschiedlicher genetischer Herkunft der Mutanten möglicherweise nicht um einen Phänotyp handelt. Diese Beobachtungen verdeutlichen, wie wichtig die Auswahl der richtigen Kontrollen in der Forschung ist.

Innerhalb dieser Lipidanalysen konnten sowohl in zahlreichen Augenpigmentierungsmutanten als auch bei den *knock-downs* von ABCA- und ABCG-Transportern interessante Phänotypen festgestellt werden. Mutationen in einzelnen Untereinheiten des AP-3-Komplexes haben beispielsweise einen drastischen Effekt auf den Protein- und Lipidgehalt. Auch Mitglieder der ABC-Transporter, die, wie ihre humanen Homologe, den Lipidmetabolismus direkt oder indirekt beeinflussen, konnten in *Drosophila* identifiziert werden. Beispiele hierfür sind *white* und *Atet* sowie bisher noch nicht genauer charakterisierte Gene wie CG3164 und CG9664. Hier sind jedoch weitere Untersuchungen notwendig, um deren Funktion im Lipidstoffwechsel verstehen zu können.

1 Einleitung

1.1 Funktion und Bedeutung der ABC-Transporter

ABC-Transporter (*ATP binding cassette*) stellen eine der größten bekannten Proteinfamilien dar. Sie sind in ihrer Struktur evolutionär hochkonserviert und kommen in Archaeen, Prokaryoten und Eukaryoten vor (Higgins, 1992; Schneider und Hunke, 1998).

Mitglieder dieser Proteinfamilie transportieren unter der Hydrolyse von ATP eine Vielzahl verschiedener Substrate über biologische Membranen. Ein funktioneller *fullsize* ABC-Transporter besteht gewöhnlich aus zwei ATP-Bindedomänen (bzw. Nukleotid-Bindedomänen, NBD) und zwei Transmembrandomänen (TMD). Die NBD sind auf der cytoplasmatischen Seite lokalisiert, für die Bindung und Spaltung von ATP verantwortlich und beinhalten charakteristische Struktur motive (ABC-Motive). Die hydrophoben TMD sind wichtig für die Substratspezifität und bestehen aus jeweils sechs bis elf transmembranen, α -helicalen Segmenten (Dean *et al.*, 2001). Häufig bilden zwei so genannte *halfsize*-Proteine mit jeweils einer NBD und einer TMD Homo- oder Heterodimere (Abb. 1).

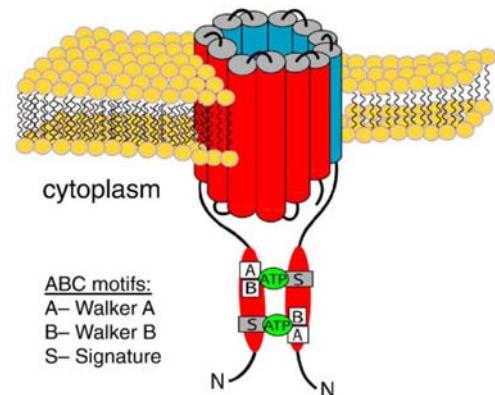


Abb. 1: Aufbau eines ABC-Transporter Heterodimers. Das Dimer besteht aus 12 transmembranen Segmenten sowie zwei ATP-Bindedomänen mit ABC-Motiven. ABC: *ATP binding cassette* (Tarr *et al.*, 2009).

In *Drosophila melanogaster* sind bis heute 56 ABC-Transporter identifiziert worden, die in die Unterfamilien ABCA bis ABCH eingeteilt werden. Diese Dissertation konzentriert sich auf die Charakterisierung der Familien ABCA und ABCG. Erstere zählt in der Taufliege zehn Proteine, Letztere stellt mit 15 Mitgliedern die größte Subfamilie dar (Dean *et al.*, 2001).

Die bekanntesten ABC-Transporter in *Drosophila* sind White (W), Scarlet (St) und Brown (Bw), drei Mitglieder der Unterfamilie ABCG, die an der Augenpigmentierung beteiligt sind. Diese Proteine werden unter 1.2.2 beschrieben. Weitere genauer charakterisierte ABCG-Transporter sind E23 (*early gene at 23*) und Atet (*ABC-transporter expressed in trachea*). E23 wurde aufgrund seiner Lage im 23E frühen Puff polytäner Riesenchromosomen in larvalen Speicheldrüsen benannt. Seine Transkription wird durch Ecdyson induziert und durch das Rezeptordimer EcR/Usp (EcR: Ecdyson-Rezeptor; Usp: *ultraspiracle*) aktiviert. Das Protein E23 hat große Ähnlichkeit zum ABC-Transporter White und stellt einen *halfsize*-Transporter dar, der entweder als Homo- oder als Heterodimer fungieren kann (Hock *et al.*, 2000). Transkripte von Atet wurden

im respiratorischen System und in der Amnioserosa detektiert. Das Protein Atet zeigt ebenfalls eine starke Ähnlichkeit zu White (Kuwana *et al.*, 1996).

Die humanen ABC-Transporter zählen 48 Mitglieder und werden in die Gruppen ABCA bis ABCG eingeteilt (Dean *et al.*, 2001). Viele dieser Proteine sind von medizinischer Bedeutung, da sie eine Rolle im Lipidmetabolismus spielen und im Zusammenhang mit lipidassoziierten Krankheiten oder anderen spezifischen Erkrankungsbildern stehen (Pohl *et al.*, 2005; s. Tabelle 1).

Transporter	Funktion	Krankheit
ABCA1	Cholesterin- und Phospholipidtransport	Tangier-Krankheit, HDL-Defizienz
ABCA2	Multidrug-Resistenz	unbekannt
ABCA4	Retinoidtransport in Photorezeptorzellen (Stäbchen)	Stargardt-Krankheit, Retinopathia pigmentosa, Zapfen-Stäbchendystrophie, altersabhängige Makuladegeneration
ABCB1	Multidrug-Resistenz	Morbus Crohn, Colitis ulcerosa
ABCB2	Peptidtransport	Immundefizienz
ABCB3	Peptidtransport	Immundefizienz
ABCB4	Gallensäuretransport	Progressive familiäre intrahepatische Cholestase Typ 3
ABCB6	Eisentransport	unbekannt
ABCB7	Eisentransport	X-chromosomal Sideroblastose und Anämie
ABCB11	Gallensäuretransport	Progressive familiäre intrahepatische Cholestase Typ 2
ABCC1	Multidrug-Resistenz	unbekannt
ABCC2	Gallensäuretransport	Dubin-Johnson-Syndrom
ABCC4	Nukleosidtransport	unbekannt
ABCC6	unbekannt	Pseudoxanthoma elasticum
ABCC7	Chloridionenkanal	Cystische Fibrose
ABCC8	Sulfonylurea Rezeptor	Persistierende hyperinsulinämische Hypoglykämie bei Kindern
ABCD1	Transport langkettiger Fettsäuren	Adrenoleukodystrophie
ABCD3	unbekannt	Zellweger Syndrom 2
ABCE1	Oligoadenylat-Bindeprotein	unbekannt
ABCG1	Cholesterintransport	unbekannt
ABCG2	Multidrug-Resistenz	unbekannt
ABCG5	Steroltransport	Sitosterolämie
ABCG8	Steroltransport	Sitosterolämie

Tabelle 1: Auflistung einer Auswahl an humanen ABC-Transportern. Darstellung ihrer Funktion und der mit ihnen assoziierten Krankheiten. HDL: *high-density lipoprotein*. Nach Schmitz und Langmann, 2003 und Štefková *et al.*, 2004.

Die am besten charakterisierten Vertreter der Unterfamilie ABCA, bestehend aus zwölf Proteinen, sind ABCA1 und ABCA4. Mutationen in ABCA1 können in der Tangier-Krankheit bzw. in HDL-Defizienz (*high-density lipoprotein*) resultieren, da dieses Protein am Cholesterol Transport und an der HDL-Biosynthese beteiligt ist. ABCA4 transportiert Vitamin A Derivate in die äußeren

Bereiche der retinalen Stäbchen, weshalb Defekte in ABCA4 unter anderem zur Stargardt-Krankheit führen können (Dean *et al.*, 2001).

Von den fünf bekannten humanen ABCG-Transportern sind ABCG1, ABCG2, ABCG5 und ABCG8 genauer charakterisiert. ABCG1 spielt eine Rolle in der Regulation des Cholesterol-Transports und wurde aufgrund der Sequenzähnlichkeit zu *Drosophila* White bereits mehrfach als dessen humanes Homolog bezeichnet (Chen *et al.*, 1996; Savary *et al.*, 1996; Croop *et al.*, 1997; Nakamura *et al.*, 1999; Klucken *et al.*, 2000; Kirov *et al.*, 2001). Das *breast-cancer resistance protein* (BCRP) ABCG2 ist involviert in die Multidrug-Resistenz und transportiert beispielsweise Riboflavin in die Muttermilch (van Herwaarden *et al.*, 2007). ABCG5 und ABCG8 bilden ein Heterodimer und transportieren Sterole in den Darm und in die Leber, weshalb Mutationen in einem der beiden Gene in der Erbkrankheit Sitosterolämie resultieren können (Berge *et al.*, 2000; Dean *et al.*, 2001).

1.2 Die Pigmentierung der Augen in *Drosophila melanogaster*

Vor genau 100 Jahren berichtete der Zoologe Thomas Hunt Morgan erstmals über eine atypische Taufliege. In seiner Veröffentlichung *Sex limited inheritance in Drosophila* beschrieb er das Auftreten eines weißäugigen Männchens in einer Kultur von *Drosophila melanogaster* und seine Beobachtungen über dessen Nachkommen. Dabei fand er heraus, dass *white* eine rezessive Mutation auf dem X-Chromosom ist, was den Grundstein für die Chromosomentheorie der Vererbung legte (Morgan, 1910). Somit war es erstmals gelungen, ein Gen einem bestimmten Chromosom zuzuordnen (Green, 2010).

Seit dieser Zeit sind zahlreiche verschiedene Augenfarbenmutanten entdeckt und beschrieben worden, darunter Fliegen mit Mutationen in ABC-Transportern, in Enzymen oder in anderen an der Pigmentierung der Augen beteiligten Komplexen. Eine Selektion dieser Proteingruppen ist Gegenstand dieser Arbeit und wurde auf verschiedene Aspekte hin analysiert.

Das Komplexauge von *Drosophila melanogaster* besteht aus 800 identischen Photorezeptororganen, den Ommatidien (Abb. 2 A). Jedes dieser Einheiten setzt sich zusammen aus der Cornea am apikalen Ende, acht Photorezeptorzellen (R1 bis R8) mit ihren Rhabdomeren, vier Kegelzellen, einem Borstenkomplex sowie zwei primären, sechs sekundären und drei tertiären Pigmentzellen. Letztere schirmen das Ommatidium in seiner gesamten Länge von den Nachbarzellen ab (Ready *et al.*, 1976).

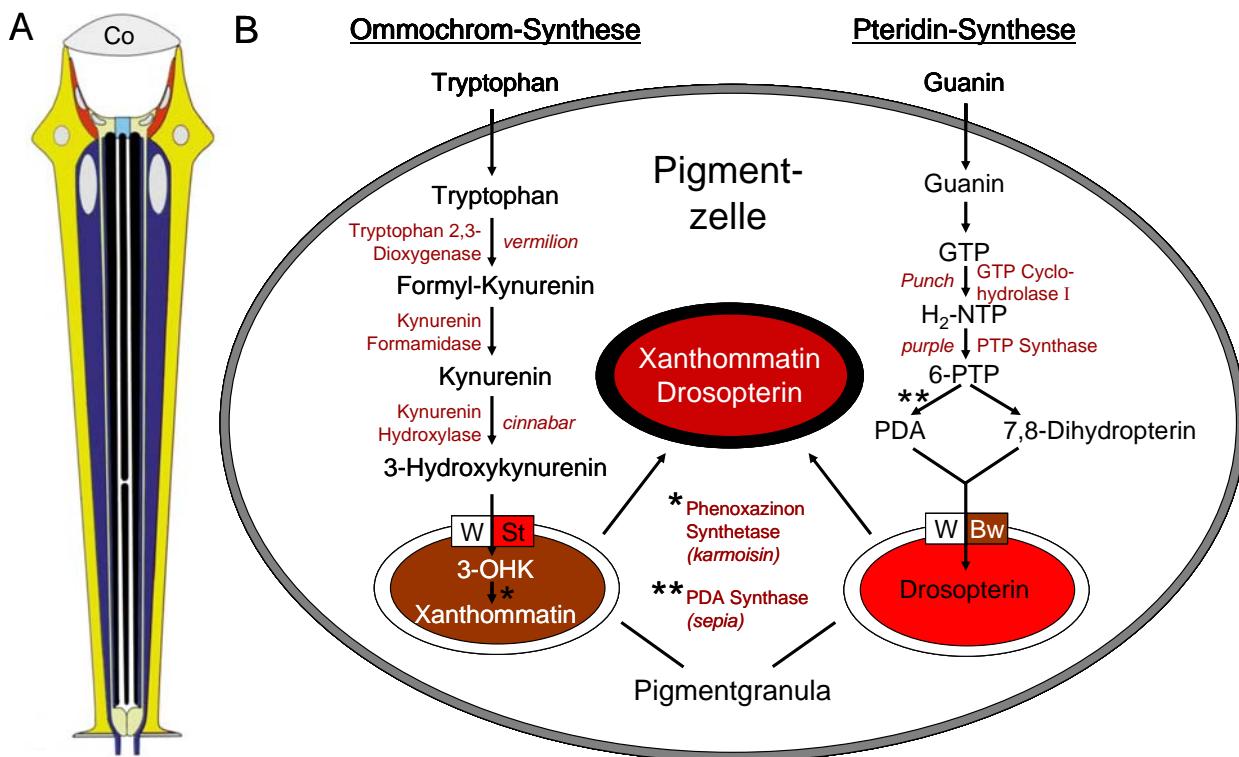


Abb. 2: Schematische Darstellung eines Ommatidiums und der Stoffwechselwege in der Augenpigmentierung. A: Ein Ommatidium besteht aus Cornea (Co), Photorezeptorzellen (blau) und ihren Rhabdomeren (schwarz), Kegelzellen (beige, hellblau) und primären (orange), sekundären sowie tertiären (gelb) Pigmentzellen (Cagan und Zipursky, 1992). Der Borstenkomplex und die sekundären Pigmentzellen sind in der Abbildung nicht zu sehen. B: Xanthommatin und Drosopterin werden auf unabhängigen Synthesewegen hergestellt und akkumulieren in den Pigmentgranula im Inneren von Pigmentzellen. 3-OHK: 3-Hydroxykynurenin; 6-PTP: 6-Pyruvyltetrahydropterin; Bw: Brown; Co: Cornea; GTP: Guanosintriphosphat; H₂-NTP: Dihydronoopterin Triphosphat; PDA: Pyrimidodiazepin; St: Scarlet; W: White.

Die Farbe der Augen wird von Pigmenten bestimmt, die in den Pigmentgranula im Inneren der Pigmentzellen akkumulieren (Abb. 2 B). Diese Farbstoffe sind nicht an der Lichtdetektion beteiligt, sondern für die optische Isolation jeder Einheit des Komplexauges von dessen Nachbar-Ommatidien verantwortlich und erhöhen somit Kontrastsensitivität und Sehschärfe (Summers *et al.*, 1982). Die wildtypische Augenfarbe entsteht durch ein Zusammenspiel von braunen Ommochromen und roten Pteridinen. Die prominentesten Pigmente in *Drosophila* sind die beiden Farbstoffe Xanthommatin (braun) und Drosopterin (rot), die auf unabhängigen Synthesewegen hergestellt werden (Abb. 2 B). Xanthommatin wird aus Tryptophan über Formyl-Kynurenin, Kynurenin und 3-Hydroxykynurenin (3-OHK) gebildet (Summers *et al.*, 1982), während Drosopterin aus Guanin über Guanosintriphosphat (GTP), Dihydronoopterin Triphosphat (H₂-NTP¹), 6-Pyruvyltetrahydropterin (6-PTP²) und 7,8-Dihydropterin oder Pyrimidodiazepin (PDA³) entsteht (Kim *et al.*, 2006). An der Bildung und am Transport dieser Pigmente und

¹ 2-Amino-4-Oxo-6-(D-erythro-1',2',3'-Trihydroxypropyl)-7,8-Dihydropterin Triphosphat

² 2-Amino-4-Oxo-6-Pyruvyl-5,6,7,8-Tetrahydropterin

³ 6-Acetyl-2-Amino-3,7,8,9-Tetrahydro-4H-Pyrimido-[4,5-b]-[1,4]Diazepin-4-One

Pigmentvorstufen sind Enzyme und Proteine beteiligt, die in den folgenden Kapiteln beschrieben werden.

1.2.1 An der Pigmentierung des Komplexauges beteiligte Enzyme

Der erste Schritt der Xanthommatin-Herstellung, die Bildung von Formyl-Kynurenin aus Tryptophan (Abb. 2), wird von der Tryptophan 2,3-Dioxygenase⁴ Vermilion katalysiert (Searles und Voelker, 1986; Tartof, 1969). Die Aktivität dieses Enzyms ist im Fettkörper und in den Malpighischen Gefäßen von Larven sowie in den Augen adulter Fliegen detektierbar (Summers *et al.*, 1982). Die Konvertierung von Formyl-Kynurenin zu Kynurenin wird von der Kynurenin Formamidase vorgenommen (Glassmann, 1956), deren zugrunde liegendes Gen bisher noch nicht identifiziert werden konnte. Möglicherweise kodieren für dieses Enzym zwei verschiedene Genloci (Moore und Sullivan, 1978). Cinnabar, die Kynurenin Hydroxylase⁵, katalysiert die Umwandlung von Kynurenin zu 3-OHK (Sullivan *et al.*, 1973). Die Aktivität dieses mitochondrial assoziierten Enzyms (Ghosh und Forrest, 1967) ist im Larvalstadium ausschließlich in den Malpighischen Gefäßen nachweisbar (Sullivan und Sullivan, 1975), während sie in adulten Fliegen primär im Auge detektierbar ist (Sullivan *et al.*, 1973). *karmoisin* ist der Genlocus für die Phenoxazinon Synthetase, die 3-OHK zu Xanthommatin konvertiert (Phillips *et al.*, 1970; Lloyd *et al.*, 1998). Dieses Enzym ist primär im Kopf adulter Fliegen aktiv und mit den Pigmentgranula assoziiert (Phillips *et al.*, 1973; Summers *et al.*, 1982). Zusätzlich ist auch Xanthommatin selbst in der Lage, 3-OHK zu oxidieren (Wiley und Forrest, 1981).

Am Anfang der Drosopterin-Synthese wird Guanin zu Guanosintriphosphat (GTP) umgewandelt (Abb. 2). Daraus wird durch die GTP Cyclohydrolase I, kodiert von *Punch*, H₂-NTP synthetisiert (Mackay und O'Donnell, 1983), aus welchem daraufhin durch die Sepiapterin Synthase A (Purple) 6-PTP gebildet wird (Tobler *et al.*, 1979). Aufgrund von seiner Funktion wurde das letztgenannte Enzym später in PTP Synthase umbenannt (Switchenko und Brown, 1985). Aus 6-PTP wird entweder 7,8-Dihydropterin oder durch die PDA Synthase (Sepia) PDA hergestellt. Beide Intermediate können anschließend zu Drosopterin konvertiert werden (Kim *et al.*, 2006).

⁴ bzw. Tryptophan Oxygenase oder Tryptophan Pyrrolase

⁵ bzw. Kynurenin-3-Monoxygenase

1.2.2 Die ABC-Transporter White, Scarlet und Brown

Wie bereits erwähnt, sind White (Bingham *et al.*, 1981), Scarlet (Tearle *et al.*, 1989) und Brown (Dreesen *et al.*, 1988) die am besten charakterisierten ABC-Transporter in *Drosophila*. Diese Proteine sind in den Membranen der Pigmentgranula lokalisiert und bilden Heterodimere, die Intermediate der Pigment-Synthese in das Lumen der Granula transportieren (Abb. 2). Das Substrat von W/St ist vermutlich 3-OHK (Abb. 5 B), während das Dimer W/Bw eine der Drosopterin-Vorstufen in die Pigmentgranula transportiert (Mackenzie *et al.*, 2000). Folglich haben *st*-Mutanten rote Augen, ein Fehlen von Bw resultiert hingegen in einer braunen Augenpigmentierung (Abb. 3). Da W an beiden Synthesewegen beteiligt ist, zeigen *white*-Mutanten unpigmentierte Augen. In *bwst*-Doppelmutanten sind ebenfalls beide *Pathways* beeinträchtigt, was phänotypisch nicht von *white* zu unterscheiden ist.



Abb. 3: Phänotyp vom Wildtyp und von Augenpigmentierungsmutanten. Im Vergleich zum Wildtyp (links) zeigen *scarlet*- (oben), *white*- (rechts) und *brown*-Mutanten (unten) eine veränderte Pigmentierung der Komplexaugen (Mackenzie *et al.*, 1999).

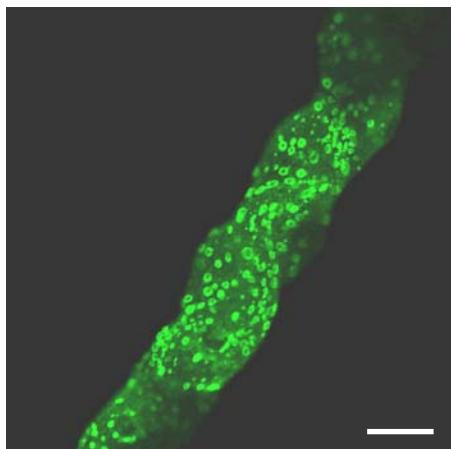


Abb. 4: Immunohistochemie von White an Malpighischen Gefäßen. White ist in intrazellulären Vesikeln der Exkretionsorgane detektierbar. Maßstab: 25 µm (Ohmann, 2006).

Abgesehen vom Komplexauge konnten W und St auch in den Malpighischen Gefäßen, den Exkretionsorganen von *Drosophila melanogaster* (s. 1.3), detektiert werden. Dort sind die beiden Proteine in den Membranen intrazellulärer Vesikel lokalisiert (Abb. 4) und zeigen ein identisches Expressionsmuster. Darüber hinaus ist die Stabilität von St in *w*-Mutanten drastisch reduziert und auch W ist in *st*-Fliegen nahezu nicht detektierbar. Diese Beobachtungen führten zu der Schlussfolgerung, dass St und W in den Malpighischen Gefäßen kolokalisieren und als Dimer funktionieren (Ohmann, 2006).

Eine Funktion von White in diesen Organen ist der aktive Transport von zyklischem Guanosin-monophosphat (cGMP; Abb. 5 A), einem zellulären Botenstoff, der für die Signaltransduktion verantwortlich ist (Evans *et al.*, 2008). Außerdem wurde eine Beeinträchtigung des Transports von Riboflavin (Abb. 5 C; s. 1.5) in die Malpighischen Gefäße von *w*-Mutanten nachgewiesen (Sullivan *et al.*, 1979). Darüber hinaus ist die Aufnahme von Tryptophan (Abb. 5 D), Kynurenin (Abb. 5 E) und Guanin (Abb. 5 F) in Malpighische Gefäße von *w*-Mutanten reduziert (Sullivan und Sullivan, 1975; Sullivan *et al.*, 1980).

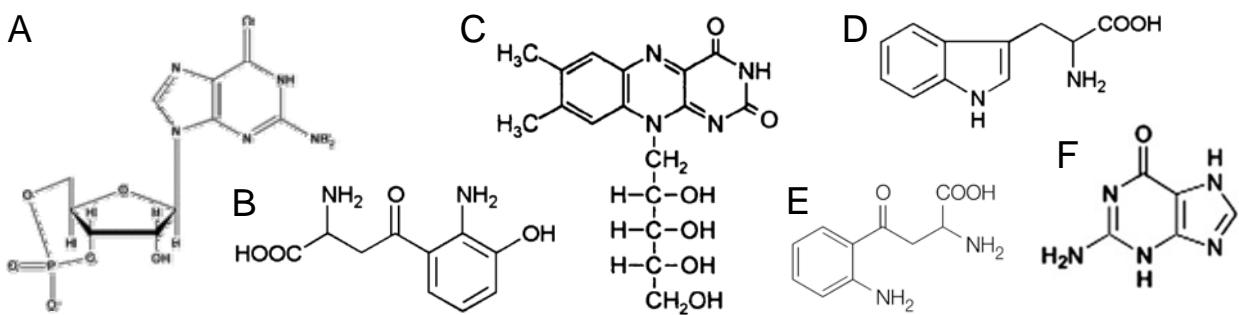


Abb. 5: Struktur von cGMP, 3-Hydroxykynurenin, Riboflavin, Tryptophan, Kynurenin und Guanin. Die abgebildeten Stoffwechselintermediate sind Substrate für White. A: cGMP⁶. B: 3-Hydroxykynurenin (Kamleh *et al.*, 2009). C: Riboflavin (Bacher *et al.*, 2000). D: Tryptophan (Kamleh *et al.*, 2009). E: Kynurenin (Stone und Darlington, 2002). F: Guanin (Kamleh *et al.*, 2008). cGMP: zyklisches Guanosinmonophosphat.

Diese Beobachtungen zeigen, dass es sich bei White um einen vielseitigen ABC-Transporter mit einem umfangreichen Substratspektrum handelt. In keinem der genannten Fälle wurde jedoch bisher über einen möglichen Dimerisationspartner diskutiert.

1.2.3 Der AP-3-Komplex und seine Funktion

Mutationen in *Drosophila ruby* (Kretzschmar *et al.*, 2000), *garnet* (Ooi *et al.*, 1997), *carmine* und *orange* (Mullins *et al.*, 2000) resultieren unter anderem in einer Veränderung der Augenfarbe. Die Gene kodieren für die Untereinheiten β (*ruby*), δ (*garnet*), μ (*carmine*) und σ (*orange*) des AP-3-Komplexes (*adaptor protein*; Abb. 6). Dieses stabile Heterotetramer spielt beispielsweise eine Rolle im Transport vom Trans-Golgi Netzwerk zur Plasmamembran und zu den Lysosomen (Dell'Angelica, 2009; Simpson *et al.*, 1997). Der Komplex ist an der Bildung von intrazellulären Transportvesikeln und an der Auswahl der Moleküle, die in diese Vesikel aufgenommen werden sollen, beteiligt (Boehm und Bonifacino, 2001). Obwohl jede AP-3-Untereinheit eine andere Funktion hat, zeigen die entsprechenden Mutanten ähnliche Phänotypen. Als Erklärung dafür postulierten Zhen und Kollegen (1999), dass das Fehlen einer der vier Untereinheiten zur Destabilisierung des Komplexes und zur Degeneration der verbleibenden Proteine führt. Die veränderte Augenfarbe kommt dabei durch eine Reduktion der Anzahl an Pigmentgranula zustande (Mullins *et al.*, 2000; Kretzschmar *et al.*,

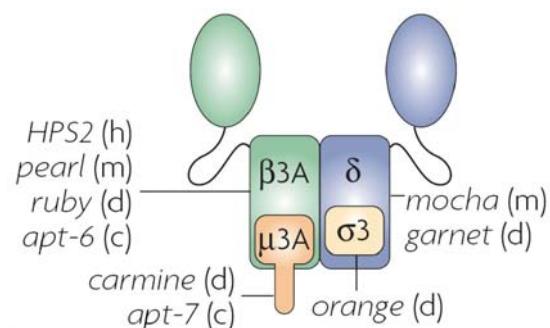


Abb. 6: Schematische Darstellung des AP-3-Komplexes. Der AP-3-Komplex ist ein Heterotetramer aus den Untereinheiten β , δ , μ und σ . AP: *adaptor protein*; apt: *Adaptin*; c: *C. elegans*; d: *D. melanogaster*; h: Mensch; HPS: Hermansky-Pudlak Syndrom; m: Maus (Raposo und Marks, 2007).

⁶ http://biochem.siu.edu/web_lessons/bmb_na.htm

2000). In Abbildung 6 sind neben den *Drosophila* AP-3-Komplex-Genen auch die bisher identifizierten Isoformen aus dem Menschen, der Maus und aus *Caenorhabditis elegans* genannt. Humane Mutationen im AP-3-Komplex stehen im Zusammenhang mit dem Hermansky-Pudlak Syndrom (HPS), einer seltenen Erbkrankheit (Raposo und Marks, 2007).

1.2.4 VPS- und Rab-Proteine in *Drosophila*

Auch ein Komplex aus VPS-Proteinen, der so genannte Dor-Komplex, wird in *Drosophila* für den Transport von Proteinen zu Lysosomen und für die Biosynthese von Pigmentgranula benötigt

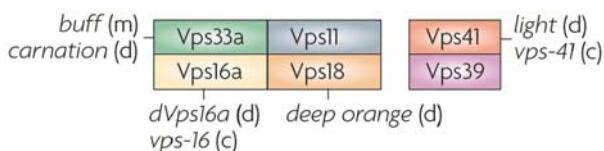


Abb. 7: Schematische Darstellung des HOPS-Komplexes. In *Drosophila* sind VPS33, VPS16, VPS18 und VPS41 bekannt. c: *C. elegans*; d: *D. melanogaster*; HOPS: *homotypic fusion and vacuole protein sorting*; m: Maus; Vps: *vacuolar protein sorting* (Raposo und Marks, 2007).

(Sevrioukov *et al.*, 1999). Die kodierenden Gene *light* (VPS41), *carnation* (VPS33) und *deep orange* (VPS18) sind Homologe der humanen HOPS-Komplex (*homotypic fusion and vacuole protein sorting*) Komponenten (Abb. 7), die späte endosomale Reifung und lysosomale Fusionen vermitteln (Wilkin *et al.*, 2008). *dVps16A* kodiert für eine weitere VPS-Untereinheit (Pulipparacharuvil *et al.*, 2005).

Es gibt Hinweise auf funktionelle Interaktionen zwischen diesen Proteinen und dem AP-3-Komplex in *Drosophila* (Warner *et al.*, 1998). Abbildung 7 zeigt neben den *Drosophila* VPS-Genen auch die bisher identifizierten Isoformen aus der Maus und aus *Caenorhabditis elegans*.

Das Protein Claret wird für die Bildung von Lysosomen-ähnlichen Organellen, so genannten LROs (*lysosome-related organelles*), benötigt. In *Drosophila* handelt es sich dabei um die Pigmentgranula (Hadjebi *et al.*, 2008). *Drosophila lightoid* kodiert für Rab-RP1 (*Rab-related protein*; *Rab*: *ras-related in brain*), eine Rab GTPase, die an der Regulation des vesikulären Transports beteiligt ist (Ma *et al.*, 2004; Raposo und Marks, 2007). Die RLD (*RCC1⁷-like domain*) des claret-Proteins bindet an die Nukleotid-freie Form von Lightoid, also funktioniert Claret als Lightoid-GEF (*guanine nucleotide exchange factor*) bzw. als RCC1-GEF für Rab-RP1 (Hadjebi *et al.*, 2008). Claret ist auch in der Lage, mit RAB32 und RAB38, den humanen Homologen von Rab-RP1, zu interagieren (Ma *et al.*, 2004).

⁷ regulator of chromosome condensation 1; ein GEF (*guanine nucleotide exchange factor*) für die GTPase Ran (*ras-related nuclear protein*)

1.2.5 Sonstige Proteine, welche die Pigmentierung der Augen beeinflussen

Proteine, die einen Einfluss auf die Augenpigmentierung haben und keiner der bisher genannten Gruppen zugeordnet werden können oder noch nicht annotiert sind, werden in dieser Arbeit als „sonstige“ zusammengefasst. Davon sind *pink* und *zeste* bereits annotiert, während die Genloci von *cardinal*, *pale ocelli* und *purpleoid* noch nicht lokalisiert werden konnten.

Pink wurde als *Drosophila* Homolog für die humane BLOC-2 (*biogenesis of lysosome-related organelles complex*) Untereinheit HPS5

(Abb. 8) identifiziert. Mutationen in *pink* resultieren, wie auch Defekte in AP-3-Proteinen

(s. 1.2.3), im Hermansky-Pudlak Syndrom

(Falcón-Pérez *et al.*, 2007; Syrzycka *et al.*,

2007). BLOC-2 ist, wie BLOC-1, BLOC-3 und

AP-3, ein stabiler Proteinkomplex, der ubiqui-

tär exprimiert wird und sowohl in löslicher

Form als auch membrangebunden vorkommt

(Falcón-Pérez *et al.*, 2007). Die BLOC-Komplexe bestehen aus Untereinheiten, die keine gemeinsamen Strukturmotive oder Homologien zu Proteinen mit bekannter Funktion zeigen

(Raposo und Marks, 2007). In Abbildung 8 sind neben *pink* auch die bisher identifizierten

Isoformen aus dem Menschen und der Maus dargestellt.

Allele von *zeste* beeinflussen die Expression von mindestens drei unverwandten Loci (*white*, *bithorax* und *decapentaplegic*; Mariani *et al.*, 1985) und sind auch an der Regulation einer Vielzahl weiterer Gene beteiligt (Pirrotta *et al.*, 1988). Für eine effiziente Bindung an DNA ist eine Multimerisierung von Zeste nötig (Chen und Pirrotta, 1993).

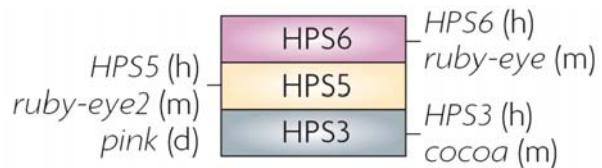


Abb. 8: Schematische Darstellung von BLOC-2. *pink* kodiert für das *Drosophila* Homolog von HPS5. BLOC: *biogenesis of lysosome-related organelles complex*; d: *D. melanogaster*; h: Mensch; HPS: Hermansky-Pudlak Syndrom; m: Maus (Raposo und Marks, 2007).

Die Gene *purpleoid*, *cardinal* und *pale ocelli* wurden bisher nur in wenigen Publikationen erwähnt. Beadle und Ephrussi beschrieben beispielsweise 1936, dass Augenimaginalscheiben von *purpleoid*, die in den Wildtyp implantiert werden, eine autonome Entwicklung der Pigmentierung zeigen, weshalb es sich bei Purpleoid nicht um ein Enzym handeln kann. Über *cardinal* und *pale ocelli* wurde berichtet, dass diese Mutationen phänotypisch ausschließlich die Pigmentierung der Augen und der Ocelli beeinflussen (Tearle, 1991).

1.3 Malpighische Gefäße, die Exkretionsorgane von *Drosophila melanogaster*

Das Exkretionssystem von *Drosophila melanogaster* besteht aus den Malpighischen Gefäßen und dem Darm (Abb. 9 A). Die Malpighischen Gefäße, bzw. *Tubules*, sind für Osmoregulation sowie Entgiftung verantwortlich (Dow und Davies, 2003; Wessing und Eichelberg, 1978) und spielen außerdem eine wichtige Rolle bei der Immunabwehr (McGettigan *et al.*, 2005). Sie sind ektodermalen Ursprungs und bestehen aus einem anterioren und einem posterioren Paar, welches sich jeweils zu einem gemeinsamen Ureter vereinigt und zwischen Mittel- und Enddarm in den Verdauungstrakt mündet (Wessing und Eichelberg, 1978). Jeder Strang kann in das *Initial*-, das *Transitional*- und das *Hauptsegment*, den *Lower Tubule* sowie den oberen und den unteren Ureter unterteilt werden (Sözen *et al.*, 1997) und hat eine Länge von 2 mm sowie einen Durchmesser von 35 μm (Dow und Davies, 2003).

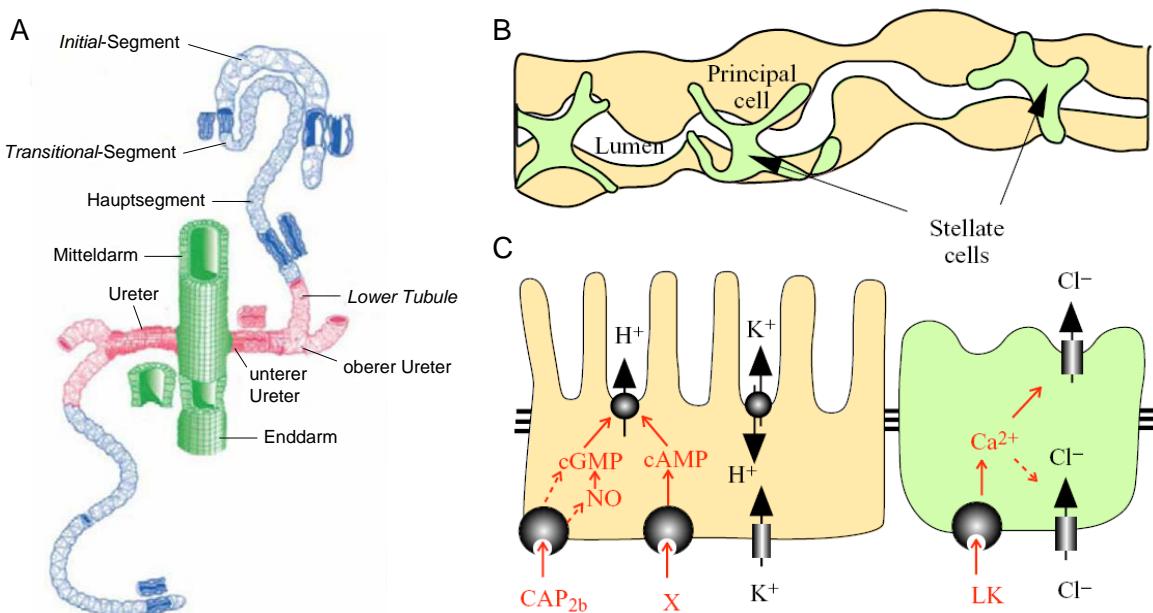


Abb. 9: Übersicht über die Malpighischen Gefäße und die Funktion ihrer Zelltypen. A: Die Malpighischen Gefäße bestehen aus einem anterioren und einem posterioren Paar, die in definierte Segmente gegliedert werden können (Singh und Hou, 2009). B: Prinzipal- und Sternzellen (*Stellate cells*) umgeben das Lumen. C: Prinzipalzellen regeln den K^+ - und H^+ -Transport, Sternzellen den Austausch von Cl^- und H_2O . cAMP: zirkuläres Adenosinmonophosphat; CAP_{2b}: cardioacceleratory peptide 2b; cGMP: zirkuläres Guanosinmonophosphat; LK: Leukokinin; NO: nitric oxide; X: extrazelluläre Agonisten, die cAMP oder cGMP stimulieren (B und C: O'Donnell *et al.*, 1996).

Die prominentesten Zelltypen in den Malpighischen Gefäßen sind die Prinzipal- und die Sternzellen (Abb. 9 B). Letztere sind mesodermalen Ursprungs und interkalieren während der Entwicklung der Malpighischen Gefäße zwischen die Prinzipal-Zellen (Denholm *et al.*, 2003; Jung *et al.*, 2005). Prinzipal-Zellen sind für den K^+ - und H^+ -Transport verantwortlich, während Sternzellen den Austausch von Cl^- und Wasser regulieren (Abb. 9 C). Diese Vorgänge stehen unter der Kontrolle von Neurohormonen und intrazellulären Second Messengern (O'Donnell

et al., 1998). Das Hauptsegment ist für die Harnsekretion verantwortlich, während der *Lower Tubule* reabsorptive Funktion hat (O'Donnell und Maddrell, 1995). Im reabsorptiven Bereich sind keine Sternzellen vorhanden, weshalb diesem Zelltyp sekretorische Funktion zugeschrieben wurde (Sözen et al., 1997).

Malpighische Gefäße des Wildtyps von *Drosophila melanogaster* zeigen durch verschiedene fluoreszierende Substanzen, darunter Riboflavin, 3-OHK, Drosopterin, Tryptophan und Kynurenin, eine gelbe Färbung (Abb. 10, links). In zahlreichen Augenfarbenmutanten, wie beispielsweise der *white*-Mutante w^{1118} , sind die Malpighischen Gefäße durch die Abwesenheit mancher der oben genannten Substanzen kaum gefärbt oder sogar gänzlich farblos (Wessing und Eichelberg, 1978; Abb. 10, rechts).

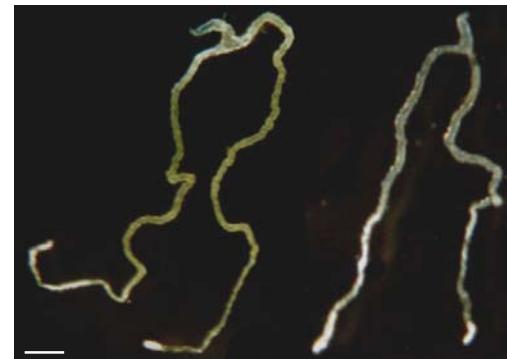


Abb. 10: Phänotyp der Malpighischen Gefäße aus CS und w^{1118} . Tubules des Wildtyps CS sind gelb gefärbt (links), in *white*-Mutanten sind sie farblos (rechts). Maßstab: 100 µm (Evans et al., 2008).

1.4 Riboflavin, das gelbe Pigment in den Malpighischen Gefäßen

Riboflavin ist die Hauptkomponente des gelben Pigments in den Malpighischen Gefäßen von *Drosophila melanogaster* (Nickla, 1972). Darüber hinaus ist es, wie bereits erwähnt, sowohl ein Substrat des humanen ABC-Transporters ABCG2 als auch von *Drosophila* White.

Riboflavin (Vitamin B2) ist ein Pteridin-Derivat und besteht aus einem aromatischen Isoalloxazinring, der mit Ribitol konjugiert ist (Abb. 5 C). Es ist ein essentielles Vitamin und der direkte Vorläufer der Kofaktoren Flavin Mononukleotid (FMN) und Flavin Adenin Dinukleotid (FAD), die wichtige Komponenten des zellulären Metabolismus darstellen. Durch Phosphorylierung von Riboflavin durch Flavokinasen entsteht FMN, welches daraufhin durch die FAD Synthetase zu FAD konvertiert wird (Vogl et al., 2007). Riboflavin wird von Pflanzen und vielen Bakterien synthetisiert, wofür ein Molekül GTP und zwei Moleküle Ribulose 5-Phosphat benötigt werden. Der Mensch bezieht Vitamin B2 vor allem aus Milch und Gemüse (Bacher et al., 2000). Zahlreiche Organismen, darunter auch *Drosophila melanogaster*, sind nicht in der Lage, Riboflavin herzustellen. Die Taufliege benötigt mindestens 0,8 µg pro Milliliter Nahrungsbrei für die Entwicklung. Unterhalb dieser Konzentration sind sowohl Größe als auch Überlebensrate der Larven und Puppen stark reduziert (Sang, 1956).

1.5 Struktur und Funktion von Lipiden

Zahlreiche humane ABC-Transporter sind entweder direkt in den Transport von Lipiden involviert oder in anderer Weise mit Krankheiten des Lipidmetabolismus assoziiert (s. 1.1).

Lipide werden von verschiedenen Enzymen, Bindeproteinen und Rezeptoren produziert, transportiert und erkannt (Fahy *et al.*, 2005). Sie sind Komponenten von Biomembranen und kommen als Signalmoleküle oder als Energiespeicher vor. William W. Christie definiert Lipide als Fettsäuren und deren Derivate sowie Substanzen, die biosynthetisch oder funktionell mit ihnen verwandt sind (Christie und Han, 2003). Die Organe mit der höchsten Lipidkonzentration sind das Fettgewebe und das Nervensystem (Wenk, 2005). Der Großteil der Lipide wird im Endoplasmatischen Retikulum synthetisiert und daraufhin zu den verschiedenen Organen und Organellen transportiert (van Meer, 1989).

Lipidspezies, die für diese Arbeit von besonderer Bedeutung sind, werden nachfolgend genauer beschrieben.

1.5.1 Fettsäuren

Fettsäuren (FS) sind Komponenten, die natürlicherweise über die Elongation von einem Acetyl-CoA (Coenzym A) Startmolekül mit Malonyl-CoA oder Methylmalonyl-CoA durch einen Fettsäure Synthase Komplex entstehen (Fahy *et al.*, 2005). Pflanzliche, tierische oder mikrobiologische FS bestehen normalerweise aus einer geraden Anzahl von C-Atomen in unverzweigten Ketten (Abb. 11). Sie besitzen eine Carboxylgruppe an einem Ende und sind entweder gesättigt oder haben eine oder mehrere Doppelbindungen in *cis*-Konfiguration an spezifischen Positionen (Christie und Han, 2003). Freie FS sind als Lipidvorläufer, Energiequelle und als zelluläre Messenger von großer biologischer Bedeutung (*lipid library*⁸). In veresterter Form, z.B. in Triglyceriden (s. 1.5.2) und Phospholipiden (s. 1.5.3), sind sie verantwortlich für die charakteristischen physikalischen und metabolischen Eigenschaften dieser Lipide (Christie und Han, 2003).

Die gesättigte Fettsäure Laurinsäure (12:0) kommt in den meisten Milchfetten, aber nicht in Membranlipiden vor. Myristinsäure (14:0) ist eine ubiquitäre Komponente der Lipide in nahezu allen Lebewesen. Die in Tieren, Pflanzen und niederen Organismen am häufigsten auftretende FS ist Palmitinsäure (16:0), gefolgt von Stearinsäure (18:0), die ebenfalls in den Lipiden fast aller lebenden Organismen auftritt (*lipid library*).

In einfach ungesättigten FS führt die *cis*-Doppelbindung zu einem Knick in der Kohlenwasserstoffkette um ca. 30°, was eine reduzierte Verdichtung in Membranen oder Kristallstrukturen zur

⁸ <http://lipidlibrary.aco.org/>

Folge hat. Ölsäure (18:1-c9; Abb. 11) ist die häufigste einfach ungesättigte FS in pflanzlichen und tierischen Geweben. Palmitoleinsäure (16:1-c9) ist eine ubiquitäre, aber normalerweise geringfügig vorkommende FS der tierischen Lipide. Myristoleinsäure (14:1-c9) wird aus Myristinsäure hergestellt und kommt in der Natur selten vor (*lipid library*).

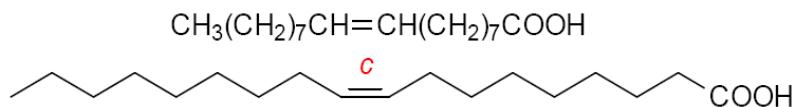


Abb. 11: Darstellung von Ölsäure. Ölsäure wird auch als *cis*-9-Oktadekansäure oder als 18:1-c9 (n-9) bezeichnet. *c: cis* (*lipid library*).

Lipide aller höheren Organismen beinhalten außerdem beträchtliche Mengen an mehrfach ungesättigten Fettsäuren mit zwei oder mehreren Doppelbindungen, die jeweils durch eine Methylengruppe getrennt sind. Diese FS sind wichtige Bestandteile der Phospholipide und reduzieren die Starrheit von Membranen. In der Natur existieren zwei Familien der mehrfach ungesättigten FS, die biosynthetisch von Linol- (18:2-c9,c12) oder α -Linolensäure (18:3-c9,c12,c15) abstammen. Obwohl es sich bei Linolsäure für den Menschen um eine essentielle FS handelt, ist sie die am häufigsten auftretende mehrfach ungesättigte FS in den meisten Lipidklassen. α -Linolensäure muss ebenfalls mit der Nahrung aufgenommen werden (*lipid library*).

1.5.2 Triglyceride und Sterole

Triglyceride (Triacylglycerine; Abb. 12 A) bestehen aus Glycerin, von welchem jede Hydroxylgruppe mit einer FS verestert ist. Fast alle wichtigen Fette und Öle aus tierischer und pflanzlicher Herkunft bestehen zum Großteil aus dieser Lipidklasse. Aufgabe der Triglyceride ist die Lipidspeicherung in Zellen, wo sie in intrazellulären Lipid Droplets (s. 1.5.6) auftreten. Die Fettsäuren werden durch Hydrolyse, katalysiert von Lipasen, freigegeben, wenn sie benötigt werden (*lipid library*). Ein präzises Gleichgewicht zwischen Lipidsynthese (Lipogenese) und Lipidmobilisierung (Lipolyse) sorgt für den richtigen Gehalt an Speicherlipiden in den Zellen (Grönke *et al.*, 2007).

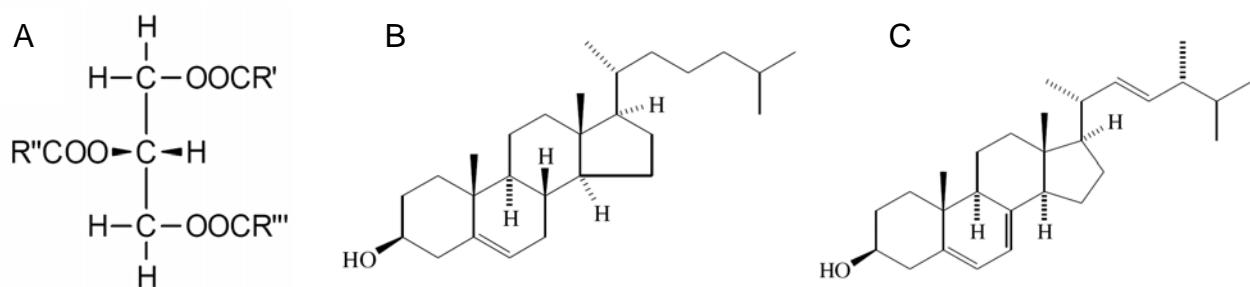


Abb. 12: Struktur von Triglyceriden, Cholesterin und Ergosterin. A: Allgemeine Struktur eines Triglycerids (Christie und Han, 2003). B: Cholesterin. C: Ergosterin, das dominierende Sterol in *Drosophila* (B und C: Gunstone und Herslöt, 2000).

Sterole sind die am besten untersuchten Lipidspezies. Sie sind ein wichtiger Bestandteil von Biomembranen und ein bestimmender Faktor der Membranorganisation (Maxfield und Tabas, 2005). Säuger haben komplizierte Mechanismen entwickelt, um den zellulären Sterolspiegel durch Regulation von Synthese, Influx und Efflux präzise zu kontrollieren (Simons und Ikonen, 2000). Die strukturell sehr komplexen Lipide sind in Verdauungsprozesse, hormonelle Abläufe, die Entwicklung von Gewebe und die Membranpermeabilität involviert (Eaton, 2006; Haines, 2001). Cholesterin (Abb. 12 B) ist der häufigste Vertreter der Sterole in Membranen tierischer Gewebe. Hefen und Pilze haben anstelle von Cholesterin einen größeren Anteil an Ergosterin (Abb. 12 C). Auch in embryonalen Membranen von *Drosophila melanogaster* stellt Ergosterin mit 69% das dominierende Sterol dar, während Cholesterin nur 3% zum Gesamtanteil der Sterole beiträgt (*lipid library*; Rietveld *et al.*, 1999).

1.5.3 Phospholipide und Sphingomyelin

Phospholipide (Glycerophospholipide), zusammen mit Sphingolipiden und Glycosphingolipiden, sind ebenfalls strukturelle Elemente aller biologischen Membranen (*lipid library*).

Phospholipide bestehen aus einer polaren Phosphorgruppe und einem Glycerin Rückgrat, die über eine Phosphodiesterbindung verbunden sind (Abb. 13). Zwei Fettsäuren sind über zwei Acyl- oder über eine Acyl- und eine Alkyl-Bindung an das Glycerin gebunden. Phospholipide sind die Hauptkomponenten biologischer Membranen und können selbst als Second Messenger wirken oder als Vorläufer dieser sekundären Botenstoffe fungieren (Bleijerveld *et al.*, 2006). Bei Lysophospholipiden ist nur eine Fettsäure mit dem Rückgrat verbunden. Diese Lipide spielen neben der Funktion als Membranphospholipid-Metabolite eine wichtige Rolle als intrazelluläre Signalmoleküle (Schmitz und Ruebsaamen, 2010). Sie regulieren viele verschiedene zelluläre Aktivitäten, wie beispielsweise Zellproliferation und Wundheilung (Fukushima *et al.*, 2001).

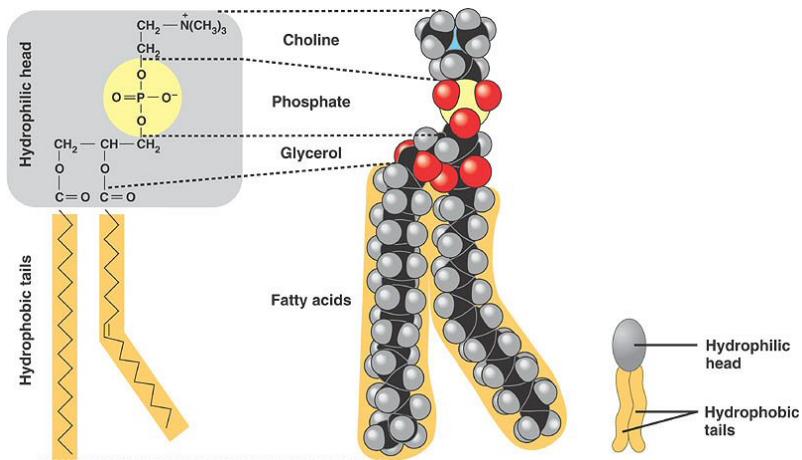


Abb. 13: Schematische Darstellung eines Phospholipids. Phospholipide sind amphiphil und bestehen aus einer hydrophilen Kopfgruppe und hydrophoben Kohlenwasserstoffketten, den Fettsäuren⁹.

Phosphatidylcholin (PC; Abb. 14 A) ist ein zwitterionisches Lipid und normalerweise das prominenteste Phospholipid in den Membranen tierischer und pflanzlicher Gewebe. Das am zweithäufigsten auftretende Phospholipid in Eukaryoten ist Phosphatidylethanolamin (PE; Abb. 14 B). Es hat eine kleine Kopfgruppe sowie die Fähigkeit, Wasserstoff zu binden und kann enzymatisch zu PC umgewandelt werden. Phosphatidylserin (PS; Abb. 14 C) ist ein schwach saures Lipid, das in nahezu allen Geweben vorkommt und ausschließlich auf der inneren Oberfläche der Lipiddoppelschicht lokalisiert ist. Es ist in viele biologische Prozesse, wie beispielsweise Apoptose, involviert und bildet auch Komplexe mit Kalzium als Grundlage für Knochenwachstum. Phosphatidylglycerol (PG; Abb. 14 D) ist in vielen Geweben nur in Spuren vorhanden und der biosynthetische Vorläufer von Cardiolipin (Abb. 14 E). Lysophosphatidylcholin (LPC; Abb. 14 F) enthält nur eine Fettsäure pro Molekül und weist eine höhere Löslichkeit in Wasser auf als die meisten anderen Lipide. Phosphatidylinositol (PI; Abb. 14 G), welches die optisch inaktive Inositol-Form *myo*-Inositol enthält, kommt in besonders hohen Konzentrationen im Gehirn vor (*lipid library*).

⁹ http://kvhs.nbed.nb.ca/gallant/biology/phospholipid_structure.jpg

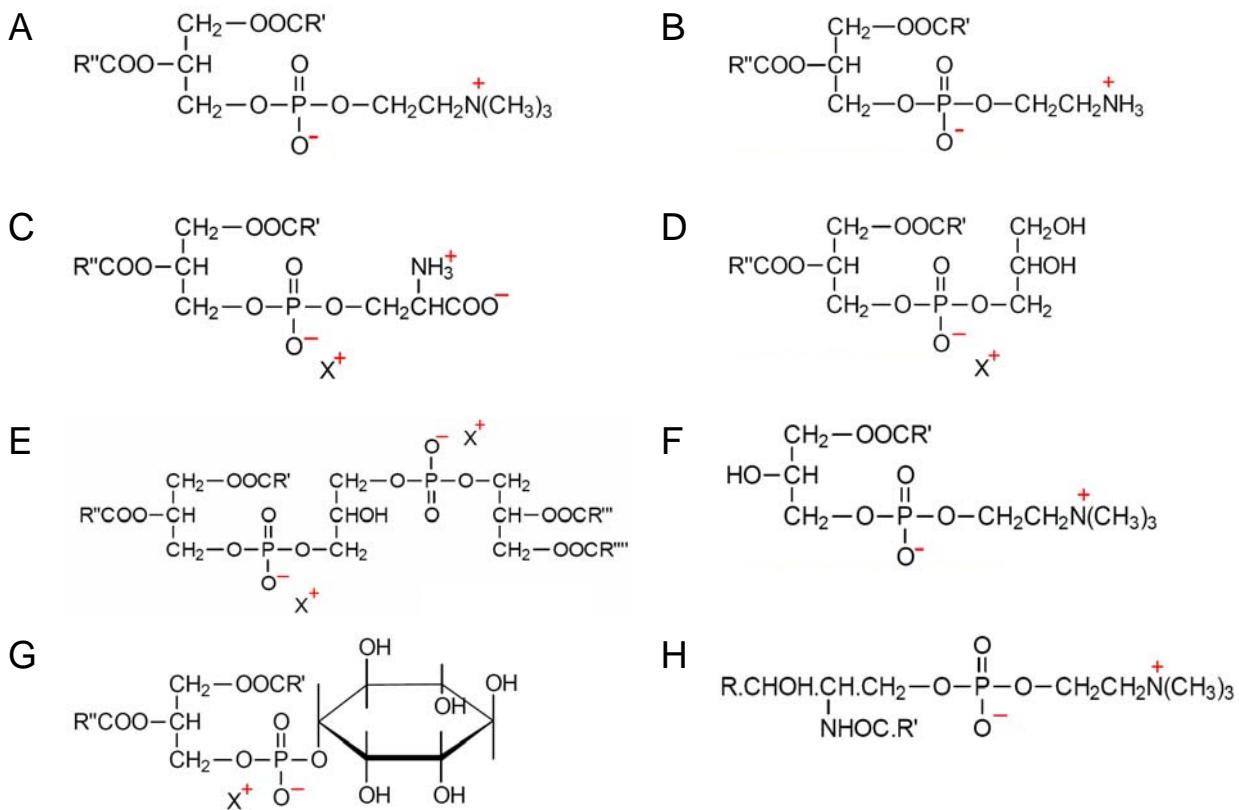


Abb. 14: Struktur von verschiedenen Phospholipiden und von Sphingomyelin. A: Phosphatidylcholin. B: Phosphatidylethanolamin. C: Phosphatidylserin. D: Phosphatidylglycerol. E: Cardiolipin. F: Lysophosphatidylcholin. G: Phosphatidylinositol. H: Sphingomyelin (*lipid library*).

Sphingolipide sind in allen Zelltypen zu finden (Levade *et al.*, 2001), funktionieren als bioaktive Signalmoleküle und sind an der Regulation des Zellwachstums, an der Zelldifferenzierung, an Seneszenz und an Apoptose beteiligt (Bartke und Hannun, 2009). Sphingomyelin (Abb. 14 H), ein Ceramid mit Phosphorylcholin, ist das am häufigsten vorkommende Sphingolipid in tierischen Zellmembranen (*lipid library*). Sphingosylphosphoethanolamin (SPE; ohne Abbildung) ist Sphingomyelin mit Ethanolamin als Kopfgruppe (Dr. Gerhard Liebisch, persönliche Mitteilung).

1.5.4 Die Funktion von Lipiden in Biomembranen

Die repräsentative Eigenschaft von Phospholipiden ist, dass sie amphiphil sind (Abb. 13), was dazu führt, dass sie in wässriger Lösung Micellen oder doppelschichtige Aggregate bilden. Letztere grenzen als Biomembranen den Zellinhalt vom umgebenden Milieu ab (Abb. 15). Die spezifische Beschaffenheit dieser Membranen hat sich im Laufe der Evolution entwickelt, um einerseits eine Abgrenzung für die Diffusion von Ionen und anderen Molekülen in zelluläre Bereiche, in denen sie nicht benötigt werden, zu sichern. Andererseits sind diese Zellmembranen stabile molekulare Plattformen für essentielle metabolische Ereignisse und für die Aufnahme von extrazellulären Signalen. Proteine, wie Enzyme oder Transportsysteme, überspannen die Dop-

pelschicht und nehmen einen großen Teil ihrer Oberfläche ein. Über Aminosäurereste interagieren sie elektrostatisch mit den Ionengruppen der polaren Lipide, woraus eine meist negative oder zwitterionische Nettoladung resultiert. Obwohl sich alle Lipide in einer dynamischen Fluktuation befinden, werden Membranlipide, außer unter Stresskonditionen, in ihrem Gehalt und in ihrer Zusammensetzung konserviert (*lipid library*).

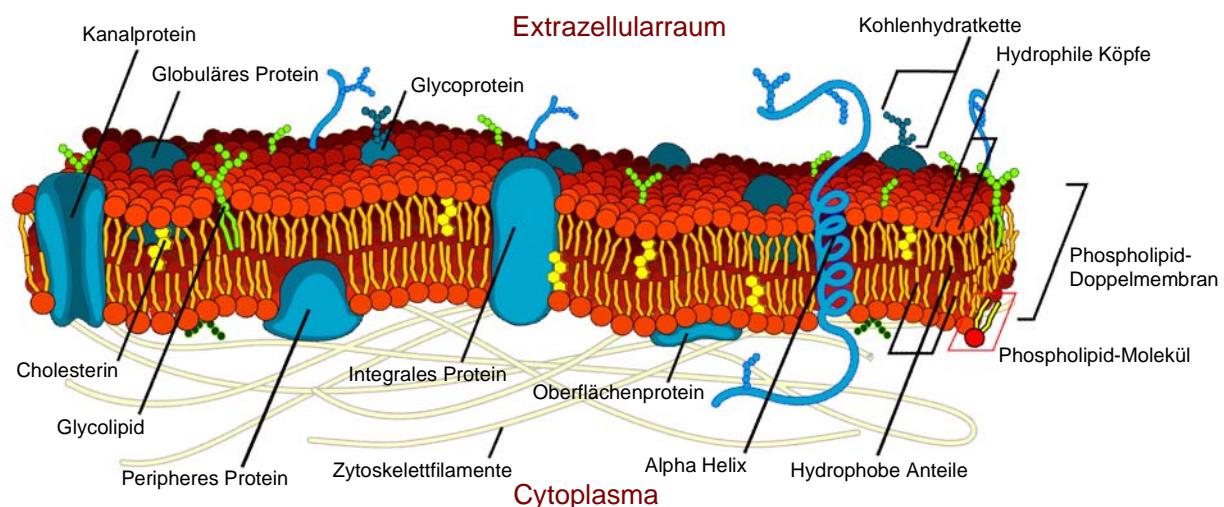


Abb. 15: Schematische Darstellung einer Biomembran. Biomembranen sind doppelschichtige Lipidaggregate mit integralen Proteinen, Kanälen und assoziierten Oberflächenproteinen¹⁰.

Phospholipide sind in der Lipiddoppelschicht asymmetrisch über den exo- und cytoplasmatischen Bereich verteilt (Simons und Ikonen, 1997). PC und Sphingolipide sind meist in der äußeren Membran lokalisiert, während sich PI und PE primär auf der Innenseite befinden. Die richtige Balance zwischen gesättigten, einfach und mehrfach ungesättigten Fettsäuren in den Phospholipiden ist wichtig, um eine optimale Fluidität der Membran zu gewährleisten (*lipid library*).

Die Zusammensetzung der Membranen beeinflusst ihre Organisation und ihre Eigenschaften, weshalb Störungen in Lipidmetabolismus und -transport eine wesentliche Rolle bei Krankheiten spielen (Maxfield und Tabas, 2005). Einige Beispiele dafür sind neurodegenerative Krankheiten, Diabetes, Krebs und Infektionskrankheiten, welche teilweise durch Ungleichgewichte in Protein-Lipid Interaktionen zustande kommen (Wenk, 2005).

¹⁰ <http://de.academic.ru/dic.nsf/dewiki/1545499>

1.5.5 Möglichkeiten zur Detektion von Lipiden

Die Fortschritte, die bis heute in den Feldern Genomics und Proteomics erzielt werden konnten, sind mit den Lipidomics und Metabolomics noch lange nicht erreicht. In der Natur kommen zahlreiche verschiedene Lipide vor, welche sich chemisch und strukturell voneinander unterscheiden. In den letzten Jahren haben sich viele Mechanismen zur Analyse von Lipiden etabliert, wobei mit jeder dieser Techniken andere Lipidspezies detektiert werden können und für diese Detektion jeweils andere Voraussetzungen erfüllt werden müssen. Dünnschichtchromatographie (DC) ist eine einfache Methode, mit welcher die meisten Lipidklassen untersucht werden können. Nachteile sind die geringe Auflösung und eine geringe Sensitivität. Durch Gaschromatographie (GC) können nach Derivatisierung der polaren Lipide die unpolaren Komponenten analysiert werden, weshalb die GC eine weit verbreitete Technik zur Feststellung der Fettsäurezusammensetzung darstellt. Durch Elektrospray-Ionisation Tandem-Massenspektrometrie können polare Komponenten wie Phospholipide detektiert werden. Weitere Methoden sind beispielsweise High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) und Nukleare Magnetische Resonanz (NMR) Spektroskopie. Es gibt jedoch keine Möglichkeit, in einem Experiment umfassend alle Lipidbestandteile eines Gewebes zu messen (Wenk, 2005).

1.5.6 Die Bedeutung von *Drosophila melanogaster* für die Lipidforschung

In den letzten Jahren haben sich Modellorganismen wie *Caenorhabditis elegans* und *Drosophila melanogaster* zu äußerst beliebten Forschungsobjekten für Analysen der Physiologie von Fettleibigkeit entwickelt (Kulkarni und Perrimon, 2005). Durch genomweite Screens konnten sowohl in den Nematoden (Ashrafi *et al.*, 2003) als auch in der Taufliege (Grönke *et al.*, 2005; Pospisilik *et al.*, 2010) Gene identifiziert werden, die einen Einfluss auf den Lipidmetabolismus haben. Von vielen dieser Gene sind Homologe bei Säugern bekannt, die ebenfalls eine Rolle in der Lipidhomöostase spielen (Kulkarni und Perrimon, 2005).

Analog zu den Adipozyten im Säuger sind es bei Insekten Fettkörperzellen, die Energiereserven des tierischen Organismus bereitstellen. Beide Zelltypen akkumulieren Triglyceride in intrazellulären Lipid Droplets (Abb. 16 A), was darauf hindeutet, dass die Strategie der Energie- und Fettspeicherung evolutionär hochkonserviert ist (Grönke *et al.*, 2003; Kulkarni und Perrimon, 2005). Lipid Droplets bestehen aus einer proteinbeschichteten Phospholipid-Monolayer Membran, welche einen hydrophoben Kern mit den neutralen Speicherfetten umschließt. Sie sind primär passive Speicherstätten für Fette und Lipidhormon-Vorläufer, interagieren aber auch mit zahlreichen Zellkompartimenten und sind ein wichtiger Bestandteil verschiedener zellulärer Prozesse (Beller *et al.*, 2006). In *Drosophila* haben sie einen Durchmesser von 0,5 bis 10 µm und

kommen in Fettkörperzellen, in Epithelzellen des Mitteldarms und in larvalen Oenocyten vor (Abb. 16 B; Gutierrez *et al.*, 2007; Beller *et al.*, 2006).

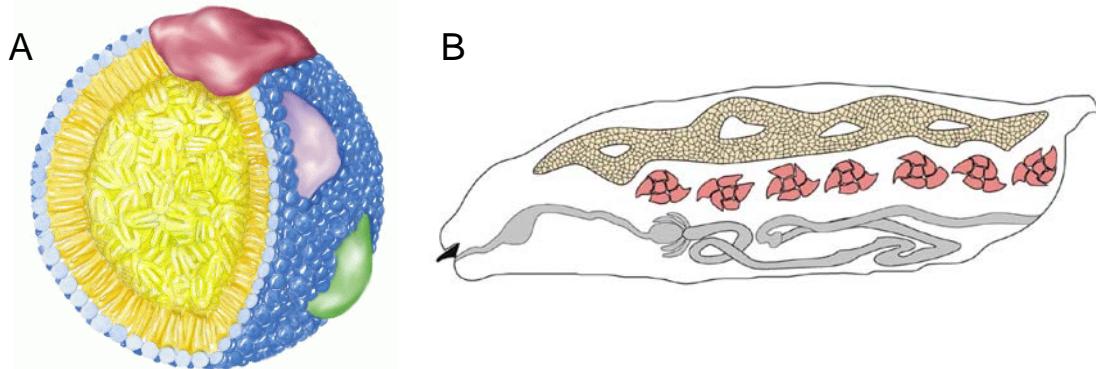


Abb. 16: Schematische Darstellung der Lipid Droplets und ihrer Speicherorte in *Drosophila melanogaster*. A: Darstellung eines Lipid Droplets¹¹. B: Darstellung einer Larve von *Drosophila*, in welcher die Hauptspeicherorte von Lipid Droplets abgebildet sind: Fettkörper (beige), Oenocyten (pink) und der Darm (grau; Gutierrez *et al.*, 2007).

Das Larvalstadium von *Drosophila* ist charakterisiert durch umfangreiche Nahrungszufuhr, wodurch die Akkumulation von Lipidreserven für die Puppenphase ermöglicht wird. Dabei wachsen die Larven in den letzten 3 Tagen vor der Verpuppung um das 200-fache (Aguila *et al.*, 2007). Anschließend hören die geschlüpften Larven auf zu fressen und beginnen zu wandern, um einen geeigneten Platz für die Verpuppung zu suchen (Zinke *et al.*, 2002). Die Organisation der Fettdepots erfordert ein intaktes Zusammenspiel von zentralen Regulatoren des Fressverhaltens im Nervensystem, neuroendokrinen Signalen und metabolischen Regulatoren von Energieaufwand und Fettspeicherung (Kulkarni und Perrimon, 2005). Viele larvale Fettkörperzellen werden am Ende in den adulten Fliegen durch eine Caspase-Kaskade, welche zum apoptotischen Zelltod führt, entfernt (Aguila *et al.*, 2007).

Die Lipolyse in *Drosophila* wird zweifach reguliert, wobei die Inaktivierung eines der beiden Kontroll-Pathways zu Fliegen mit übermäßiger Fett-Akkumulierung und einer begrenzten Fähigkeit, Lipidreserven zu mobilisieren, führt (Grönke *et al.*, 2007). Die Oenocyten agieren dabei *downstream* vom Fettkörper, akkumulieren bei Nahrungsmangel Lipid Droplets und werden auch dafür benötigt, das im Fettkörper gespeicherte Lipid aufzubrauchen. Im Säuger wird bei Nahrungsmangel durch eine Erhöhung der Aktivität von Hormon-sensitiven Lipasen und durch Expression der *adipose triglyceride lipase* (ATGL) die Lipolyse von Triglyceriden angekurbelt (Gutierrez *et al.*, 2007). Das Protein Brummer aus *Drosophila* ist eine ATGL-ähnliche Lipase, die in den Lipid Droplets lokalisiert ist und vor allem in Fettkörperzellen exprimiert wird (Grönke *et al.*, 2005). Die Mobilisierung der Fettreserven in *Drosophila* wird zusätzlich von dem Lipid Droplet Protein Lsd2 (*lipid storage droplet*) beeinflusst, welches mit Perilipin, einem in Säugern vorkom-

¹¹ http://www.mpibpc.mpg.de/groups/jaeckle/pages/Project_Beller/Lipid%20drop%20chol-free.gif

menden Inhibitor der Hydrolyse von Triglyceriden, verwandt ist (Grönke *et al.*, 2005). Vermutlich sind die Oenocytten in *Drosophila* das Gewebe, das Fettsäuren in ähnlicher Weise wie die Leber bei Säugern synthetisiert, modifiziert und oxidiert. Oenocytten regulieren auch larvales Wachstum, Lipidgehalt, Nahrungszufuhr und die Entwicklung (Gutierrez *et al.*, 2007).

Die Schlüsselkomponenten und die regulatorischen Mechanismen der Lipolyse sind also zwischen Insekten und Säugern hochkonserviert, was *Drosophila* zu einem wertvollen Modellsystem für die Erforschung des Lipidmetabolismus macht (Grönke *et al.*, 2007). Trotzdem wurden bisher keine detaillierten Analysen von Lipidgehalt und -zusammensetzung der Taufliege durchgeführt.

1.6 Zielsetzung dieser Arbeit

Im Rahmen dieser Dissertation sollten die ABC-Transporter White (W), Scarlet (St) und Brown (Bw) aus *Drosophila melanogaster* genauer untersucht werden, um Funktionen dieser Proteine neben der Pigmentierung der Komplexaugen zu beschreiben. In einer vorhergehenden Diplomarbeit konnten St und W bereits in intrazellulären Strukturen der Malpighischen Gefäße lokalisiert werden (Ohmann, 2006). Die Funktion von W, St und Bw in diesen Organen genauer zu charakterisieren, war Teil der vorliegenden Arbeit.

Drosophila White findet seine homologen Proteine in der humanen Unterfamilie ABCG. Im Rahmen einer Diplomarbeit wurde bereits gezeigt, dass ABCG1 *in vivo* nicht in der Lage ist, die Funktion von White zu übernehmen (Daller, 2005). Da ABCG2 aufgrund funktioneller Ähnlichkeiten möglicherweise das humane Homolog von White darstellen könnte, sollte das Protein nun auf diesen Aspekt hin untersucht werden.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war, ein detailliertes Lipidmuster von *Drosophila* zu erstellen, wozu unterschiedliche Methoden für Lipidanalysen an der Taufliege etabliert werden sollten. Neben der Erstellung einer Übersicht über die Verteilung der Lipidspezies im Wildtyp sollten auch Analysen verschiedener Mutanten durchgeführt werden. Nachdem Mutationen in humanen ABC-Transportern für Störungen des Lipidstoffwechsels verantwortlich sind, sollten Fliegen mit Defekten in ABCA- bzw. ABCG-Genen auf Veränderungen von Lipidgehalt und -zusammensetzung untersucht werden. Ferner sollte analysiert werden, ob bestimmte Proteine, welche primär die Pigmentierung der Komplexaugen beeinflussen, ebenfalls im Zusammenhang mit dem Lipidmetabolismus stehen.

2 Material

2.1 Organismen

2.1.1 Bakterienstämme

Stamm	Eigenschaften	Herkunft/Referenz
<i>Bacillus subtilis</i> Δ ribB::Erm ^r	<i>Bacillus subtilis</i> Marburg 168; Deletion der Riboflavin Synthase ribB mit der Resistenzkassette Erm ^r	Vogl <i>et al.</i> , 2007
<i>Escherichia coli</i> XL1-blue	<i>supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thi relA1 lac F</i> [<i>proAB⁺</i> , <i>lacI^q</i> <i>lacZΔM15</i> <i>Tn10</i> (<i>tet^r</i>)]	Stratagene/Sambrook <i>et al.</i> , 1989

Tabelle 2: Verwendete Bakterienstämme.

Die Anzucht der Bakterien erfolgte 14 bis 16 Stunden bei 37°C auf Agarplatten oder in Flüssigkulturen auf einem Rundschüttler bei 220 rpm.

2.1.2 Fliegenstämme

2.1.2.1 Wildtypstämme

Name	Details	Herkunft	Literatur
BK (Berlin-K)	Wildtypstamm	Bloomington (8522)	Flybase
CS (Canton S)	Wildtypstamm <i>Canton Special</i>	Stammsammlung	Lindsley und Grell, 1968
CS-1 (Canton S)	Wildtypstamm <i>Canton Special</i>	Bloomington (1)	Lindsley und Grell, 1968
CSi2 (CS-iso2B)	Canton S mit isogenisiertem II. Chromosom	Bloomington (9514)	Sharma <i>et al.</i> , 2005
OR (Oregon R)	Wildtypstamm	Stammsammlung	Lindsley und Grell, 1968
OR-C (Oregon R-C)	Wildtypstamm	Bloomington (5)	Lindsley und Grell, 1968
ORiX (OR-SNPisoX)	Oregon R mit isogenisiertem X-Chromosom	Bloomington (6361)	Hoskins <i>et al.</i> , 2001
RAL (RAL-555)	Wildtypstamm, sequenziert	Bloomington (25198)	Flybase

Tabelle 3: Verwendete Wildtypstämme.

2.1.2.2 Mutanten

Name	Details	Herkunft	Literatur
<i>bw</i> ¹	<i>brown</i> -Mutante, ABCG-Transporter (CG17632, II)	Stammsammlung (Bloomington, 245)	Lindsley und Grell, 1968
<i>bw</i> ¹⁶	<i>brown</i> -Mutante	Bloomington (9475)	Flybase
<i>bw</i> ¹⁹	<i>brown</i> -Mutante	Bloomington (9474)	Flybase
<i>bw</i> ^{2b}	<i>brown</i> -Mutante	Bloomington (248)	Lindsley und Grell, 1968
<i>bwst</i> (<i>bw</i> ¹ ; <i>st</i> ¹)	<i>brown-scarlet</i> -Mutante	Stammsammlung (Bloomington, 686)	Flybase

Name	Details	Herkunft	Literatur
<i>bwst-2</i> (<i>bw</i> ¹ ; <i>st</i> ¹)	brown-scarlet-Mutante, gekreuzt aus <i>st</i> ¹ und <i>bw</i> ¹	vorliegende Arbeit	
<i>ca</i> ¹	claret-Mutante, RCC1-GEF für Rab-RP1 (CG31037, III)	Bloomington (459)	Lindsley und Grell, 1968
<i>car</i> ¹	carnation-Mutante, VPS33 (CG12230, X)	Bloomington (19)	Lindsley und Grell, 1968
<i>cd</i> ¹	cardinal-Mutante (unannotiert)	Bloomington (3052)	Lindsley und Grell, 1968
<i>cm</i> ¹	carmine-Mutante, AP-3 μ (CG3035, X)	Bloomington (21)	Lindsley und Grell, 1968
<i>cn</i> ¹	cinnabar-Mutante, Kynurenin-3-Hydroxylase (CG1555, II)	Bloomington (263)	Lindsley und Grell, 1968
<i>cnbw</i> (<i>cn</i> ¹ <i>bw</i> ¹)	cinnabar-brown-Mutante	Stammsammlung (Bloomington, 264)	Flybase
<i>dor</i> ¹ (<i>dor</i> ¹ /C(1) DX, <i>y</i> ¹ <i>f</i> ¹)	deep orange-Mutante, VPS18 (CG3093, X)	Bloomington (751)	Lindsley und Grell, 1968
<i>g</i> ¹	garnet-Mutante, AP-3 δ (CG10986, X)	Bloomington (3958)	Lindsley und Grell, 1968
<i>kar</i> ²	karmoisin-Mutante, Phenoxazinon Synthetase (CG12286, III)	Bloomington (524)	Lindsley und Grell, 1968
<i>ltrl</i> (<i>lt</i> ¹ <i>rl</i> ¹)	light-rolled-Mutante <i>lt</i> : VPS41 (CG18028, II)	Bloomington (1051)	Lindsley und Grell, 1968
<i>ltd</i> ¹	lightoid-Mutante, Rab-RP1 (CG8024, II)	Bloomington (338)	Lindsley und Grell, 1968
<i>or</i> ^{49h}	orange-Mutante, AP-3 σ (CG3029, II)	Bloomington (2385)	Lindsley und Zimm, 1992
<i>p</i> ¹	pink-Mutante (CG9770, III)	Bloomington (552)	Lindsley und Grell, 1968
<i>pd</i> ¹	purpleoid-Mutante (nicht annotiert)	Bloomington (361)	Lindsley und Grell, 1968
<i>po</i> ²	pale ocelli-Mutante (nicht annotiert)	Bloomington (369)	Lindsley und Grell, 1968
<i>pr</i> ¹	purple-Mutante, Sepiapterin Synthetase A (CG16784, II)	Bloomington (370)	Lindsley und Grell, 1968
<i>Pu</i> ¹	Punch-Mutante, GTP Cyclohydro-lase I (CG9441, II)	Bloomington (1002)	Lindsley und Grell, 1968
<i>rb</i> ¹	ruby-Mutante, AP-3 β (CG11427, X)	Bloomington (88)	Lindsley und Grell, 1968
<i>rl</i> ¹	rolled-Mutante, MAP-Kinase (CG12259, II)	Bloomington (386)	Lindsley und Grell, 1968
<i>st</i> ¹	scarlet-Mutante, ABCG-Transporter (CG4314, III)	Stammsammlung (Bloomington, 605)	Lindsley und Grell, 1968 Tearle <i>et al.</i> , 1989
<i>v</i> ¹	vermillion-Mutante, Tryptophan 2,3-Dioxygenase (CG2155, X)	Bloomington (137)	Lindsley und Grell, 1968
<i>w</i> ¹	white-Mutante, ABCG-Transporter (CG2759, X)	Bloomington (145)	Lindsley und Grell, 1968
<i>w</i> ¹¹¹⁸	white-Mutante, ABCG-Transporter (CG2759, X)	Stammsammlung	Lindsley und Grell, 1968
<i>w-3</i> (<i>w</i> ¹¹¹⁸)	white-Mutante	Bloomington (3605)	Lindsley und Grell, 1968
<i>w-5</i> (<i>w</i> ¹¹¹⁸)	white-Mutante	Bloomington (5905)	Lindsley und Grell, 1968
<i>y w</i> (<i>y</i> ¹ <i>w</i> ¹)	yellow-white-Mutante	Stammsammlung	
<i>z</i> ^{a693}	zeste-Mutante (CG7803, X)	Bloomington (1498)	Lindsley und Grell, 1968

Tabelle 4: Verwendete Mutanten.

2.1.2.3 RNAi-Linien

Durch das UAS-GAL4-System (Brand und Perrimon, 1993) können bestimmte Gene mithilfe verschiedener Aktivator-Linien in beliebigen Geweben exprimiert werden (siehe auch Duffy, 2002). Bei Verwendung von RNAi-Linien werden die entsprechenden Gene gezielt herunterreguliert.

Name	Zielgen/Stamm	Typ	Transformant ID	Chromosom	Herkunft/ Literatur
R1_G2759_w	CG2759	ABCG (<i>white</i>)	30033	III	VDRC
R2_1555_cn	CG1555	<i>cinnabar</i>	11322	II	VDRC
R3_12286_kar	CG12286	<i>karmoisin</i>	37348	II	VDRC
R4_9542	CG9542	evtl. <i>Kynurenin Formamidase</i>	45622	III	VDRC
R5_G4314_st	CG4314	ABCG (<i>scarlet</i>)	40875	II	VDRC
R6_A8473	CG8473, CG33172	ABCA	49462	III	VDRC
R7_A1819	CG1819, CG34120	ABCA	11673	III ^a	VDRC
R8_A1718	CG1718	ABCA	44449	II	VDRC
R9_A1718	CG1718	ABCA	44451	III	VDRC
R10_A1801	CG1801	ABCA	8655	III	VDRC
R11_A1494	CG1494	ABCA	30320	III	VDRC
R12_G3164	CG3164	ABCG	42733	II	VDRC
R13_G3164	CG3164	ABCG	42734	II	VDRC
R14_G4822	CG4822	ABCG	42729	II	VDRC
R15_G4822	CG4822	ABCG	42730	III	VDRC
R16_G9892	CG9892, CG31689	ABCG	2584	II (steril)	VDRC
R17_G9892	CG9892, CG31689	ABCG	2585	II (letal)	VDRC
R18_G9664	CG9664	ABCG	42465	X	VDRC
R19_G9664	CG9664	ABCG	42467	III	VDRC
R20_G3327_E23	CG3327	ABCG (<i>E23</i>)	2620	II ^b	VDRC
R21_G2969_Atet	CG2969	ABCG (<i>Atet</i>)	42750	III	VDRC
R22_G2969_Atet	CG2969	ABCG (<i>Atet</i>)	42751	II	VDRC
R23_A7491	CG7491, CG31731	ABCA	11082	X	VDRC
R24_G17632_bw	CG17632	ABCG (<i>brown</i>)	44268	II	VDRC
R25_G7346	CG7346, CG32091	ABCG	5222	X	VDRC
R26_A6052	CG6052	ABCA	5310	III	VDRC
R27_A6052	CG6052	ABCA	5311	II	VDRC
R28_A4794	CG4794, CG31213	ABCA	40926	II	VDRC
R29_A4794	CG4794, CG31213	ABCA	40927	II	VDRC
R30_G18633	CG18633, CG31121	ABCG	43981	II	VDRC
R31_G11069	CG11069	ABCG	51367	III (letal)	VDRC
Kondo_w	<i>y w; p[UASdswhite]²⁴/y⁺ bw</i>	ABCG (<i>white</i>)		II	Kondo et al., 2006

Tabelle 5: Verwendete RNAi-Linien. ^a laut VDRC homozygot letal, ist aber lebensfähig. ^b laut VDRC homozygot steril, ist aber fertil. ID: Identifikationsnummer; VDRC: VDRC Stockcenter.

2.1.2.4 Treiber, Balancer und weitere Stämme

Stamm	Details	Herkunft	Literatur
<i>FM6</i>	Balancer-Stamm, X-Chromosom	Stammsammlung	Lindsley und Zimm, 1992
<i>FM6;; D³/TM6B (Tb)</i>	Doppelbalancer-Stamm, X- und III. Chromosom	vorliegende Arbeit	Lindsley und Zimm, 1992
<i>FM6; ScO/CyO</i>	Doppelbalancer-Stamm, X- und II. Chromosom	vorliegende Arbeit	Lindsley und Zimm, 1992
<i>w^{*/}; Sp/CyO; D³/TM6B (Tb)</i>	Doppelbalancer-Stamm, II. und III. Chromosom	Stammsammlung	Lindsley und Zimm, 1992
<i>w^{*/}; A441/SM6::TM6 (CyO, Tb)</i>	Doppelbalancer-Stamm, II. und III. Chromosom	Stammsammlung	Lindsley und Zimm, 1992
<i>y^{*/} w^{*/}; Sp/CyO; D³/TM6B (Tb)</i>	Doppelbalancer-Stamm im <i>y w</i> -HG	vorliegende Arbeit	Lindsley und Zimm, 1992
<i>+;; D³/TM6B (Tb)</i>	Balancer-Stamm, III. Chromosom, CS-HG	vorliegende Arbeit	
<i>+; ScO/CyO</i>	Balancer-Stamm, II. Chromosom, CS-HG	vorliegende Arbeit	
<i>+; Sp/CyO; st¹</i>	Balancer-Stamm, II. Chromosom im <i>st¹</i> - und CS-HG	vorliegende Arbeit	
<i>w^{*/}; daughterless-GAL4 (w; da-GAL4)</i>	Treiber-Linie zur Expression in allen Geweben, III	Stammsammlung	Smith und Cronmiller, 2001
<i>+; da-GAL4</i>	<i>da-GAL4</i> im CS-HG	vorliegende Arbeit	
<i>w^{*/}; Sp/CyO; da-GAL4</i>	<i>da-GAL4</i> , balanciert	vorliegende Arbeit	
<i>+; bw¹; da-GAL4</i>	<i>da-GAL4</i> im <i>bw¹</i> - und CS-HG	vorliegende Arbeit	
<i>y^{*/} w^{*/}; actin-GAL4/TM6B (Tb)</i>	Treiber-Linie zur Expression in allen Geweben, III	Stammsammlung	Ito <i>et al.</i> , 1997
<i>+; actin-GAL4/TM6B (Tb)</i>	<i>actin-GAL4</i> im CS-HG	vorliegende Arbeit	
<i>w^{*/}; actin-GAL4/CyO; D³/TM3 (Sb)</i>	Treiber-Linie zur Expression in allen Geweben, II	Stammsammlung	Ito <i>et al.</i> , 1997
<i>+; actin-GAL4/CyO; st¹</i>	<i>actin-GAL4</i> im <i>st¹</i> - und CS-HG	vorliegende Arbeit	
<i>w^{*/}; GMR-GAL4</i>	Treiber-Linie zur Expression in den Augen, II	Stammsammlung	Freeman, 1996
<i>+; GMR-GAL4</i>	<i>GMR-GAL4</i> im CS-HG, II	vorliegende Arbeit	
<i>w^{*/}; p[UAS-scarlet]³⁷</i>	<i>scarlet</i> cDNA unter UAS-Kontrolle, II	Diplomarbeit Julia Albrecht	Albrecht, 2005
<i>+; p[UAS-scarlet]³⁷; st¹</i>	p[UAS-scarlet] im <i>st¹</i> - und CS-HG	vorliegende Arbeit	
<i>+; bw¹; p[UAS-brown]⁶</i>	p[UAS-bw] im <i>bw¹</i> - und CS-HG	vorliegende Arbeit	
<i>y^{*/} w^{*/}; KiΔ2-3</i>	<i>yellow-white</i> -Stamm mit Transposase-Aktivität	Stammsammlung	Lindsley und Zimm, 1992
<i>y^{*/} w^{*/}; p[Cary⁺-GMR-mini-white]³</i>	<i>mini-white</i> DNA in <i>yellow-Carnegie4-GMR</i> , II	Diplomarbeit Barbara Daller	Daller, 2005
<i>y^{*/} w^{*/}; p[Cary⁺-GMR-ABCG1]³</i>	<i>ABCG1</i> DNA in <i>yellow-Carnegie4-GMR</i> , III	Diplomarbeit Barbara Daller	Daller, 2005

Tabelle 6: Verwendete Treiber, Balancer und weitere Stämme. HG: Hintergrund.

Die Fliegenstämme wurden in Gläsern mit Standardmedium (Maismehl, Agar, Sojamehl, Melasse, Malzextrakt, Hefe und 3 g/l Nipagin als Fungizid) bei 18°C und 65% relativer Luftfeuchtigkeit gehalten. Experimente und Kreuzungen wurden bei 25°C durchgeführt.

Alternativ wurde für Lipidanalysen auf *instant-Futter Formula 4-24 Drosophila Medium Blue* (Carolina Biological Supply Company) verwendet. Dafür wurden gleiche Mengen des Pulvers und Wasser (versetzt mit 10 ml/l Nipagin-Lösung; s. 2.7) gemischt.

2.2 Medien

Bezeichnung	Zusammensetzung
AXI-Platten	LB _{Amp} -Platten mit 50 µl X-Gal-Lösung und 50 µl 1 M IPTG
CSEG-Platten für <i>Bacillus subtilis</i>	16 g/l K ₂ HPO ₄ x 3 H ₂ O; 4,0 g/l KH ₂ PO ₄ ; 3,3 g/l (NH ₄) ₂ SO ₄ ; 0,12 g/l MgSO ₄ x 7 H ₂ O; 1,5 mg/l MnSO ₄ ; 22 mg/l Ammoniumeisencitrat; 6 g/l Natriumsuccinat; 8 g/l Kaliumglutamat; 5 g/l Glukose; 50 mg/l L-Tryptophan; 20 g/l Bacto Agar; 1 mg/l Erythromycin; 25 mg/l Lincomycin
Eiablageplatten	250 ml/l Apfelsaft; 2 g/l Bacto Agar; 25 g/l Saccharose; 4 g/l Nipagin gelöst in 20 ml Ethanol
LB ₀ -Medium	10 g/l Bacto Tryptone; 10 g/l NaCl; 5 g/l Bacto Yeast Extract; 3 ml/l 1 M NaOH; pH 7
LB _{Amp} -Medium	LB ₀ -Medium mit Ampicillin (50-100 µg/ml)
LB _{Amp} -Platten	LB _{Amp} -Medium (100 µg/ml Ampicillin) mit 8 g/l Bacto Agar

Tabelle 7: Verwendete Medien.

2.3 Vektoren

Bezeichnung	Größe	Eigenschaften/Verwendung	Resistenz	Herkunft/Literatur
pBluescript II SK- (pSK)	3,0 kb	Zwischenklonierung, <i>lacZ</i> in der MCS	Ampicillin	Stratagene
pGEM-T Easy	3,0 kb	Klonierung von PCR-Produkten, <i>lacZ</i> in der MCS	Ampicillin	Promega
pUAST	9,0 kb	Keimbahntransformation, <i>white</i> als Selektionsmarker	Ampicillin	Brand und Perrimon, 1993
yellow-Carnegie4	8,5 kb	Keimbahntransformation, <i>yellow</i> als Selektionsmarker	Ampicillin	Patton <i>et al.</i> , 1992

Tabelle 8: Verwendete Vektoren. *lacZ*: Gen für β-Galactosidase; MCS: *multiple cloning site*.

2.4 Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz 5'→ 3'/Nummer	Annealing-Temperatur	Verwendung/Herkunft
ABCG2-2100	ctt ctg ccc agg act caa tgc	50-55°C	Sequenzierung ABCG2
ABCG2-950	gga cta gta tag gaa tgg agc t	50-55°C	Sequenzierung ABCG2
AS2	caa cta ctg aaa tct gcc aag	55°C	Sequenzierung pUAST
S2	cat tcc acc act gct ccc	55°C	Sequenzierung pUAST
SV40	tag tt gtc caa tta tgt	55°C	Sequenzierung pUAST
bw-seq1	gac atc ttc gag ctc ttc acc	54°C	Sequenzierung brown
GMR3	cgg atc ctc tag agt cga c	53°C	Sequenzierung GMR-ABCG2
GMR5	gtc gac tct aga gga tcc g	53°C	Sequenzierung GMR-ABCG2
SP6	att tag gtg aca cta tag	55°C	Sequenzierung pGEM-T Easy
T3	aat taa ccc tca cta aag gg	55°C	Sequenzierung pSK
T7	gta ata cga ctc act ata ggg c	55°C	Sequenzierung pSK, pGEM-T Easy
wA	ggc atc caa gta tcg cca tc	55°C	Sequenzierung white
wB	gca gtt gaa gaa gtg cag cac	55°C	Sequenzierung white
5'bw-EcoRI	tag aat tcg ccg gtg agg tga ctg a	55-57°C	5'Primer für brown mit einer EcoRI Schnittstelle
3'bw-KpnI	tag gta ccg cac gag tac tca atg caa c	55-57°C	3'Primer für brown mit einer KpnI Schnittstelle
5'G2-HpaI-Kozak	gtt aac aaa atg tct tcc agt aat gtc gaa g	48-55°C	5'Primer für ABCG2 mit Kozak-Sequenz und einer HpaI Ss
3'G2-HpaI	gtt aac cac gtg att ctt cca caa gc	48-55°C	3'Primer für ABCG2 mit einer HpaI Schnittstelle
5'G2-EcoRI-Kozak	gaa ttc aaa atg tct tcc agt aat gtc gaa g	48-55°C	5'Primer für ABCG2 mit Kozak-Sequenz und einer EcoRI Ss
3'G2-XhoI	ctc gag cac gtg att ctt cca caa gc	48-55°C	3'Primer für ABCG2 mit einer XhoI Schnittstelle
5'GMR-SmaI	atc ccg ggt aca tac ata cta gaa ttg at	56°C	5'Primer für GMR-ABCG2 mit einer SmaI Schnittstelle
3'GMR-SmaI	tac ccg ggt tgg gct gca ggt cga cgg atc	56°C	3'Primer für GMR-ABCG2 mit einer SmaI Schnittstelle
rp49 reverse	gcg ggt gcg ctt gtt cga tcc	55°C	Housekeeper
rp49 forward	cca agc act tca tcc gcc acc	55°C	Housekeeper
bw-forw	gcg agc gaa agc gac tca g	50-51°C	RT-PCR
bw-rev2	gag ttc gta gcc cag gtc tg	50-51°C	RT-PCR
R5-ABCG1	cca tga tgg tgt cgg cac atc	48-55°C	RT-PCR
R3-ABCG1	ggc agt tca gac cca aat ccc	48-55°C	RT-PCR
R5-ABCG2	ctg gtc tca acg cca tcc tg	48-55°C	RT-PCR
R3-ABCG2	gac aca cca cgg ata aac tga g	48-55°C	RT-PCR
white	Dm01841738_m1	60°C	TaqMan Assay, Applied Biosystems
scarlet	Dm01822899_g1	60°C	TaqMan Assay, Applied Biosystems
brown	Dm01821716_g1	60°C	TaqMan Assay, Applied Biosystems
18S rRNA	Hs03003631_g1	60°C	TaqMan Assay, Applied Biosystems

Tabelle 9: Verwendete Oligonukleotide. Enzymschnittstellen sind hervorgehoben. Ss: Schnittstelle.

2.5 Antikörper

Antikörper	Bemerkungen	Herkunft
anti-Scarlet (α -St)	ungereinigtes Antiserum aus Kaninchen, die mit dem Scarlet-Peptid (StNT) immunisiert wurden (StNT repräsentiert 20 Aminosäuren des Aminoterminus des <i>scarlet</i> -Proteins; MSDSDSKRIDVEAPERVEQC). Verwendung: StNT T2 für Schnitte und Ganzpräparate	J. Pineda
anti-White (α -W)	ungereinigtes Antiserum aus Kaninchen, die mit dem White-Peptid (WECL) immunisiert wurden (WECL repräsentiert eine extrazelluläre Schleife des <i>white</i> -Proteins zwischen den Transmembran- α -Helices 5 und 6; RYANEGLLINQWADVEPGEC) Verwendung: WECL T2 für Schnitte und Ganzpräparate	J. Pineda
Alexa Fluor 488 nm GAR	sekundärer fluoreszierender Antikörper für Schnitte und Ganzpräparate	Molecular Probes

Tabelle 10: Verwendete Antikörper. GAR: *goat anti rabbit*; T2: Tier 2.

2.6 Kitsysteme

Bezeichnung	Verwendung	Herkunft
Big Dye Terminator v 1.1 Cycle Sequencing Kit	Sequenzierung	Applied Biosystems
Coomassie Plus Assay Kit	Proteinbestimmung (Bradford)	Thermo Scientific
peqGOLD TriFast	RNA Isolierung	Peqlab
pGEM-T Easy Vector System I	T/A Klonierung	Promega
QIAprep Spin Miniprep Kit	Plasmid-Extraktion	Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit	DNA Isolierung aus Agarosegelen	Qiagen
Reverse Transcription System	Reverse Transkription	Promega
RNeasy Mini Kit	RNA Isolierung	Qiagen
TaqMan Mastermix	TaqMan-PCR	Applied Biosystems

Tabelle 11: Verwendete Kitsysteme.

2.7 Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung	Verwendung
Acetat-Lösung	5 M Eisessig zu 5 M Kaliumacetat bis pH 4,8	Plasmid-Minipräparation
Alkali-SDS-Lösung	200 mM NaOH; 1% SDS (v/v)	Plasmid-Minipräparation
Bligh & Dyer	2/3 Methanol, 1/3 Chloroform	Lipidextraktion
Carnoy	30 ml Ethanol; 15 ml Chloroform; 5 ml Eisessig	Fixierung von Paraffinschnitten
DAPI Stammlösung	1 mg DAPI/ml; 180 mM Tris-HCl, pH 7,5	Anfärben von Zellkernen
Gel-Ladepuffer, 6-fach	0,001 M EDTA; 50% Glycerin (v/v); 0,25% Bromphenolblau (w/v); 0,25% Xylencyanol (w/v)	Agarosegelelektrophorese
GTE-Puffer	50 mM Glukose; 25 mM Tris/HCl, pH 8,0; 10 mM EDTA, pH 8,0	Plasmid-Minipräparation
Injektionspuffer	5 mM KCl; 0,1 mM NaPO ₄ , pH 6,8	Keimbahntransformation

Bezeichnung	Zusammensetzung	Verwendung
Kupfersulfatlösung	156,4 g CuSO ₄ x 5 H ₂ O; 94 ml H ₃ PO ₄ , auf 1 l H ₂ O	Besprühen von Dünnschichtchromatographieplatten
LSB (<i>low salt buffer</i>), 10-fach	200 mM Tris/HCl, pH 8,75; 100 mM KCl; 100 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ ; 20 mM MgSO ₄ ; 1 mg/ml BSA	Polymerasekettenreaktion
Nipagin-Lösung	100 mg/ml Nipagin in Ethanol	Fungizid für <i>instant</i> -Futter und Sucrose
NL-Mix	1 ml Essigsäure; 20 ml Diethylether; 80 ml Hexan	Laufmittel für Neutrallipide, Dünnschichtchromatographie
Paraformaldehyd	4% Paraformaldehyd in PBS (w/v)	Fixierung von Gewebe
PBS (<i>phosphate buffered saline</i>)	3 mM NaH ₂ PO ₄ ; 7 mM Na ₂ HPO ₄ ; 130 mM NaCl; pH 7,2	Präparation von Gewebe
PBT (0,1% oder 0,5%)	PBS mit Triton X-100 (v/v; 0,1% oder 0,5%)	Waschen von Gewebe
PL-Laufmittel	10 mM Ammoniumacetat in Methanol/Chloroform (3:1 v/v)	Laufmittel für Massenspektrometrie
PL-Mix	9 ml 0,25% KCl; 10 ml Methanol; 25 ml Chloroform; 25 ml Methylacetat; 25 ml 2-Propanol	Laufmittel für Phospholipide, Dünnschichtchromatographie
TAE-Puffer, 50-fach	242 g Tris-Base; 57,1 ml Essigsäure; 100 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0; auf 1 l H ₂ O	Agarosegelektrophorese (1-fach)
X-Gal-Lösung	8% X-Gal (w/v) in Dimethylformamid	AXI-Platten

Tabelle 12: Verwendete Puffer und Lösungen.

2.8 Größenstandards und Enzyme

Enzyme/Standards	Verwendung	Herkunft
CIAP	Dephosphorylierung von Vektoren	Fermentas
Expand High Fidelity	Polymerase für PCR-Reaktionen von Fragmenten über 3 kb	Roche
FastStart High Fidelity	Polymerase für PCR-Reaktionen	Roche
Restriktionsenzyme	Plasmidverdau	New England Biolabs
RNAse (10 µg/ml)	Mini-Präparation	Roth
T4 DNA Ligase	Ligation	Fermentas, New England Biolabs
Taq DNA Polymerase	Polymerase für Test-PCR-Reaktionen	vom Lehrstuhl selbst hergestellt
100 bp und 1 kb DNA-Leiter	Größenstandards für Agarosegel-elektrophorese	New England Biolabs

Tabelle 13: Verwendete Größenstandards und Enzyme. CIAP: *calf intestinal alkaline phosphatase*.

2.9 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Alle übrigen Chemikalien und Verbrauchsmaterialien wurden von folgenden Firmen bezogen: Amersham Life Sciences, Appligene, Beckmann, Biometra, BioRad, Biozym, Boehringer, Brand, Braun, Eppendorf, Fermentas, Fluca, Gibco BRL, Gilson, Invitrogen, Kimberly-Clark, Merck, Nalge, New England Biolabs, Qiagen, Roche, Roth, Sarstedt, Sigma-Aldrich, Stratagene und Whatman.

Entionisiertes gefiltertes Wasser wurde der Filtrieranlage Milli-Q Plus (Millipore) entnommen.

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Plasmid-Minipräparation (alkalische Lyse)

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde aus einer 2 ml Übernachtkultur im entsprechenden Selektionsmedium (LB_{Amp}) nach dem Protokoll von Sambrook *et al.* (1989) durchgeführt. Um RNA zu entfernen, wurde der GTE-Puffer mit 1 µl RNase (1 µg/µl) versetzt. Das DNA-Pellet wurde in 50 µl H₂O gelöst.

Benötigte man DNA mit höherem Reinheitsgrad, wurde der QIAprep Spin Miniprep Kit verwendet. Eluiert wurde mit 30 µl H₂O.

3.1.2 Spaltung von DNA durch Restriktionsenzyme

Der enzymatische Verdau von DNA erfolgte in einem Reaktionsvolumen von 10 bis 20 µl nach den Angaben des Herstellers (New England Biolabs).

3.1.3 Dephosphorylierung von Vektoren

Die Dephosphorylierung von Vektoren wurde mit CIAP (*calf intestinal alkaline phosphatase*) entsprechend den Herstellerangaben (Fermentas) durchgeführt.

3.1.4 Elektrophoretische Auftrennung von DNA

Die Elektrophorese von DNA-Fragmenten wurde in 0,8-2,0%igen Agarosegelen, denen Ethidiumbromid (0,1 mg/l, Roth) beigefügt wurde, durchgeführt. Die zu analysierenden Proben wurden mit Gel-Ladepuffer versetzt und auf das Gel geladen. Die Auftrennung erfolgte bei 80 bis 120 Volt in dem Elektrophoresepuffer TAE.

Bei der präparativen DNA-Gelelektrophorese wurden die Banden unter UV-Licht ausgeschnitten und mit dem QIAquick Gel Extraction Kit aufgereinigt. Eluiert wurde mit 50 µl H₂O.

3.1.5 Ligation

Die Ligation von DNA-Fragmenten erfolgte zwei Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 18°C in einem Reaktionsvolumen von 10 µl entsprechend den Herstellerangaben (Fermentas, New England Biolabs). Das Verhältnis von Plasmid zu Insert betrug 1 zu 3.

PCR-Produkte wurden 1 bis 2 h bei Raumtemperatur in den Vektor pGEM-T Easy (Promega) ligiert.

3.1.6 Hitzeschocktransformation von *E. coli*

Die *heat-shock* Transformation von Plasmid-DNA in chemisch kompetente *E. coli* Zellen wurde nach dem Protokoll von Ausubel *et al.* (1996, Unit 1.8.3) durchgeführt.

3.1.7 Polymerasekettenreaktion (PCR)

3.1.7.1 Standard-PCR

Für die Amplifikation von DNA-Fragmenten wurden folgender Standard-Ansatz und folgendes Programm verwendet:

Ansatz:

Matrize (ca. 100 ng)	X µl
10-fach <i>low salt buffer</i>	2,5 µl
40 mM dNTPs	1 µl
10 µM 5' Primer	1 µl
10 µM 3' Primer	1 µl
<i>Taq</i> Polymerase	1 µl
ddH ₂ O	ad 25 µl

Programm:

Denaturierung	95°C	5 min	1x
Denaturierung	95°C	1 min	
Annealing	x°C	1 min	30x
Kettenverlängerung	72°C	y min	
Kettenverlängerung	72°C	10 min	1x

x: je nach Annealing-Temperatur der verwendeten Primer; y: je nach Länge des PCR-Produkts.

3.1.7.2 Sequenzierung

Für die Sequenzierungs-Reaktion wurde der Big Dye Terminator v 1.1 Cycle Sequencing Kit mit folgendem Ansatz und folgendem Programm verwendet:

Ansatz:

Matrize (10 ng pro 100 bp)	X µl
5-fach Sequenzierpuffer	4 µl
Big Dye	1 µl
10 µM 5' oder 3' Primer	1 µl
ddH ₂ O	ad 20 µl

Programm:

Denaturierung	96°C	10 s	
Annealing	x°C	5 s	30x
Kettenverlängerung	60°C	4 min	

x: je nach Annealing-Temperatur der verwendeten Primer

Vor der Auf trennung der entstandenen DNA-Fragmente wurde der PCR-Ansatz durch Zugabe von 80 µl H₂O, 10 µl 3 M NaAc (pH 4,8) und 250 µl 100% EtOH gefällt. Anschließend wurde der Ansatz 15 min bei 13000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet zweimal mit 70% EtOH gewaschen, bevor es in 20 µl H₂O gelöst wurde.

Die elektrophoretische Auf trennung wurde bei der Firma Geneart durchgeführt. Die Datenauswertung wurde mit den Programmen Chromas Lite und DNA Star vorgenommen.

3.1.8 RNA-Isolierung

Die RNA-Isolierung mithilfe des RNeasy Mini Kits (Qiagen) erfolgte entsprechend dem Protokoll für tierisches Gewebe. Als Ausgangsmaterial wurden 20 Larven des dritten Larvenstadiums (3L) in 2,0 ml Precellys Cups mit 2,8 mm Keramikkügelchen (Peqlab) in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Homogenisiert wurden die Proben in 1 ml RLT Puffer (im Kit enthalten) mit 1% β -Mercaptoethanol im Precellys 24 Homogenisator (Peqlab) mit dem Programm 5500-2x25-15 (Geschwindigkeit - Anzahl Zyklen - Schüttelzeit - Pause zwischen den Zyklen). Die Elution der RNA erfolgte mit 50 μ l RNase freiem Wasser (im Kit enthalten).

Für die RNA-Isolierung mit peqGOLD TriFast (Peqlab) wurden die Gewebe in 1 ml TriFast homogenisiert und dem beiliegenden Protokoll entsprechend weiterverarbeitet. Die RNA wurde in 50 μ l DEPC-H₂O gelöst.

Die Konzentration der RNA wurde am Spektrophotometer NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific) oder am Photometer Ultrospec 3000 (Pharmacia Biotech) bestimmt.

3.1.9 Qualitätskontrolle der RNA

Um Degradierungen durch Nukleasen ausschließen zu können, wurde die Qualität der für die TaqMan-PCR bestimmten RNA am Agilent Bioanalyzer kontrolliert.

3.1.10 Reverse Transkription

Die Reverse Transkription von 2 μ g der isolierten RNA wurde mit Hilfe des Kits Reverse Transcription System (Promega) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

Alternativ wurde 1 μ g RNA mit dem QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen) entsprechend dem beiliegenden Protokoll in cDNA umgeschrieben.

3.1.11 TaqMan-PCR

Unter Assay-on-Demand versteht man ein von der Firma Applied Biosystems hergestelltes und getestetes Reportersystem mit einer FAM/*non fluorescent* modifizierten Sonde (genauere Angaben behält sich der Hersteller vor). Die gemessenen Werte werden mit einem Haushaltsgen, z.B. der 18S rRNA, normalisiert. Im Assay-on-Demand sind beide Primer (jeweils 18 μ m) und die Sonde (5 μ m) enthalten. Der PCR-Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

TaqMan Mastermix	5,0 μ l
Assay-on-Demand	0,5 μ l
cDNA	2,5 μ l (10 ng/ μ l)
ddH ₂ O	1,0 μ l

Die Amplifikation am TaqMan 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems) wurde nach folgendem Programm durchgeführt:

Abbau dUTP-haltiger DNA-Stränge	50°C	2 min	1x
Aktivierung der Polymerase	95°C	10 min	1x
Denaturierung	95°C	15 s	45x
Annealing/Kettenverlängerung	60°C	1 min	

Die Daten wurden mit der Sequence Detector Software SDS 2.3 (Applied Biosystems) ausgewertet.

3.2 Keimbahntransformation

3.2.1 Mikroinjektion

Für die Injektion verwendete Fliegenembryonen stammten aus einer Kreuzung von w^{1118} (pUAST-Konstrukte) bzw. $y w$ (yellow-Carnegie4-Konstrukt; yCar) mit Männchen der Transposase-Fliegen $y w; Ki\Delta 2-3$.

Höchstens 30 min alte Embryonen wurden von Eiablageplatten abgesammelt und bei 18°C weiterbehandelt. Durch Wenden auf einem Klebestreifen wurde das Chorion entfernt, wonach die Embryonen 7 min über Kieselgel getrocknet und daraufhin mit Voltalef-Öl überschichtet wurden. Die Plasmid-DNA (300 ng/μl), versetzt mit grüner Lebensmittelfarbe, wurde mit Hilfe eines Mikromanipulators in die Nähe der Polzellregion injiziert. Die Haltung der Embryonen erfolgte auf Eiablageplatten, geschlüpfte Larven wurden auf Standardmedium bei 25°C transferiert.

3.2.2 Selektion der transformierten Fliegen

Für die Selektion der transformierten Fliegen erfolgte eine Kreuzung mit w^{1118} (pUAST-Konstrukte) oder $y w$ (yCar-Konstrukt). In der F₁-Generation konnte man Transformanten durch orange bis rote Augenpigmentierung (pUAST-Konstrukte) bzw. durch wildtypische Körperfarbe (yCar-Konstrukt) erkennen.

3.2.3 Balancierung der Fliegenstämme

Die Balancierung des P-Elements erfolgte durch Kreuzungen von männlichen Transformanten mit den Balancer-Stämmen $w; Sp/CyO; D^3/TM6B$, $y w; Sp/CyO; D^3/TM6B$ bzw. $FM6$

3.3 Histologie

3.3.1 Präabsorption der primären Antikörper

Larven von st^1 bzw. w^{1118} wurden in PBS geöffnet, 1 h mit 4% Paraformaldehyd (PFA) fixiert und je dreimal 10 min mit PBS bzw. 0,5% PBT gewaschen. Die Inkubation in der Antikörperlösung (1:200 verdünnt in 0,5% PBT mit 5% NGS; NGS: *normal goat serum*) erfolgte über Nacht bei 4°C.

3.3.2 Antikörperfärbung von Ganzpräparaten (*whole mounts*)

3.3.2.1 Larvale Gewebe

Nach der Präparation in PBS wurden die Gewebe 1 h in 4% PFA fixiert und anschließend dreimal in PBS und dreimal in 0,5% PBT gewaschen (jeweils 10 min), bevor unspezifische Bindestellen mit 5% NGS in 0,5% PBT 3 bis 4 h geblockt wurden. Die Inkubation mit dem präab-

sorbierenen primären Antikörper (1:3000 in 0,5% PBT mit 1,5% NGS; Präabsorption s. 3.3.1) erfolgte über Nacht bei 4°C. Anschließend wurden ungebundene Antikörper durch sechs Waschschritte mit 0,5% PBT entfernt und die Präparate 3 bis 4 h bei RT im Dunkeln mit dem sekundären Antikörper (Alexa Fluor 488 nm GAR, Verdünnung: 1:200 in 0,1% PBT mit 1,5% NGS) inkubiert. Nach weiteren fünf Waschschritten mit 0,1% PBT wurden die Gewebe in Vectashield (Vector Laboratories) eingebettet.

3.3.2.2 Gehirne adulter Fliegen

Für die Präparation von Gehirnen wurden die Fliegen vor der Präparation 2,5 h mit 4% PFA in 0,1% PBT fixiert und anschließend dreimal 15 min in PBS gewaschen.

Nach der Präparation wurden die Gewebe erneut dreimal 5 min in 0,5% PBT gewaschen und daraufhin 2 h in 0,5% PBT mit 5% NGS geblockt. Die Inkubation mit dem präabsorbierten primären Antikörper (1:3000 in 0,5% PBT mit 1,5% NGS; Präabsorption s. 3.3.1) erfolgte 40 h bei 4°C. Daraufhin wurde sechsmal 10 min mit 0,5% PBT gewaschen, bevor die Präparate 3 h bei RT im Dunkeln mit dem sekundären Antikörper (Alexa Fluor 488 nm GAR, Verdünnung: 1:200 in 0,1% PBT mit 1,5% NGS) inkubiert wurden. Nach sieben 10-minütigen Waschschritten mit 0,5% PBT wurden die Gehirne kurz in 0,1% PBT gespült und in Vectashield (Vector Laboratories) eingebettet.

3.3.3 Antikörperfärbung von Kryostatschnitten

Vor der Anfertigung von Gefrierschnitten wurden 3L oder Abdomen adulter Fliegen in Tissue-Tek (Sakura) eingebettet und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die 10 µm-Schnitte wurden bei -18°C hergestellt und anschließend 10 min bei 40°C getrocknet, bevor sie 30 min mit 4% PFA fixiert wurden. Nach drei Waschschritten (gewaschen wurde jeweils für 5 min) mit PBS wurden unspezifische Bindestellen 1 h mit 5% NGS in 0,1% PBT geblockt, bevor die Schnitte über Nacht bei 4°C mit dem primären Antikörper (Verdünnung: 1:5000 in 0,1% PBT mit 1,5% NGS) inkubiert wurden. Nachdem ungebundene Antikörper durch dreimaliges Waschen in 0,1% PBT entfernt wurden, erfolgte die Inkubation (1 bis 2 h bei RT im Dunkeln) mit dem sekundären fluoreszierenden Antikörper (Alexa Fluor 488 nm GAR, Verdünnung: 1:200 in 0,1% PBT mit 1,5% NGS). Nach drei weiteren Waschschritten mit 0,1% PBT wurden die Schnitte mit Vectashield (Vector Laboratories) überschichtet.

3.3.4 Paraffinschnitte

10 bis 15 Fliegen wurden auf Krägen aufgefädelt und 4 h in Carnoy fixiert. Anschließend wurden sie dreimal 30 min in Ethanol gewaschen und über Nacht in Methylbenzoat inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Fliegen bei 60°C für 1 h in Methylbenzoat:Paraffin (1:1) und sechsmal für 30 min in Paraffin mit steigendem Reinheitsgrad inkubiert, bevor sie in Paraffin eingebettet wurden. Die 7 µm-Schnitte wurden mit etwas Wasser auf Objektträger aufgebracht, die mit Eiweiß-Glycerin beschichtet waren, und kurz bei 42°C gestreckt. Nach dem Absaugen des Wassers wurden sie über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet. Durch zwei 30-minütige Inkubationsschritte in Xylol bei 55°C wurde das restliche Paraffin entfernt, bevor die Schnitte in DPX Mountant for histology (Fluka) eingebettet wurden.

3.3.5 DAPI-Färbung

Malpighische Gefäße aus 3L wurden in PBS präpariert und 15 min in 4% PFA fixiert. Nach zwei Waschschritten in PBS wurden die Gewebe 15 min in einer 1:500 Verdünnung der DAPI Stammlösung in 0,1% PBT inkubiert und anschließend zweimal mit PBS gewaschen.

3.4 Pigment-Extraktion

3.4.1 Extraktion von Xanthommatin

Für die Extraktion der braunen Augenpigmente wurden 10 Köpfe von 9 Tage gealterten Männchen in 150 µl 2 M HCl homogenisiert. Nach Zugabe von 1 mg Na₂O₅S₂ (Natriumdisulfit) und 200 µl n-Butanol wurden die Proben 10 min bei RT geschüttelt und 2 min bei 10000 rpm zentrifugiert. 100 µl der oberen Phase wurden bei 492 nm am Versamax Tunable Microplate Reader (Molecular Devices) gegen n-Butanol gemessen (nach Mackenzie *et al.*, 1999).

3.4.2 Extraktion von Drosopterin

Für die Extraktion der roten Augenpigmente wurden 4 Köpfe von 9 Tage gealterten Männchen in einer Mischung aus 50 µl Chloroform und 50 µl 0,1% wässrigem Ammoniak homogenisiert und 2 min bei 10000 rpm zentrifugiert. 2 µl der oberen Phase wurden am Spektrophotometer NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific) gegen 0,1% wässrigen Ammoniak gemessen (nach Mackenzie *et al.*, 1999).

3.5 Lipidanalysen

Fliegen für Lipidanalysen wurden unter kontrollierten Bedingungen aufgezogen. Dazu wurden adulte Tiere für wenige Stunden auf Gläser mit Standard *Drosophila* Medium (bei 25°C) gesetzt und immer nach der Ablage von ca. 100 Eiern auf neue Gläser geschüttelt. Die Nachkommen (männliche 3L bzw. 7 Tage alte Männchen) wurden für die Analysen verwendet.

Für die Analysen der Futtervarianten wurden gleiche Mengen der Medien für die Probenaufarbeitung eingesetzt. Zur Untersuchung von Genotypen auf den Futtervarianten wurden Larven des ersten Larvenstadiums von Eiablageplatten abgesammelt und auf *instant*-Futter oder Standardmedium transferiert.

Stämme vom Bloomington *Drosophila* Stock Center wurden drei Generationen unter Laborbedingungen gehalten, bevor sie für Lipidanalysen verwendet wurden.

3.5.1 Homogenisierung und Proteinbestimmung

Proben für die Lipidextraktion wurden in 2,0 ml Precellys Cups mit 2,8 mm Keramikkügelchen (Peqlab) in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Homogenisiert wurden die Proben in 1 ml H₂O im Precellys 24 Homogenisator (Peqlab) mit dem Programm 5500-2x25-15 (s. 3.1.8). Das Homogenat wurde in ein neues Cup überführt und 1 min bei 5000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde für die Lipidanalysen abgenommen. Für die Proteinbestimmung wurden zweimal 5 µl des Überstands mit jeweils 1 ml Bradford-Lösung (Coomassie Plus Assay Kit, Thermo Scientific) gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Absorption bei 595 nm im Vergleich zu einer Standardgeraden gab den Protein gehalt der Probe an. Dieser betrug 0,90 µg/µl (+/- 0,12) für zehn männliche 3L und 0,77 µg/ml (+/- 0,06) für 25 sieben Tage alte Männchen des Wildtyps CS.

3.5.2 Dünnschichtchromatographie (DC)

Für die Probenaufarbeitung nach Bligh & Dyer (Bligh und Dyer, 1959) wurden gleiche Mengen an Protein (300 bis 700 µg) in Glaszentrifugenröhren überführt und mit H₂O auf 800 µl aufgefüllt. Nach Zugabe von 3 ml Bligh & Dyer (s. 2.7) wurden die Proben gevortext und 1 h bei RT inkubiert. Anschließend wurden 1 ml Chloroform und 1 ml H₂O zugegeben und die Proben gut gevortext. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 4000 rpm wurden 1800 µl der unteren Phase mit einer Hamiltonspritze in ein neues Zentrifugenglas überführt und daraufhin in der Speedvac komplett eingedampft. Das Pellet wurde durch Vortexen in 200 µl Bligh & Dyer gelöst und in 1,5 ml Kurzgewindeflaschen ND9 mit 0,1 ml Mikroinsatz (6x31 mm) überführt (beides VWR International). Die Flaschen wurden mit Kurzgewinde-Schraubkappen PTFE mit zentralem Loch (6 mm) und Septum ND9 (Stärke 1,0 mm; VWR International) verschlossen und bei -20°C gelagert.

Das Auftragen der Proben erfolgte mit dem ATS 4 (Automatic TLC Sampler, CAMAG) auf 20x10 cm HPTLC Kieselgel 60-Platten (Merck), welche zuvor 15 min bei 180°C gebacken wurden. Standards für Neutrallipide waren jeweils 0,1 mg/ml Triolein, Ölsäure, Lanosterol und Ergosterol in Hexan/Isopropanol (1:1), für Phospholipide jeweils 0,1 mg/ml Phosphatidylglycerol, Cardiolipin (läuft auf gleicher Höhe wie Phosphatidylethanolamin), Phosphatidylinositol, Phosphatidylserin, Phosphatidylcholin, Sphingomyelin und Lysophosphatidylcholin in Hexan/Isopropanol (1:1). Die Standards wurden von Sigma oder von Avanti Polar Lipids bezogen.

Die Entwicklung am AMD 2 (Automated Multiple Development, CAMAG) erfolgte entweder mit NL- oder PL-Mix (s. 2.7). Anschließend wurden die Platten im ChromaJet DS 20 (Desaga) dreimal mit Kupfersulfatlösung besprüht und daraufhin 20 min bei 180°C gebacken.

Fertige Platten wurden im TLC Scanner 3 (CAMAG) eingelesen und mit dem Programm winCATS (CAMAG) ausgewertet. Die Auswertung erfolgte über die Fläche der detektierten Peaks im Vergleich zur entsprechenden Kontrolle.

3.5.3 Gaschromatographie (GC)

20 µg Protein wurden in Schraubkappenröhren überführt und in der Speedvac pelletiert. Anschließend wurden 50 µl interner Standard (1 µg C13:0 und 1 µg C21:0iso; Supelco) und 2 ml Methanol hinzugefügt. Die Zugabe von 200 µl Acetylchlorid erfolgte unter Vortexen. Daraufhin wurden die Röhren gut verschraubt und 1 h bei 95°C im Schüttelwasserbad inkubiert. Nachdem die Proben komplett abgekühlt waren, wurden 400 µl Hexan und 5 ml 6% Kaliumcarbonatlösung hinzugefügt und die Röhren gut gevortext. Nach Zentrifugation (10 min, 4000 rpm)

wurden 200 µl der oberen Phase mit der Hamiltonspritze abgenommen und in 1,5 ml Kurzgewindeflaschen mit Mikroreinsatz (s. 3.5.2) überführt.

Die Analyse der Gesamtfettsäuren wurde am Shimadzu 2010 GC-MS System durchgeführt. Fettsäuremethylester (FAME) wurden auf einer BPX70 Säule (Länge: 10 m, Durchmesser: 0,10 mm, Filmdicke: 0,20 µm; SGE, Griesheim) mit Helium als Trägergas aufgetrennt. Die Anfangstemperatur von 50°C wurde schrittweise auf 250°C erhöht (40°C/min bis 155°C, 6°C/min bis 210°C, 15°C/min bis 250°C). Injiziert wurde jeweils 1 µl der Proben.

Die Auswertung erfolgte mit dem Programm GCMS Lab Solutions (Shimadzu). Zur Erstellung einer Eichgeraden dienten vier unterschiedlich konzentrierte Kalibratormischungen, bestehend aus Supelco 37 Component FAME Mix (Supelco) und weiteren Fettsäuren (alle Komponenten s. 4.2.2, Tabelle 17).

3.5.4 Massenspektrometrie (MS)

Bei der Aufarbeitung für die Massenspektrometrie wurden 50 µg Protein als Ausgangsmaterial verwendet. Für die vier zur Quantifizierung benötigten Kalibratoren wurden die 50 µg aus mehreren Proben gepoolt und mit 0, 25, 50 bzw. 100 µl Kalibrator-Lösung (PC 34:1, 36:2, 38:4, 40:0; SM 16:0, 18:1, 18:0; LPC 16:0, 18:1, 18:0; PE 34:1, 36:2, 38:4, 40:6; PS 34:1, 36:2, 38:4, 40:6; FC, CE 16:0, 18:2, 18:1, 18:0; Avanti Polar Lipids) versetzt. Zu allen Proben und Kalibratoren wurden 25 µl interner Standard (PC 28:0, PC 44:0, LPC 13:0, LPC 19:0, PE 28:0, PE 40:0, PS 28:0, PS 40:0, D7-FC, CE 17:0, CE 22:0, PG 28:0, PG 40:0, PI 34:0, LPE 14:0, Cer 14:0, Cer 17:0; Avanti Polar Lipids) hinzugefügt. Die Aufarbeitung erfolgte nach Bligh und Dyer, wie unter 3.5.2 beschrieben. Nach der Zentrifugation wurden jedoch 1200 µl der unteren Phase mit dem Tecan Genesis RSP 150 (Robotic Sample Processor, Tecan) abgenommen und in 1,5 ml Kurzgewindeflaschen ND9 (VWR International) überführt. Anschließend wurden die Proben in der Speedvac pelletiert, um daraufhin in 800 µl PL-Laufmittel aufgenommen zu werden.

Die Proben wurden mit ESI-MS/MS (Elektrospray-Ionisation Tandem-Massenspektrometrie) am Quattro Ultima Triple Quadrupole Mass Spectrometer (Micromass, Manchester) analysiert, wie bereits beschrieben (Binder *et al.*, 2006; Liebisch *et al.*, 2004), und von Dr. Gerhard Liebisch ausgewertet.

3.6 Riboflavin-Experimente

3.6.1 Messung des Riboflavingehalts

3.6.1.1 *Bacillus subtilis* Wachstumstest

Malpighische Gefäße aus zehn 3L wurden in 35 µl H₂O homogenisiert. Der *Bacillus subtilis* Stamm *ΔribB::Erm*^r wurde bis zu einer optischen Dichte von 0,3 herangezogen, wonach 10⁴ bis 10⁵ Zellen auf CSEG-Platten ausplattiert wurden. Das Homogenat wurde auf einen Rundfilter (6 mm) in der Mitte der Platte aufgetragen. Nach 16 Stunden bei 37°C wurde der Durchmesser der bewachsenen Fläche gemessen.

3.6.1.2 Fluorimeter

Malpighische Gefäße einer 3L wurden in 200 µl PBS homogenisiert. Nach einer 2-minütigen Zentrifugation bei 13000 rpm wurden 180 µl des Überstands in ein Well einer schwarzen Mikroplatte 655101/96 (Greiner) überführt und am FLUOstar Optima Multifunction Microplate Reader (BMG Labtech, Anregung: 445 nm, Emission: 526 nm) im Vergleich zu einer Standardgeraden gemessen. Proben des Wildtyps hatten eine Riboflavinkonzentration von 83 nM (+/- 14).

3.6.2 Riboflavintransport

Malpighische Gefäße aus fünf 3L wurden in PBS präpariert und in einer Vertiefung einer 96-Well Platte gesammelt. Die Gewebe wurden in einem Well mit 100 µl 160 nM ¹⁴C-Riboflavin in PBS für 10, 30 oder 60 Minuten inkubiert und anschließend auf eine GN-6 Metricel Membran (0,45 µm Porengröße, Pall-Filtron GmbH) überführt und mit 2 ml PBS gewaschen. Die Membran mit den Malpighischen Gefäßen wurde in ein Scintillationsgefäß mit 5 ml Rotiszint EcoPlus (Roth) transferiert und im Scintillationszähler Tri-Carb 2810 TR (Perkin Elmer) gemessen (Zählzeit: 5 min, Bereich: 4 bis 156 Kiloelektronenvolt). Das radioaktiv markierte Riboflavin hatte eine spezifische Aktivität von 5,54 MBq/mg und war ein Geschenk von PD Dr. Jürgen Stolz, Technische Universität München. Die in dieser Arbeit verwendete Riboflavinlösung (160 nM) hatte eine Aktivität von ca. 1 µCi/ml. Als Kontrolle wurde Glycerin-3-Phosphat (G-3-P; ein Geschenk von Harald Guldan, Lehrstuhl Sterner), welches nicht aktiv transportiert werden kann, verwendet. Dieses hatte eine Konzentration von 117,3 µM und bestand zu 1/3 aus heißem G-3-P mit einer spezifischen Aktivität von 66 Bq/mmol. Für das Kontrollexperiment in dieser Arbeit wurde es 1:250 in PBS verdünnt.

3.6.3 Lebensspanne

Männliche Puppen wurden in Gläser mit Watte, getränkt mit 5% Sucrose und 1% Nipagin-Lösung in H₂O, gelegt. Nach dem Schlüpfen wurden die überlebenden Fliegen alle 2 Tage auf neue Gläser gesetzt.

In einem zweiten Versuch wurden zusätzlich zu Sucrose und Nipagin-Lösung 10 µg/ml Riboflavin zugegeben.

3.7 Auswertung

Auswertungen wurden mit Excel 2003 durchgeführt, die Graphen entweder mit Excel 2003 oder mit SigmaPlot 11.0 erstellt. Sofern nicht anders angegeben, repräsentieren die Fehlerbalken in den Graphen die Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Experimenten.

4 Ergebnisse

4.1 Charakterisierung der ABC-Transporter White, Scarlet und Brown

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die *Drosophila melanogaster* ABC-Transporter White (W), Scarlet (St) und Brown (Bw) genauer beschrieben werden. Diese Proteine sind, wie bereits einleitend erwähnt (s. 1.2.2), primär verantwortlich für den Transport von Stoffwechselzwischenprodukten der Augenpigmente in die Pigmentgranula der Komplexaugen. Das Heterodimer W/St transportiert eine Xanthommatin-Vorstufe, während W/Bw für den Transport eines Intermediats der Drosopterin-Synthese zuständig ist. Somit resultiert das Fehlen jedes dieser drei Proteine in einer Veränderung der Augenpigmentierung.

4.1.1 Pigmentanalysen von *white*-, *scarlet*- und *brown*-Mutanten

Sowohl phänotypisch als auch durch Analyse von Xanthommatin- und Drosopteringehalt sind Unterschiede zwischen *w*-, *st*- und *bw*-Mutanten und dem Wildtyp Canton S (CS) festzustellen (Abb. 17). Die *st*-Mutante *st*¹ zeigt im Vergleich zu CS eine Reduktion von Xanthommatin auf 30% und somit einen roten Augenphänotyp. Im Gegensatz dazu haben verschiedene *bw*-Allele nur 5 bis 16% Drosopterin und weisen außerdem einen auf 53 bis 78% verringerten Xanthommatingehalt auf.

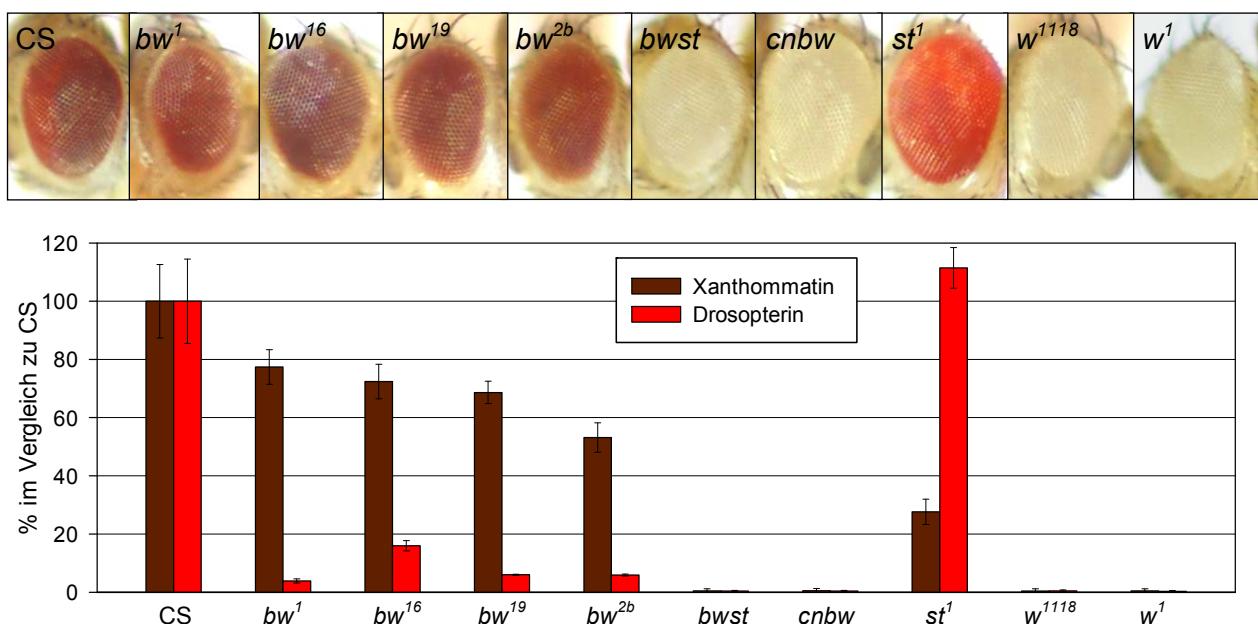


Abb. 17: Phänotyp und Pigmentgehalt 9 Tage alter Männchen von *white*-, *scarlet*- und *brown*-Mutanten im Vergleich zu CS. In den getesteten *bw*-Allelen ist der Gehalt an Drosopterin reduziert, während in *st*¹ wenig Xanthommatin vorhanden ist. In den beiden *w*-Mutanten und in den Doppelmutanten *bwˢᵗ* und *cnbw* sind keine Pigmente detektierbar.

Da W an beiden Pigmentsynthesewegen beteiligt ist, sind die Augen der entsprechenden Mutanten w^{1118} und w^1 unpigmentiert. Auch in den Doppelmutanten $bwst$ und $cnbw$, in denen jeweils beide *Pathways* beeinträchtigt sind, ist weder Xanthommatin noch Drosopterin detektierbar (Abb. 17).

4.1.2 Herstellung von p[UAS-brown] und p[UAS-white]

Zur weiteren Analyse der Funktion von W, St und Bw mithilfe des UAS-GAL4-Systems (s. 2.1.2.3) wurden die Konstrukte p[UAS-brown] und p[UAS-white] zur Keimbahntransformation von *Drosophila* kloniert. Fliegen des Genotyps $w; p[UAS-scarlet]$ standen bereits durch eine vorhergehende Diplomarbeit zur Verfügung (Albrecht, 2005).

Zur Herstellung von p[UAS-brown] (Abb. 18) wurde die *brown* (*bw*) cDNA (2,0 kb) mit den Primern 5'bw-EcoRI und 3'bw-KpnI aus Oregon R amplifiziert. Nach TA-Klonierung in pGEM-T Easy (3,0 kb) wurde das entstandene 2,2 kb-Fragment mit EcoRI und KpnI ausgeschnitten und in den Expressionsvektor pUAST (9,0 kb) ligiert. Zur Bestätigung der Richtigkeit von p[UAS-bw] erfolgte eine Sequenzierung.

Das 11,2 kb-Konstrukt p[UAS-bw] wurde in 230 Embryonen injiziert (s. 3.2.1), davon gelangten 35% ins Larvenstadium. Von diesen entwickelten sich 77% zu adulten Fliegen, woraus zehn unabhängige stabile Linien etabliert wurden (Tabelle 14).

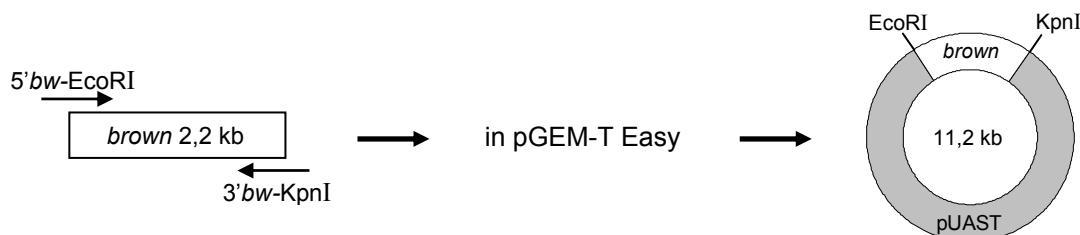


Abb. 18: Klonierung von p[UAS-brown]. Die *brown* cDNA wurde aus Oregon R amplifiziert, in pGEM-T Easy und anschließend mit EcoRI und KpnI in pUAST kloniert.

p[UAS-brown] Nr.	Insertions-chromosom	homozygot lebensfähig	Bemerkungen
6	III	ja	für <i>Rescue</i> -Experimente verwendet
10	II	ja	letal mit <i>da-GAL4</i>
13-2	II	ja	
13-3	III	nein	
16	II	ja	
18	II	ja	
19	III	nein	
20	III	nein	
21	III	nein	
22	II	ja	

Tabelle 14: Etablierte p[UAS-brown]-Linien. *da-GAL4*: *daughterless-GAL4*.

Für p[UAS-white] wurde die *white* (*w*) cDNA (2,1 kb) mit EcoRI (5') und XhoI (3') aus dem Ursprungsvektor pOT2 (1,7 kb; GM14592, Genomics Resource Center) ausgeschnitten (Abb. 19). Das entstandene 2,4 kb-Fragment wurde in pUAST (9,0 kb) kloniert und anschließend sequenziert.

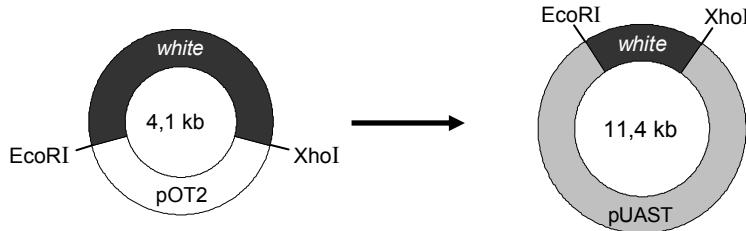


Abb. 19: Klonierung von p[UAS-white]. Die *white* cDNA wurde mit EcoRI und XhoI aus pOT2 ausgeschnitten und in pUAST kloniert.

Das 11,4 kb-Konstrukt p[UAS-w] wurde in 390 Embryonen injiziert (s. 3.2.1), aus 20% davon schlüpften Larven. Von diesen entwickelten sich 74% zu adulten Fliegen, woraus zehn unabhängige stabile Linien etabliert wurden (Tabelle 15).

p[UAS-white] Nr.	Insertionschromosom	homozygot lebensfähig	Bemerkungen
3	III	ja	letal mit <i>actin-GAL4</i> und <i>da-GAL4</i>
5	III	ja	letal mit <i>actin-GAL4</i> und <i>da-GAL4</i>
13	II	nein	
15	II	ja	für <i>Rescue</i> -Experimente verwendet
16-2	II	ja	
16-3	III	ja	letal mit <i>da-GAL4</i>
17	II	ja	
20	III	ja	
21	III	ja	
22	X	ja	letal mit <i>actin-GAL4</i> und <i>da-GAL4</i>

Tabelle 15: Etablierte p[UAS-white]-Linien. *da-GAL4*: *daughterless-GAL4*.

4.1.3 Rettung der Augenpigmentierung

Um die Funktionsfähigkeit von p[UAS-white]¹⁵ (UAS-w), p[UAS-scarlet]³⁷ (UAS-st) und p[UAS-brown]⁶ (UAS-bw) zu überprüfen, wurden Experimente zur Rettung der Augenpigmentierung durchgeführt. Dazu wurden als Aktivatoren entweder die ubiquitären Treiber *actin-GAL4* bzw. *daughterless-GAL4* (*da-GAL4*) oder der augenspezifische Treiber *GMR-GAL4* verwendet.

Der *white-Rescue* wurde mit *da-GAL4* bzw. *GMR-GAL4* durchgeführt (Abb. 20). Während beide Kontrollen, die Treiber- und die Responder-Linie, etwa 10% des wildtypischen Pigmentgehalts aufweisen, zeigt der *Rescue* mit *da-GAL4* 70% Xanthommatin und 50% Drosopterin. Die Pigmentierung der Kontrollen ist dabei zurückzuführen auf *mini-white*, den pUAST-Marker für

eine erfolgreiche Transformation. Diese partielle Rettung ist abhängig vom Insertionsort des P-Elements und von der Anzahl der vorhandenen Kopien im jeweiligen Stamm. Um sicher zu stellen, dass nicht die Anzahl der *mini-white*-Kopien für die erfolgreiche Wiederherstellung der Pigmentierung im *Rescue* entscheidend ist, sondern die Kombination aus Treiber und Effektor, wurden für diesen Versuch als Kontrollen homozygote Stämme verwendet.

Die augenspezifische Treiber-Linie *w; GMR-GAL4* besitzt durch die beiden Kopien von *mini-white* sogar 45% der Pigmente. Im *Rescue* mit *GMR-GAL4* als Treiber wurde Xanthommatin auf 70% erhöht und der wildtypische Drosopteringehalt vollständig wiederhergestellt (Abb. 20).

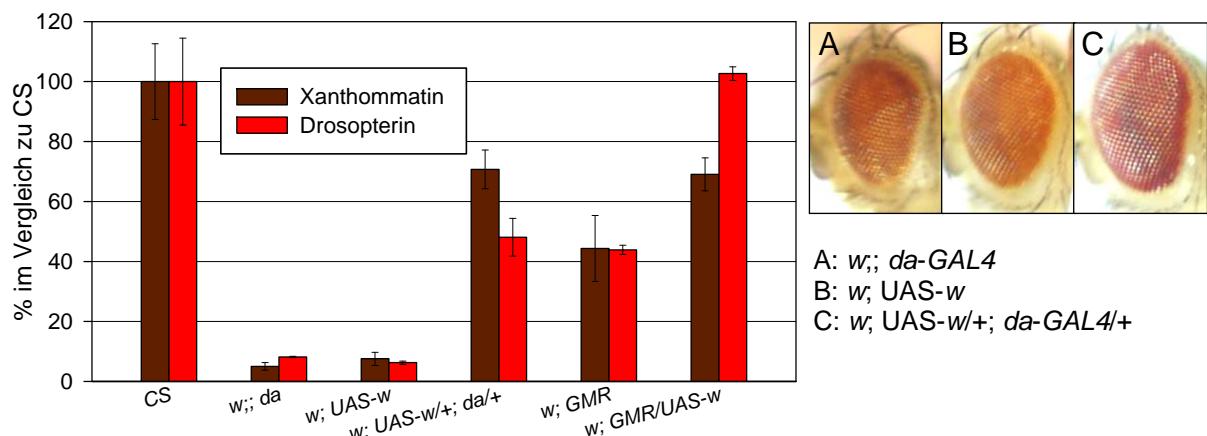


Abb. 20: Phänotyp und Pigmentgehalt des *white-Rescues* und der entsprechenden Kontrollen. Mit UAS-*w* und den Treibern *da-GAL4* bzw. *GMR-GAL4* kann der Gehalt an Xanthommatin und Drosopterin in *white*-Mutanten gerettet werden. *da*: *da-GAL4*; *GMR*: *GMR-GAL4*.

Das Gen *brown* ist auf dem II. Chromosom lokalisiert, *scarlet* hingegen auf dem III. Chromosom. Daher mussten für die *Rescue*-Experimente zwei unterschiedliche ubiquitäre Treiber verwendet werden. Die Rettung von *brown* wurde mit *da-GAL4* (III. Chromosom) durchgeführt, die Rettung von *scarlet* stattdessen mit *actin-GAL4* (II. Chromosom).

Die Kontrolle $+; bw^1; da-GAL4$ weist, ähnlich wie bw^1 , einen sehr geringen Drosopteringehalt im Vergleich zu CS auf, welcher im *Rescue* $+; bw^1; UAS-bw/da-GAL4$ zu 48% wiederhergestellt ist (Abb. 21). Der Gehalt an Xanthommatin ist in diesem Genotyp nahezu wildtypisch.

Im Gegensatz zur Kontrolle $+; actin-GAL4/CyO; st^1$, die genau wie st^1 im Vergleich zu CS nur 30% Xanthommatin aufweist, zeigt $+; UAS-st/actin-GAL4; st^1$ eine vollständige Rettung des braunen Pigments (Abb. 21).

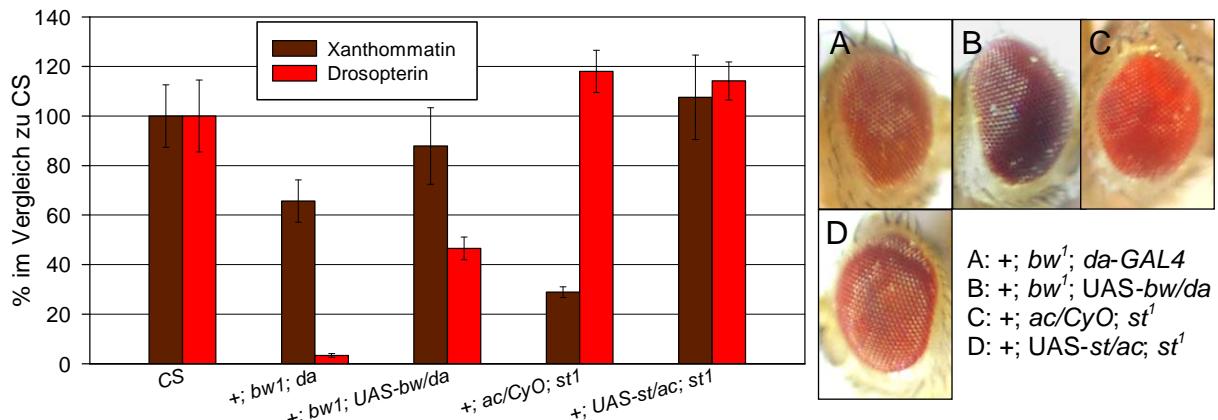


Abb. 21: Phänotyp und Pigmentgehalt des *brown*- bzw. *scarlet-Rescues* und jeweils einer Kontrolle. Mit UAS-bw kann der Drosopteringehalt in *bw*¹ partiell gerettet werden, während mit UAS-st der Xanthommintingehalt in *st*¹ vollständig wiederhergestellt werden kann. ac: *actin-GAL4*; da: *da-GAL4*.

4.1.4 Charakterisierung von RNAi-white, -scarlet und -brown

Durch einen *knock-down* mithilfe entsprechender RNAi-Linien (s. 2.1.2.3) sollten Xanthomminin- bzw. Drosopteringehalt in den Komplexaugen analog zu den Mutanten reduziert werden können. Nach einer Kreuzung von Männchen der RNAi-Linien mit dem ubiquitären Treiber +; *actin-GAL4* bzw. dem augenspezifischen Treiber +; *GMR-GAL4* waren die Fliegen der F₁-Generation im CS-Hintergrund und konnten für dieses Experiment verwendet werden. Der Pigmentgehalt der beiden Treiber-Linien ist mit CS vergleichbar (nicht gezeigt).

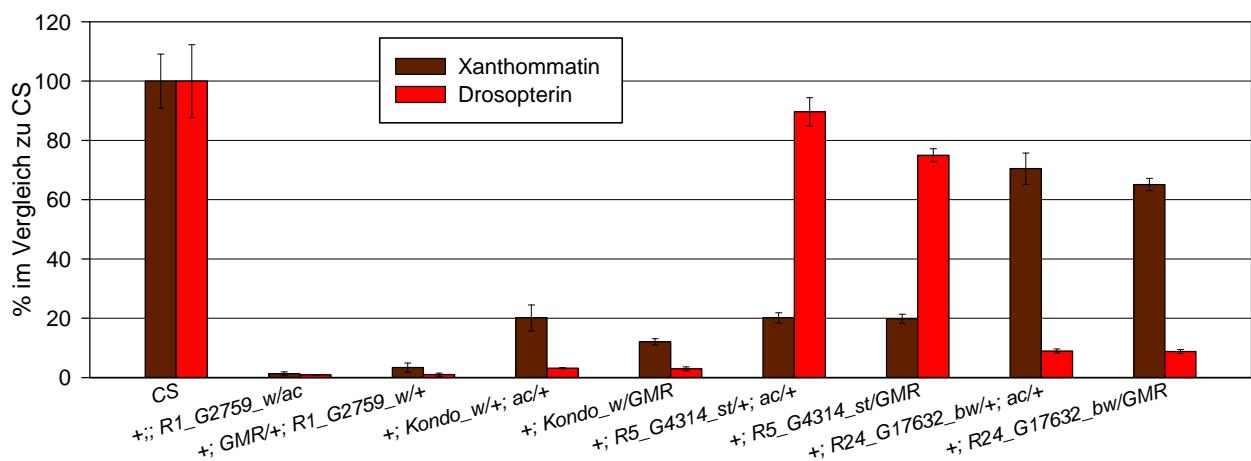


Abb. 22: Pigmentgehalt von white-, scarlet- und brown-knock-down-Fliegen. Durch einen *knock-down* mit *actin*- bzw. *GMR-GAL4* kann der Pigmentgehalt in den Augen reduziert werden. ac: *actin-GAL4*; GMR: *GMR-GAL4*.

Vergleicht man die beiden RNAi-white-Linien, ist erkennbar, dass die Linie des VDRC (R1_G2759_w) einen stärkeren Augenphänotyp erzeugt als die Linie aus Japan (Kondo_w; Abb. 22). Dies trifft sowohl für den *knock-down* mit *actin*- als auch mit *GMR-GAL4* zu. In RNAi-scarlet (Linie: R5_G4314_st) liegt der Xanthomatingehalt im Vergleich zu CS mit beiden Treibern bei 20% und ist sogar noch geringer als in der Mutante *st*¹ (s. 4.1.1). Im Genotyp +; R5_G4314_st/*GMR-GAL4* ist auch Drosopterin auf 75% reduziert. Die Ergebnisse des Gehalts beider Pigmente von RNAi-brown (Linie: R24_G17632_bw) mit den verschiedenen Treiber-Linien sind vergleichbar mit den in 4.1.1 analysierten *bw*-Allelen.

4.1.5 Expression von White, Scarlet und Brown

Verschiedene Phänotypen, wie beispielsweise der reduzierte Gehalt an Histamin und Dopamin im Gehirn von *w*¹¹¹⁸, *st*¹ und *bw*¹ (Borycz *et al.*, 2008), lassen eine Expression von White und möglicherweise auch von St und Bw im Gehirn vermuten. Dies sollte durch Antikörperfärbungen an CS und den Mutanten *w*¹¹¹⁸, *st*¹ und *bw*¹ überprüft werden. Dazu wurden Gehirne adulter Männchen sowohl mit dem St-Antikörper (α -St) als auch mit dem W-Antikörper (α -W) gefärbt (s. 3.3.2.2). Dabei konnte jedoch in keinem der überprüften Genotypen ein spezifisches Signal detektiert werden (nicht gezeigt). Zur Detektion von Bw stand kein Antikörper zur Verfügung.

In einer vorhergehenden Diplomarbeit wurde die Expression von St und W mittels Immunohistochemie in den Malpighischen Gefäßen (s. 1.3) von *Drosophila melanogaster* nachgewiesen. In diesen Organen sind die Proteine nicht in der Zellmembran, sondern wie im Auge in den Membranen intrazellulärer Vesikel lokalisiert. Außerdem stellte sich heraus, dass analog zu den Komplexaugen die Expression von St in *w*¹¹¹⁸ drastisch reduziert ist. Darüber hinaus ist auch W in *st*¹ sowie in der Doppelmutante *bwst* nahezu nicht detektierbar. Daher wurde postuliert, dass St und W in den Malpighischen Gefäßen als Dimer funktionieren (Ohmann, 2006).

Um diese Vermutung zu bestätigen, wurde versucht, durch die Expression von st im *st*¹-Hintergrund, die Stabilität von W zu retten. Im *Rescue* +; UAS-st/*actin-GAL4*; *st*¹ ist im Gegensatz zur Kontrolle +; UAS-st; *st*¹ die Stabilität von St in den Vesikeln der Malpighischen Gefäße wiederhergestellt (ohne Abbildung) und zusätzlich auch W wieder detektierbar (Abb. 23).

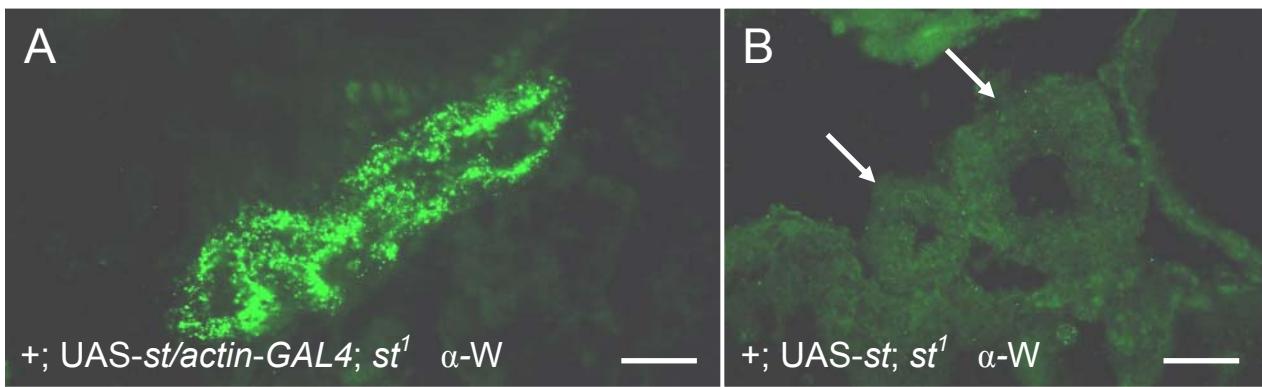


Abb. 23: Immunohistochemie von White am scarlet-Rescue. In Malpighischen Gefäßen von Larven des *st*-Rescues (A) ist W im Gegensatz zu den Tubules der Kontrolle (B, Pfeile) stabilisiert. A: +; UAS-*st/actin-GAL4*; *st*¹, α-W. B: +; UAS-*st*; *st*¹, α-W. W: White. Maßstab: A: 20 µm; B: 12 µm.

Diese Instabilität von W ohne St deutet darauf hin, dass Bw, der zweite Dimerisierungspartner von W im Komplexauge, in den Malpighischen Gefäßen keine Rolle spielt, da Bw offenbar nicht in der Lage ist, W in *st*¹ zu stabilisieren. Auch in der Mutante *bw*¹ sind sowohl St als auch W in einem wildtypischen Maß nachweisbar (Abb. 24), weshalb Bw offenbar keinen Einfluss auf die Stabilität der beiden Proteine hat. Zusätzlich wurden Färbungen von *cn*¹ und *cnbw* durchgeführt. In diesen beiden Mutanten sind wildtypische Mengen an W und St vorhanden (ohne Abbildung).

Um zu überprüfen, ob *brown*, wie bereits vermutet (Arndt, 2003), kopfspezifisch ist, wurde eine RT-PCR durchgeführt. Diese zeigte, dass *bw* im Körper zwar weitaus schwächer als im Kopf exprimiert, aber trotzdem detektierbar ist (ohne Abbildung).

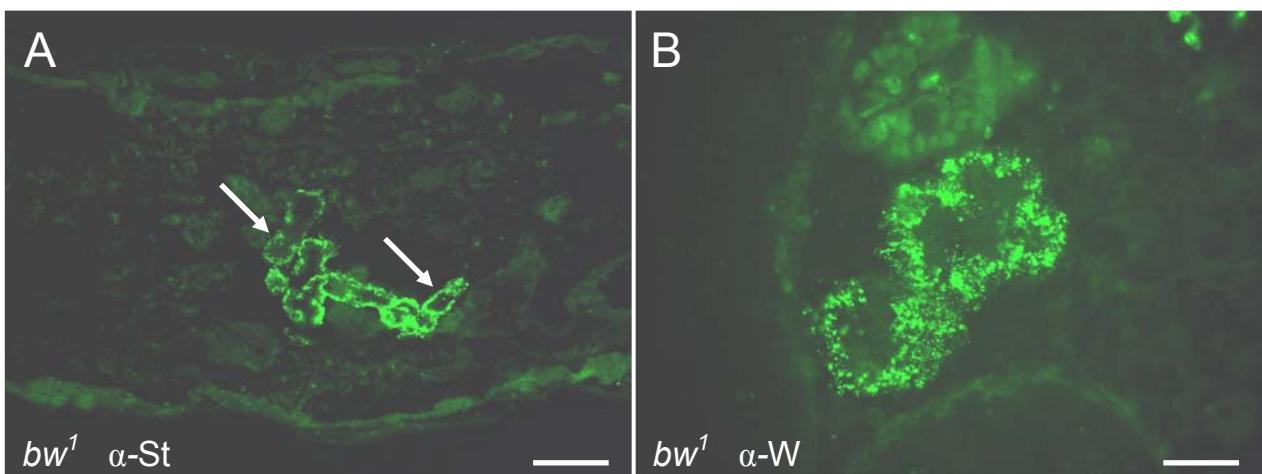


Abb. 24: Immunohistochemie von White und Scarlet an *bw*¹. In Malpighischen Gefäßen der Larven von *bw*¹ ist ein wildtypischer Gehalt an St (A, Pfeile) und W (B) detektierbar. A: *bw*¹, α-St. B: *bw*¹, α-W. St: Scarlet; W: White. Maßstab: A: 100 µm; B: 20 µm.

Ob die auf Proteinebene beobachtete Reduktion von St in *w*¹¹¹⁸ und W in *st*¹ sowie in *bw*¹ bereits auf eine geringere Transkription zurückzuführen ist, sollte durch eine semiquantitative PCR gezeigt werden. Dazu wurden Larven (3L) von CS, *st*¹, *bw*¹ und *w*¹¹¹⁸ mit den TaqMan

Assays *white*, *brown* und *scarlet* untersucht (s. 2.4 und 3.1.11). Zusätzlich erfolgte eine Analyse der Mutanten *bwst*, *cn¹* und *cnbw*.

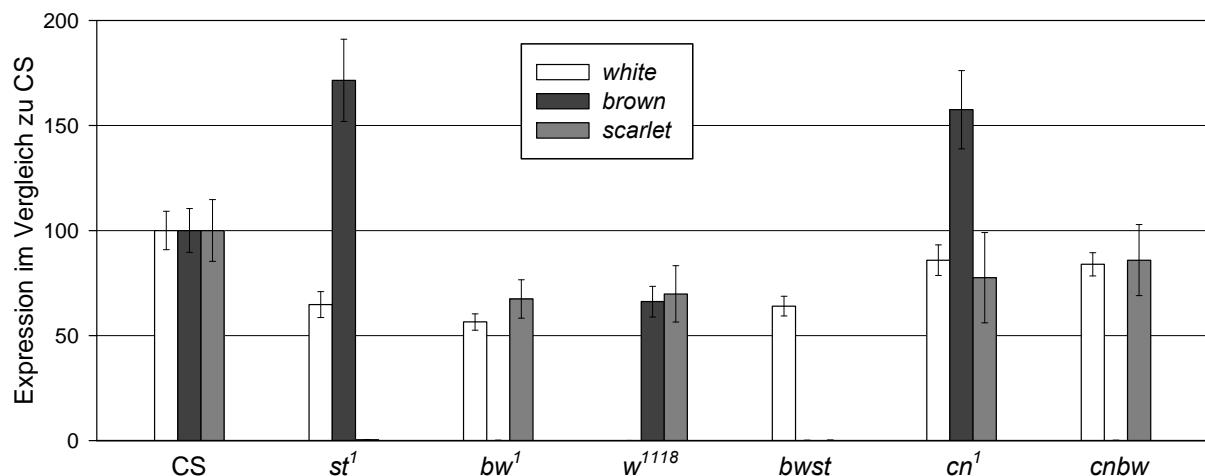


Abb. 25: Relative Expression von *white*, *brown* und *scarlet* in verschiedenen Mutanten. Anhand von TaqMan-PCR wurde die relative Expression von *w*, *bw* und *st* in Mutanten im Vergleich zu CS gemessen. Die Balken repräsentieren den Standardfehler.

Durch dieses Experiment konnte gezeigt werden, dass die Expression von *white* in *st¹* und *bwst* auf 65% reduziert ist (Abb. 25). Analog dazu ist auch *scarlet* in *w¹¹¹⁸* zu 70% detektierbar. In *st¹* und auch in *cn¹* ist *brown* auf 170% bzw. 160% erhöht, in *w¹¹¹⁸* hingegen auf 70% verringert. In *bw¹* sind *white* und *scarlet*, verglichen mit CS, zu 55 bzw. 70% nachweisbar. In *cn¹* und in der Doppelmutante *cnbw* zeigt sich eine geringfügige Reduktion der Expression von *scarlet* und *white*.

4.1.6 Funktion von White, Scarlet und Brown in den Malpighischen Gefäßen

Bereits 1979 konnte gezeigt werden, dass in *w*-Mutanten die Aufnahme des essentiellen Vitamins Riboflavin (Vitamin B2) in Malpighische Gefäße beeinträchtigt ist (Sullivan *et al.*, 1979). Im Folgenden wird analysiert, ob W in diesen Organen als Homodimer in der Lage ist, Riboflavin zu akkumulieren. Zur Identifizierung eines möglichen Dimerisierungspartners für diese Funktion wurden in den folgenden Experimenten verschiedene Mutanten untersucht.

Um aufzuklären, welche Proteine am Transport des Vitamins beteiligt sind, wurde zuerst der Riboflavingehalt der Mutanten im Vergleich zu CS bestimmt. Dazu dienten zwei unterschiedliche Methoden (s. 3.6.1). Einerseits konnte der Gehalt an Vitamin B2 mit einem Fluorimeter (FluoStar Optima Multifunction Microplate Reader) gemessen werden, andererseits wurde ein bakterieller Test mit einem Riboflavin-defizienten Stamm von *Bacillus subtilis* durchgeführt. Dieser *B. subtilis* Stamm *ΔribB::Erm^r* benötigt die Zugabe einer bestimmten Menge an Riboflavin, um zu wachsen.

Erst wenn dieser Schwellenwert überschritten wird, ist Wachstum möglich. Das Fluorimeter hingegen erlaubt eine exakte Quantifizierung des Riboflavingehalts.

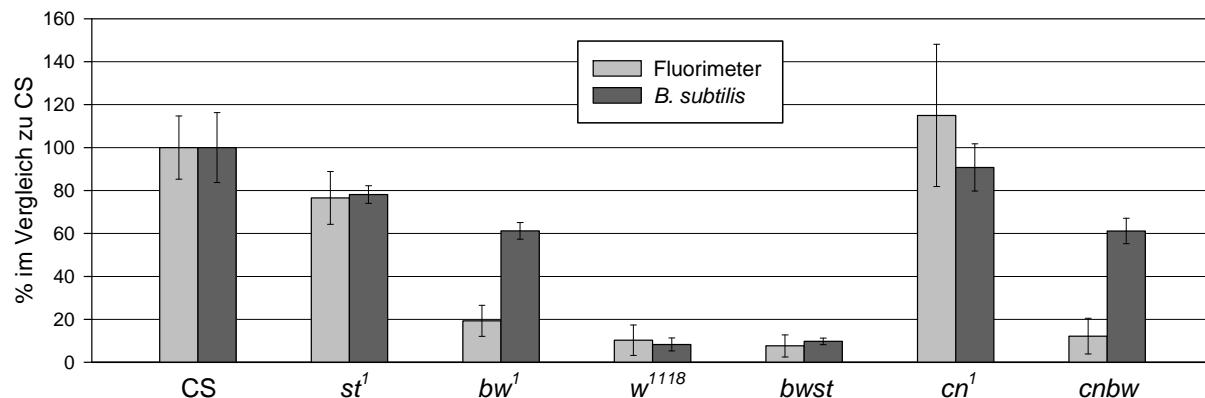


Abb. 26: Riboflavingehalt der Malpighischen Gefäße verschiedener Mutanten im Vergleich zu CS. Der Riboflavingehalt in CS und in den Mutanten wurde mit dem Fluorimeter und einem *Bacillus subtilis* Wachstumstest bestimmt.

Unter Verwendung dieser beiden Methoden konnte gezeigt werden, dass w^{1118} und die Doppelmutante *bwst* die geringste Menge des Vitamins in den Malpighischen Gefäßen speichern (Abb. 26). In der Mutante *st¹* ist der Riboflavingehalt im Vergleich zu CS nur leicht reduziert, während sich in *bw¹* mit beiden Methoden unterschiedliche Resultate ergeben. Das Fluorimeter gibt den B2-Gehalt mit 20% an, nur geringfügig höher als in w^{1118} und *bwst*. Der *B. subtilis* Test zeigt hingegen, dass der Gehalt an Riboflavin in den Malpighischen Gefäßen von *bw¹* ausreicht, um Wachstum zu gewährleisten. Daher muss er signifikant höher sein als in w^{1118} und *bwst*. Dasselbe Resultat ergibt sich für die Doppelmutante *cnbw*. In Malpighischen Gefäßen von *cn¹* ist der Gehalt an Riboflavin im Vergleich zum Wildtyp CS nicht verändert.

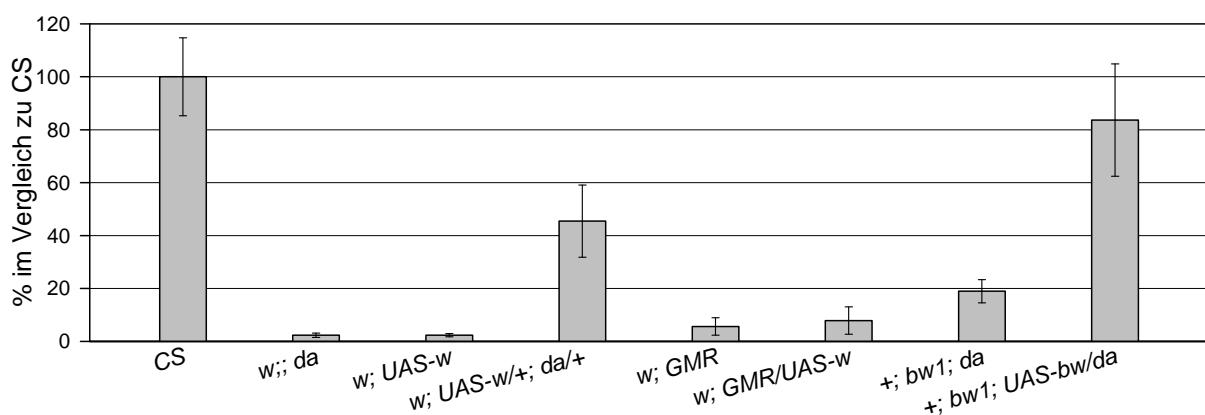


Abb. 27: Riboflavingehalt der Malpighischen Gefäße verschiedener Rescues und der entsprechenden Kontrollen. Der Mangel an Riboflavin in *white* und *bw¹* kann mit dem entsprechenden UAS-Konstrukt und dem Treiber *da-GAL4* gerettet werden. Die Quantifizierung erfolgte am Fluorimeter. *da*: *da-GAL4*; *GMR*: *GMR-GAL4*.

Durch Expression von *white* bzw. *brown* im entsprechenden mutanten Hintergrund wurde versucht, den reduzierten Gehalt an Vitamin B2 in den *Tubules* zu retten. Mit dem Konstrukt UAS-w

und dem ubiquitären Treiber *da-GAL4*, nicht jedoch mit dem augenspezifischen Treiber *GMR-GAL4*, kann die Menge an Riboflavin in Malpighischen Gefäßen von *white* teilweise wiederhergestellt werden (Abb. 27). Im Gegensatz zur Pigmentierung der Komplexaugen ergibt sich durch die beiden Kopien von *mini-white* kein partieller *Rescue*. Fliegen des Genotyps $+$; *bw*¹; UAS-*bw/da-GAL4* zeigen nahezu eine vollständige Rettung des Defekts von *bw*¹. Der Riboflavingehalt in Malpighischen Gefäßen von *Rescues* und Kontrollen wurde nur am Fluorimeter quantifiziert.

Eine mögliche Erklärung für den geringen Riboflavingehalt in Malpighischen Gefäßen von *w*¹¹¹⁸, *bwst*, *cnbw* und auch *bw*¹ ist ein beeinträchtigter Transport des Vitamins. Um dies zu untersuchen, wurde ein Experiment zur Aufnahme von radioaktiv markiertem Riboflavin (¹⁴C-B2) durchgeführt (s. 3.6.2).

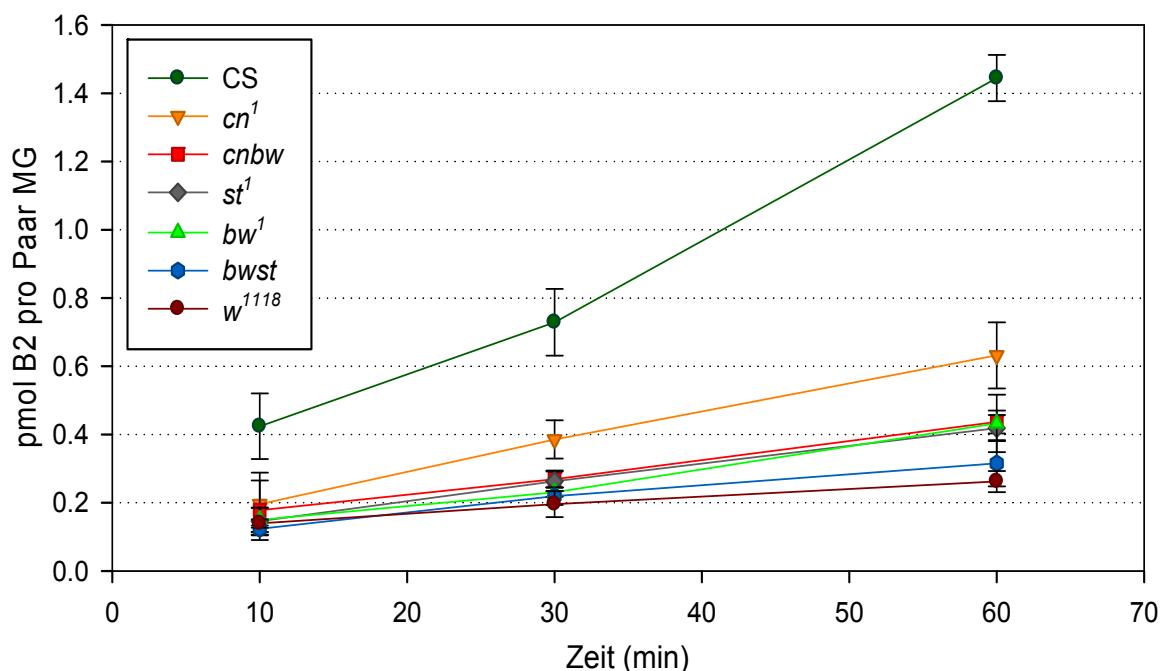


Abb. 28: Aufnahme von Riboflavin in Malpighische Gefäße des Wildtyps und verschiedener Mutanten. Alle getesteten Mutanten transportieren innerhalb von 60 min weniger Riboflavin in Malpighische Gefäße als CS. B2: Riboflavin; MG: Malpighische Gefäße.

Beim Vergleich mit den verschiedenen Mutanten stellte sich heraus, dass Malpighische Gefäße des Wildtyps CS mehr ¹⁴C-B2 aufnehmen als die anderen Genotypen (Abb. 28). Nach 10-minütiger Inkubation sind bereits 0,4 pmol neu akkumuliertes Riboflavin detektierbar, nach 30 min 0,7 pmol und nach 60 min 1,4 pmol pro Paar larvaler Malpighischer Gefäße. In den Mutanten *w*¹¹¹⁸ und *bwst*, die beide kaum Riboflavin in den *Tubules* gespeichert haben, beschränkt sich die Aufnahme von ¹⁴C-B2 auf 0,3 pmol nach 60 min, was vermutlich auf Diffusion zurückzuführen ist. Dies wurde durch ein Kontrollexperiment mit ¹⁴C-Glycerin-3-Phosphat (¹⁴C-G-3-P), welches nicht aktiv transportiert werden kann, verifiziert (Abb. 29 A). In *bw*¹, *cnbw* und sogar in *st*¹, der Mutante in welcher der Gehalt an Riboflavin im Vergleich zu CS kaum reduziert ist, können

nur 0,4 pmol Riboflavin nach 60 min akkumuliert werden. Einzig Malpighische Gefäße von *cn*¹ sind in der Lage, etwas mehr ¹⁴C-B2 aufzunehmen als die der anderen Mutanten (0,6 pmol nach 60 min). Dennoch transportieren *Tubules* von *cn*¹ nur 44%, verglichen mit CS.

Durch Expression von *w*, *bw* und *st* mit ubiquitären Treibern wurde versucht, die Beeinträchtigung des Riboflavintransports in den entsprechenden Mutanten *white*, *bw*¹ und *st*¹ zu retten. Malpighische Gefäße des *bw-Rescues* sind in der Lage, das externe Riboflavin schneller aufzunehmen als die *Tubules* des Wildtyps CS (Abb. 29 B). Im Genotyp *w*; UAS-*w*+/; *da-GAL4*+/ können nach 60 min 0,55 pmol mehr Vitamin B2 transportiert werden als in der Kontrolle (Abb. 29 C) und auch durch UAS-*st*, aktiviert von *actin-GAL4*, ist eine Erhöhung der Aufnahme von Riboflavin, verglichen mit +; *actin-GAL4/CyO*; *st*¹, möglich (Abb. 29 D).

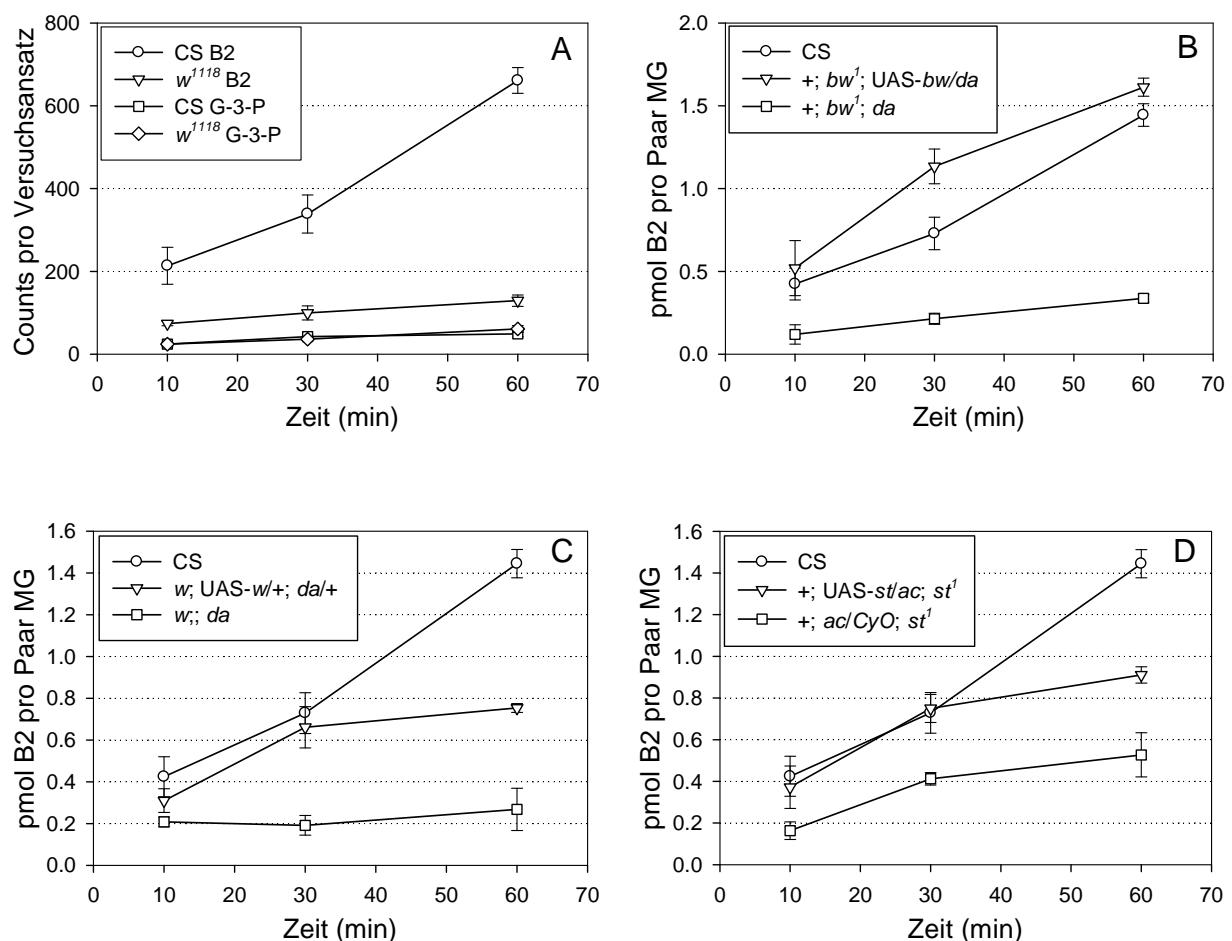


Abb. 29: Aufnahme von Riboflavin in Malpighische Gefäße von Rescues und den entsprechenden Kontrollen. Der Defekt im Transport von Riboflavin in *bw*¹, *white* und *st*¹ kann mit dem entsprechenden UAS-Konstrukt und einem Treiber gerettet werden. A: Kontrollexperiment, Aufnahme von Riboflavin in Malpighische Gefäße von CS und *w*¹¹¹⁸ im Vergleich zur Diffusion von Glycerin-3-Phosphat. B-D: Aufnahme von Riboflavin durch Malpighische Gefäße von Rescues im Vergleich zu CS und einer Kontrolle. B: *bw-Rescue*. C: *w-Rescue*. D: *st-Rescue*. ac: *actin-GAL4*; B2: Riboflavin; da: *da-GAL4*; G-3-P: Glycerin-3-Phosphat; MG: Malpighische Gefäße.

4.1.7 Lebensspanne auf Riboflavin-freiem Medium

Malpighische Gefäße von w^{1118} und von weiteren Mutanten sind nicht in der Lage, Riboflavin, ein essentielles Vitamin, aufzunehmen und zu speichern. Daher liegt die Vermutung nahe, dass die Lebenserwartung dieser Mutanten auf einem Riboflavin-freien Medium im Vergleich zum Wildtyp verkürzt sein muss.

Um dies zu überprüfen, wurden die Lebensspannen verschiedener Mutanten im Vergleich zur Kontrolle CS auf einem Futter, welches ausschließlich aus Wasser, Sucrose und Nipagin-Lösung besteht (s. 3.6.3), untersucht. Dazu wurden die Männchen bereits im Puppenstadium abgesammelt, damit sie nach dem Schlüpfen keinen Kontakt zum Standardmedium haben.

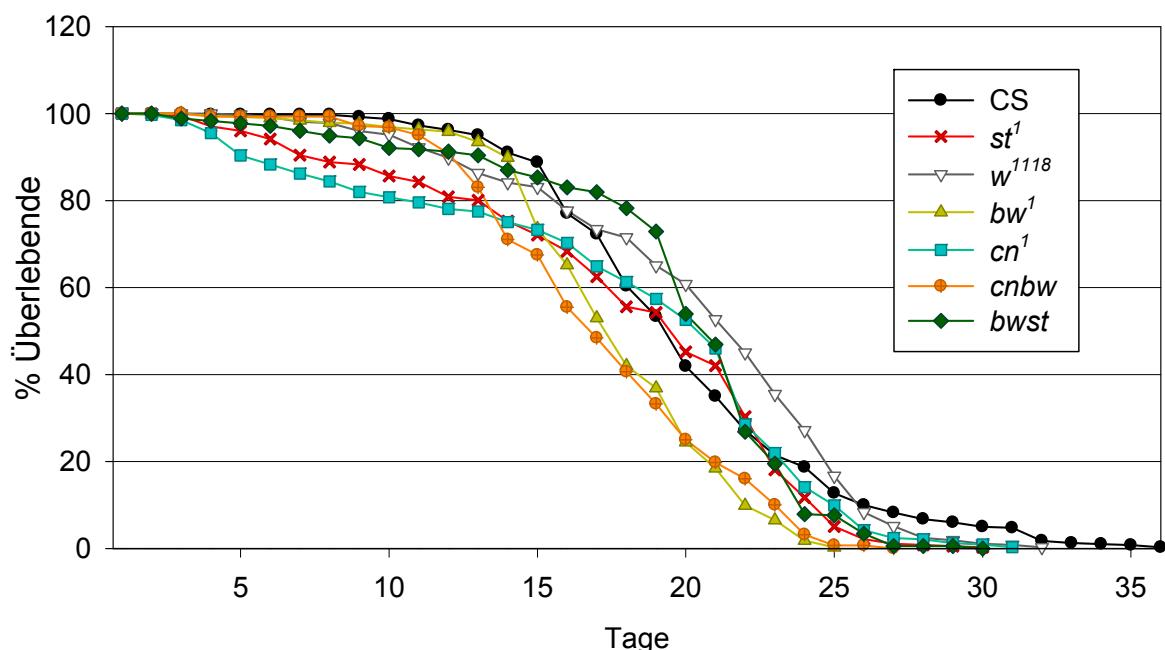


Abb. 30: Lebensspanne von CS und verschiedenen Mutanten auf einem Riboflavin-freien Sucrose-Medium. Die mittleren Lebensspannen der Mutanten weichen um 2 bis 3 Tage vom Wildtyp ab.

Wie in Abbildung 30 zu sehen ist, hat die Unfähigkeit, Riboflavin aufzunehmen und in den Malpighischen Gefäßen zu speichern, keinen Einfluss auf die Lebensspanne von adulten Fliegen. w^{1118} -Männchen leben beispielsweise auf dem Sucrose-Medium vergleichbar lange wie der Wildtyp CS. Auch $bwst$ zeigt keine Reduktion der Lebensspanne. Die geringste Lebenserwartung haben bw^1 und $cnbw$, während von den Mutanten st^1 und cn^1 in den ersten Tagen mehr Tiere sterben als von den anderen untersuchten Stämmen.

Die Zugabe von 10 µg/ml Riboflavin hat keinen Einfluss auf die Lebensspannen der Mutanten auf Sucrose (ohne Abbildung).

Außerdem wurden Experimente zur Aufzucht von *Drosophila* auf einem Riboflavin-freien Medium durchgeführt. Dazu wurde ein Minimalmedium nach Sang (1956) verwendet, welches auch

ohne Vitamin B2 hergestellt werden könnte. Zur Etablierung dieser Versuche wurden geschlüpfte Larven des Wildtyps CS von Eiablageplatten auf das Medium (mit Riboflavin) transferiert. Die beobachteten Überlebensraten von CS waren jedoch sehr gering und nicht reproduzierbar.

4.1.8 Weitere Phänotypen von *white*-, *scarlet*- und *brown*-Mutanten

Bei der Präparation larvaler Malpighischer Gefäße wurde beobachtet, dass sowohl die anterioren als auch die posterioren Stränge dieser Organe vor allem in *bw*¹ kürzer sind als im Wildtyp. Zur genaueren Charakterisierung wurden DAPI-Färbungen durchgeführt (3.3.5) und die Anzahl der Zellkerne, welche mit der Anzahl der Zellen und der Länge der Gefäße korrelieren sollte, verglichen.

Anteriore Malpighische Gefäße des Wildtyps CS bestehen aus ca. 210 Zellen pro Strang, während die posterioren *Tubules* um 50 Zellen kleiner sind (Abb. 31). Dasselbe gilt auch für die Mutante *w*¹¹¹⁸ und die Doppelmutante *bwst*. In *cn*¹ haben nur die anterioren Gefäße etwas weniger Zellkerne als CS, in *st*¹ besteht hingegen auch der posteriore Bereich aus einer reduzierten Anzahl von Zellen. In den Mutanten *cnbw* und *bw*¹ sind beide Teile der Malpighischen Gefäße stark verkürzt.

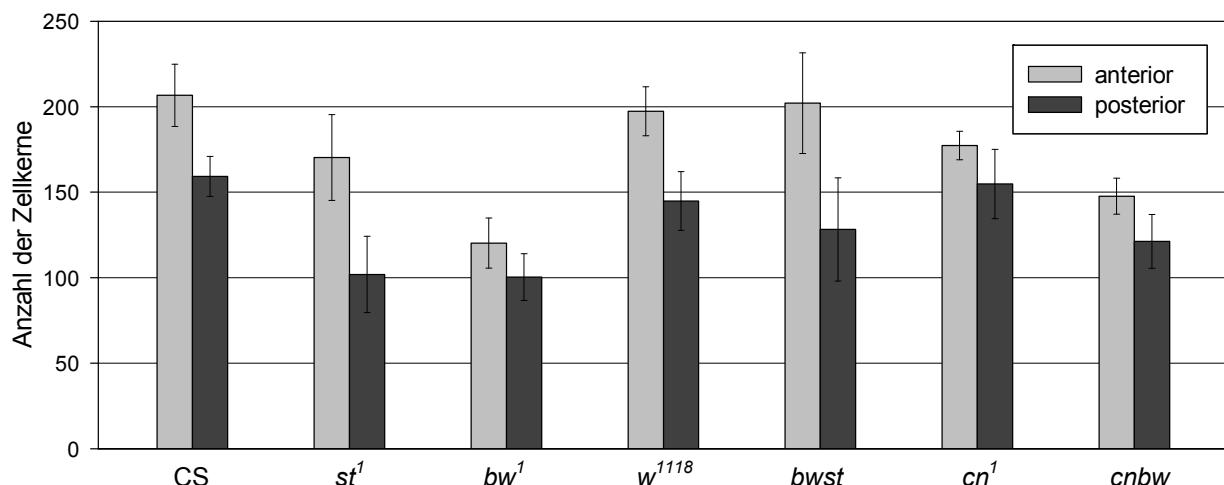


Abb. 31: Analyse der Zellkerne im anterioren bzw. posterioren Paar der Malpighischen Gefäße. Die Anzahl der Zellkerne ist in verschiedenen Mutanten reduziert.

Zur Untersuchung weiterer Phänotypen wurden Paraffinschnitte von CS, *w*¹¹¹⁸, *w*¹, *st*¹, *bw*¹, *bwst*, *cn*¹ und *cnbw* angefertigt. Dabei wurde in einzelnen Fliegen aller Genotypen, außer in CS, nach Alterung auf Sucrose eine leichte Neurodegeneration im optischen Lobus festgestellt. Am stärksten ist diese in der Mutante *w*¹¹¹⁸ zu beobachten (Abb. 32 A).

In *bwst* zeigte sich sowohl auf normalem Medium als auch auf Sucrose bei Fliegen jeden Alters eine starke Degeneration der Retina (Abb. 32 B und C). Um herauszufinden, ob diese Degeneration durch die Kombination der beiden Mutationen oder durch den genetischen Hintergrund

verursacht wird, wurde die Doppelmutante aus *bw¹* und *st¹* neu gekreuzt (*bwst-2*). In *bwst-2* ist jedoch kein Defekt in der Retina festzustellen (Abb. 32 D).

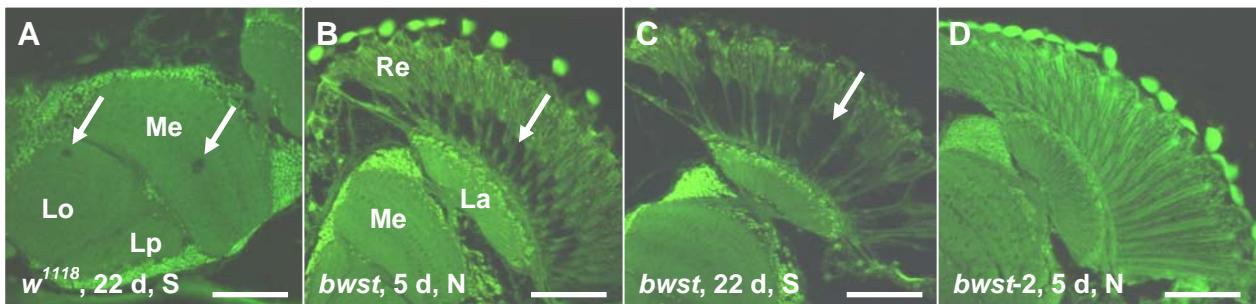


Abb. 32: Phänotypische Charakterisierung von white- und bwst-Mutanten. Horizontale Paraffinschnitte von *w¹¹¹⁸* (A) und *bwst* (B bis D). *w¹¹¹⁸* zeigt nach 22 Tagen auf Sucrose eine leichte Neurodegeneration (A, Pfeile). In *bwst* ist ein Defekt der Retina zu beobachten (B und C, Pfeile), welcher jedoch in *bwst-2* nicht vorhanden ist (D). A: *w¹¹¹⁸* nach 22 Tagen auf Sucrose. B: *bwst* nach 5 Tagen auf normalem Medium. C: *bwst* nach 22 Tagen auf Sucrose. D: *bwst-2* nach 5 Tagen auf normalem Medium. La: Lamina; Lo: Lobula; Lp: Lobulaplatte; Me: Medulla; N: normales Medium; Re: Retina; S: Sucrose; d: Tage. Maßstab: 40 µm in A; 50 µm in B-D.

4.1.9 Charakterisierung von ABCG2 als humanes Homolog von White

Aufgrund von großen Ähnlichkeiten zu *Drosophila* White wird die humane ABC-Transporter Unterfamilie ABCG auch als White-Familie bezeichnet. Zu dieser zählen die fünf Proteine ABCG1, ABCG2, ABCG4, ABCG5 und ABCG8.

Bei ABCG2 handelt es sich um einen Multidrug-Transporter, welcher analog zu *Drosophila* White unter anderem das Substrat Riboflavin transportiert (s. 1.1). Um zu untersuchen, ob ABCG2 *in vivo* White ersetzen kann, indem es die Pigmentierung der Augen rettet, wurden zwei Konstrukte hergestellt.

Durch p[UAS-ABCG2] kann ABCG2 mithilfe verschiedener Treiber-Linien in jedem beliebigen Gewebe der Fliege exprimiert werden. Der Vektor pUAST enthält jedoch *mini-white* als Marker, wodurch die Augenpigmentierung in den erfolgreich transformierten Fliegen partiell wiederhergestellt und somit ein möglicher Effekt von ABCG2 auf die Pigmentierung der Komplexaugen maskiert wird. Daher wurde ABCG2 auch in den Vektor yellow-Carnegie4 (yCar) kloniert, in welchem die Pigmentierung des Körpers als Marker dient (*mini-yellow*). Daher wird in yCar-GMR-ABCG2-Transformanten eine potentielle Rettung der Augenpigmentierung durch ABCG2, aktiviert von dem augenspezifischen Promotor GMR, wie in der Kontrolle *y w; p[Cary⁺-GMR-mini-white]* (Daller, 2005), phänotypisch sichtbar. Eine Expression von ABCG2 in anderen Geweben ist allerdings mit diesem Konstrukt nicht möglich.

4.1.9.1 Klonierung von ABCG2-Konstrukten

Zur Herstellung von p[UAS-ABCG2] (Abb. 33) wurde die ABCG2 cDNA (1,8 kb) aus dem Vektor pCMV-SPORT6 (4,4 kb; Imagenes) amplifiziert, wofür die Primer 5'G2-EcoRI-Kozak (mit der *Drosophila* Kozak-Sequenz; Kozak, 1989) und 3'G2-XhoI verwendet wurden. Das entstandene 1,9 kb-Fragment wurde nach TA-Klonierung in pGEM-T Easy mit EcoRI und XhoI ausgeschnitten und in pUAST (9,0 kb) ligiert. Zur Überprüfung der Richtigkeit erfolgte eine Sequenzierung des Konstrukts.



Abb. 33: Klonierung von p[UAS-ABCG2]. Die ABCG2 cDNA wurde durch entsprechende Primer mit der *Drosophila* Kozak-Sequenz versehen, aus pCMV-SPORT6 amplifiziert, in pGEM-T Easy und daraufhin mit EcoRI und XhoI in pUAST kloniert.

Das 10,9 kb-Konstrukt p[UAS-ABCG2] wurde in 280 Embryonen injiziert (s. 3.2.1), aus 39% davon schlüpften Larven. Von diesen entwickelten sich 65% zu adulten Fliegen, woraus acht unabhängige stabile Linien etabliert wurden (Tabelle 16).

p[UAS-ABCG2] Nr.	Insertions-chromosom	homozygot lebensfähig	Bemerkungen
2	II	ja	für Rescue-Experimente verwendet
9	X	ja	
17	X	ja	
29	II	nein	
30	II	nein	
31	II	ja	für Rescue-Experimente verwendet
34	II	ja	
38	III	ja	

Tabelle 16: Etablierte p[UAS-ABCG2]-Linien.

Analog zu yCar-GMR-ABCG1 (Daller, 2005) wurde das Konstrukt yCar-GMR-ABCG2 (11,6 kb) hergestellt (Abb. 34). Zur Klonierung von GMR-ABCG2 in den Expressionsvektor yellow-Carnegie4 (yCar; 8,5 kb) wurde das Konstrukt yCar-GMR-mini-white (12,5 kb; Daller, 2005) partiell mit SmaI verdaut und das erhaltene GMR-mini-white-Fragment (4,0 kb) in pSK (3,0 kb) kloniert (pSK-GMR-mini-white; 7,0 kb). Durch den Verdau mit StuI und eine anschließende Religation wurde mini-white (2,9 kb) aus der MCS (*multiple cloning site*) von GMR (1,1 kb) entfernt und pSK-GMR (4,1 kb) erhalten.

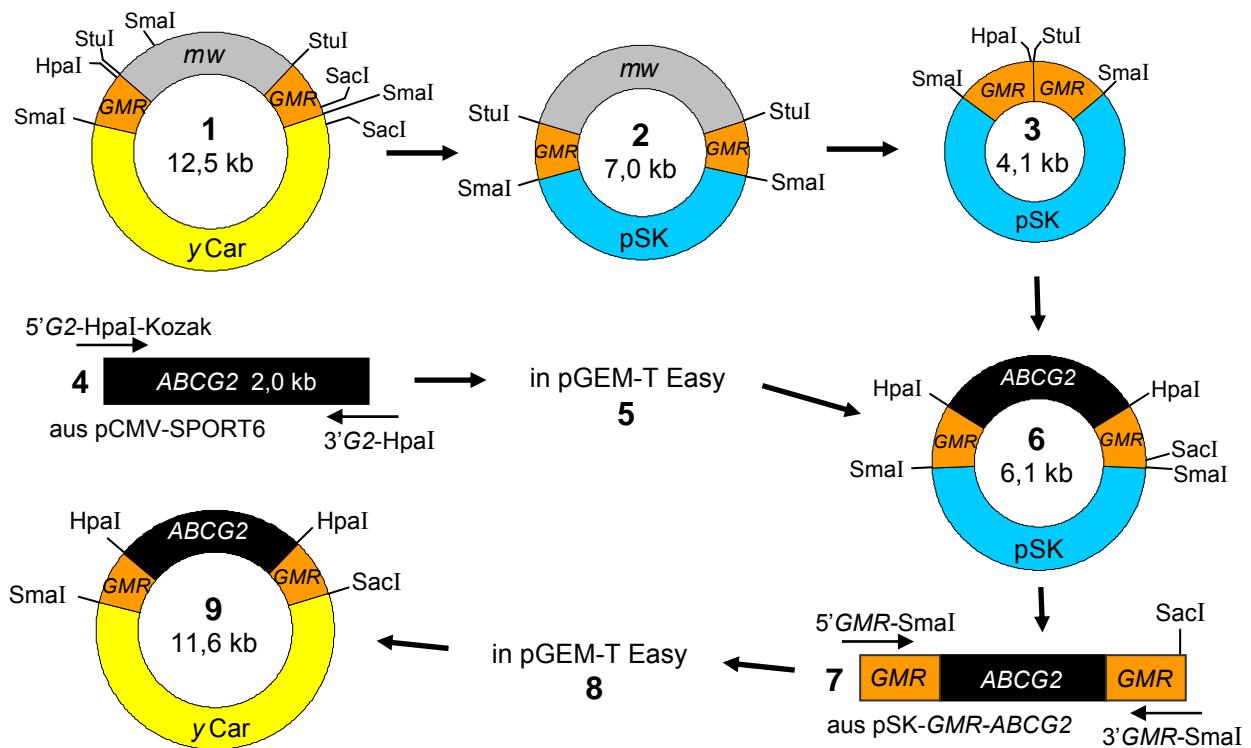


Abb. 34: Klonierung von yellow-Carnegie-GMR-ABCG2. 1: *yCar-GMR-mini-white*; 2: *pSK-GMR-mini-white*; 3: *pSK-GMR*; 4: PCR von *ABCG2* aus *pCMV-SPORT6*; 5: *pGEM-T Easy-ABCG2*; 6: *pSK-GMR-ABCG2*; 7: PCR von *GMR-ABCG2* aus *pSK-GMR-ABCG2*; 8: *pGEM-T Easy-GMR-ABCG2*; 9: *yCar-GMR-ABCG2*. *yCar*: *yellow-Carnegie4*; *mw*: *mini-white*. Details zur Durchführung siehe Text.

Mit den Primern 5'G2-HpaI-Kozak und 3'G2-HpaI (Abb. 34) wurde die humane *ABCG2* cDNA (1,8 kb) mit der *Drosophila* Kozak-Sequenz (Kozak, 1989) versehen, aus dem Vektor pCMV-SPORT6 (4,4 kb; ImaGenes) amplifiziert und das entstandene 2,0 kb-Fragment in pGEM-T Easy (3,0 kb) kloniert (pGEM-T Easy-ABCG2; 5,0 kb). Daraufhin wurde *ABCG2* mit HpaI ausgeschnitten und in die MCS von *GMR* (zwischen Promotor und Poly-A Ende) in pSK-GMR ligiert. Zur Überprüfung der richtigen Orientierung von *ABCG2* in pSK-GMR-ABCG2 (6,1 kb) erfolgte eine Sequenzierung. Mit den Primern 5'GMR-SmaI und 3'GMR-SmaI wurde *GMR-ABCG2* (3,1 kb) aus pSK-GMR-ABCG2 amplifiziert und in pGEM-T Easy kloniert (pGEM-T Easy-GMR-ABCG2; 6,1 kb). Durch einen Verdau mit SmaI, SacI und FspI wurde *GMR-ABCG2* aus pGEM-T Easy isoliert und in den mit SmaI und SacI verdauten Expressionsvektor *yCar* (8,5 kb) ligiert. Es erfolgten mehrere Sequenzierungen zur Bestätigung der Richtigkeit des Konstrukts.

Das 11,6 kb-Konstrukt *yellow-Carnegie4-GMR-ABCG2* wurde in 270 Embryonen injiziert (s. 3.2.1), davon gelangten 15% ins Larvenstadium. Von diesen entwickelten sich 60% zu adulten Fliegen, woraus die Stämme *y w; p[Cary⁺-GMR-ABCG2]* Nr. 6 und Nr. 8 (beide III. Chromosom) etabliert wurden.

4.1.9.2 Funktionelle Überprüfung der ABCG2-Konstrukte

Durch p[UAS-ABCG2] sollte möglicherweise mit dem ubiquitären Treiber *da-GAL4* der Augenphänotyp im *w*-Hintergrund gerettet werden können. Dabei muss jedoch, analog zum *Rescue* mit UAS-*w* (s. 4.1.3), der Effekt des Transformationsmarkers *mini-white* berücksichtigt werden. Vergleicht man den Pigmentgehalt der beiden Genotypen *w*; p[UAS-ABCG2]²/*da-GAL4* und *w*; p[UAS-ABCG2]³¹/*da-GAL4* mit dem der parentalen Stämme, wird deutlich, dass mit ABCG2 keine Rettung des *w*-Phänotyps möglich ist (Abb. 35). Die *Rescue*-Fliegen haben weniger Xanthommatin bzw. Drosopterin als die homozygoten Stämme mit den ABCG2-Konstrukten durch die beiden Kopien von *mini-white*.

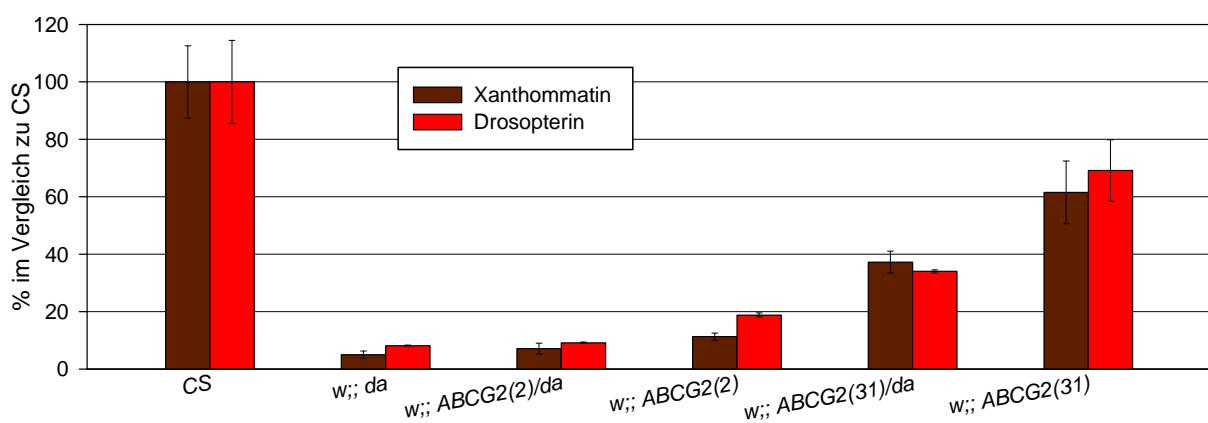


Abb. 35: Pigmentgehalt des humanen ABCG2-Rescues und der entsprechenden Kontrollen. p[UAS-ABCG2], aktiviert von *da-GAL4*, ist nicht in der Lage, die Pigmentierung in *white* zu retten. Die parentalen p[UAS-ABCG2]-Stämme wurden jeweils homozygot getestet. ABCG2: p[UAS-ABCG2]; *da*: *da-GAL4*.

Auch in den Transformanten *y w*; p[Cary⁺-GMR-ABCG2] zeigt sich, wie in *y w*; p[Cary⁺-GMR-ABCG1]³ (Daller, 2005), kein *Rescue*, da die Fliegen unpigmentierte Augen aufweisen (Abb. 36, links). In der Kontrolle *y w*; p[Cary⁺-GMR-*mini-white*]³ (Abb. 36 A) beträgt der Xanthommatingehalt im Vergleich zu CS 35%, während der Drosopteringehalt 16% ausmacht.

Durch eine RT-PCR an adulten Fliegen konnte gezeigt werden, dass sowohl ABCG1 (Abb. 36, rechts) als auch ABCG2 (ohne Abbildung) in den entsprechenden *yCar*-Transformanten auf RNA-Ebene exprimiert werden.

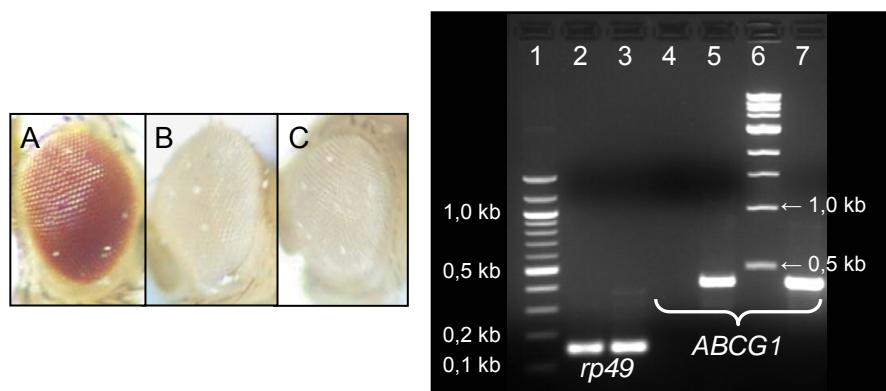


Abb. 36: Phänotyp der yCarnegie-Transformanten und Expression von *ABCG1*. Nur *mini-white* kann unter der Kontrolle von *GMR* die Augenpigmentierung wiederherstellen (A bis C). *ABCG1* wird auf RNA-Ebene exprimiert (1 bis 7). A: *y w; p[Cary⁺-GMR-mini-white]*³. B: *y w; p[Cary⁺-GMR-ABCG1]*³. C: *y w; p[Cary⁺-GMR-ABCG2]*⁶. 1: 100 bp-Leiter. 2 und 4: CS cDNA. 3 und 5: *y w; p[Cary⁺-GMR-ABCG1]*³ cDNA. 6: 1 kb-Leiter. 7: Positivkontrolle, Plasmid-DNA *yCar-GMR-ABCG1*.

Analog zur Pigmentierung der Komplexaugen kann durch *p[UAS-ABCG2]* und den Treiber *da-GAL4* der Riboflavingehalt in Malpighischen Gefäßen von *white*-Mutanten nicht gerettet werden (ohne Abbildung).

4.2 Etablierung von Lipidanalysemethoden für *Drosophila melanogaster*

Nachdem humane ABC-Proteine, wie z.B. ABCG5 und ABCG8, eine wichtige Rolle im Lipidtransport spielen (s. 1.1), wurden im Rahmen dieser Dissertation detaillierte Lipidanalysen von *w*-, *st*- und *bw*-Mutanten sowie von *knock-down*-Fliegen der *Drosophila* ABCA- und ABCG-Transporter durchgeführt. Dadurch sollte untersucht werden, ob diese Proteine, ähnlich wie ihre humanen Homologe, den Lipidmetabolismus beeinflussen. Außerdem wurden verschiedene Augenpigmentierungsmutanten analysiert, um herauszufinden, ob ein Zusammenhang zwischen der Pigmentierung der Komplexaugen und dem Lipidgehalt oder der Lipidzusammensetzung besteht.

Für diese Analysen wurden am Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin, Klinikum der Universität Regensburg, drei unterschiedliche Methoden für *Drosophila melanogaster* etabliert, welche nachfolgend näher erläutert werden: Dünnschichtchromatographie, Gaschromatographie und Massenspektrometrie. Damit wurden sowohl männliche Larven des dritten Larvalstadiums (3L) als auch 7 Tage alte Männchen untersucht.

4.2.1 Dünnschichtchromatographie

Die Dünnschichtchromatographie (DC) ist ein physikalisch-chemisches Trennverfahren, durch welches die Zusammensetzung von Proben analysiert werden kann. Die Proben werden nach der Aufarbeitung strichförmig auf eine mit Kieselgel (stationäre Phase) beschichtete Trägerplatte aufgetragen. Anschließend werden sie durch Entwicklung mit einem Laufmittel (mobile Phase) aufgetrennt. Je nach ausgewähltem Laufmittel kann dadurch beispielsweise ein Überblick über die Verteilung von Neutrallipiden (NL) oder Phospholipiden (PL) gewonnen werden.

Bei Entwicklung der Proben mit dem NL-Mix (s. 2.7) für Neutrallipide werden Sterole (Standard: Ergosterol), freie Fettsäuren (freie FS; Standard: Ölsäure) und Triglyceride (TG; Standard: Triolein) aufgetrennt (Abb. 37). Zusätzlich ist in Körpern von adulten Männchen auch Cis-Vaccenyl-Acetat (CVA), ein männchenspezifisches Pheromon (Butterworth, 1969; Briege und Butterworth, 1970), detektierbar, es wird jedoch im Folgenden nicht in die Auswertungen einbezogen.

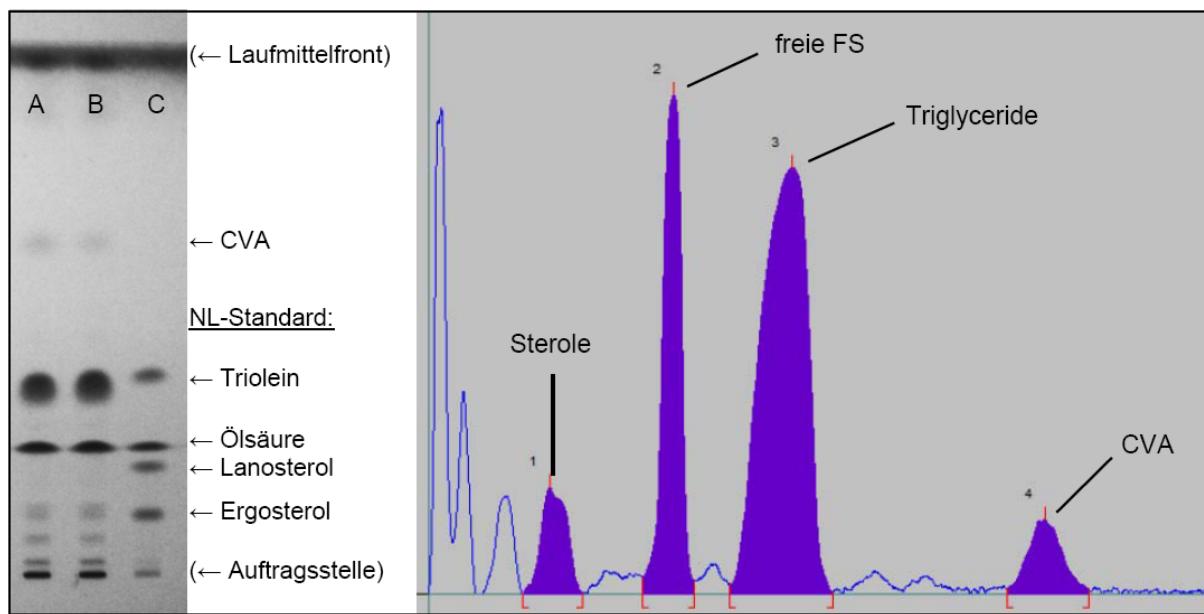


Abb. 37: Ausschnitt aus einer Neutrallipid-Platte. Mit NL-Mix (s. 2.7) können Sterole, freie FS und Triglyceride aufgetrennt werden. In adulten Männchen ist auch CVA detektierbar. Spuren A und B: Proben des Wildtyps Canton S (adulte Männchen). Spur C: NL-Standard. CVA: Cis-Vaccenyl-Acetat; FS: Fettsäuren; NL: Neutrallipide.

Durch die Entwicklung einer Platte mit dem PL-Mix (s. 2.7) als mobile Phase werden Phospholipide aufgetrennt (Abb. 38).

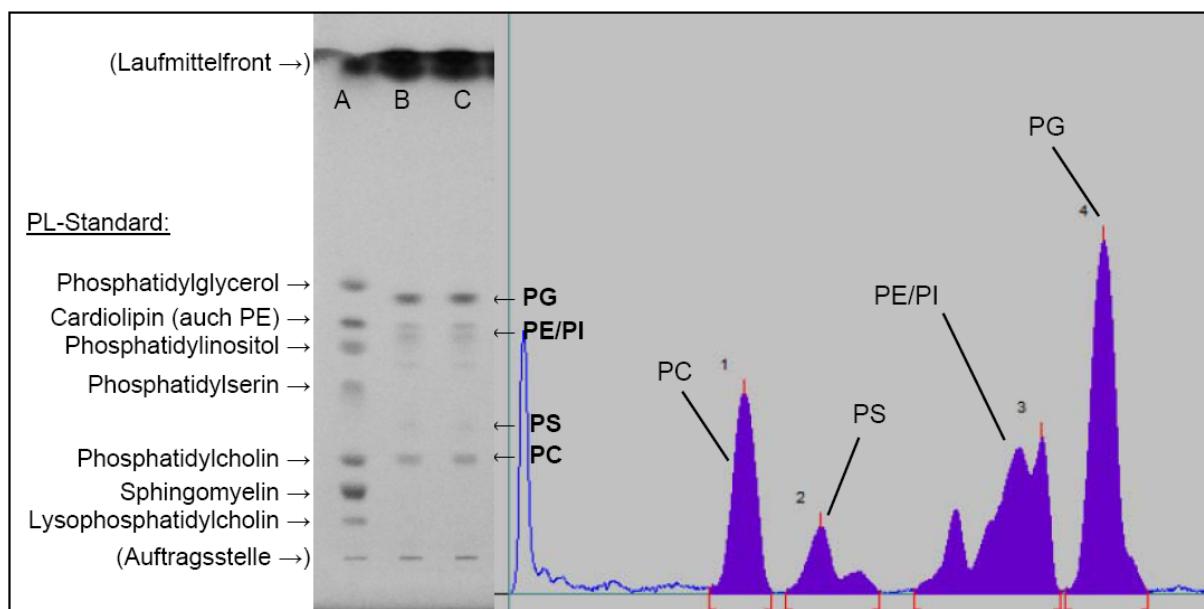


Abb. 38: Ausschnitt aus einer Phospholipid-Platte. Mit PL-Mix (s. 2.7) können die Phospholipide PC, PS, PE/PI und PG detektiert werden. Spur A: PL-Standard. Spuren B und C: Proben des Wildtyps Canton S (adulte Männchen). PC: Phosphatidylcholin; PE: Phosphatidylethanolamin; PG: Phosphatidylglycerol; PI: Phosphatidylinositol; PL: Phospholipide; PS: Phosphatidylserin.

Im Gegensatz zu den Neutrallipiden entstehen bei der PL-Auf trennung teilweise keine sauber separierbaren Peaks bzw. Peaks, die den Substanzen im Standard nicht exakt zugeordnet werden können (Abb. 38). Einzig Phosphatidylcholin (PC) kann sicher identifiziert werden. Der

Peak zwischen PC und Phosphatidylserin (PS) wird in den Auswertungen als PS bezeichnet. Die Peaks, die auf der Höhe von Phosphatidylinositol (PI) und dem Standard Cardiolipin (CL) nicht trennbar sind, werden als PE/PI zusammengefasst, da Phosphatidylethanolamin (PE) die gleiche Laufweite aufweist wie CL. Der Peak zwischen den Standards CL und Phosphatidylglycerol (PG) wird PG zugeordnet.

Die Auswertung von Neutral- und Phospholipiden bei der Dünnschichtchromatographie wird über die Fläche der detektierten Peaks im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle vorgenommen und als Prozent NL (100%) plus PL (100%) dargestellt. Für Larven (3L) und adulte Männchen des Wildtyps Canton S (CS) ergibt sich dabei folgendes Bild (Abb. 39):

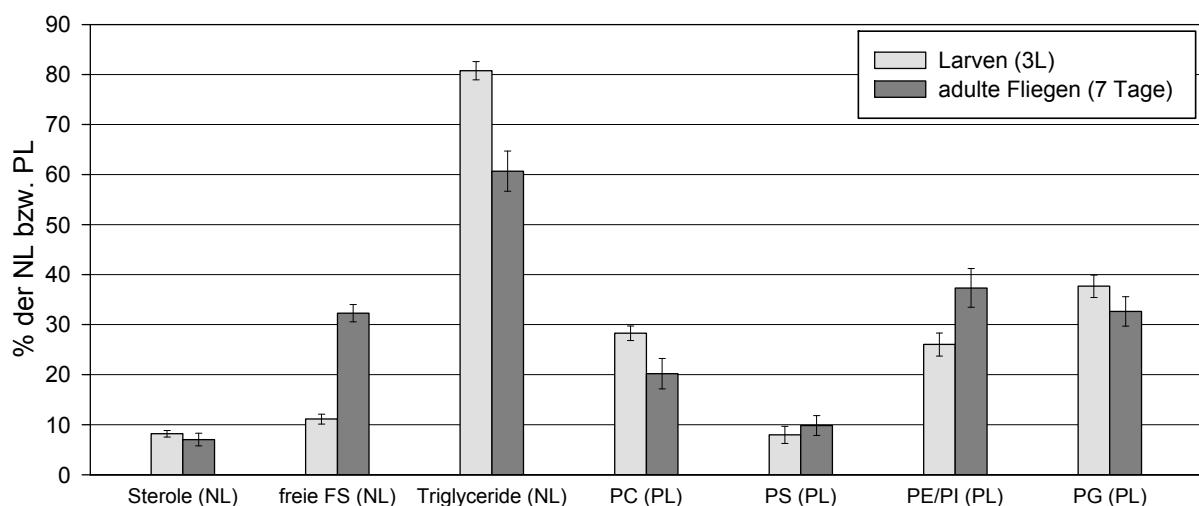


Abb. 39: Verteilung der Neutral- bzw. Phospholipide in Larven und adulten Fliegen des Wildtyps CS. FS: Fettsäuren; NL: Neutrallipide; PC: Phosphatidylcholin; PE: Phosphatidylethanolamin; PG: Phosphatidylglycerol; PI: Phosphatidylinositol; PL: Phospholipide; PS: Phosphatidylserin.

Betrachtet man die Neutrallipide, bestehen Larven zu 81% aus Triglyceriden (TG) und nur zu einem kleinen Teil aus Sterolen (8%) und freien Fettsäuren (11%). In adulten Fliegen betragen die TG 61% der Neutrallipide, der Anteil an freien FS liegt bei 32% und an Sterolen bei 7%. Auffallend ist die Reduktion der TG zugunsten der freien FS beim Übergang vom Larval- zum Adultstadium. In Larven zeigt sich eine deutliche Dominanz der Speicherform, während in adulten Fliegen eine Erhöhung der Verfügbarkeit von freien FS für den Energiestoffwechsel festzustellen ist.

Bei den Phospholipiden gibt es in beiden untersuchten Stadien keine deutlich dominierende Spezies. In Larven liegen PC und PE/PI bei 28 bzw. 26%, PS liegt bei 8% und PG bei 38%. In adulten Männchen bestehen die Phospholipide zu 20% aus PC, zu 37% aus PE/PI, zu 10% aus PS und zu 33% aus PG. Dabei kommt es zu einer Umkehr der PC/PE Ratio mit einer geringfügigen Prädominanz von PC in Larven und von PE/PI in adulten Fliegen.

Da für die Analyse von NL bzw. PL verschiedene Laufmittel verwendet werden, kann der absolute Gehalt der NL im Vergleich zu den PL nicht bestimmt werden.

Die hier erzielten Ergebnisse zeigen, dass mit dieser Methode zwar die Neutrallipide sehr gut aufgetrennt und identifiziert werden können, jedoch nicht die Phospholipide. Deshalb wird in der folgenden Auswertung der Lipidanalysen die DC nur für die Neutrallipide eingesetzt. Für die Phospholipide wurde eine weitere, zuverlässigere Methode, die Massenspektrometrie, etabliert (s. 4.2.3).

4.2.2 Gaschromatographie

Die Gaschromatographie (GC) ist eine Verteilungschromatographie, durch die Subzangemische in einzelne Komponenten aufgetrennt werden können. Bei der Probenaufarbeitung für die GC werden polare Lipide derivatisiert, wonach die entstandenen unpolaren freien Fettsäuren im Chromatographen analysiert werden können.

In Tabelle 17 sind alle auswertbaren FS sowie ihre Detektierbarkeit in Larven (3L) und in 7 Tage alten Männchen (Adulten) aufgelistet.

Fettsäure	Name	3L	Adulte
FS 10:0	Caprinsäure	w	w
FS 12:0	Laurinsäure	++	++
FS 13:0	interner Standard		
FS 14:0	Myristinsäure	++	++
FS 14:1-c9 (n-5)	Myristoleinsäure	++	++
FS 15:0	Pentadecansäure	w	w
FS 16:0iso	Iso-Palmitinsäure	w	w
FS 16:0	Palmitinsäure	++	++
FS 16:1-c9 (n-7)	Palmitoleinsäure	++	++
FS 16:0-4Me	Phytansäure	---	---
FS 17:0	Margarinsäure	w	w
FS 18:0	Stearinsäure	++	++
FS 18:1-c9 (n-9)	Ölsäure	++	++
FS 18:1-c11 (n-7)	Vaccensäure	---	w
FS 18:2-c9,c12 (n-6)	Linolsäure	++	++
FS 18:3-c6,c9,c12 (n-6)	γ-Linolensäure	---	---
FS 18:3-c9,c12,c15 (n-3)	α-Linolensäure	++	++
FS 20:0	Eicosansäure, Arachinsäure	w	w
FS 20:1-c11 (n-9)	Eicosensäure, Gondosäure	---	---
FS 21:0iso	interner Standard		
FS 20:2-c11,c14 (n-6)	Eicosadiensäure	---	---
FS 20:3-c8,c11,c14 (n-6)	Eicosatriensäure, Dihomo-γ-linolensäure	---	---
FS 20:4-c5,c8,c11,c14 (n-6)	Arachidonsäure	---	---
FS 20:3-c11,c14,c17 (n-3)		---	---
FS 22:0	Behensäure	w	w

Fettsäure	Name	3L	Adulte
FS 20:4-c8,c11,c14,c17 (n-3)		---	---
FS 22:1-c13 (n-9)	Erucasäure	---	w
FS 20:5-c5,c8,c11,c14,c17 (n-3)	Eicosapentaensäure, Timnodonsäure	---	---
FS 23:0	Tricosansäure	w	w
FS 22:4-c7,c10,c13,c16 (n-6)	Docosatetraensäure, Adrensäure	---	---
FS 24:0	Lignocerinsäure	w	w
FS 24:1-c15 (n-9)	Nervonsäure	---	w
FS 22:5-c7,c10,c13,c16,c19 (n-3)	Clupanodonsäure, Docosapentaensäure	---	---
FS 22:6-c4,c7,c10,c13,c16,c19 (n-3)	Docosahexaensäure, Cervonsäure	---	---

Tabelle 17: Auflistung der im GC-Standard enthaltenen Fettsäuren sowie ihrer Detektierbarkeit in Larven (3L) und in 7 Tage alten Männchen (Adulten). ++: detektierbar; w: schwach detektierbar (< 0,2%); ---: nicht detektierbar. Fettsäuren, die für alle Proben ausgewertet wurden, sind hervorgehoben. 3L: Larven des dritten Larvalstadiums; 4Me: Tetramethyl; c: cis; FS: Fettsäure.

Unterschiede bei den untersuchten Proben findet man sowohl in der Gesamtmenge der detektierten FS (gemessen in nmol pro eingesetztem Protein) als auch in ihrer Verteilung. Die Ergebnisse werden daher einerseits als Summe der FS im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle, andererseits als Verteilung der FS in jedem Genotyp dargestellt.

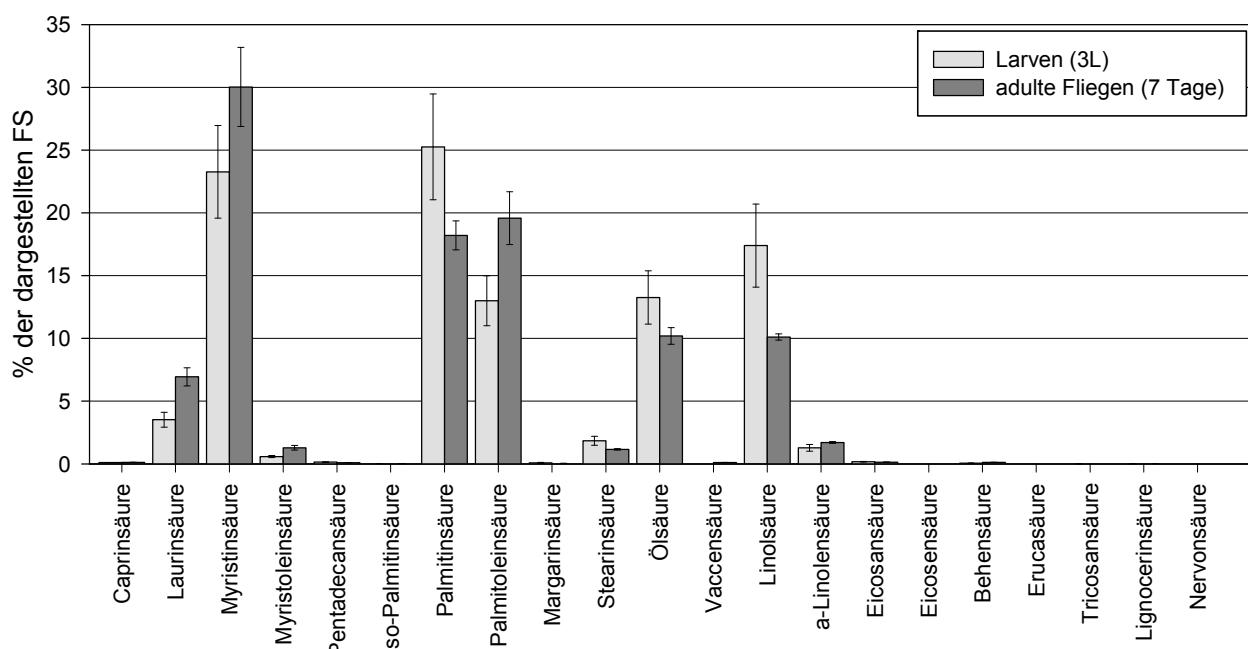


Abb. 40: Übersicht über die Verteilung aller detektierbaren Fettsäuren in Larven und adulten Fliegen des Wildtyps CS. Länge der Kohlenwasserstoffkette, Sättigungsgrad und Lage der Doppelbindungen s. Tabelle 17.

Abbildung 40 zeigt eine Übersicht über alle detektierbaren FS in den analysierten Entwicklungsstadien des Wildtyps CS. Für alle weiteren Proben wurden nur die FS ausgewertet, die mehr als 0,2% zum Gesamtlipid beitragen (s. Tabelle 17). Die prominentesten gesättigten FS in *Drosophila melanogaster* sind Myristin- (C 14:0), Palmitin- (C 16:0), Laurin- (C 12:0) und Stearinsäure (C 18:0). Präsente Vertreter der einfach ungesättigten FS sind Palmitolein- (C 16:1), Öl- (C 18:1)

und Myristoleinsäure (C 14:1). Die beiden überwiegend auftretenden mehrfach ungesättigten FS sind die 2-fach ungesättigte Omega-6-FS Linolsäure (C 18:2) und die 3-fach ungesättigte Omega-3-FS α -Linolensäure (C 18:3). Fettsäuren mit einer Kettenlänge von mehr als 18 C-Atomen sind nur in Spuren vorhanden.

Auffallend ist dabei einerseits die Verschiebung der gesättigten FS von Palmitinsäure (C 16:0) zu den kürzeren Spezies Myristin- (C 14:0) und Laurinsäure (C 12:0) zwischen Larval- und Adultstadium. Andererseits kommt es zu einer Zunahme der einfach ungesättigten Palmitoleinsäure (C 16:1) sowie zu einer Abnahme von Ölsäure (C 18:1) und der zweifach ungesättigten Omega-6-FS Linolsäure (C 18:2). Diese Daten weisen auf eine Verkürzung der Kettenlänge und eine Veränderung des Desaturierungsgrades in Richtung auf C 16:1-Palmitoleate hin.

4.2.3 Massenspektrometrie

Die Elektrospray-Ionisation Tandem-Massenspektrometrie (ESI-MS/MS) ist eine Methode zur Auf trennung von Teilchen entsprechend ihrer Masse. Durch die Kopplung von mehreren Analy satoren hintereinander (MS/MS) werden Sensitivität und Selektivität verbessert. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit werden verschiedene Phospholipid-Spezies sowie deren Sättigungsgrad mit der Massenspektrometrie (MS) analysiert. Abbildung 41 zeigt die Sättigungsgrade der detektierbaren Phospholipide in Larven und adulten Fliegen des Wildtyps CS.

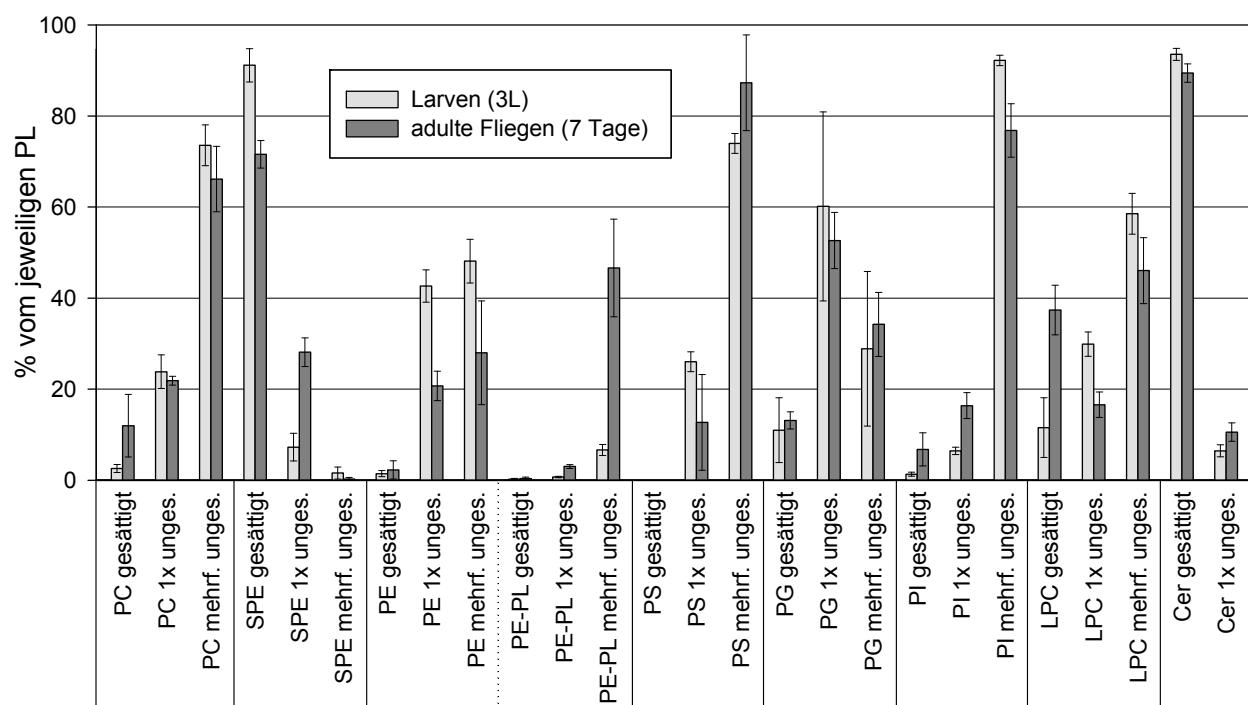


Abb. 41: Übersicht über den Sättigungsgrad der detektierbaren Phospholipide in Larven und adulten Fliegen des Wildtyps CS. Cer: Ceramide; LPC: Lysophosphatidylcholin; mehrf.: mehrfach; PC: Phosphatidylcholin; PE: Phosphatidylethanolamin; PE-PL: PE Etherlipide (Plasmalogene); PG: Phosphatidylglycerol; PI: Phosphatidylinositol; PS: Phosphatidylserin; SPE: Sphingosylphosphoethanolamin; unges.: ungesättigt.

Phosphatidylcholin (PC) kommt sowohl in Larven als auch in adulten Fliegen zu über 60% mehrfach ungesättigt vor. In adulten Fliegen ist im Vergleich zum Larvalstadium die Fraktion der gesättigten PC-Spezies erhöht. Bei den Sphingosylphosphoethanolaminen (SPE) ist in beiden analysierten Entwicklungsstadien eine Dominanz der gesättigten Formen zu beobachten. In adulten Fliegen ist eine Erhöhung von einfach ungesättigtem SPE zu verzeichnen. Bei Phosphatidylethanolamin (PE) dominieren die ungesättigten Spezies im Larvalstadium, in adulten Fliegen sind allerdings die PE Etherlipide (Plasmalogene), insbesondere die mehrfach ungesättigten Formen, als Vorstufen für die Eicosanoid-Biosynthese erhöht. Phosphatidylserin (PS) liegt primär mehrfach ungesättigt vor, wobei im Larvalstadium im Gegensatz zu adulten Fliegen ein größerer Anteil an einfach ungesättigtem PS detektierbar ist. Phosphatidylglycerol (PG) kommt in beiden Stadien überwiegend ungesättigt vor und liegt bei adulten Fliegen an der Detektionsgrenze, weshalb es nicht bei allen Ansätzen ausgewertet werden konnte. Von Phosphatidylinositol (PI) sind die gesättigten und einfach ungesättigten Spezies in den adulten Fliegen stärker vertreten, während mehrfach ungesättigtes PI in den Larven dominiert. Bei Lysophosphatidylcholin (LPC) zeigt sich vor allem in Larven eine Dominanz der ungesättigten Formen, während im Adultstadium ein höherer Gehalt an gesättigtem LPC detektierbar ist. Ceramide (Cer) treten vor allem gesättigt auf, wobei im Larvalstadium ein höherer Anteil an ungesättigten Cer-Spezies zu verzeichnen ist.

Bei der Auswertung der MS-Daten wurde durch den Vergleich der Werte von CS aus unabhängigen Experimenten ersichtlich, dass die Ceramide in allen Proben trotz unterschiedlicher PL-Gesamtmengen einen relativ konstanten Wert bilden und daher nicht ausgewertet werden können. Dasselbe Resultat ergab sich für LPC in Larven.

Ergebnisse der Massenspektrometrie werden einerseits als Summe der Phospholipide (gemessen in nmol pro mg Protein) im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle, andererseits als Verteilung der PL in jedem Genotyp dargestellt.

4.2.4 Lipidanalysen von Wildtypstämmen

Um die Variabilität von Lipiden in *Drosophila melanogaster* abschätzen zu können, wurden 7 Tage alte Männchen unterschiedlicher Wildtypstämme untersucht. Als Standardkontrolle diente Canton S (CS; Abb. 42 hellgrau).

Während der Proteingehalt relativ stabil und nur in den Stämmen Berlin-K (BK) und Oregon R-C (OR-C) auf 85% reduziert ist, sind im Gehalt an Gesamtfettsäuren große Unterschiede zu verzeichnen (Abb. 42). CS-1 und CSi2 (gelb) haben um 70 bzw. 45% weniger FS als CS. Auch die drei getesteten OR Stämme (hellblau) sind sowohl voneinander als auch von der Standardkontrolle verschieden und haben einen FS-Gehalt zwischen 35 und 70%. In RAL-Fliegen sind

die FS auf 58% reduziert. Nur BK hat einen ähnlich hohen Gehalt an FS wie CS. In CS-1, OR und OR-C ließ sich eine Erhöhung der Gesamt-PL auf 130 bis 138% feststellen, wobei bei den einzelnen Werten relativ große Schwankungen zu verzeichnen sind.

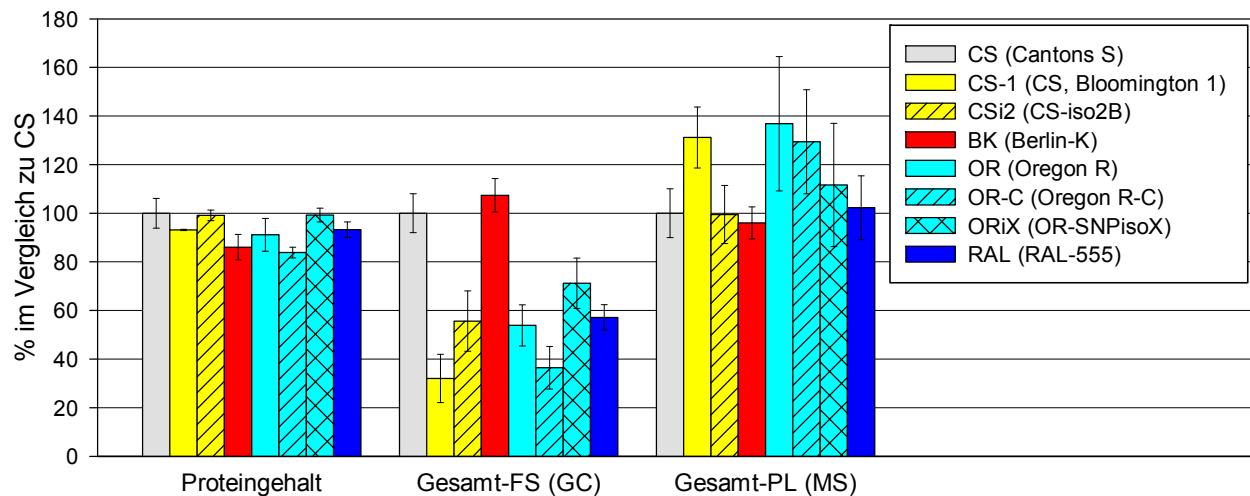


Abb. 42: Übersicht über Protein-, Fettsäure- und Phospholipidgehalt adulter Männchen von Wildtypstämmen im Vergleich zu CS. FS: Fettsäuren; GC: Gaschromatographie; MS: Massenspektrometrie; PL: Phospholipide.

Die DC-Analyse zeigt, dass im Vergleich zu CS in allen Wildtypstämmen, außer in BK, die Triglyceride reduziert sind (Abb. 43 A). In BK ist hingegen auf eine Erhöhung des Gehalts an freien FS hinzuweisen, in OR-C und RAL sind diese verringert. Die Sterole sind in allen Wildtypstämmen etwas, in CS-1 und CSi2 stark reduziert.

Durch die GC konnte festgestellt werden, dass sich nicht nur die Summe der Fettsäuren, sondern auch deren Verteilung in den getesteten Wildtypstämmen stark voneinander unterscheidet (Abb. 43 B). In CS-1 sind die kürzeren FS Laurin-, Myristin-, Myristolein- und Palmitoleinsäure zugunsten der FS mit 18 C-Atomen reduziert, wodurch in diesem Stamm Linolsäure den größten prozentualen Anteil ausmacht. In CSi2 sind hingegen Laurin-, Myristolein- und Linolsäure erhöht und Palmitinsäure ist vermindert. In BK ist Laurinsäure reduziert und Palmitinsäure ist etwas höher als in CS. In den drei OR-Stämmen ist Myristinsäure verringert, Linol- und α -Linolensäure sind erhöht. In OR-C ist zusätzlich der Gehalt an Palmitoleinsäure reduziert, zugunsten von Stearin- und Ölsäure. RAL-Fliegen zeigen eine Reduktion von Palmitoleinsäure, kompensiert durch eine Erhöhung von Linolsäure.

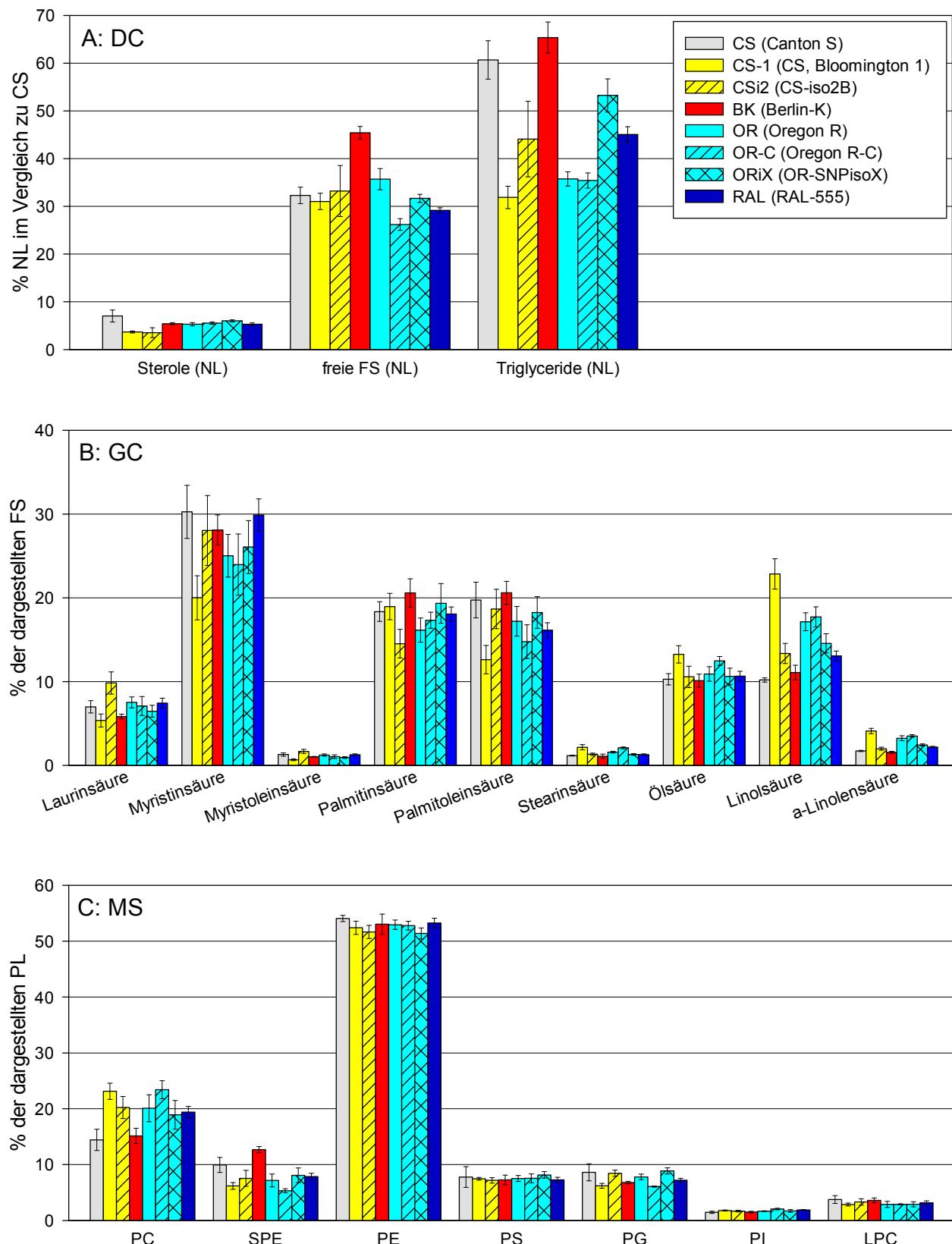


Abb. 43: Lipidanalysen adulter Männchen von Wildtypstämmen. A: Dünnschichtchromatographie (DC), Verteilung der NL im Vergleich zu CS. B: Gaschromatographie (GC), Verteilung der FS. C: Massenspektrometrie (MS), Verteilung der PL-Spezies. Die Legende in A bezieht sich auf die gesamte Abbildung. FS: Fettsäuren; LPC: Lysophosphatidylcholin; NL: Neutrallipide; PC: Phosphatidylcholin; PE: Phosphatidylethanolamin; PG: Phosphatidylglycerol; PI: Phosphatidylinositol; PL: Phospholipide; PS: Phosphatidylserin; SPE: Sphingosylphosphoethanolamin.

Die Anteile der einzelnen Phospholipide an den Gesamt-PL sind in den Wildtypstämmen weit-aus konstanter als die Verteilung der FS (Abb. 43 C). In CS-1 und CSi2 ist im Vergleich zur Standardkontrolle Canton S PC erhöht und SPE reduziert. In CS-1 ist zusätzlich PG vermindert, in CSi2 stattdessen PE. In den drei getesteten OR-Stämmen sind eine Erhöhung von PC und eine Reduktion von SPE zu verzeichnen. In OR-C ist außerdem der Gehalt an PG verringert, in ORiX hingegen PE. Im Stamm RAL ist PC erhöht, kompensiert durch eine Reduktion von SPE, während in Berlin-K SPE erhöht und PG vermindert ist.

4.2.5 Lipidanalysen von Futtervarianten

Die Zusammensetzung verschiedener Futterquellen könnte sich möglicherweise auf Lipidgehalt und -verteilung von *Drosophila* auswirken. Daher wurde zur Analyse von Unterschieden im Gehalt und in der Zusammensetzung der Lipide in Futtervarianten das am Lehrstuhl hergestellte Standardmedium (s. 2.1.2.4) mit dem *instant*-Futter Formula 4-24 *Drosophila* Medium Blue verglichen.

Der Lipidgehalt im *instant*-Futter ist im Vergleich zum Standardmedium stark reduziert. Während die Gesamt-PL (MS) 48% betragen, sind die Gesamt-FS im *instant*-Futter sogar auf 18% vermindert (ohne Abbildung).

Die DC zeigt, dass Sterole, freie FS und Triglyceride im *instant*-Medium, verglichen mit dem Standardmedium, jeweils auf weniger als 50% reduziert sind (Abb. 44 A).

Durch die gaschromatographische Analyse wird eine völlig ungleiche Verteilung der Fettsäuren in den Futtervarianten deutlich (Abb. 44 B). Einzig der Gehalt an der 3-fach ungesättigten α -Linolensäure liegt in beiden Medien bei 5%. Während im *instant*-Futter die gesättigten FS Myristin-, Palmitin- und Stearinäure stärker vertreten sind als im Standardmedium, hat Letzteres einen höheren Gehalt an den ungesättigten FS Palmitolein-, Öl- und Linolsäure.

Auch die Phospholipide sind in den beiden Futtervarianten unterschiedlich verteilt (Abb. 44 C). Im Standardmedium ist der Gehalt an PI und LPC höher, im *instant*-Futter sind hingegen mehr PC und PE vorhanden. Der Menge an PS und PG ist in beiden Medien gleich.

Diese drastischen Unterschiede zeigen, dass ein Einfluss der Futterquelle auf den Lipidhaushalt der Fliege nicht auszuschließen ist.

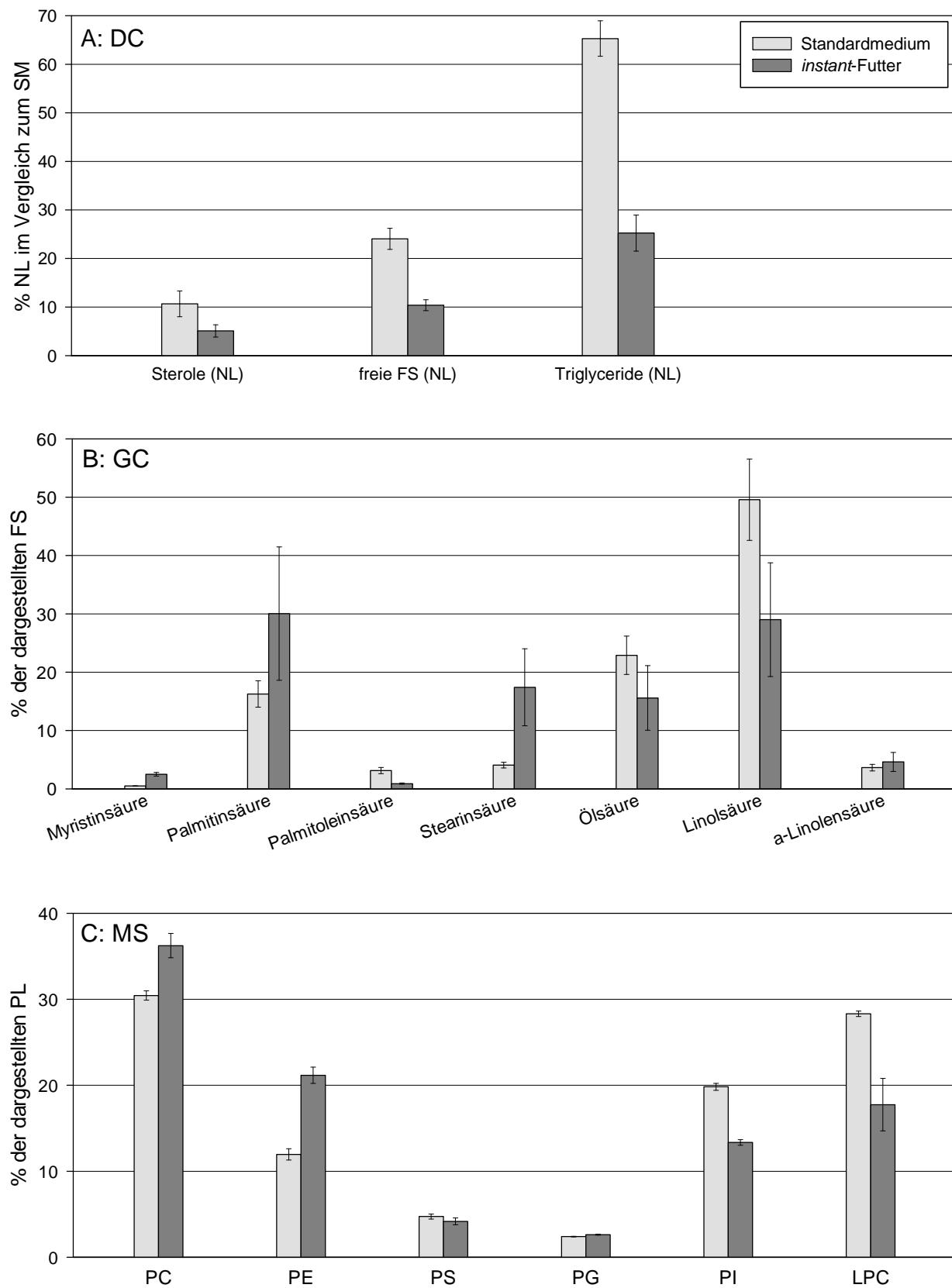


Abb. 44: Lipidanalysen des *instant-Futters* im Vergleich zum Standardmedium. A: Dünnschichtchromatographie (DC), Verteilung der NL im Vergleich zum SM. B: Gaschromatographie (GC), Verteilung der FS. C: Massenspektrometrie (MS), Verteilung der PL-Spezies. Die Legende in A bezieht sich auf die gesamte Abbildung. FS: Fettsäuren; LPC: Lysophosphatidylcholin; NL: Neutrallipide; PC: Phosphatidylcholin; PE: Phosphatidylethanolamin; PG: Phosphatidylglycerol; PI: Phosphatidylinositol; PL: Phospholipide; PS: Phosphatidylserin; SM: Standardmedium.

4.3 Charakterisierung der ABC-Transporter White, Scarlet und Brown - Lipidanalysen

Im Folgenden werden die ABC-Transporter-Mutanten *w*, *st* und *bw* auf Veränderungen von Lipidgehalt und -zusammensetzung analysiert, um herauszufinden, ob sie, wie ihre humanen Homologe, in den Lipidtransport involviert sind. Dazu werden vier verschiedene *bw*- und zwei *w*-Allele sowie *st*¹, *cnbw*, *bwst* und der Stamm *bwst*-2 (s. 4.1.8) miteinander verglichen.

4.3.1 Lipidanalysen der Larven von ABC-Transporter-Mutanten

Der Proteingehalt der Larven von ABC-Transporter-Mutanten schwankt im Vergleich zu CS zwischen 75 und 108% (Abb. 45). Aufgrund von sehr hohen Standardabweichungen ist bei den Gesamt-FS nur auf eine Erhöhung in *w*¹ um 23% hinzuweisen. Die Summe der Gesamt-PL ist hingegen in allen getesteten Mutanten verringert. In den vier *bw*-Allelen liegt der PL-Gehalt zwischen 35 und 72%, in *cnbw* bei 75%. Auch in den beiden *w*-Mutanten sind die PL auf 65 bzw. 70% reduziert. Zwischen *bwst* und *bwst*-2 ist ein großer Unterschied im PL-Gehalt zu verzeichnen.

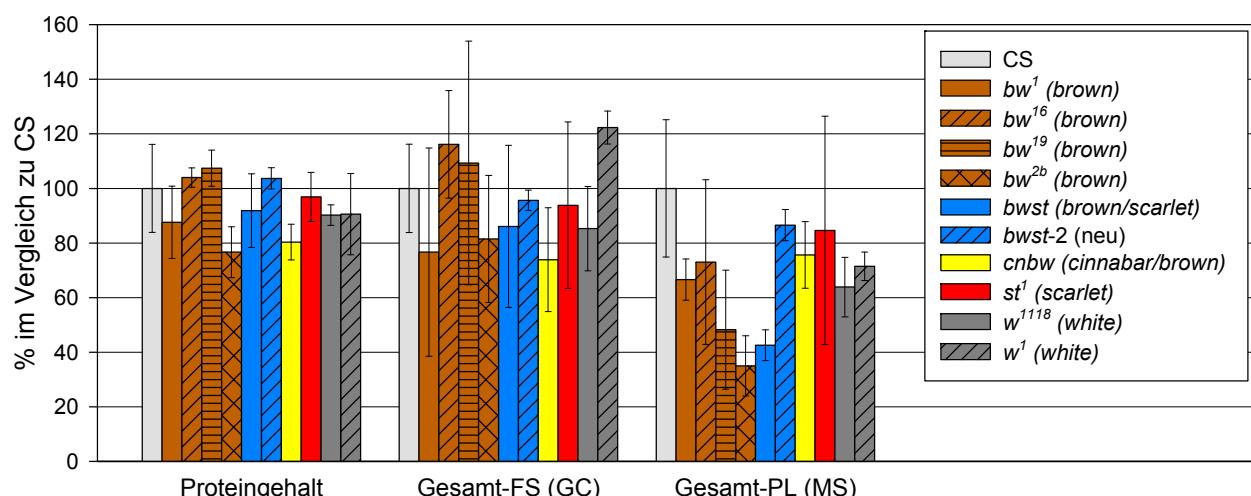


Abb. 45: Übersicht über Protein-, Fettsäure- und Phospholipidgehalt der Larven von ABC-Transporter-Mutanten im Vergleich zu CS. FS: Fettsäuren; GC: Gaschromatographie; MS: Massenspektrometrie; PL: Phospholipide.

In der DC zeigen sich, außer einer geringfügigen Erhöhung der Triglyceride in *bw*¹⁶, *bw*¹⁹, *st*¹ und in den beiden *w*-Allelen, keine nennenswerten Unterschiede zwischen den Larven der ABC-Transporter-Mutanten (Abb. 46 A).

Wegen der hohen Standardabweichungen sind in der GC keine Unterschiede detektierbar, einzige *cnbw* fällt mit einer Verschiebung von Myristin- zu Ölsäure auf (Abb. 46 B).

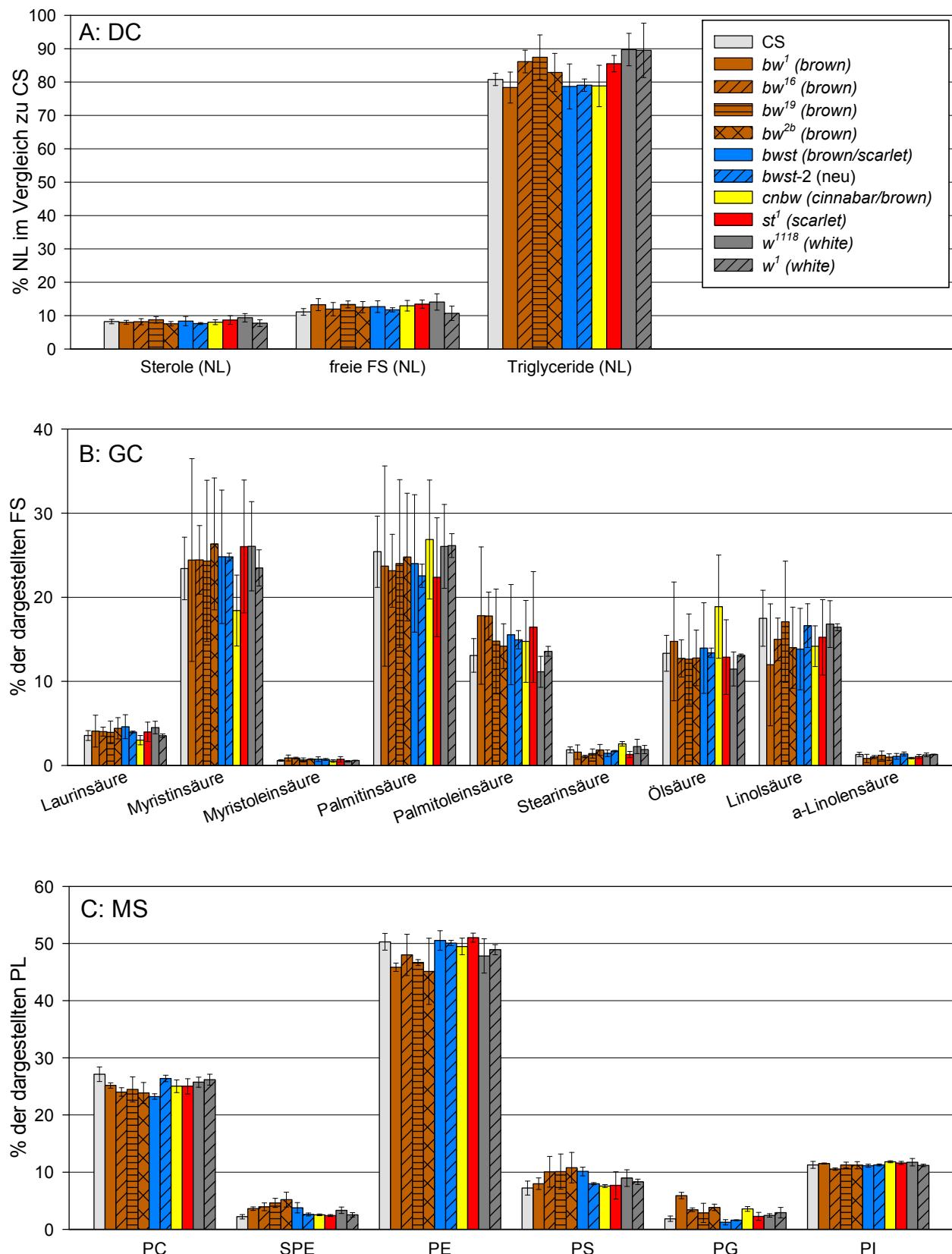


Abb. 46: Lipidanalysen der Larven von ABC-Transporter-Mutanten. A: Dünnschichtchromatographie (DC), Verteilung der NL im Vergleich zu CS. B: Gaschromatographie (GC), Verteilung der FS. C: Massenspektrometrie (MS), Verteilung der PL-Spezies. Die Legende in A bezieht sich auf die gesamte Abbildung. FS: Fettsäuren; NL: Neutrallipide; PC: Phosphatidylcholin; PE: Phosphatidylethanolamin; PG: Phosphatidylglycerol; PI: Phosphatidylinositol; PL: Phospholipide; PS: Phosphatidylserin; SPE: Sphingosylphosphoethanolamin.

Durch die MS ist in den vier *bw*-Allelen eine Reduktion von PC und PE sowie eine Erhöhung von SPE zu beobachten (Abb. 46 C). In *bw*¹⁶, *bw*¹⁹ und *bw*^{2b} ist ein Anstieg von PS festzustellen, in *bw*¹, *bw*¹⁶ und *bw*^{2b} ist der Gehalt an PG höher als in der Kontrolle. In *bwst* ist PC verringert und SPE sowie PS sind stärker vertreten als in CS und in *bwst*-2. In *w*¹¹¹⁸ ist SPE geringfügig erhöht, in *cnbw* hingegen PG.

4.3.2 Lipidanalysen von adulten ABC-Transporter-Mutanten

Der Proteingehalt von adulten Männchen der vier getesteten *bw*-Allele liegt im Vergleich zu CS zwischen 75 und 117% (Abb. 47). Die Gesamt-FS sind in *bw*¹, *bw*¹⁶ und *bw*^{2b} unterschiedlich stark reduziert (auf 41 bis 83%), während die Gesamt-PL in den vier *bw*-Allelen zwischen 80 und 95% liegen. Bei den beiden *bwst*-Stämmen sind die größten Ungleichheiten in den Gesamt-PL zu finden (*bwst*: 70%, *bwst*-2: 115%), aber auch im Protein- und FS-Gehalt liegen die Unterschiede bei 20%. Die Doppelmutante *cnbw* hat nur 37% Gesamt-FS im Vergleich zur Kontrolle und einen Proteingehalt von 85%. In *st*¹ sind hingegen Protein- und PL-Gehalt etwas reduziert. Die beiden *w*-Allele unterscheiden sich im Gehalt an FS um 38 bzw. 50% von CS, die Gesamt-PL liegen in *w*¹ bei 63% und in *w*¹¹¹⁸ bei 84%, verglichen mit dem Wildtyp.

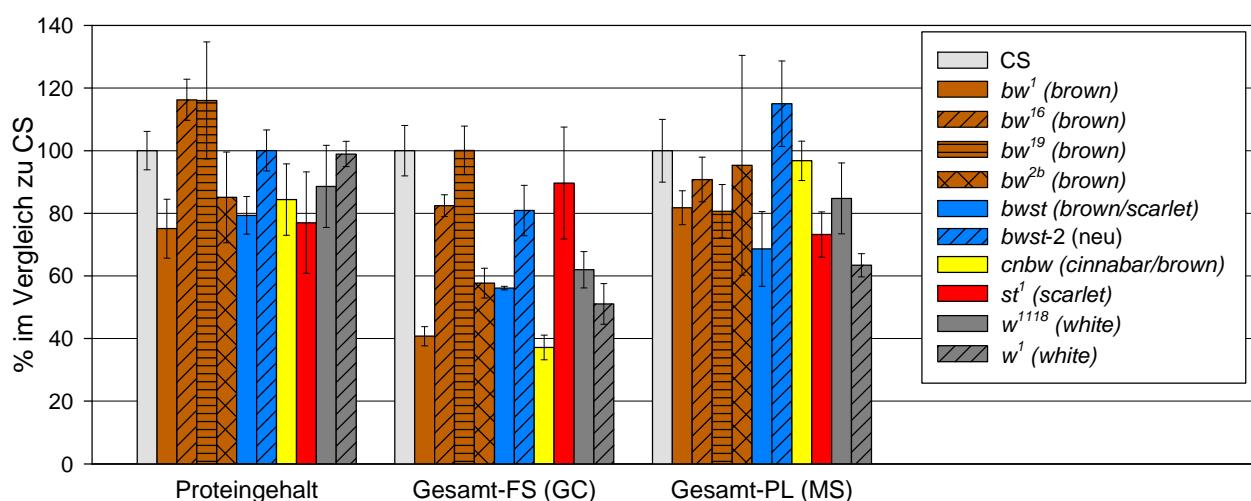


Abb. 47: Übersicht über Protein-, Fettsäure- und Phospholipidgehalt der adulten ABC-Transporter-Mutanten im Vergleich zu CS. FS: Fettsäuren; GC: Gaschromatographie; MS: Massenspektrometrie; PL: Phospholipide.

Die DC zeigt eine Reduktion der freien FS in *bw*¹, *bw*¹⁶ und *bw*^{2b}, während der Gehalt an TG in allen vier *bw*-Allelen unterschiedlich stark reduziert ist (Abb. 48 A). In *bwst*, *bwst*-2 und vor allem in *cnbw* ist der Gehalt an freien FS und TG verringert. Auch in beiden *w*-Allelen ist eine Reduktion der freien FS und der TG zu verzeichnen. Einzig in *st*¹ sind keine Unterschiede zu CS detektierbar.

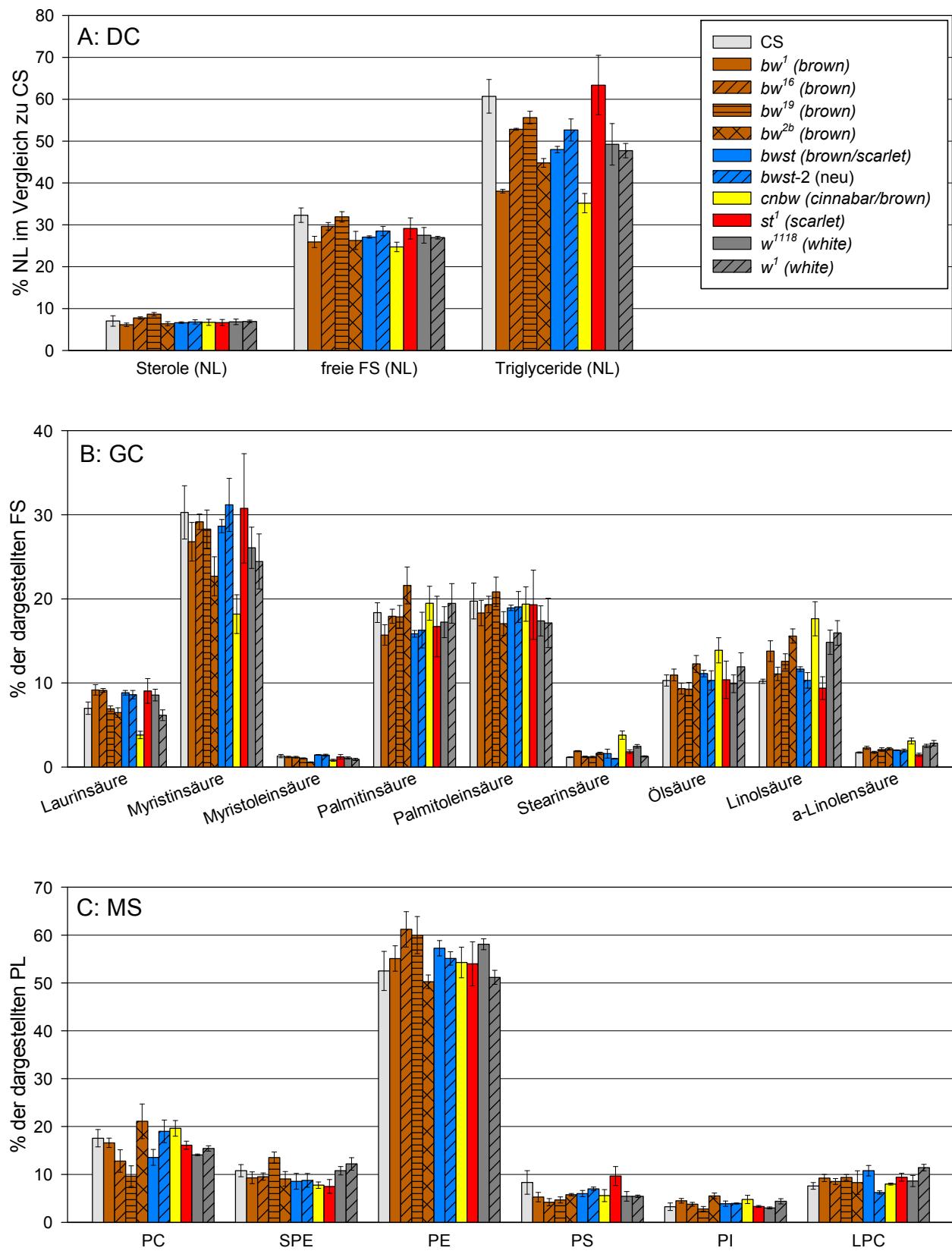


Abb. 48: Lipidanalysen der adulten ABC-Transporter-Mutanten. A: Dünnschichtchromatographie (DC), Verteilung der NL im Vergleich zu CS. B: Gaschromatographie (GC), Verteilung der FS. C: Massenspektrometrie (MS), Verteilung der PL-Spezies. Die Legende in A bezieht sich auf die gesamte Abbildung. FS: Fettsäuren; LPC: Lysophosphatidylcholin; NL: Neutrallipide; PC: Phosphatidylcholin; PE: Phosphatidylethanolamin; PG: Phosphatidylglycerol; PI: Phosphatidylinositol; PL: Phospholipide; PS: Phosphatidylserin; SPE: Sphingosylphosphoethanolamin.

In bw^1 ist Palmitinsäure reduziert, kompensiert durch eine Erhöhung von Laurin-, Stearin-, Linol- und α -Linolensäure (Abb. 48 B). In bw^{16} ist der Gehalt an Laurinsäure höher als in CS, in bw^{19} ist Linolsäure erhöht. In bw^{2b} sind Myristin- und Myristoleinsäure verringert, Palmitin-, Stearin-, Öl- und Linolsäure hingegen erhöht. In den beiden getesteten *bwst*-Stämmen sind eine Erhöhung von Laurinsäure und eine Reduktion von Palmitinsäure zu verzeichnen. Linolsäure ist hingegen nur in *bwst* etwas höher als in CS. In *cnbw* zeigt sich eine Reduktion von Laurin-, Myristin-, und Myristoleinsäure zugunsten der vier FS mit 18 C-Atomen. In *st¹* sind Laurin- und Stearinsäure geringfügig höher als in CS. In w^{1118} sind ebenfalls Laurin- und Stearinsäure erhöht, in beiden *w*-Allelen ist Myristinsäure reduziert, Linol- und α -Linolensäure hingegen sind höher als in CS. Die vier *bw*-Allele haben im Vergleich zum Wildtyp nur eine Reduktion von PS gemeinsam (Abb. 48 C). In bw^1 ist PI erhöht, in bw^{16} und bw^{19} ist PC reduziert und PE erhöht. In bw^{19} ist zusätzlich ein erhöhter Gehalt an SPE detektierbar, während in bw^{2b} eine Erhöhung von PC und PI zu verzeichnen ist. Die beiden *bwst*-Stämme unterscheiden sich im Gehalt an PC und LPC voneinander. In *cnbw* ist nur auf eine leichte Reduktion von SPE hinzuweisen, welche auch in der Mutante *st¹* auftritt. In w^{1118} ist PE erhöht, in w^1 stattdessen LPC. In beiden analysierten *w*-Allelen sind PC und PS etwas reduziert.

4.3.3 Analyse von CS, *st¹* und w^{1118} auf *instant*-Medium

Ob sich Auffälligkeiten, wie beispielsweise der reduzierte Triglycerid-Gehalt in w^{1118} , auch in Fliegen zeigen, die auf unterschiedlichen Medien gehalten werden, wurde durch Analysen adulter Männchen von w^{1118} und *st¹*, jeweils im Vergleich zu CS, auf den beiden oben genannten Futtervarianten (s. 4.2.5) überprüft. Auch die ungleiche Lipidzusammensetzung der beiden Nährmedien könnte einen Einfluss auf die Organismen haben.

Trotz des unterschiedlichen Lipidgehalts von Standardmedium und *instant*-Futter sind keine signifikanten Unterschiede in Protein, FS- und PL-Gehalt im Wildtyp CS nach Haltung auf der einen oder der anderen Futterquelle detektierbar (ohne Abbildung).

Adulte *st¹*- und w^{1118} -Männchen auf *instant*-Futter haben etwas mehr Gesamtprotein als der Wildtyp, während sie nach Aufzucht auf Standardmedium eine leichte Reduktion aufweisen (Abb. 49). Auf beiden getesteten Futtervarianten zeigt w^{1118} eine Reduktion der Fettsäuren auf 60%. In adulten *st¹*-Männchen auf Standardmedium ist der Gehalt an Gesamt-PL reduziert, während sich auf *instant*-Futter kein Unterschied zu CS feststellen lässt. In adulten w^{1118} -Fliegen auf Standardmedium ergibt sich eine leichte Verringerung der PL, auf *instant*-Futter hingegen eine Erhöhung.

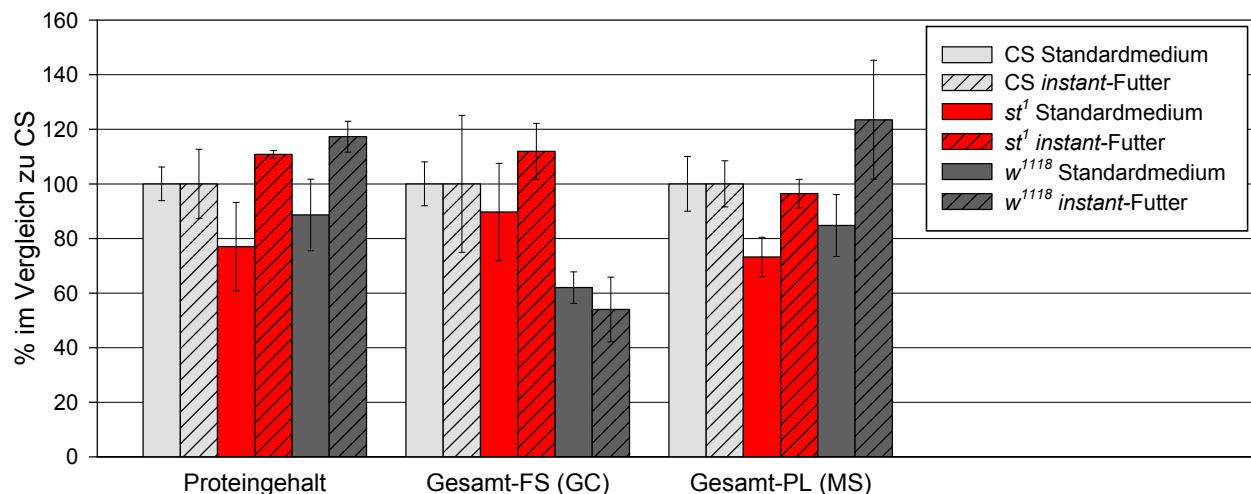


Abb. 49: Übersicht über Protein-, Fettsäure- und Phospholipidgehalt adulter Männchen von CS, *st¹* und *w¹¹¹⁸* auf Standardmedium oder instant-Futter. FS: Fettsäuren; GC: Gaschromatographie; MS: Massenspektrometrie; PL: Phospholipide.

In allen drei Genotypen sind geringfügig mehr Sterole vorhanden, wenn sie auf *instant-Futter* gehalten wurden (Abb. 50 A). *w¹¹¹⁸*-Fliegen zeigen eine Reduktion von freien FS und TG nach Haltung auf beiden Futtervarianten.

Durch die GC-Analyse konnte eine Erhöhung von Stearin-, Linol- und α -Linolensäure in *w¹¹¹⁸* auf beiden Nahrungsquellen dargestellt werden (Abb. 50 B). Ölsäure ist in allen Genotypen erhöht, wenn sie auf *instant-Futter* gehalten wurden, jedoch nur in *w¹¹¹⁸* signifikant höher als nach Aufzucht auf Standardmedium. Sowohl in CS als auch in *st¹* ist Linolsäure nach Haltung auf *instant-Futter* reduziert.

In CS und *st¹* ist PC verringert, wenn die Fliegen auf *instant-Medium* gehalten wurden (Abb. 50 C). SPE ist in diesen beiden Stämmen auf *instant-Futter* hingegen erhöht, was im Gegensatz zur Reduktion von SPE in *st¹* auf dem normalen Medium steht. Die Erhöhung von PE sowie die Verringerung von PS in *w¹¹¹⁸* sind nur nach Haltung auf Standardmedium zu beobachten. LPC ist in CS auf *instant-Futter* und in *st¹* auf beiden Futtervarianten erhöht.

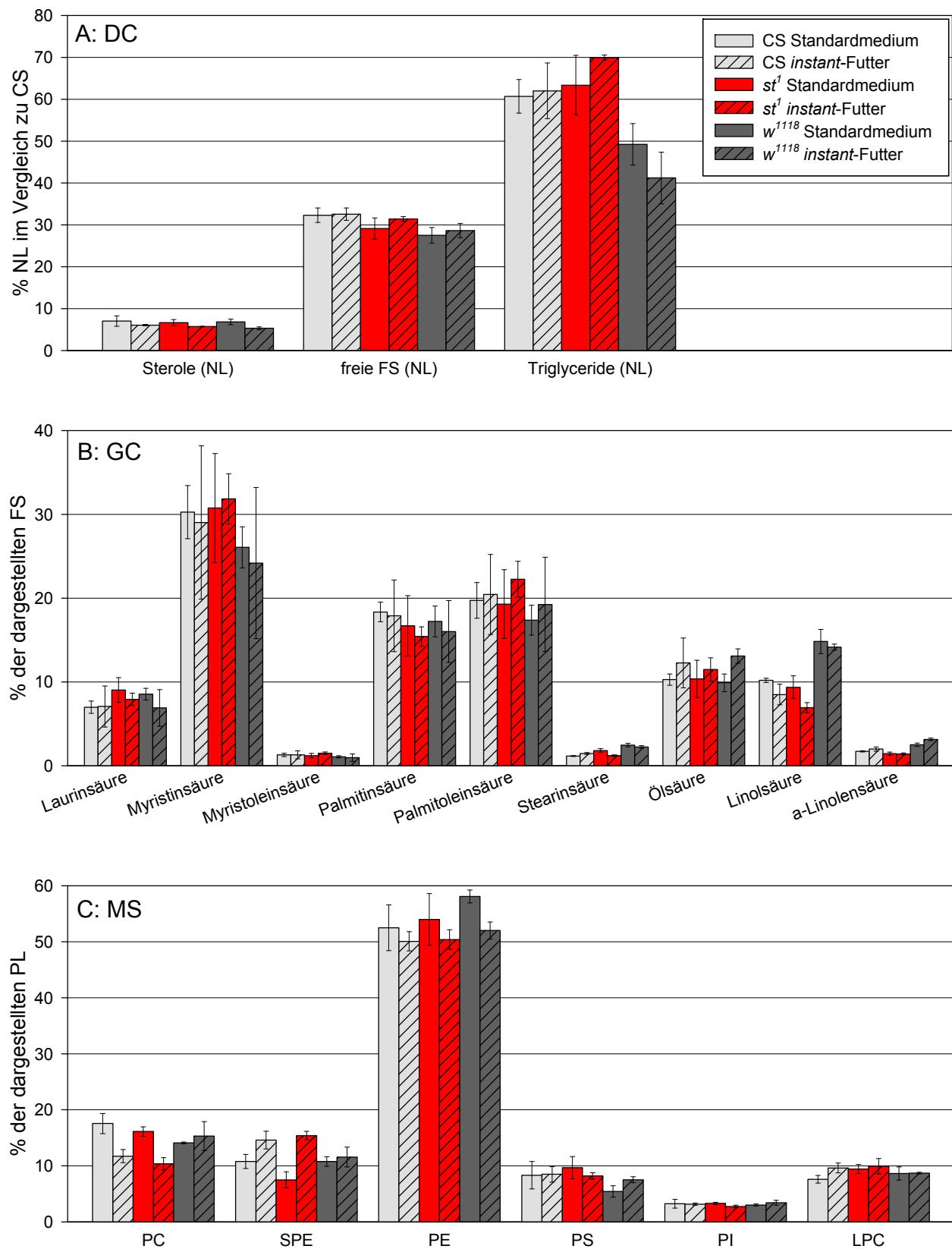


Abb. 50: Lipidanalysen adulter Männchen von CS, *st¹* und *w¹¹¹⁸* auf Standardmedium oder *instant-Futter*. A: Dünnschichtchromatographie (DC), Verteilung der NL im Vergleich zu CS. B: Gaschromatographie (GC), Verteilung der FS. C: Massenspektrometrie (MS), Verteilung der PL-Spezies. Die Legende in A bezieht sich auf die gesamte Abbildung. FS: Fettsäuren; LPC: Lysophosphatidylcholin; NL: Neutrallipide; PC: Phosphatidylcholin; PE: Phosphatidylethanolamin; PG: Phosphatidylglycerol; PI: Phosphatidylinositol; PL: Phospholipide; PS: Phosphatidylserin; SPE: Sphingosylphosphoethanolamin.

4.3.4 Rettung und Verifizierung der Lipidphänotypen

In adulten Männchen von *brown*- und *white*-Mutanten konnten vor allem durch Dünnschicht- und Gaschromatographie Unterschiede in Lipidgehalt und -zusammensetzung festgestellt werden. Nachdem jedoch insgesamt eine hohe Variabilität der Lipidwerte und unterschiedliche Effekte bei verschiedenen Allelen des gleichen Gens zu beobachten sind (s. 4.3.2), sollten die Lipidphänotypen durch Rettungsversuche mit den im Rahmen dieser Arbeit etablierten UAS-Linien (s. 4.1.2) und dem ubiquitären Treiber *da-GAL4* überprüft werden.

4.3.4.1 Der *brown*-Phänotyp

Die Mutante *bw*¹ zeichnet sich vor allem durch Reduktionen im Gehalt an Protein, Gesamt-FS, freien FS und TG in adulten Männchen aus (s. 4.3.2). Außerdem wurde eine signifikante Veränderung der FS-Verteilung beobachtet. Der *brown-Rescue* entstammte einer Kreuzung aus Männchen von +; *bw*¹; *da-GAL4* und Jungfrauen von +; *bw*¹; UAS-*brown*.

Der reduzierte Proteingehalt von *bw*¹ kann nicht gerettet werden, der wildtypische Gehalt an FS ist jedoch in +; *bw*¹; UAS-*brown*/*da-GAL4* im Gegensatz zu *bw*¹ und den beiden Kontrollen wiederhergestellt (Abb. 51). Somit ist die Reduktion der Gesamt-FS als signifikant und mutationsbezogen einzustufen. In der Gesamtmenge der PL war nur ein geringer Unterschied zwischen CS und *bw*¹ vorhanden, der sowohl im *Rescue* als auch in den Kontrollen gerettet wurde.

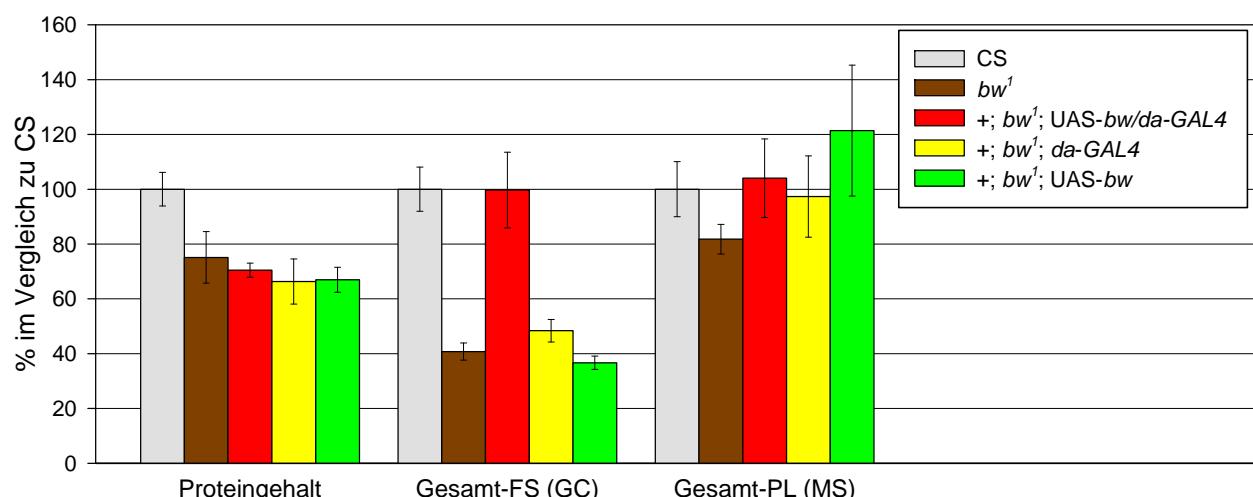


Abb. 51: Übersicht über Protein-, Fettsäure- und Phospholipidgehalt von adulten Männchen des *brown-Rescues* und der entsprechenden Kontrollen im Vergleich zu CS. FS: Fettsäuren; GC: Gaschromatographie; MS: Massenspektrometrie; PL: Phospholipide.

In der DC konnte hingegen kein *Rescue* des reduzierten Gehalts an freien FS und TG im entsprechenden Genotyp bestätigt werden (Abb. 52 A).

Bei der GC-Analyse stellte sich heraus, dass Fliegen des *brown-Rescues* den gleichen Phänotyp zeigen wie CS (Abb. 52 B). Die beiden Kontrollen +; *brown*/*da-GAL4* und +; *brown*/*UAS-brown* weichen

jedoch durch eine Reduktion von Laurin-, Myristin- und Palmitoleinsäure sowie eine Erhöhung von Palmitin- und Ölsäure stark von *bw*¹ und auch voneinander ab.

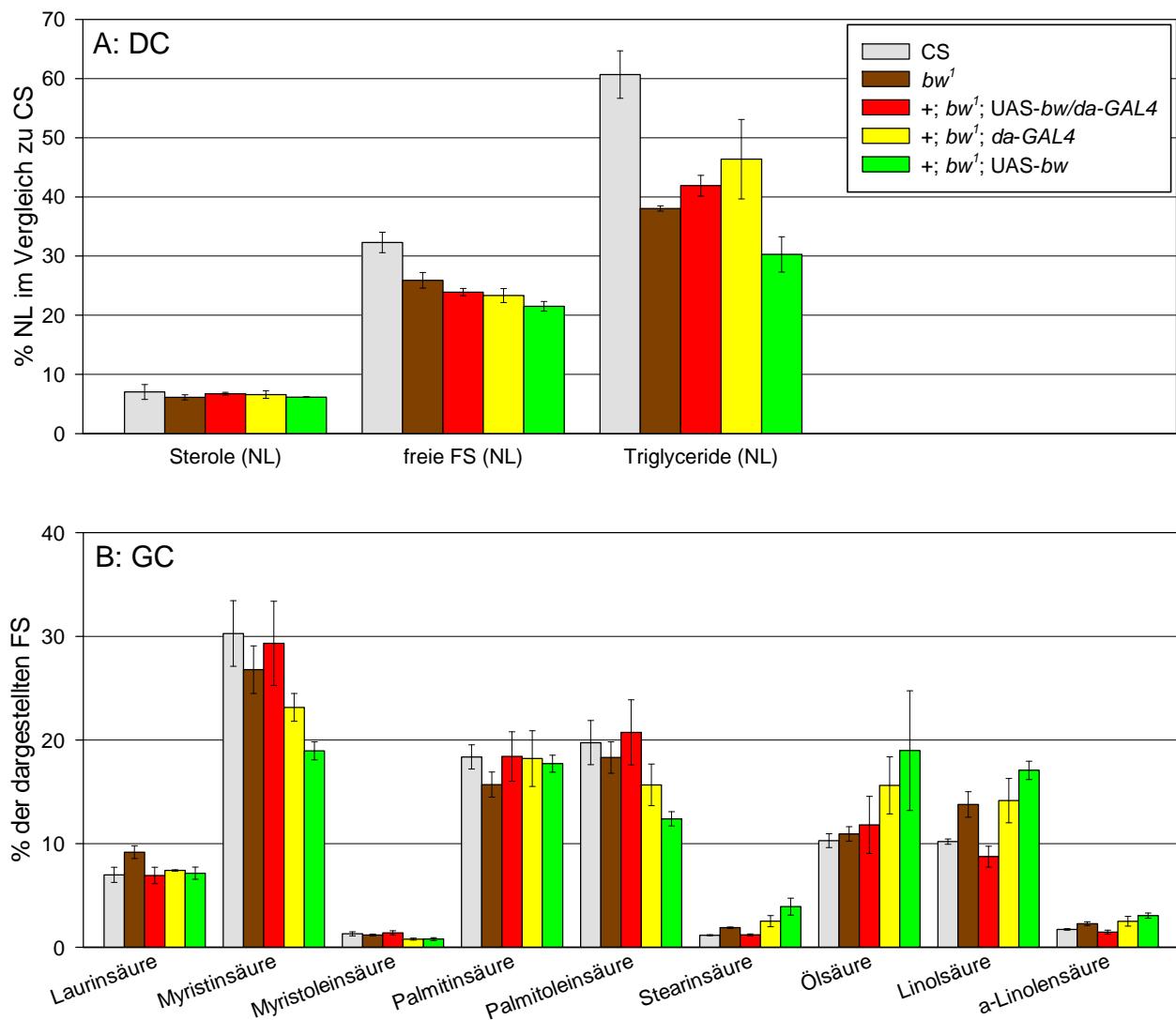


Abb. 52: Lipidanalysen adulter Männchen des *brown-Rescues* und der entsprechenden Kontrollen.
 A: Dünnschichtchromatographie (DC), Verteilung der NL im Vergleich zu CS. B: Gaschromatographie (GC), Verteilung der FS; Die Legende in A bezieht sich auf die gesamte Abbildung. FS: Fettsäuren; NL: Neutrallipide.

4.3.4.2 Der *white*-Phänotyp

Adulte *white*-Mutanten zeigen eine Reduktion der Gesamt-FS, der freien FS und der TG sowie eine Verschiebung der FS (s. 4.3.2). Der *white*-Rescue entstammte einer Kreuzung aus Männchen von *w*; UAS-*w* und Jungfrauen von *w*; *da-GAL4*. Die entsprechenden Kontrollen wurden jeweils homozygot getestet, um einen Effekt durch die Anzahl der *mini-white*-Kopien zu vermeiden. Zusätzlich zu *w*¹¹¹⁸ aus der Stammsammlung des Labors wurden zur Verifizierung des beobachteten Phänotyps mit *w*¹¹¹⁸ Nr. 3605 (*w*-3) und *w*¹¹¹⁸ Nr. 5905 (*w*-5) zwei weitere *w*¹¹¹⁸-Stämme vom Bloomington *Drosophila* Stock Center überprüft.

Der Proteingehalt kann im *Rescue* nicht gerettet werden, sondern ist in allen Stämmen, besonders in $w;; da\text{-}GAL4$ reduziert (Abb. 53). Der Gehalt an Gesamt-FS ist in diesem Genotyp höher als im *Rescue* und in der weiteren Kontrolle $w; UAS\text{-}w$, die Gesamt-PL sind stattdessen niedriger.

Im Protein- und PL-Gehalt ist kein Unterschied zwischen den drei getesteten w^{1118} -Stämmen vorhanden. Der Gehalt an Gesamt-FS ist jedoch in $w\text{-}3$ und $w\text{-}5$ noch etwas geringer als in w^{1118} .

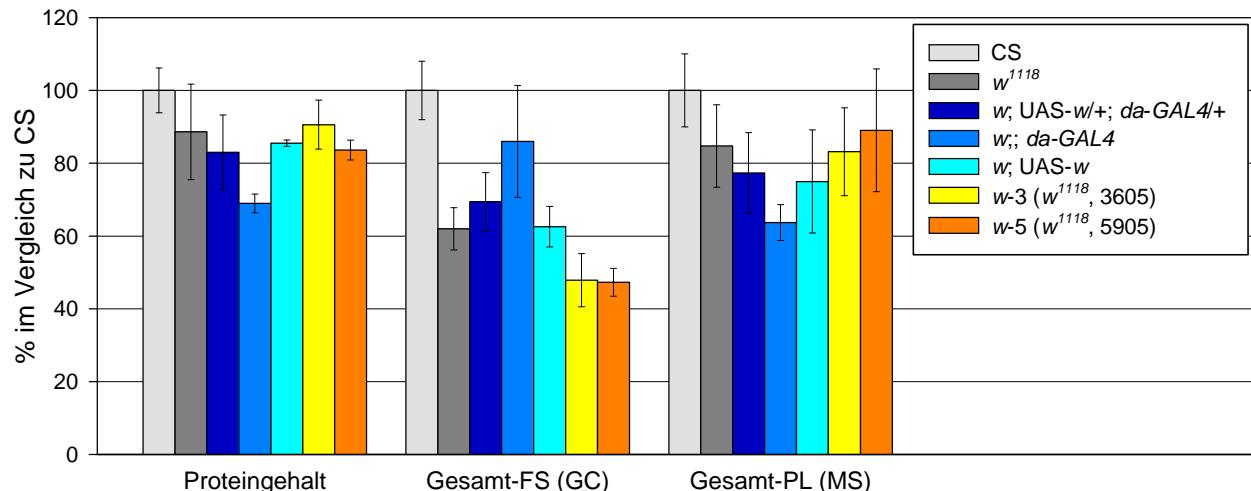


Abb. 53: Übersicht über Protein-, Fettsäure- und Phospholipidgehalt von adulten Männchen des *white-Rescues* und der entsprechenden Kontrollen im Vergleich zu CS. FS: Fettsäuren; GC: Gas-chromatographie; MS: Massenspektrometrie; PL: Phospholipide.

Auch in der DC ist keine erfolgreiche Rettung des *white*-Phänotyps zu verzeichnen (Abb. 54 A). Die freien FS sind im *Rescue* und in den Kontrollen noch weiter reduziert als in CS und w^{1118} . Die wildtypische Menge an TG ist in $w;; da\text{-}GAL4$ wiederhergestellt, jedoch nicht im *Rescue*. Die beiden neu bestellten w^{1118} -Stämme unterscheiden sich durch eine Reduktion der freien FS von w^{1118} aus der Stammsammlung. Im Gehalt an TG ist außerdem ein signifikanter Unterschied zwischen $w\text{-}3$ und $w\text{-}5$ festzustellen.

Bei der gaschromatographischen Analyse sind leichte Unterschiede detektierbar, die drei w^{1118} -Stämme zeigen aber, außer der Erhöhung von Stearinsäure in w^{1118} , das gleiche Verteilungsmuster (Abb. 54 B). Die FS im *Rescue* und in den entsprechenden Kontrollen unterscheiden sich nicht nennenswert voneinander.

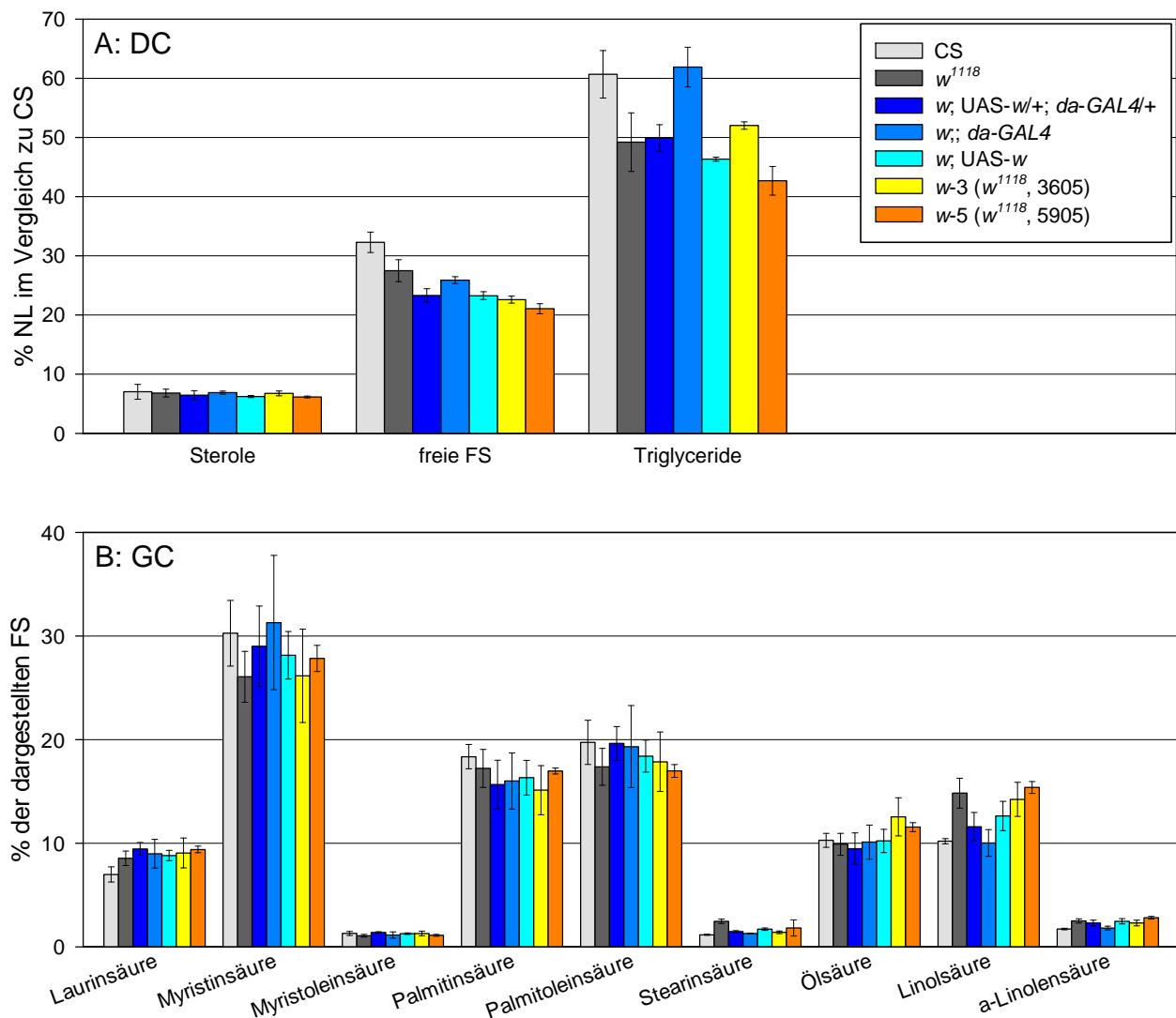


Abb. 54: Lipidanalysen adulter Männchen des *white*-Rescues und der entsprechenden Kontrollen.
 A: Dünnschichtchromatographie (DC), Verteilung der NL im Vergleich zu CS. B: Gaschromatographie (GC), Verteilung der FS. Die Legende in A bezieht sich auf die gesamte Abbildung. FS: Fettsäuren; NL: Neutrallipide.

4.3.5 Lipidphänotyp von RNAi-*white*, -*scarlet* und -*brown*

Im Rahmen dieser Arbeit wurden bereits Lipidanalysen bzw. Rescue-Experimente an *w*-, *st*- und *bw*-Mutanten durchgeführt (s. 4.3.2 und 4.3.4). Nun sollten die beobachteten Phänotypen in adulten Männchen durch einen gezielten *knock-down* bestätigt werden. Dazu standen für *white* zwei verschiedene RNAi-Linien zur Verfügung, von denen die Linie vom VDRC (R1_G2759_w) im Auge einen etwas stärkeren Phänotyp erzeugt als die Linie aus Japan (Kondo_w; s. 4.1.4). Zum besseren Vergleich mit den Mutanten sind die Ergebnisse von w^{1118} , bw^1 und st^1 erneut dargestellt. Da *w*-Mutanten eine Veränderung des Lipidgehalts zeigen, wurden alle Genotypen nicht wie üblich im *w*-Hintergrund, sondern durch Kreuzung mit Weibchen der Treiber-Linie $+; da-GAL4$ im CS-Hintergrund getestet (s. auch 4.5).

Außer einem wildtypischen Proteingehalt in w^{1118} sowie in den beiden RNAi-*w*-Stämmen und der Reduktion der Gesamt-FS in w^{1118} , die mit RNAi-*w* (VDRC) bestätigt werden kann, zeigen sich bei den RNAi-Fliegen völlig andere Ergebnisse als bei den Mutanten (Abb. 55).

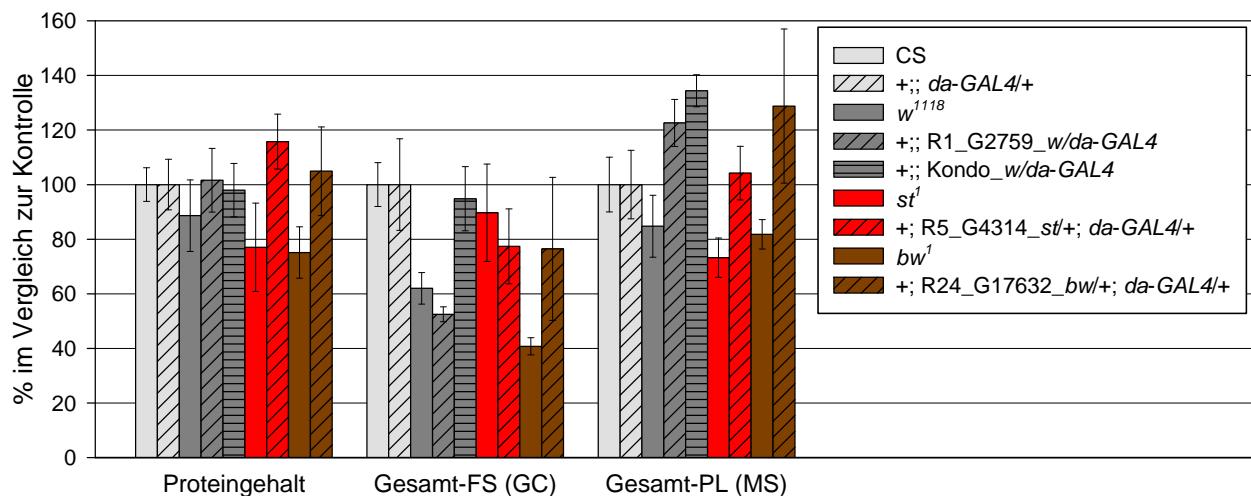


Abb. 55: Übersicht über Protein-, Fettsäure- und Phospholipidgehalt von adulten *white*-, *scarlet*- und *brown-knock-down*-Fliegen. Kontrolle: CS bzw. +; *da-GAL4*/+. FS: Fettsäuren; GC: Gaschromatographie; MS: Massenspektrometrie; PL: Phospholipide.

In RNAi-*w* (VDRC) sind, wie in w^{1118} , eine Reduktion von freien FS und TG festzustellen (Abb. 56 A), zusätzlich sind in RNAi-*w* (VDRC) die Sterole verringert. In RNAi-*bw* ist nur eine Verringerung der freien FS zu beobachten, die mit bw^1 korreliert.

Auch in der GC wird mit RNAi-*w* (VDRC) durch die Reduktion von Myristin- zugunsten von Stearin-, Linol- und α -Linolensäure ein ähnlicher Phänotyp beobachtet, wie in w^{1118} (Abb. 56 B). Zusätzlich sind in RNAi-*w* (VDRC) jedoch eine Verringerung von Laurin- und Myristoleinsäure sowie ein erhöhter Gehalt an Ölsäure zu verzeichnen. RNAi-*bw* zeigt analog zu bw^1 eine Erhöhung von Linolsäure.

Betrachtet man die Verteilung der Phospholipide, sind in RNAi-*st*, im Gegensatz zu st^1 , eine Erhöhung von SPE sowie eine Verringerung von PC zu verzeichnen (Abb. 56 C). In RNAi-*bw* sind ein höherer Gehalt an PC und PI sowie eine geringfügige Reduktion von SPE detektierbar.

Zu beachten ist dabei, dass im Auge mit beiden RNAi-*white*-Linien eine Verringerung des Pigmentgehalts festzustellen ist (s. 4.1.4), der Lipidphänotyp jedoch nur mit der Linie des VDRC erzeugt werden kann. RNAi-*bw* zeigt ebenfalls nur den Augenphänotyp, während der Lipidgehalt weder mit bw^1 noch mit einem der anderen *bw*-Allele (s. 4.3.2) übereinstimmt.

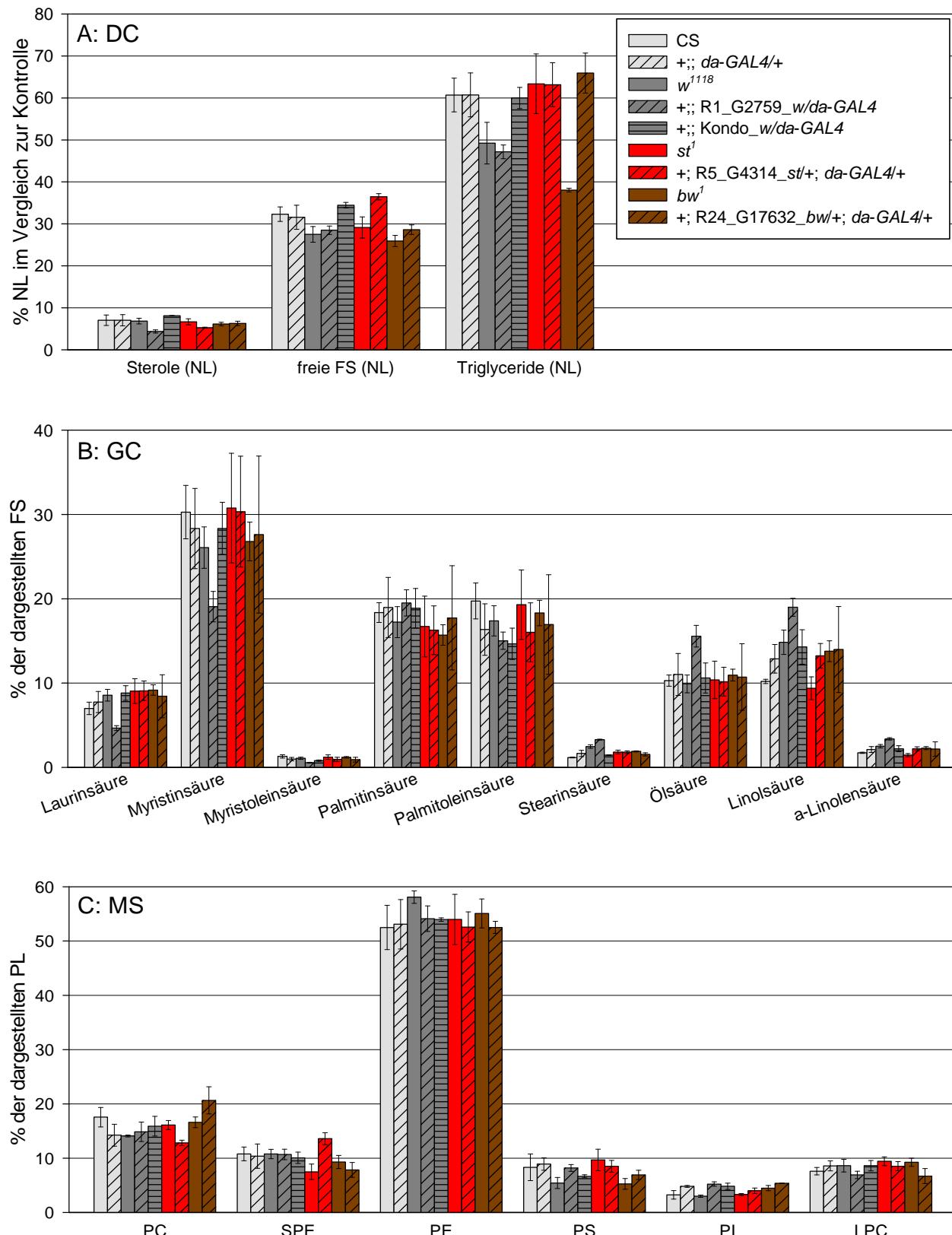


Abb. 56: Lipidanalysen von adulten white-, scarlet- und brown-knock-down-Fliegen. A: Dünn-schichtchromatographie (DC), Verteilung der NL im Vergleich zur Kontrolle. B: Gaschromatographie (GC), Verteilung der FS. C: Massenspektrometrie (MS), Verteilung der PL-Spezies. Die Legende in A bezieht sich auf die gesamte Abbildung. Kontrolle: CS bzw. +; da-GAL4/+.

FS: Fettsäuren; LPC: Lysophosphatidylcholin; NL: Neutrallipide; PC: Phosphatidylcholin; PE: Phosphatidylethanolamin; PG: Phosphatidylglycerol; PI: Phosphatidylinositol; PL: Phospholipide; PS: Phosphatidylserin; SPE: Sphingosylphosphoethanolamin.

4.4 Analyse von Augenpigmentierungsmutanten

Neben den ABC-Transportern White, Scarlet und Brown werden in der vorliegenden Dissertation verschiedene *Drosophila melanogaster* Mutanten analysiert, die im Vergleich zu wildtypischen Fliegen eine Veränderung der Augenpigmentierung zeigen. Dabei sollte durch detaillierte Lipidanalysen überprüft werden, ob ein Zusammenhang zwischen der Pigmentierung der Komplexaugen und dem Lipidmetabolismus besteht.

In die Augenpigmentierung sind Transportproteine und Enzyme involviert, aber auch zahlreiche andere Faktoren beeinflussen den Pigmentgehalt der Komplexaugen. Die im Folgenden analysierten Fliegenstämme gehören zu den Gruppen der an der Pigmentsynthese beteiligten Enzyme, der AP-3-Proteine oder der VPS- und Rab-Proteine. Als „sonstige“ werden Mutanten zusammengefasst, die keiner dieser Gruppen zugeordnet werden können.

4.4.1 Analyse von Enzym-Mutanten

Im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Enzyme sind kodiert von *vermillion* (*v*), *cinnabar* (*cn*), *karmoisin* (*kar*), *Punch* (*Pu*) und *purple* (*pr*). Die Tryptophan Oxygenase Vermilion, die Kynurenin Hydroxylase Cinnabar und die Phenoxazinon Synthetase Karmoisin sind in die Xanthommatin-Herstellung involviert, während die GTP Cyclohydrolase I Punch und die 6-PTP Synthase Purple an der Drosopterin-Synthese beteiligt sind (s. 1.2.1).

4.4.1.1 Pigmentanalysen von Enzym-Mutanten

Die entsprechenden Enzym-Mutanten *cn*¹, *kar*² und *v*¹ haben weniger Xanthommatin als CS in den Pigmentgranula der Komplexaugen (Abb. 57). In *cn*¹ und *v*¹ ist das braune Pigment, wie in *st*¹, auf 25 bis 30% verringert, in *kar*² hingegen nur auf 55%. *Pu*^{r1} und *pr*¹ zeigen stattdessen primär eine Reduktion des roten Pigments auf 10 bzw. 30%, wobei in beiden Mutanten auch Xanthommatin auf 70 bzw. 60% reduziert ist.

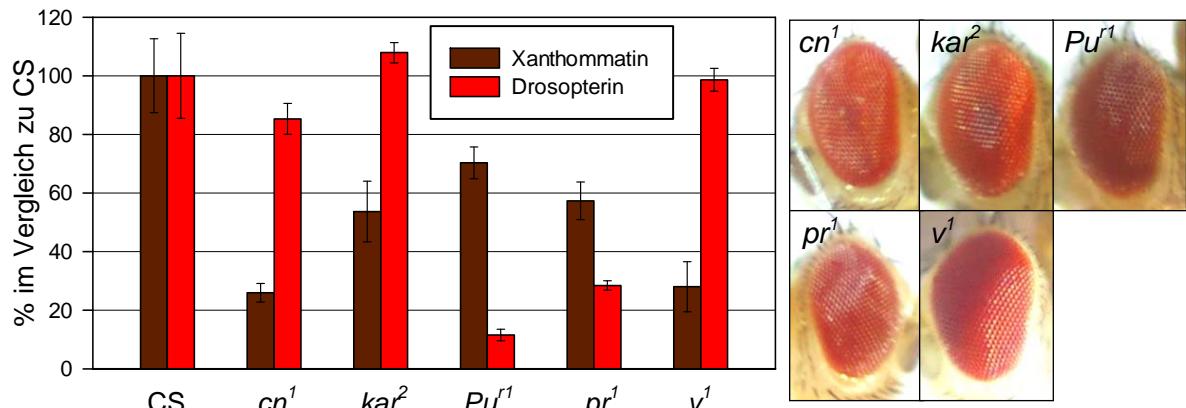


Abb. 57: Phänotyp und Pigmentgehalt der Mutanten von Enzymen, die an der Pigmentsynthese beteiligt sind. In *cn*¹, *kar*² und *v*¹ ist Xanthommatin reduziert, während *Pu*^{r1} und *pr*¹ vor allem weniger Drosopterin aufweisen.

Durch einen gezielten *knock-down* kann ein ähnlicher Phänotyp wie in den Mutanten *cn*¹ und *kar*² erreicht werden (Abb. 58). In RNAi-*cinnabar* (Linie: R2_1555_cn) ist der Xanthommatinge- halt nach Aktivierung mit *actin*- und mit *GMR-GAL4* jeweils auf 65% reduziert, im Gegensatz zu 25% in *cn*¹. In *kar*² zeigt sich eine Reduktion von Xanthommatin auf 50%, welche auch mit RNAi-*karmoisin* (Linie: R3_12286_kar) und dem ubiquitären Treiber *actin-GAL4* erreicht wird. Mit dem augenspezifischen Treiber *GMR-GAL4* lässt sich der Gehalt an braunem Pigment hin- gegen nur auf 80% verringern. Die Aktivierung von R4_CG9542 mit *actin-GAL4* hat eine leichte Erhöhung von Drosopterin zur Folge. Bei CG9542 wurde vermutet, dass es für die Kynurenin Formamidase kodiert, dann wäre jedoch eine Reduktion von Xanthommatin zu erwarten.

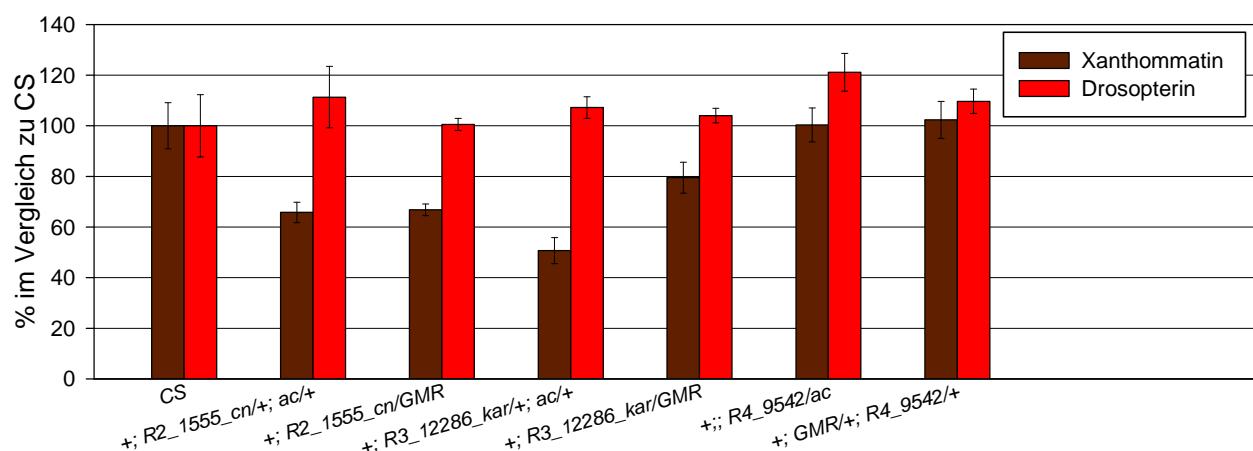


Abb. 58: Pigmentgehalt von *cinnabar*-, *karmoisin*- und CG9542-*knock-down*-Fliegen. Durch einen *knock-down* der entsprechenden Gene mit *actin*- bzw. *GMR-GAL4* kann der Pigmentgehalt der Augen reduziert werden. CG9542 kodiert möglicherweise für die Kynurenin Formamidase. ac: *actin-GAL4*; GMR: *GMR-GAL4*.

4.4.1.2 Lipidanalysen der Larven von Enzym-Mutanten

In den Darstellungen der Lipidanalysen von Enzym-Mutanten wird die Doppelmutante *cnbw*, die bereits unter 4.3.1 und 4.3.2 beschrieben wurde, zum Vergleich mit *cn¹* erneut aufgeführt.

In Larven der Mutante *Pu^{r1}* ist der Proteingehalt, verglichen mit CS, auf 70% reduziert und auch in *cnbw*, *kar²* sowie *pr^{r1}* ist eine leichte Reduktion auf 80 bis 85% zu beobachten (Abb. 59). Die Summe der FS ist nur in *cn¹* mit 62% und in *cnbw* mit 75% niedriger als in der Kontrolle, während die Gesamt-PL in *cn¹*, *kar²*, *Pu^{r1}* und *v^{r1}* nur 52 bis 62% und in *cnbw* 75% des wildtypischen Gehalts betragen.

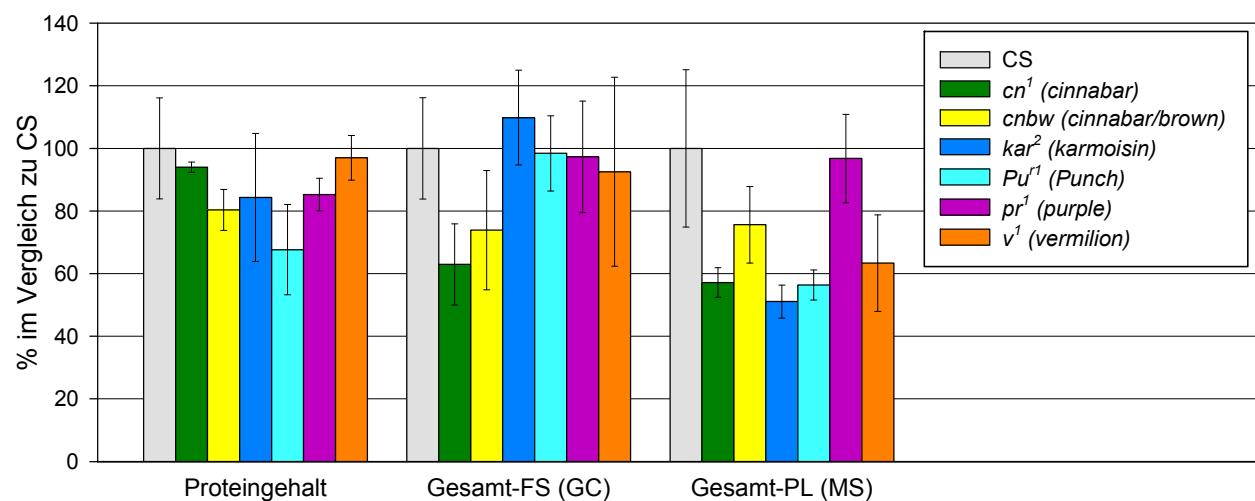


Abb. 59: Übersicht über Protein-, Fettsäure- und Phospholipidgehalt der Larven von Enzym-Mutanten im Vergleich zu CS. FS: Fettsäuren; GC: Gaschromatographie; MS: Massenspektrometrie; PL: Phospholipide.

Durch die DC wurde eine Erhöhung der TG in *kar²* und *Pu^{r1}* festgestellt, während in *v^{r1}* eine Reduktion dieser Speicherlipide zu verzeichnen ist (Abb. 60 A).

Die bei der GC detektierten Unterschiede in der Verteilung der FS sind in den meisten Fällen aufgrund von hohen Standardabweichungen nicht aussagekräftig (Abb. 60 B). In *cnbw* ist, wie bereits erwähnt, eine Verschiebung von Myristin- zu Ölsäure zu beobachten. In *kar²* sind Myristin- und Palmitoleinsäure reduziert, zugunsten von Palmitin- und Stearinsäure. In *Pu^{r1}* ist der Gehalt an Palmitoleinsäure höher als in CS und Linolsäure ist verringert. In *pr^{r1}* ist ebenfalls Linolsäure leicht reduziert.

Durch massenspektrometrische Analyse ergeben sich eine leichte Verringerung von PE in *kar²* und eine Erhöhung von SPE in *kar²* und *Pu^{r1}* sowie von PS in *kar²* (Abb. 60 C). In *cnbw* und *Pu^{r1}* ist der Gehalt an PG höher als in CS, in *Pu^{r1}* ist außerdem PC reduziert.

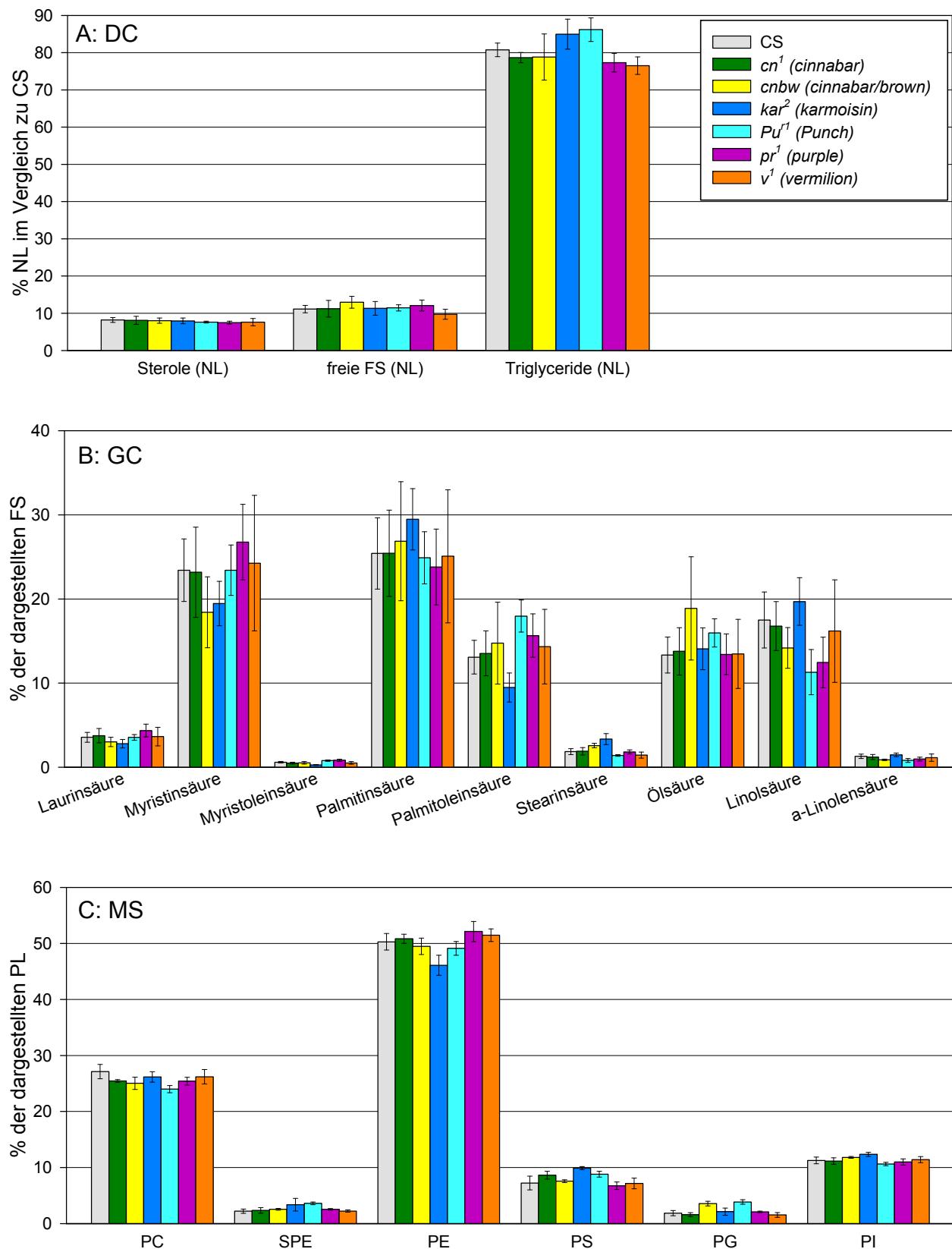


Abb. 60: Lipidanalysen der Larven von Enzym-Mutanten. A: Dünnschichtchromatographie (DC), Verteilung der NL im Vergleich zu CS. B: Gaschromatographie (GC), Verteilung der FS. C: Massenspektrometrie (MS), Verteilung der PL-Spezies. Die Legende in A bezieht sich auf die gesamte Abbildung. FS: Fettsäuren; NL: Neutrallipide; PC: Phosphatidylcholin; PE: Phosphatidylethanolamin; PG: Phosphatidylglycerol; PI: Phosphatidylinositol; PL: Phospholipide; PS: Phosphatidylserin; SPE: Sphingosylphosphatidylethanolamin.

4.4.1.3 Lipidanalysen von adulten Enzym-Mutanten

Von den untersuchten adulten Enzym-Mutanten ist der Proteingehalt im Vergleich zu CS nur in *pr*¹ nennenswert reduziert (Abb. 61). Im Gegensatz dazu zeigen alle Genotypen eine drastische Reduktion der Gesamt-FS auf 37 bis 62%. Die Phospholipide sind in *kar*² sowie in *Pu*^{r1} auf 60% und in *cn*¹ sowie in *v*¹ auf 80% reduziert.

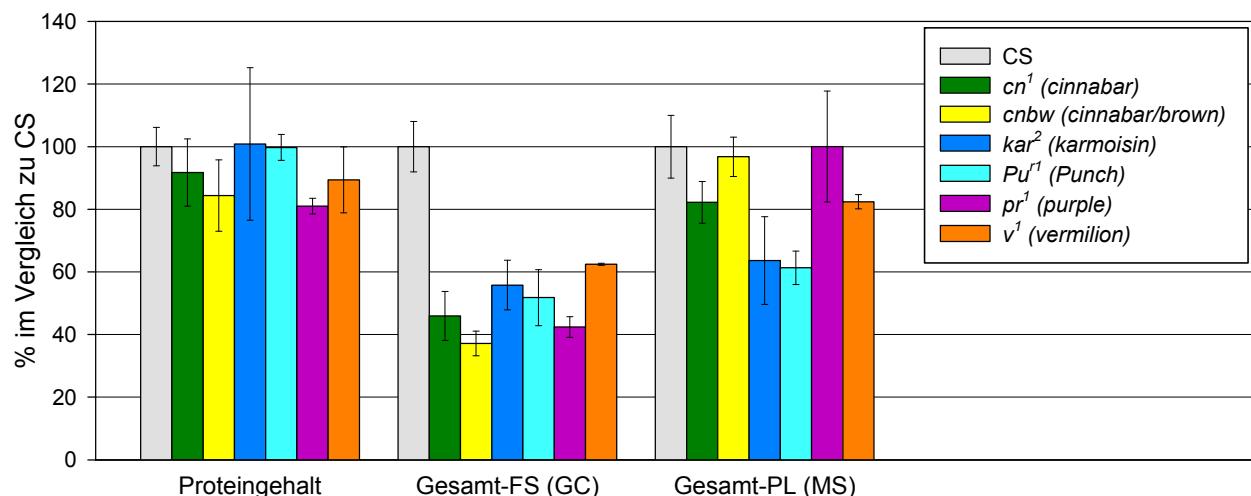


Abb. 61: Übersicht über Protein-, Fettsäure- und Phospholipidgehalt der adulten Enzym-Mutanten im Vergleich zu CS. FS: Fettsäuren; GC: Gaschromatographie; MS: Massenspektrometrie; PL: Phospholipide.

Die DC zeigt, dass im Vergleich zu CS in *cn*¹, wie in *cnbw*, freie FS und TG verringert sind (Abb. 62 A). Auch in *kar*², *Pu*^{r1} und *pr*¹ sind sowohl freie FS als auch TG reduziert. In *v*¹ sind eine Reduktion der TG und eine Erhöhung der Sterole detektierbar.

In *cn*¹ sind Myristin- und Myristoleinsäure zugunsten der vier FS mit 18 C-Atomen reduziert (Abb. 62 B). In *cnbw* ist zusätzlich eine Reduktion von Laurinsäure zu beobachten. In *kar*², *Pu*^{r1}, *pr*¹ und *v*¹ sind eine Verringerung von Myristinsäure sowie eine Erhöhung von Öl- und Linolsäure festzustellen.

Bei der MS sind eine Erhöhung von PE und eine Reduktion von PC und PS in *cn*¹ detektierbar, in *cnbw* ist hingegen der Gehalt an SPE verringert (Abb. 62 C). In *kar*² ist eine Erhöhung von LPC zu verzeichnen, in *Pu*^{r1} ist PE reduziert und LPC ist höher als in CS. In *pr*¹ ist SPE etwas verringert, in *v*¹ hingegen sind PC und PS reduziert und SPE sowie LPC erhöht.

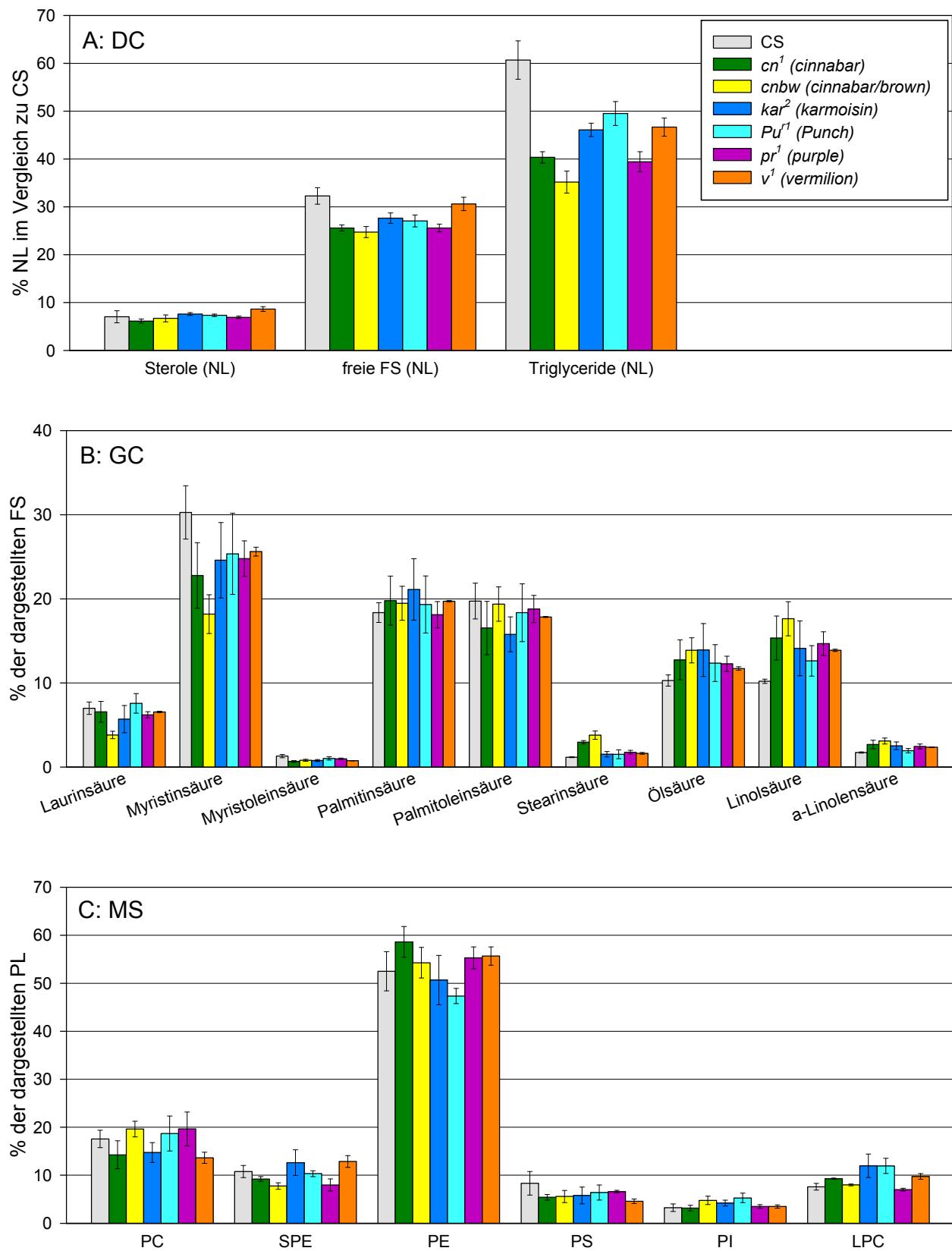


Abb. 62: Lipidanalysen der adulten Enzym-Mutanten. A: Dünnschichtchromatographie (DC), Verteilung der NL im Vergleich zu CS. B: Gaschromatographie (GC), Verteilung der FS. C: Massenspektrometrie (MS), Verteilung der PL-Spezies. Die Legende in A bezieht sich auf die gesamte Abbildung. FS: Fettsäuren; LPC: Lysophosphatidylcholin; NL: Neutrallipide; PC: Phosphatidylcholin; PE: Phosphatidylethanolamin; PG: Phosphatidylglycerol; PI: Phosphatidylinositol; PL: Phospholipide; PS: Phosphatidylserin; SPE: Sphingosylphosphoethanolamin.

4.4.1.4 Lipidphänotyp von RNAi-*cinnabar*, RNAi-*karmoisin* und RNAi-CG9542

Durch einen gezielten *knock-down* wurde untersucht, ob die in adulten Fliegen von *cn*¹ und *kar*² beobachteten Phänotypen bestätigt werden können. Zusätzlich wurde das Gen CG9542 analysiert, welches möglicherweise für das Enzym Kynurenin Formamidase kodiert.

In den Männchen ist der Proteingehalt nur in RNAi-*cn* geringfügig erhöht (Abb. 63). Mit RNAi-*cn* und RNAi-*kar* kann die in *cn*¹ und in *kar*² beobachtete Reduktion der Gesamt-FS partiell bestätigt werden. Bei den Gesamt-PL zeigen sich jedoch in den RNAi-Fliegen von den Mutanten stark abweichende Ergebnisse. CG9542 kodiert möglicherweise für die Kynurenin Formamidase. Bei einem *knock-down* dieses Gens sind eine leichte Reduktion der Gesamt-FS auf 82% sowie eine Erhöhung der PL auf 132% zu verzeichnen.

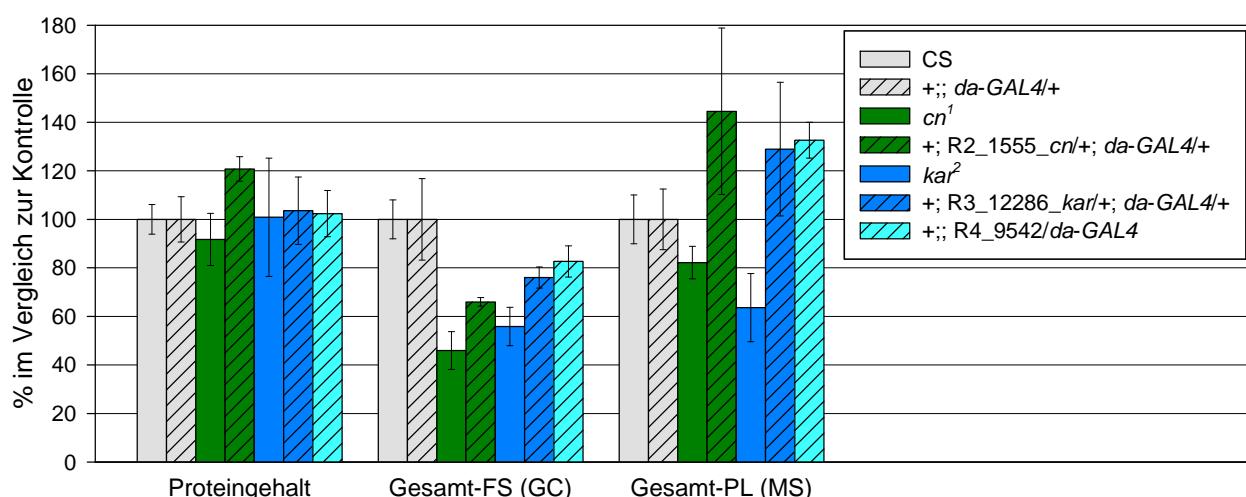


Abb. 63: Übersicht über Protein-, Fettsäure- und Phospholipidgehalt von *cinnabar*-, *karmoisin*- und CG9542-*knock-down*-Fliegen. Kontrolle: CS bzw. +; da-GAL4/+; FS: Fettsäuren; GC: Gaschromatographie; MS: Massenspektrometrie; PL: Phospholipide.

Bei der DC zeigen die Mutanten *cn*¹ und *kar*² eine Reduktion von freien FS und TG, was mit den RNAi-Fliegen nicht bestätigt werden kann (Abb. 64 A). In diesen sind stattdessen die Sterole vermindert.

Durch die GC wurden bei RNAi-*cn* und RNAi-*kar* eine Reduktion von Myristin- und ein höherer Gehalt an Linolsäure detektiert, was mit den Ergebnissen der beiden Mutanten übereinstimmt (Abb. 64 B). In +; R4_9542/da-GAL4 ist eine Reduktion von Laurin- und Myristinsäure sowie eine Erhöhung von Linolsäure festzustellen. In der Kontrolle +; da-GAL4/+ ist der Gehalt an Linolsäure signifikant höher als in CS.

Durch massenspektrometrische Analyse sind bei RNAi-*cn* und RNAi-*kar* keine Phänotypen zu beobachten, die mit den entsprechenden Mutanten korrelieren (Abb. 64 C). +; R4_9542/da-GAL4 zeigt, außer einer Reduktion von PS und LPC, die gleiche Verteilung der PL wie die Kontrolle +; da-GAL4/+.

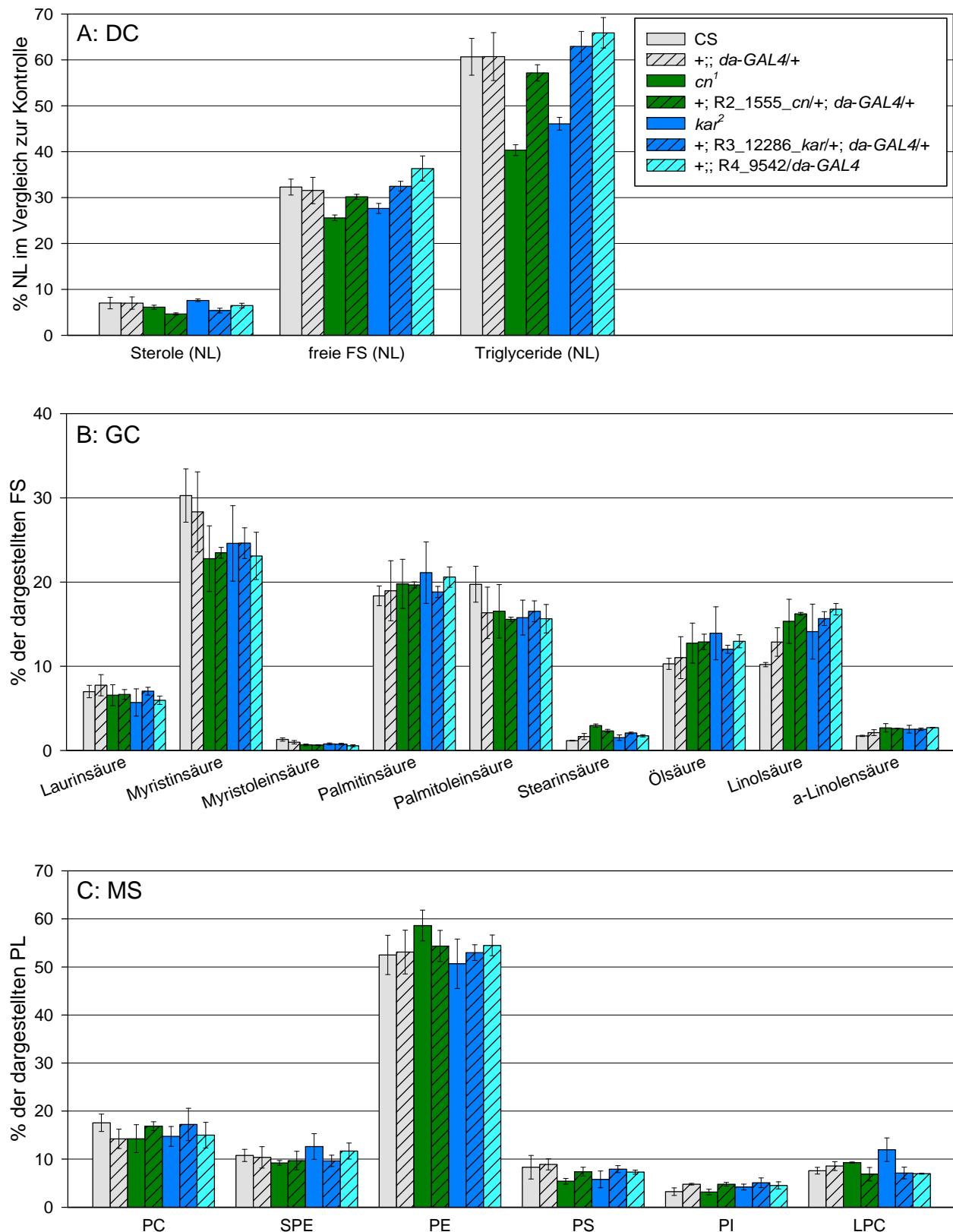


Abb. 64: Lipidanalysen von *cinnabar*-, *karmoisin*- und *CG9542*-knock-down-Fliegen. A: Dünn-schichtchromatographie (DC), Verteilung der NL im Vergleich zur Kontrolle. B: Gaschromatographie (GC), Verteilung der FS. C: Massenspektrometrie (MS), Verteilung der PL-Spezies. Die Legende in A bezieht sich auf die gesamte Abbildung. Kontrolle: CS bzw. $+; da\text{-}GAL4/+$. FS: Fettsäuren; LPC: Lysophosphatidylcholin; NL: Neutrallipide; PC: Phosphatidylcholin; PE: Phosphatidylethanolamin; PG: Phosphatidylglycerol; PI: Phosphatidylinositol; PL: Phospholipide; PS: Phosphatidylserin; SPE: Sphingosylphosphoethanolamin.

4.4.2 Analyse von AP-3-Mutanten

Der AP-3-Komplex setzt sich zusammen aus den vier Untereinheiten β , δ , μ und σ , welche von *ruby* (rb , β), *garnet* (g , δ), *carmine* (cm , μ) und *orange* (or , σ) kodiert werden (s. 1.2.3). Die entsprechenden Mutanten rb^1 , g^1 , cm^1 und or^{49h} wurden auf Pigmentgehalt sowie Auffälligkeiten in Lipidgehalt und -zusammensetzung untersucht.

4.4.2.1 Pigmentanalysen von AP-3-Mutanten

Das Fehlen jeder einzelnen Untereinheit des AP-3-Heterotetramers führt im Vergleich zum Wildtyp zu einer drastischen Reduktion des Xanthommatin- und Drosopterinengehalts (Abb. 65).

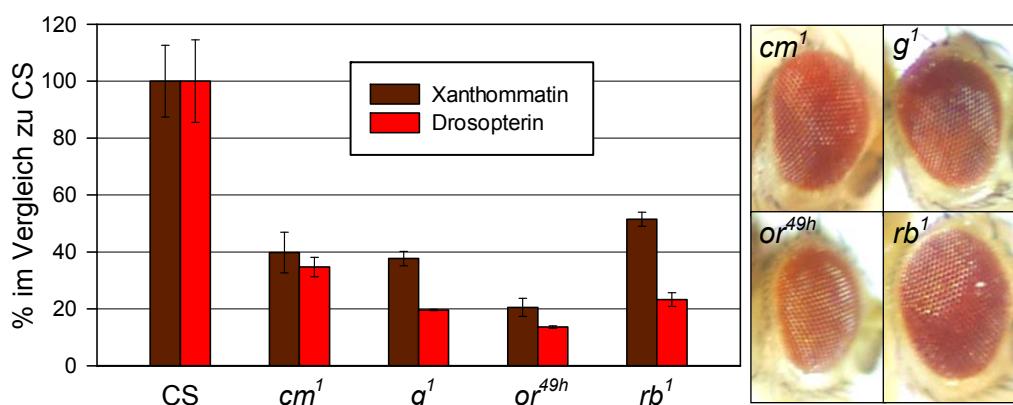


Abb. 65: Phänotyp und Pigmentgehalt der AP-3-Mutanten. Das Fehlen einer der vier Untereinheiten des AP-3-Komplexes resultiert in einer deutlich reduzierten Augenpigmentierung.

In der Mutante cm^1 sind beide Pigmente im Vergleich zu CS auf 40 bzw. 35% verringert, während in g^1 und rb^1 Drosopterin auf jeweils 20% und somit weitaus stärker reduziert ist als Xanthommatin mit 38 bzw. 52%. In or^{49h} sind sogar nur 20 bzw. 15% der Pigmente detektierbar.

4.4.2.2 Lipidanalysen der Larven von AP-3-Mutanten

Bereits im dritten Larvalstadium ist in allen vier AP-3-Mutanten eine Reduktion des Proteingehalts auf 70% zu beobachten (Abb. 66). Die Gesamt-FS sind nur in g^1 und rb^1 leicht vermindert, während die PL in g^1 und or^{49h} auf 50% des wildtypischen Gehalts reduziert sind.

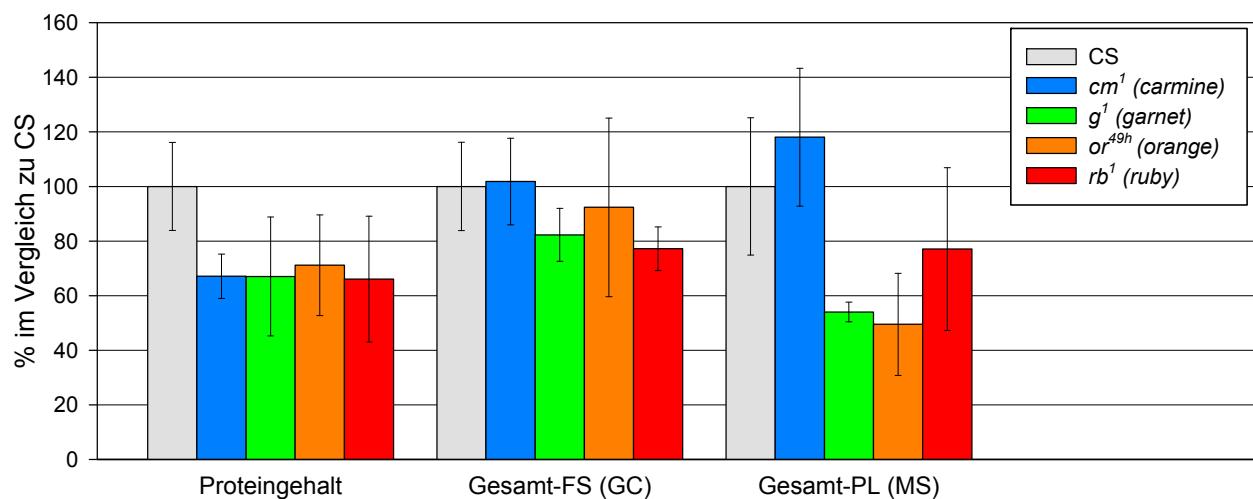


Abb. 66: Übersicht über Protein-, Fettsäure- und Phospholipidgehalt der Larven von AP-3-Mutanten im Vergleich zu CS. FS: Fettsäuren; GC: Gaschromatographie; MS: Massenspektrometrie; PL: Phospholipide.

In der DC der Larven von AP-3-Mutanten sind, außer einer geringfügigen Erhöhung der TG in g^1 , keine Unterschiede zu CS detektierbar (Abb. 67 A).

Auch bei der GC sind nur ein leicht erhöhter Gehalt an Laurinsäure und eine starke Verminderung von Linol- und α -Linolensäure in cm^1 sowie eine Erhöhung von Palmitoleinsäure in rb^1 zu beobachten (Abb. 67 B).

Bei der MS ist auf eine Reduktion von PC in or^{49h} zugunsten von SPE und PS hinzuweisen (Abb. 67 C). Letzteres ist auch in g^1 erhöht, PE stattdessen verringert.

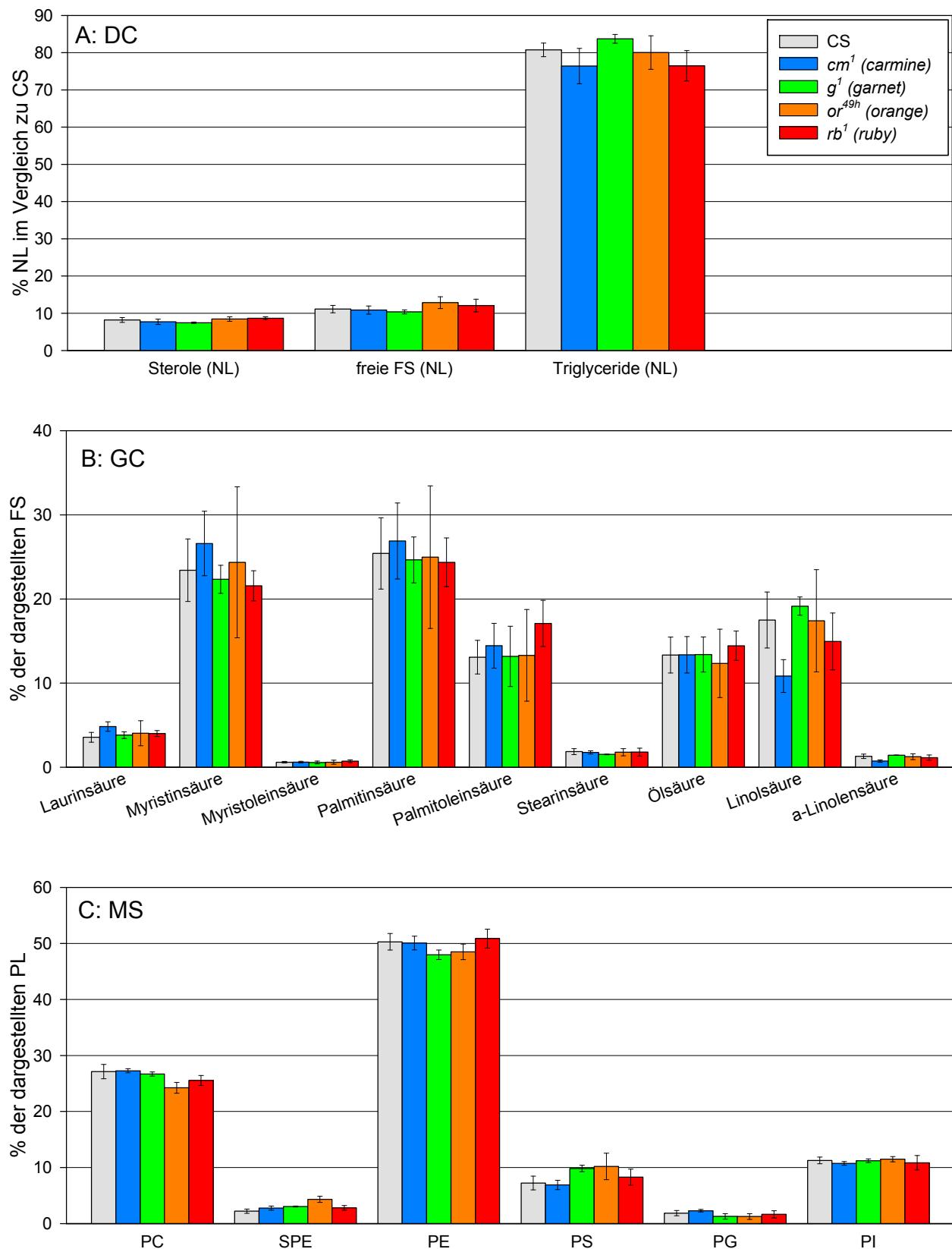


Abb. 67: Lipidanalysen der Larven von AP-3-Mutanten. A: Dünnschichtchromatographie (DC), Verteilung der NL im Vergleich zu CS. B: Gaschromatographie (GC), Verteilung der FS. C: Massenspektrometrie (MS), Verteilung der PL-Spezies. Die Legende in A bezieht sich auf die gesamte Abbildung. FS: Fettsäuren; NL: Neutrallipide; PC: Phosphatidylcholin; PE: Phosphatidylethanolamin; PG: Phosphatidylglycerol; PI: Phosphatidylinositol; PL: Phospholipide; PS: Phosphatidylserin; SPE: Sphingosylphosphoethanolamin.

4.4.2.3 Lipidanalysen von adulten AP-3-Mutanten

In adulten Fliegen von Mutanten aller vier Untereinheiten des AP-3-Heterotetramers ist der Proteingehalt im Vergleich zu CS auf 70 bis 75% reduziert (Abb. 68). Auch die Summe der Gesamt-FS ist in diesen Mutanten drastisch vermindert und beläuft sich auf 38 bis 43%. Einzig im Gehalt an Gesamt-PL unterscheiden sich die Mutanten voneinander. In cm^1 findet sich eine starke Reduktion auf 55%, in or^{49h} auf 78%, während sich g^1 und rb^1 ähnlich wie der Wildtyp CS verhalten.

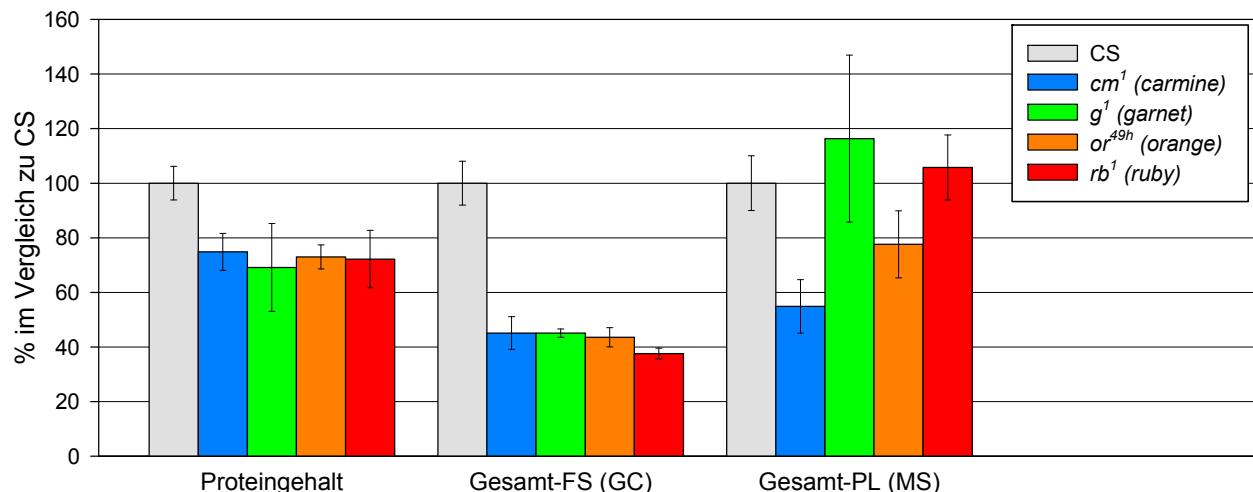


Abb. 68: Übersicht über Protein-, Fettsäure- und Phospholipidgehalt der adulten AP-3-Mutanten im Vergleich zu CS. FS: Fettsäuren; GC: Gaschromatographie; MS: Massenspektrometrie; PL: Phospholipide.

Die DC-Analyse zeigt, dass in allen vier AP-3-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp die freien Fettsäuren und insbesondere die TG reduziert sind (Abb. 69 A).

In cm^1 ist der Gehalt an Myristin-, Myristolein- und Palmitoleinsäure verringert, Stearin-, Öl- und Linolsäure sind hingegen erhöht (Abb. 69 B). In g^1 ist Myristinsäure vermindert, Stearin-, Öl-, Linol- und α -Linolensäure indessen sind höher als in CS. In der Mutante or^{49h} zeigt sich eine Erhöhung von Laurin-, Linol- und α -Linolensäure. In rb^1 ist Myristinsäure reduziert, während Öl-, Linol- und α -Linolensäure erhöht sind.

Die MS zeigt in g^1 eine starke Erhöhung von PC und eine Reduktion von SPE, verglichen mit CS (Abb. 69 C). In cm^1 und or^{49h} ist LPC erhöht, außerdem ist in or^{49h} und auch in rb^1 ein Anstieg von PE zu verzeichnen. PS ist in allen AP-3-Mutanten leicht reduziert.

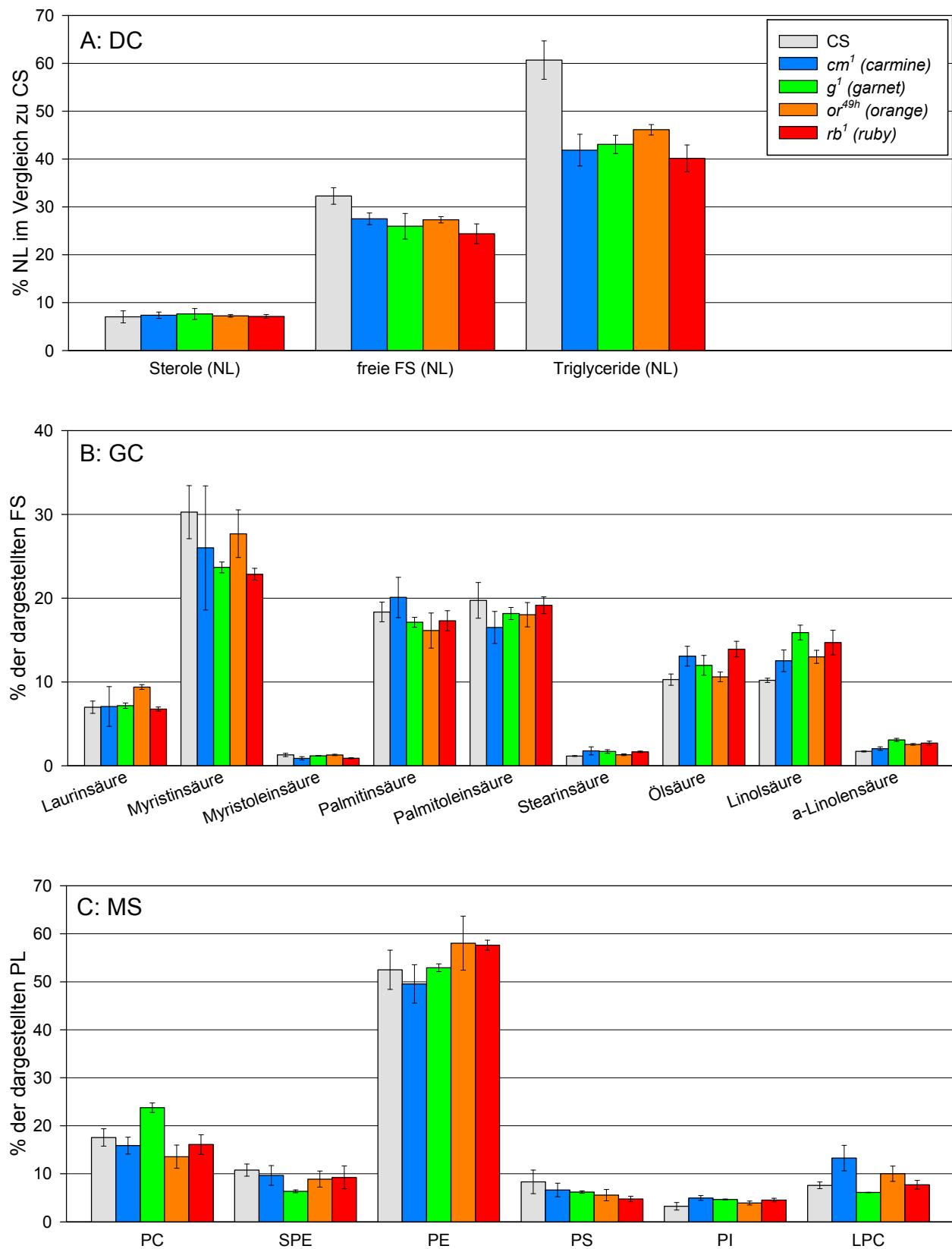


Abb. 69: Lipidanalysen der adulten AP-3-Mutanten. A: Dünnschichtchromatographie (DC), Verteilung der NL im Vergleich zu CS. B: Gaschromatographie (GC), Verteilung der FS. C: Massenspektrometrie (MS), Verteilung der PL-Spezies. Die Legende in A bezieht sich auf die gesamte Abbildung. FS: Fettsäuren; LPC: Lysophosphatidylcholin; NL: Neutrallipide; PC: Phosphatidylcholin; PE: Phosphatidylethanolamin; PG: Phosphatidylglycerol; PI: Phosphatidylinositol; PL: Phospholipide; PS: Phosphatidylserin; SPE: Sphingosylphosphoethanolamin.

4.4.3 Analyse von VPS- und Rab-Mutanten

Zu den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten VPS-Genen zählen *carnation* (*car*, VPS33), *deep orange* (*dor*, VPS18) und *light* (*lt*, VPS41; s. 1.2.4). Die Mutante *rl*¹ dient als Kontrolle, um zu überprüfen, ob die Effekte in der Doppelmutante *ltrl* (*lt*¹ *rl*¹) auf das Allel *lt*¹ zurückzuführen sind. Das Gen *rolled* kodiert für eine MAP-Kinase (*mitogen-activated protein*), die unter anderem für die Entwicklung der Photorezeptorzelle R7 benötigt wird (Biggs *et al.*, 1994). *lightoid* (*ltd*) kodiert für die Rab GTPase Rab-RP1, welche mit Claret (Ca; RCC1-GEF für Rab-RP1) interagiert (s. 1.2.4).

4.4.3.1 Pigmentanalysen von VPS- und Rab-Mutanten

In der Mutante *car*¹ sind der Xanthommatin gehalt im Vergleich zu CS auf 50% und der Drosophterin gehalt auf 15% reduziert (Abb. 70). In *dor*¹ beträgt der Gehalt beider Pigmente nur 10 bzw. 5%, verglichen mit dem Wildtyp. In *rl*¹ ist nur Drosophterin auf 70% vermindert, während der Gehalt beider Pigmente in *ltrl* weniger als 20% ausmacht. In *ltd*¹ sind Xanthommatin auf 25% und Drosophterin auf 58% verringert, in *ca*¹ beträgt der Pigmentgehalt nur 25 bzw. 20%.

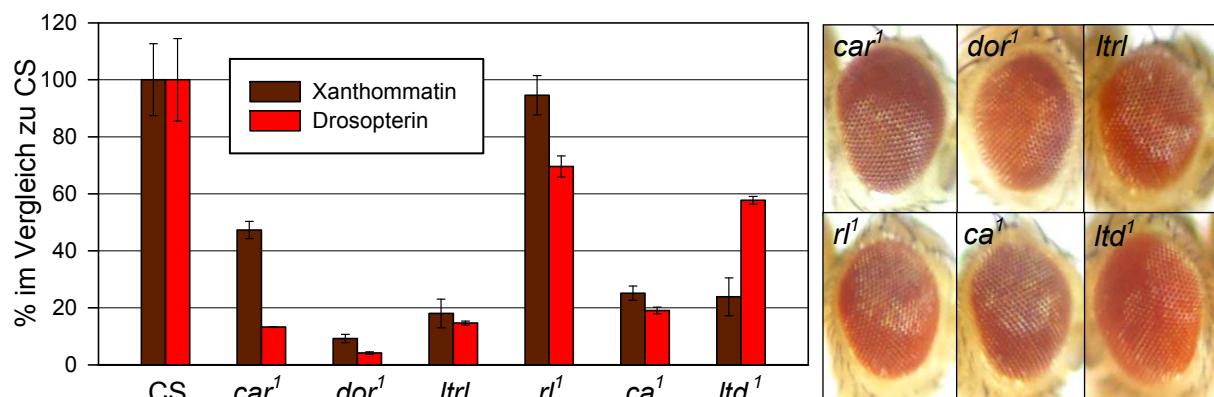


Abb. 70: Phänotyp und Pigmentgehalt von VPS- und Rab-Mutanten. Die VPS-Mutanten *car*¹, *dor*¹ und *ltrl* haben im Vergleich zu CS einen reduzierten Pigmentgehalt. Ein Fehlen eines der beiden interagierenden Proteine Ca und Ltd führt ebenfalls zu einer veränderten Augenpigmentierung. Die Mutante *rl*¹ dient als Kontrolle für *ltrl*.

4.4.3.2 Lipidanalysen der Larven von VPS- und Rab-Mutanten

In Larven der Mutanten *ca*¹ und *Itd*¹ zeigen sich Reduktionen im Proteingehalt auf 70%, verglichen mit CS (Abb. 71). In *Itd*¹ ist außerdem der Gehalt an Gesamt-FS auf 70% verringert, welcher in *dor*¹ und *ca*¹ auf 125% erhöht ist. Die Gesamt-PL hingegen sind in *dor*¹ und auch in *car*¹ auf 50% reduziert. Zwischen der Doppelmutante *Itrl*, der entsprechenden Kontrolle *rl*¹ und dem Wildtyp CS ergeben sich keine Unterschiede.

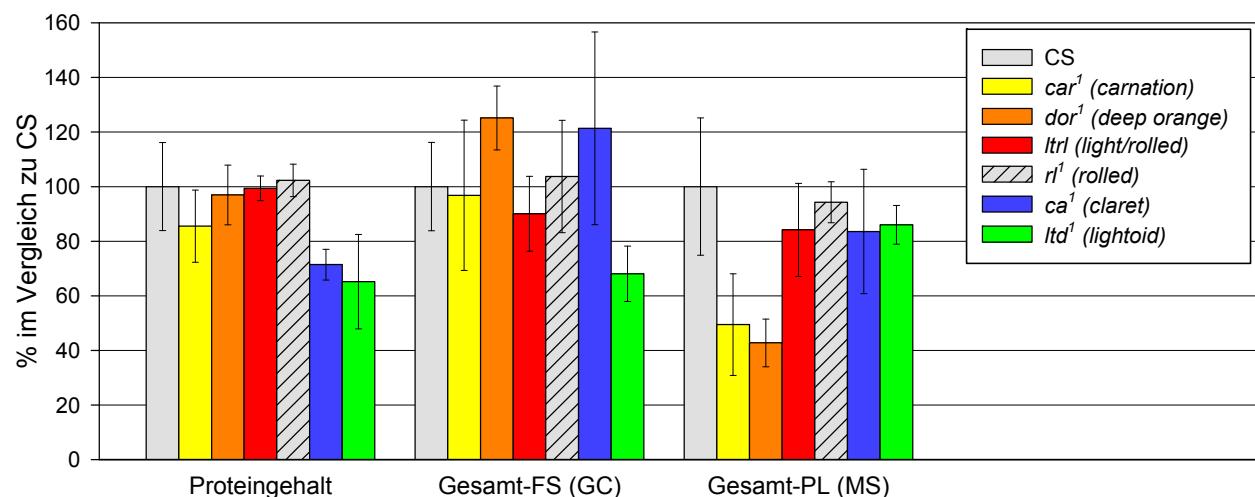


Abb. 71: Übersicht über Protein-, Fettsäure- und Phospholipidgehalt der Larven von VPS- und Rab-Mutanten im Vergleich zu CS. FS: Fettsäuren; GC: Gaschromatographie; MS: Massenspektrometrie; PL: Phospholipide.

Bei der DC sind, verglichen mit CS, in *rl*¹ und *Itrl* Erhöhungen der TG, in *Itrl* zusätzlich ein Anstieg der freien FS zu verzeichnen (Abb. 72 A). In *ca*¹ sind freie FS und TG erhöht, in *Itd*¹ sind Letztere reduziert.

Außer einer geringfügigen Erhöhung von Palmitoleinsäure in *Itd*¹, welche einhergeht mit einer Reduktion von Linol- und α -Linolensäure, sind durch gaschromatographische Analyse keine nennenswerten Verschiebungen der FS-Spezies in den Larven der VPS- und Rab-Mutanten festzustellen (Abb. 72 B).

Durch die MS kann in *car*¹ eine leichte Reduktion von PC und PE zugunsten von SPE und PS nachgewiesen werden (Abb. 72 C). In *dor*¹ ist ebenfalls PE reduziert und SPE sowie PS sind erhöht. Zwischen *Itrl*, *rl*¹ und der Kontrolle CS sind keine Unterschiede detektierbar. In *ca*¹ ist der Gehalt an PC verringert und SPE ist erhöht, während in *Itd*¹ PC und PG geringfügig reduziert sind.

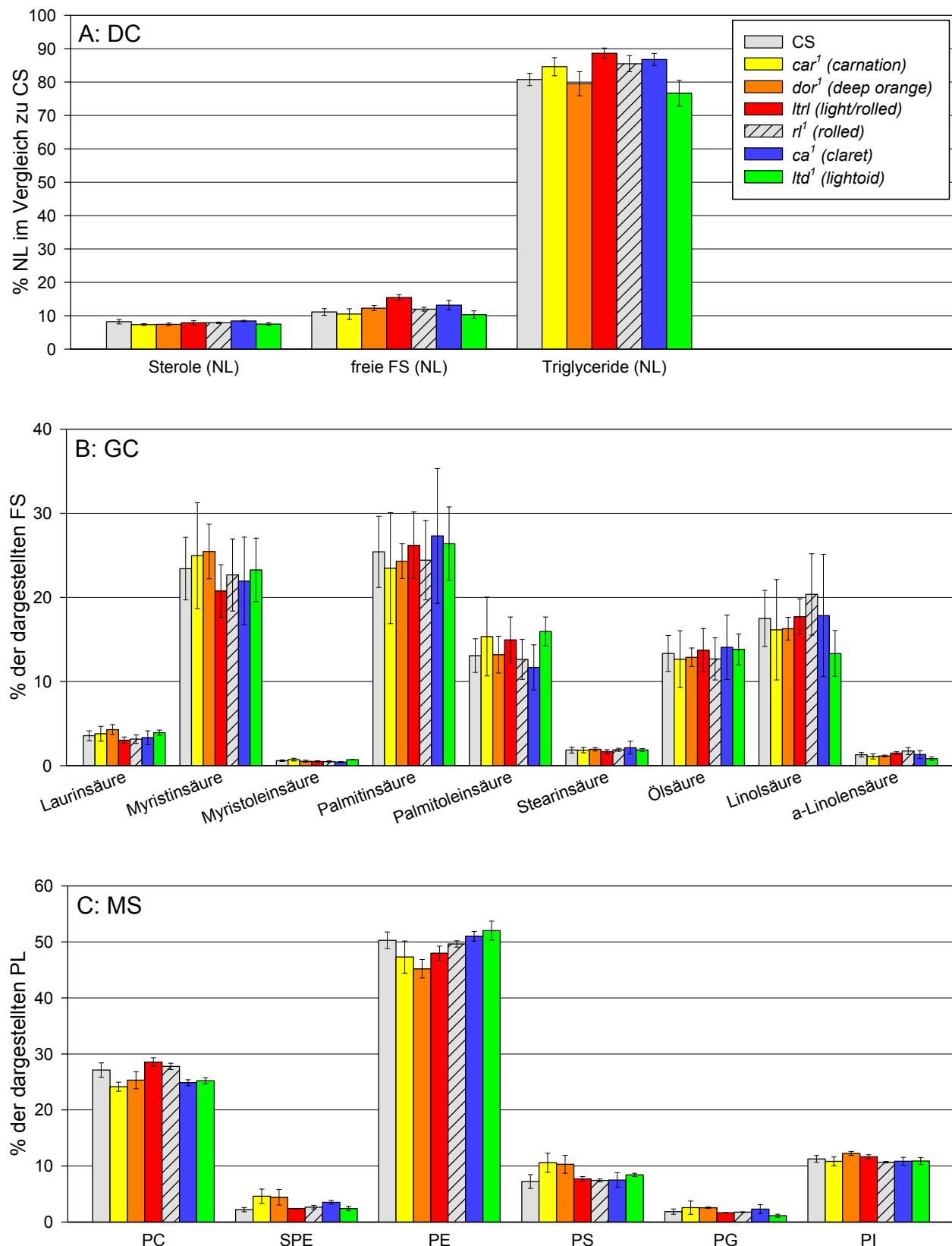


Abb. 72: Lipidanalysen der Larven von VPS- und Rab-Mutanten. A: Dünnschichtchromatographie (DC), Verteilung der NL im Vergleich zu CS. B: Gaschromatographie (GC), Verteilung der FS. C: Massenspektrometrie (MS), Verteilung der PL-Spezies. Die Legende in A bezieht sich auf die gesamte Abbildung. FS: Fettsäuren; NL: Neutrallipide; PC: Phosphatidylcholin; PE: Phosphatidylethanolamin; PG: Phosphatidylglycerol; PI: Phosphatidylinositol; PL: Phospholipide; PS: Phosphatidylserin; SPE: Sphingosylphosphatidylethanolamin.

4.4.3.3 Lipidanalysen von adulten VPS- und Rab-Mutanten

In den adulten VPS- und Rab-Mutanten sind, außer der Erhöhung auf 130% in *dor*¹ und der Reduktion auf 83% in *ca*¹, keine Unterschiede im Proteingehalt zu verzeichnen (Abb. 73). Die Gesamt-FS sind indessen, verglichen mit CS, in allen getesteten Mutanten auf 30 bis 60% reduziert. Die Gesamt-PL sind in *car*¹ und in *ca*¹ verringert, während sie in *ltr*¹ und in *dor*¹ geringfügig, in *rl*¹ hingegen stark erhöht sind.

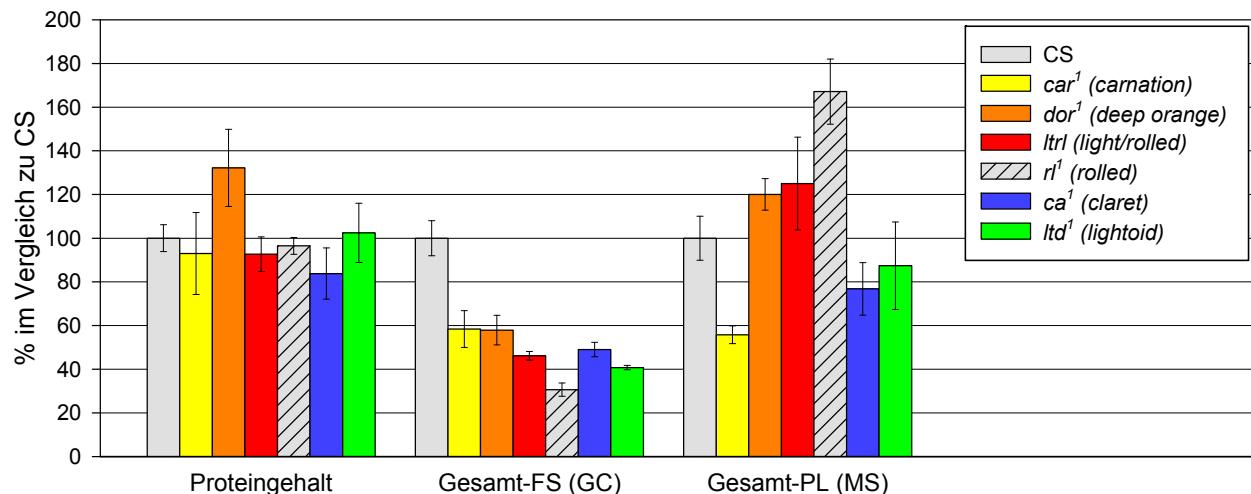


Abb. 73: Übersicht über Protein-, Fettsäure- und Phospholipidgehalt der adulten VPS- und Rab-Mutanten im Vergleich zu CS. FS: Fettsäuren; GC: Gaschromatographie; MS: Massenspektrometrie; PL: Phospholipide.

Bei der DC ist eine unterschiedlich starke Reduktion der freien FS in allen Mutanten, außer in *dor*¹, zu beobachten (Abb. 74 A). In *dor*¹ sind die Sterole etwas erhöht. Im Vergleich zu CS sind in *dor*¹, *ltr*¹, *ca*¹, *lta*¹ und insbesondere in *rl*¹ die Triglyceride reduziert.

Die gaschromatographische Analyse ergibt in allen Mutanten eine Verschiebung der FS in den längerkettigen ungesättigten Bereich (Abb. 74 B). In *car*¹ sind Laurin-, Myristin- und Myristoleinsäure reduziert, Stearin-, Öl- und Linolsäure erhöht. Die Mutante *dor*¹ zeigt eine Reduktion von Myristin- und Palmitinsäure, während eine Erhöhung von Öl-, Linol- und α -Linolensäure vorliegt. In *ltr*¹, *rl*¹ und auch in *lta*¹ sind Myristin-, Myristolein- und Palmitoleinsäure vermindert und Öl- sowie Linolsäure erhöht. Zusätzlich ist in *ltr*¹ und *rl*¹ α -Linolensäure höher als in CS und in *rl*¹ ist eine Erhöhung von Stearinäure zu verzeichnen. In *ca*¹ sind Laurin-, Myristin- und Myristoleinsäure schwächer vertreten als in der Kontrolle, zugunsten von Öl-, Linol- und α -Linolensäure.

Bei der MS zeigt sich in *car*¹ eine Reduktion von PC und PS, während eine Erhöhung von SPE, PI und LPC vorliegt (Abb. 74 C). In *dor*¹ sind PC und PS verringert, PE ist hingegen erhöht. So-wohl in *ltr*¹ als auch in *rl*¹ ist SPE vermindert und PE etwas höher als in CS. PC ist nur in *rl*¹ leicht erhöht, LPC hingegen reduziert. In *ca*¹ ist der Gehalt an PC und PS geringer und LPC ist stärker vertreten als in CS. *lta*¹ weist einen reduzierten Gehalt an PC und PS sowie eine Erhöhung von LPC auf.

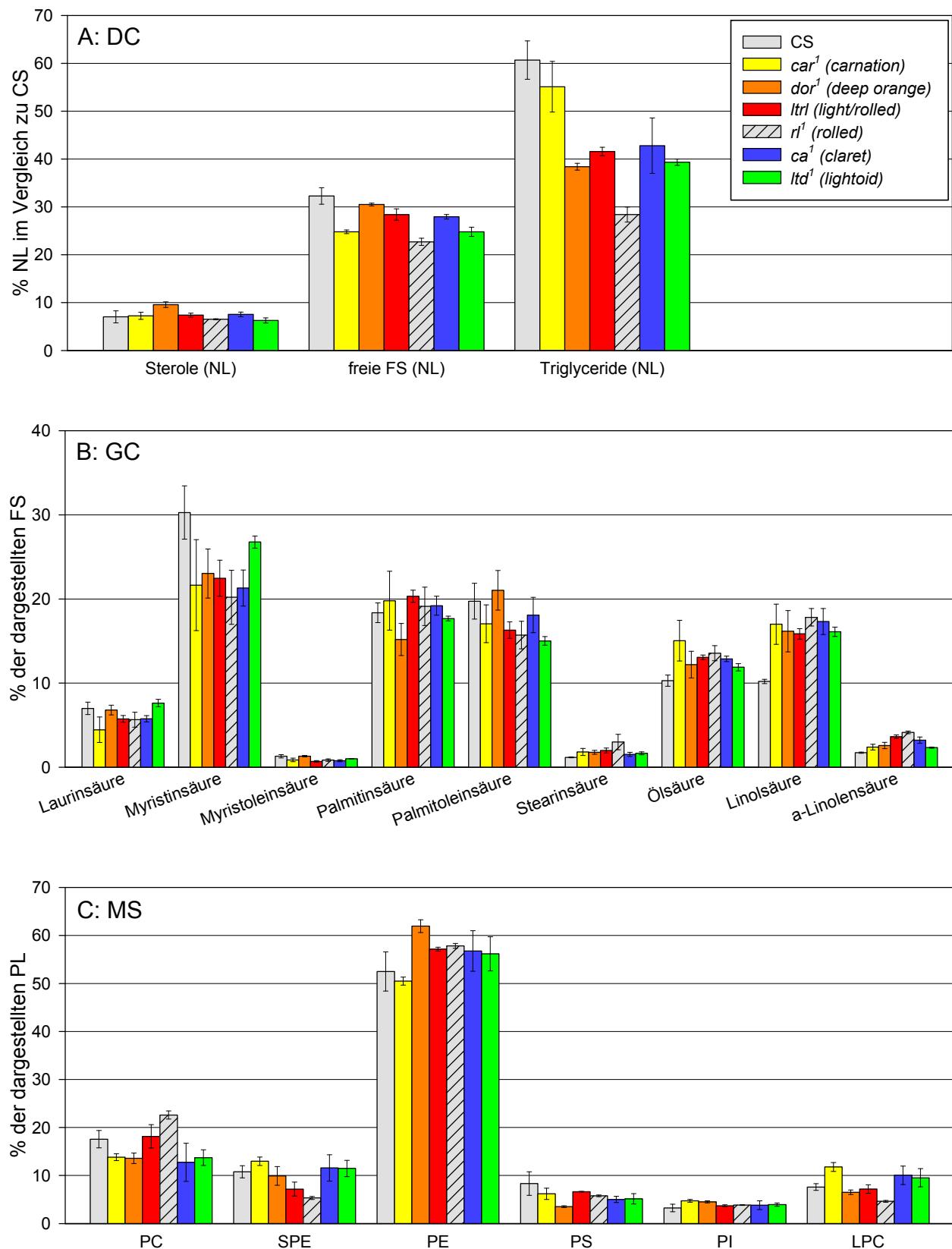


Abb. 74: Lipidanalysen der adulten VPS- und Rab-Mutanten. A: Dünnschichtchromatographie (DC), Verteilung der NL im Vergleich zu CS. B: Gaschromatographie (GC), Verteilung der FS. C: Massenspektrometrie (MS), Verteilung der PL-Spezies. Die Legende in A bezieht sich auf die gesamte Abbildung. FS: Fettsäuren; LPC: Lysophosphatidylcholin; NL: Neutrallipide; PC: Phosphatidylcholin; PE: Phosphatidylethanolamin; PG: Phosphatidylglycerol; PI: Phosphatidylinositol; PL: Phospholipide; PS: Phosphatidylserin; SPE: Sphingosylphosphoethanolamin.

4.4.4 Analyse von sonstigen Mutanten

Zu den „sonstigen“ Mutanten zählen der Genlocus *cardinal* (*cd*), welcher möglicherweise zusammen mit *kar* für die Phenoxazinon Synthetase kodiert (Sullivan *et al.*, 1974), das Gen *pink* (*p*), welches als *Drosophila* Homolog für die humane BLOC-2 Untereinheit HPS5 beschrieben wurde, sowie *pale ocelli* (*po*), *purpleoid* (*pd*) und *zeste* (*z*). Von diesen fünf Genen sind *cd*, *po* und *pd* noch nicht annotiert (s. 1.2.5).

4.4.4.1 Pigmentanalysen von sonstigen Mutanten

In der Mutante *cd*¹ ist, ähnlich wie in *kar*² (s. 4.4.1.1), nur der Xanthommatin gehalt beeinflusst und auf 40% reduziert (Abb. 75). Auch in *po*² und *z*^{a693} ist nur das braune Pigment betroffen und in beiden Fällen auf 70 bis 75% verringert, was jedoch phänotypisch nicht vom Wildtyp zu unterscheiden ist. In *p*¹ machen Xanthommatin und Drosopterin 35 bis 40% aus, während in *pd*¹ Erstere auf 50% und Letzteres auf 20% reduziert ist.

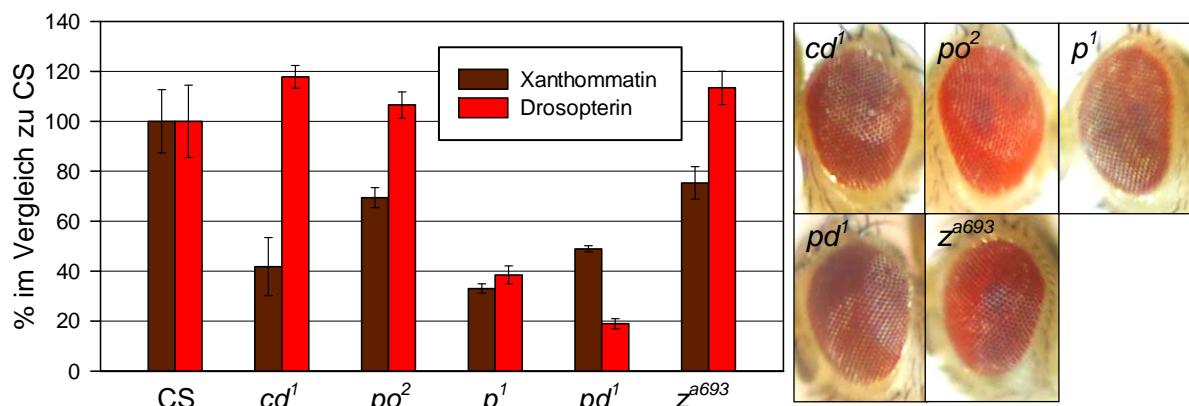


Abb. 75: Phänotyp und Pigmentgehalt von Augenpigmentierungsmutanten, die keiner der anderen Gruppen zugeordnet werden können. In *cd*¹, *po*² und *z*^{a693} ist nur der Gehalt an Xanthommatin reduziert, während in *p*¹ und *pd*¹ beide Pigmente vermindert sind.

4.4.4.2 Lipidanalysen von Larven der sonstigen Mutanten

Im Proteingehalt ergeben sich in Larven der entsprechenden Mutanten keine nennenswerten Unterschiede zu CS (Abb. 76). Die Gesamt-FS sind in *cd¹* auf 132%, in *p¹* auf 140% und in *z^{a693}* auf 147% erhöht. Die PL hingegen sind in *cd¹* auf 63%, in *po²* auf 50%, in *pd¹* auf 70% und in *z^{a693}* auf 80% reduziert.

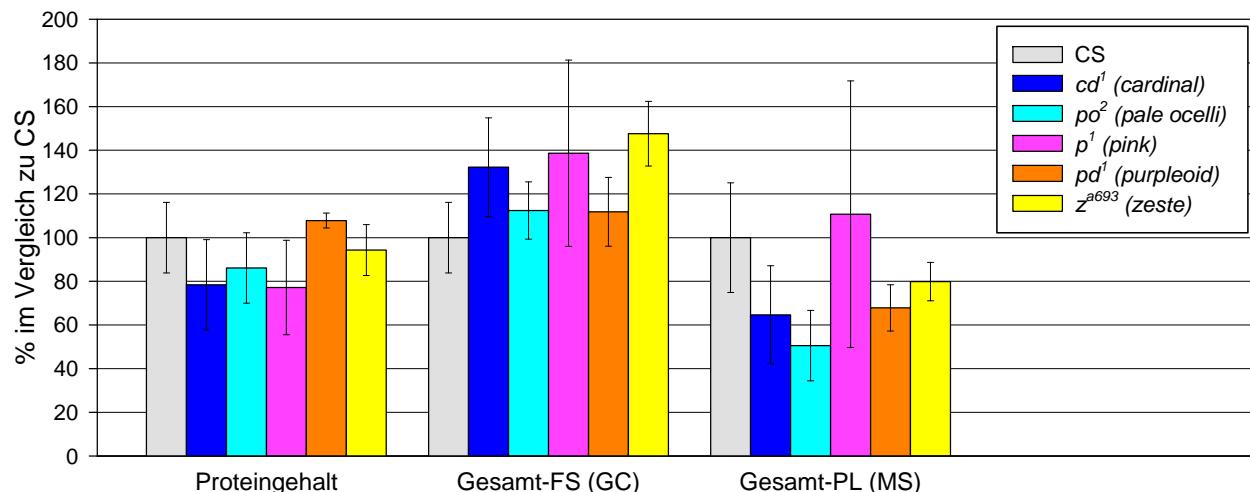


Abb. 76: Übersicht über Protein-, Fettsäure- und Phospholipidgehalt der Larven von sonstigen Mutanten im Vergleich zu CS. FS: Fettsäuren; GC: Gaschromatographie; MS: Massenspektrometrie; PL: Phospholipide.

Durch dünnenschichtchromatographische Analyse zeigt sich im Vergleich zu CS eine Erhöhung der freien FS in *cd¹* (Abb. 77 A). Außerdem sind in allen analysierten Mutanten die TG geringfügig erhöht, die Sterole sind nur in *pd¹* etwas reduziert.

Die deutlichsten Unterschiede, die durch die GC festgestellt werden konnten, sind eine Erhöhung von Palmitoleinsäure sowie eine Reduktion von Linol- und α -Linolensäure in *cd¹* und *p¹* (Abb. 77 B).

Mit der MS wurde in *cd¹* eine Verringerung von PE, kompensiert durch höhere Anteile an SPE und PG, detektiert (Abb. 77 C). Dasselbe gilt auch für *po²*, in dieser Mutante wurde jedoch zusätzlich eine geringfügige Erhöhung von PS festgestellt. In *p¹* und *z^{a693}* ist PG erhöht.

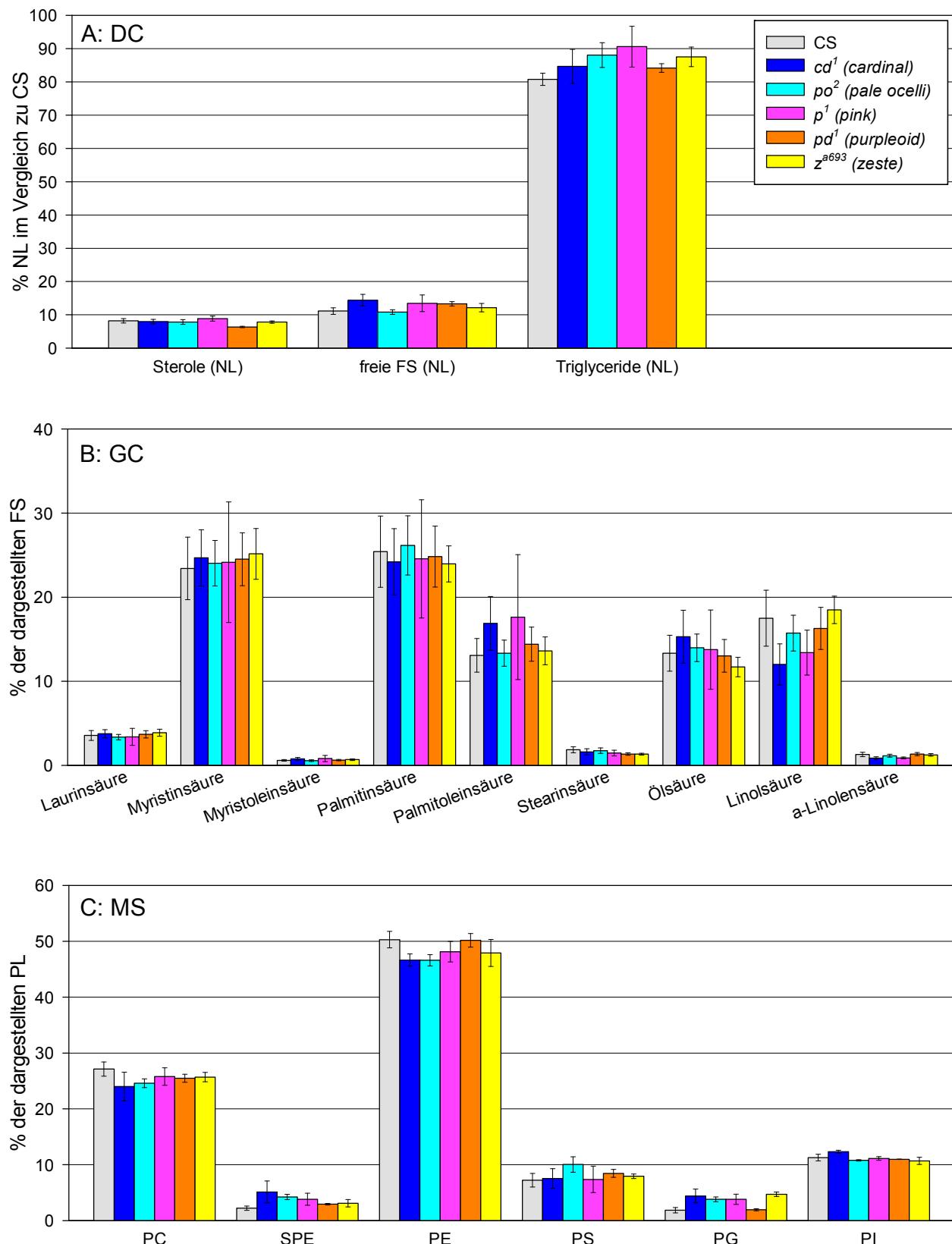


Abb. 77: Lipidanalysen der Larven von sonstigen Mutanten. A: Dünnschichtchromatographie (DC), Verteilung der NL im Vergleich zu CS. B: Gaschromatographie (GC), Verteilung der FS. C: Massenspektrometrie (MS), Verteilung der PL-Spezies. Die Legende in A bezieht sich auf die gesamte Abbildung. FS: Fettsäuren; NL: Neutrallipide; PC: Phosphatidylcholin; PE: Phosphatidylethanolamin; PG: Phosphatidylglycerol; PI: Phosphatidylinositol; PL: Phospholipide; PS: Phosphatidylserin; SPE: Sphingosylphosphatidylethanolamin.

4.4.4.3 Lipidanalysen der adulten sonstigen Mutanten

Auch in den adulten sonstigen Mutanten können keine bemerkenswerten Unterschiede zu CS im Proteingehalt festgestellt werden (Abb. 78). Die Gesamt-FS sind in *po²* und *pd¹* auf 42 bzw. 45% und in *cd¹*, *p¹* sowie *z^{a693}* auf 75 bis 85% reduziert. Bei den Gesamt-PL ergibt sich eine Erhöhung auf 120% in *pd¹*, in den anderen vier Mutanten hingegen eine Reduktion auf 73 bis 80%.

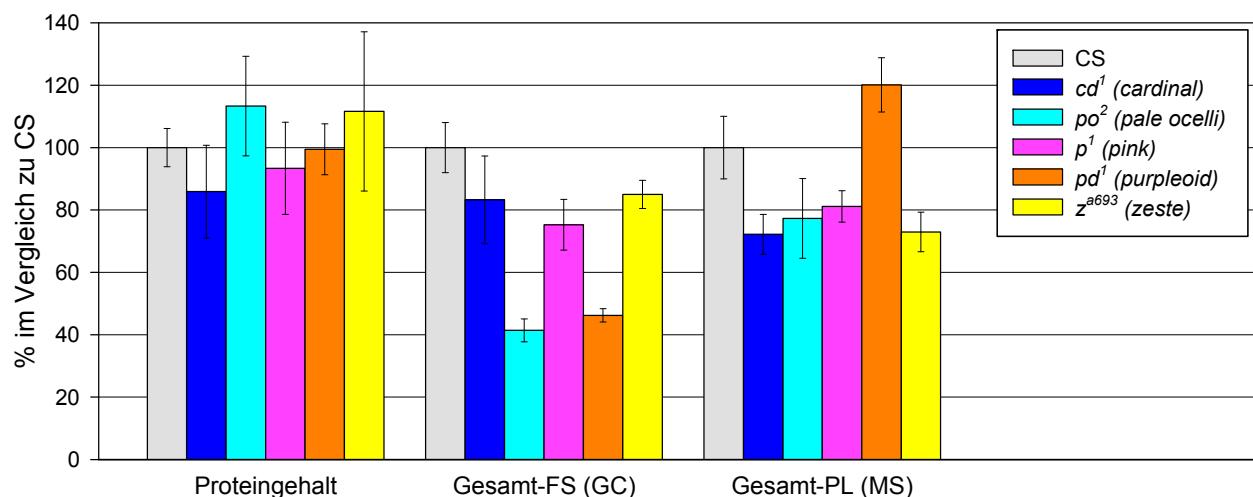


Abb. 78: Übersicht über Protein-, Fettsäure- und Phospholipidgehalt der adulten sonstigen Mutanten im Vergleich zu CS. FS: Fettsäuren; GC: Gaschromatographie; MS: Massenspektrometrie; PL: Phospholipide.

In der DC zeigen sich im Vergleich zu CS in *po²* und *pd¹* Reduktionen der freien FS und der TG, in *po²* sind auch die Sterole verringert (Abb. 79 A).

Durch die GC kann in *cd¹* ein erhöhter Gehalt an Ölsäure festgestellt werden (Abb. 79 B). In *po²* und *pd¹* sind Myristin- und Palmitoleinsäure verringert, Öl-, Linol- und α -Linolensäure stattdessen erhöht. In *p¹* ist ein geringfügiger Anstieg von Linolsäure zu verzeichnen, während in *z^{a693}* Laurin- und Linolsäure etwas erhöht sind und Palmitoleinsäure reduziert ist.

Bei der MS ergibt sich in *cd¹*, *po²*, *p¹* und *z^{a693}* eine Reduktion von PC, in *cd¹* und *p¹* ist PE erhöht (Abb. 79 C). In *pd¹* zeigt sich eine Verringerung von SPE, während PS in allen analysierten Mutanten leicht reduziert ist. Der Gehalt an LPC ist in allen Genotypen, außer in *pd¹*, höher als in CS. In *po²* ist eine geringfügige Erhöhung von PI und SPE festzustellen. Letzteres ist auch in *z^{a693}* etwas höher als im Wildtyp.

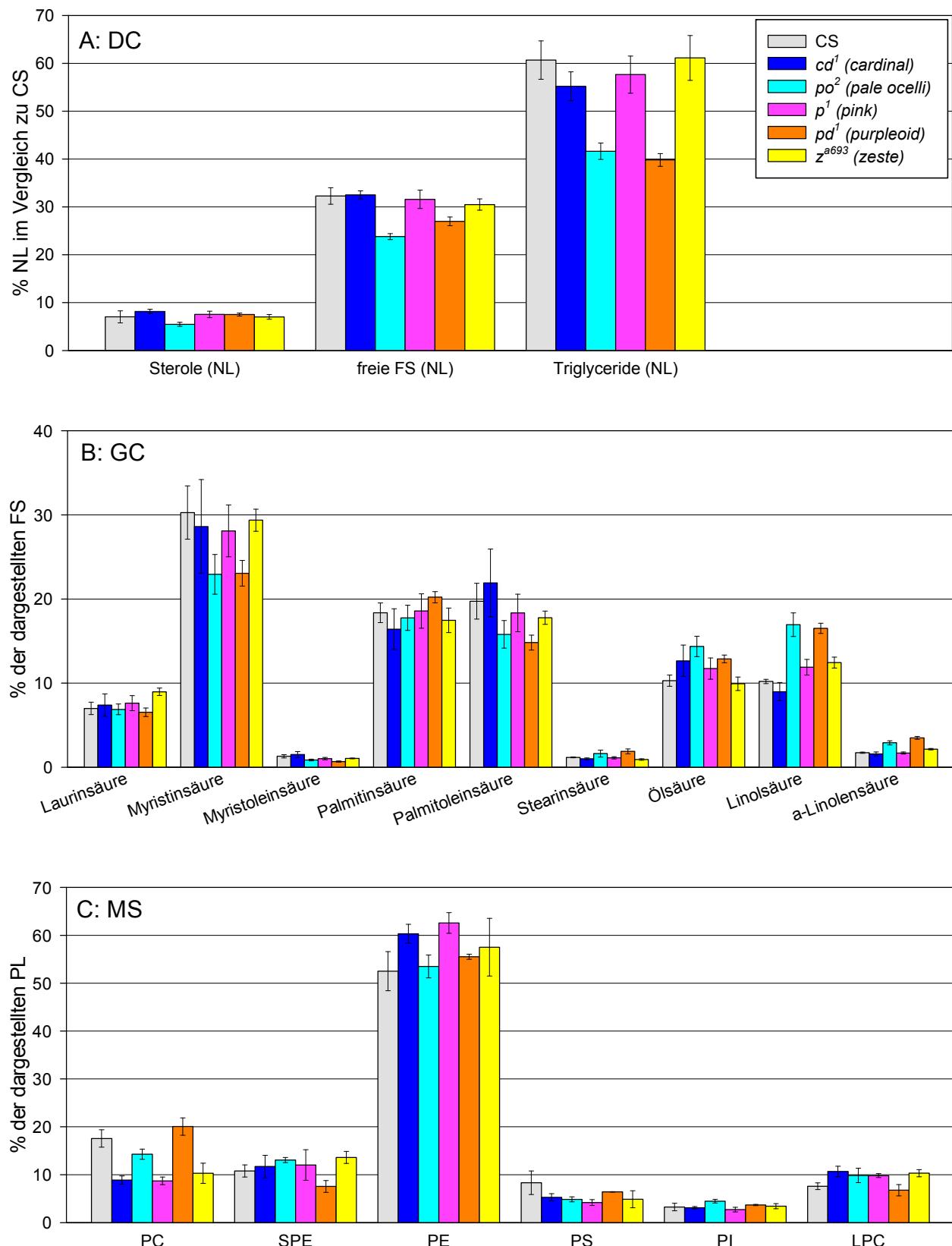


Abb. 79: Lipidanalysen der adulten sonstigen Mutanten. A: Dünnschichtchromatographie (DC), Verteilung der NL im Vergleich zu CS. B: Gaschromatographie (GC), Verteilung der FS. C: Massenspektrometrie (MS), Verteilung der PL-Spezies. Die Legende in A bezieht sich auf die gesamte Abbildung. FS: Fettäuren; LPC: Lysophosphatidylcholin; NL: Neutrallipide; PC: Phosphatidylcholin; PE: Phosphatidylethanolamin; PG: Phosphatidylglycerol; PI: Phosphatidylinositol; PL: Phospholipide; PS: Phosphatidylserin; SPE: Sphingosylphosphoethanolamin.

4.5 Charakterisierung von ABCA- und ABCG-Transportern

Einige der humanen ABC-Transporter, wie beispielsweise ABCA1, ABCG1, ABCG5 und ABCG8, sind am Lipidtransport beteiligt (s. 1.1). Daher sollten im Folgenden die homologen Gene der ABCA- und ABCG-Unterfamilien aus *Drosophila* untersucht werden, wozu durch die RNAi-Fliegenbank des VDRC Stock Centers RNAi-Linien für einen gezielten *knock-down* der entsprechenden Gene zur Verfügung standen (s. 2.1.2.3). Durch Veränderungen im Lipidmuster können möglicherweise ABC-Transporter der Taufliege mit vergleichbaren Funktionen identifiziert werden.

Da White einen Einfluss auf Lipidgehalt und -zusammensetzung hat (s. 4.3), wurden RNAi-Männchen von Linien auf dem II. oder III. Chromosom mit Jungfrauen des ubiquitären Treibers $+\text{;; } da\text{-GAL4}$ gekreuzt, um die Nachkommen jeweils im CS-Hintergrund zu erhalten. Als Kontrolle diente $+\text{/y; } da\text{-GAL4/+}$ aus einer Kreuzung von $+\text{;; } da\text{-GAL4}$ mit w^{1118} -Männchen.

Bei den drei Stämmen mit Insertion auf dem X-Chromosom wurden Jungfrauen der RNAi-Linien mit $+\text{;; } da\text{-GAL4}$ -Männchen gepaart. In diesem Fall entstammte die Kontrolle $w\text{/y; } da\text{-GAL4/+}$ einer Kreuzung von w^{1118} -Jungfrauen mit $+\text{/y; } da\text{-GAL4}$.

Die verwendeten RNAi-Linien des VDRC Stockcenters sind von R1 bis R31 durchnummerniert. Im Folgenden wird beispielsweise die durch *da-GAL4* aktivierte RNAi-Linie R10_A1801, also der Genotyp $+\text{;; R10_A1801/da\text{-GAL4}}$, als „R10“ bezeichnet. Wird neben der CG-Nummer normalerweise ein anderer Name verwendet, steht dieser als Abkürzung in Klammern dahinter, z.B. R21(*Atet*). Der korrekte Genotyp ist in den Legenden der entsprechenden Abbildungen zu finden.

4.5.1 Lipidanalysen von ABCA-Transportern

Zur Untersuchung der *Drosophila melanogaster* ABCA-Transporter wurden elf RNAi-Linien getestet. Davon sind für die Gene CG1718 (Abb. 80, hellblau), CG6052 (gelb) und CG4794 (orange) jeweils zwei verschiedene Linien für die Analysen verwendet worden. Für CG8908 und GC5944 (CG32186) standen keine RNAi-Stämme zur Verfügung.

4.5.1.1 Lipidanalysen der Larven von RNAi-ABCA

In Larven von R26 und R27 (beide CG6052) sowie von R28 und R29 (beide CG4794) ist der Proteingehalt höher als in der entsprechenden Kontrolle, in R23 hingegen reduziert (Abb. 80). In der Summe der FS sind zwischen allen Genotypen keine nennenswerten Unterschiede zu verzeichnen. Nur die beiden aktivierten RNAi-Linien von CG4794 unterscheiden sich signifikant voneinander. Die Gesamt-PL sind in allen Genotypen im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen erhöht, was jedoch in den meisten Fällen aufgrund von hohen Standardabweichungen nicht aussagekräftig ist. Einzig in R23 ist auf eine beträchtliche Erhöhung der PL auf 177% hinzuweisen.

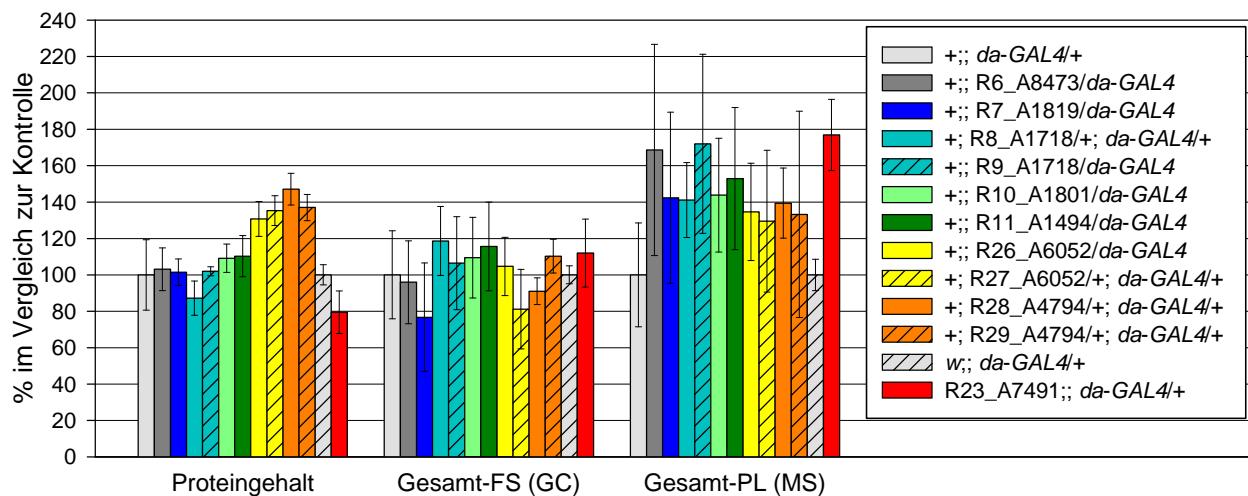


Abb. 80: Übersicht über Protein-, Fettsäure- und Phospholipidgehalt der Larven von RNAi-ABCA im Vergleich zur Kontrolle. Kontrolle: +; *da-GAL4*/+ bzw. *w*; *da-GAL4*/+. FS: Fettsäuren; GC: Gaschromatographie; MS: Massenspektrometrie; PL: Phospholipide.

In der DC ist eine leichte Reduktion der Sterole in jeweils beiden analysierten RNAi-CG6052- und RNAi-CG4794-Stämmen festzustellen (Abb. 81 A). Auch die TG sind in R26, R27 und R28 vermindert. In R23 sind TG und freie FS höher als in der Kontrolle.

Bei der GC sind keine nennenswerten Verschiebungen in den Larven aller RNAi-ABCA-Fliegen zu verzeichnen (Abb. 81 B).

Durch massenspektrometrische Analysen zeigen sich in allen RNAi-ABCA-Larven Reduktionen von PS sowie eine Erhöhung von PC im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 81 C). In den meisten Genotypen, außer in R8 und R11, ist auch SPE geringfügig reduziert. In *w*; *da-GAL4*/+ ist PS etwas niedriger, PG und PI sind hingegen höher als in der zweiten Kontrolle +; *da-GAL4*/+.

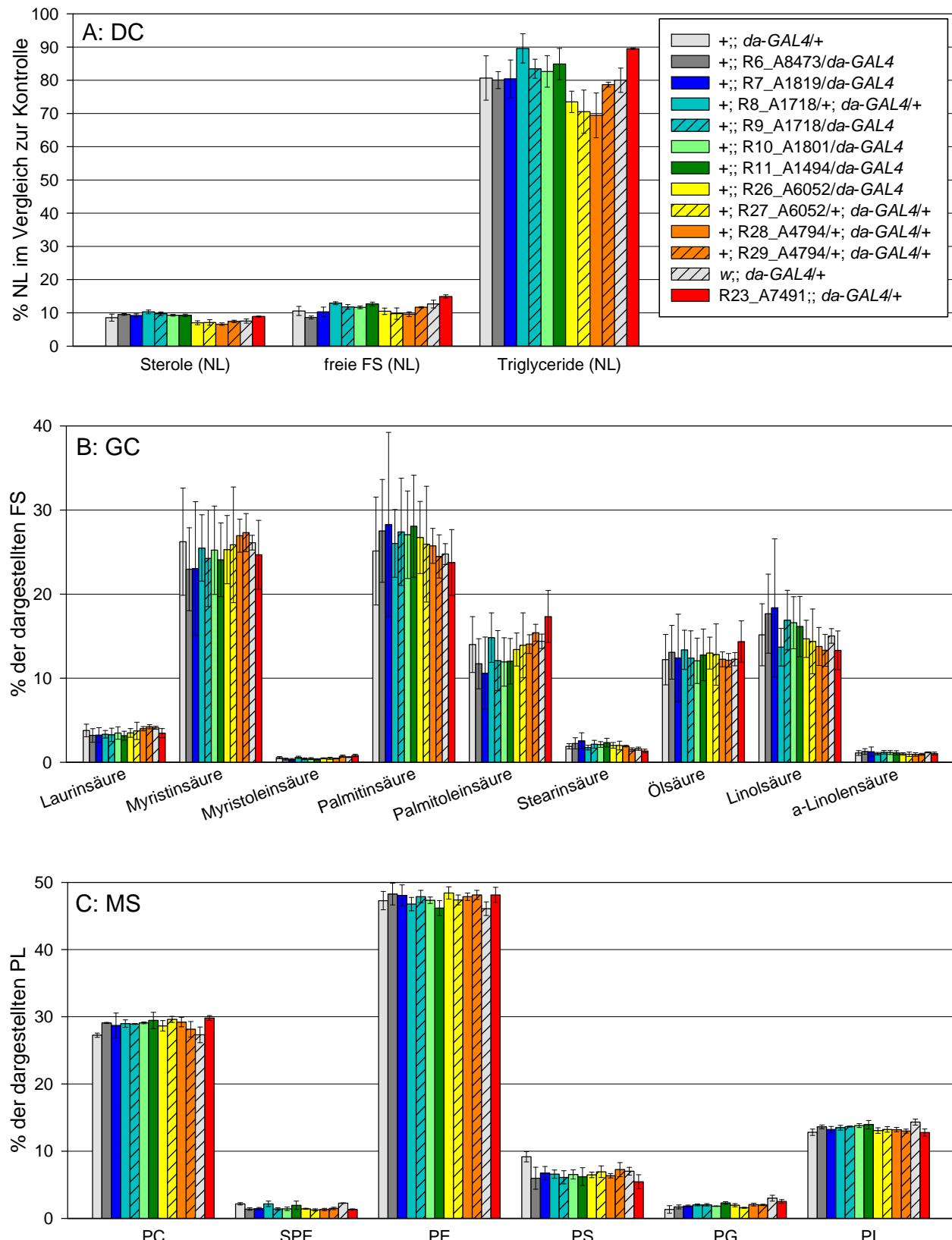


Abb. 81: Lipidanalysen der Larven von RNAi-ABCA. A: Dünnschichtchromatographie (DC), Verteilung der NL im Vergleich zur Kontrolle. B: Gaschromatographie (GC), Verteilung der FS. C: Massenspektrometrie (MS), Verteilung der PL-Spezies. Die Legende in A bezieht sich auf die gesamte Abbildung. Kontrolle: $++$; *da-GAL4*+/+ bzw. w ; *da-GAL4*+/+. FS: Fettsäuren; NL: Neutrallipide; PC: Phosphatidylcholin; PE: Phosphatidylethanolamin; PG: Phosphatidylglycerol; PI: Phosphatidylinositol; PL: Phospholipide; PS: Phosphatidylserin; SPE: Sphingosylphosphoethanolamin.

4.5.1.2 Lipidanalysen der Adulten von RNAi-ABCA

Bei der Analyse der adulten RNAi-ABCA-Fliegen im Vergleich zur Kontrolle kann nur in R29 ein auf 142% erhöhter Proteingehalt festgestellt werden (Abb. 82). Die Summe der FS ist in R10, R26, R27, R28, R29 und R23 nennenswert reduziert. In den weiteren Genotypen, außer in R11, ist eine geringfügige Verminderung der FS detektierbar. Die PL sind, wie schon bei den Larven, in allen getesteten *knock-downs* unterschiedlich stark erhöht.

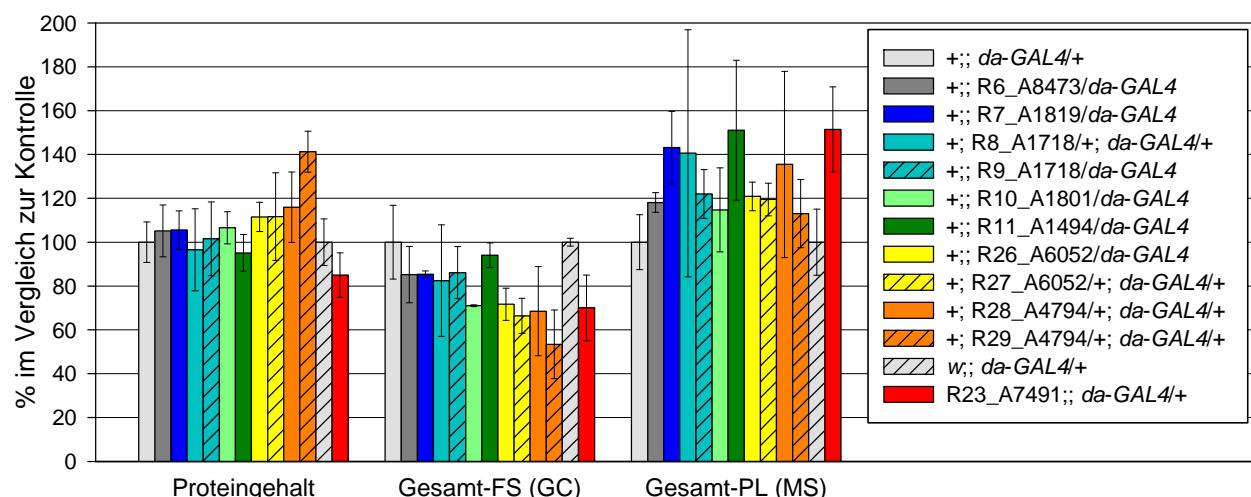


Abb. 82: Übersicht über Protein-, Fettsäure- und Phospholipidgehalt der adulten RNAi-ABCA-Fliegen im Vergleich zur Kontrolle. Kontrolle: +; *da-GAL4*/+ bzw. *w*; *da-GAL4*/+. FS: Fettsäuren; GC: Gaschromatographie; MS: Massenspektrometrie; PL: Phospholipide.

Bei der DC zeigt sich eine Erhöhung der freien FS und der TG in R7. Letztere sind auch in R9 höher als in der Kontrolle (Abb. 83 A). In R11 sind Sterole und TG erhöht, während in R26 eine Verringerung der freien FS zu verzeichnen ist. In beiden RNAi-CG4794-Genotypen wurde eine Reduktion der TG festgestellt. In R23 sind freie FS und TG reduziert.

Die GC zeigt eine Reduktion von Myristinsäure und eine Erhöhung von Palmitoleinsäure in R7 (Abb. 83 B). In R10 und R23 sind Laurin- sowie Myristinsäure vermindert und Linolsäure ist erhöht. In R23 sind zusätzlich alle weiteren FS mit 18 C-Atomen höher als in +; *da-GAL4*/+.

In R7 ist PS reduziert, während in R11 eine Erhöhung von PC und eine Reduktion von PS und LPC detektierbar sind (Abb. 83 C). In R23 ist PC drastisch und PI geringfügig höher als in *w*; *da-GAL4*/+, während eine Reduktion von SPE, PS und LPC vorliegt.

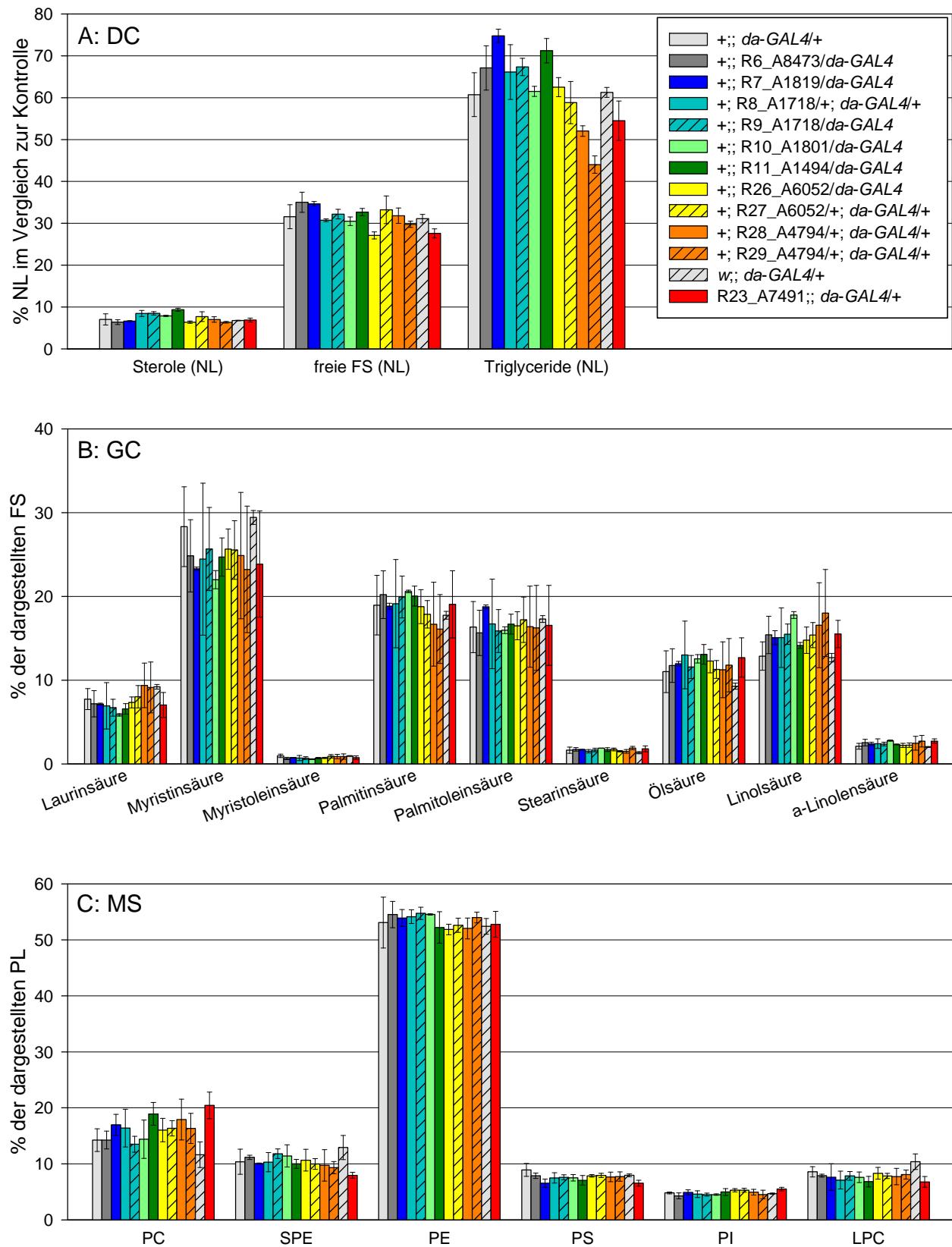


Abb. 83: Lipidanalysen der adulten RNAi-ABCA-Fliegen. A: Dünnschichtchromatographie (DC), Verteilung der NL im Vergleich zur Kontrolle. B: Gaschromatographie (GC), Verteilung der FS. C: Massenspektrometrie (MS), Verteilung der PL-Spezies. Die Legende in A bezieht sich auf die gesamte Abbildung. Kontrolle: +;; da-GAL4/+ bzw. w;; da-GAL4/+ FS: Fettsäuren; LPC: Lysophosphatidylcholin; NL: Neutrallipide; PC: Phosphatidylcholin; PE: Phosphatidylethanolamin; PG: Phosphatidylglycerol; PI: Phosphatidyl-inositol; PL: Phospholipide; PS: Phosphatidylserin; SPE: Sphingosylphosphoethanolamin.

4.5.2 Lipidanalysen von ABCG-Transportern

Die Lipidanalysen der ABCG-Transporter wurden mit 17 RNAi-Linien durchgeführt. RNAi-*w*, -*st* und -*bw* sind bereits unter 4.3.5 aufgeführt, von CG3164 (Abb. 84, gelb), CG4822 (rot), CG9892 (grau), CG2969 (dunkelgrün) und CG9664 (orange) wurden jeweils zwei verschiedene Linien für die Untersuchungen verwendet. Für CG17646, CG9663 und CG5853 standen keine RNAi-Linien zur Verfügung.

Die parentalen Stämme R16_G9892 und R17_G9892 sind homozygot steril bzw. letal, daher konnten nur adulte *knock-down*-Fliegen des Gens CG9892 getestet werden. Dasselbe gilt auch für R31_G11069. Die Linien R12_G3164 und R13_G3164 zeigen beide nach Aktivierung durch *da-GAL4* Letalität im Puppenstadium, von R22(*Atet*) sind bereits frühe Larven letal. Mit der zweiten verwendeten RNAi-*Atet*-Linie können nach Aktivierung durch *da-GAL4* zwar Larven getestet werden, diese sind jedoch nicht in der Lage, sich zu verpuppen. Dabei wurde darauf geachtet, für die Analysen wandernde Larven im gleichen Entwicklungsstadium zu verwenden wie bei den anderen Genotypen. Adulte Männchen von R18 wurden bereits nach 2 Tagen getestet, da Fliegen dieses Genotyps nur vereinzelt 7 Tage überleben.

4.5.2.1 Lipidanalysen der Larven von RNAi-ABCG

In Larven von R21(*Atet*) sind im Vergleich zur Kontrolle drastische Unterschiede zu verzeichnen, nämlich eine Erhöhung des Proteingehalts auf 170%, der FS auf 220% und der PL auf 150% (Abb. 84). Auch in R20(*E23*) und R30 ist der Gehalt an Protein höher als in der Kontrolle. In R25 ist der Proteingehalt reduziert und die Gesamt-FS sind erhöht. In R12 und R13 (beide RNAi-CG3164) sowie in R18 und R25 ist ein Anstieg der Phospholipide zu verzeichnen.

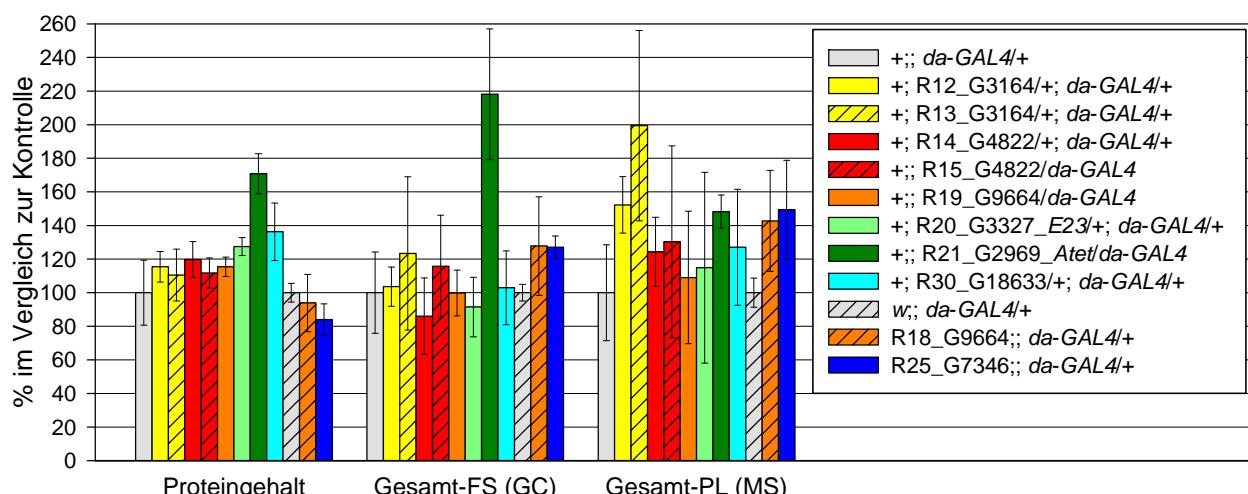


Abb. 84: Übersicht über Protein-, Fettsäure- und Phospholipidgehalt der Larven von RNAi-ABCG im Vergleich zur Kontrolle. Kontrolle: +; *da-GAL4*/+ bzw. *w*; *da-GAL4*/+. FS: Fettsäuren; GC: Gaschromatographie; MS: Massenspektrometrie; PL: Phospholipide.

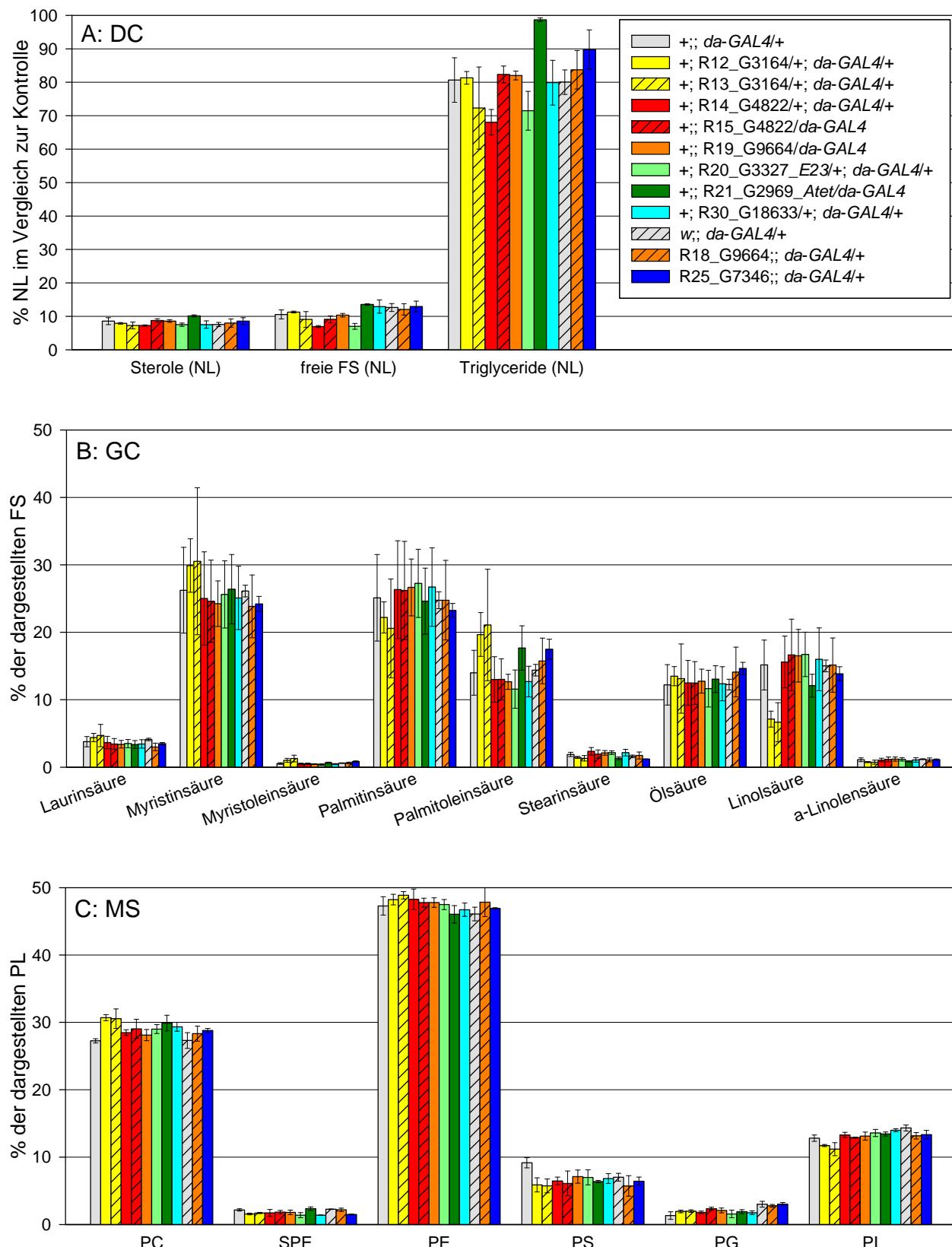


Abb. 85: Lipidanalysen der Larven von RNAi-ABCG. A: Dünnschichtchromatographie (DC), Verteilung der NL im Vergleich zur Kontrolle. B: Gaschromatographie (GC), Verteilung der FS. C: Massenspektrometrie (MS), Verteilung der PL-Spezies. Die Legende in A bezieht sich auf die gesamte Abbildung. Kontrolle: $+/+ da\text{-GAL4}/+$ bzw. $w; da\text{-GAL4}/+$. FS: Fettsäuren; LPC: Lysophosphatidylcholin; NL: Neutrallipide; PC: Phosphatidylcholin; PE: Phosphatidylethanolamin; PG: Phosphatidylglycerol; PI: Phosphatidylinositol; PL: Phospholipide; PS: Phosphatidylserin; SPE: Sphingosylphosphoethanolamin.

In R14, jedoch nicht in R15 (beide RNAi-CG4822), sind freie FS und TG vermindert (Abb. 85 A). R20(*E23*) zeigt einen reduzierten Gehalt an freien FS. In R21(*Atet*) sind Sterole und freie FS geringfügig erhöht, im Gehalt an Triglyceriden sind hingegen drastische Erhöhungen festzustellen. Auch in R25 sind die TG erhöht.

Eine bemerkenswerte Verschiebung der FS ist in den beiden RNAi-CG3164-Genotypen zu verzeichnen (Abb. 85 B). Sowohl in R12 als auch in R13 sind Myristin-, Myristolein- und Palmitoleinsäure erhöht, während Palmitin- und Linolsäure reduziert sind. In R21(*Atet*) ist Palmitoleinsäure etwas höher als in der Kontrolle, während Linol- und Stearinsäure verringert sind. Bei R25 sind ein geringerer Gehalt an Myristin- und eine Erhöhung von Palmitoleinsäure im Vergleich zu *w;; da-GAL4/+* festzustellen.

Die MS zeigt in allen getesteten RNAi-ABCG-Larven, insbesondere in R12 und R13 (beide RNAi-CG3164), eine Erhöhung von PC und eine Reduktion von PS im Vergleich zu *;; da-GAL4/+* (Abb. 85 C). PS ist auch in der Kontrolle *w;; da-GAL4/+* sowie in R18 und R25 reduziert. In diesen drei Genotypen ist außerdem ein Anstieg von PG detektierbar. In R12 und R13 ist eine Verminderung von PI zu verzeichnen.

4.5.2.2 Lipidanalysen der Adulten von RNAi-ABCG

In keinem Genotyp der adulten RNAi-ABCG-Fliegen kann eine nennenswerte Veränderung des Proteingehalts festgestellt werden (Abb. 86). In R14, R15 (beide RNAi-CG4822), R18, R19 (beide RNAi-CG9664), R20(*E23*) sowie R30 sind die FS geringfügig reduziert. In R14, R20(*E23*), R31, R25 und R18 ist hingegen eine Erhöhung der PL zu verzeichnen, in R18 sogar auf 175%.

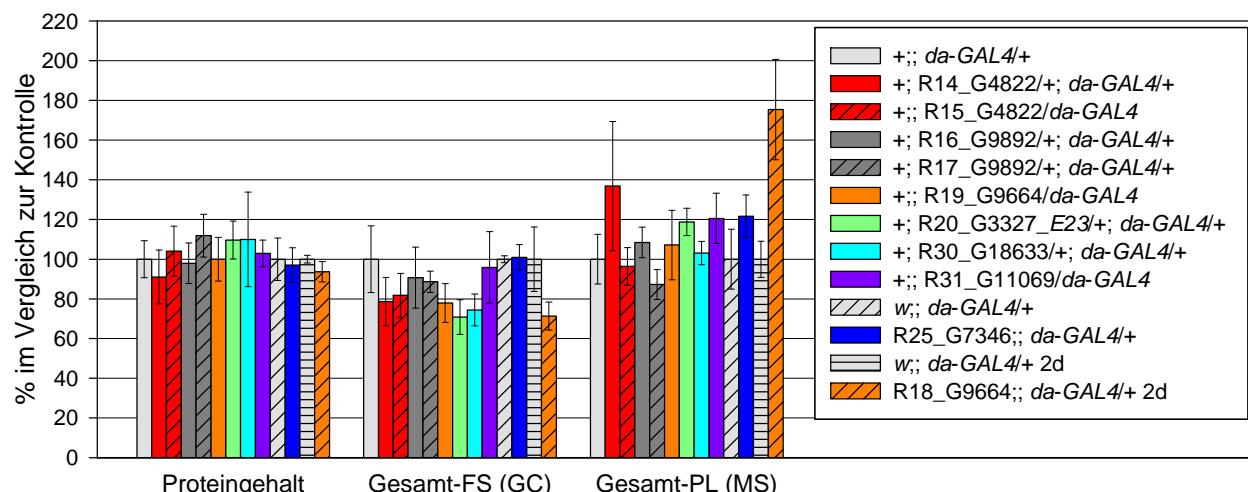


Abb. 86: Übersicht über Protein-, Fettsäure- und Phospholipidgehalt der adulten RNAi-ABCG-Fliegen im Vergleich zur Kontrolle. Kontrolle: *;; da-GAL4/+*, *w;; da-GAL4/+* bzw. *w;; da-GAL4/+ 2d*. d: Tage; FS: Fettsäuren; GC: Gaschromatographie; MS: Massenspektrometrie; PL: Phospholipide.

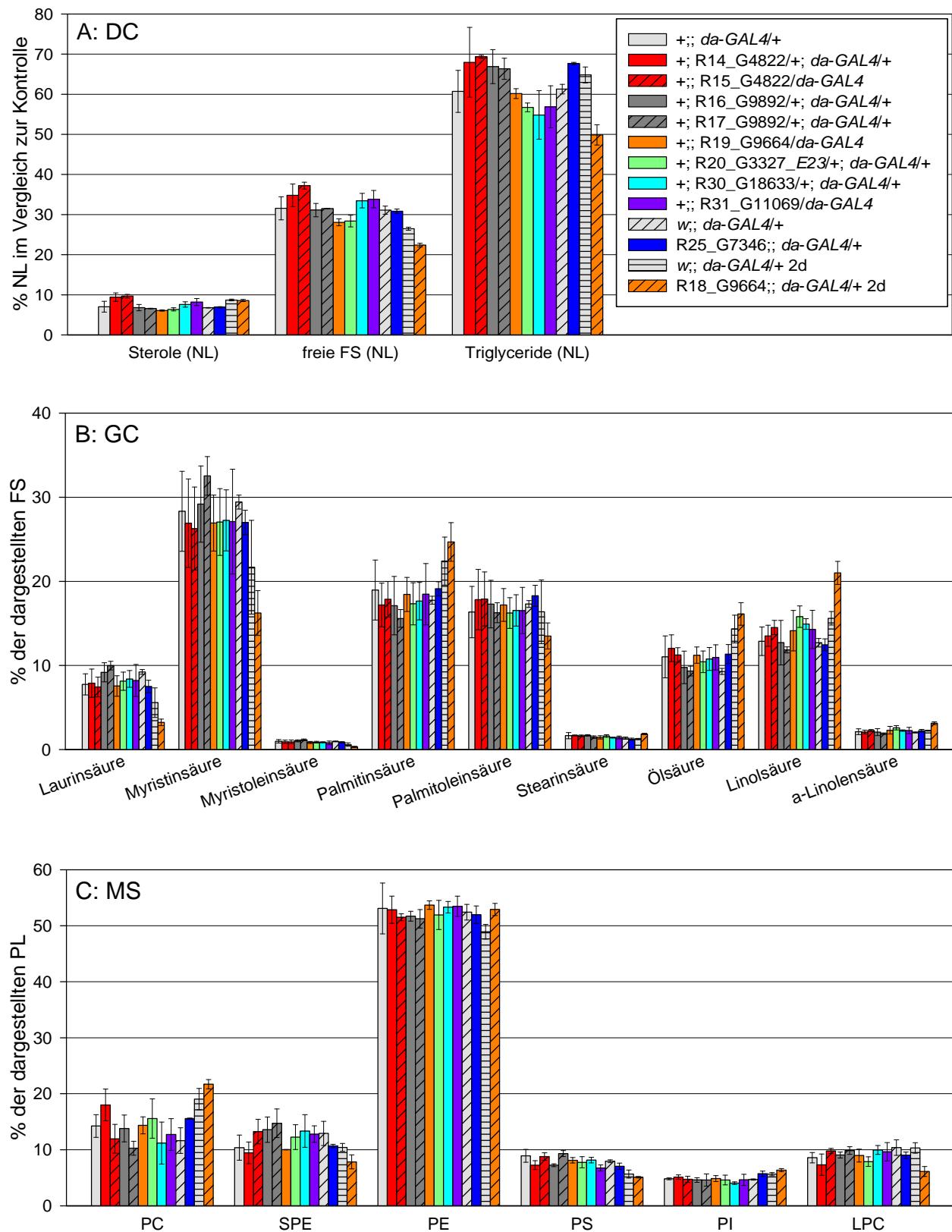


Abb. 87: Lipidanalysen der adulten RNAi-ABCG-Fliegen. A: Dünnschichtchromatographie (DC), Verteilung der NL im Vergleich zur Kontrolle. B: Gaschromatographie (GC), Verteilung der FS. C: Massenspektrometrie (MS), Verteilung der PL-Spezies. Die Legende in A bezieht sich auf die gesamte Abbildung. Kontrolle: +++; da-GAL4/+; w; da-GAL4/+ bzw. w; da-GAL4/+ 2d. d: Tage; FS: Fettsäuren; LPC: Lysophosphatidylcholin; NL: Neutrallipide; PC: Phosphatidylcholin; PE: Phosphatidylethanolamin; PG: Phosphatidylglycerol; PI: Phosphatidylinositol; PL: Phospholipide; PS: Phosphatidylserin; SPE: Sphingosylphosphatidylethanolamin.

Bei der DC-Analyse der adulten RNAi-ABCG-Fliegen zeigt sich in R14 und R15 (beide RNAi-CG4822) eine Erhöhung von Sterolen, freien FS und TG (Abb. 87 A). In R16 und R17 (beide RNAi-CG9892) sind die TG leicht erhöht. In R18 und R19 (beide RNAi-CG9664) sind die freien FS vermindert, während in R18 zusätzlich die TG reduziert sind. In R25 wurde eine Erhöhung der TG festgestellt. Auch beim Vergleich der Kontrollen *w*; *da-GAL4/+* nach 7 bzw. 2 Tagen zeigen sich Unterschiede. In 7 Tage alten Männchen sind weniger Sterole und TG, aber mehr freie FS detektierbar als nach 2 Tagen.

Durch die GC ist in R20(E23) eine Erhöhung von Linolsäure zu verzeichnen (Abb. 87 B). In R25 sind Laurin- und Myristinsäure reduziert, stattdessen sind Palmitin- und Ölsäure höher als in *+; da-GAL4/+*. In R18 sind ebenfalls Laurin- und Myristinsäure vermindert, dafür sind Stearin-, Linol- und α -Linolensäure erhöht. Nach 2 Tagen ist in der Kontrolle *w*; *da-GAL4/+* der Gehalt an Laurin-, Myristin- und Myristoleinsäure geringer als nach 7 Tagen, kompensiert durch eine Erhöhung von Palmitin-, Öl- und Linolsäure.

In R16 und R17 (beide RNAi-CG9892) ist SPE höher als in der Kontrolle, in R16 ist PS, in R17 hingegen PC verringert (Abb. 87 C). Bei R18 ist eine Erhöhung von PC, PE und PI, einhergehend mit einer Reduktion von SPE und LPC, zu verzeichnen, während in R19 keine Unterschiede zur Kontrolle detektierbar sind, obwohl in beiden Fällen dasselbe Gen (CG9664) herunterreguliert wird. In R30 ist PI reduziert, in R31 hingegen ist eine Verringerung von PS festzustellen. Bei R25 zeigt sich ein erhöhter Gehalt an PC und PI, während SPE und PS vermindert sind. In der Kontrolle *w*; *da-GAL4/+* ist nach 2 Tagen der Gehalt an PC erhöht, stattdessen sind SPE, PE und PS schwächer vertreten als in 7 Tage alten Männchen desselben Genotyps.

5 Diskussion

5.1 Die ABC-Transporter White, Scarlet und Brown

5.1.1 Die Funktion von White, Scarlet und Brown im Komplexauge

Gegenstand dieser Dissertation ist die detaillierte Charakterisierung der ABC-Transporter White (W), Scarlet (St) und Brown (Bw). Über diese Proteine ist bisher bekannt, dass sie funktionell interagieren und Stoffwechselzwischenprodukte der Augenpigmente in die Pigmentgranula der Komplexaugen transportieren (s. 1.2.2). Dabei sind sie in den Membranen dieser Granula im Inneren von Pigmentzellen lokalisiert und bilden Heterodimere (Mackenzie *et al.*, 2000). W/Bw transportiert eine der Vorstufen von Drosopterin, während W/St vermutlich für den Transport von 3-OHK (3-Hydroxykynurenin) verantwortlich ist. Anhand von diesen neueren Erkenntnissen zur Lokalisation der Proteine und den Ergebnissen von Transplantationsexperimenten aus dem Jahr 1936 kann 3-OHK als Substrat für W/St identifiziert werden. Augenimaginalscheiben der Mutante *cinnabar* (*cn*) waren nach Transplantation in *st*- oder *w*-Mutanten in der Lage, Komplexaugen mit Xanthommatin hervorzubringen (Beadle und Ephrussi, 1936). Da *cn* selbst nicht in der Lage ist, 3-OHK zu synthetisieren, muss das letzte Stoffwechselintermediat vor Xanthommatin in den Mutanten *st* und *w* ausreichend vorhanden sein und kann vom Heterodimer W/St in die transplantierte Imaginalscheibe von *cn* transportiert, darin gespeichert und anschließend zum braunen Pigment konvertiert werden.

Anhand von Pigmentanalysen wurde im Rahmen dieser Dissertation gezeigt, dass Drosopterin im Vergleich zum Wildtyp Canton S (CS) in *bw*-Mutanten auf 5 bis 15% reduziert ist, während in der *st*-Mutante *st*¹ nur 30% Xanthommatin detektiert werden kann (s. 4.1.1). In der Doppelmutante *bwst* ist keines der beiden Augenpigmente nachweisbar, was zeigt, dass Drosopterin und Xanthommatin bei der Extraktion nicht vollständig voneinander trennbar sind, sondern sich zu einem bestimmten Teil überlagern. Die zusätzliche Reduktion von Xanthommatin in den verschiedenen *bw*-Allelen ist einerseits zurückzuführen auf eine geringere Augengröße dieser Mutanten im Vergleich zur Kontrolle (Danneel und Schumann, 1966). Andererseits wurde beobachtet, dass Malpighische Gefäße von *bw*-Fliegen zeitweise mehr 3-OHK enthalten als CS, was bedeuten könnte, dass dieses Intermediat nicht in normalem Maße zu Xanthommatin konvertiert werden kann (Eichelberg, 1968). Möglicherweise hat somit ein Fehlen von Bw auch einen indirekten Effekt auf die Transportfähigkeit des Heterodimers W/St.

Durch Überexpression von entsprechenden UAS-Konstrukten oder durch gezielte Herunterregulierung der Gene können diese Phänotypen partiell gerettet bzw. wiederhergestellt werden (s. 4.1.3 und 4.1.4). Dabei funktioniert der *w*-Rescue mit dem augenspezifischen Treiber *GMR-GAL4* zwar letztendlich besser als mit dem ubiquitären Treiber *da-GAL4* (*daughterless-GAL4*),

jedoch sind im homozygoten parentalen Stamm *w; GMR-GAL4* durch die Kopien von *mini-white* bereits 45% beider Pigmente vorhanden. Außerdem fällt auf, dass nach ubiquitärer Expression von *white* mehr Xanthommatin synthetisiert wird, bei augenspezifischer Expression jedoch mehr Drosopterin. Das deutet darauf hin, dass White im Körper primär zum Transport von Xanthommatin-Vorstufen benötigt wird, das Heterodimer W/Bw als Pigmenttransporter aber vor allem im Auge aktiv ist. Offensichtlich exprimiert *da-GAL4* die UAS-Konstrukte nicht so stark im Auge wie *GMR-GAL4*. Des Weiteren ist zu beobachten, dass bereits ein Pigmentgehalt von weniger als 10% eine starke Färbung der Komplexaugen hervorruft, weshalb zur genauen Quantifizierung von Xanthommatin und Drosopterin immer eine Extraktion der Pigmente durchgeführt werden muss.

Diese Ergebnisse zeigen, dass sowohl die drei UAS-Konstrukte als auch die vier RNAi-Linien funktionsfähig sind und für weitere Experimente verwendet werden können.

5.1.2 Neuronale Funktion von White und Scarlet

Verschiedene Phänotypen weisen auf eine Funktion von White und möglicherweise auch von den beiden Dimerisierungspartnern Bw und St im Gehirn von *Drosophila* hin. Im Rahmen dieser Arbeit konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die *w*-Mutante *w¹¹¹⁸* nach Alterung auf Sucrose eine leichte Neurodegeneration aufweist (s. 4.1.8). Außerdem beeinflusst die Über- bzw. Fehlexpression von W das Sexualverhalten der Fliegen (Zhang und Odenwald, 1995; Anaka *et al.*, 2008). Darüber hinaus wurde im Gehirn von *w*-, *st*- und *bw*-Mutanten eine Reduktion der biogenen Amine Histamin, Dopamin und Serotonin festgestellt (Borycz *et al.*, 2008). Serotonin entsteht aus Tryptophan und spielt eine wichtige Rolle im Lernverhalten der Taufliege, weshalb *w*-Mutanten diesbezüglich beeinträchtigt sind (Sitaraman *et al.*, 2008). Außerdem zeigt *w¹¹¹⁸* nicht nur aufgrund der Beeinträchtigung des visuellen Systems, sondern auch wegen der fehlenden Funktion des Gens im zentralen Nervensystem ein verändertes Aggressionsverhalten (Hoyer *et al.*, 2008). Zusätzlich wurde eine Expression von *white* auch in den Köpfen augen- und ocellenloser Fliegen nachgewiesen (Campbell und Nash, 2001).

Mittels Immunohistochemie konnten W und St im Rahmen dieser Dissertation nicht im Gehirn detektiert werden (s. 4.1.5). Möglicherweise ist die endogene Expression der Proteine zu schwach, um die spezifische Färbung vom Hintergrund abzuheben. Die Gene *w*, *st* und *bw* sind auf RNA-Ebene zwar im Kopf stärker exprimiert als im Gesamtorganismus, das Signal im Gehirn ist jedoch schwächer als in der ganzen Fliege (Flyatlas¹²), was gegen eine Lokalisation von W, St und Bw in diesem Organ spricht.

¹² <http://www.flyatlas.org>

5.1.3 White und Scarlet kolokalisieren in den Malpighischen Gefäßen

Abgesehen vom Komplexauge konnten die Proteine W und St in einer vorhergehenden Diplomarbeit sowohl im dritten Larvalstadium (3L) als auch in Puppen und adulten Fliegen in den Malpighischen Gefäßen nachgewiesen werden (Ohmann, 2006). Auch durch RNA-Datenbanken und Microarray-Experimente wurde gezeigt, dass die Gene *w*, *st* und *bw* in diesen Exkretionsorganen im Vergleich zum Gesamtorganismus stark exprimiert sind (Flyatlas; Wang *et al.*, 2004). Analog zum Auge sind die Proteine in den Malpighischen Gefäßen nicht in den Zellmembranen, sondern in den Membranen subzellulärer, granulärer Vesikel lokalisiert (Ohmann, 2006). Diese Beobachtung konnte später durch gezielte Expression von *w* in Prinzipal-Zellen der Malpighischen Gefäße bestätigt werden (Evans *et al.*, 2008). Aufgrund eines ähnlichen Expressionsmusters von St und W sowie einer drastischen Reduktion der Detektierbarkeit ohne das jeweils andere Protein wurde vermutet, dass diese beiden Proteine auch in den *Tubules* dimerisieren (Ohmann, 2006). Eine reduzierte Stabilität von St in *w*-Mutanten wurde bereits im Komplexauge beobachtet (Mackenzie *et al.*, 2000). Die Dimerisierung in den Malpighischen Gefäßen konnte nun durch weitere Experimente bestätigt werden. Exprimiert man Scarlet im mutanten Hintergrund (*st*¹), ist einerseits St wieder detektierbar, andererseits ist auch W wieder stabilisiert und kann nachgewiesen werden (s. 4.1.5). Wie bereits beschrieben, wird in *w*-Mutanten *scarlet* normal exprimiert (Tearle *et al.*, 1989) und auch in *st*¹ konnten keine Veränderungen in der Transkription des *white*-Gens beobachtet werden (Levis *et al.*, 1984). Vergleichsweise wurde im Rahmen dieser Arbeit durch TaqMan-PCR zwar eine geringfügige Reduktion von *scarlet* in *w*¹¹¹⁸ und von *white* in *st*¹ sowie in der Doppelmutante *bwst* festgestellt, jedoch ist damit bewiesen, dass die Instabilität generell auf Proteinebene zu beobachten ist (s. 4.1.5). Somit werden die beiden Proteine St und W nicht nur für die Funktionsfähigkeit des Heterodimers, sondern auch für die Lokalisation und Stabilisation des Dimerisationspartners in der Membran benötigt. In welchen intrazellulären Strukturen die Proteine dimerisieren, konnte bisher nicht eindeutig geklärt werden. Es könnte sich dabei um Lysosomen oder um andere vesikuläre Strukturen handeln. Vermutlich sind diese Kompartimente, wie die Pigmentgranula der Komplexaugen (Ziegler-Günder und Jaenicke, 1959), in den entsprechenden Mutanten zwar vorhanden, können aber aufgrund der Abwesenheit von St und W nicht angefärbt und somit nicht visualisiert werden.

Brown ist neben Scarlet ein weiterer bekannter Dimerisierungspartner von White im Komplexauge. Ob dieses Protein in den Malpighischen Gefäßen exprimiert wird oder nicht, ist bisher nicht bekannt. Da für Bw kein spezifischer Antikörper zur Verfügung stand, konnte die Expression des Proteins in den *Tubules* nicht analog zu W und St nachgewiesen werden. Offensichtlich ist Brown nicht in der Lage, White in den Malpighischen Gefäßen der Mutante *st*¹ in der Form zu stabilisieren, dass es mittels Immunohistochemie nachweisbar ist (Ohmann, 2006). Außerdem ist in den *Tubules* der *bw*-Mutante *bw*¹ die Detektierbarkeit von W und St nicht verändert, nur die

Expression der beiden Gene *w* und *st* ist geringfügig reduziert (s. 4.1.5). Dennoch ist *bw* zumindest auf RNA-Ebene auch im Körper von adulten Fliegen detektierbar und ist somit nicht kopfspezifisch (diese Arbeit; Wang *et al.*, 2004). Darüber hinaus deutet die erhöhte Expression von *brown* in *st¹*-Larven (s. 4.1.5) darauf hin, dass die Abwesenheit von St dazu führt, dass mehr *bw*-Protein zur Dimerisierung mit W gebildet wird. Die Erhöhung von *brown*-RNA in der *cinnabar*-Mutante *cn¹* könnte durch eine Rückkopplung bedingt sein. Da in *cn¹* das Substrat 3-OHK für das Heterodimer W/St nicht zur Verfügung steht, wird möglicherweise mehr Bw zum Transport von Drosopterin-Vorstufen gebildet.

5.1.4 Die Funktion von White, Scarlet und Brown in den Malpighischen Gefäßen

Es wurde bereits mehrfach berichtet, dass ABC-Proteine in den Transport von Riboflavin (Vitamin B2) involviert sind. Das humane Protein ABCG2 ist ein Multidrug-Transporter, der, wie bereits erwähnt, Riboflavin in die Muttermilch sekretiert (van Herwaarden *et al.*, 2007). Aufgrund von Beobachtungen, dass *Drosophila white*-Fliegen farblose Malpighische Gefäße haben, wurde eine Veränderung der Aufnahmefähigkeit von Riboflavin in diesen Mutanten postuliert. Durch Transportexperimente konnte bestätigt werden, dass im Vergleich zum Wildtyp die Akkumulation des Vitamins in Malpighischen Gefäßen von *w*-Mutanten drastisch reduziert ist (Sullivan *et al.*, 1979). Auch in *Drosophila hydei* speichern Malpighische Gefäße des Wildtyps im Gegensatz zu *w*-Mutanten eine Substanz, bei der es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um Riboflavin handelt (van Breugel, 1987).

Anhand von zwei unterschiedlichen Methoden zur Quantifizierung des Riboflavingehalts konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass in *w¹¹¹⁸* und in der Doppelmutante *bwst* nur eine geringe Menge an Riboflavin in den Malpighischen Gefäßen gespeichert wird (s. 4.1.6). Somit ist W zwar an der Speicherung dieses Vitamins beteiligt, aber dabei nicht in der Lage, als Homodimer zu agieren. Das Protein benötigt entweder St oder Bw als Dimerisierungspartner. Sowohl in *bw¹* als auch in der Doppelmutante *cnbw* ist nur geringfügig mehr Riboflavin in den Malpighischen Gefäßen detektierbar als in den beiden oben genannten Mutanten. In *st¹* und *cn¹* sind hingegen nahezu wildtypische Mengen des Vitamins gespeichert. Die Defekte in *w*- und *bw*-Fliegen können durch ubiquitäre Expression von *w* bzw. *bw* im entsprechenden mutanten Hintergrund gerettet werden, mit UAS-*bw* sogar nahezu vollständig. Diese Ergebnisse zeigen, dass zur Speicherung von Riboflavin hauptsächlich das Heterodimer W/Bw (ca. 80%), jedoch auch in geringerem Maße W/St (ca. 20%) befähigt ist.

Durch Experimente mit radioaktiv markiertem Riboflavin wurde eine Beeinträchtigung des Transports dieser Substanz in die Malpighischen Gefäße der Mutanten w^{1118} , $bwst$, $cnbw$, bw^1 und st^1 aufgezeigt (s. 4.1.6). Dass die Aufnahme des Vitamins in w^{1118} und $bwst$ auf Diffusion zurückzuführen ist, wurde durch ein Kontrollexperiment mit Glycerin-3-Phosphat nachgewiesen. Dieses kann zwar nicht aktiv in das Gewebe transportiert werden, ist jedoch nach 60 min Inkubation trotzdem in den Malpighischen Gefäßen detektierbar. Durch entsprechende UAS-Konstrukte und ubiquitäre Treiber können die Transportdefekte in bw^1 , st^1 und in der w -Mutante gerettet werden (s. 4.1.6). Bezeichnenderweise ist im Genotyp $+$; bw^1 ; UAS- bw/da -GAL4 eine schnellere Aufnahme von Riboflavin möglich als im Wildtyp CS, obwohl mit UAS- bw der *Rescue* der Augenpigmentierung nicht so effizient ist, wie mit UAS- st und UAS- w (s. 4.1.3). Offensichtlich ist die endogene Expression von bw in den Malpighischen Gefäßen nur sehr schwach und kann somit in diesen Organen leichter durch ein UAS-Konstrukt gerettet werden als im Auge. Dass Bw lange nicht im Körper von *Drosophila* detektiert werden konnte (Arndt, 2003; Dreesen *et al.*, 1988), ist vermutlich auch auf das geringere absolute Expressionslevel von *brown* im Vergleich zu *white* und *scarlet* in den *Tubules* zurückzuführen. Die Experimente dieser Dissertation beweisen jedoch, dass das Protein Bw in den Malpighischen Gefäßen exprimiert wird und dort mit W dimerisiert, um Riboflavin zu transportieren.

Somit konnte gezeigt werden, dass primär das Heterodimer W/Bw für die Aufnahme von Riboflavin in intrazelluläre Vesikel der Malpighischen Gefäße und die darauffolgende Speicherung verantwortlich ist. Der vergleichsweise langsame Transport in st^1 , der Mutante in welcher beinahe wildtypische Mengen des Vitamins gespeichert sind, ist erklärbar durch die bereits diskutierte Instabilität von W ohne den Dimerisationspartner St. Aufgrund der drastischen Reduktion von W in st^1 sind nur wenige W-Moleküle vorhanden, die mit Bw dimerisieren können. Diese W/Bw Heterodimere sind nicht in der Lage, innerhalb von 60 min eine große Menge externes Riboflavin in die Malpighischen Gefäße zu transportieren. In st^1 -Larven ist der Riboflavingehalt jedoch nahezu wildtypisch, da den wenigen W/Bw Dimeren in diesem Fall hinreichend Zeit zur Verfügung stand, das Vitamin zu akkumulieren.

Ein weiterer Phänotyp der verschiedenen Augenfarbenmutanten ist eine reduzierte Anzahl an Zellkernen und folglich eine geringere Größe der Malpighischen Gefäße (s. 4.1.8). Diese Ergebnisse widersprechen den Angaben, dass die Anzahl der Zellen in jedem Bereich der *Tubules* von *Drosophila* sehr konstant ist (Sözen *et al.*, 1997). In der vorliegenden Arbeit konnte eine starke Verkürzung sowohl der anterioren als auch der posterioren Malpighischen Gefäße von bw^1 im Vergleich zu CS aufgezeigt werden. Dasselbe ist auch in der Doppelmutante $cnbw$ zu beobachten, jedoch nicht in $bwst$, obwohl in st^1 die posterioren *Tubules* ebenfalls kürzer sind als in CS. Somit ist dieser Phänotyp nicht durch die entsprechenden Allele bedingt, sondern vermut-

lich durch genetische Veränderungen, die im Laufe der Zeit in den Mutanten akkumulierten. Diese Reduktion der Zellen in den Malpighischen Gefäßen könnte zusätzlich zum verringerten Gehalt an Riboflavin bzw. zum eingeschränkten aktiven Transport dieses Vitamins beitragen.

3-OHK wird im Auge von W/St transportiert und ist auch in den Malpighischen Gefäßen ein mögliches Substrat für dieses Heterodimer, da es in den verschiedenen Entwicklungsstadien der entsprechenden Mutanten eine vom Wildtyp abweichende Verteilung zeigt. Während die Xanthommatin-Vorstufe in der larvalen Phase kaum vorhanden ist, akkumuliert sie im Puppenstadium, um unmittelbar danach wieder ausgeschieden zu werden. Dabei ist die zwischenzeitliche Akkumulation ausschließlich darauf zurückzuführen, dass im Puppenstadium keine Exkretion möglich ist (Howells und Ryall, 1975; Howells *et al.*, 1977). Außerdem wurde beschrieben, dass Malpighische Gefäße von *st*- und *w*-Mutanten nicht in der Lage sind, exogenes Tryptophan und Kynurenin aufzunehmen (Sullivan und Sullivan, 1975; Sullivan *et al.*, 1980). Möglicherweise werden die Zellen erst dazu befähigt, diese Substanzen zu transportieren, wenn für die Speicherung oder Exkretion der Stoffwechselintermediate gesorgt ist (Mackenzie *et al.*, 2000).

Analog dazu sind Malpighische Gefäße von *w*- und *bw*-Fliegen im Vergleich zum Wildtyp Oregon R (OR) nur partiell in der Lage, Guanin in die Zellen aufzunehmen (Sullivan *et al.*, 1979). Möglicherweise werden Drosopterin-Vorstufen in den Exkretionsorganen zwischengespeichert, um für die spätere Pigmentsynthese zur Verfügung zu stehen. Obwohl Pteridine und Riboflavin durch den Pyrimidinring chemisch verwandt sind (Eichelberg, 1969) und von den gleichen Vorfahren abstammen, können viele Insekten Ersteres synthetisieren, während Letzteres essentiell ist (Nickla, 1972). Es wurde postuliert, dass diese Substanzen das gleiche System zur Aufnahme und zur Speicherung verwenden (Summers *et al.*, 1982), was durch die Experimente der vorliegenden Arbeit bestätigt werden konnte. Möglicherweise wird auch cGMP nicht ausschließlich von W, sondern aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zu Guanin (s. 1.2.2) vom Heterodimer W/Bw in die Malpighischen Gefäße transportiert.

5.1.5 Riboflavin und seine Bedeutung für *Drosophila melanogaster*

Bei Riboflavin handelt es sich um ein essentielles Vitamin, das im Futter vorhanden sein muss, um eine ungehinderte Entwicklung von *Drosophila* im Larven- und Puppenstadium zu gewährleisten (Sang, 1956). Daher liegt die Vermutung nahe, dass eine Speicherung von Riboflavin in Malpighischen Gefäßen oder eine externe Verfügbarkeit des Vitamins über die Nahrung auch im Adultstadium von großer Bedeutung für die Lebensspanne der Fliegen ist. Um diese Annahme zu überprüfen, wurde ein Experiment durchgeführt, bei dem Männchen verschiedener Genotypen auf einem Riboflavin-freien Sucrose-Medium gealtert wurden (s. 4.1.7). Dadurch konnte jedoch gezeigt werden, dass eine reduzierte Lebenserwartung der adulten Fliegen nicht auf die

Unfähigkeit, dieses Vitamin transportieren und speichern zu können, zurückzuführen ist. Auch die Zugabe von 10 µg/ml Riboflavin zu der Zucker-Lösung hat keinen signifikanten Einfluss auf die Lebensspanne der Mutanten auf Sucrose. Vermutlich ist es den Fliegen aber nicht möglich, das Vitamin in dieser Form aufzunehmen.

Denkbar ist, dass minimale Mengen an Riboflavin für *Drosophila* ausreichen, um zu überleben oder dass das Vitamin im Adultstadium gar nicht mehr benötigt wird und nur in der Larvalphase wichtig ist. Da die ABC-Transporter St und W in den Malpighischen Gefäßen nicht in den Zellmembranen detektiert werden konnten, sind sie vermutlich nicht am Transport von Substanzen in die Zellen beteiligt. Möglicherweise ist die passive Diffusion von Riboflavin der Mechanismus, der die ausreichende Versorgung mit diesem Vitamin in allen Mutanten gewährleistet. Wahrscheinlich diffundiert Riboflavin entlang des Konzentrationsgradienten in die Zellen der Malpighischen Gefäße bis ein bestimmter intrazellulärer Gehalt erreicht ist. Aus dem Lumen der Zellen wird es im Wildtyp anschließend durch W/Bw (und zu einem geringen Anteil auch durch W/St) aktiv in die Vesikel transportiert und dort gespeichert. Somit wird Platz geschaffen für die Diffusion weiterer Riboflavin-Moleküle in die Zellen. Solange eine ausreichende Menge des Vitamins im Futter zur Verfügung steht, wie es durch das Labormedium der Fall ist, haben Mutanten, die nicht zum aktiven Transport und zur Speicherung befähigt sind, keine Nachteile. Die Riboflavinreserven in Larven könnten jedoch vor allem in der freien Wildbahn von Bedeutung sein, weil das Vitamin dort möglicherweise nicht immer in genügendem Maße zur Verfügung steht. Auch durch seine starke Lichtsensitivität (Edwards *et al.*, 1999) könnte das Vitamin im Futter bisweilen ein limitierender Faktor sein. Versuche zur Haltung von Fliegen auf einem Riboflavin-freien Minimalmedium nach Sang (1956) waren aufgrund von mangelnder Reproduzierbarkeit nicht auswertbar.

Die Diffusion der Substanzen in die Zellen der *Tubules* bis zu einer bestimmten Konzentration würde auch erklären, warum die Aufnahme von Tryptophan, Kynurenin und Guanin in Malpighische Gefäße von *w*-Mutanten reduziert ist (Sullivan *et al.*, 1979 und 1980). Wenn die Intermediate nach der Diffusion entlang der entsprechenden Synthesewege weiter metabolisiert und abschließend zur Speicherung in intrazelluläre Kompartimente transportiert werden können, ist eine weitere Diffusion möglich. Da dies in der *w*-Mutante nicht gewährleistet ist, diffundieren die Vorstufen ins Zytosol und akkumulieren dort bis zu einer bestimmten Sättigungsgrenze, was eine weitere Diffusion verhindert. Durch diese Theorie ließe sich auch begründen, warum in *w*-Fliegen trotz der Transportdefekte keine Reduktionen des Tryptophangehalts nachgewiesen werden konnten (Green, 1949).

Außerdem wäre denkbar, dass neben W/Bw und W/St zusätzliche Transportwege existieren, um die Versorgung mit Riboflavin sicherzustellen.

5.1.6 Bedeutung der intrazellulären Speicherung von Stoffwechselintermediaten

Riboflavin ist ein Vitamin, das beim Menschen erfolgreich als Migräneprophylaxe eingesetzt wird (Condò *et al.*, 2009) und in *Arabidopsis thaliana* Resistenzentwicklung gegen Parasiten induziert (Dong und Beer, 2000). Hohe Dosen dieses Vitamins haben offensichtlich keine nachteiligen Auswirkungen auf Säuger (Fukuyatari *et al.*, 2009), sondern können beispielsweise die durch Lipopolysaccharide verursachte Mortalität bei Mäusen reduzieren (Shih *et al.*, 2010).

Im Gegensatz dazu wurde aber auch von zahlreichen toxischen Effekten dieses Vitamins berichtet. Die Bestrahlung von Tumorzellen in Anwesenheit von Riboflavin induziert z.B. apoptotischen Zelltod (Edwards und Silva, 2001). Außerdem zeigt das Vitamin in Anwesenheit von Licht zeit- und konzentrationsabhängige Mutagenität durch die Produktion von reaktiven Sauerstoffmolekülen und Superoxidradikalen (Kale, 1992). Diese hochreaktiven Spezies können im Säuger beispielsweise die Erythrozytenmembran schädigen und Hämolyse verursachen, Linsenschädigungen hervorrufen, Enzyme inaktivieren, DNA- und RNA-Moleküle brechen, Protein-Vernetzungen erhöhen sowie Bilirubin, Harnsäure, Aminosäuren und Hyaluronsäure zerstören (Frati *et al.*, 1997). Möglicherweise wird überschüssiges Riboflavin in *Drosophila* durch Akkumulierung in den intrazellulären Kompartimenten für den Organismus unschädlich gemacht oder dort zur Exkretion vorbereitet.

Auch die Regulation der Speicherung von 3-OHK und den weiteren Intermediaten des Tryptophanmetabolismus hat vermutlich verschiedene Bedeutungen für *Drosophila*. Einerseits wird 3-OHK zwar, wie die Drosopterin-Vorstufen, zwischengespeichert, um für die Xanthomatin-Synthese während der Puppenphase zur Verfügung zu stehen (Wessing und Eichelberg, 1978), andererseits ist die intrazelluläre Speicherung von manchen Substanzen in Malpighischen Gefäßen wichtig, um sie dadurch ungefährlich zu machen. Schon mikromolare Konzentrationen von 3-OHK zeigen eine toxische Wirkung auf Neuronen in Zellkultur (Okuda *et al.*, 1996) und auch *in vivo* führt die Injektion geringer Mengen an Tryptophan, Kynurenin oder 3-OHK in der Fleischfliege *Neobellieria bullata* zu schweren neurologischen Störungen (Cerstiaens *et al.*, 2003). Außerdem fördert 3-OHK durch die Oxidation von α -Crystallin die Kataraktbildung in humanen Linsen (Korlimbinis *et al.*, 2006). Im Säuger akkumulieren bei bestimmten Störungen der Nierenfunktion viele Substanzen, die normalerweise ausgeschieden werden, im Blut. Darunter auch einige Stoffwechselintermediate des Kynurenin-Synthesewegs, die partiell für die Nierenfehlfunktionen verantwortlich sind (Pawlak *et al.*, 2001). Darüber hinaus wurden bei vielen Krankheitsbildern, die mit schweren neurologischen Fehlfunktionen assoziiert sind, erhöhte Konzentrationen von Tryptophanmetaboliten beim Menschen gefunden. Dazu zählen beispielsweise Parkinson, Alzheimer, Multiple Sklerose, Chorea Huntington und das Tourette-Syndrom (Okuda *et al.*, 1998; Stone, 2001).

5.1.7 ABCG1 und ABCG2 als humane Homologe von White

Aufgrund von Sequenzähnlichkeiten wurde ABCG1 bereits mehrfach als humanes Homolog zu *Drosophila* White beschrieben (s. 1.1). Da jedoch ABCG2, genauso wie White, am Transport von Riboflavin beteiligt ist, wäre dieses Protein möglicherweise der passende Kandidat aus der ABCG-Unterfamilie für das humane Homolog von W. Durch mehrere *in vivo* Experimente wurde im Rahmen dieser Dissertation und einer vorhergehenden Diplomarbeit (Daller, 2005) gezeigt, dass sowohl ABCG1 als auch ABCG2 zwar auf RNA-Ebene in *Drosophila* exprimiert werden können, jedoch beide nicht in der Lage sind, die Funktion von W zu übernehmen und eine Pigmentierung der Komplexaugen hervorzubringen (s. 4.1.9). Möglicherweise können die humanen Gene in der Fliege zwar transkribiert und translatiert werden, aber die Homologie der Proteine zu W ist zu gering für die Übernahme seiner Funktion. Bei strukturellen Unterschieden in Proteinbereichen, die für den Transport von Pigmentvorstufen von Bedeutung sind, könnte die Funktion von ABCG1 bzw. ABCG2 in *Drosophila* beeinträchtigt werden. Darüber hinaus ist W im Komplexauge nicht in der Lage, als Homodimer zu arbeiten, während ABCG1 vermutlich als Heterodimer mit ABCG4 agiert (Cserepes *et al.*, 2004). Möglicherweise würde ABCG1 einen passenden Dimerisationspartner benötigen, um die entsprechenden Pigmentvorstufen transportieren zu können. Wenn das humane Protein nicht mit Scarlet oder Brown dimerisieren kann, könnte dies zur Folge haben, dass ABCG1 nach der Translation nicht stabil in die Membran integriert und daher wieder abgebaut wird. ABCG2 funktioniert stattdessen bekanntermaßen als Homodimer oder als Homotetramer (Xu *et al.*, 2004). ABC-Transporter aus *Drosophila* sind allerdings in intrazellulären Strukturen lokalisiert, die humanen Proteine hingegen in der Plasmamembran. Vermutlich wird ein spezifisches Signal für die richtige Lokalisierung von ABCG2 benötigt, das in der Taufliege nicht vorhanden ist. Die Transportrichtung sollte hingegen kein Problem darstellen. Humane ABC-Transporter sind bekanntermaßen Exporter, die Substrate aus dem Zytoplasma in den Extrazellularraum transportieren. Die entsprechenden Proteine in *Drosophila* sind zwar offensichtlich Importer, exportieren jedoch die Substanzen ebenfalls aus dem Zytoplasma in das Lumen von intrazellulären Vesikeln.

Kürzlich wurde publiziert, dass auch die Proteine ABCG1 und ABCG4 aus Mäusen nicht in der Lage sind, die Pigmentierung der Augen in *Drosophila* wiederherzustellen (Tarr *et al.*, 2009), was die Experimente der vorliegenden Dissertation bestätigt.

5.2 Etablierung von Lipidanalysemethoden

Es ist bekannt, dass einige humane ABC-Transporter in den Lipidtransport involviert sind (s. 1.1). Um entsprechende Proteine in der Taufliege zu erforschen, sollten im Rahmen dieser Arbeit verschiedene Methoden der Lipidanalyse für *Drosophila* etabliert werden. Am Institut für Klinische

Chemie und Laboratoriumsmedizin (Klinikum der Universität Regensburg) standen dafür die drei Methoden Dünnschichtchromatographie (DC), Gaschromatographie (GC) und Massenspektrometrie (MS) zur Verfügung (s. 4.2). Dabei sollte primär ein Überblick über die Verteilung und den Gehalt verschiedener Lipidspezies am Gesamtlipid von *Drosophila melanogaster* geschaffen werden. Außerdem können durch Analysen von entsprechenden Mutanten und *knock-down*-Fliegen der *Drosophila* ABCA- und ABCG-Proteine möglicherweise besonders interessante ABC-Transporter mit deutlichen Auswirkungen auf das Lipidspektrum identifiziert werden.

5.2.1 Analyse der Lipide im Wildtyp Canton S

Im Rahmen dieser Arbeit ist es gelungen, die drei Methoden Dünnschichtchromatographie, Gaschromatographie und Massenspektrometrie zur Analyse von Lipidgehalt und -zusammensetzung der Taufliege *Drosophila melanogaster* zu etablieren. Damit kann ein breites Spektrum an Lipidspezies identifiziert und quantifiziert werden.

Die Standardabweichungen bei diesen Analysen sind teilweise jedoch sehr hoch, was möglicherweise durch störende Einflüsse der Kutikula auf die Reproduzierbarkeit bedingt sein könnte, welche auch bei Lipidanalysen später Stadien von *C. elegans* beobachtet wurden (Prof. Gerd Schmitz, persönliche Mitteilung). Auch die nicht auswertbaren Ceramid- bzw. Lysophosphatidylcholin-Werte in der MS (s. 4.2.3) könnten dadurch verursacht sein.

Mithilfe der Dünnschichtchromatographie (DC) wurden Sterole, freie Fettsäuren (freie FS) und Triglyceride (TG) untersucht und verglichen (s. 4.2.1). Im dritten Larvalstadium (3L) und in adulten Männchen des Wildtyps Canton S (CS) machen die TG, wie in den meisten Insekten (Stanley-Samuelson *et al.*, 1988), den Hauptanteil dieser Lipide aus. In adulten Fliegen erhöht sich der Anteil an freien FS für den Energiestoffwechsel. Sterole tragen in beiden analysierten Entwicklungsstadien nur einen geringen Teil zum Gesamtlipid bei.

Die verlässliche Auswertung der Phospholipide (PL) anhand der DC-Daten war nicht möglich, da die detektierten Lipide den im Standard enthaltenen Substanzen nicht genau zugeordnet werden konnten. Daher wurde für diese Analysen die Massenspektrometrie (MS) verwendet, womit sowohl die Summe der PL als auch deren Verteilung analysiert werden konnte (s. 4.2.3). Phosphatidylethanolamin (PE) ist mit über 50% das dominierende Phospholipid in Larven (3L), gefolgt von Phosphatidylcholin (PC) und Phosphatidylinositol (PI). Die weiteren PL Sphingosylphosphoethanolamin (SPE), Phosphatidylserin (PS) und Phosphatidylglycerol (PG) sind jeweils zu weniger als 10% detektierbar. In adulten Fliegen ist PE ebenfalls mit einem Anteil von mehr als 50% am stärksten vertreten.

Die Summe und die Verteilung der Gesamt-FS wurden anhand von Gaschromatographie (GC) untersucht (s. 4.2.2). Die prominentesten FS in Larven und adulten Fliegen sind Myristin-, Palmi-

tin-, Palmitolein-, Öl- und Linolsäure mit einem Gehalt von jeweils 10 bis 30% (s. 4.2.2). Laurin-, Myristolein-, Stearin- und α -Linolensäure tragen max. 7% zu den Gesamt-FS bei. Zu einem geringen Anteil konnten FS mit einer Kettenlänge über 18 detektiert werden (s. Tabelle 17), die in Spuren auch in der Futterquelle vorhanden sind. Im Adultstadium kommt es im Vergleich zum Larvalstadium zu einer Verkürzung der Fettsäuren und zu einer Änderung des Desaturierungsgrads. Außerdem ist eine Verschiebung der Ratio von Omega-3- zu Omega-6-Fettsäuren durch eine Reduktion von Linolsäure zu beobachten.

Eine Gegenüberstellung dieser Ergebnisse mit Werten aus der Literatur ist ausgesprochen schwierig, da bisher keine vergleichbaren Experimente zu Gesamtlipidgehalt und -verteilung auf Standardmedium durchgeführt wurden. Es konnte jedoch bestätigt werden, dass Lipide in *Drosophila* allgemein aus kürzeren FS als im Säuger bestehen (Rietveld *et al.*, 1999).

Durch den hohen Gehalt an Triglyceriden in *Drosophila* repräsentiert die im Rahmen der vorliegenden Dissertation festgestellte Verteilung der Gesamt-FS primär die Fettsäuren in der Speicherform der Lipide. Bei der Untersuchung einzelner Ge- webe oder Phospholipide würde sich eine andere Verteilung ergeben. Jones und Kollegen (1992) haben z.B. die FS-Zusammensetzung der lysosomalen Phospholipide in Larven und frühen Puppen untersucht und dabei je nach PL-Spezies drastische Unterschiede festgestellt. In den einzelnen PL waren außerdem nur sehr geringe Anteile an FS mit weniger als 16 C-Atomen detektierbar. Auch in den verschiedenen PL bzw. Triglyceriden in Köpfen von *Drosophila* wurden unterschiedliche Verteilungen der FS verzeichnet (Stark *et al.*, 1993). In Phospholipiden embryonaler Membranen sind die FS wiederum anders verteilt (Abb. 88; Rietveld *et al.*, 1999).

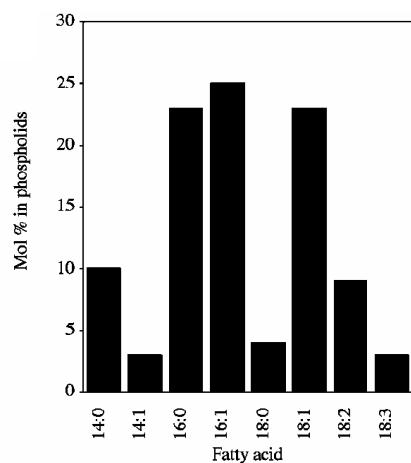


Abb. 88: Länge und Sättigungsgrad der Fettsäuren in Phospholipiden embryonaler Membranen. Rietveld *et al.*, 1999.

Wenn *Drosophila* nicht auf Standardmedium, sondern auf einer lipidfreien Futterquelle gehalten wird, ist Ölsäure (C 18:1) mit 30% die dominierende Fettsäure in Larven des Wildtyps CS vor Palmitin- (C 16:0) und Palmitoleinsäure (C 16:1) mit jeweils 25% und Myristinsäure (C 14:0) mit 10%. Zusätzlich wurde gezeigt, dass *Drosophila* in der Lage ist, Laurin- (C 12:0), Myristolein- (C 14:1) und Stearinäure (C 18:0) zu synthetisieren (McKechnie und Geer, 1993). Somit war bekannt, dass *Drosophila* nur Fettsäuren mit einer Kettenlänge von maximal 18 C-Atomen *de novo* synthetisieren und gesättigte FS ausschließlich an Position 9 desaturieren kann (Abb. 89), weshalb nach Haltung auf lipidfreiem Medium keine mehrfach ungesättigten FS

(PUFAs, *polyunsaturated fatty acids*) detektierbar sind. Somit müssen Linol- (C 18:2) und α -Linolensäure (C 18:3), wie beim Menschen, mit der Nahrung aufgenommen werden. Die Taufliege kann sich jedoch auch in Abwesenheit dieser beiden PUFAs entwickeln (Stanley-Samuelson *et al.*, 1988).

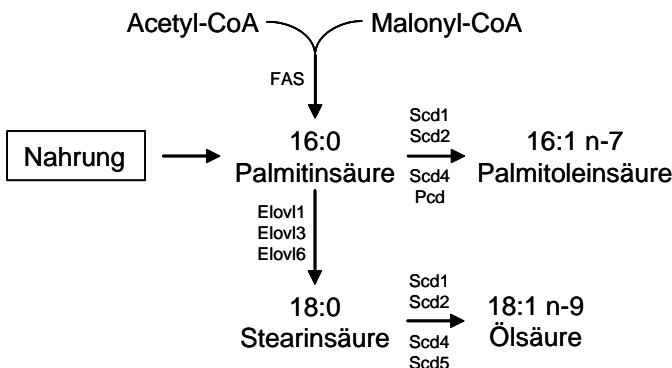


Abb. 89: Synthese von gesättigten und einfach ungesättigten Fettsäuren. Bildung von Fettsäuren durch Desaturierung und Elongation ausgehend von diätischer und *de novo* synthetisierter Palmitinsäure. CoA: Coenzym A; ElovL: *elongation of very long chain fatty acids-like*; FAS: Fettsäure Synthase; Pcd: Palmitoyl-CoA Desaturase; Scd: Stearyl-CoA Desaturase. Nach Vance und Vance, 2008.

Nach Zugabe einzelner FS zu diesem Minimalmedium erhöht sich im Normalfall der Anteil der entsprechenden FS, aber auch anderer FS, die daraus hergestellt werden können. Interessanterweise führt nur die Applikation von Palmitinsäure nicht zu einer Erhöhung ebendieser Fettsäure, stattdessen werden verstärkt die kürzeren FS C12 bzw. C14 gebildet (McKechnie und Geer, 1993).

Durch diese Studie wurde außerdem gezeigt, dass der Wildtyp CS α -Linolensäure (C 18:3) aus keiner anderen FS synthetisieren kann, Linolsäure (C 18:2)

jedoch geringfügig aus Palmitoleinsäure (C 16:1) hergestellt wird. Bemerkenswerterweise werden nach Zugabe bestimmter FS andere FS vollständig eliminiert. Die Verfügbarkeit von Myristinsäure resultiert z.B. darin, dass weder Myristolein- noch Stearinsäure detektierbar sind. Applizierte Ölsäure eliminiert Stearinsäure, während die Zugabe von α -Linolensäure dazu führt, dass Laurin-, Myristin- und Stearinsäure nicht mehr synthetisiert werden.

Bei diesen Experimenten wurden jedoch signifikante Unterschiede in der Verteilung der FS zwischen Canton S und dem weiteren Wildtypstamm OD4, welcher 10 Jahre vor der Durchführung der Studie aus einem eingefangenen Weibchen etabliert wurde, beobachtet (McKechnie und Geer, 1993).

Es sind einige starke Ähnlichkeiten zwischen der Taufliege und dem Säuger, bezogen auf den Lipidmetabolismus, bekannt. Membranen in *Drosophila* beinhalten beispielsweise so genannte Lipid Raft Mikrodomänen, die ihrem Pendant im Säuger gleichen. Diese Lipid Rafts sind dicht gepackte Bereiche, in welchen sich die Lipidzusammensetzung vom Rest der Membran unterscheidet (Rietveld *et al.*, 1999).

In *Drosophila* kontrolliert Phosphatidylethanolamin die Freigabe des *sterol regulatory element-binding protein* (SREBP) aus Zellmembranen von *Drosophila*, welches eine rückkoppelnde Kontrolle auf die Synthese von Fettsäuren und Phospholipiden ausübt. Im Säuger wird SREBP zwar

von Sterolen kontrolliert, der Mechanismus dieser Regulation ist jedoch hochkonserviert (Dobrosootskaya *et al.*, 2002).

Ein bezeichnender Unterschied zwischen *Drosophila* und dem humanen System ist das Auftreten von Sphingosylphosphoethanolamin (SPE) in der Taufliege anstelle von Sphingomyelin.

5.2.2 Die Variabilität der Lipide in Wildtypstämmen

Durch Lipidanalysen verschiedener Wildtypstämme sollte eine Einschätzung der Variabilität der Lipidspezies in *Drosophila* ermöglicht werden, um Effekte in Mutanten besser beurteilen zu können. Dabei stellte sich heraus, dass die acht überprüften Stämme zwar einen ähnlichen Proteingehalt haben (zwischen 85 und 100%), sich aber vor allem in der Summe der Gesamt-FS signifikant voneinander unterscheiden (s. 4.2.4). Zwei CS-, drei Oregon R-Stämme (OR) und RAL-555 zeigen im Vergleich zur Standardkontrolle CS starke Reduktionen im Gehalt an FS um bis zu 70%. Die Reduktion der FS ist in allen Wildtypen primär auf eine entsprechend starke Verringerung der TG zurückzuführen. Von den untersuchten Stämmen hat nur Berlin K (BK) einen mit CS vergleichbar hohen Gehalt an Gesamt-FS und TG, weist aber abweichend von CS eine Erhöhung der freien FS auf. BK ist auch in der Verteilung der FS der in dieser Arbeit verwendeten Standardkontrolle am ähnlichsten, während sich alle anderen Stämme stark unterscheiden. In einigen Wildtypen ist eine Verschiebung in den längerkettigen ungesättigten Bereich zu beobachten. Bezeichnenderweise wird dadurch in CS-1 sogar Myristinsäure als stärkster Vertreter der FS von Linolsäure ersetzt. Auch der Anteil an PL variiert in den getesteten Stämmen. In der Verteilung der PL sind bei den Wildtypen primär Unterschiede im Gehalt an Phosphatidylcholin (PC) und Sphingosylphosphoethanolamin (SPE) zu verzeichnen.

Diese zum Teil dramatischen Schwankungen im Lipidgehalt verlangen eine ausführliche Analyse. Als Ursachen für die identifizierten Unterschiede kommen Futterzusammensetzung, Aufzucht, Haltung oder der genetische Hintergrund in Frage. Die in dieser Arbeit untersuchten Stämme wurden daher generell auf dem *Drosophila* Standardmedium (s. 2.1.2.4) gehalten. Zur Überprüfung von Effekten durch die Nahrung wurden drei Fliegenstämme auf unterschiedlichen Futterquellen aufgezogen und anschließend untersucht. Die Ergebnisse werden im folgenden Abschnitt diskutiert, sind aber für die Unterschiede bei den Wildtypstämmen nicht relevant. Aufzuchtbedingungen, wie z.B. Stress durch überfüllte Zuchtgefäß, könnten ebenfalls einen Einfluss auf den Lipidgehalt haben, weshalb Fliegen für Lipidexperimente unter kontrollierten Bedingungen aufgezogen wurden (s. 3.5). Auch während der Entwicklung und der Alterung der Taufliege ändert sich die FS-Zusammensetzung (Green und Geer, 1979), daher wurden die adulten Männchen immer nach 7 Tagen analysiert.

Die jahrelange unnatürliche Haltung im Labor mit genau definierter, einseitiger Futterzusammensetzung bei stets gleicher Temperatur und Luftfeuchtigkeit sowie einem 12:12-Stunden hell-dunkel Zyklus hat vermutlich ebenfalls einen großen Einfluss auf den Lipidgehalt, den Stoffwechsel und das Verhalten der Fliegen. Dazu kommt der Inzuchtfaktor, wodurch sich genetische Veränderungen schnell durchsetzen können, was bedeutet, dass der genetische Hintergrund als einer der plausibelsten Gründe für die unterschiedlichen Lipidwerte erscheint. Dies macht die Interpretation der beobachteten Phänotypen in Mutanten besonders schwierig. Vermutlich sind auch in anderen Modellorganismen drastische Unterschiede in der Lipidzusammensetzung von mehreren Wildtypstämmen zu beobachten.

Vor allem in CS-1 wurden erhöhte Anteile an ungesättigten FS festgestellt. Ein höherer Gehalt dieser Spezies in Triglyceriden von poikilothermen Organismen wurde oft als Anpassung an Kälte interpretiert. Bei niedrigen Temperaturen wird so die Aufrechterhaltung der Fluidität in Speicherlipiden gewährleistet. In *Dolycoris baccarum* und *Piezodorus lituratus* (Heteroptera: Pentatomidae) wurden beispielsweise entsprechende Veränderungen in der Verteilung der FS während der Diapause beobachtet (Bashan und Cakmak, 2005). Die langkettigen FS-Spezies Stearin-, Linol- und α -Linolensäure haben außerdem einen Einfluss auf die Lebensspanne von *Drosophila* unter Stressbedingungen (McKechnie und Geer, 1993).

Die Wildtypstämme zeigen aufgrund von Unterschieden im Gehalt an Speicherlipiden vermutlich andere Lebenskurven oder verschiedene Verhaltensweisen, beispielsweise in Kletterversuchen oder in der circadianen Rhythmik. Kürzlich wurde publiziert, dass w^{118} -Weibchen im Vergleich zur Kontrolle OR eine verlängerte Lebensspanne aufweisen, wobei die mittlere Lebenserwartung von OR auf Standardmedium mit 27,1 Tagen angegeben wurde, im Gegensatz zu w^{118} mit 45,5 Tagen (Abb. 90 A; Oxenkrug, 2010). Eine wildtypische Lebenskurve auf Standardmedium hat jedoch normalerweise einen anderen Verlauf (Abb. 90 B). Außerdem wurde für den Wildtyp CS eine weitaus längere Lebenserwartung beschrieben (mittlere Lebensspanne ♂: 66 Tage; ♀: 53 Tage; Bauer *et al.*, 2004). Die Beobachtung von G. Oxenkrug könnte möglicherweise auf einen reduzierten Lipidgehalt in dem verwendeten OR-Stamm zurückzuführen sein. Dieser wurde, wie zwei der in dieser Arbeit getesteten OR-Stämme, vom Bloomington *Drosophila* Stock Center bezogen.

Zur genaueren Analyse des wildtypischen Lipidgehalts und seiner Zusammensetzung müssten Fliegen aus der freien Wildbahn untersucht werden. Dabei sind jedoch in Anbetracht der oben genannten Resultate starke regionale und saisonale Unterschiede zu erwarten.

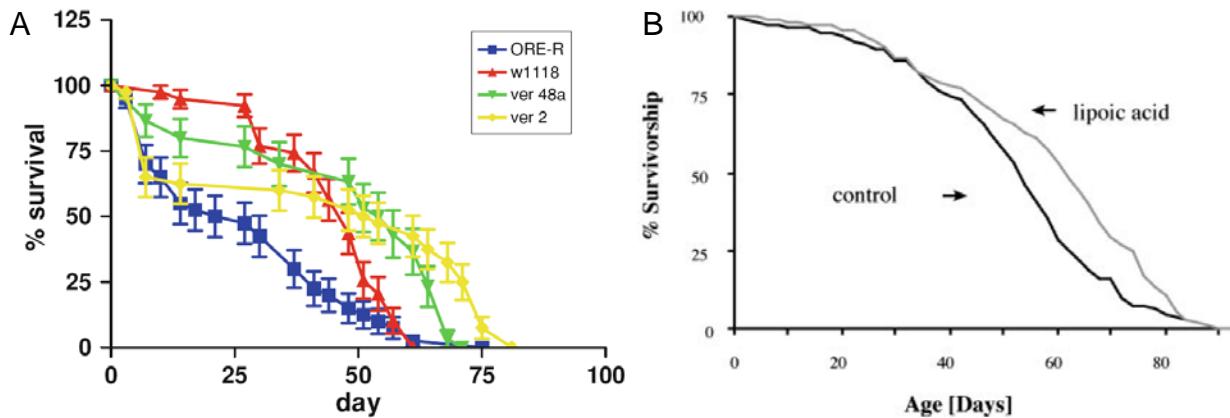


Abb. 90: Lebensspannen von Oregon R und Canton S auf Standardmedium. A: Weibchen von Oregon R zeigen eine kürzere mittlere Lebensspanne (27 Tage) als white- und vermillion-Mutanten (Oxenkrug, 2010). B: Die mittlere Lebensspanne von Canton S-Weibchen beträgt 53 Tage (schwarze Kurve, Bauer *et al.*, 2004). ORE-R: Oregon R; ver: vermillion.

Diese Ergebnisse zeigen, dass verschiedene Wildtypstämme eine hohe Variabilität im Gehalt und in der Zusammensetzung der Lipide aufweisen. Auch in Stämmen mit putativ identischem genetischen Hintergrund sind große Unterschiede vorhanden. Die drastischen Schwankungen in den Wildtypstämmen sind bei der Auswertung der Lipidanalysen von verschiedenen Mutanten zu berücksichtigen, da in den meisten Mutanten der genetische Hintergrund und somit die entsprechende Kontrolle unbekannt ist. Daher ist es wichtig, Unterschiede in Mutanten auf verschiedene Arten zu überprüfen, beispielsweise durch *Rescue*-Experimente, einen gezielten *knock-down* oder durch Untersuchung verschiedener Allele einer Mutation. Nur so kann eine mutationsspezifische Lipidveränderung sicher nachgewiesen werden. Im Rahmen der vorliegenden Dissertation konnte dies jedoch mangels verfügbarer Fliegenstämme nicht für alle Mutanten durchgeführt werden.

5.2.3 Lipidanalysen nach Aufzucht auf verschiedenen Futterquellen

In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Nahrungsquellen untersucht und dabei drastische Unterschiede festgestellt. Das käuflich erwerbbare *instant*-Futter hat dabei einen weitaus geringeren Fettsäure- und Phospholipidgehalt als das am Lehrstuhl hergestellte Standardmedium (s. 4.2.5).

Trotzdem zeigt der Wildtyp CS nach der Aufzucht auf den beiden Futtervarianten keine signifikanten Unterschiede in Proteingehalt, Gehalt an Gesamt-FS und Gesamt-PL. Die Fliegen sind also auch auf dem *instant*-Futter ausreichend mit den entsprechenden Nährstoffen versorgt (s. 4.3.3).

Drosophila ist nicht in der Lage, Sterole zu synthetisieren, sondern ist auf deren Verfügbarkeit in der Nahrung angewiesen. Der reduzierte Gehalt an Sterolen im *instant*-Futter zeigt sich geringfügig auch in CS, *st*¹ und *w*¹¹¹⁸ nach Haltung auf diesem Medium.

Laurin- und Myristoleinsäure wurden in den Futterquellen nicht detektiert. Wie bereits berichtet, kann *Drosophila* diese FS aus anderen Molekülen synthetisieren (s. 5.2.1). Myristin-, Palmitin-, Palmitolein- und Stearinsäure sind in den Nahrungsquellen zu unterschiedlichen Anteilen vorhanden, was aber keinen Einfluss auf die Fliegen hat. Ölsäure ist im normalen Medium etwas stärker vertreten, aber in *w*¹¹¹⁸ nach Haltung auf *instant*-Futter signifikant höher als nach Aufzucht auf dem Standardmedium. Stearin-, Linol- und α -Linolensäure sind in *w*¹¹¹⁸, egal auf welcher Futtervariante, erhöht. Linolsäure ist im *instant*-Futter im Vergleich zum Standardmedium reduziert, was sich in CS und *st*¹ zeigt.

Der größere Anteil von PC im *instant*-Futter spiegelt sich in den Fliegen nicht wider. In CS und *st*¹ ist PC sogar verringert, wenn die Tiere auf dieser Futtervariante gehalten wurden. SPE ist zwar in den beiden Medien nicht detektierbar und muss somit von den Fliegen synthetisiert werden, in CS und *st*¹ ergibt sich jedoch eine Erhöhung von SPE nach Haltung auf *instant*-Futter, welcher im Gegensatz zur Reduktion von SPE in *st*¹ auf dem normalen Medium steht. Der Gehalt an Phosphatidylethanolamin (PE) ist im Standardmedium niedriger als im *instant*-Futter, in *w*¹¹¹⁸ auf *instant*-Futter ist PE jedoch signifikant erhöht. Phosphatidylserin (PS) ist in beiden Futterquellen zu gleichen Anteilen vertreten und in den Fliegen sind ebenso keine Unterschiede detektierbar. Lysophosphatidylcholin (LPC) ist zwar im Standardmedium erhöht, in CS jedoch höher nach Haltung auf *instant*-Futter.

Diese Ergebnisse zeigen, dass sich durch die Aufzucht auf zwei komplett verschiedenen Futtervarianten zwar leichte Unterschiede in den adulten Fliegen ergeben, *Drosophila* aber großteils in der Lage ist, die Unterschiede im Futter auszugleichen. Möglicherweise müssten die Tiere über mehrere Generationen auf dem *instant*-Futter gehalten werden, um Effekte, wie Veränderungen in der Verteilung der FS und PL, beobachten zu können.

5.2.4 Der Einfluss von *white*, *scarlet* und *brown* auf Lipidgehalt und Lipidzusammensetzung

Verschiedene Funktionen der ABC-Transporter White (W), Scarlet (St) und Brown (Bw) wurden bereits unter 5.1 diskutiert. Da humane ABCG-Transporter in den Lipidtransport involviert sind und entsprechenden Mutationen lipidassoziierte Krankheiten, wie z.B. Sitosterolämie (ABCG5 und ABCG8), verursachen (s. 1.1), wurden Mutanten der homologen Proteine aus *Drosophila* auf Veränderungen des Lipidgehalts und seiner Zusammensetzung untersucht (s. 4.3).

Geringfügige Unterschiede zu CS im Gehalt an Lipiden, die möglicherweise *white* zugeschrieben werden können, sind bereits im dritten Larvalstadium (3L) zu beobachten. Sowohl in w^{1118} als auch in w^1 sind die Gesamt-PL reduziert und die Triglyceride erhöht.

Weitaus größere Unterschiede sind jedoch in adulten Fliegen festzustellen. Reduktionen der Gesamt-FS, der freien FS und der TG konnten in w^{1118} , in w^1 , im *white-knock-down* mit der Linie des VDRC sowie in w^{1118} auf *instant*-Futter bestätigt werden. Dasselbe gilt für eine Verringerung von Myristinsäure zugunsten von Linol- und α -Linolensäure. Eine zusätzliche Erhöhung von Stearinsäure konnte dabei ausschließlich in w^{1118} und im *knock-down* verzeichnet werden. Letzterer zeigt jedoch weitere signifikante Unterschiede zur Kontrolle. Die Erhöhung der beiden FS Linol- und α -Linolensäure bedeutet, dass *w*-Mutanten entweder einen verhältnismäßig höheren Anteil dieser FS aufnehmen oder dass sie nicht in der Lage sind, diese FS in einem wildtypischen Maß zu metabolisieren. Der Versuch, die Veränderungen von *white* mit einem UAS-Konstrukt und dem Treiber *da-GAL4* zu retten, war aufgrund von abweichenden Ergebnissen in den Kontrollen sowie im *Rescue* nicht aufschlussreich. Möglicherweise ergeben sich durch die Fehlexpression von *mini-white* zusätzliche Einflüsse, welche sich aber je nach Stärke und Ort der Expression unterschiedlich äußern. Das würde auch von den Mutanten abweichende Ergebnisse im *knock-down* erklären.

Anhand dieser Experimente konnte nachgewiesen werden, dass *white* den Lipidgehalt und seine Zusammensetzung beeinflusst. Diese Information ist von besonderer Bedeutung, da die *w*-Mutante w^{1118} von vielen Arbeitsgruppen als Wildtypkontrolle verwendet wird. Veränderungen im Lipidmetabolismus sowie zahlreiche weitere Phänotypen, die mit *white* assoziiert sind (s. 5.1), zeigen, dass w^{1118} keine geeignete Kontrolle darstellt.

Adulte Männchen der *bw*-Mutante bw^1 weisen einen reduzierten Gehalt an Protein und an Gesamt-FS auf. Letztere sind durch Verringerungen der freien FS und der TG verursacht. Auch die Verteilung der FS ist in bw^1 anders als in CS. Dabei können jedoch nur die Gesamt-FS und die FS-Verteilung mit UAS-*bw* und dem Treiber *da-GAL4* gerettet werden. Möglicherweise ist mit dem Treiber *da-GAL4* nur ein partieller *Rescue* möglich, wodurch die Fettsäuren in anderer Form gespeichert werden. Außerdem verhalten sich die entsprechenden Kontrollen im bw^1 -Hintergrund signifikant anders als bw^1 . Möglicherweise spielt dabei wiederum die Fehlexpression von *white* eine Rolle. Der gezielte *knock-down* von *bw* erbrachte ebenfalls von der Mutante abweichende Ergebnisse. Bei der Analyse von drei weiteren *bw*-Allelen stellte sich heraus, dass diese vollkommen andere Lipidphänotypen zeigen als bw^1 , also sind die beobachteten Unterschiede nicht auf Mutationen in *bw* zurückzuführen.

In der Doppelmutante *cnbw* (*cn¹ bw¹*) sind Gesamt-FS, freie FS und TG ebenso reduziert, wie in bw^1 , die Verteilung der FS stimmt hingegen nicht überein. Auch die Verteilung der Lipide in der Doppelmutante *bwst* (*bw¹; st¹*) ist nicht mit bw^1 vergleichbar. Drastische Unterschiede im

Lipidgehalt sind zwischen *bwst* und dem aus *bw¹* und *st¹* neu hergestellten Stamm *bwst-2* zu verzeichnen. Zusätzlich zeigt *bwst*, vermutlich aufgrund von Defekten der Photorezeptorzelle R8, eine starke Degeneration der Retina (s. 4.1.8). Durch histologische Analyse von *bwst-2* sollte überprüft werden, ob dieser Phänotyp auf die Kombination der beiden Allele *bw¹* und *st¹* zurückzuführen ist. Dieser neue Stamm zeigt jedoch keine Retinadegeneration, was beweist, dass es sich dabei um einen sekundären Effekt im *bwst*-Stamm handelt. Vermutlich sind nach zahlreichen Generationen im Labor neben *bw* und *st* zusätzliche Gene mutiert, welche diesen Phänotyp hervorrufen, was auch die drastischen Unterschiede in Lipidgehalt und -verteilung erklären würde.

In *st¹* wurden keine signifikanten Unterschiede zu CS festgestellt, welche durch Analyse auf beiden Futtervarianten oder durch den *knock-down* bestätigt werden konnten. Somit hat *scarlet* vermutlich keinen Einfluss auf den Lipidgehalt.

5.3 Phänotypen von Augenpigmentierungsmutanten

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zahlreiche Augenpigmentierungsmutanten auf Pigmentgehalt sowie auf Lipidgehalt und -zusammensetzung untersucht. Dabei sollte analysiert werden, ob ein Zusammenhang zwischen der Augenpigmentierung und dem Lipidstoffwechsel besteht.

5.3.1 Phänotypen von Enzym-Mutanten

In Mutanten von Enzymen, welche in die Synthese des braunen Pigments involviert sind, ist ausschließlich Xanthommatin reduziert (s. 4.4.1.1). Mutationen in den Genen *v* (*vermilion*) bzw. *cn* (*cinnabar*) verringern den Xanthommatingehalt stärker als Defekte in *kar* (*karmoisin*). Letzteres kodiert für die Phenoxazinon Synthetase, welche den finalen Schritt der Synthese des Pigments katalysiert (s. 1.2.1). Da das Endprodukt selbst auch in der Lage ist, 3-OHK zu oxidieren, ist in *kar²* mehr Xanthommatin detektierbar als in den Mutanten *v¹* und *cn¹*. Die Enzyme *Pu* (Punch) und *Pr* (Purple) hingegen sind an der Drosopterin-Synthese beteiligt, was sich in den entsprechenden Mutanten zeigt. In *pr¹* kann jedoch mehr Drosopterin gebildet werden als in *Pu¹*. Außerdem ist in beiden Mutanten eine signifikante Reduktion des Xanthommatingehalts zu beobachten, was in *pr¹* auf eine geringere Augengröße (s. Abb. 57) zurückzuführen sein könnte. Möglicherweise gibt es in diesen Mutanten Effekte, wie den erhöhten Gehalt an 3-OHK in Malpighischen Gefäßen von *bw*-Fliegen (s. 5.1.1), die indirekt den Xanthommatingehalt beeinflussen.

Durch einen *knock-down* von *cn* kann der Phänotyp von *cn*¹ partiell erzeugt werden. Bei RNAi-*kar* fällt auf, dass die ubiquitäre Herunterregulierung mit *actin-GAL4* besser funktioniert als der augenspezifische *knock-down* mit *GMR-GAL4*. Die Aktivität dieses Enzyms wird jedoch in den Pigmentgranula der Komplexaugen erwartet. Möglicherweise exprimiert *actin-GAL4* in den Pigmentzellen stärker als *GMR-GAL4*.

Bei dem Gen CG9542 wurde vermutet, dass es für die Kynurenin Formamidase, welche die Konvertierung von Formyl-Kynurenin zu Kynurenin durchführt, kodiert. In diesem Fall würde man jedoch bei einem *knock-down* eine Reduktion von Xanthommatin erwarten, was nicht beobachtet werden konnte. Das deutet darauf hin, dass entweder die RNAi-Linie nicht funktionsfähig ist oder CG9542 nicht das strukturelle Gen für dieses Enzym darstellt.

Da Pigmentvorläufer im Fettkörper synthetisiert und während der Puppenphase von den Pigmentzellen aufgenommen werden (Kretzschmar *et al.*, 2000), wäre es denkbar, dass Mutationen in Enzymen, welche diese Intermediate metabolisieren, einen Einfluss auf den Lipidgehalt haben. Für die Synthese von Kynurenin in Larven ist beispielsweise primär der Fettkörper von Bedeutung (Summers *et al.*, 1982), weshalb die Aktivität von entsprechenden Enzymen wie Vermilion in diesem Organ sehr hoch ist (Walker *et al.*, 1986). Auch die Involvierung von Punch in frühe nukleäre Teilungen und die Chromosomentrennung (Chen *et al.*, 1994) könnte unter anderem den Lipidgehalt beeinflussen.

Larven und adulte Fliegen der Enzym-Mutanten zeigen im Vergleich zu CS große Veränderungen in Lipidgehalt und -zusammensetzung (s. 4.4.1.2 und 4.4.1.3). Besonders auffällig sind dabei die Reduktion der Gesamt-FS, der freien FS und der TG in allen adulten Männchen sowie eine Verschiebung der FS in den längerketten ungesättigten Bereich. Durch Herunterregulierung von *cn* bzw. *kar* können der reduzierte Gehalt an Gesamt-FS und die Verschiebung der FS bestätigt werden. Letztere ist auch in RNAi-CG9542-Fliegen zu beobachten.

Da diese Phänotypen partiell auch in Wildtypstämmen zu beobachten sind (s. 4.2.4), müssen sie durch Analyse zusätzlicher Allele und *Rescue*-Experimente überprüft werden.

5.3.2 Phänotypen von AP-3-Mutanten

In den Mutanten der Untereinheiten des AP-3-Heterotetramers *cm*¹ (*carmine*), *g*¹ (*garnet*), *or*^{49h} (*orange*) und *rb*¹ (*ruby*) sind sowohl Xanthommatin als auch Drosopterin drastisch reduziert (s. 4.4.2.1). Diese Reduktion der Augenpigmentierung ist vor allem auf eine geringere Anzahl an Pigmentgranula (Abb. 91) zurückzuführen (Ooi *et al.*, 1997). Dass die Gene, wie z.B. *garnet*, ubiquitär exprimiert werden (Lloyd *et al.*, 1999), deutet auf weitere Funktionen in anderen Organen der Fliege hin.

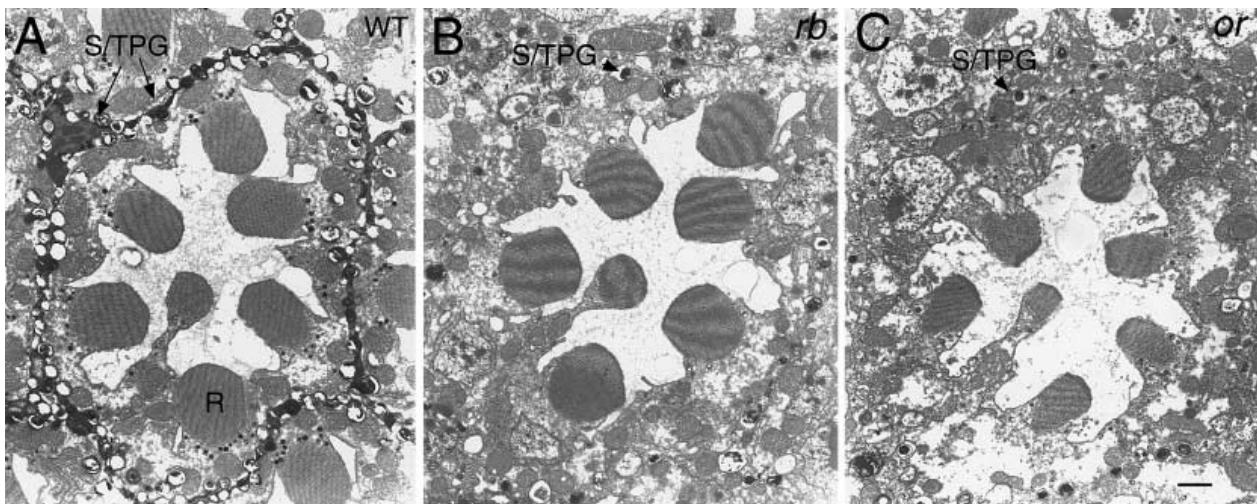


Abb. 91: Analyse der Pigmentgranula im Wildtyp und in AP-3-Mutanten. Elektronenmikroskopische Aufnahmen, die eine tangentiale Sicht auf Augen von CS (A), *rb*¹ (B) und *or*¹ (C) auf R7-Ebene zeigen. Leere Granula in A sind Artefakte aufgrund von starker Zerbrechlichkeit nach der Fixierung. R: Rhabdomer; S/TPG: sekundäre bzw. tertiäre Pigmentgranula. Maßstab: 1,0 µm (Mullins *et al.*, 2000).

Der Proteingehalt ist in den Larven und in den adulten AP-3-Mutanten im Vergleich zu CS stark verringert (s. 4.4.2.2 und 4.4.2.3). Der AP-3-Komplex ist bekanntermaßen in den Transport und die Sortierung von Proteinen involviert (Dell'Angelica, 2009), was offensichtlich einen reduzierten Proteingehalt in den entsprechenden Mutanten zur Folge hat. Zusätzlich zeigt sich in den adulten Männchen aller vier Untereinheiten eine nahezu identische Reduktion der Gesamt-FS, der freien FS sowie der TG. Da diese Phänotypen in allen vier Mutanten auftreten, könnten sie darauf zurückzuführen sein, dass das Fehlen einer Einheit des Komplexes zur Degeneration der verbleibenden Untereinheiten führt (Zhen *et al.*, 1999).

5.3.3 Phänotypen von VPS- und Rab-Mutanten

Die VPS-Gene *carnation* (*car*), *deep orange* (*dor*) und *light* (*lt*) sind Homologe der humanen HOPS-Komplex Komponenten (s. 1.2.4). Die entsprechenden Mutanten *car*¹, *dor*¹ und *lt*¹ (Doppelmutante *light/rolled*; Kontrolle: *rl*¹) zeigen unterschiedlich starke Reduktionen von Xanthommatin und Drosopterin (s. 4.4.3.1). Diesem Phänotyp liegen Beeinträchtigungen in der Biogenese von Pigmentgranula zugrunde (Pulipparacharuvil *et al.*, 2005).

Auch in den Mutanten *ca*¹ und *lt*¹ sind beide Pigmente verringert, da die interagierenden Proteine Claret (Ca) und Lightoid (Ltd) für die Synthese von Pigmentgranula erforderlich sind. Ltd und Ca regulieren vermutlich einen AP-3-unabhängigen Weg der Biogenese von LROs (*lysosome-related organelles*; Ma *et al.*, 2004).

Außerdem sind Lipidphänotypen in den VPS- und Rab-Mutanten zu beobachten (s. 4.4.3.2 und 4.4.3.3). Dabei sind ein erhöhter Gehalt an FS in Larven sowie ein erhöhter Proteingehalt in adulten Männchen von *dor*¹ hervorzuheben. In manchen *dor*-Allelen wurde das Ausbleiben der

Histolyse des larvalen Fettkörpers beobachtet, was dazu führt, dass dieser in den adulten Fliegen verbleibt (Lucchesi *et al.*, 1968). Außerdem zeigen *dor*-Mutanten Defekte in der programmierten Makroautophagie. *Dor* kontrolliert die Makroautophagie indirekt über Ecdyson-Signalling sowie direkt über autolysosomale Fusionen (Lindmo *et al.*, 2006). Demgegenüber steht jedoch eine drastische Reduktion der Gesamt-FS, der freien FS und der TG in adulten Männchen aller getesteten Mutanten dieser Gruppe. Darüber hinaus wurde eine Verschiebung der FS in den längerkettigen ungesättigten Bereich detektiert. Der stärkste Phänotyp wurde dabei jedoch in der Kontrolle *rl*¹ festgestellt, was bedeutet, dass nicht *It* für die Veränderungen in *It*¹ verantwortlich ist. Außer einer Expression von *rolled* im Fettkörper (Berghella und Dimitri, 1996) sind bisher keine Lipidassoziationen im Zusammenhang mit diesem Gen bekannt. Zur Überprüfung und Verifizierung dieser Phänotypen in den Enzym-Mutanten sind somit weitere Experimente nötig.

5.3.4 Phänotypen von sonstigen Mutanten

Als sonstige Mutanten wurden im Rahmen dieser Arbeit *cd*¹ (*cardinal*), *po*² (*pale ocelli*), *p*¹ (*pink*), *pd*¹ (*purpleoid*) und *z*^{a693} (*zeste*) zusammengefasst (s. 1.2.5).

Da *cardinal*-Mutanten zu dem Zeitpunkt, an dem im Wildtyp Xanthommatin synthetisiert wird, eine Erhöhung des 3-OHK Spiegels zeigen, haben Sullivan und Kollegen vermutet, dass *cd* und *karmoisin* zusammen das strukturelle Gen für die Phenoxazinon Synthetase darstellen (Sullivan *et al.*, 1974), was aber nie bestätigt wurde. Da die entsprechenden Mutanten ausschließlich eine Reduktion von Xanthommatin zeigen (s. 4.4.4.1), ist dies durchaus denkbar. In *po*² sowie in *z*^{a693} ist ebenfalls nur das braune Pigment betroffen, jedoch in geringerem Maße. In *p*¹ und *pd*¹ sind sowohl Xanthommatin als auch Drosopterin reduziert, was darauf hindeutet, dass die Proteine Pink und Purpleoid, wie VPS- und AP-3-Proteine, nicht direkt in die Pigmentsynthese, sondern beispielsweise in die Synthese von LROs involviert sind. Pink ist, wie bereits erwähnt, das *Drosophila* Homolog für HPS5, eine humane BLOC-2 Untereinheit.

Vor allem in den adulten Männchen von *po*² und *pd*¹ sind außerdem Lipidphänotypen zu beobachten (s. 4.4.4.3). Dass bisher über diese Proteine sehr wenig bekannt ist, erschwert eine Interpretation dieser Ergebnisse. Geringfügige Unterschiede zu CS, die in *z*^{a693} festzustellen sind, könnten dadurch bedingt sein, dass Zeste die Expression von zahlreichen verschiedenen Genen in allen Entwicklungsstadien beeinflusst (Pirrotta *et al.*, 1988). Das Ortholog zu Pink aus *C. elegans* reguliert den Fettmetabolismus (Syrzycka *et al.*, 2007), was ebenfalls Verschiedenheiten im Lipidgehalt oder der Lipidzusammensetzung in *p*¹ erklären würde.

5.3.5 Interaktionen von Rab-Proteinen, dem AP-3-, dem BLOC-2- und dem HOPS-Komplex

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Komponenten der Komplexe AP-3, BLOC-2 und HOPS sowie Rab-Proteine charakterisiert. Mutationen in diesen Proteinen beeinflussen primär die Augenpigmentierung, haben aber auch teilweise einen Einfluss auf den Lipidgehalt in *Drosophila* (s. 4.4).

Wie bereits einleitend erwähnt, stehen humane Defekte in manchen dieser Proteine im Zusammenhang mit dem Hermansky-Pudlak Syndrom (HPS). HPS entsteht durch Mutationen in verschiedenen Genen, die Bestandteile von Proteinkomplexen mit mehreren Untereinheiten sind, wie z.B. dem AP-3-, dem BLOC-2- oder dem HOPS-Komplex. Auch Rab-Proteine sind mit HPS assoziiert (Raposo und Marks, 2007).

Das Hermansky-Pudlak Syndrom (HPS) ist eine genetisch bedingte multisystemische Krankheit, die von Mutationen verursacht wird, welche mit der Biogenese von LROs, z.B. von Melanosomen, interferieren (Gahl *et al.*, 1998). Melanosomen sind intrazelluläre Organellen, die von Melanozyten der Haut und der Augen generiert werden und für die Synthese und Speicherung von Melanin verantwortlich sind (Raposo und Marks, 2007). Defekte in der Herstellung sowie der Sortierung von Melanosomen sind für den okulokutanen Albinismus der HPS-Patienten verantwortlich (Nguyen *et al.*, 2002; Nguyen und Wei, 2004). Außerdem ist bekannt, dass HPS-Patienten Störungen im Lipidmetabolismus zeigen, nämlich eine Erhöhung des Serum-Cholesterolspiegels (Syrzycka *et al.*, 2007).

Abbildung 92 zeigt schematisch die Entstehung von Melanosomen. Dabei ist der AP-3-Komplex auf Knospen früher Endosomen lokalisiert und spielt eine Rolle am Transport von Tyrosinase zu Lysosomen oder zu neurosekretorischen Granula anderer Zelltypen. BLOC-2 ist an der Regulierung eines weiteren Synthesewegs über Tyrosinase und TYRP1 (*tyrosinase-related protein 1*) beteiligt. Diese beiden Proteine sind auf reifende Melanosomen ausgerichtet und fördern dort die Melanin-Ablagerung. Die Rab GTPasen RAB32 und RAB38 werden unter anderem in Melanozyten exprimiert und beeinflussen die Synthesewege der Melanosomen.

Außerdem interagiert der HOPS-Komplex mit endosomalen SNAREs (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors*) und reguliert entscheidende Interaktionen, die für den Transport von Endosomen zu Lysosomen benötigt werden.

Dieses endosomale System beinhaltet ein umfassendes Netzwerk an Organellen und anderen Einheiten mit wichtigen Aufgaben in der Signaltransduktion, der Aufnahme von Nährstoffen sowie der Zerstörung von Pathogenen. Die komplexen Funktionen dieses Systems konnten bis heute nicht vollständig aufgeklärt werden (Raposo und Marks, 2007).

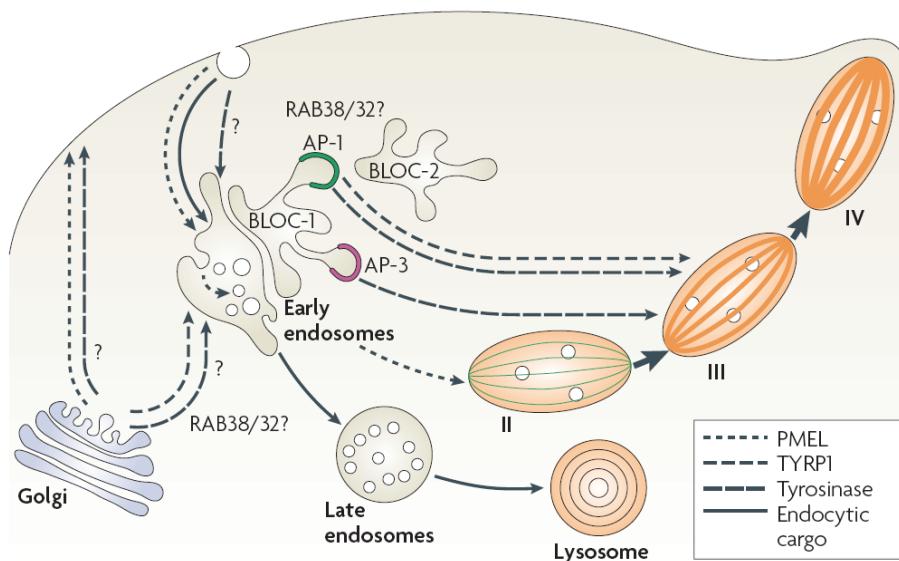


Abb. 92: Modell der Entstehung von Melanosomen. Schematische Darstellung von endosomalen und melanosomalen Organellen aller melanozytischen Stadien und ihrer biosynthetischen, substratabhängigen Transportwege. Alle melanosomalen Ladungen stammen vom Golgi-Apparat ab und überqueren vakuoläre oder tubuläre Elemente entweder direkt oder indirekt über die Zellmembran. PMEL Fibrillen segregieren zu Melanosomen des zweiten Stadiums. Der AP-3-Komplex initiiert einen Endosom-Melanosom Syntheseweg für die Tyrosinase. BLOC-1 und BLOC-2 regulieren einen zweiten *Pathway*, der über Tyrosinase und TYRP1 führt. Tyrosinase und TYRP1 sind ausgerichtet auf reifende Melanosomen, wo sie die Melanin-Ablagerung (orange) fördern. Endozytische Ladungen sind für Lysosomen bestimmt. Die Rab-Proteine RAB32 und RAB38 haben möglicherweise einen Einfluss auf diese Synthesewege. II, III, IV: Entwicklungsstadien der Melanosomen; AP: *adaptor protein*; BLOC: *biogenesis of lysosome-related organelles complex*; PMEL: *melanocyte protein*; RAB: *ras-related in brain*; TYRP: *tyrosinase-related protein* (Raposo und Marks, 2007).

Ein ähnliches Zusammenspiel dieser Komponenten könnte für die Synthese der Pigmentgranula in *Drosophila* verantwortlich sein. Diese sind, wie Melanosomen im Säuger, spezialisierte Formen später Endosomen oder Lysosomen (Lloyd *et al.*, 1998).

Möglicherweise wird der ABC-Transporter White dabei von beteiligten Proteinen, z.B. dem AP-3-Komplex, vom endoplasmatischen Retikulum zu den Granula transportiert und daraufhin durch die Dimerisierungspartner stabil in deren Membran integriert. Das würde erklären, warum in AP-3-Mutanten sowohl Xanthommatin als auch Drosopterin reduziert sind (Lloyd *et al.*, 2002; Dell'Angelica, 2009). Diese Vermutung könnte durch Immunohistochemie mit α -W an den entsprechenden Mutanten überprüft werden. Da diese Gene nicht augenspezifisch, sondern ubiquitär exprimiert werden, sind sie wahrscheinlich an Transportprozessen im ganzen Körper von *Drosophila* beteiligt (Lloyd *et al.*, 2002). Es ist anzunehmen, dass White durch den AP-3-Komplex auch zu den Vesikeln der Malpighischen Gefäße transportiert wird. Eine weitere denkbare Funktion der AP-3-Proteine im Körper der Taufliege wäre, aufgrund der in dieser Arbeit beschriebenen Phänotypen (s. 5.3.2), die Sortierung von Lipiden.

5.4 Charakterisierung der ABC-Transporter Familien ABCA und ABCG

Humane ABC-Transporter spielen bekanntermaßen eine Rolle bei lipidassoziierten Krankheiten (s. 1.1). Um Auswirkungen von Defekten in den *Drosophila* Unterfamilien ABCA und ABCG zu analysieren, wurden die entsprechenden Gene mithilfe des UAS-GAL4-Systems (s. 2.1.2.3) gezielt herunterreguliert. Veränderungen in Lipidgehalt und -zusammensetzung in den entsprechenden Genotypen geben Hinweise auf Funktionen der ABC-Proteine im Transport von Lipiden. Da im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass *white* den Lipidmetabolismus beeinflusst, wurden die *knock-down*-Fliegen nicht wie gewöhnlich im *white*-, sondern im CS-Hintergrund getestet, um einen Effekt von *white* zu vermeiden. Vermutlich hat jedoch auch die Fehlexpression von *mini-white* Auswirkungen auf den Lipidgehalt, wie bereits unter 5.2.4 erörtert. Darüber hinaus ist zu beachten, dass der Transkriptionsfaktor GAL4 aus der Hefe die Expression vieler Gene in *Drosophila*, beispielsweise des ABCA-Gens CG1819, verändert (Liu und Lehmann, 2008), was sich ebenfalls auf den Lipidmetabolismus auswirken könnte. Außerdem ist nicht bekannt, ob und wie stark die verwendeten Konstrukte das entsprechende Gen herunterregulieren.

Über den Großteil der ABCA- und ABCG-Transporter sind bisher kaum Informationen erhältlich, was die Interpretation der Ergebnisse erschwert. Im Folgenden werden Auffälligkeiten hervorgehoben und diskutiert. Dabei wurde in allen RNAi-ABCA- und RNAi-ABCG-Larven eine Erhöhung von Phosphatidylcholin (PC) sowie eine Reduktion von Phosphatidylserin (PS) beobachtet. Diese Effekte lassen sich nur durch den gemeinsamen genetischen Hintergrund dieser Linien erklären.

5.4.1 ABCA-Transporter und der Lipidmetabolismus

Wie bereits einleitend erwähnt (s. 1.1), sind in *Drosophila* zehn ABCA-Transporter bekannt, die bisher nur durch ihre CG-Nummer annotiert sind (Dean *et al.*, 2001).

Der *knock-down* von CG6052 wurde mit zwei verschiedenen Konstrukten durchgeführt, mit gleichem Ergebnis: In Larven ist der Proteingehalt erhöht, während Sterole und TG reduziert sind (s. 4.5.1). In adulten Männchen sind hingegen die Gesamt-FS verringert. Dabei könnte es sich durchaus um einen nennenswerten Lipidphänotyp handeln. Zu diesem Gen existieren bisher jedoch keine Publikationen, die auf eine Involvierung in den Lipidmetabolismus hinweisen. Auch bei RNAi-CG4794 konnten Phänotypen mit zwei unterschiedlichen Linien bestätigt werden. Larven zeigen dabei einen erhöhten Proteingehalt und eine Reduktion der Sterole, adulte Fliegen eine Verringerung der Gesamt-FS und der TG. Es sind jedoch auch signifikante Unter-

schiede in den beiden erhaltenen Genotypen zu beobachten, wie beispielsweise eine starke Erhöhung des Proteingehalts adulter Männchen nur in einem der *knock-downs*. Möglicherweise ist die Effizienz der verwendeten RNAi-Linien unterschiedlich.

Auch bei den *knock-downs* von CG1819, CG1801, CG1494 und CG7491 sind teilweise starke Unterschiede zur Kontrolle festzustellen. Zur Herunterregulierung dieser Gene wurde jedoch nur je eine RNAi-Linie verwendet.

Es ist außerdem zu beachten, dass sich in der Verteilung der PL in Larven auch die beiden Kontrollen signifikant voneinander unterscheiden, was, wie bereits diskutiert (s. 5.2.4), durch die unterschiedliche Expression von *mini-white* verursacht sein könnte.

ABCA1, eines der zwölf Mitglieder der humanen Homologe der ABCA-Unterfamilie, ist bekanntermaßen am Cholesterin- und Phospholipidtransport beteiligt. Die auffälligsten Veränderungen im Gehalt an Phospholipiden in *Drosophila* sind mit RNAi-CG7491 zu beobachten. Unterschiede im Sterolgehalt konnten beim *knock-down* von CG6052 und CG4794 festgestellt werden.

5.4.2 ABCG-Transporter und der Lipidmetabolismus

Die ABCG-Transporter mit 15 Mitgliedern sind die größte ABC-Unterfamilie in *Drosophila* (Dean *et al.*, 2001). Von diesen Proteinen sind, außer White, Scarlet und Brown (s. 1.2.2), bisher nur CG3327 (E23) und CG2969 (Atet) genauer charakterisiert. Mindestens drei der fünf bekannten humanen Homologe sind am Steroltransport beteiligt (s. 1.1).

Die auffälligsten Phänotypen wurden nach Herunterregulierung von *Atet*, einem Gen, das im respiratorischen System exprimiert wird, festgestellt (s. 4.5.2). Der *knock-down* mit einer der verwendeten Linien ist bereits in der frühen larvalen Entwicklung letal, mit der zweiten untersuchten Linie zeigt sich Letalität vor der Verpuppung. Zusätzlich ist in den RNAi-*Atet*-Larven eine sehr starke Erhöhung von Protein- und Lipidgehalt festzustellen. Interessanterweise ist *Atet* im Fettkörper des Larvalstadiums schwächer, der adulten Fliegen hingegen stärker exprimiert als in der ganzen Fliege (Flyatlas). Über einen Zusammenhang von *Atet* mit dem Lipidmetabolismus ist bisher nichts bekannt.

Weitere bemerkenswerte Phänotypen sind nach Herunterregulierung von CG3164 zu verzeichnen. Zusätzlich zu einer Erhöhung der Gesamt-PL konnte eine Verschiebung von Linol- zu Palmitoleinsäure beobachtet werden. Möglicherweise wird Erstere in diesen Larven verstärkt zu Palmitoleinsäure konvertiert oder es wird weniger Linolsäure aufgenommen. Ein vergleichbarer Phänotyp konnte bei den verschiedenen Wildtypstämmen (s. 4.2.4) nicht beobachtet werden. Darüber hinaus führt ein *knock-down* dieses Gens zur Letalität im Puppenstadium. CG3164 ist

also essentiell für den Metabolismus, was entweder einen direkten oder einen indirekten Effekt auf die Lipidverteilung haben kann.

Das Gen CG4822 ist sehr stark im Fettkörper exprimiert (Flyatlas), die entsprechenden *knock-down* Fliegen zeigen jedoch, außer einer Erhöhung der Sterole in Adulten, keine nennenswerten Phänotypen, die mit beiden Konstrukten bestätigt werden konnten. Möglicherweise zeigen die verwendeten RNAi-Linien eine unterschiedliche Effizienz.

Mit den zwei überprüften RNAi-CG9664-Linien wurden in adulten Fliegen unterschiedliche Veränderungen im Vergleich zur Kontrolle beobachtet. Nach dem *knock-down* mit R18_G9664 auf dem X-Chromosom zeigen die Fliegen beispielsweise eine reduzierte Lebensspanne. Vermutlich werden die Konstrukte nicht gleich stark exprimiert oder R19_G9664 ist nicht funktionsfähig. Über CG9664 wurde berichtet, dass es das Verhalten verändert und in den Lipidtransport involviert ist (Sambandan *et al.*, 2008). Worauf dabei jedoch der Link zum Lipidmetabolismus begründet ist, geht aus der Publikation nicht hervor.

Auch in RNAi-E23 sind sowohl in Larven als auch in adulten Fliegen signifikante Veränderungen im Lipidgehalt festzustellen. E23 ist ein negativer Regulator des Ecdysteroid-Signallings (Thummel und Chory, 2002) und wurde in einem Screen als Clock-Protein identifiziert (Matsumoto *et al.*, 2009). Über einen Zusammenhang von E23 mit dem Lipidmetabolismus ist bisher nichts bekannt, das Gen wird jedoch im larvalen Fettkörper stark exprimiert (Flyatlas).

Letzteres wurde auch für CG7346 beschrieben (Flyatlas). Im entsprechenden *knock-down* mit der einen verfügbaren Linie sind sowohl in Larven als auch in adulten Fliegen signifikante Unterschiede zur Kontrolle festzustellen.

Bei diesen Ergebnissen ist aber wiederum zu beachten, dass sich die beiden Kontrollen voneinander unterscheiden (s. 5.4.1). Besondere Verschiedenheiten sind dabei in den adulten Männchen von *w;; da-GAL4/+* nach 2 bzw. 7 Tagen zu beobachten.

Mit keiner der untersuchten RNAi-Linien wurden jedoch nennenswerte Veränderungen des Sterolgehalts beobachtet, was bei einer funktionellen Homologie zu den humanen ABCG-Proteinen zu erwarten wäre.

Insgesamt zeigen die vorliegenden Lipidanalysen, dass nur bei einer sorgfältigen Betrachtung aller genetischen Hintergrund-Effekte relevante Schlüsse gezogen werden können. Die hohe Variabilität bei unterschiedlichen Wildtypstämmen zusammen mit der Beobachtung von gegenläufigen Lipideffekten in mehreren Allelen des gleichen Gens (z.B. *brown*) bedeuten, dass für jeden der ABCA- bzw. ABCG-Transporter ein umfangreiches Repertoire an Kontrollstämmen hergestellt und analysiert werden muss, um eine eindeutige Aussage treffen zu können.

6 Literaturverzeichnis

Aguila J. R., Suszko J., Gibbs A. G., Hoshizaki D. K. (2007). The role of larval fat cells in adult *Drosophila melanogaster*. *J. Exp. Biol.* 210, 956-963.

Albrecht J. (2005). Molekulare und funktionelle Untersuchungen der *scarlet* Mutante in *Drosophila melanogaster*. Diplomarbeit, Universität Regensburg.

Anaka M., MacDonald C. D., Barkova E., Simon K., Rostom R., Godoy R. A., Haigh A. J., Meinertzhagen I. A., Lloyd V. (2008). The *white* gene of *Drosophila melanogaster* encodes a protein with a role in courtship behaviour. *J. Neurogenet.* 22, 243-276.

Arndt S. (2003). ATP-Binding Cassette (ABC)-Transporter in *Drosophila melanogaster*. Diplomarbeit, Universität Regensburg.

Ashrafi K., Chang F. Y., Watts J. L., Fraser A. G., Kamath R. S., Ahringer J., Ruvkun G. (2003). Genome-wide RNAi analysis of *Caenorhabditis elegans* fat regulatory genes. *Nature* 421, 268-272.

Ausubel A. M., Brent R., Kingston R. E., Smith J. A., Seidmann J. G., Struhl D. (1996). Current protocols in molecular biology. John Wiley & Sons, New York.

Bacher A., Eberhardt S., Fischer M., Kis K., Richter G. (2000). Biosynthesis of vitamin B2 (riboflavin). *Annu. Rev. Nutr.* 20, 153-167.

Bartke N., Hannun Y. A. (2009). Bioactive sphingolipids: metabolism and function. *J. Lipid Res.*, supplement S91-S96.

Bashan M., Cakmak O. (2005). Changes in composition of phospholipid and triacylglycerol fatty acids prepared from prediapausing and diapausing individuals of *Dolycoris baccarum* and *Piezodorus lituratus* (Heteroptera: Pentatomidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 98, 575-579.

Bauer J. H., Goupil S., Garber G. B., Helfand S. L. (2004). An accelerated assay for the identification of life-span-extending interventions in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 12980-12985.

Beadle G. W., Ephrussi B. (1936). The differentiation of eye pigments in *Drosophila* as studied by transplantation. *Genetics* 21, 225-247.

Beller M., Oliver B. (2006). One hundred years of high-throughput *Drosophila* research. *Chromosome Res.* 14, 349-362.

Berge K. E., Tian H., Graf G. A., Yu L., Grishin N. V., Schultz J., Kwiterovich P., Shan B., Barnes R., Hobbs H. H. (2000). Accumulation of dietary cholesterol in sitosterolemia caused by mutations in adjacent ABC transporters. *Science* 290, 1771-1775.

Berghella L., Dimitri P. (1996). The heterochromatic *rolled* gene of *Drosophila melanogaster* is extensively polytenized and transcriptionally active in the salivary gland chromocenter. *Genetics* 144, 117-125.

Binder M., Liebisch G., Langmann T., Schmitz G. (2006). Metabolic profiling of glycerophospholipid synthesis in fibroblasts loaded with free cholesterol and modified low density lipoproteins. *J. Biol. Chem.* 281, 21869-21877.

Bingham P. M., Levis R., Rubin G. M. (1981). Cloning of DNA sequences from the *white* locus of *D. melanogaster* by a novel and general method. *Cell* 25, 693-704.

Bleijerveld O. B., Houweling M., Thomas M. J., Cui Z. (2006). Metabolipidomics: profiling metabolism of glycerophospholipid species by stable isotopic precursors and tandem mass spectrometry. *Anal. Biochem.* 352, 1-14.

Bligh E. G., Dyer W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37, 911-917.

Boehm M., Bonifacino J. S. (2001). Adaptins. The final recount. *Mol. Biol. Cell* 12, 2907-2920.

Borycz J., Borycz J. A., Kubów A., Lloyd V., Meinertzhagen I. A. (2008). *Drosophila* ABC transporter mutants *white*, *brown* and *scarlet* have altered contents and distribution of biogenic amines in the brain. *J. Exp. Biol.* 211, 3454-3466.

Brand A. H., Perrimon N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118, 401-415.

Brieger G., Butterworth F. M. (1970). *Drosophila melanogaster*: identity of male lipid in reproductive system. *Science* 167, 1262.

Butterworth F. M. (1969). Lipids of *Drosophila*: a newly detected lipid in the male. *Science* 163, 1356-1357.

Cagan R. L., Zipursky S. L. (1992). Cell choice and patterning in the *Drosophila* retina. In: Shankland M., Macagno E. R.: Determinants of neuronal identity. Academic Press, San Diego.

Campbell J. L., Nash H. A. (2001). Volatile general anesthetics reveal a neurobiological role for the *white* and *brown* genes of *Drosophila melanogaster*. *J. Neurobiol.* 49, 339-349.

Cerstiaens A., Huybrechts J., Kotanen S., Lebeau I., Meylaers K., De Loof A., Schoofs L. (2003). Neurotoxic and neurobehavioral effects of kynurenines in adult insects. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 312, 1171-1177.

Chen H., Rossier C., Lalioti M. D., Lynn A., Chakravarti A., Perrin G., Antonarakis S. E. (1996). Cloning of the cDNA for a human homologue of the *Drosophila white* gene and mapping to chromosome 21q22.3. *Am. J. Hum. Genet.* 59, 66-75.

Chen J. D., Pirrotta V. (1993). Multimerization of the *Drosophila zeste* protein is required for efficient DNA binding. *EMBO J.* 12, 2075-2083.

Chen X., Reynolds E. R., Ranganayakulu G., O'Donnell J. M. (1994). A maternal product of the *Punch* locus of *Drosophila melanogaster* is required for precellular blastoderm nuclear divisions. *J. Cell Sci.* 107, 3501-3513.

Christie W. W., Han X. (2003). Lipid analysis. Isolation, separation, identification and lipidomic analysis. 4th edition. The Oily Press, Bridgwater.

Condò M., Posar A., Arbizzani A., Parmeggiani A. (2009). Riboflavin prophylaxis in pediatric and adolescent migraine. *J. Headache Pain* 10, 361-365.

Croop J. M., Tiller G. E., Fletcher J. A., Lux M. L., Raab E., Goldenson D., Son D., Arciniegas S., Wu R. L. (1997). Isolation and characterization of a mammalian homolog of the *Drosophila white* gene. *Gene* 185, 77-85.

Cserepes J., Szentpétery Z., Seres L., Özvegy-Laczka C., Langmann T., Schmitz G., Glavinas H., Klein I., Homolya L., Váradi A., Sarkadi B., Elkind N. B. (2004). Functional expression and characterization of the human ABCG1 and ABCG4 proteins: indications for heterodimerization. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 320, 860-867.

Daller B. (2005). Molekulare und funktionelle Untersuchungen der ABCG-Transporter Scarlet und White in *Drosophila melanogaster*. Diplomarbeit, Universität Regensburg.

Danneel R., Schumann H. (1966). Farbstoffgehalt und Größe der Augen bei verschiedenen Mutanten von *Drosophila melanogaster*. *Roux' Arch. Entwickl. Mech. Org.* 157, 190-198.

Dean M., Rzhetsky A., Allikmets R. (2001). The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Res.* 11, 1156-1166.

Dell'Angelica E. C. (2009). AP-3-dependent trafficking and disease: the first decade. *Curr. Opin. Cell Biol.* 21, 552-559.

Denholm B., Sudarsan V., Pasalodos-Sanchez S., Artero R., Lawrence P., Maddrell S., Baylies M., Skaer H. (2003). Dual origin of the renal tubules in *Drosophila*: mesodermal cells integrate and polarize to establish secretory function. *Curr. Biol.* 13, 1052-1057.

Dobrosotskaya I. Y., Seegmiller A. C., Brown M. S., Goldstein J. L., Rawson R. B. (2002). Regulation of SREBP processing and membrane lipid production by phospholipids in *Drosophila*. *Science* 296, 879-883.

Dong H., Beer S. V. (2000). Riboflavin induces disease resistance in plants by activating a novel signal transduction pathway. *Phytopathology* 90, 801-811.

Dow J. A. T., Davies S.-A. (2003). Integrative physiology and functional genomics of epithelial function in a genetic model organism. *Physiol. Rev.* 83, 687-729.

Dreesen T. D., Johnson D. H., Henikoff S. (1988). The Brown protein of *Drosophila melanogaster* is similar to the White protein and to components of active transport complexes. *Mol. Cell. Biol.* 8, 5206-5215.

Duffy J. B. (2002). GAL4 system in *Drosophila*: a fly geneticist's swiss army knife. *Genesis* 34, 1-15.

Eaton S. (2006). Release and trafficking of lipid-linked morphogens. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 16, 17-22.

Edwards A. M., Bueno C., Saldaño A., Silva E., Kassab K., Polo L., Jori G. (1999). Photochemical and pharmacokinetic properties of selected flavins. *J. Photochem. Photobiol. B* 48, 36-41.

Edwards A. M., Silva E. (2001). Effect of visible light on selected enzymes, vitamins and amino acids. *J. Photochem. Photobiol. B* 63, 126-131.

Eichelberg D. (1968). Quantitative Untersuchungen über die Ommochromvorstufen in den Malpighischen Gefäßen verschiedener *Drosophila*-Mutanten. *Z. Naturforsch.* 23b, 547-554.

Eichelberg D. (1969). Über das Auftreten von Tetrahydrobiopterin und Riboflavin in den Malpighischen Gefäßen von *Drosophila melanogaster* und deren Mutante *brown*. *Z. Naturforsch.* 24b, 123-127.

Ejendal K. F. K., Hrycyna C. A. (2002). Multidrug resistance and cancer: the role of the human ABC transporter ABCG2. *Curr. Protein Pept. Sci.* 3, 503-511.

Evans J. M., Day J. P., Cabrero P., Dow J. A. T., Davies S.-A. (2008). A new role for a classical gene: White transports cyclic GMP. *J. Exp. Biol.* 211, 890-899.

Fahy E., Subramaniam S., Brown H. A., Glass C. K., Merrill Jr. A. H., Murphy R. C., Raetz C. R. H., Russell D. W., Seyama Y., Shaw W., Shimizu T., Spener F., van Meer G., VanNieuwenhze M. S., White S. H., Witztum J. L., Dennis E. A. (2005). A comprehensive classification system for lipids. *J. Lipid Res.* 46, 839-861.

Falcón-Pérez J. M., Romero-Calderón R., Brooks E. S., Krantz D. E., Dell'Angelica E. C. (2007). The *Drosophila* pigmentation gene *pink* (*p*) encodes a homologue of human Hermansky-Pudlak syndrome 5 (HPS5). *Traffic* 8, 154-168.

Flyatlas: <http://www.flyatlas.org/>

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

- Frati E., Khatib A.-M., Front P., Panasyuk A., Aprile F., Mitrovic D. R. (1997).** Degradation of hyaluronic acid by photosensitized riboflavin *in vitro*. Modulation of the effect by transition metals, radical quenchers, and metal chelators. *Free Radic. Biol. Med.* 22, 1139-1144.
- Freeman M. (1996).** Reiterative use of the EGF receptor triggers differentiation of all cell types in the *Drosophila* eye. *Cell* 87, 651-660.
- Fukushima N., Ishii I., Contos J. J. A., Weiner J. A., Chun J. (2001).** Lysophospholipid receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 41, 507-534.
- Fukuwatari T., Kuzuya M., Satoh S., Shibata K. (2009).** Effects of excess vitamin B1 or vitamin B2 on growth and urinary excretion of water-soluble vitamins in weaning rats. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi* 50, 70-74.
- Gahl W. A., Brantly M., Kaiser-Kupfer M. I., Iwata F., Hazelwood S., Shotelersuk V., Duffy L. F., Kuehl E. M., Troendle J., Bernardini I. (1998).** Genetic defects and clinical characteristics of patients with a form of oculocutaneous albinism (Hermansky-Pudlak syndrome). *N. Engl. J. Med.* 338, 1258-1264.
- Ghosh D., Forrest H. S. (1967).** Enzymatic studies on the hydroxylation of kynurenine in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 55, 423-431.
- Glassman E. (1956).** Kynurenine formamidase in mutants of *Drosophila*. *Genetics* 41, 566-574.
- Green M. M. (1949).** A study of tryptophane in eye color mutants of *Drosophila*. *Genetics* 34, 564-572.
- Green M. M. (2010).** 2010: a century of *Drosophila* genetics through the prism of the *white* gene. *Genetics* 184, 3-7.
- Green P. R., Geer B. W. (1979).** Changes in the fatty acid composition of *Drosophila melanogaster* during development and ageing. *Arch. Int. Physiol. Biochim.* 87, 485-491.
- Grönke S., Beller M., Fellert S., Ramakrishnan H., Jäckle H., Kühnlein R. P. (2003).** Control of fat storage by a *Drosophila* PAT domain protein. *Curr. Biol.* 13, 603-606.
- Grönke S., Mildner A., Fellert S., Tennagels N., Petry S., Müller G., Jäckle H., Kühnlein R. P. (2005).** Brummer lipase is an evolutionary conserved fat storage regulator in *Drosophila*. *Cell Metab.* 1, 323-330.
- Grönke S., Müller G., Hirsch J., Fellert S., Andreou A., Haase T., Jäckle H., Kühnlein R. P. (2007).** Dual lipolytic control of body fat storage and mobilization in *Drosophila*. *PLoS Biol.* 5, 1248-1256.
- Gunstone F. D., Herslöt B. G. (2000).** Lipid glossary 2. The Oily Press, Bridgwater.
- Gutierrez E., Wiggins D., Fielding B., Gould A. P. (2007).** Specialized hepatocyte-like cells regulate *Drosophila* lipid metabolism. *Nature* 445, 275-280.
- Hadjebi O., Casas-Terradellas E., Garcia-Gonzalo F. R., Rosa J. L. (2008).** The RCC1 superfamily: from genes, to function, to disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1783, 1467-1479.
- Haines T. H. (2001).** Do sterols reduce proton and sodium leaks through lipid bilayers? *Prog. Lipid Res.* 40, 299-324.
- Higgins C. F. (1992).** ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu. Rev. Cell Biol.* 8, 67-113.
- Hock T., Cottrill T., Keegan J., Garza D. (2000).** The *E23* early gene of *Drosophila* encodes an ecdysone-inducible ATP-binding cassette transporter capable of repressing ecdysone-mediated gene activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 9519-9524.

- Hoskins R. A., Phan A. C., Naeemuddin M., Mapa F. A., Ruddy D. A., Ryan J. J., Young L. M., Wells T., Kopczynski C., Ellis M. C. (2001).** Single nucleotide polymorphism markers for genetic mapping in *Drosophila melanogaster*. *Genome Res.* 11, 1100- 1113.
- Howells A. J., Ryall R. L. (1975).** A biochemical study of the *scarlet* eye-color mutant of *Drosophila melanogaster*. *Biochem. Genet.* 13, 273-282.
- Howells A. J., Summers K. M., Ryall R. L. (1977).** Developmental patterns of 3-hydroxykynurenine accumulation in *white* and various other eye color mutants of *Drosophila melanogaster*. *Biochem. Genet.* 15, 1049-1059.
- Hoyer S. C., Eckart A., Herrel A., Zars T., Fischer S. A., Hardie S. L., Heisenberg M. (2008).** Octopamine in male aggression of *Drosophila*. *Curr. Biol.* 18, 159-167.
- Ito K., Awano W., Suzuki K., Hiromi Y., Yamamoto D. (1997).** The *Drosophila* mushroom body is a quadruple structure of clonal units each of which contains a virtually identical set of neurones and glial cells. *Development* 124, 761-771.
- Jones H. E., Harwood J. L., Bowen I. D., Griffiths G. (1992).** Lipid composition of subcellular membranes from larvae and prepupae of *Drosophila melanogaster*. *Lipids* 27, 984-987.
- Jung A. C., Denholm B., Skaer H., Affolter M. (2005).** Renal tubule development in *Drosophila*: a closer look at the cellular level. *J. Am. Soc. Nephrol.* 16, 322-328.
- Kale H., Harikumar P., Kulkarni S. B., Nair P. M., Netrawali M. S. (1992).** Assessment of the genotoxic potential of riboflavin and lumiflavin. B. Effect of light. *Mutat. Res.* 298, 17-23.
- Kamleh M. A., Hobani Y., Dow J. A. T., Watson D. G. (2008).** Metabolomic profiling of *Drosophila* using liquid chromatography Fourier transform mass spectrometry. *FEBS Lett.* 582, 2916-2922.
- Kamleh M. A., Hobani Y., Dow J. A. T., Zheng L., Watson D. G (2009).** Towards a platform for the metabonomic profiling of different strains of *Drosophila melanogaster* using liquid chromatography-Fourier transform mass spectrometry. *FEBS J.* 276, 6798-6809.
- Kim J., Suh H., Kim S., Kim K., Ahn C., Yim J. (2006).** Identification and characteristics of the structural gene for the *Drosophila* eye colour mutant *sepia*, encoding PDA synthase, a member of the omega class glutathione S-transferases. *Biochem. J.* 398, 451-460.
- Kirov G., Lowry C. A., Stephens M., Oldfield S., O'Donovan M. C., Lightman S. L., Owen M. J. (2001).** Screening ABCG1, the human homologue of the *Drosophila white* gene, for polymorphisms and association with bipolar affective disorder. *Mol. Psychiatry* 6, 671-677.
- Klucken J., Büchler C., Orsó E., Kaminski W. E., Porsch-Özcürümz M., Liebisch G., Kapinsky M., Diederich W., Drobnik W., Dean M., Allikmets R., Schmitz G. (2000).** ABCG1 (ABC8), the human homolog of the *Drosophila white* gene, is a regulator of macrophage cholesterol and phospholipid transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 817-822.
- Korlimbinis A., Hains P. G., Truscott R. J. W., Aquilina J. A. (2006).** 3-Hydroxykynurenine oxidizes α -crystallin: potential role in cataractogenesis. *Biochemistry* 45, 1852-1860.
- Kozak M. (1989).** The scanning model for translation: an update. *J. Cell Biol.* 108, 229-241.
- Kretzschmar D., Poeck B., Roth H., Ernst R., Keller A., Porsch M., Strauss R., Pflugfelder G. O. (2000).** Defective pigment granule biogenesis and aberrant behaviour caused by mutations in the *Drosophila* AP-3 β adaptin gene *ruby*. *Genetics* 155, 213-223.
- Kulkarni M. M., Perrimon N. (2005).** Super-size flies. *Cell Metab.* 1, 288-290.

Kuwana H., Shimizu-Nishikawa K., Iwahana H., Yamamoto D. (1996). Molecular cloning and characterization of the ABC transporter expressed in trachea (*ATET*) gene from *Drosophila melanogaster*. *Biochim. Biophys. Acta* 1309, 47-52.

Levade T., Augé N., Veldman R. J., Cuvillier O., Nègre-Salvayre A., Salvayre R. (2001). Sphingolipid mediators in cardiovascular cell biology and pathology. *Circ. Res.* 89, 957-968.

Levis R., O'Hare K., Rubin G. M. (1984). Effects of transposable element insertions on RNA encoded by the *white* gene of *Drosophila*. *Cell* 38, 471-481.

Liebisch G., Lieser B., Rathenberg J., Drobnik W., Schmitz G. (2004). High-throughput quantification of phosphatidylcholine and sphingomyelin by electrospray ionization tandem mass spectrometry coupled with isotope correction algorithm. *Biochim. Biophys. Acta* 1686, 108-117.

Lindmo K., Simonsen A., Brech A., Finley K., Rusten T. E., Stenmark H. (2006). A dual function for Deep orange in programmed autophagy in the *Drosophila melanogaster* fat body. *Exp. Cell Res.* 312, 2018-2027.

Lindsley D. L., Grell E. H. (1968). Genetic variations of *Drosophila melanogaster*. Carnegie Institution of Washington Publication, Washington.

Lindsley D. L., Zimm G. G. (1992). The genome of *Drosophila melanogaster*. Academic Press, San Diego.

lipid library: <http://lipidlibrary.acs.org/>

Liu Y., Lehmann M. (2008). A genomic response to the yeast transcription factor GAL4 in *Drosophila*. *Fly* 2, 92-98.

Lloyd V. K., Sinclair D. A. R., Alperyn M., Grigliatti T. A. (2002). Enhancer of *garnet*/ δ AP-3 is a cryptic allele of the *white* gene and identifies the intracellular transport system for the *white* protein. *Genome* 45, 296-312.

Lloyd V. K., Sinclair D. A., Wennberg R., Warner T. S., Honda B. M., Grigliatti T. A. (1999). A genetic and molecular characterization of the *garnet* gene of *Drosophila melanogaster*. *Genome* 42, 1183-1193.

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

Lucchesi J. C., Counce S. J., Hildreth P. E. (1968). Male gonadal dysgenesis in a female-sterile mutant of *Drosophila melanogaster*. *J. Exp. Zool.* 168, 437-450.

Ma J., Plesken H., Treisman J. E., Edelman-Novemsky I., Ren M. (2004). Lightoid and Claret: a rab GTPase and its putative guanine nucleotide exchange factor in biogenesis of *Drosophila* eye pigment granules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 11652-11657.

Mackay W. J., O'Donnell J. M. (1983). A genetic analysis of the pteridine biosynthetic enzyme, guanosine triphosphate cyclohydrolase, in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 105, 35-53.

Mackenzie S. M., Brooker M. R., Gill T. R., Cox G. B., Howells A. J., Ewart G. D. (1999). Mutations in the *white* gene of *Drosophila melanogaster* affecting ABC transporters that determine eye colouration. *Biochim. Biophys. Acta* 1419, 173-185.

Mackenzie S. M., Howells A. J., Cox G. B., Ewart G. D. (2000). Sub-cellular localisation of the White/Scarlet ABC transporter to pigment granule membranes within the compound eye of *Drosophila melanogaster*. *Genetica* 108, 239-252.

Mariani C., Pirrotta V., Manet E. (1985). Isolation and characterization of the *zeste* locus of *Drosophila*. *EMBO J.* 4, 2045-2052.

Matsumoto A., Ukai-Tadenuma M., Yamada R. G., Houl J., Uno K. D., Kasukawa T., Dauwalder B., Itoh T. Q., Takahashi K., Ueda R., Hardin P. E., Tanimura T., Ueda H. R. (2007). A functional genomics strategy reveals *clockwork orange* as a transcriptional regulator in the *Drosophila* circadian clock. *Genes Dev.* 21, 1687-1700.

Maxfield F. R., Tabas I. (2005). Role of cholesterol and lipid organization in disease. *Nature* 438, 612-621.

McGettigan J., McLennan R. K. J., Broderick K. E., Kean L., Allan A. K., Cabrero P., Regulski M. R., Pollock V. P., Gould G. W., Davies S.-A., Dow J. A. T. (2005). Insect renal tubules constitute a cell-autonomous immune system that protects the organism against bacterial infection. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 35, 741-754.

McKechnie S. W., Geer B. W. (1993). Long-chain dietary fatty acids affect the capacity of *Drosophila melanogaster* to tolerate ethanol. *J. Nutr.* 123, 106-116.

Moore G. P., Sullivan D. T. (1978). Biochemical and genetic characterization of kynurenine formamidase from *Drosophila melanogaster*. *Biochem. Genet.* 16, 619-634.

Morgan T. H. (1910). Sex limited inheritance in *Drosophila*. *Science* 32, 120-122.

Mullins C., Hartnell L. M., Bonifacino J. S. (2000). Distinct requirements for the AP-3 adaptor complex in pigment granule and synaptic vesicle biogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Gen. Genet.* 263, 1003-1014.

Nakamura M., Ueno S., Sano A., Tanabe H. (1999). Polymorphisms of the human homologue of the *Drosophila white* gene are associated with mood and panic disorders. *Mol. Psychiatry* 4, 155-162.

Nguyen T., Novak E. K., Kermani M., Fluhr J., Peters L. L., Swank R. T., Wei M. L. (2002). Melanosome morphologies in murine models of Hermansky-Pudlak syndrome reflect blocks in organelle development. *J. Invest. Dermatol.* 119, 1156-1164.

Nguyen T., Wei M. L. (2004). Characterization of melanosomes in murine Hermansky-Pudlak syndrome: mechanisms of hypopigmentation. *J. Invest. Dermatol.* 122, 452-460.

Nickla H. (1972). Interaction between pteridine synthesis and riboflavin accumulation in *Drosophila melanogaster*. *Can. J. Genet. Cytol.* 14, 105-111.

O'Donnell M. J. (2009). Too much of a good thing: how insects cope with excess ions or toxins in the diet. *J. Exp. Biol.* 212, 363-372.

O'Donnell M. J., Maddrell S. H. P. (1995). Fluid reabsorption and ion transport by the lower Malpighian tubules of adult female *Drosophila*. *J. Exp. Biol.* 198, 1647-1653.

O'Donnell M. J., Rheault M. R., Davies S.-A., Rosay P., Harvey B. J., Maddrell S. H. P., Kaiser K., Dow J. A. T. (1998). Hormonally controlled chloride movement across *Drosophila* tubules is via ion channels in stellate cells. *Am. J. Physiol.* 274, R1039-R1049.

O'Donnell M. J., Dow J. A. T., Huesmann G. R., Tublitz N. J., Maddrell S. H. P. (1996). Separate control of anion and cation transport in Malpighian tubules of *Drosophila melanogaster*. *J. Exp. Biol.* 199, 1163-1175.

Ohmann E. (2006). Analyse von ABC Transporter-Genen in *Drosophila melanogaster*. Diplomarbeit, Universität Regensburg.

Okuda S., Nishiyama N., Saito H., Katsuki H. (1996). Hydrogen peroxide-mediated neuronal cell death induced by an endogenous neurotoxin, 3-hydroxykynurenine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 12553-12558.

Okuda S., Nishiyama N., Saito H., Katsuki H. (1998). 3-Hydroxykynurenine, an endogenous oxidative stress generator, causes neuronal cell death with apoptotic features and region selectivity. *J. Neurochem.* 70, 299-307.

Ooi C. E., Moreira J. E., Dell'Angelica E. C., Poy G., Wassarman D. A., Bonifacino J. S. (1997). Altered expression of a novel adaptin leads to defective pigment granule biogenesis in the *Drosophila* eye color mutant *garnet*. *EMBO J.* 16, 4508-4518.

Oxenkrug G. F. (2010). The extended life span of *Drosophila melanogaster* eye-color (*white* and *vermillion*) mutants with impaired formation of kynurenine. *J. Neural. Transm.* 117, 23-26.

Patton J. S., Gomes X. V., Geyer P. K. (1992). Position-independent germline transformation in *Drosophila* using a cuticle pigmentation gene as a selectable marker. *Nucleic Acids Res.* 20, 5859-5860.

Pawlak D., Tankiewicz A., Buczko W. (2001). Kynurenine and its metabolites in the rat with experimental renal insufficiency. *J. Physiol. Pharmacol.* 52, 755-766.

Phillips J. P., Forrest H. S., Kulkarni A. D. (1973). Terminal synthesis of xanthommatin in *Drosophila melanogaster*. III. Mutational pleiotropy and pigment granule association of phenoxyazinone synthetase. *Genetics* 73, 45-56.

Phillips J. P., Simmons J. R., Bowman J. T. (1970). Terminal synthesis of xanthommatin in *Drosophila melanogaster*. I. Roles of phenol oxidase and substrate availability. *Biochem. Genet.* 4, 481-487.

Pirrotta V., Bickel S., Mariani C. (1988). Developmental expression of the *Drosophila zeste* gene and localization of *zeste* protein on polytene chromosomes. *Genes Dev.* 2, 1839-1850.

Pohl A., Devaux P. F., Herrmann A. (2005). Function of prokaryotic and eukaryotic ABC proteins in lipid transport. *Biochim. Biophys. Acta* 1733, 29-52.

Pospisilik J. A., Schramek D., Schnidar H., Cronin S. J. F., Nehme N. T., Zhang X., Knauf C., Cani P. D., Aumayr K., Todoric J., Bayer M., Haschemi A., Puvuindran V., Tar K., Orthofer M., Neely G. G., Dietzl G., Manoukian A., Funovics M., Prager G., Wagner O., Ferrandon D., Aberger F., Hui C.-C., Esterbauer H., Penninger J. M. (2010). *Drosophila* genome-wide obesity screen reveals *hedgehog* as a determinant of brown versus white adipose cell fate. *Cell* 140, 148-160.

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

Raposo G., Marks M. S. (2007). Melanosomes - dark organelles enlighten endosomal membrane transport. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 786-797.

Ready D. F., Hanson T. E., Benzer S. (1976). Development of the *Drosophila* retina, a neurocrystalline lattice. *Dev. Biol.* 53, 217-240.

Rietveld A., Neutz S., Simons K., Eaton S. (1999). Association of sterol- and glycosylphosphatidylinositol-linked proteins with *Drosophila* raft lipid microdomains. *J. Biol. Chem.* 274, 12049-12054.

Sambandan D., Carbone M. A., Anholt R. R. H., Mackay T. F. C. (2008). Phenotypic plasticity and genotype by environment interaction for olfactory behavior in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 179, 1079-1088.

Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. (1989). Molecular cloning - a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Sang J. H. (1956). The quantitative nutritional requirements of *Drosophila melanogaster*. *J. Exp. Biol.* 33, 45-72.

Savary S., Denizot F., Luciani M., Mattei M., Chimini G. (1996). Molecular cloning of a mammalian ABC transporter homologous to *Drosophila white* gene. *Mamm. Genome* 7, 673-676.

Schmitz G., Langmann T. (2003). Function, expression and regulation of human ABC transporters. In: Duttaroy A. K., Spener F.: Cellular proteins and their fatty acids in health and disease. Wiley-VCH, Weinheim.

- Schmitz G., Ruebsaamen K. (2010).** Metabolism and atherogenic disease association of lysophosphatidylcholine. *Atherosclerosis* 208, 10-18.
- Schneider E., Hunke S. (1998).** ATP-binding-cassette (ABC) transport systems: functional and structural aspects of the ATP-hydrolyzing subunits/domains. *FEMS Microbiol. Rev.* 22, 1-20.
- Searles L. L., Voelker R. A. (1986).** Molecular characterization of the *Drosophila vermillion* locus and its suppressible alleles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83, 404-408.
- Sevrioukov E. A., He J.-P., Moghrabi N., Sunio A., Krämer H. (1999).** A role for the *deep orange* and *carnation* eye color genes in lysosomal delivery in *Drosophila*. *Mol. Cell* 4, 479-486.
- Sharma P., Asztalos Z., Ayyub C., de Bruyne M., Dornan A. J., Gomez-Hernandez A., Keane J., Killeen J., Kramer S., Madhavan M., Roe H., Sherkhane P. D., Siddiqi K., Silva E., Carlson J. R., Goodwin S. F., Heisenberg M., Krishnan K., Kyriacou C. P., Partridge L., Riesgo-Escovar J., Rodrigues V., Tully T., O'Kane C. J. (2005).** Isogenic autosomes to be applied in optimal screening for novel mutants with viable phenotypes in *Drosophila melanogaster*. *J. Neurogenet.* 19, 57-85.
- Shih C.-K., Chen C.-M., Chen C.-Y. O., Liu J.-F., Lin H.-W., Chou H.-T., Li S.-C. (2010).** Riboflavin protects mice against liposaccharide-induced shock through expression of heat shock protein 25. *Food Chem. Toxicol.* 48, 1913-1918.
- Simons K., Ikonen E. (1997).** Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387, 569-572.
- Simons K., Ikonen E. (2000).** How cells handle cholesterol. *Science* 290, 1721-1726.
- Simpson F., Peden A. A., Christopoulou L., Robinson M. S. (1997).** Characterization of the adaptor-related protein complex, AP-3. *J. Cell Biol.* 137, 835-845.
- Singh S. R., Hou S. X. (2008).** Lessons learned about adult kidney stem cells from the Malpighian tubules of *Drosophila*. *J. Am. Soc. Nephrol.* 19, 660-666.
- Sitaraman D., Zars M., LaFerriere H., Chen Y.-C., Sable-Smith A., Kitamoto T., Rottinghaus G. E., Zars T. (2008).** Serotonin is necessary for place memory in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 5579-5584.
- Smith J. E. 3rd, Cronmiller C. (2001).** The *Drosophila daughterless* gene autoregulates and is controlled by both positive and negative *cis* regulation. *Development* 128, 4705-4714.
- Sözen M. A., Armstrong J. D., Yang M., Kaiser K., Dow J. A. T. (1997).** Functional domains are specified to single-cell resolution in a *Drosophila* epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 5207-5212.
- Stanley-Samuelson D. W., Jurenka R. A., Cripps C., Blomquist G. J., de Renobales M. (1988).** Fatty acids in insects: composition, metabolism, and biological significance. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 9, 1-33.
- Stark W. S., Lin T.-N., Brackhahn D., Christianson J. S., Sun G. Y. (1993).** Fatty acids in the lipids of *Drosophila* heads: effects of visual mutants, carotenoid deprivation and dietary fatty acids. *Lipids* 28, 345-350.
- Štefková J., Poledne R., Hubáček J. A. (2004).** ATP-binding cassette (ABC) transporters in human metabolism and diseases. *Physiol. Res.* 53, 235-243.
- Stone T. W. (2001).** Endogenous neurotoxins from tryptophan. *Toxicon* 39, 61-73.
- Stone T. W., Darlington L. G. (2002).** Endogenous kynurenes as targets for drug discovery and development. *Nat. Rev. Drug Discov.* 1, 609-620.
- Sullivan D. T., Bell L. A., Paton D. R., Sullivan M. C. (1979).** Purine transport by Malpighian tubules of pteridine-deficient eye color mutants of *Drosophila melanogaster*. *Biochem. Genet.* 17, 565-573.

- Sullivan D. T., Bell L. A., Paton D. R., Sullivan M. C. (1980).** Genetic and functional analysis of tryptophan transport in Malpighian tubules of *Drosophila*. *Biochem. Genet.* 18, 1109-1130.
- Sullivan D. T., Grillo S. L., Kitos R. J. (1974).** Subcellular localization of the first three enzymes of the ommochrome synthetic pathway in *Drosophila melanogaster*. *J. Exp. Zool.* 188, 225-233.
- Sullivan D. T., Kitos R. J., Sullivan M. C. (1973).** Developmental and genetic studies on kynurenine hydroxylase from *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 75, 651-661.
- Sullivan D. T., Sullivan M. C. (1975).** Transport defects as the physiological basis for eye color mutants of *Drosophila melanogaster*. *Biochem. Genet.* 13, 603-613.
- Summers K. M., Howells A. J., Pyliotis N. A. (1982).** Biology of eye pigmentation in insects. *Adv. Insect Phys.* 16, 119-166.
- Switchenko A. C., Brown G. M., (1985).** The enzymatic conversion of dihydroneopterin triphosphate to tripolyphosphate and 6-pyruvoyl-tetrahydropterin, an intermediate in the biosynthesis of other pterins in *Drosophila melanogaster*. *J. Biol. Chem.* 260 (5), 2945-2951.
- Syrzycka M., McEachern L. A., Kinneard J., Prabhu K., Fitzpatrick K., Schulze S., Rawls J. M., Lloyd V. K., Sinclair D. A. R., Honda B. M. (2007).** The *pink* gene encodes the *Drosophila* orthologue of the human Hermansky-Pudlack syndrome 5 (HPS5) gene. *Genome* 50, 548-556.
- Tarr P. T., Tarling E. J., Bojanic D. D., Edwards P. A., Baldán Á. (2009).** Emerging new paradigms for ABCG transporters. *Biochim. Biophys. Acta* 1791, 584-593.
- Tartof K. D. (1969).** Interacting gene systems: I. The regulation of tryptophan pyrolase by the *vermillion*-suppressor of *vermillion* system in *Drosophila*. *Genetics* 62, 781-795.
- Tearle R. (1991).** Tissue specific effects of ommochrome pathway mutations in *Drosophila melanogaster*. *Genet. Res.* 57, 257-266.
- Tearle R. G., Belote J. M., McKeown M., Baker B. S., Howells A. J. (1989).** Cloning and characterization of the *scarlet* gene of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 122, 595-606.
- Thummel C. S., Chory J. (2002).** Steroid signaling in plants and insects - common themes, different pathways. *Genes Dev.* 16, 3113-3129.
- Tobler J. E., Yim J. J., Grell E. H., Jacobson K. B. (1979).** Developmental changes of sepiapterin synthase activity associated with a variegated *purple* gene in *Drosophila melanogaster*. *Biochem. Genet.* 17, 197-206.
- Vance D. E., Vance J. E. (2008).** Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes. 5th edition. Elsevier Science, Amsterdam.
- van Breugel F. M. A. (1987).** Differential riboflavin deposition in *white* and variegated *white* mutants of *Drosophila hydei*. *Dev. Genet.* 8, 45-58.
- van Herwaarden A. E., Wagenaar E., Merino G., Jonker J. W., Rosing H., Beijnen J. H., Schinkel A. H. (2007).** Multidrug transporter ABCG2/breast cancer resistance protein secretes riboflavin (vitamin B2) into milk. *Mol. Cell. Biol.* 27, 1247-1253.
- van Meer G. (1989).** Lipid traffic in animal cells. *Annu. Rev. Cell Biol.* 5, 247-275.
- Vogl C., Grill S., Schilling O., Stülke J., Mack M., Stolz J. (2007).** Characterization of riboflavin (vitamin B2) transport proteins from *Bacillus subtilis* and *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* 189, 7367-7375.
- Walker A. R., Howells A. J., Tearle R. G. (1986).** Cloning and characterization of the *vermillion* gene of *Drosophila melanogaster*. *Mol. Gen. Genet.* 202, 102-107.

Wang J., Kean L., Yang J., Allan A. K., Davies S.-A., Herzyk P., Dow J. A. T. (2004). Function-informed transcriptome analysis of *Drosophila* renal tubule. *Genome Biol.* 5, R69.

Warner T. S., Sinclair D. A. R., Fitzpatrick K. A., Singh M., Devlin R. H., Honda B. M. (1998). The *light* gene of *Drosophila melanogaster* encodes a homologue of VPS41, a yeast gene involved in cellular-protein trafficking. *Genome* 41, 236-243.

Wenk M. R. (2005). The emerging field of lipidomics. *Nat. Rev. Drug Discov.* 4, 594-610.

Wessing A., Eichelberg D. (1978) Malpighian tubules, rectal papillae and excretion. In: Ashburner A., Wright T. R. F.: The genetics and biology of *Drosophila*, Vol. 2c. Academic Press, San Diego.

Wiley K., Forrest H. S. (1981). Terminal synthesis of xanthommatin in *Drosophila melanogaster*. IV. Enzymatic and nonenzymatic catalysis. *Biochem. Genet.* 19, 1211-1221.

Wilkin M., Tongngok P., Gensch N., Clemence S., Motoki M., Yamada K., Hori K., Taniguchi-Kanai M., Franklin E., Matsuno K., Baron M. (2008). *Drosophila* HOPS and AP-3 complex genes are required for a Deltex-regulated activation of Notch in the endosomal trafficking pathway. *Dev. Cell* 15, 762-772.

Xu J., Liu Y., Yang Y., Bates S., Zhang J-T. (2004). Characterization of oligomeric human half ABC transporter ATP-binding cassette G2. *J. Biol. Chem.* 279, 19781-19789.

Zhang S.-D., Odenwald W. F. (1995). Misexpression of the *white* (*w*) gene triggers male-male courtship in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 5525-5529.

Zhen L., Jiang S., Feng L., Bright N. A., Peden A. A., Seymour A. B., Novak E. K., Elliott R., Gorin M. B., Robinson M. S., Swank R. T. (1999). Abnormal expression and subcellular distribution of subunit proteins of the AP-3 adaptor complex lead to platelet storage pool deficiency in the pearl mouse. *Blood* 94, 146-155.

Ziegler-Günder I., Jaenicke L. (1959). Zur Wirkungsweise des *white*-Allels bei *Drosophila melanogaster*. *Z. Vererbungsl.* 90, 53-61.

Zinke I., Schütz C. S., Katzenberger J. D., Bauer M., Pankratz M. J. (2002). Nutrient control of gene expression in *Drosophila*: microarray analysis of starvation and sugar-dependent response. *EMBO J.* 21, 6162-6173.

7 Anhang

7.1 Verzeichnis der Abbildungen

Abb. 1: Aufbau eines ABC-Transporter Heterodimers	10
Abb. 2: Schematische Darstellung eines Ommatidiums und der Stoffwechselwege in der Augenpigmentierung	13
Abb. 3: Phänotyp vom Wildtyp und von Augenpigmentierungsmutanten.....	15
Abb. 4: Immunhistochemie von White an Malpighischen Gefäßen	15
Abb. 5: Struktur von cGMP, 3-Hydroxykynurenin, Riboflavin, Tryptophan, Kynurenin und Guanin	16
Abb. 6: Schematische Darstellung des AP-3-Komplexes.....	16
Abb. 7: Schematische Darstellung des HOPS-Komplexes	17
Abb. 8: Schematische Darstellung von BLOC-2.....	18
Abb. 9: Übersicht über die Malpighischen Gefäße und die Funktion ihrer Zelltypen.....	19
Abb. 10: Phänotyp der Malpighischen Gefäße aus CS und <i>w¹¹¹⁸</i>	20
Abb. 11: Darstellung von Ölsäure.....	22
Abb. 12: Struktur von Triglyceriden, Cholesterin und Ergosterol.....	23
Abb. 13: Schematische Darstellung eines Phospholipids	24
Abb. 14: Struktur von verschiedenen Phospholipiden und von Sphingomyelin	25
Abb. 15: Schematische Darstellung einer Biomembran	26
Abb. 16: Schematische Darstellung der Lipid Droplets und ihrer Speicherorte in <i>Drosophila melanogaster</i> ..	28
Abb. 17: Phänotyp und Pigmentgehalt 9 Tage alter Männchen von <i>white</i> -, <i>scarlet</i> - und <i>brown</i> -Mutanten im Vergleich zu CS.....	47
Abb. 18: Klonierung von p[UAS- <i>brown</i>].....	48
Abb. 19: Klonierung von p[UAS- <i>white</i>]	49
Abb. 20: Phänotyp und Pigmentgehalt des <i>white</i> -Rescues und der entsprechenden Kontrollen	50
Abb. 21: Phänotyp und Pigmentgehalt des <i>brown</i> - bzw. <i>scarlet</i> -Rescues und jeweils einer Kontrolle	51
Abb. 22: Pigmentgehalt von <i>white</i> -, <i>scarlet</i> - und <i>brown</i> -knock-down-Fliegen.....	51
Abb. 23: Immunhistochemie von White am <i>scarlet</i> -Rescue	53
Abb. 24: Immunhistochemie von White und Scarlet an <i>bw¹</i>	53
Abb. 25: Relative Expression von <i>white</i> , <i>brown</i> und <i>scarlet</i> in verschiedenen Mutanten	54
Abb. 26: Riboflavingehalt der Malpighischen Gefäße verschiedener Mutanten im Vergleich zu CS	55
Abb. 27: Riboflavingehalt der Malpighischen Gefäße verschiedener Rescues und der entsprechenden Kontrollen	55
Abb. 28: Aufnahme von Riboflavin in Malpighische Gefäße des Wildtyps und verschiedener Mutanten	56
Abb. 29: Aufnahme von Riboflavin in Malpighische Gefäße von Rescues und den entsprechenden Kontrollen	57
Abb. 30: Lebensspanne von CS und verschiedenen Mutanten auf einem Riboflavin-freien Sucrose-Medium	58
Abb. 31: Analyse der Zellkerne im anterioren bzw. posterioren Paar der Malpighischen Gefäße	59
Abb. 32: Phänotypische Charakterisierung von <i>white</i> - und <i>bwst</i> -Mutanten	60
Abb. 33: Klonierung von p[UAS- <i>ABCG2</i>]	61
Abb. 34: Klonierung von <i>yellow</i> -Carnegie-GMR- <i>ABCG2</i>	62
Abb. 35: Pigmentgehalt des humanen <i>ABCG2</i> -Rescues und der entsprechenden Kontrollen.....	63
Abb. 36: Phänotyp der <i>γ</i> Carnegie-Transformanten und Expression von <i>ABCG1</i>	64
Abb. 37: Ausschnitt aus einer Neutrallipid-Platte	66
Abb. 38: Ausschnitt aus einer Phospholipid-Platte	66
Abb. 39: Verteilung der Neutral- bzw. Phospholipide in Larven und adulten Fliegen des Wildtyps CS	67
Abb. 40: Übersicht über die Verteilung aller detektierbaren Fettsäuren in Larven und adulten Fliegen des Wildtyps CS	69

Abb. 41: Übersicht über den Sättigungsgrad der detektierbaren Phospholipide in Larven und adulten Fliegen des Wildtyps CS	70
Abb. 42: Übersicht über Protein-, Fettsäure- und Phospholipidgehalt adulter Männchen von Wildtypstämmen im Vergleich zu CS	72
Abb. 43: Lipidanalysen adulter Männchen von Wildtypstämmen	73
Abb. 44: Lipidanalysen des <i>instant</i> -Futters im Vergleich zum Standardmedium	75
Abb. 45: Übersicht über Protein-, Fettsäure- und Phospholipidgehalt der Larven von ABC-Transporter-Mutanten im Vergleich zu CS	76
Abb. 46: Lipidanalysen der Larven von ABC-Transporter-Mutanten	77
Abb. 47: Übersicht über Protein-, Fettsäure- und Phospholipidgehalt der adulten ABC-Transporter-Mutanten im Vergleich zu CS	78
Abb. 48: Lipidanalysen der adulten ABC-Transporter-Mutanten	79
Abb. 49: Übersicht über Protein-, Fettsäure- und Phospholipidgehalt adulter Männchen von CS, <i>st</i> ¹ und <i>w</i> ¹¹¹⁸ auf Standardmedium oder <i>instant</i> -Futter	81
Abb. 50: Lipidanalysen adulter Männchen von CS, <i>st</i> ¹ und <i>w</i> ¹¹¹⁸ auf Standardmedium oder <i>instant</i> -Futter	82
Abb. 51: Übersicht über Protein-, Fettsäure- und Phospholipidgehalt von adulten Männchen des <i>brown-Rescues</i> und der entsprechenden Kontrollen im Vergleich zu CS	83
Abb. 52: Lipidanalysen adulter Männchen des <i>brown-Rescues</i> und der entsprechenden Kontrollen	84
Abb. 53: Übersicht über Protein-, Fettsäure- und Phospholipidgehalt von adulten Männchen des <i>white-Rescues</i> und der entsprechenden Kontrollen im Vergleich zu CS	85
Abb. 54: Lipidanalysen adulter Männchen des <i>white-Rescues</i> und der entsprechenden Kontrollen	86
Abb. 55: Übersicht über Protein-, Fettsäure- und Phospholipidgehalt von adulten <i>white</i> -, <i>scarlet</i> - und <i>brown-knock-down</i> -Fliegen	87
Abb. 56: Lipidanalysen von adulten <i>white</i> -, <i>scarlet</i> - und <i>brown-knock-down</i> -Fliegen	88
Abb. 57: Phänotyp und Pigmentgehalt der Mutanten von Enzymen, die an der Pigmentsynthese beteiligt sind	90
Abb. 58: Pigmentgehalt von <i>cinnabar</i> -, <i>karmoisin</i> - und CG9542- <i>knock-down</i> -Fliegen	90
Abb. 59: Übersicht über Protein-, Fettsäure- und Phospholipidgehalt der Larven von Enzym-Mutanten im Vergleich zu CS	91
Abb. 60: Lipidanalysen der Larven von Enzym-Mutanten	92
Abb. 61: Übersicht über Protein-, Fettsäure- und Phospholipidgehalt der adulten Enzym-Mutanten im Vergleich zu CS	93
Abb. 62: Lipidanalysen der adulten Enzym-Mutanten	94
Abb. 63: Übersicht über Protein-, Fettsäure- und Phospholipidgehalt von <i>cinnabar</i> -, <i>karmoisin</i> - und CG9542- <i>knock-down</i> -Fliegen	95
Abb. 64: Lipidanalysen von <i>cinnabar</i> -, <i>karmoisin</i> - und CG9542- <i>knock-down</i> -Fliegen	96
Abb. 65: Phänotyp und Pigmentgehalt der AP-3-Mutanten	97
Abb. 66: Übersicht über Protein-, Fettsäure- und Phospholipidgehalt der Larven von AP-3-Mutanten im Vergleich zu CS	98
Abb. 67: Lipidanalysen der Larven von AP-3-Mutanten	99
Abb. 68: Übersicht über Protein-, Fettsäure- und Phospholipidgehalt der adulten AP-3-Mutanten im Vergleich zu CS	100
Abb. 69: Lipidanalysen der adulten AP-3-Mutanten	101
Abb. 70: Phänotyp und Pigmentgehalt von VPS- und Rab-Mutanten	102
Abb. 71: Übersicht über Protein-, Fettsäure- und Phospholipidgehalt der Larven von VPS- und Rab-Mutanten im Vergleich zu CS	103
Abb. 72: Lipidanalysen der Larven von VPS- und Rab-Mutanten	104
Abb. 73: Übersicht über Protein-, Fettsäure- und Phospholipidgehalt der adulten VPS- und Rab-Mutanten im Vergleich zu CS	105
Abb. 74: Lipidanalysen der adulten VPS- und Rab-Mutanten	106
Abb. 75: Phänotyp und Pigmentgehalt von Augenpigmentierungsmutanten, die keiner der anderen Gruppen zugeordnet werden können	107
Abb. 76: Übersicht über Protein-, Fettsäure- und Phospholipidgehalt der Larven von sonstigen Mutanten im Vergleich zu CS	108
Abb. 77: Lipidanalysen der Larven von sonstigen Mutanten	109

Abb. 78: Übersicht über Protein-, Fettsäure- und Phospholipidgehalt der adulten sonstigen Mutanten im Vergleich zu CS.....	110
Abb. 79: Lipidanalysen der adulten sonstigen Mutanten.....	111
Abb. 80: Übersicht über Protein-, Fettsäure- und Phospholipidgehalt der Larven von RNAi-ABCA im Vergleich zur Kontrolle	113
Abb. 81: Lipidanalysen der Larven von RNAi-ABCA.....	114
Abb. 82: Übersicht über Protein-, Fettsäure- und Phospholipidgehalt der adulten RNAi-ABCA-Fliegen im Vergleich zur Kontrolle	115
Abb. 83: Lipidanalysen der adulten RNAi-ABCA-Fliegen.....	116
Abb. 84: Übersicht über Protein-, Fettsäure- und Phospholipidgehalt der Larven von RNAi-ABCG im Vergleich zur Kontrolle	117
Abb. 85: Lipidanalysen der Larven von RNAi-ABCG	118
Abb. 86: Übersicht über Protein-, Fettsäure- und Phospholipidgehalt der adulten RNAi-ABCG-Fliegen im Vergleich zur Kontrolle	119
Abb. 87: Lipidanalysen der adulten RNAi-ABCG-Fliegen	120
Abb. 88: Länge und Sättigungsgrad der Fettsäuren in Phospholipiden embryonaler Membranen	132
Abb. 89: Synthese von gesättigten und einfach ungesättigten Fettsäuren	133
Abb. 90: Lebensspannen von Oregon R und Canton S auf Standardmedium.....	136
Abb. 91: Analyse der Pigmentgranula im Wildtyp und in AP-3-Mutanten	141
Abb. 92: Modell der Entstehung von Melanosomen.....	144

7.2 Verzeichnis der Tabellen

Tabelle 1: Auflistung einer Auswahl an humanen ABC-Transportern	11
Tabelle 2: Verwendete Bakterienstämme	30
Tabelle 3: Verwendete Wildtypstämme.....	30
Tabelle 4: Verwendete Mutanten	30
Tabelle 5: Verwendete RNAi-Linien	32
Tabelle 6: Verwendete Treiber, Balancer und weitere Stämme	33
Tabelle 7: Verwendete Medien.....	34
Tabelle 8: Verwendete Vektoren	34
Tabelle 9: Verwendete Oligonukleotide.....	35
Tabelle 10: Verwendete Antikörper	36
Tabelle 11: Verwendete Kitsysteme	36
Tabelle 12: Verwendete Puffer und Lösungen	36
Tabelle 13: Verwendete Größenstandards und Enzyme	37
Tabelle 14: Etablierte p[UAS-brown]-Linien	48
Tabelle 15: Etablierte p[UAS-white]-Linien.....	49
Tabelle 16: Etablierte p[UAS- ABCG2]-Linien	61
Tabelle 17: Auflistung der im GC-Standard enthaltenen Fettsäuren sowie ihrer Detektierbarkeit in Larven (3L) und in 7 Tage alten Männchen (Adulten)	68

7.3 Verzeichnis der Abkürzungen

C(1)DX	<i>compound (1) Double X</i>	FAD	Flavin Adenin Dinukleotid
3L	Larven des dritten Larvalstadiums	FAM	6-Carboxyfluorescein
3-OHK	3-Hydroxykynurenin	FAME	Fettsäuremethylester
Abb.	Abbildung	FM6	<i>First Multiple 6, Balancer (X)</i>
ABC	<i>ATP binding cassette</i>	FMN	Flavin Mononukleotid
Amp	Ampicillin	FS	Fettsäure
AP	<i>adaptor protein</i>	<i>g</i>	<i>garnet</i>
Atet, Atet	<i>ABC-transporter expressed in trachea</i>	G-3-P	Glycerin-3-Phosphat
ATGL	<i>adipose triglyceride lipase</i>	GAL4	Transkriptionsfaktor aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
ATP	Adenosintriphosphat	GAR	<i>goat anti rabbit</i>
AXI	Ampicillin, X-Gal, IPTG	GC	Gaschromatographie
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	GEF	<i>guanine nucleotide exchange factor</i>
BLOC	<i>biogenesis of lysosome-related organelles complex</i>	GMR	<i>glass multimer reporter</i>
bp	Basenpaare	GTE	Glucose-Tris-EDTA
BSA	<i>bovine serum albumin</i>	GTP	Guanosintriphosphat
Bw, bw	Brown, brown	h	Stunde
bzw.	beziehungsweise	H ₂ -NTP	Dihydronopterin Triphosphat
c	<i>cis</i>	HOPS	<i>homotypic fusion and vacuole protein sorting</i>
Ca, ca	Claret, claret	HPS	Hermansky-Pudlak Syndrom
ca.	circa	HPTLC	Hochleistungs-TLC
Car	Carnegie4	IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
car	<i>carnation</i>	<i>kar</i>	<i>karmoisin</i>
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>	kb	Kilobasen
cd	<i>cardinal</i>	<i>Ki</i>	<i>Kinked, Marker (III)</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>	<i>lacZ</i>	Gen für β-Galactosidase aus <i>E. coli</i>
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat	LB	<i>lysogeny broth</i>
CL	Cardiolipin	LPC	Lysophosphatidylcholin
cm	<i>carmine</i>	LRO	<i>lysosome-related organelles</i>
cn	<i>cinnabar</i>	<i>lt</i>	<i>light</i>
CoA	Coenzym A	Ltd, <i>ltd</i>	Lightoid, <i>lightoid</i>
CS	Canton Special	MCS	<i>multiple cloning site</i>
CSEG	Medium für <i>B. subtilis</i>	MS	Massenspektrometrie
CyO	<i>Curly of Oster, Balancer (II)</i>	NBD	Nukleotid-Bindedomäne
D ³	<i>Dichaete, Marker (III)</i>	NGS	<i>normal goat serum</i>
da	<i>daughterless</i>	NL	Neutrallipide
DAPI	4',6-Diamidin-2'-phenylindoldihydrochlorid	Nr.	Nummer
DC	Dünnschichtchromatographie	NT	N-Terminus
dd	doppelt destilliert	OR	Oregon R
DNA	Desoxyribonukleinsäure	<i>or</i>	<i>orange</i>
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat	<i>p</i>	<i>pink</i>
Dor, dor	Deep orange, <i>deep orange</i>	PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
ds	<i>double stranded</i>	PBT	PBS mit Triton-X
dUTP	Desoxyuridintriphosphat	PC	Phosphatidylcholin
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	PCR	Polymerasenkettenreaktion
E23	<i>early gene at 23</i>	<i>pd</i>	<i>purpleoid</i>
ECL	<i>extracellular loop</i>	PDA	Pyrimidodiazepin
EDTA	Ethyldiamintetraessigsäure	PE	Phosphatidylethanolamin
Erm ^r	Erythromycin Resistenz	PFA	Paraformaldehyd
et al.	und andere	PG	Phosphatidylglycerol
F ₁	erste Tochtergeneration	PI	Phosphatidylinositol

PL	Phospholipide	SPE	Sphingosylphosphoethanolamin
<i>po</i>	<i>pale ocelli</i>	SREBP	<i>sterol regulatory element-binding protein</i>
<i>pr</i>	<i>purple</i>	St, <i>st</i>	Scarlet, <i>scarlet</i>
PS	Phosphatidylserin	TAE	Tris-Acetat-EDTA
pSK	pBlueskript II SK-	<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
PTP	Pyruvoyltetrahydropterin	<i>Tb</i>	<i>Tubby</i> , Marker (III)
<i>Pu</i>	<i>Punch</i>	TG	Triglyceride
PUFAs	<i>polyunsaturated fatty acids</i>	TLC	<i>thin layer chromatography</i>
Rab	<i>ras-related in brain</i>	TM3	<i>Third Multiple 3</i> , Balancer (III)
<i>rb</i>	<i>ruby</i>	TM6B	<i>Third Multiple 6B</i> , Balancer (III)
RCC	<i>regulator of chromosome condensation</i>	TMD	Transmembrandomäne
ribB	Riboflavin Synthetase, α -Untereinheit	UAS	<i>upstream activating sequence</i>
<i>rl</i>	<i>rolled</i>	UAS-bw	P[UAS-brown] ⁶
RNA	Ribonukleinsäure	UAS-st	P[UAS-scarlet] ³⁷
RNAi	RNA Interferenz	UAS-w	P[UAS-white] ¹⁵
RNase	Ribonuklease	UV	Ultraviolett
RP	<i>related protein</i>	<i>v</i>	<i>vermillion</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>	VDRC	Vienna <i>Drosophila</i> Research Center
RT	Raumtemperatur	VPS	<i>vacuolar protein sorting</i>
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR	W, <i>w</i>	White, <i>white</i>
s.	siehe	X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside
<i>Sb</i>	<i>Stubble</i> , Marker (III)	<i>y</i>	<i>yellow</i>
ScO	<i>Scutoid</i> , Marker (II)	yCar	yellowCarnegie4
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>	<i>z</i>	<i>zeste</i>
SM6	<i>Second Multiple 6</i> , Balancer (II)	z.B.	zum Beispiel
<i>Sp</i>	<i>Sternopleural</i> , Marker (II)		

7.4 Danksagung

DANKE AN...

- ... Prof. Dr. Stephan Schneuwly für die Möglichkeit, diese Dissertation am Lehrstuhl für Entwicklungsbiologie anfertigen zu dürfen. Vielen Dank für die interessante Themenstellung, die zahlreichen Diskussionen und die konstruktiven Ratschläge.
- ... meine liebe Betreuerin Susi. Vielen, vielen Dank für die tolle Begleitung meiner Doktorarbeit, für die große Hilfe und die super Zusammenarbeit in den letzten Jahren sowie für Dein stets „offenes Ohr“ für kleinere und größere Probleme in allen Lebenslagen. Unsere vielen „Insider“ werden mir fehlen!!!
- ... Alois, der immer Zeit und die passenden Antworten auf Fragen jeder Art hatte. Besonderer Dank für die Hilfe im Isotopenlabor.
- ... José für das große Interesse an meinem Thema und für viele gute Ideen.
- ... Juan für viele lustige Stunden, eine interessante Kooperation und für das Paper.
- ... Evi für den herzlichen Empfang am Morgen und die nette Gesellschaft bei so manchen Autofahrten.
- ... unsere TAs Anneliese, Heike, Margot (viel Erfolg mit der Kaffeeliste!), Renate (besonders für die geduldige mit-Präparation im Isotopenlabor) und Uschi (besonders für die Hilfe bei den DAPI-Färbungen). Renate und Uschi, danke für die gute Stimmung in unserem „Frauen-Labor“.
- ... Beibs und Conny für die dauerhaft gute Stimmung am Lehrstuhl.
- ... Zsuzsa, dafür, dass Du mich durch das ganze Studium begleitet hast.

- ... Prof. Dr. Gerd Schmitz. Danke, dass ich einen Teil dieser Arbeit am Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin durchführen durfte.
- ... Dr. Gerhard Liebisch für die große Hilfe bei den Lipidanalysen, insbesondere für die Auswertung der Massenspektrometrie-Daten.
- ... Jolanthe, Simone, Bettina, Conny, Uschi, Ottolie, Doreen und Manfred sowie Dr. Katharina Rübsamen vom Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin für die praktische Hilfe bei meinen Experimenten.

- ... PD Dr. Jürgen Stoltz und Dr. Christian Vogl für die große Hilfe bei den Riboflavin-Versuchen.
- ... Harald Guldan für das ¹⁴C-Glycerin-3-Phosphat.
- ... Daniela Achatz für die Hilfe am Fluorimeter.

- ... das Graduiertenkolleg GK640 für die finanzielle Unterstützung.
- ... Prof. Dr. Dick und Prof. Dr. Hauska für die große Hilfe während meiner Zeit als Studentensprecherin im GK640.

- ... meine Eltern, dafür, dass sie mich immer unterstützt haben.
- ... Sabine für die regelmäßige Ablenkung, die die Tage dazwischen nicht so lang erscheinen lässt.
- ... Andrea. Danke dafür, dass ich Dich kennen lernen durfte und dafür, dass du mich immer noch täglich begleitest.
- ... Christian. Vielen Dank, dass Du immer für mich da bist.