

**Die Analyse der Funktion des
Tumorsuppressors Lethal (2) giant discs
(Lgd) während der Oogenese
und
die Analyse der Determination der
sensorischen Vorläuferzellen im peripheren
Nervensystem von
*Drosophila melanogaster***

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Markus Hubertus Schneider
aus Köln

Düsseldorf, Mai 2012

aus dem Institut für Genetik
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Thomas Klein
Korreferent: Prof. Dr. Hermann Aberle

Tag der mündlichen Prüfung:

Quäl dich, du Sau.

(Udo Bölts zu Jan Ulrich bei der 18. Etappe der Tour de France 1997)

Et hät noch immer joot jejange.

(Artikel 3 des Kölschen Grundgesetzes)

Da steh ich nun, ich armer Tor! Und bin so klug als wie zuvor.

(Johann Wolfgang von Goethe, Faust, Tragödie erster Teil)

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
1. Einleitung	1
1.1 Der Notch Signalweg.....	1
1.2 Die Endozytose, der endosomalen Transport und die MVB-Biogenese	4
1.3 Das Tumorsuppressorgen <i>lethal (2) giant discs (lgd)</i>	9
1.4 Die Oogenese bei <i>Drosophila melanogaster</i>	11
1.5 Die Entwicklung der mechanosensorischen Borsten bei <i>Drosophila melanogaster</i> ..	14
1.6 Das Modell der lateralen Inhibition	18
1.7 Ziele der Arbeit.....	20
2. Material und Methoden	21
2.1 Material.....	21
2.1.1 Chemikalien, Enzyme und Reaktions-Kits	21
2.1.2 Antikörper	22
2.1.3 Plasmide, verwendete Vektoren	23
2.1.4 Verwendete Primer	23
2.1.5 Bakterien und Zelllinien	23
2.2 Methoden	24
2.2.1 Methoden zur Arbeit mit DNA	24
2.2.1.1 Chemische Transformation.....	24
2.2.1.2 Isolierung der Plasmid-DNA durch alkalische Lysen (Mini-Präparation) ..	24
2.2.1.3 Isolierung der Plasmid-DNA durch alkalische Lysen (Midi-Präparation) ..	25
2.2.1.4 DNA-Konzentrationsbestimmung	25
2.2.1.5 Restriktionsspaltungen.....	26
2.2.1.6 Ligation.....	26
2.2.1.7 Ligationen in den pGEM-T Easy-Vektor	27

2.2.1.8 DNA-Gelelektrophorese und Gelextraktion	27
2.2.1.9 Herstellung von 50X Tris-Acetat-EDTA (TAE-Laufpuffer).....	28
2.2.1.10 Herstellung von 6x Ladepuffer	28
2.2.1.11 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	28
2.2.1.12 Sequenzierungen.....	29
2.2.2 Fliegen	29
2.2.2.1 Anzucht und Haltung von Fliegen von <i>Drosophila melanogaster</i>	29
2.2.2.2 Herstellung des Futtermediums (für 20 Liter)	30
2.2.2.3 Verwendete Fliegenstämme.....	30
2.2.2.4 Präparation und Antikörperfärbung von Flügelimaginalscheiben.....	34
2.2.2.4.1 Herstellung von 10x PBS (phosphate-buffered saline).....	34
2.2.2.4.2 Herstellung von 0,3%-igem PBT (PBS+Triton X-100)	35
2.2.2.4.3 Herstellung von 4%-igem PFA (Paraformaldehyd).....	35
2.2.2.4.4 Herstellung von NGS (normal goat serum)	35
2.2.2.4.5 Präparation und Antikörperfärbung von Ovarien	35
2.2.2.5 Herstellung transgener Fliegen	36
2.2.2.6 Das GAL4/UAS-System.....	36
2.2.2.7 Die FLP/FRT-vermittelte mitotische Rekombination	37
2.2.2.8 MARCM-System.....	37
2.2.2.9 RNA-Interferenz	38
3. Ergebnisse	39
3.1 Die Herstellung und Charakterisierung der Reportergenkonstrukte <i>Gbe+Su(H)-GFP_{nls}</i> und <i>Gbe+Su(H)-DsRed_{nls}</i>.....	39
3.1.1 Klonierungsstrategie zur Herstellung der Reportergenkonstrukte <i>Gbe+Su(H)-GFP_{nls}</i> und <i>Gbe+Su(H)-DsRed_{nls}</i>	40
3.1.2 Charakterisierung der Reportergenkonstrukte <i>Gbe+Su(H)-GFP_{nls}</i> und <i>Gbe+Su(H)-DsRed_{nls}</i>	42

3.2 Die Analyse der Funktion von Lgd während der Oogenese bei	52
<i>D. melanogaster</i>	52
3.2.1 Die Analyse des Funktionsverlustes von <i>lgd</i> im Follikelepithel von <i>D. melanogaster</i>	52
3.2.1.1 Der Genfunktionsverlust von <i>lgd</i> in den Follikelzellen des Germariums führt zur ektopischen Aktivierung des Notch Signalweges.....	52
3.2.1.2 Die ektopische Notch-Aktivierung in <i>lgd^{d7}</i> mutanten Follikelzellen führt zu einem verfrühten Übergang vom mitotischen Zyklus in den Endozyklus.....	54
3.2.1.3 Die ektopische Notch-Aktivierung in <i>lgd^{d7}</i> -mutanten Follikelzellen ist ligandenunabhängig, aber γ -Secretase-abhängig	56
3.2.1.4 Die ektopische Notch-Aktivierung in <i>lgd^{d7}</i> -Follikelzellen kann durch den zusätzlichen Verlust von <i>hrs</i> unterdrückt werden.....	59
3.2.1.5 Der Genfunktionsverlust von <i>ept</i> , <i>vps25</i> oder <i>shrub</i> in den Follikelzellen führt ebenfalls zur ektopischen Notch-Aktivierung.....	61
3.2.1.6 Der Ausfall von <i>lgd</i> führt zu einer Notch-unabhängigen ektopischen Aktivierung des Dpp-Reportergenkonstrukts <i>Dad-lacZ</i> im Follikelepithel	62
3.2.1.7 Der Verlust von <i>lgd</i> im Follikelepithel führt zur Akkumulation des Notch-Rezeptors in einem späten endosomalen Kompartimenten	66
3.2.1.8 Der Verlust der Funktion von Mitgliedern der ESCRT-Komplexe I-III resultiert in einer verstärkten Akkumulation des Notch-Rezeptors.....	71
3.2.1.9 Die Aktivierung von Notch in <i>lgd^{d7}</i> -mutanten Follikelzellklonen benötigt, im Gegensatz zu <i>shrub⁴⁻¹</i> -mutanten Follikelzellklonen, die Fusion mit dem Lysosomen	73
3.2.2 Die Analyse des Funktionsverlustes von <i>lgd</i> in der Keimbahn von <i>D. melanogaster</i>	76
3.2.2.1 Der Verlust von <i>lgd</i> in der Keimbahn führt zur Bildung von 32 Keimzellen	76
3.2.2.2 Die Bildung von 32 Keimzellen in <i>lgd^{d7}</i> -Keimbahnklonen wird durch einen Notch-unabhängigen Prozess ausgelöst.....	79

3.2.2.4 Der Ausfall der <i>lgd</i> -Funktion in der Keimbahn führt zur Notch-unabhängigen ektopischen Expression des Dpp-Reportergens <i>Dad-lacZ</i>	82
3.2.2.5 Der Verlust der Funktion von <i>lgd</i> in der Keimbahn führt zu einem Defekt im endosomalen Transport und zur Akkumulation von Delta und der extrazellulären Notch-Rezeptor-Domäne in Endosomen	86
3.3 Die Analyse der Determination der sensorischen Vorläuferzellen im peripheren Nervensystem der Flügelimaginalscheibe bei <i>Drosophila melanogaster</i>.....	91
3.3.1 Die Aktivität des Notch Signalweges im Verhältnis zur proneuralen Aktivität und zu den SOPs	91
3.3.2 Die Verteilung von Serrate und Delta relativ zur Notch- und zur proneuralen Aktivität im Notum.....	97
3.3.3 Die Notch-Aktivierung im Notum der Flügelimaginalscheibe durch die Liganden Delta (Dl) und Serrate (Ser).....	99
3.3.4 Die Reichweite des Notch-Signals in der Flügelimaginalscheibe	101
3.3.5 Die Flügelimaginalscheibe besitzt eine Band-ähnliche Region proneuraler Aktivität die durch den Notch-Signalweg in Kluster unterteilt wird.....	103
3.3.6 Extramacrochaetae wird in den meisten, aber nicht allen Zellen der Imaginalscheibe für die Suppression der proneuralen Aktivität benötigt.....	109
3.3.7 Die Entwicklung einer SOP in einem Feld der Notch und Emc Aktivität innerhalb der Flügelimaginalscheibe	114
4. Diskussion	117
4.1 Die Herstellung und Charakterisierung der Reportergenkonstrukte <i>Gbe+Su(H)-GFP_{nls}</i> und <i>Gbe+Su(H)-DsRed_{nls}</i> zur Analyse der Aktivität des Notch-Signalweges ..	117
4.2 Der Funktionsverlust von <i>lgd</i> im Follikelepithel bei <i>Drosophila</i> führt zur ligandenunabhängigen, γ -Secretase-abhängigen Aktivierung des Notch-Signalweges und zur ektopischen Expression des Dpp-Zielgens <i>Dad</i>	119
4.3 Der Funktionsverlust von <i>lgd</i> im Follikelepithel bei <i>Drosophila</i> führt zu einem Abbaudefekt des Notch-Rezeptors, welcher vermutlich für die ektopische Notch-Aktivierung verantwortlich ist.....	126

4.4 Der Funktionsverlust von <i>lgd</i> in der Keimbahn führt zur Bildung zusätzlicher Keimzellen, der ektopischen Expression des Dpp-Reportergens <i>Dad-lacZ</i> , einem Defekt im endosomalen Transport und der Akkumulation von Delta und der extrazellulären Notch-Rezeptor-Domäne in Endosomen	130
4.5 Die Analyse der Determination der sensorischen Vorläuferzellen im peripheren Nervensystem von <i>D. melanogaster</i>	137
5. Zusammenfassung.....	145
6. Summary	146
7. Literaturverzeichnis.....	147
8. Danksagung.....	160
9. Erklärung.....	161

1. Einleitung

1.1 Der Notch Signalweg

Der Notch Signalweg ist ein evolutionär hoch-konservierter Mechanismus, der es einer Zelle erlaubt mit ihrer direkten Nachbarzelle zu kommunizieren und auf diese Weise das Zellschicksal, die Zellproliferation und den Zelltod, während der Entwicklung von Metazoen reguliert (Artavanis-Tsakonas et al. 1995; Bray 2006; Chitnis 2006). Der Verlust von Komponenten des Notch Signalweges verursacht eine Vielzahl vererbbarer Krankheiten, wie dem Alagille-Syndrom (ALGS) (Krantz et al. 1997), der Spondylokostalen Dysostose (ARDS) (Bulman et al. 2000) und der zerebral autosomal dominanten Arteriopathie mit subkortikalen Infarkten und Leukenzephalopathie (CADASIL) (Gridley 2003). Dagegen resultiert die Überaktivierung des Notch Signalweges in der akuten T-Zell lymphatischen Leukämie (T-ALL) (Jundt et al. 2008; Tien et al. 2009).

Die Kernkomponenten des Notch Signalwegs bei *Drosophila melanogaster* sind der Notch-Rezeptor, die zur DSL-Familie (Delta, Serrate/Jagged in *Drosophila* und den Vertebraten, Lag2 in *C.elegans*) gehörenden Liganden, Delta (DI) und Serrate (Ser), und der zur Familie der CSL-Transkriptionsfaktoren (CBF-1/RBPjk in Vertebraten, Su(H) in *Drosophila*, Lag-1 in *C.elegans*) zählende, Suppressor of Hairless (Su(H)) (Lendahl 1998; Bray and Furriols 2001; Althausen et al. 2005; Krejčí and Bray 2007). Bei den Liganden, welche in der signalgebenden Zelle lokalisiert sind, und beim Rezeptor der sich in der signalempfangenden Zelle befindet, handelt es sich um sogenannte Typ-I Transmembranproteine. Die jeweiligen extrazellulären Domänen von Rezeptor und Ligand sind mit epidermalen Wachstumsfaktor-ähnlichen Wiederholungen (EGF-like repeats, epidermal growth factor) ausgestattet, welche die Bindung von Rezeptor und Ligand im extrazellulären Raum vermitteln (Bray 2006). Um einen funktionellen Notch-Rezeptor zu erhalten, muss dieser bereits nach seiner Synthese im endoplasmatischen Retikulum an seinen EGF-ähnlichen Wiederholungen glykosyliert werden (Haines and Irvine 2003; Xu et al. 2005). Hierbei wird zunächst eine erste Fucose durch die O-Fucosyltransferase (O-Fut) hinzugefügt und der Rezeptor wird zum Golgi-Apparat transportiert (Okajima and

Irvine 2002; Sasamura et al. 2003; Bray 2006). Im Golgi wird der noch unreife Rezeptor weiter glykosyliert und zum ersten Mal geschnitten. Die Glykosylierung wird unter anderem durch die Glykosyltransferase Fringe (Fng) katalysiert (Blair 2000; Haines and Irvine 2003). Die Modifizierung des Notch-Rezeptors durch die Glykosylierungen verändern die Fähigkeit des Liganden den Notch Rezeptor zu aktivieren. In den dorsalen Zellen der Flügelimaginalscheibe fördert Fng die Aktivierung durch Dl und verleiht Notch eine Resistenz gegen die Aktivierung durch Ser (Haines and Irvine 2003; Lei et al. 2003; Bray 2006). Die erste Prozessierung des unreifen Rezeptors, welche auch als S1-Spaltung bezeichnet wird, erfolgt durch eine Furin-ähnliche Konvertase an der S1-Stelle, während des Sekretionsprozesses im *trans*-Golgi-Netzwerk.

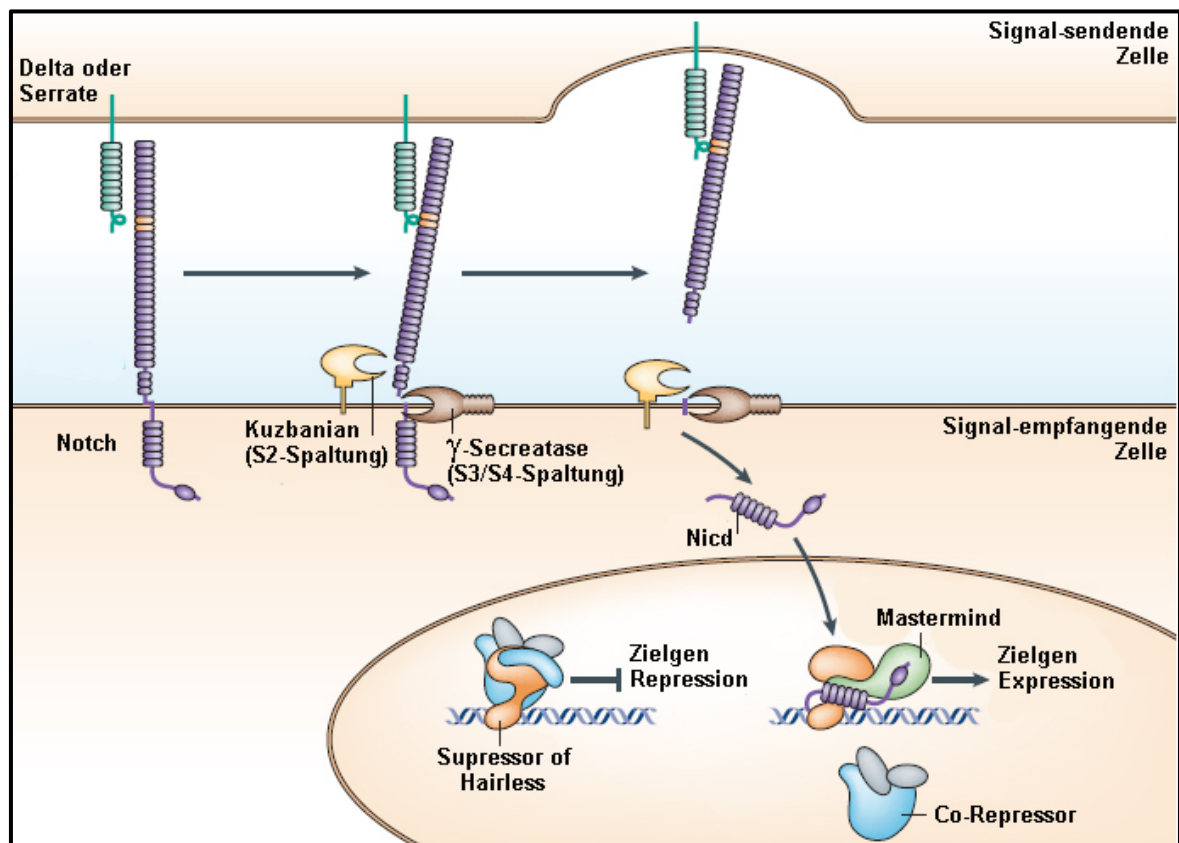


Abb.1.: Vereinfachte Darstellung des Notch Signalweges und seiner Kernkomponenten

Die Bindung der Liganden Delta oder Serrate (grün) an den Notch Rezeptor (violett) führt zu zwei proteolytischen Spaltungen des Rezeptors. Die Metalloprotease Kuzbanian (gelb) vermittelt die S2-Spaltung und entfernt die extrazelluläre Notch Rezeptor Domäne, wogegen die S3/S4-Spaltungen durch den γ -Secretase Komplex (braun) katalysiert werden. Durch die Prozessierung wird die intrazelluläre Notch Domäne (Ncd) freigesetzt und in den Zellkern transloziert, wo sie sich mit dem DNA-bindenden Transkriptionsfaktor Suppressor of Hairless (Su(H), orange) interagiert und die Expression gewebespezifischer Notch-Zielgene aktiviert. Für die Zielgen Expression werden zusätzliche Co-Faktoren, wie Mastermind (grün), benötigt. In Abwesenheit von Ncd fungiert Su(H) zusammen mit Ko-Repressoren als Repressor und reprimiert die Zielgen Expression. In Anwesenheit von Ncd, wirkt Su(H) als Aktivator und die Ko-Repressoren werden durch Ko-Aktivatoren, wie Mastermind (Mam, grün) verdrängt. Dies führt zur Expression gewebespezifischer Notch-Zielgene (modifiziert nach Bray, 2006)

Die dadurch resultierenden zwei Proteine gehen eine nicht kovalente Bindung ein und der reife Notch Rezeptor wird als Heterodimer zur Plasmamembran transportiert (Blaumueller and Artavanis-Tsakonas 1997).

Nachdem der heterodimere Notch-Rezeptor zur Plasmamembran transportiert wurde, erfolgt die Bindung der Liganden D1 oder Ser über die extrazellulären Domänen (**s.Abb.1**) (Xu et al. 2005). Diese Interaktion kann sowohl über *cis* als auch über *trans* erfolgen und entscheidet in konzentrationsabhängiger Art und Weise über Aktivierung oder Hemmung des Notch Signalweges (Klein et al. 1997; Micchelli et al. 1997; Klein and Arias 1998; Glittenberg et al. 2006). Die Bindung eines Liganden in *trans* führt möglicherweise zu einem Konformationswechsel des Notch-Rezeptors und zu einer, durch die Endozytose des Liganden erzeugten, Zugkraft, welche vermutlich die Freilegung einer weiteren Spaltungsstelle ermöglicht (Gordon et al. 2007). Die daraus folgende S2-Spaltung wird durch die ADAM (A Disintegrin And Metalloproteinase) Metalloproteasen innerhalb der extrazellulären Notch Domäne vermittelt, wobei Kuzbanian (Kuz; ADAM10) im Gegensatz zu TACE (tumour-necrosis factor- α converting enzyme, ADAM17) dafür hauptsächlich verantwortlich scheint und zur Abspaltung der extrazellulären Domäne führt (**s.Abb.1**), (Rooke et al. 1996; Pan and Rubin 1997; Sotillos et al. 1997; Brou et al. 2000; Mumm and Kopan 2000; Klein 2002; Lieber et al. 2002).

Das Ergebnis dieser Spaltung ist ein membranverankertes Notch Fragment, welches anschließend über zwei weitere Spaltungen, die als S3- und S4-Spaltung bekannt sind, innerhalb der Membran weiter prozessiert wird und die Freisetzung der intrazellulären Domäne des Notch Rezeptors ermöglicht. Verantwortlich für diese beiden Spaltungen ist der sogenannte γ -Secretase Komplex, der aus den Untereinheiten Pen2 (Presenilin enhancer protein 2), Nic (Nicastrin), Aph-1 (Anterior pharynx defective-1) und Psn (Presenilin) aufgebaut ist. Dabei bildet Psn die katalytische Einheit des Komplexes, welche die Spaltung katalysiert (**s.Abb.1**) (Fortini 2001; Francis et al. 2002).

Nach Abspaltung der intrazellulären Domäne des Notch Rezeptors wird diese in den Zellkern transloziert und reguliert zusammen mit dem Transkriptionsfaktor Su(H) und anderen Ko-Faktoren, wie Mastermind (Mam), die Expression von gewebespezifischen Notch-Zielgenen (**s.Abb.1**) (Fortini and Artavanis-Tsakonas 1994; Lecourtois and Schweisguth 1995; Lecourtois and Schweisguth 1997; Struhl and Adachi 1998).

Die Aktivität des Notch Signalweges kann auf viele Art und Weise reguliert werden (Bray 2006). So führt die Ubiquitinierung der Notch-Liganden, durch die E3-Ubiquitinligasen

Neuralized (Neur) und Mind bomb 1 (Mib1) zur Aktivierung des Signalweges (Deblandre et al. 2001; Pavlopoulos et al. 2001; Lai 2002; Le Borgne et al. 2005; Pitsouli and Delidakis 2005; Wang and Struhl 2005; Chitnis 2006).

Ein wichtige Regulationsmöglichkeit der Notch-Aktivität stellt die Endozytose und der damit verbundene Abbau des aktiven Rezeptors im Lysosom dar (Schweisguth 2004; Bray 2006). Um in den endosomalen Transportweg einzutreten muss der Notch-Rezeptor ebenfalls durch E3-Ligasen ubiquitiniert werden (Lai 2002).

Da die Endozytose und der endosomale Transportweg eine wichtige Bedeutung in der negativen Regulation des Notch-Rezeptors und anderer Signalproteine einnimmt, werden diese im folgenden Kapitel genauer beschrieben.

1.2 Die Endozytose, der endosomalen Transport und die MVB-Biogenese

Die Endozytose ist ein zellulärer Prozess den Zellen benutzen um unter anderem eine Vielzahl an Molekülen aufzunehmen (Mayor and Pagano 2007). Bei diesem Prozess wird die Plasmamembran eingestülpt und ein Vesikel von der Membran abgeschnürt, welcher die Fracht mit ins Innere der Zelle nimmt. Man unterteilt die Endozytose in die Phagozytose, bei der große Partikel aufgenommen werden, die Pinozytose, bei der Flüssigkeiten aufgenommen werden und die rezeptorvermittelte Endozytose (Soldati and Schliwa 2006). Bei der rezeptorvermittelten Endozytose wird wiederum zwischen Clathrin- bzw. Caveolin-abhängiger und Clathrin- bzw. Caveolin-unabhängiger Endozytose unterschieden (Mayor and Pagano 2007).

Die Signalisierung durch Transmembranrezeptoren wird in vielen Entwicklungsprozessen verwendet und stellt einen Hauptregulator der Zellproliferation und der Zelldifferenzierung dar (Di Fiore and De Camilli 2001; Seto et al. 2002; Vaccari et al. 2008). Die Aufnahme von Membranrezeptoren verschiedener Signalwege durch die rezeptorvermittelte Endozytose, wie z.B. des Notch-, Decapentaplegic, Hedgehog- oder Wiggless-Signalweges, in spezielle endosomale Kompartimente, ist entscheidend für die Regulation der Signalwege (Di Fiore and De Camilli 2001).

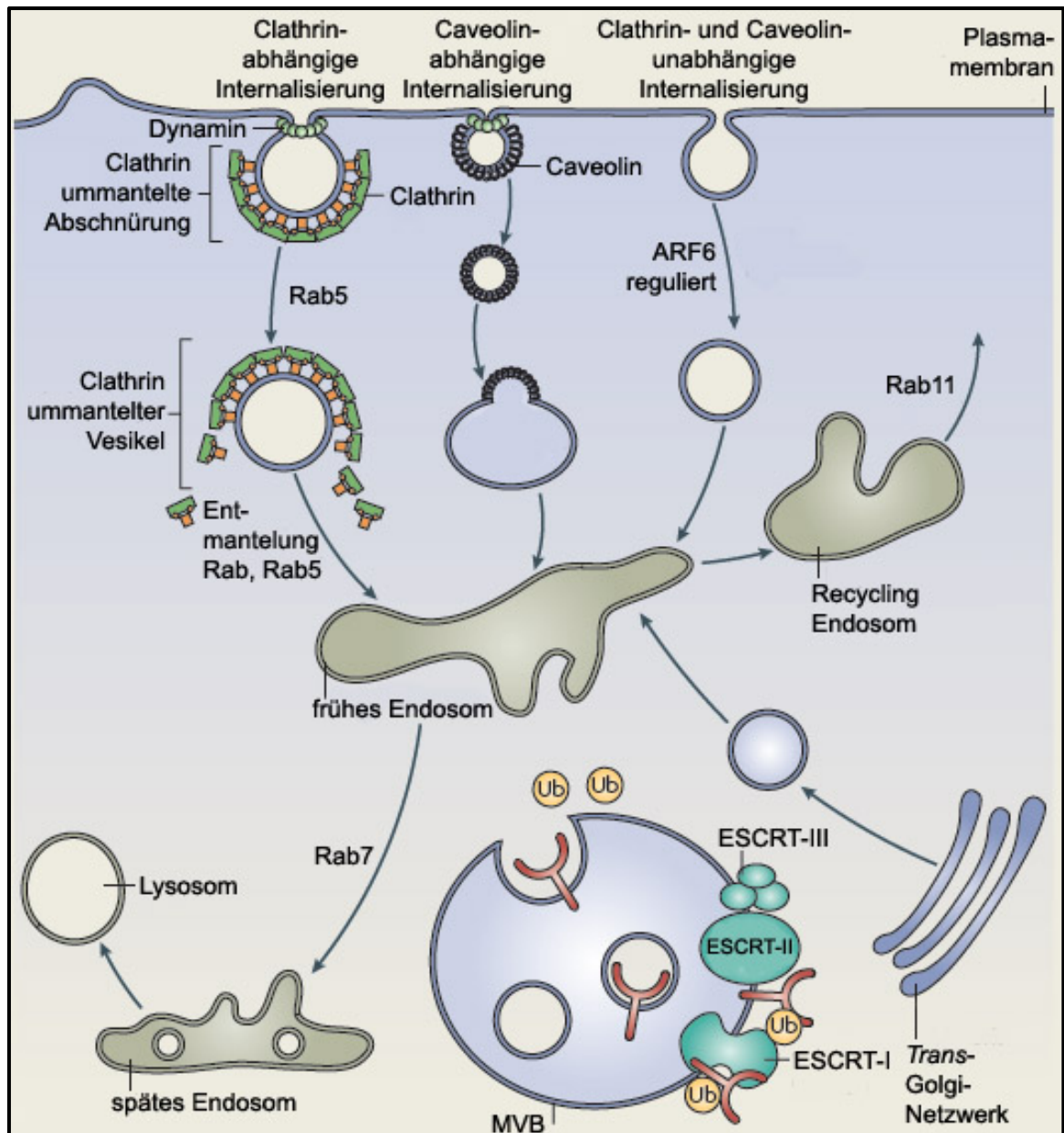


Abb.2: Der endosomale Transportweg

Auf verschiedene Art und Weise, Clathrin- und Caveolin-abhängig bzw.- unabhängig Internalisierung, werden Moleküle von der Plasmamembran ins Zellinnere internalisiert. Nach der Internalisierung erfolgt die Fusion mit den frühen Endosomen. Wenn sich die Fracht im frühen Endosom befindet wird sie entweder ins späte Endosom und anschließend ins Lysosom oder zur Plasmamembran zurück sortiert. Monoubiquitinierte Membranproteine, wie der Notch-Rezeptor bzw. seine Liganden, werden von monoubiquitinierungsbindenden Domänen erkannt und können so durch den Transport zum Lysosom abgebaut werden. Dafür müssen die Rezeptoren an der endosomalen Membran ein weiteres Mal invaginiert werden, wodurch multivesikuläre Körper (MVBs) gebildet werden. Dabei fungiert das Ubiquitin als Sortierungs-Signal. Die ESCRT-Komplexe spielen bei der MVB-Biogenese eine entscheidende Rolle. (modifiziert nach Gould und Lippincott-Schwartz 2009)

Die Monoubiquitinierung der Transmembranrezeptoren ist für den Abbau im endosomalen Transportweg entscheidend und erfolgt durch spezielle E3-Ubiquitinligasen (Urbe 2005). Die ubiquitinierten Rezeptoren können über verschiedenen Arten endozytiert und zum frühen Endosom (EE, early endosome) transportiert werden (**s.Abb.2**).

Am frühen Endosom wird der Signalrezeptor in einen von zwei möglichen Transportwegen sortiert. Entweder wird er an die Plasmamembran recycelt oder in den MVB-Pathway für den lysosomalen Abbau sortiert (Saksena et al. 2009).

Bei der Rezeptor-Deregulierung über den MVB-Pathway, spielt die ESCRT-Maschinerie eine entscheidende Rolle (Saksena et al. 2009).

Für den korrekten Abbau des Notch-Rezeptors oder anderer Transmembranrezeptoren ist die Bildung der multivesikulären Körper (MVBs, multivesicular bodies), die bei der rezeptorvermittelten Endozytose gebildet werden, essentiell, da diese durch den vesikulären Transport in der Lage sind die Signalaktivität zu beeinflussen (Vaccari et al. 2009). Verantwortlich für die MVB-Biogenese sind die sogenannten ESCRT (*endosomal sorting complexes required for transport*) Proteine, die in der Lage sind vier multimeren Proteinkomplexe (ESCRT-0-III) zu bilden (Hurley and Emr 2006). Entdeckt wurden diese Proteine in der Hefe, wo der Ausfall der VpsE (class E VPS, yacuolar protein sorting) Gene zu Defekten im lysosomalen bzw. vesikulären Transport führt (Raymond et al. 1992).

Der ESCRT-0-Komplex besteht aus den beiden Mitgliedern Hrs (Hepatocyte growth factor-regulated substrate) und STAM (Signal-Transducing Adapter-Molecule), die durch eine Vielzahl von Domänen und Peptid-Motive gekennzeichnet sind, welche für ihre Funktion entscheidend sind (**s.Abb.3**) (Komada et al. 1997). Lokalisiert ist der ESCRT-0-Komplex auf der cytoplasmatischen Seite des frühen Endosoms. Mit Hilfe der FYVE- (Fab1,YOTB,VAC1,EEA1) Domäne bindet Hrs PI3P (Phospatidylinositol-3-phosphat), welches innerhalb der endosomalen Membran lokalisiert ist, und zur Verankerung von Hrs an den Endosomen führt (Komada and Kitamura 2005).

Hrs und STAM besitzen Ubiquitin-interagierende Motive (UIM) mit denen sie direkt an Ubiquitin binden können. Die Komplexe erkennen somit ubiquitinierte Fracht und sortieren so z.B. die Transmembranrezeptoren für den Abbau (Komada and Kitamura 2005).

Bei *Drosophila* führt der Verlust der Hrs oder der STAM Funktion zu einer Vergrößerung der frühen Endosomen und zu einem Abbaufekt ligandenaktivierter RTKs (Rezeptortyrosinkinasen) und anderer Signalrezeptoren, wie Thickveins, Patched, Smoothed und Notch (Jekely and Rorth 2003; Komada and Kitamura 2005; Chanut-Delalande et al. 2010).

Dieser gestörte Abbau der Rezeptoren resultiert in einer verstärkten Aktivierung nachgeschalteter Signalmoleküle und der vermehrten Expression von Zielgenen.

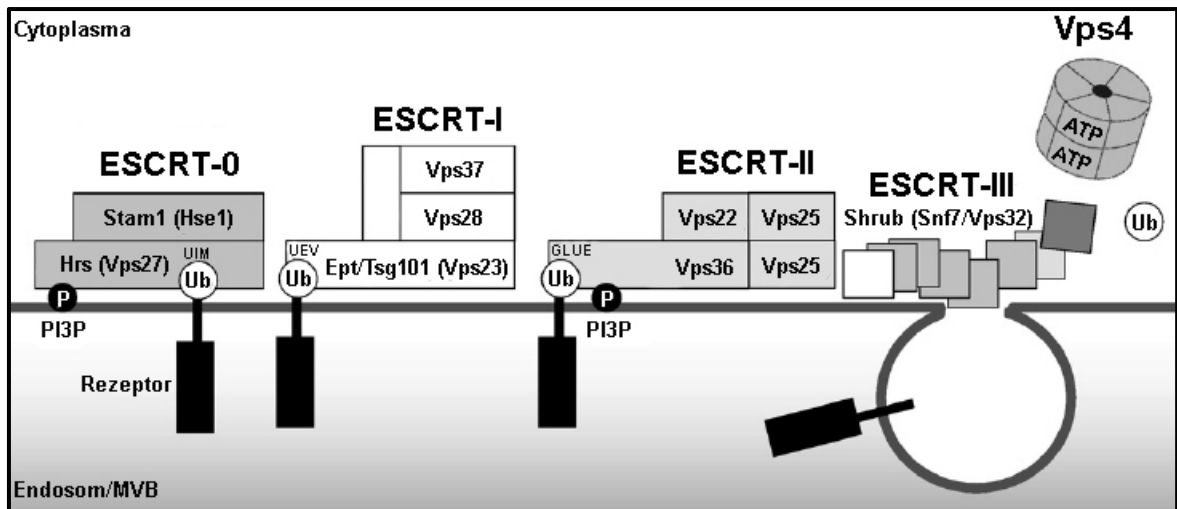


Abb.3: Abbau und Funktion der ESCRT-Komplexe bei der MVB-Biogenese bzw. der Bildung der intraluminalen Vesikel

Die ESCRT-Komplexe 0, I und II binden nacheinander über ubiquitinbindende Domänen (UIM,UEV,GLUE) an den ubiquitinierten Rezeptor (schwarzes Rechteck mit Ubiquitin, Ub) und erkennen diesen damit er in intraluminale Vesikel (ILVs) verpackt werden kann. Bevor der ubiquitinierte Rezeptor intraluminisiert wird, entfernen deubiquitinierende Enzyme, die vom ESCRT-III Komplex rekrutiert werden, das Ubiquitin. Der ESCRT-III-Komplex vermittelt die Abschnürung des intraluminalen Vesikels. Die ATPase Vps4 wird durch den ESCRT-III-Komplex rekrutiert und sorgt für dessen Deassemblierung. (modifiziert nach Stuffers et al 2009)

Verglichen mit anderen Signalwegen ist die Aktivität des Notch-Signalweges nicht verändert (Jekely and Rorth 2003; Komada and Kitamura 2005; Chanut-Delalande et al. 2010). Durch Bindung von Hrs an die ESCRT-I Komponente Tsg101 (Erupted) wird der ESCRT-I-Komplex an die endosomale Membran rekrutiert (Komada and Kitamura 2005). Der ESCRT-I-Komplex besteht aus den Proteinen Vps28 (Vacuolar protein sorting), Vps37, Mvb12 (multivesicular body) und Tsg101 (tumor susceptibility gene 101) (**s.Abb.3**) (Gill et al. 2007). Das *Drosophila* Tsg101 Ortholog Erupted (Ept) besitzt, wie Hrs, ebenfalls eine Ub-Domäne und bindet ubiquitinierte Proteine (Moberg et al. 2005). TSG101/Vps23/Ept bindet Hrs/Vps27 über die Tetrapeptid-Sequenz PSAP von Hrs (Komada and Kitamura 2005). In der Augenimaginalscheibe und im Follikelepithel bei *Drosophila* konnte gezeigt werden das der Ausfall von *ept* zur Akkumulation des Notch-Rezeptors und einer Aktivierung des Notch-Signalweges führt (Moberg et al. 2005; Vaccari et al. 2008). Der ESCRT-II-Komplex wird durch den ESCRT-I-Komplex rekrutiert, wodurch dieser aktiviert wird und die ubiquitinierte Fracht erhält (Hierro et al. 2004; Teo et al. 2004). Der ESCRT-II-Komplex ist aus den Proteinen Vps22,Vps25 und Vps36 aufgebaut (Hierro et al. 2004; Teo et al. 2004). Die Komponente Vps36 ist, neben der Bindung an Vps28 (ESCRT-I), durch die GLUE (Gram-like ubiquitin-binding in EAP45)-Domäne auch in der Lage Ubiquitin und PI3P zu binden (**s.Abb.3**) (Slagsvold et

al. 2005). Das ESCRT-II Mitglied Vps25 agiert als unkonventioneller Tumorsuppressor bei *Drosophila*. Zusätzlich zum Zell-autonomen Verlust der Zellpolarität und der Proliferationskontrolle, verursachen die Mutationen in *vps25* eine nicht-Zell-autonome Überproliferation (Vaccari and Bilder 2005). In den mutanten Geweben akkumuliert der Notch Rezeptor, und andere Rezeptoren, in einem endosomalen Kompartiment, was zur unkontrollierten Notch Aktivierung führt. Diese ektopische Notch Aktivität induziert in den mutanten Zellen den JAK/STAT Signalweg und die Produktion des Sekretionssignals Unpaired (Mezencev et al.), welches in den Nachbarzellen vermehrte Zellteilungen stimuliert. Anschließend sterben die *vps25* mutanten Zellen durch die Einleitung der Apoptose (Thompson et al. 2005; Vaccari and Bilder 2005). Der ESCRT-II-Komplex wiederum induziert die Ansammlung des ESCRT-III-Komplexes, an welchen ESCRT-II seine Fracht übergibt (Vaccari and Bilder 2005). Dieser ist aus den Untereinheiten Vps20, Vps32, Vps24 und Vps2 aufgebaut, die, im Gegensatz zu den heterooligomeren ESCRT-0-II-Komplexen, als Monomere im Cytoplasma verteilt sind (**s.Abb.3**) (Katzmann et al. 2001; Babst et al. 2002a; Babst et al. 2002b; Saksena et al. 2009).

Die ESCRT-III Komplexbildung scheint durch die Interaktion von Vps25 (ESCRT-II) mit Vps20 initiiert zu werden (Saksena and Emr 2009; Saksena et al. 2009).

shrub (*shrb*), das *Drosophila*-Homolog zu Snf7/Vps32, kodiert für ein hochkonserviertes *coiled coil*-Protein und stellt die Kernkomponenten des ESCRT-III-Komplexes dar (Babst 2005; Sweeney et al. 2006; Troost et al. 2012). *shrub* wurde bei der Suche nach Mutationen identifiziert, welche dendritische Musterdefekte auslösen (Gao et al. 1999). Mutationen im *shrub*⁴-Locus führen zur embryonalen Letalität, wobei die betroffenen Embryonen ein stark reduziertes dendritisches Feld aufweisen (Gao et al. 1999; Sweeney et al. 2006).

Shrub und andere ESCRT-III-Proteine wechseln zwischen einer monomeren cytoplasmatischen und einer komplexbildenden multimeren Form, welche an die endosomale Membran gebunden werden und aus ca. 200-250 Aminosäuren aufgebaut sind. Ihr N-Terminus besteht aus einer basischen Kern-Region mit vier α -Helices, über welche Homo- und Heterooligomerisierung abläuft. Der C-Terminus beinhaltet eine saure autoinhibitorische Region, mit einer fünften α -Helix und einer MIR (MIT-interacting Region) Region, für die Bindung an die N-terminale MIT (microtubule-interacting and-transport) Domäne der ATPase Vps4 (Scott et al. 2005).

In der monomeren geschlossenen Form eines ESCRT-III-Proteins verhindert die autoinhibitorische Region im C-Terminus die Hetero- und Homooligomerisierung mit anderen ESCRT-III-Proteinen (Williams and Urbe 2007).

Die an die endosomale Membran rekrutierten ESCRT-III-Proteine ändern ihre Konformation in eine geöffnete, aktive Form, welche in der Lage ist, durch den freigewordenen N-Terminus mit anderen ESCRT-III-Proteinen zu homo- oder heterodimerisieren (Lin et al. 2005; Muziol et al. 2006; Zamborlini et al. 2006).

Shrub und die anderen ESCRT-III Proteine scheinen nicht in der Lage zu sein ubiquitinierte Fracht-Proteine direkt zu binden. Allerdings können sie weitere Proteine rekrutieren, wie die ATPase Vps4 und ALIX (ALG-2 interacting protein X)/Bro1. Die ATPase Vps4 ist notwendig, um die ESCRT-Komplexe zu entfernen (Davies et al. 2009). Alix/Bro1 bindet welches Doa4, welches die Deubiquitinierung der Fracht gewährleistet und zu dessen Internalisierung in intraluminale Vesikel (ILVs) führt (Luhtala and Odorizzi 2004; Odorizzi 2006).

Bei Shrub handelt es sich wie bei ESCRT-I- und ESCRT-II-Proteinen um einen negativen Regulator des Notch Signalweges (Hori et al. 2011). Es konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von Shrub, an der D/V-Grenze in der Flügelimaginalscheibe, zu einer Reduktion der Genexpression von *cut* (*ct*) führt, einem direkten Zielgen des Notch-Signalweges (Hori et al. 2011). Dagegen führt die Reduzierung bzw. der Verlust der *shrub*-Funktion zur schwachen Expression des Notch-Zielgens *cut* (Hori et al. 2011).

Mit Hilfe eines genetischen *modifier screens* und über biochemische Methoden, durch eine Ko-Immunopräzipitation und durch einen GST-Pull-Down-Assay, konnte Shrub, als direkter Interaktionspartner des Tumorsuppressorprotein Lethal (2) giant discs (*Lgd*) nachgewiesen werden (Troost et al. 2012).

1.3 Das Tumorsuppressorgen *lethal (2) giant discs (lgd)*

Erstmals wurde das Tumorsuppressorgen *lethal (2) giant discs (lgd)*, 1971 durch Bryant und Schubiger, bei *Drosophila melanogaster* beschrieben (Bryant and Schubiger 1971).

Die Transkriptionseinheit *CG4713* ist auf dem linken Arm des 2. Chromosoms lokalisiert und kodiert für ein 816-Aminosäuren großes *Lgd* Protein bei *Drosophila* (Childress et al. 2006; Jackel and Klein 2006).

Das Protein stellt ein Mitglied einer uncharakterisierten Familie dar und eine Strukturanalyse des Proteins in *Drosophila* deckte vier DM14-Domänen und eine C2-Domäne auf (**s.Abb.4**) (Nalefski and Falke 1996; Ponting and Russell 2002; Jaekel and Klein 2006).

Die Abkürzung DM14 steht für die 14. Domäne bei *Drosophila melanogaster*, und es handelt sich dabei um ca. 59-Aminosäure große Domänen, die nur bei Lgd zu finden ist (Ponting and Russell 2002). Neuste Forschungen haben gezeigt, dass die DM14 Domänen essentiell für die Funktion von Lgd sind. In redundanter Art und Weise fungieren sie für die direkte Interaktion mit der ESCRT-III Untereinheit Shrub (Troost et al. 2012).

Die C-terminal gelegene C2-Domäne ist normalerweise bekannt für Protein-Protein- und Protein-Phospholipid-Interaktionen und wird bei Lgd für dessen subzelluläre Lokalisation benötigt (Nalefski and Falke 1996; Troost et al. 2012).

Die Lgd-Struktur scheint im gesamten Tierreich hochkonserviert zu sein. So besitzen Vertebraten zwei Lgd-Orthologe (Lgd1 und Lgd2), wobei humanes Lgd2 (hLgd2/CC2D1A/Freud-1) ist mit nicht-syndromischer autosomal rezessiver mentaler Retardation assoziiert ist und womöglich einen Regulator der Expression des Serotonin-Rezeptors (5-HT1A) darstellt (Ou et al. 2003; Basel-Vanagaite et al. 2006; Jaekel and Klein 2006; Rogaeva et al. 2007). Auch humanes Lgd1 (hLgd1/CC2D1B/Freud-2) konnte als zweiter Regulator des 5-HT1A-Rezeptors identifiziert werden (Hadjighassem et al. 2009; Hadjighassem et al. 2011).

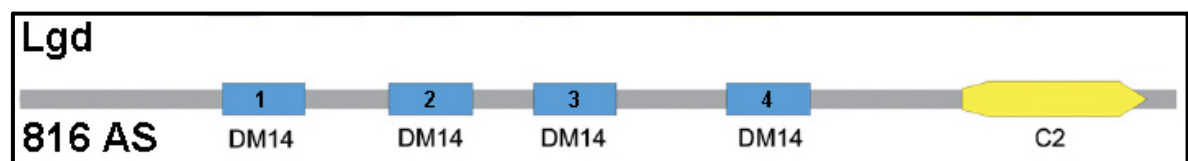


Abb.4: Schematische Darstellung der Proteinstruktur von Lgd

Die Graphik zeigt die Proteinstruktur des Tumorsuppressors Lgd, welches eine Länge von 816 Aminosäuren (AS) besitzt. Im N-Terminus befinden sich die vier hintereinandergeschalteten DM14-Domänen, welche von 1-4 durchnummeriert sind (blaue Rechtecke). Die C2-Domäne (gelbe Box) ist im C-Terminus lokalisiert. (modifiziert nach Jaekel and Klein, 2006)

Der Ausfall der *lgd*-Funktion bei *Drosophila* resultiert in der Überproliferation aller Imaginalscheiben, welche aufgrund einer ligandenunabhängigen Aktivierung des Notch Signalweges ausgelöst werden und zu einer verlängerten larvalen Phase und der frühpupalen Letalität führen (Klein 2003; Jaekel and Klein 2006; Troost et al. 2012). Aus diesem Grund stellt Lgd einen negativen Regulator des Notch Signalweges dar und

verhindert dessen ektopische Aktivierung in allen Imaginalscheiben bei *Drosophila* (Klein 2003; Jaekel and Klein 2006).

Wie bereits erwähnt konnte diese ligandenunabhängige Aktivierung des Notch-Signalweges auch beim Verlust der ESCRT-I bis ESCRT-III Mitglieder beobachtet werden (Thompson et al. 2005; Childress et al. 2006; Gallagher and Knoblich 2006; Jaekel and Klein 2006). Daher ist Lgd am konstitutiven Transport des Notch-Rezeptors über den endosomalen Transportweg beteiligt. Der Ausfall von *lgd* führt zu einem Defekt im endosomalen Transport und zur Akkumulation des Notch Rezeptors in vergrößerten späten Endosomen (Klein 2003; Gallagher and Knoblich 2006; Jaekel and Klein 2006; Troost et al. 2012). Bisher konnte aber nicht gezeigt werden, dass der Verlust von *lgd* Auswirkungen auf andere Signalwege, wie z.B. dem Wntless/Wnt-, dem Hedgehog- und dem Decapentaplegic/BMP-Signalweg, besitzt (Klein 2003; Jaekel and Klein 2006).

1.4 Die Oogenese bei *Drosophila melanogaster*

Die Oogenese bei *Drosophila* dient als ausgezeichnetes Modellsystem in der Zell-, Molekular- und Entwicklungsbiologie (Spradling 1993; Roth 2001; Horne-Badovinac and Bilder 2005; Bastock and St Johnston 2008; Klusza and Deng).

Die weibliche *Drosophila* Fliege besitzt zwei Ovarien, welche sich aus ungefähr 16-20 Ovariolen bzw. Ovariolschläuchen zusammensetzen in denen der gesamte Prozess der Oogenese abläuft. Jede Ovariole stellt eine individuelle Eiproduktionslinie dar, welche junge Eikammern am anterioren Ende und eine Reihe fortschreitend älter werdender Eikammern, nach posterior wandern, besitzt (Horne-Badovinac and Bilder 2005).

Das ungefähre Alter einer Eikammer kann anhand von morphologischen Kriterien bestimmt und in die Stadien 1-14 der Oogenese eingeteilt werden (**s.Abb.5 A**). Am anterioren Ende eines jeden Ovariolschlauchs befindet sich das sogenannte Germarium, welches sowohl Keimbahn-Stammzellen (germline stem cells, GSCs) als auch somatische Follikel-Stammzellen (follicle stem cells, FCSs) besitzt (**s.Abb.5 B**) (Horne-Badovinac and Bilder 2005).

An der anterioren Spitze des Germariums sind ungefähr zwei bis drei GSCs lokalisiert, welche durch somatische terminale Filament-Zellen, Kap-Zellen und Innere Hüll-Zellen umgeben sind und eine Nische für die Stammzellen bilden (**s.Abb.5 B**) (Song et al. 2004).

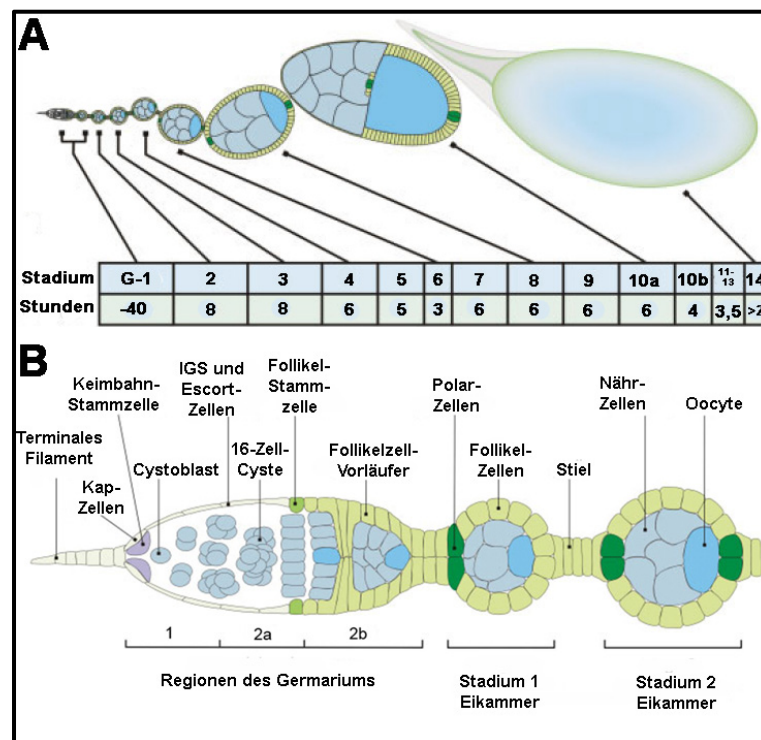


Abb.5: Überblick der Oogenese und Bildung eines Follikels

A) Graphische Darstellung eines wildtypischen Ovariolschlauchs. Die Zahlen unter jeder Eikammer zeigen das Stadium in der Oogenese an. Das Germarium ist mit einem G gekennzeichnet. Die Zeitlinie drunter, zeigt die relative Länge der Stadien an. B) Graphische Darstellung des Aufbaus einer Eikammer. Die Zeichnung zeigt die Ereignisse der frühen Oogenese, die zur Struktur der Eikammer führen, wie die Abkapselung der Keimbahnzyste durch die Follikelzellvorläufer, die Differenzierung der Polar- und Stielzellen, die posteriore Position der Oocyte und die Position der Keimbahn Stammzellen und der somatischen Follikelzellen. Außerdem ist eine Vielzahl anderer Zelltypen dargestellt, die sich im Germarium befinden. (Graphiken entnommen und modifiziert aus Horne-Bodavina and Bilder, 2005)

Die GSCs sind durch DE-Cadherin vermittelte Zell-Adhäsion mit den Kappen-Zellen und so auch mit der Nische verankert. Diese Verankerung ist entscheidend für die Aufrechterhaltung der GSC (Song et al. 2002; Li and Xie 2005). Der Verlust der adherens junctions zwischen den GSCs und den Kappen-Zellen führt dazu dass die GSCs von der Nische wegwandern und differenzieren (Song et al. 2002). Die Kappen-Zellen sind durch die Expression von *dpp*, *gbb*, *hh*, *piwi* und *Yb* gekennzeichnet und der BMP-, Hh- und Piwi-Signalweg spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation und Aufrechterhaltung der GSCs (Cox et al. 2000; Xie and Spradling 2000; King et al. 2001; Song et al. 2004; Spradling 2004).

Die GSCs teilen sich abwechselnd asymmetrisch über eine vollständige Cytokinese um eine neue GSC und einen sogenannten Cystoblasten (CB) zu produzieren. Die GSC bleibt verankert mit den Nische-Zellen und die Tochterzelle wird einen Zelldurchmesser von der Nische entfernt platziert. Der Cystoblast durchläuft vier Runden synchroner Teilung mit

unvollständiger Cytokinese um Gruppen aus 2, 4, 8 und 16 Cystocysten zu bilden, die über 15 cytoplasmatische Brücken, genannt Ringkanäle, miteinander in Verbindung stehen (de Cuevas et al. 1997; Spradling et al. 1997).

Die GSCs und ihre Nachfolger können, anhand einer Keimbahn-spezifischen Struktur die als Fusome bezeichnet wird, innerhalb des Germariums sehr einfach identifiziert und voneinander unterschieden werden (Lin et al. 1994; de Cuevas et al. 1997). Das Fusome ist reich an Skelettmembran Proteinen wie alpha-Spectrin (a-Spec) und Hu li tai shao (Hts). In den GSCs und den CBs besitzt es eine kugelige Form und wird auch als Spectrosom bezeichnet. Bei den unvollständigen Teilungen wird das Fusome verzweigt und verbindet die Cystocysten miteinander (Lin et al. 1994; Song et al. 2004).

Das Follikelepithel bei *Drosophila melanogaster* liefert ein ausgezeichnetes Modell für Studien der Regulation von Zell-Zyklus Programmen, der DNA-Replikation und der Zell-Differenzierung (Sun, J. et al. 2008).

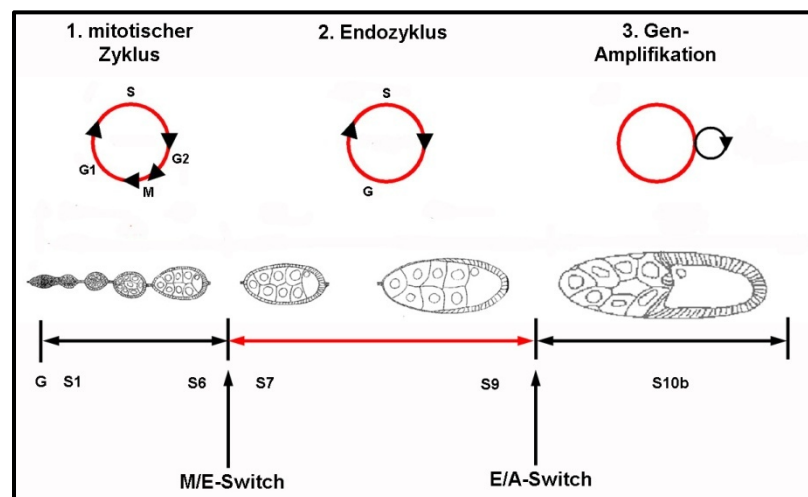


Abb.6: Graphische Darstellung der unterschiedlichen Zellzyklus-Programme während der Oogenese bei *Drosophila*

1. Mitotischer Zyklus: In den frühen Stadien der Oogenese (S1-S6) durchlaufen die Follikelzellen den normalen mitotischen Zell-Zyklus, mit kompletter G1-, S-, G2- und M-Phase. 2. Endozyklus: Nach Stadium 6 (S7-S9) durchlaufen sie drei Runden eines Endozyklus, in denen sie ihre genomische DNA duplizieren, ohne sich dabei zu teilen. 3. Gen-Amplifikation: Ab Stadium 10b wird die Duplikation der genomischen DNA gestoppt und die Follikelzellen starten mit der synchronisierten Amplifikation ganz bestimmter weniger genomischer Loci. Der Wechsel vom mitotischen Zyklus, hin zum Endozyklus wird auch als M/E-Switch bezeichnet. Wogegen für den Wechsel vom Endozyklus zur Gen-Amplifikation, die Abkürzung E/A-Switch verwendet wird. (Graphik entnommen und modifiziert aus Sun und Deng, 2005)

Im Germarium befinden sich 2-3 Follikelstammzellen, welche sich asymmetrisch teilen und eine neue Stammzelle und eine Vorläufer-Follikelzelle bilden. Die Bildung der Follikelzellen führt zur Umschließung der 16-Keimzellen durch ein einschichtiges

Follikelepithel und der Produktion einer Eikammer bzw. eines Follikels (Sun, J. et al. 2008).

Die Main-Body-Follikelzellen durchlaufen während der Oogenese drei verschiedenen Zell-Zyklus-Programme (**s.Abb.6**). Zunächst durchlaufen die Follikelzellen von Stadium 1-6 bis zu 5 Runden eines proliferierenden mitotischen Zykluses, mit kompletter G1-, S-, G2- und M-Phase (**s.Abb.6**). Ab Stadium 6/7 wird die Proliferation der Follikelzellen durch einen Notch-abhängigen Prozesses gestoppt und die Zellen durchlaufen drei Rundes eines Endozyklus, in denen sie ihre genomische DNA duplizieren ohne sich dabei zu teilen (**s.Abb.6**).

Der Wechsel vom mitotischen Zyklus zum Endozyklus wird auch als M/E-Switch bezeichnet. Nach Ablauf des Endozyklus, ab Stadium 10b wird die Duplikation der genomischen DNA angehalten und die Follikelzellen starten mit der Amplifikation spezifischer genomischer DNA (**s.Abb.6**). Der Wechsel vom Endozyklus zur sogenannten Chorion-Gen-Amplifikation wird als E/A-Switch bezeichnet.

1.5 Die Entwicklung der mechanosensorischen Borsten bei *Drosophila melanogaster*

Das adulte periphere Nervensystem von *Drosophila melanogaster* besteht u.a. aus externen sensorischen Organen, die während der larvalen und puppalen Entwicklung etabliert werden und in einem stereotypen Muster über den gesamten Körper der Fliege verteilt sind. Bei diesen Organen handelt es sich um sensorische Borsten, die auf mechanische Reize der Umwelt reagieren. Unterschieden werden zwei Typen von Borsten, die in ihrer Anzahl und Größe differieren. Es handelt sich hierbei um die kleinen Microchaeten und deren größere Gegenstücke, die Macrochaeten. Bezogen auf den Thorax bei *Drosophila* sind die größeren sensorischen Organe (SO, sensory organs), die Macrochaeten, in einem ganz spezifischen Muster angeordnet. Aufgrund dieser genau bestimmten Position konnte jeder Borste ein eigener Name zugeordnet werden. Dagegen besitzen die kleineren SOs, die Microchaeten, nur eine teilweise regelmäßige Anordnung und außerdem variieren sie in ihrer Anzahl (Hartenstein and Posakony 1989; Jan and Jan 1994; Modolell and Campuzano 1998; Simpson et al. 1999; Calleja et al. 2002). Die Musterbildung im peripheren Nervensystem (PNS) von *Drosophila* spiegelt einen Prozess wider, durch den Zellen sowohl räumlich als auch zeitlich reguliert und in einem reproduzierbaren Muster

angeordnet werden. Aus diesem Grund wurden zahlreiche Studien in diesem speziellen Entwicklungsprozess bei *Drosophila* durchgeführt.

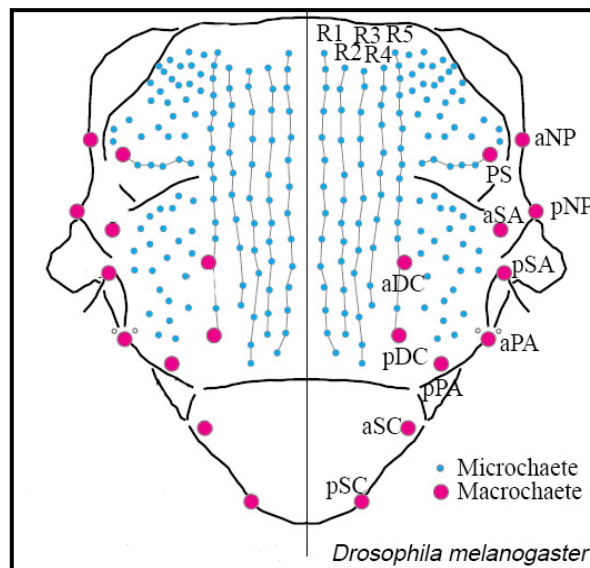


Abb.7: Die Position der mechanosensorischen Borsten von *Drosophila melanogaster*

Die zwei Arten von Borstentypen, die sich auf dem Thorax befinden, unterscheiden sich in ihrer Anzahl, ihrer Größe und ihrer Anordnung. Während die größeren Macrochaeten in einem streng stereotypen Muster angeordnet sind, variieren die kleineren Microchaeten sowohl in ihrer Anordnung als auch in ihrer Anzahl. Jede Macrochaeten besitzt entsprechend ihrer Position einen Namen (an: Anterior Notopleural; pNP: posterior Notopleural; PS: Presuteral; aSA: anterior Supraalar; pSA: posterior Supraalar; aPA: anterior Postalar; pPA: posterior Postalar; aDC: anterior Dorsocentral; pDC: posterior Dorsocentral; aSC: anterior Scutellar; pSC: posterior Scutellar). (Graphik entnommen und modifiziert aus Simpson et al., 1999.)

Sowohl Macro- als auch Microchaeten sind aus vier Zellen aufgebaut. Hierbei werden die äußeren Strukturen durch die Schaft- und Sockelzelle und die inneren Strukturen durch die Begleitzelle und das Neuron, welches die Borste innerviert, gebildet. Eine fünfte Zelle, die Gliazelle, wandert nach der Bildung der Borste weg und wird durch Apoptose entfernt. Die Bildung dieser fünf Zellen erfolgt durch drei asymmetrische Zellteilungen einer einzelnen sensorischen Vorläuferzelle (sensory organ precursor, SOP). Nach der ersten asymmetrischen Teilung der SOP (oder auch pI-Zelle) bilden sich eine äußere (pIIa) und eine innere (pIIb) Tochterzelle. Aus der äußeren Zelle (pIIa) bilden sich dann durch eine zweite asymmetrische Teilung die Schaft- (Trichogen) und die Sockelzelle (Tormogen). Aus der inneren Zelle (pIIb) gehen die Glia- (G) und die pIIIb-Zelle hervor. Aus der pIIIb-Zelle entstehen durch eine abschließende asymmetrische Teilung das Neuron (N) und die Begleitzelle (Thecogen) (Hartenstein and Posakony 1989; Gho et al. 1999).

Die Entwicklung beider Borstentypen auf dem Notum, verläuft nach dem gleichen Prinzip und erfolgt in den Flügelimaginalscheiben, den Anlagen der adulten Epidermis. Die Borstenentwicklung beginnt mit der Expression der proneuralen Gene *achaete* (*ac*) und

scute (*sc*). Die Expression der beiden Gene ist auf bestimmte Gruppen von Zellen der Flügelimaginalscheibe, die als proneurale Kluster (proneural cluster, PNC) bezeichnet werden, beschränkt (Romani et al. 1989; Cubas et al. 1991; Martinez and Modolell 1991; Skeath and Carroll 1991). Zunächst besitzen aufgrund der Ac und Sc Aktivität alle Zellen eines PNC die Fähigkeit ein neuronales Schicksal anzunehmen. Durch einen Selektionsprozess, der als lateral Inhibition bezeichnet wird und der durch den Notch Signalweg vermittelt wird, erlangen maximal 1-2 Zellen in einem PNC das SOP Schicksal. In den Nachbarzellen wird dagegen die Expression der proneuralen Gene ausgeschaltet und das epidermale Schicksal ausgelöst (Modolell and Campuzano 1998).

Kodiert werden die proneuralen Gene durch den *achaete-scute*-Genkomplex (*AS-K*), der sowohl an der Entwicklung des zentralen (ZNS) als auch des peripheren Nervensystems (PNS) beteiligt ist. Bei den Mitgliedern des *AS-K* handelt es sich um die vier homologen Gene *achaete* (*ac*), *scute* (*sc*), *lethal of scute* (*l'sc*) und *asense* (*ase*), welche alle für basische Helix-Loop-Helix-Proteine (bHLH-Proteine) kodieren und als Transkriptionsfaktoren fungieren. Die Mitglieder werden als proneurale Gene bezeichnet, da sie durch ihre Aktivität bestimmten Zellen die Fähigkeit verleihen können, sich zu SOPs zu differenzieren (Romani et al. 1989; Modolell 1997; Modolell and Campuzano 1998). Der *AS-K* befindet sich an der Spitze des X-Chromosoms und erstreckt sich über ungefähr 90 kb (Kilobasen) DNA, wobei die vier bHLH Transkriptionseinheiten durch große Regionen nicht-transkribierter DNA voneinander getrennt sind (**s.Abb.8 A**). Die Gene *achaete* (*ac*) und *scute* (*sc*) sind für die Entwicklung des adulten Borstenmusters auf dem *Drosophila* Thorax hauptsächlich verantwortlich (Gibert and Simpson 2003; Marcellini et al. 2005).

Die Expression der proneuralen Gene *ac* und *sc* in der Flügelimaginalscheibe erfolgt wie bereits zuvor erwähnt innerhalb der Zellen des PNC (**s.Abb.8 B**). Für die Aktivität von Ac und Sc wird das proneurale Protein Daughterless (Da) benötigt, welches ebenfalls einen bHLH-Transkriptionsfaktor darstellt. Das Protein Da bildet über deren gemeinsame HLH-Domäne (HLH-Domäne) Heterodimere mit Achaete (Ac) und Scute (Sc). Die Heterodimere Ac/Da bzw. Sc/Da können anschließend mit Hilfe ihrer basischen DNA-bindenden Domäne an spezifische Regionen der DNA binden und durch die Expression bestimmter proneuraler Zielgene das neuronale Schicksal einleiten (Cabrera and Alonso 1991; Romain et al. 2000). Für die DNA-Bindung werden bestimmte Erkennungssequenzen benötigt, die als E-Boxen bezeichnet werden und sich durch die Konsensussequenz CAG(G/C)TG auszeichnen (Culi and Modolell 1998).

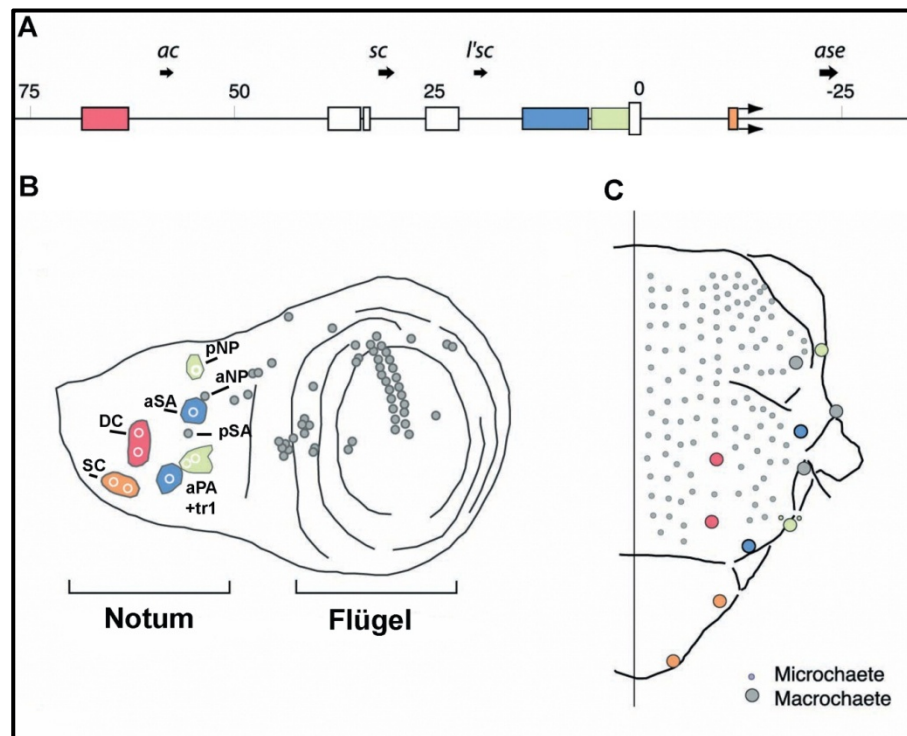


Abb.8: Der *achaete-scute*-Genkomplex (*AS-K*) bei *Drosophila melanogaster* und die Schematische Darstellung einer Flügelimaginalscheibe und die sich aus ihr entwickelnden adulten Strukturen

(A) Schematische Darstellung der genomischen Region des *achaete-scute*-Komplexes (*AS-K*), welcher sich über ca. 90 kb DNA erstreckt. Eingezeichnet sind die vier Transkriptionseinheiten von *ac*, *sc*, *l'sc* und *ase*, deren Transkriptionsrichtung zusätzlich durch Pfeile markiert ist. Die verschiedenen Enhancer-Elemente des Genkomplexes sind durch unterschiedlich farbige Boxen hervorgehoben. Diese Enhancer regulieren die Expression der proneuralen Gene *ac* und *sc* in den PNCs der Flügelimaginalscheibe (B). Die Expression der Gene wird durch die entsprechenden Enhancer aus (A) reguliert. (C) Zu erkennen sind die Positionen der Macrochaeten (Hemiotum), die aus den proneuralen Klustern bzw. den entsprechenden SOPs aus der Flügelimaginalscheibe (B) hervorgehen. (Graphik entnommen und modifiziert aus Calleja et al., 2002)

Der Ausfall der Genfunktion von *ac* und *sc* bzw. des gesamten *AS-Komplexes*, hat einen extremen Verlust sensorischer Vorläuferzellen in der Flügelimaginalscheibe bzw. sensorischer Organe auf dem Thorax zur Folge (Campuzano et al. 1985; Marcellini et al. 2005). Dagegen führt die Überexpression von *ac* und *sc* zur Ausbildung ektopischer SOPs bzw. zusätzlicher mechanosensorischer Borsten (Rodriguez et al. 1990). Eines der Zielgene von *Ac* und *Sc* ist *scabrous* (*sca*), welches für ein sekretierendes dimeres Glycoprotein kodiert. Es ist an der Ausbildung des allgemeinen Borstenmusters beteiligt und wird aufgrund der *ac*- und *sc*-Abhängigkeit in gleicher Weise wie die beiden proneuralen Gene exprimiert (Mlodzik et al. 1990; Hu et al. 1995; Renaud and Simpson 2001).

Der kodierende Bereich des *AS-Komplexes* umfasst nur einen sehr geringen Teil des gesamten Genkomplexes und die proneuralen Transkriptionseinheiten werden durch große Regionen nicht-transkribierter DNA voneinander getrennt. Innerhalb dieser nicht-

kodierenden Bereiche befinden sich zahlreiche positionsspezifische, Enhancer-ähnliche Elemente, die sowohl stromaufwärts (*upstream*) als auch stromabwärts (*downstream*) von den jeweiligen Transkriptionseinheiten lokalisiert sind (G>,). Durch die Aktivität der Enhancer Elemente wird die Expression der proneuralen Gene *ac* und *sc* reguliert. Obwohl die Gene in einem sehr ähnlichen Muster innerhalb der Flügelimaginalscheibe exprimiert werden, besitzen sie sehr unterschiedlich *cis*-regulatorische Regionen. Während der von *sc* sehr komplex aufgebaut ist und sich über 50 kb ausdehnt, befindet sich der von *ac* in einem Bereich von ungefähr 0,8 kb *upstream* vom Gen. Die regulatorischen Elemente sind dafür verantwortlich, dass die Expression von *ac* und *sc* in einem kompletten Muster räumlich und zeitlich reguliert wird (Culí and Modolell 1998; Gómez-Skarmeta et al. 2003).

Diese *cis*-agierenden Enhancer-ähnlichen Elemente reagieren auch auf lokale spezifische Kombinationen von Faktoren und vermitteln so die *ac*- und *sc*-Aktivierung, welche die Entwicklung der Macrochaeten in der korrespondierenden Position auslöst (Martinez and Modolell 1991). Der Prozess der Aktivierung der proneuralen Gene wird auch als *Prepatterning* bezeichnet und die Gene die daran beteiligt sind als *Prepattern*-Gene. Zwei dieser Prepattern-Faktoren sind der GATA1-Transkriptionsfaktor Pannier (Pnr) und sein Gegenspieler U-shaped (Ush), ein Zinkfinger-Transkriptionsfaktor. Diese Faktoren sind an der Regulation der Expression von *ac* und *sc* in den proneuralen Clustern beteiligt (Romain et al. 1993; Cubadda et al. 1997; Haenlin et al. 1997).

Eine weitere Regulation der proneuralen Genexpression erfolgt durch den bHLH-Transkriptionsfaktor Hairy (H), der als Repressor fungiert und die Expression von *ac* unterdrückt (Gómez-Skarmeta et al. 2003). Ein Beispiel für die Ac- und Sc-Regulation auf posttranslationaler Ebene stellt das HLH-Protein Extramacrochaetae dar. Aufgrund der fehlenden basischen Domäne, bildet Emc inaktive Heterodimere mit Ac, Sc und Da die nicht in der Lage sind an die DNA zu binden und die Expression der Zielgene auszulösen (Ellis et al. 1990; Garrell and Modolell 1990; Van Doren et al. 1991; Cubas and Modolell 1992; Van Doren et al. 1992; Martinez et al. 1993).

1.6 Das Modell der lateralen Inhibition

Wie bereits zuvor erwähnt, erlangen innerhalb eines proneuralen Klusters eine oder maximal zwei Zellen die neuronale Kompetenz und entwickeln sich zu SOPs. Aufgrund des Selektionsprozesses, der als laterale Inhibition bezeichnet wird, werden die direkten

Nachbarzellen daran gehindert das gleiche Zellschicksal anzunehmen und entwickeln sich zu Epidermiszellen (Simpson 1990; Bailey and Posakony 1995).

Innerhalb eines proneuralen Klusters besitzen alle Zellen die Kompetenz das neuronale Entwicklungsschicksal anzunehmen. Aufgrund von erhöhter *ac* und *sc*- Expression in der zukünftigen SOP, welche unter anderem durch eigen- bzw. auto-stimulatorische Effekte ausgelöst werden, steigt in diesen Zellen die Konzentration an proneuralen Proteinen an. Anfänglich besitzen alle Zellen eines PNC die gleiche Konzentration des Notch-Liganden Delta (Dl), aber aufgrund von Schwankungen in der Aktivität der regulatorischen Faktoren und der erhöhten proneuralen Proteinkonzentration wird in den zukünftige SOPs mehr Dl exprimiert.

Durch die Erhöhung der Genexpression von Dl kommt es zur Aktivierung von Notch in den Nachbarzellen der SOP und zur Expression der Zielgene des Enhancer-of-split-Komplexes (E(spl)-C), welche für bHLH-Proteine kodieren und zusammen mit dem Ko-Repressor Groucho (Gro) als Repressor fungieren und die Expression der proneuralen Gene *ac* und *sc* in diesen Zellen verhindern.

Gleichzeitig wird die Dl-Expression in den zukünftigen epidermalen Zellen stärker gehemmt, wodurch verhindert wird, dass die zukünftigen SOPs anfällig für die Aktivierung des Notch-Signalweges werden.

Die Proteine des E(spl)-Komplexes sammeln sich in den SOP-angrenzenden Zellen an, unterdrücken die Expression der proneuralen Gene und leiten den epidermalen Entwicklungsprozess ein (Oellers et al. 1994; Paroush et al. 1994; Bailey and Posakony 1995; Lecourtois and Schweisguth 1995 ; Heitzler et al. 1996; Giagtzoglou et al. 2003).

1.7 Ziele der Arbeit

Die Ziele dieser Doktorarbeit bestanden aus drei Projekten, die im Folgenden kurz erläutert werden.

1. Die Aktivität des Notch Signalweges bei *Drosophila melanogaster* kann mit dem Reportergenkonstrukt *Gbe+Su(H)-lacZ* nachgewiesen werden. Der Nachteil dieses Konstrukts liegt u.a. in der cytoplasmatischen Lokalisation des Reporters β -Galaktosidase und des indirekten Nachweises über eine anti- β -Gal Antikörperfärbung. Um ein sensitiveres Signal der Notch-Aktivität zu erhalten, sollten die beiden Konstrukte *Gbe+Su(H)-GFP_{nls}* bzw. *Gbe+Su(H)-Ds-Red_{nls}* hergestellt werden, die fluoreszierende Markerproteine mit nukleärer Lokalisation aufweisen und daher, verglichen mit *Gbe+Su(H)-lacZ*, ein sensitiveres Signal der Notch Aktivität aufweisen sollten.

Eingesetzt werden sollten die Reportergenkonstrukte unter anderem in den beiden folgenden Projekten.

2. Der Tumorsuppressor Lethal (2) giant discs (Lgd) besitzt eine Funktion im endosomalen Transportweg und wirkt als ein negativer Regulator der Notch-Aktivität in der Flügelimaginalscheibe von *Drosophila melanogaster*. Um zu überprüfen, ob der Tumorsuppressor Lgd diese Funktion auch in anderen Geweben hat, sollte eine Lgd Funktionsanalyse in der Oogenese von *Drosophila* durchgeführt werden. Hierbei sollten die Auswirkungen des Genverlustes von *lgd*, sowohl in der Keimbahn als auch in den somatischen Follikelzellen untersucht, und mit den Resultaten aus der Flügelimaginalscheibe hinsichtlich des Notch-Signalweges, anderer Signalwege und des endosomalen Transports verglichen werden.

3. Das Modell der lateralen Inhibition, bei welchem der Notch-Signalweg eine entscheidende Rolle bei der Determination der sensorischen Vorläuferzellen (SOPs) einnimmt, ist in der Literatur nicht zweifelsfrei beschrieben.

Aufgrund zahlreicher Hinweise die alternative Modelle zulassen und die Tatsache, dass das Modell nicht erklärt wie Zellen über größere Distanzen inhibiert werden, sollte die Rolle der lateralen Inhibition bei der Determination der SOPs des adulten peripheren Nervensystems bei *D. melanogaster* detailliert untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien, Enzyme und Reaktions-Kits

Es wurden, soweit nicht anders vermerkt, analysereine Substanzen folgender Firmen eingesetzt: Sigma Aldrich, Merk, Roth,

Feinchemikalien und Reaktions-Kits

DNA-Standard (1 kb Hyperladder I)	Fermentas
Expand High Fidelity PCR-Kit	Roche
Illustra GFX PCR und Gel Band Purification Kit	GE Healthcare
Nucleobond PC100 Midiprep Kit	Macherey-Nagel
Normales Ziegenserum (normal goat serum, NGS)	Jackson ImmunoResearch
Vectashield Mounting Medium	Vector Labs

Enzyme

Für molekularbiologische Arbeiten wurden, soweit nicht anders erwähnt, Enzyme von den folgenden Firmen bezogen: Fermentas, Roche und New England Biolabs.

Geräte und Arbeitsmaterial

Computer	iMac unter OSX und IBM-kompatible PC's unter WindowsXP/Windows7
Software	Adobe Photoshop PS4/PS5 (Adobe Systems), VectorNTI 9.0 (Informax/Invitrogen), Microsoft Office (Microsoft Corp.), ImageJ, AxioVision 4.8 (Zeiss et al.)
Geldokumentation	Polaroid-System, Bio-Rad, Peqlab
Gelelektrophorese	PeqLab
Inkubatoren	Heizblöcke (Liebisch), Wasserbäder (GFL 1083, Julabo U3), Heizschränke (Ehret, WTB Binder, Memmert)
Mikroskope	Axiophot 2, Axioplan, Axioplan 2 Imaging + „Apotome“, Imager.Z1m + „Apotome“, Stemi 200-C, Stemi DCR, Stemi 1000, Stemi 2000, Stemi 2000c, Stemi DV4 (alle von Zeiss)
Mikrowellengerät	Daewoo, Sharp
PCR-Maschinen	T-Gradient, Personal Cycler, UNO-Block, T-Professional Thermocycler (alle von Biometra)
Plastikartikel	Reaktionsgefäße, Petrischalen, Multiwellplatten (Eppendorf, Falcon, Greiner)
Quarzküvetten	105-QS, 70µl, Schichtdicke 10mm (Hellma)
Sequenzierer	ABI 377A DNA-Sequenzierer (Perkin Elmer)
Spektralphotometer	Genequant II (Pharmacia) und BioPhotometer (Eppendorf)
Zentrifugen	Beckmann, Beckman Coulter, Eppendorf, Hettich, Heraeus, Sorvall
Zentrifugenzubehör	SS-34 Rotor (Beckmann), JA-14 Rotor und JA-20 Rotor (beide Beckman Coulter)

2.1.2 Antikörper

Primäre Antikörper

Die primären Antikörper sind von der Developmental Studies Hybridoma Bank (DSHB).

Tabelle 1: Primäre Antikörper

Antikörper gegen:	Herkunft:	Verdünnung:	Hersteller:
β-Galactosidase	Kaninchen	1:1500	Cappel Research Products
Delta (Dl)	Maus	1:100	DSHB
Hindsight (Smythe et al.)	Maus	1:50	DSHB
Nextra	Maus	1:100	DSHB
Nintra	Maus	1:100	DSHB
Wingless (Wg)	Maus	1:50	DSHB
Orb	Maus	1:50	DSHB

Sekundäre Antikörper

Die sekundären Antikörper wurden von der Firma Invitrogen bezogen und stammen aus der Ziege. Die gegen die primären Maus und Kaninchen gerichteten Antikörper sind „highly cross absorbed (hca)“ um Kreuzreaktionen unter den Antikörpern zu verhindern.

Tabelle 2: Sekundäre Antikörper

Antikörper gegen:	gekoppelt mit:	Herkunft:	Hersteller:	Verdünnung:
Maus	Alexa-488 (hca)	Ziege	Invitrogen	1:500
Maus	Alexa-568 (hca)	Ziege	Invitrogen	1:500
Maus	Alexa-647 (hca)	Ziege	Invitrogen	1:125-1:500
Kaninchen	Alexa-488 (hca)	Ziege	Invitrogen	1:500
Kaninchen	Alexa-568 (hca)	Ziege	Invitrogen	1:500
Kaninchen	Alexa-647 (hca)	Ziege	Invitrogen	1:125-1:500
Ratte	Alexa-488	Ziege	Invitrogen	1:500
Ratte	Alexa-568	Ziege	Invitrogen	1:500
Ratte	Alexa-647	Ziege	Invitrogen	1:125-1:500

2.1.3 Plasmide, verwendete Vektoren

Gbe+Su(H)-GFP(cyt) (Michael Schoppmeier)

H-Stinger Transformationsvektor (Scott Barolo)

dsRed T4 Transformationsvektor (Scott Barolo)

pGem-Teasy (Promega)

Die Vektorkarten der jeweiligen Plasmide sind in der Klonierungsstrategie (**Abb.12**) in Kapitel 3.1 abgebildet.

2.1.4 Verwendete Primer

Tabelle 3.: Verwendete Oligonukleotide

	Verwendete Oligonukleotide:	Firma:	Nukelotidsequenz:
1	PCR-S	Invitrogen	5'-CACACCTCCCCCTGAACCTGAAACA-3'
2	PCR-AS	Invitrogen	5'-CTCATGAATTCTGTCGCTCCGTAGACGAAGC-3'
3	T7-Promoter Primer	Promega	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'
4	SP6-Promoter Primer	Promega	5'-d(TATTTAGGTGACACTATAG)-3'

2.1.5 Bakterien und Zelllinien

Für alle Transformationen, die in dieser Arbeit durchgeführt wurden, wurden Mach1TM-T1 kompetente Zellen der Firma Invitrogen verwendet.

Genotyp: F-φ80(lacZ)ΔM15 ΔlacX74 hsdR(rk-, mk+) ΔrecA1398 endA1 tonA

2.2 Methoden

2.2.1 Methoden zur Arbeit mit DNA

Standardmethoden der Molekularbiologie wurden nach den Angaben von Sambrook et al. (1989) durchgeführt.

2.2.1.1 Chemische Transformation

50-100µl chemisch kompetente Mach1TM-T1-Zellen, in einem 1,5ml Eppendorfgefäß, wurden auf Eis aufgetaut und mit 0,1-0,2µl (100-2000ng/µl) Plasmid DNA vermischt. Anschließend wurde das Gemisch für 15min auf Eis und danach für 1min im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Daraufhin erfolgte ein weiterer 2 minütiger Inkubationsschritt auf Eis. Zu dem DNA/E.coli-Gemisch wurden 900µl LB-Kulturmedium, ohne den selektiven Zusatz Ampicillin (Amp), hinzugefügt und für 1h bei 37°C erneut im Wasserbad erwärmt. Durch den folgenden 2 minütigen Zentrifugationsschritt bei 4500rpm wurden Bakterien und Medium voneinander getrennt und die Bakterien waren als Zellpellet am unteren Rand des Eppendorfgefäßes abgesetzt. Das Bakterienpellet wurde in ca. 500µl des Überstandes resuspendiert und auf drei „beschriftete“ LB-Agar-Platten, mit dem selektiven Zusatz Ampicillin (LB-Amp-Platten), wurden 50µl, 100µl und 250µl des DNA/E.coli-Gemischs ausgestrichen. Nach einer kurzen Trockenphase bei Raumtemperatur wurden die LB-Amp-Platten über Nacht im 37°C-Raum inkubiert.

Am folgenden Tag wurden 12 Reagenzgläser mit 3ml LB-Amp-Medium versehen und von den gewachsenen Kolonien auf den LB-Amp-Platten wurde jeweils eine Kolonie mit Hilfe einer gelben Pipettenspitze, zum animpfen des Kulturmediums, übertragen. Die Reagenzgläser wurden über Nacht im 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Die LB-Amp-Platten wurden mit Parafilm versiegelt und auf 4°C gelagert.

Zur Selektion wurden folgende Antibiotika verwendet, die mit angegebener Konzentration in flüssigem LB-Medium oder auf Agarplatten eingesetzt wurden:

Ampicillin: 100µg/ml

2.2.1.2 Isolierung der Plasmid-DNA durch alkalische Lysen (Mini-Präparation)

Um die Plasmid-DNA aus dem Kulturmedium zu gewinnen wurden von der 3ml Über-Nacht-Kulturen jeweils 1,5ml auf 12 1,5ml Eppendorfreaktionsgefäße überführt und für 2min bei 14.000rpm in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen, das entstandene Zellpellet in 300µl TENS resuspendiert und für 3min auf Eis inkubiert. Danach wurden 150µl kaltes 3M NaOAc (pH5,2) hinzugefügt und für weitere 3min bei 14.000rpm zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde in neue 1,5ml Eppendorfreaktionsgefäß überführt, mit 900µl eiskaltem EtOH versehen und für ca.15min bei -20°C im Gefrierschrank inkubiert. Nach der Inkubation folgte ein 10minütiger Zentrifugationsschritt bei 4°C und 14.000rpm. Der Überstand wurde ein weiteres Mal verworfen, dem entstandenen DNA-Pellet wurden 500µl kaltes EtOH zugefügt und es folgte ein abschließender 5minütiger Zentrifugationsschritt bei 4°C und

14.000rpm. Der Überstand wurde wiederum verworfen und das DNA-Pellet getrocknet bis sämtliche EtOH-Reste verflüchtigt waren. Das Pellet wurde danach in 50µl TE+RNase gelöst und zunächst bei Raumtemperatur resuspendiert und anschließend auf -20°C gelagert.

2.2.1.3 Isolierung der Plasmid-DNA durch alkalische Lysen (Midi-Präparation)

Für eine Midi-Präparation wurden zwei Übernachtskulturen angesetzt. Hierfür wurden zwei Erlenmeyerkolben mit 100ml LB-Amp-Medium angesetzt und mit jeweils 100µl der Übernachtskultur für die Mini-Präparation angeimpft und Übernacht auf 37°C inkubiert.

Die 100ml Übernachtskulturen wurden auf zwei 50ml red-Caps(Falcon-Tubes) verteilt und für 15min bei 4°C in der Ultrazentrifuge bei 5.000rpm zentrifugiert. Die Zentrifugation führte zu einem Bakterienpellet und der Überstand konnte verworfen werden. Für die Isolierung der DNA wurde das Nucleobond PC100 Kit von Macherey und Nagel verwendet. Für die Zelllyse wurde das Bakterienpellet zunächst in 4ml S1-Resuspensionspuffer gelöst. Anschließend wurden 4ml S2-Lysepuffer hinzugefügt, das Falcon 6-8x geschwenkt und für 3min inkubiert.

Danach wurden 4ml vorgekühlter S3-Neutralisierungspuffer beipipettiert, wiederum 6-8x geschwenkt und für 5min auf Eis inkubiert. Während der Eisinkubation wurden die Nucleobond AX100 Säulen des Kits mit 2,5ml N2-Equilibrierungspuffer vorbereitet. Um die ausgeflockten Bestandteile der Bakterien von der DNA zu trennen, wurde die homogene Suspension durch einen Faltenfilter auf die Säule aufgetragen und filtriert. Die an die Säule gebundene DNA wurde mit 10ml N3-Waschpuffer gewaschen. Mit Hilfe des N5-Elutionspuffers wurde die DNA von der Säule gelöst und in einem 15ml red-Cap aufgefangen. Zu der eluierten DNA wurden 3,5ml Isopropanol für die Präzipitation hinzugefügt und für 30min bei 13.000rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und 70% Ethanol beigefügt und wiederum zentrifugiert. Diesmal bei RT und 13.000rpm. Der Überstand wurde wiederum verworfen und das DNA-Pellet bei RT getrocknet und in 100µl TE+RNase gelöst und Übernacht im Kühlschrank resuspendiert.

2.2.1.4 DNA-Konzentrationsbestimmung

Zur Bestimmung der Konzentration der Plasmid-DNA wurden die Extinktion der Lösungen bei 260 nm mit Hilfe des NanoDrops photometrisch bestimmt. Für die doppelsträngige DNA (dsDNA) entspricht eine Extinktion von 1 bei 260nm einer Konzentration von 50µg/ml. Zur weiteren Bestimmung der Reinheit wurde außerdem die Extinktion bei 260nm und bei 280nm gemessen, weil bei 280nm das Absorptionsmaximum der meisten Proteine liegt. Der Quotient der beiden Extinktionen sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen, weil niedrigere Werte auf eine Verunreinigung mit Proteinen hinweisen.

2.2.1.5 Restriktionsspaltungen

Tabelle 4: Restriktionsspaltungsansätze

Restriktionsspaltung für analytisches Agarosegel:
X µl DNA X µl 1. Restriktionsenzym (X units; NEB) X µl 2. Restriktionsenzym (X units; NEB) X µl 10x Puffer (1-4, NEB) X µl H ₂ O 10-20µl insgesamt
Restriktionsspaltung für präparatives Agarosegel:
X µl DNA X µl 1. Restriktionsenzym (X units; NEB) X µl 2. Restriktionsenzym (X units; NEB) X µl 10x Puffer (1-4, NEB) X µl H ₂ O 50µl insgesamt

Alle Restriktionsspaltungen wurden bei 37°C für 1h inkubiert.

2.2.1.6 Ligation

Tabelle 5.: Ligationsansatz

Ligationsansatz:
X µl Vektor X µl Insert X µl 10x Ligasepuffer X µl ATP X µl T4-DNA-Ligase X µl H ₂ O 20 µl insgesamt

Alle Ligationen wurden entweder bei Raumtemperatur für 2-4h oder bei 18°C Übernacht inkubiert.

2.2.1.7 Ligationen in den pGEM-T Easy-Vektor

Das pGEM-T Easy Vektor System der Firma Promega, wurde für die Subklonierung von PCR-Fragmenten und anderen DNA-Fragmenten verwendet.

Zunächst wurde das Tube des pGEM-T Easy Vektor kurz zentrifugiert um den Inhalt an den Boden des Tubes zu befördern.

Die Ligationen wurden folgendermaßen angesetzt:

Tabelle 6: Ansatz für die Ligation in der pGEM-T Easy Vektor

Reaktionskomponenten:	Standardreaktion:	Positiv-Kontrolle:
2x Rapid Liagation Buffer, T4 DNA-Ligase	5µl	5µl
pGEM-T Easy Vector (50ng)	1µl	1µl
PCR Produkt oder DNA-Fragment	Xµl	-
Kontroll-Insert-DNA	-	2µl
T4-DNA-Ligase (3 Weiss Einheiten/µl)	1µl	1µl
Nucelase-freies Wasser auf	10µl	10µl

Die Reaktion wurde durch auf- und abpipettieren vermischt und für 1h bei Raumtemperatur inkubiert. Für die Erreichung einer maximalen Anzahl an Transformanten wurde alternativ über Nacht bei 4°C inkubiert.

Um die geeignete Menge des DNA-Fragmentes (Insert) zu berechnen und in der Reaktion einzusetzen, wurde folgende Rechnung verwendet:

ng des Vektors x kb-Größe des Inserts

----- x Insert:Vektor Molare Ratio = ng des Inserts

kb-Größe des Vektors

Bsp:

50ng x 0,5kb Inserts

----- x 3:1 = 25ng Inserts

3,0kb Vektors

Die Hälfte des Ligationsansatzes, in der Regel 5µl, wurden für die Transformation von chemisch Kompetenten Mach1-Zellen verwendet.

2.2.1.8 DNA-Gelelektrophorese und Gelextraktion

Die Auftrennung der DNA-Fragmente nach ihrer Größe, erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese. Hierzu wurden 0,8%ige (analytische Gele) oder 1,5%ige Agarosegele

(präparative Gele) mit 0,7 µg/ml Ethidiumbromid (EtBr) verwendet um die DNA sichtbar zu machen.

Die Aufreinigung gewünschter DNA-Fragmente aus den Agarosegelen erfolgte durch das „illustra GFX PCR DNA & Gel Band Purification Kit“ der Firma GE Healthcare.

2.2.1.9 Herstellung von 50X Tris-Acetat-EDTA (TAE-Laufpuffer)

242g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)
 57,1ml Acetat (Salz der Essigsäure)
 100ml Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) (0,5M)
 Der pH-Wert wird anschließend auf 8,0 eingestellt.
 Für den verwendeten Ladepuffer wird 1x TAE verwendet.

2.2.1.10 Herstellung von 6x Ladepuffer

10mM TRIS-HCl (pH 7,6)
 0,03% Bromphenolblau
 0,03% Xylenecyanol FF
 60% Glycerol
 60mM EDTA

Xylenecyanol FF läuft im TAE-Puffer bei 4160 und das Bromphenolblau bei 370 Basenpaaren.

2.2.1.11 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Tabelle 7: PCR-Programm zur Amplifikation von Gbe+Su(H)

PCR-Programm:			
1.	94°C	Initial Denaturierung	1x
2.	94°C	Denaturierung (Denaturation) Hybridisierung (Annealing) Elongation	} 10x
3.	50°C + 10°C		
4.	72°C		
5.	94°C	Denaturierung Hybridisierung Elongation	} 25x
6.	50°C + 10°C		
7.	72°C		
8.	72°C	Final Elongation	1x
9.	8°C	Kühlung	

Tabelle 8: PCR-Ansatz

<u>Ansatz</u> A:		<u>Ansatz</u> B:
10 µl	Expand HiFi ^{Plus} Reaction Buffer 5x (MgCl ₂)	10 µl
1 µl	PCR Grade Nucleotide Mix (dNTPs) (10mmol/µl)	1 µl
4 µl	PCR-S (10pmol/µl)	4 µl
4 µl	PCR-AS (10pmol/µl)	4 µl
1 µl	Gbe+Su(H)-GFP _{cyt}	1 µl
0,5 µl	Expand HiFi ^{Plus} Enzyme Blend	0,5 µl
0 µl	BSA	1 µl
29,5 µl	dH ₂ O	28,5 µl
50 µl	gesamt	50µl

2.2.1.12 Sequenzierungen

Die Sequenzierungen der Gbe+Su(H)-Sequenz im pGEM-TEasy, Gbe+Su(H)-GFP_{nl}s und Gbe+Su(H)-DsRed_{nl}s von der Firma SeqLab durchgeführt.

Für die HotShot bzw. extendedHotShot-Sequenzierungsreaktion von Plasmiden wurden 600-700 ng Plasmid und 20 pmol Primer in ein 0,2-ml-Reaktionsgefäß mit flachem Deckel gefüllt und auf 7 µl mit H₂O ergänzt. Günstig ist zudem 5-10 mMol Tris in der Probe.

2.2.2 Fliegen

2.2.2.1 Anzucht und Haltung von Fliegen von *Drosophila melanogaster*

Die in dieser Arbeit verwendeten Fliegenstämme wurden in zylindrischen Futterröhrchen, mit einer geeigneten Menge Futtermedium (Herstellung s. unten) versehen, und entweder bei 18°C oder Raumtemperatur, gehalten und vermehrt. Die Futterröhrchen wurden mit milbenundurchlässigen Stopfen aus Schaumstoff verschlossen.

Kreuzungen für diverse Experimente, aus jungfräulichen Weibchen und Männchen unbekannter Altersstufen, wurden in einem Verhältnis 4:1 verpaart und bei 25°C im Inkubator oder im 25°C-Raum gehalten.

Wohingegen Kreuzungen für RNA-Interferenz-Analysen im 29°C-Inkubator durchgeführt wurden, aufgrund der höheren Effizienz der RNAi.

Zur Verbesserung der Eiablage wurde zusätzlich in das Futtermedium, ein in flüssigem Nipagin getränktes Filterpapier gesteckt.

2.2.2.2 Herstellung des Futtermediums (für 20 Liter)

100 g Agar-Agar,
 190 g Sojamehl,
 336 g Trockenhefe,
 900 g Malzextrakt,
 800 g Rübensirup,
 1424 g Maisschrot,
 90 ml Propionsäure und
 30 g Nipaginpulver

2.2.2.3 Verwendete Fliegenstämme

Tabelle 9: Verwendete Fliegenstämme

	<u>Verwendete Stämme:</u>
1	w; If/CyO ^{wg-lacZ} ; MKRS/TM6b (Multibalancer, MB)
2	w; If; + / SM6b-TM6b (Doublebalancer, DB)
3	Gbe+Su(H)-lacZ; If; + / SM6a-TM6b
4	w; If/CyO ^{wg-lacZ} ; Gbe+Su(H)-lacZ/TM6b
5	w; If/CyO ^{wg-lacZ} ; Gbe+Su(H)-GFP _{nls} /TM6b
6	w; Gbe+Su(H)-GFP _{nls} /CyO ^{wg-lacZ} ; MKRS/TM6b
7	Gbe+Su(H)-DsRed _{nls} ; If/CyO ^{wg-lacZ} ; MKRS/TM6b
8	w; Gbe+Su(H)-DsRed _{nls} /CyO ^{wg-lacZ} ; MKRS/TM6b
9	w; If/CyO ^{wg-lacZ} ; Gbe+Su(H)-DsRed _{nls} /TM6b
10	hsFlp ^{1.22} ; arm-lacZ FRT40A/CyO ^{wg-lacZ} ; MKRS/TM6b
11	hsFlp ^{1.22} ; arm-lacZ FRT40A/CyO ^{wg-lacZ} ; Gbe+Su(H)-GFP _{nls} /TM6b
12	hsFlp ^{1.22} ; arm-lacZ FRT40A/CyO ^{wg-lacZ} ; Gbe+Su(H)-DsRed _{nls} /TM6b
13	hsFlp ^{1.22} ; arm-lacZ FRT40A/CyO ^{wg-lacZ} ; tub-Rab5-CFP, tub-Rab7-YFP/TM6b
14	hsFlp ^{1.22} ; ubi-GFP FRT40A/CyO ^{wg-lacZ} ; MKRS/TM6b
15	hsFlp ^{1.22} ; ubi-GFP FRT40A/CyO ^{wg-lacZ} ; Gbe+Su(H)-DsRed _{nls} /TM6b
16	hsFlp ^{1.22} ; ubi-GFP FRT40A/CyO ^{wg-lacZ} ; Dad-lacZ/TM6b
17	hsFlp ^{1.22} ; ubi-GFP FRT40A/CyO ^{wg-lacZ} ; mib1 ² /TM6b
18	hsFlp ^{1.22} ; ubi-GFP FRT40A/CyO ^{wg-lacZ} ; mib1 ² Gbe+Su(H)-lacZ/TM6b
19	hsFlp ^{1.22} ; His2A-RFP FRT40A/CyO ^{wg-lacZ} ; MKRS/TM6b
20	hsFlp ^{1.22} ; His2A-RFP FRT40A/CyO ^{wg-lacZ} ; Gbe+Su(H)-GFP _{nls} / TM6b

21	hsFlp ^{1.22} ; His2A-RFP FRT40A/CyO ^{wg-lacZ} ; tub-Rab5-CFP, tub-Rab7-YFP/TM6b
22	hsFlp ^{1.22} ; ubi-GFP FRTG13/CyO ^{wg-lacZ} ; MKRS/TM6b
23	hsFlp ^{1.22} ; ubi-GFP FRTG13/CyO ^{wg-lacZ} ; Gbe+Su(H)-DsRed _{nls} /TM6b
24	hsFlp ^{1.22} ; ubi-GFP FRTG13/CyO ^{wg-lacZ} ; Dad-lacZ/TM6b
25	hsFlp ^{1.22} ; His2A-RFP FRTG13/CyO ^{wg-lacZ} ; MKRS/TM6b
26	hsFlp ^{1.22} ; His2A-RFP FRTG13/CyO ^{wg-lacZ} ; Gbe+Su(H)-GFP _{nls} /TM6b
27	hsFlp ^{1.22} ; His2A-RFP FRTG13/CyO ^{wg-lacZ} ; tub-Rab5-CFP, tub-Rab7-YFP/TM6b
28	hsFlp ^{1.22} ; 2xGFP FRT42B/CyO ^{wg-lacZ} ; MKRS/TM6b
29	hsFlp ^{1.22} ; 2xGFP FRT42B/CyO ^{wg-lacZ} ; Gbe+Su(H)-dsRed _{nls} /TM6b
30	hsFlp ^{1.22} ; 2xGFP FRT42B/CyO ^{wg-lacZ} ; Dad-lacZ/TM6b
31	hsFlp ^{1.22} ; If/CyO ^{wg-lacZ} ; ubi-GFP FRT2A/TM6b
32	hsFlp ^{1.22} ; Gbe+Su(H)-dsRed _{nls} /CyO ^{wg-lacZ} ; ubi-GFP FRT2A/TM6b
33	hsFlp ^{1.22} ; If/CyO ^{wg-lacZ} ; His2A-RFP FRT2A/TM6b
34	hsFlp ^{1.22} ; Gbe+Su(H)-GFP _{nls} /CyO ^{wg-lacZ} ; His2A-RFP FRT2A/TM6b
35	hsFlp ^{1.22} ; If/CyO ^{wg-lacZ} ; GFP FRT80/TM6b
36	hsFlp ^{1.22} ; sca-lacZ/CyO ^{wg-lacZ} ; GFP FRT80/TM6b
37	w; lgd ^{d7} FRT40A/CyO ^{wg-lacZ} ; MKRS/TM6b
38	w; lgd ^{d7} FRT40A; Gbe+Su(H)-lacZ/SM6a-TM6b
39	w; lgd ^{d7} FRT40A; Gbe+Su(H)-GFP _{nls} /SM6a-TM6b
40	w; lgd ^{d7} FRT40A; Gbe+Su(H)-DsRed _{nls} /SM6a-TM6b
41	w; lgd ^{d7} FRT40A; tub-Rab5-CFP, tub-Rab7-YFP/SM6a-TM6b
42	w; lgd ^{d7} FRT40A; Dad-lacZ/SM6a-TM6b
43	Notch-YFP; lgd ^{d7} FRT40 A/CyO ^{wg-lacZ} ; MKRS/TM6b
44	w; kuz ^{ES24} FRT40A/CyO ^{wg-lacZ} ; MKRS/TM6b
45	w; kuz ^{ES24} FRT40A; Gbe+Su(H)-GFP _{nls} /SM6a-TM6b
46	w; kuz ^{ES24} FRT40A; Dad-lacZ/SM6a-TM6b
47	w; lgd ^{d7} , kuz ^{ES24} FRT40A/CyO ^{wg-lacZ} ; MKRS/TM6b
48	w; lgd ^{d7} , kuz ^{ES24} FRT40A; Gbe+Su(H)-GFP _{nls} /SM6a-TM6b
49	w; lgd ^{d7} , kuz ^{ES24} FRT40A; Dad-lacZ/SM6a-TM6b
50	w; aph-1 ^{D35} FRT40A/CyO ^{wg-lacZ} ; MKRS/TM6b
51	w; aph-1 ^{D35} FRT40A; Gbe+Su(H)-GFP _{nls} /SM6a-TM6b
52	w; aph-1 ^{D35} FRT40A; Dad-lacZ/SM6a-TM6b
53	w; lgd ^{d7} , aph-1 ^{D35} FRT40A/CyO ^{wg-lacZ} ; MKRS/TM6b

54	w; lgd ^{d7} , aph-1 ^{D35} FRT40A; Gbe+Su(H)-GFP _{nls} /SM6a-TM6b
55	w; lgd ^{d7} , aph-1 ^{D35} FRT40A; Dad-lacZ/SM6a-TM6b
56	w; hrs ^{D28} FRT40A/CyO ^{wg-lacZ} ; MKRS/TM6b
57	w; hrs ^{D28} FRT40A; Gbe+Su(H)-GFP _{nls} /SM6a-TM6b
58	w; hrs ^{D28} FRT40A; tub-Rab5-CFP, tub-Rab7-YFP/SM6a-TM6b
59	w; hrs ^{D28} FRT40A; Dad-lacZ/SM6a-TM6b
60	w; lgd ^{d7} , hrs ^{D28} FRT40A/CyO ^{wg-lacZ} ; MKRS/TM6b
61	w; lgd ^{d7} , hrs ^{D28} FRT40A; Gbe+Su(H)-GFP _{nls} /SM6a-TM6b
62	w; lgd ^{d7} , hrs ^{D28} FRT40A; tub-Rab5-CFP, tub-Rab7-YFP/SM6a-TM6b
63	w; lgd ^{d7} , hrs ^{D28} FRT40A; Dad-lacZ/SM6a-TM6b
64	w; vps ^{25Pb2931} FRT42B/CyO ^{wg-lacZ} ; MKRS/TM6b
65	w; vps ^{25Pb2931} FRT42B; Dad-lacZ/SM6a-TM6b
66	w; shrub ⁴⁻¹ FRTG13/CyO ^{wg-lacZ} ; MKRS/TM6b
67	w; shrub ⁴⁻¹ FRTG13; Gbe+Su(H)-GFP _{nls} /SM6a-TM6b
68	w; shrub ⁴⁻¹ FRTG13; Gbe+Su(H)-DsRed _{nls} /SM6a-TM6b
69	w; shrub ⁴⁻¹ FRTG13; tub-Rab5-CFP, tub-Rab7-YFP/SM6a-TM6b
70	w; shrub ⁴⁻¹ FRTG13; Dad-lacZ/SM6a-TM6b
71	w; lf/CyO ^{wg-lacZ} ; ept ^{P26} FRT2A/TM6b
72	w; Gbe+Su(H)-GFP _{nls} ; ept ^{P26} FRT2A/ SM6a-TM6b
73	w; Gbe+Su(H)-DsRed _{nls} ; ept ^{P26} FRT2A/SM6a-TM6b
74	w; dpp-lacZ; ept ^{P26} FRT2A/SM6a-TM6b
75	w; ptc-GAL4/CyOwg-lacZ; MKRS/TM6b
76	w; ptc-GAL4, UAS-GFP/CyOwg-lacZ; MKRS/TM6b
77	UAS-N-RNAi; lf; + / SM6b-TM6b
78	w; lf/CyO ^{wg-lacZ} ; UAS-N-RNAi/TM6b
79	w; lf/CyO ^{wg-lacZ} ; Psn ^{C1} FRT2A/TM6b
80	w; ptc-GAL4; Psn ^{C1} FRT2A/SM6a-TM6b
81	UAS-N-RNAi; lf; + / SM6b-TM6b
82	w; sca-lacZ; Psn ^{C1} FRT2A/SM6a-TM6b
83	UAS-N-RNAi; sca-lacZ; Psn ^{C1} FRT2A/SM6a-TM6b
84	w; E(spl)m8-Sm-GFP; Psn ^{C1} FRT2A/SM6a-TM6b
85	w; Gbe+Su(H)-GFP _{nls} ; Psn ^{C1} FRT2A/SM6a-TM6b
86	UAS-N-RNAi; Gbe+Su(H)-GFP _{nls} ; Psn ^{C1} FRT2A/SM6a-TM6b

87	w; ptc-GAL4; Gbe+Su(H)-GFP _{nls} /SM6a-TM6b
88	w; UAS-DsRed; UAS-N ^{lv} /SM6a-TM6b
89	w; UAS-DsRed; UAS-N-RNAi/SM6a-TM6b
90	UAS-Dcr2; UAS-DsRed; UAS-N-RNAi/SM6a-TM6b
91	
92	w; Igd ^{d7} FRT40A/CyO ^{wg-lacZ} ; UAS-Rab7-RNAi/TM6b
93	UAS-Dcr2; Igd ^{d7} FRT40A; UAS-Rab7-RNAi/SM6a-TM6b
94	w; shrub ⁴⁻¹ FRTG13; UAS-Rab7-RNAi/SM6a-TM6b
95	UAS-Dcr2; shrub ⁴⁻¹ FRTG13; UAS-Rab7-RNAi/SM6a-TM6b
96	w; sca-lacZ; Gbe+Su(H)-GFP _{nls} /SM6a-TM6b
97	sc ^{10.1} /Δ47
98	w; If/CyO ^{wg-lacZ} ; mib1 ² FRT2A/TM6b
99	w; If/CyO ^{wg-lacZ} ; mib1 ³ FRT2A/TM6b
100	w; If/CyO ^{wg-lacZ} ; mib1 ² FRT2A, Gbe+Su(H)-lacZ/TM6b
101	Gbe+Su(H)-lacZ; ptc-Gal4, UAS-Flp; GFP FRT82B/SM6a-TM6b
102	w; If/CyO ^{wg-lacZ} ; DI ^{rev10} FRT82B e/TM6b
103	w; If/CyO ^{wg-lacZ} ; Ser ^{RX82} FRT82B e/TM6b
104	w; If/CyO ^{wg-lacZ} ; DI ^{rev10} , Ser ^{RX82} FRT82B e/TM6b
105	w; If/CyO ^{wg-lacZ} ; Emc-YFP/SM6a-TM6b
106	w; Su(H) ^{SF8} ; Emc-YFP/SM6a-TM6b
107	w; If/CyO ^{wg-lacZ} ; Psn ^{C1} , Emc-YFP/SM6a-TM6b
108	w; If/CyO ^{wg-lacZ} ; emc ¹ FRT80/TM6b
109	w; sca-lacZ; emc ¹ FRT80/SM6a-TM6b
110	w; If/CyO ^{wg-lacZ} ; emc ^{AP6} FRT80/TM6b
111	w; sca-lacZ; emc ^{AP6} FRT80 /SM6a-TM6b
112	w; If/CyO ^{wg-lacZ} ; emc ^{Pel} /TM6b
113	w; sca-lacZ; emc ^{Pel} /SM6a-TM6b
114	w; If/CyO ^{wg-lacZ} ; Psn ^{C1} , emc ^{Pel} /TM6b
115	w; sca-lacZ; Psn ^{C1} , emc ^{Pel} /SM6a-TM6b

Alle Stämme sind aus der Stammsammlung der Arbeitsgruppe Klein.

2.2.2.4 Präparation und Antikörperfärbung von Flügelimaginalscheiben

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen an Flügelimaginalscheiben, wurden meistens Larven des späten dritten Larvenstadiums verwendet.

Die späten L3 Larven zeichnen sich dadurch aus, dass sie wesentlich größer und dicker sind als jüngere Larven und vor allem dass sie vor der Verpuppung das Futtermedium verlassen und am Rande des Röhrchens herumwandern.

Die Larven wurden abgesammelt und in einem schwarzen Blockschälchen in kaltem 1xPBS präpariert. Eine detailgetreue Anleitung befindet sich in „*Drosophila, Methods and Protocols*“ im Kapitel „*Immunolabeling of Imaginal Discs by Thomas Klein*“.

Die Kadaver wurden in selbstangefertigte Siebchen überführt, welches sich in einer Kammer einer 24-Multiwell-Platte befand und ebenfalls mit 1xPBS versehen war. Die weiteren Schritte der Antikörperfärbung fanden bei Raumtemperatur auf einem Taumler statt.

Fixierung: 30min in 500µl 4%-igem Paraformaledehyd (PFA, EM-Grade)

Waschen: 3x 10min waschen in ca. 500µl 0,3%-igem PBT

Blockierung: 30min in ca. 500µl mit 5%-igem NGS in 0,3%-igem PBT

Inkubation 1. AK: 90min in 500µl mit 5%-igem NGS in 0,3%-igem PBT

Waschen: 3x 15min waschen in ca. 500µl 0,3%-igem PBT

Inkubation 2. AK: 60min in 500µl mit 5%-igem NGS in 0,3%-igem PBT

Waschen: 1x 10min waschen in ca. 500µl 0,3%-igem PBT

Kernfärbung: 4min in 500µl 0,3%-igem PBT

Waschen: 2x 10min waschen in ca. 500µl 0,3%-igem PBT

Anschließend wurden die Kadaver mit den Imaginalscheiben in 1x PBS im Kühlschrank bei 4°C gelagert oder sofort in einem schwarzen Blockschälchen mit 1x PBS feinpräpariert. Hierbei wurden die Imaginalscheiben vom Rest der Larve getrennt und in einen Tropfen Vectashield, welcher sich auf einem Objektträger befand, überführt. Nach Übertragung aller Imaginalscheiben wurden die Objekte mit einem Deckgläschen abgedeckt und in einer Präparatenmappe bei 4°C für die spätere Analyse am Fluoreszenzmikroskop deponiert.

2.2.2.4.1 Herstellung von 10x PBS (phosphate-buffered saline)

1,37M = 80g Natriumchlorid (NaCl, 58,44g/mol)

27mM = 2g Kaliumchlorid (KCl, 74,54g/mol)

100mM = 17,79g Di-Natrium-hydrogenphosphat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{H}_2\text{O}$, 177,99g/mol)

20mM = 2,72g Kaliumhydrogenphosphat (KH_2PO_4 , 136,09g/mol)

Die Substanzen wurden in 800ml dest. H_2O aufgelöst, der pH-Wert auf 7,4 mit Natriumhydroxid (NaOH) eingestellt und anschließend wurde auf 1000ml mit H_2O aufgefüllt. Das für die Präparationen benötigte 1x PBS wurde aus der 10x PBS Stammlösung angesetzt. Hierbei wurden 50ml 10x PBS mit 450ml H_2O verdünnt.

2.2.2.4.2 Herstellung von 0,3%-igem PBT (PBS+Triton X-100)

0,3%-iges PBT (Ovarien und Imaginalscheiben)

500ml 1x PBS
1,5ml Triton X-100

2.2.2.4.3 Herstellung von 4%-igem PFA (Paraformaldehyd)

4g Paraformaldehyd (PFA, EM Grade von EMS Cat.19208) wurden in 80ml dest. H₂O aufgenommen und 1h auf der Heizplatte unter dem Abzug aufgelöst.

Zum Klären der Lösung wurden 3 Tropfen Natriumhydroxid hinzugefügt und auf Eis heruntergekühlt. Anschließend wurden 10ml 10x PBS hinzugefügt und auf 100ml mit dest. H₂O aufgefüllt. Der pH-Wert von 7,2 wurden mit Salzsäure (HCl) eingestellt und das PFA wurde in 15ml Redcaps aliquotiert und bei -20°C im Gefrierschrank gelagert. Bei Bedarf wurde das PFA weiter in 500µl Portionen auf 1,5ml Eppendorfreaktionsgefäße aufgeteilt.

2.2.2.4.4 Herstellung von NGS (normal goat serum)

Das getrocknete, 100%-ige NGS der Firma „Jackson Immuno Research“ wurde in 10ml H₂O aufgelöst, in 1,5ml Eppendorfreaktionsgefäße zu je 0,5ml aufgeteilt und anschließend bei -20°C im Gefrierschrank gelagert.

Für die Blockierungsschritte wurde ein Aliquot des 100%-igen NGS aufgetaut und in 5ml (für die Darmfärbungen) bzw. 10ml (für Ovarien- und Imaginalscheibenfärbungen) 0,3%-igem PBT verdünnt.

2.2.2.4.5 Präparation und Antikörperfärbung von Ovarien

Für die durchgeführten Analysen im Follikelepithel und in der Keimbahn bei *Drosophila*, wurden die Ovarien adulter Weibchen präpariert. Diese wurden zunächst ausreichend lange mit CO₂ betäubt und anschließend wurde das Abdomen entfernt und in ein schwarzes Blockschälchen mit 1x PBS überführt. Hier erfolgte die Präparation der beiden Ovarien aus dem Abdomen heraus und deren Auffächerung für eine bessere Färbung. Die weiteren Schritte wurden, im Gegensatz zu den Färbungen an Imaginalscheiben, in 2ml Eppendorfreaktionsgefäßen durchgeführt.

Fixierung: 10min in 500µl 4%-igem Paraformaldehyd (PFA, EM-Grade)

Waschen: 2x 10min waschen in ca. 1000µl 0,3%-igem PBT

Blockierung: 60min in ca. 500µl mit 5%-igem NGS in 0,3%-igem PBT

Inkubation 1. AK: Übernacht in 500µl mit 5%-igem NGS in 0,3%-igem PBT

Waschen: 2x 10min waschen in ca. 1000µl 0,3%-igem PBT

Blockierung: 60min in ca. 500µl mit 5%-igem NGS in 0,3%-igem PBT

Inkubation 2. AK: 60min in 500µl mit 5%-igem NGS in 0,3%-igem PBT

Waschen: 1x 10min waschen in ca. 1000µl 0,3%-igem PBT

Kernfärbung: 4min in 500µl 0,3%-igem PBT

Waschen: 2x 10min waschen in ca. 1000µl 0,3%-igem PBT

Anschließend wurden die Ovarien in 1x PBS im Kühlschrank bei 4°C gelagert oder sofort in Vectashield eingebettet.

2.2.2.5 Herstellung transgener Fliegen

Die in dieser Arbeit generierten transgenen Fliegen wurden alle mittels P-Element vermittelter Transformation von *Drosophila* Embryonen hergestellt (Rubin and Spradling 1982; Spradling and Rubin 1982). Die in den *pHSTi* und *pRHS* klonierten DNA-Bindestellen *Gbe+Su(H)* konnten stabil ins Fliegen-genom integriert werden.

Die Herstellung des Injektionsmix und die anschließende Injektion der jeweiligen Plasmide in *white*-Embryonen, erfolgte nach dem Protokoll von André Bachmann und Elisabeth Knust (*Drosophila*: Methods and Protocols; Kapitel 4: The Use of P-Element Transposons to Generate Transgenic Flies).

Die, nach der Injektion geschlüpften Larven, wurden gegen den sogenannten Multibalancer-Stamm, mit dem Genotyp $w^-; If / CyO^{wg-lacZ}; MKRS / TM6b$, gekreuzt zur Kartierung des Transgens. Wenn möglich sollten Stämme etabliert werden, die das Transgen (T) auf dem ersten ($T; If / CyO^{wg-lacZ}; MKRS / TM6b$), auf dem zweiten ($w^-; T / CyO^{wg-lacZ}; MKRS / TM6b$) und auf dem dritten Chromosom ($w^-; If / CyO^{wg-lacZ}; T / TM6b$) tragen.

2.2.2.6 Das GAL4/UAS-System

Das GAL4/UAS-System stammt aus der Hefe und besteht aus 2 Komponenten (Brand and Perrimon 1993; Elliott and Brand 2008). Dem GAL4 Transkriptionsaktivator, welcher in gewebespezifischer Art und Weise exprimiert wird, und einem Transgen unter der Kontrolle der Upstream Activating Sequence (UAS). In einer einfachen Kreuzung werden die Treiberlinie (GAL4-Linie) und die Responderlinie (UAS-Linie) zusammengebracht und in den Nachkommen der Kreuzung wird das Transgen nur in den Zellen oder dem Gewebe transkribiert, welche auch das GAL4 exprimieren. Die räumliche und zeitliche Kontrolle der GAL4-Expression basiert auf den endogenen Promoter bzw. Enhancer. So wird bei den Treiberlinien *hh*-GAL4 und *ptc*-GAL4, die Expression des Transgens nur in der *hedgehog*- oder *patched*-Expressionsdomäne induzieren. Zur Regulation der temporären Expression des UAS-abhängigen Transgens, wird zusätzlich das temperatursensitive GAL80-Protein (GAL80ts) unter der ubiquitären Kontrolle des Täubling-Promoters (*tub*-GAL80ts) exprimiert, welches an die Transaktivierungsdomäne von GAL4 bindet und die somit die GAL4-abhängige Transkription in allen Geweben verhindert. Die Reprimierung von GAL4 durch GAL80 wird durch eine einfache Temperaturerhöhung von 18°C auf 29°C erzielt und erlaubt so eine exakte Kontrolle der Expression. Das GAL4/UAS-System findet auch Verwendung im MARCM-System, welches in einem der folgenden Kapitel beschrieben wird (Lee and Luo 2001; Wu and Luo 2006).

2.2.2.7 Die FLP/FRT-vermittelte mitotische Rekombination

Für die Erzeugung mitotischer Klone oder sogenannter Mosaik-Klone, wird häufig das FLP/FRT-System verwendet (Theodosiou and Xu 1998).. Das System stammt ebenfalls aus der Hefe und besteht aus der Flipase Rekombinase (FLP) und der Flipase Recognition Target Bindestellen (FRT).

In den meisten Fällen wird FLP unter dem Hitzeschock induzierbaren Promoter des hsp70 Gens (hsFlp^{1.22}) exprimiert und die Einleitung eines Hitzeschocks führt zur ubiquitären Expression der FLP Rekombinase.

Die sogenannten FRT-Sites wurden auf jedes der Haupt-Chromosome über P-Elemente in proximale Position, nahe dem Zentromer, positioniert.

In den sich teilenden Zellen (G2) leitet die FLP, nachdem sie durch einen Hitzeschock induziert wurde, die mitotische Rekombination zwischen den FRT-Sites ein. Aus der ursprünglich heterozygoten Zelle, entsteht eine Zelle welche homozygot für das mutante Allel ist und durch weitere Zellteilung mutante Zellklone erzeugt. Außerdem entstehen sogenannte Twin-Klone welche 2 Kopien des Marker-Gens tragen und dadurch leicht von den mutanten Zellklonen und der heterozygoten Umgebung zu unterscheiden sind.

2.2.2.8 MARCM-System

Beim MARCM-System (Mosaic analysis with a repressible cell marker) handelt es sich um eine in *Drosophila* eingesetzte genetische Technik, zur Markierung einzelner Zellen oder multipler Zellen mit einem gemeinsamen Vorläufer (Lee and Luo 2001; Wu and Luo 2006).

Im Gegensatz zur FLP/FRT vermittelten mitotischen Rekombination markiert die MARCM-Technik eine kleine Population von wildtypisch oder mutanten Zellen positiv für das Markergen. Die gewünschten homozygot mutanten Zellen entstehen durch mitotische Rekombination in heterozygoten Vorläufern und die genetischen Klone werden durch eine Kombination des GAL80 Repressor Proteins, dem GAL4/UAS-Systems und dem FLP/FRT-Systems positiv markiert (Brand and Perrimon 1993).

In unmarkierten, für die zu untersuchende Mutation und für das Gal80 heterozygoten, parental Zellen, unterdrückt das Repressor-Protein GAL80 die Aktivität von GAL4 und somit die Aktivierung des Marker-Gens, GFP. Die Gene GAL4 und GAL80 stehen unter der Kontrolle des ubiquitären Tubulin-Promotors und das Marker-Gen unter UAS-Promoter Kontrolle. Die beiden FRT-Sites müssen an den gleichen Positionen auf den homologen Chromosomen vorliegen (z.B. FRT40A oder FRTG13) und das GAL80-Gen distal zu einer der FRT-Positionen. Die FLP-Rekombinase, welche die Rekombination einleitet, kann irgendwo im Genom liegen. Sie steht unter der Kontrolle eines Heatshock-Promoters und wird durch einen Hitzeschock induziert. Durch FLP/FRT-vermittelter mitotischer Rekombination, entstehen in sich teilenden Zellen, homozygot mutanten Zellen, denen das Gal80 fehlt und in denen das aktive GAL4 das Marker-Gen anschalten kann. Für die Generierung mutanter Zellklone in den Flügelimaginalscheiben bei *Drosophila melanogaster*, wurden Larven des 1-2. Larvenstadiums einem Hitzeschock bei 37°C für 70min ausgesetzt, um die Flipase zu induzieren. Die Präparation der Larven erfolgte im späten 3. Larvenstadium.

Zur Erzeugung von Keimbahnklonen in den Ovarien wurden Larven des 1-3 Stadiums für 70min bei 37°C einem Hitzeschock ausgesetzt. Die Ovarienpräparation erfolgte 2-3 Tage nach dem Schlüpfen.

Zur Erzeugung von Follikelzellklonen wurden Puppen und Adulte Tiere für 70min bei 37°C einem Hitzeschock ausgesetzt. Die Präparation erfolgte 2 Tage nach dem Heatshock.

2.2.2.9 RNA-Interferenz

Bei der RNA-Interferenz handelt es sich um einen natürlichen Mechanismus der Zelle, welcher für die gezielte Inaktivierung von Genen benötigt wird (Enerly et al. 2002). Die RNAi ist eine Art post-transkriptionelles Gene-Silencing und dient der Regulation der Gen-Aktivität, mit der gezielt ein Knock-Down der Synthese eines Proteins erreicht werden kann.

Die Komponenten die bei diesem Prozess benötigt werden, sind die Ziel-RNA, das doppelsträngige RNA-Molekül, welches künstlich exprimiert wird, und der RISC (*RNA-inducing silencing complex*) Enzymkomplex.

Die exprimierte doppelsträngige RNA wird häufig zusammen mit Dicer, einer Ribonuklease, ko-exprimiert, damit die doppelsträngige RNA in kleinere Fragmente zerstückelt wird.

Kleine RNA-Fragmente werden durch den RISC-Enzymkomplex aufgenommen, wodurch dieser aktiviert wird und in der Lage ist mRNA zu spalten, welche zum aufgenommenen RNA-Fragment komplementär ist.

3. Ergebnisse

3.1 Die Herstellung und Charakterisierung der Reportergenkonstrukte

Gbe+Su(H)-GFP_{nls} und *Gbe+Su(H)-DsRed_{nls}*

Das Reportergenkonstrukt *Gbe+Su(H)-lacZ* dient als „Readout“ der Notch-Aktivität in verschiedenen Geweben bei *Drosophila melanogaster* (Furriols and Bray 2001). Der Nachteil des Konstrukts liegt u.a. in der cytoplasmatischen Lokalisierung der β -Galactosidase, welche durch das *lacZ*-Marker-gen kodiert wird. Mit Hilfe des Reporters bzw. einer anti- β -Gal-Antikörperfärbung kann nicht zwischen einem sehr schwachen Signal oder einer möglichen Hintergrundfärbung unterschieden werden.

Zur Erlangung eines sensitiveren Signals und der dadurch erhofften genaueren Analyse des Notch-Signalweges, war eines der Ziele dieser Arbeit die Herstellung und Analyse der Reportergenkonstrukte *Gbe+Su(H)-GFP_{nls}* und *Gbe+Su(H)-DsRed_{nls}*. Diese Konstrukte enthalten neben GFP und DsRed zusätzliche Kernlokalisierungssequenzen (NLS, nuclear localisation signal/sequence) und sollen, durch das dadurch im Kern vorhandene fluoreszierende Protein, ein sensitiveres Signal der Notch-Aktivität zeigen. Außerdem besitzen die Konstrukte zwei Kopien der Insulator Sequenz des Gypsy Transposons, welche das jeweilige Reporter-gen (*GFP* oder *DsRed*) flankieren. Diese Insulatoren enthalten zwölf Bindestellen für das Su(Hw) (Suppressor-of-Hairy-wing) Protein, für das gezeigt wurde, dass es Chromatin-Effekte reduziert und einige Enhancer und Silencer blockiert wenn es zwischen ihnen und dem Promoter platziert ist (Patton et al. 1992; Cai and Levine 1995; Roseman, R. R. et al. 1995; Roseman, R.R. et al. 1995; Barolo and Levine 1997).

Die DNA-Sequenz mit den vorhandenen Bindestellen *Gbe* (Grainyhead binding element), für den Grainyhead Transkriptionsfaktor (Uv et al. 1997) und *Su(H)_{m8}*, für den Transkriptionsfaktor Suppressor of Hairless (Bailey and Posakony 1995; Lecourtois and Schweisguth 1995) wurde freundlicherweise von Dr. Michael Schoppmeier von der Universität Erlangen zu Verfügung gestellt und befanden sich im piggyBac [3xP3-DsRed, hsp70-EGFP] Vektor.

Dieser Vektor mit der *Gbe+Su(H)*-Sequenz, welcher auch als *Gbe+Su(H)-GFP_{cyt}* (cyt für cytoplasmatisch) bezeichnet wird, verfügt über eine *eGFP* (enhanced green fluorescent

protein) Sequenz ohne Kernlokalisierung-Sequenz, welches ähnlich wie das *Gbe+Su(H)-lacZ* Konstrukt ein cytoplasmatisches *GFP*-Signal aufweist, wodurch schwache Aktivitäten des Notch-Signalweges möglicherweise schwer zu detektieren sind. Bei *Gbe* handelt es sich um 3 Kopien einer palindromischen Bindestelle (AACCGGTT) und bei *Su(H)_{m8}* um die gepaarten Positionen, welche aus der regulatorischen Region des *Enhancer of split m8 (E(spl)m8)* Gens abgeleitet wurden (GTGAGAA und TTCCCAC) (Furriols, 2001 #12).

3.1.1 Klonierungsstrategie zur Herstellung der Reportergenkonstrukte *Gbe+Su(H)-GFP_{nls}* und *Gbe+Su(H)-DsRed_{nls}*

Die *Gbe+Su(H)*-Sequenz wurde mittels PCR mit den Primern PCR-S und PCR-AS amplifiziert. Als Template diente der Vektor *Gbe+Su(H)-GFP_{cyt}*. Das aufgereinigte 700bp große Fragment, wurde in den pGEM Teasy-Vektor kloniert und mit Hilfe von SP6- und T7-Primern sequenziert. Nach Restriktionsspaltung mit BglII und EcoRI wurde ein 350bp großes Fragment, welches die *Gbe+Su(H)*-Bindestellen enthält mit den ebenfalls mit BglII und EcoRI verdauten Zielvektoren pHSti und pRHS ligiert (s.Abb.9). Die fertigen Konstrukte *Gbe+Su(H)-GFP_{nls}* und *Gbe+Su(H)-DsRed_{nls}* wurden erneut sequenziert und konnten anschließend in white⁻-Embryonen, mittel P-Element vermittelter Transformation injiziert werden. Nachdem beide Konstrukte erfolgreich in Embryonen injiziert und die Nachkommen gegen Multibalancer (MB) Tiere gekreuzt wurden, konnten in der nächsten Generation Transformanten isoliert werden, welche ein weiteres Mal gegen den Multibalancer-Stamm (MB) gekreuzt wurden um fertige Stämme mit den Reportergenen zu etablieren, und um zu überprüfen auf welchem Chromosom die Konstrukte inseriert wurden. Dabei konnten Stämme mit dem Reportergenkonstrukt *Gbe+Su(H)-GFP_{nls}* auf dem II. (*w⁻;Gbe+Su(H)-GFP_{nls}/CyO^{wg-lacZ};MKRS/TM6b*) und III. Chromosom (*w⁻;If/CyO^{wg-lacZ};Gbe+Su(H)-GFP_{nls}/TM6b*) etabliert werden. Eine Mobilisierung des Reportergenkonstruktes *Gbe+Su(H)-GFP_{nls}* auf das X. bzw. I. Chromosom schlug trotz mehrmaliger Versuche fehl. Das Konstrukt *Gbe+Su(H)-DsRed_{nls}* konnte ebenfalls auf dem II. (*w⁻; Gbe+Su(H)-DsRed_{nls}/CyO^{wg-lacZ};MKRS/TM6b*) und III. Chromosom (*w⁻;If/CyO^{wg-lacZ}; Gbe+Su(H)-DsRed_{nls} /TM6b*) etabliert werden und wurde erfolgreich auf das X. bzw. I. Chromosom mobilisiert (*Gbe+Su(H)-DsRed_{nls}; If/CyO^{wg-lacZ};MKRS/TM6b*).

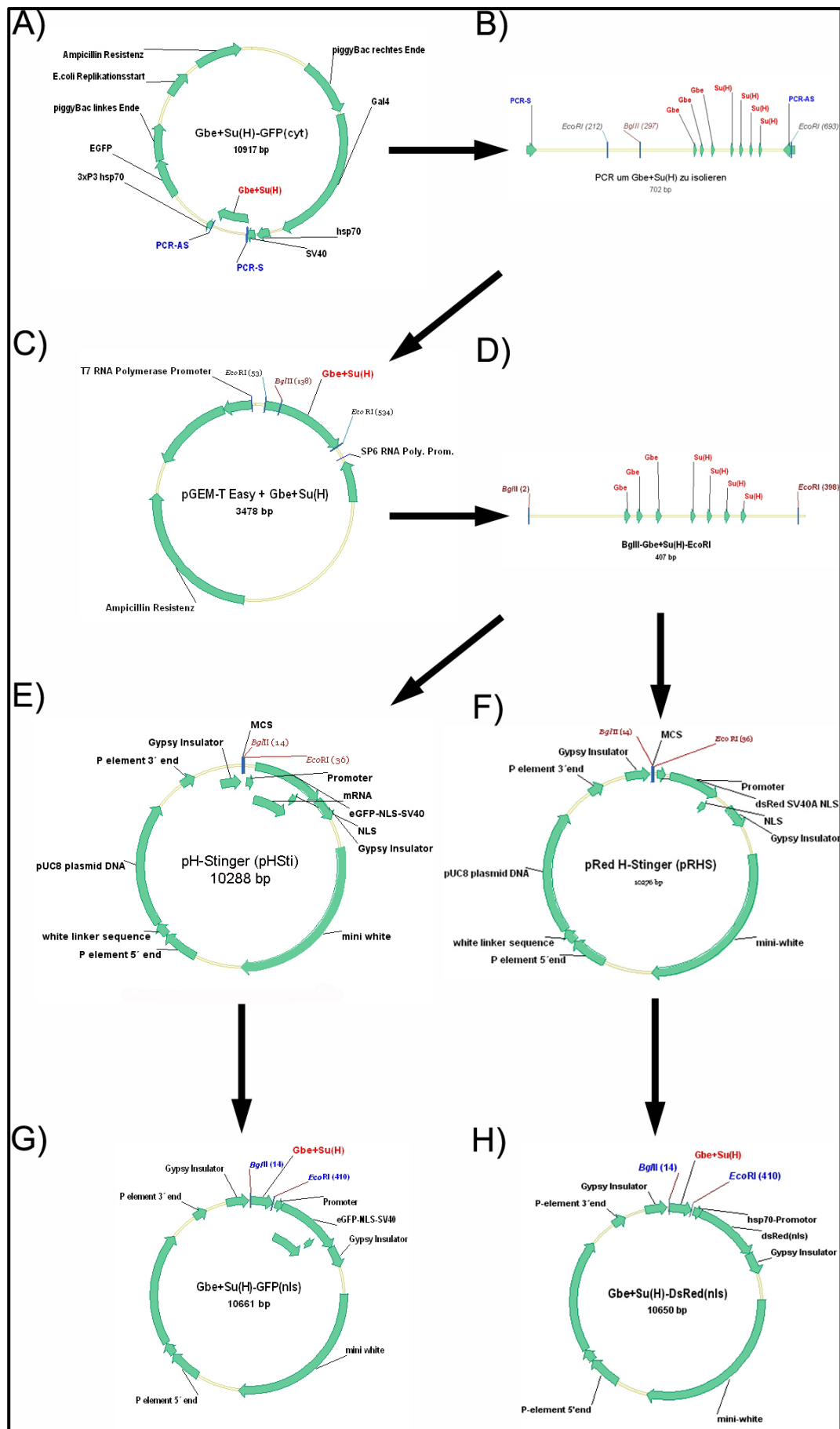


Abb.9: Klonierungsstrategie für die Herstellung von *Gbe+Su(H)-GFP_{nts}* und *Gbe+Su(H)-DsRed_{nts}*

In der Abbildung ist die Klonierungsstrategie für die beiden Reportergenkonstrukte dargestellt. Aus dem Ausgangsvektor *Gbe+Su(H)-GFP_{cyt}* (A), wurde mit Hilfe einer PCR ein ca.700bp großes Fragment mit den Bindestellen für *Gbe* und *Su(H)* amplifiziert (B). Dieses wurde in den pGEM-T Easy Vektor von Promega® ligiert (C). Nach Überprüfung der Sequenz wurde mit Hilfe der Restriktionsenzyme *BglII* und *EcoRI* ein ca. 350bp großes Fragment isoliert (D), welches anschließend in die mit *BglII* und *EcoRI* linearisierten Vektoren *pHSII* und *pRHS* ligiert wurde zur Generierung von *Gbe+Su(H)-GFP_{nts}* (E) und *Gbe+Su(H)-DsRed_{nts}* (F).

3.1.2 Charakterisierung der Reportergenkonstrukte *Gbe+Su(H)-GFP_{nts}* und *Gbe+Su(H)-DsRed_{nts}*

Um die Funktionalität der hergestellten Reportergenkonstrukte zu überprüfen, wurden sie einer ausführlichen Charakterisierung unterzogen. In dieser Abschnitt wird hauptsächlich der Reporter *Gbe+Su(H)-GFP_{nts}* beschrieben, da mit dem *Gbe+Su(H)-DsRed_{nts}* ähnliche Ergebnisse erzielt, er allerdings nur sehr selten eingesetzt wurde. In der Charakterisierung wurde zunächst die Expression von *Gbe+Su(H)-GFP_{nts}* mit der entsprechenden der von *Gbe+Su(H)-lacZ* in wildtypischen und in einem *lgd^{d7}*-homozygoten Flügelimaginalscheiben verglichen (s.Abb.10).

Der Vergleich der Expression beider Konstrukte in wildtypischen Imaginalscheiben zeigt ein nahezu identisches Expressionsmuster (s.Abb.10 B,B',B'',C',C'',C'''), welches in der Überlagerung gut zu erkennen ist (s.Abb.10 E,E',E'').

Deutliche Übereinstimmungen zeigen die starken GFP und lacZ Expression in den streifen-ähnlichen Regionen innerhalb des Notums und an der Dorso/Ventralen (D/V) Grenze. Die Vergrößerung des Notum und der Flügeltasche zeigt, dass das GFP, im Gegensatz zur β -Galactosidase (β -Gal), in den Zellkernen lokalisiert ist (s.Abb.10 B',C',E'). Allerdings zeigen einige Zellen schwache GFP-Expression in denen keine β -Gal-Färbung nachzuweisen ist (s.Abb.10 B',C',E').

Der Verlust der Funktion von *lgd* führt zur Ligandenunabhängigen ektopischen Aktivierung des Notch-Signalweges, welche durch den Reporter *Gbe+Su(H)-lacZ* in der gesamten Imaginalscheibe nachgewiesen werden kann (s.Abb.10 G,G',G'') (Jaekel and Klein 2006).

Diese ektopische Aktivierung führt außerdem zur Verbreiterung der wg-Expressionsdomäne in der Flügeltasche entlang der dorsoventralen Grenze (s.Abb.10 I,I''), verglichen mit wildtypischen Imaginalscheiben, die einen schmalen Streifen der Wg-Expression aufweisen (s.Abb.10 D,D'').

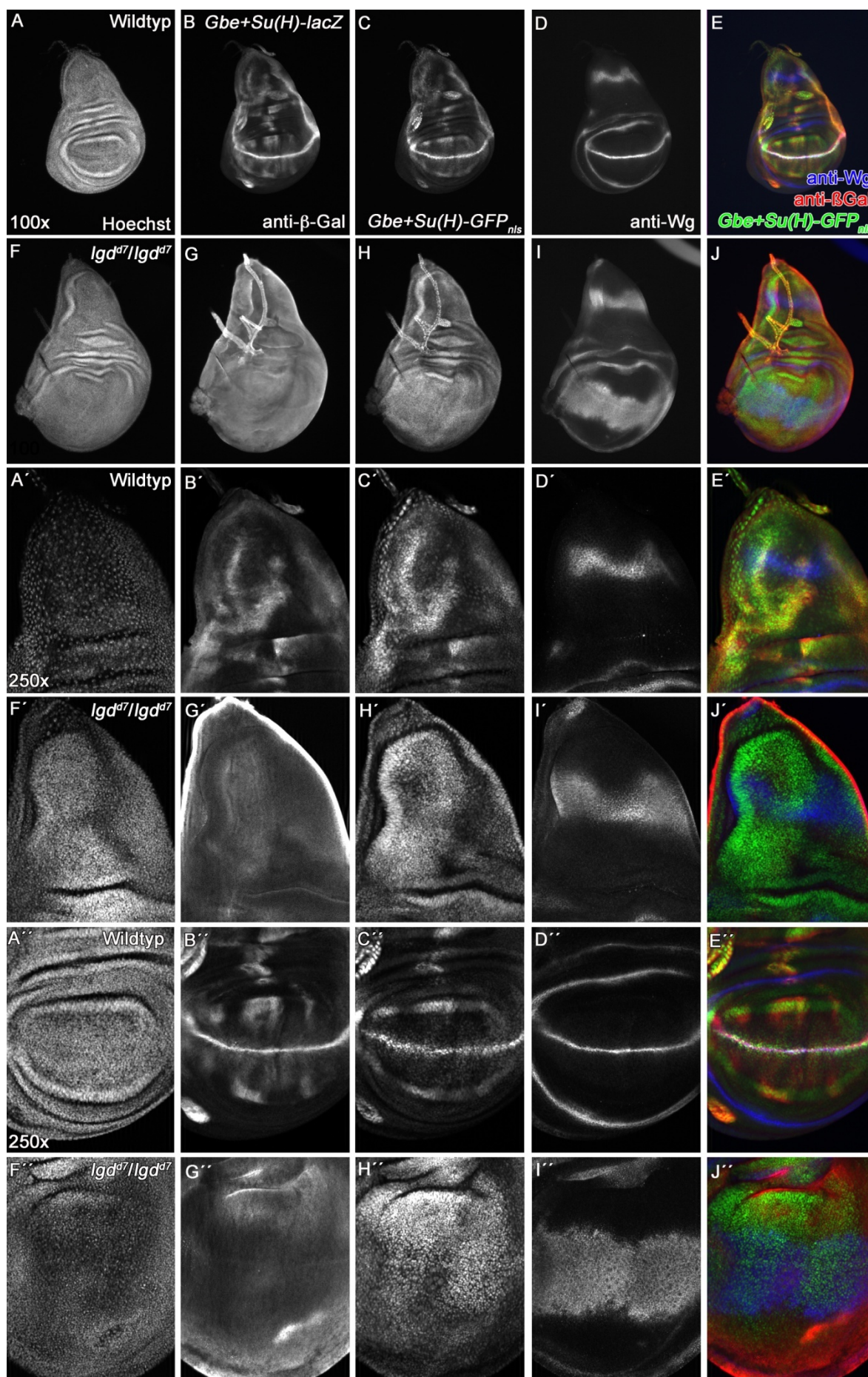


Abb.10: Der Verlust von *lgd* führt zur Expression des Reporters *Gbe+Su(H)-GFP_{nls}* in der gesamten Flügelimaginalscheibe

In der Graphik sind wildtypische und *lgd^{d7}*-homozygote Flügelimaginalscheiben und die Expressionsmuster von *Gbe+Su(H)-lacZ*, *Gbe+Su(H)-GFP_{nls}* und *wg* vergleichend dargestellt. In den Reihen A-E findet sich die 100fache Vergrößerung einer wildtypischen Imaginalscheibe und in F-J die einer *lgd^{d7}* homozygot Mutanten. Der Vergleich der Scheibengröße in A und A' (Hoechst-Färbung) zeigt den *lgd*-Phänotypen, welcher sich in vergrößerten Imaginalscheiben kenntlich macht. Die Expression der Reportergenkonstrukte *Gbe+Su(H)-lacZ* (B) und *-GFP_{nls}* (C) im Wildtyp legt eine nahezu identisches Expressionsmuster offen mit den charakteristischen Domänen im Notum und an der dorsoventralen Grenze, welche in der Überlagerung in E hervorgehoben sind. Die 250fache Vergrößerung des Notums wildtypischer Imaginalscheiben zeigt das die *lacZ* und die *GFP_{nls}*-Expression überlappen, wobei das *GFP_{nls}* im Gegensatz zur cytoplasmatischen β -Gal Färbung deutlich in den Zellkernen lokalisiert ist. Die *GFP*-Expression zeigt sich im Gegensatz zur β -Gal Färbung allerdings in jeder Zelle und in den Bereichen in denen keine β -Gal-Färbung vorhanden ist erscheint schwache *GFP_{nls}*-Expression. In den *lgd^{d7}*-homozygot mutanten Flügelimaginalscheiben (F-F'-J,J') tritt sowohl in der 100fachen als auch in der 250fachen Vergrößerung eine ubiquitäre Expression des *lacZ* (G,G') und des *GFP* (H,H') auf, welche aus der ektopischen Notch Aktivierung resultiert. Diese ist ebenfalls durch die Expression des natürlichen Notch-Zielgens *wingless* (*wg*) an der dorsoventralen Grenze zu erkennen, welche in *lgd^{d7}*-homozygoten Imaginalscheiben stark verbreitert ist (I,I'). In der 250fachen Vergrößerung einer wildtypischen Flügeltasche ist die überlagernde Expression der beiden Reporter deutlich zu erkennen. Auch hier finden sich Positionen mit schwacher *GFP_{nls}*-Expression und nicht vorhandener *lacZ*-Expression. Dagegen zeigt sich in der Vergrößerung einer *lgd^{d7}*-Mutanten die ubiquitäre Expression beider Reportergenkonstrukte.

Der Ausfall von *lgd* führt ebenfalls zur ektopischen Expression des Reporters *Gbe+Su(H)-GFP_{nls}*, welcher in allen *lgd^{d7}*-mutanten Zellen eine relativ gleichmäßig starke *GFP*-Expression aufweist (s.Abb.10 H,H',H'') die mit der *lacZ* Variante des Reporters vergleichbar ist (s.Abb.10 G,G',G'').

Das Ergebnis dieser ersten Charakterisierung zeigt, dass der Reporter *Gbe+Su(H)-GFP_{nls}* ein sehr ähnliches Expressionsmuster wie *Gbe+Su(H)-lacZ* in wildtypischen Flügelimaginalscheiben aufweist und dass der Ausfall der *lgd* Genfunktion zu ektopischen Expression von *Gbe+Su(H)-GFP_{nls}* in der gesamten Imaginalscheibe führt. Die Charakterisierung von *Gbe+Su(H)-GFP_{nls}* deutet darauf hin, dass das Reportergenkonstrukt funktional ist und Veränderungen der Aktivität des Notch-Signalweges detektieren kann.

Um die Funktionalität von *Gbe+Su(H)-GFP_{nls}* weiter zu überprüfen, wurde die Expression in *Psn^{C1}*-homozygoten Flügelimaginalscheiben untersucht (s.Abb.11). Bei Presenilin (Psn) handelt es sich um eine Untereinheit, des γ -Secretase-Komplexes, einem Protease-Komplex, zu denen auch Nicastrin (Nic), Anterior pharynx-defective 1 (Aph-1) und Presenilin enhancer 2 (Pen-2) gehören (Struhl and Greenwald 1999; Struhl and Greenwald 2001; Kopan and Goate 2002). Psn stellt die katalytische Einheit innerhalb des Komplexes dar, fungiert als Aspartyl-Protease und vermittelt, nach Abspaltung der intrazellulären Notch-Domäne, die S3/S4-Spaltungen des verbleibenden Membranständigen Notch Rezeptors, sowie die Freisetzung der intrazellulären Domäne des Notch-

Rezeptors, NICD (Notch intracellular domain) und der damit verbundenen Expression gewebespezifischer Notch-Zielgene. Der Ausfall von *Psn* führt zur Inaktivierung des Notch-Signalweges und zu fehlender Expression von *Gbe+Su(H)-lacZ*. Die Analyse *Psn^{Cl}*-mutanter Flügelimaginalscheibe zeigt kleine Flügelimaginalscheiben, die für den Ausfall von Komponenten des Notch-Signalweges typisch sind und auf die Inaktivierung des Signalweges hinweisen (**s.Abb.11 E,E',H,H'**). Im Gegensatz zur fehlenden *Gbe+Su(H)-lacZ* Expression in *Psn^{Cl}*-mutanten Flügelimaginalscheiben, führt der Verlust von *Psn* zur schwachen homogenen Expression von *Gbe+Su(H)-GFP_{nls}* in der gesamten Flügelimaginalscheibe (**s.Abb.11 F,F',H,H'**). Interessanterweise kann diese GFP-Expression nur bei langer Belichtungszeit am Fluoreszenzmikroskopie detektiert werden. Das Ergebnis deutet darauf hin, dass der Verlust von *Psn* nicht zu einer kompletten Inaktivierung des Notch-Signalweges führt und eine geringe Restaktivität vorliegt.

Um zu testen, ob *Gbe+Su(H)-GFP_{nls}* aufgrund sehr geringer Notch-Restaktivität in *Psn^{Cl}*-mutanten Flügelimaginalscheiben exprimiert wird, wurde durch das *Gal4/UAS*-System und der RNA-Interferenz die Synthese des Notch-Rezeptors in *Psn^{Cl}*-mutanten Flügelimaginalscheiben reduziert um die mögliche Restaktivität zu unterdrücken (**s.Abb.11 I,I'-L,L'**) (Phelps and Brand 1998; Enerly et al. 2002). Mit Hilfe der Treiberlinie *patched-Gal4* (*ptc-Gal4*) und der Effektorlinie *UAS-Notch-RNAi* (*UAS-N-RNAi*; VDRC) wurde innerhalb der *patched* (*ptc*)-Expressionsdomäne *Notch-RNAi* exprimiert. Die Untersuchung der *UAS-Notch-RNAi* Expression in *Psn^{Cl}*-mutanten Flügelimaginalscheiben zeigt, dass auch die Unterdrückung der Notch Rezeptor Synthese die schwache *Gbe+Su(H)-GFP_{nls}* Expression nicht verhindern kann (**s.Abb.11 J,J',L,L'**).

Zur Bestätigung, dass die Bildung des Notch-Rezeptors reduziert ist, wurde zusätzlich eine anti-Nextra Antikörperfärbung durchgeführt (**s.Abb.11 K,K',L,L'**). Das Ergebnis zeigt, dass der Verlust von *Psn* und die zusätzliche Hemmung der Notch-Synthese nicht in der Lage sind die schwache Expression von *Gbe+Su(H)-GFP_{nls}* zu verhindern. Die Beobachtungen deuten darauf hin, dass die schwache *Gbe+Su(H)-GFP_{nls}* Expression Notch-unabhängig erfolgt oder einer gewissen Grund-Expression des Reportergenkonstruktes vorliegt, die nicht unterdrückt werden kann.

Um das Konstrukt *Gbe+Su(H)-GFP_{nls}* weiter zu charakterisieren, wurden die Auswirkungen der Expression von *UAS-Notch^{lv}* und *UAS-Notch-RNAi* innerhalb der *ptc*-Expressionsdomäne wildtypischer Flügelimaginalscheiben auf die *Gbe+Su(H)-GFP_{nls}* Expression untersucht (Lieber et al. 2002).

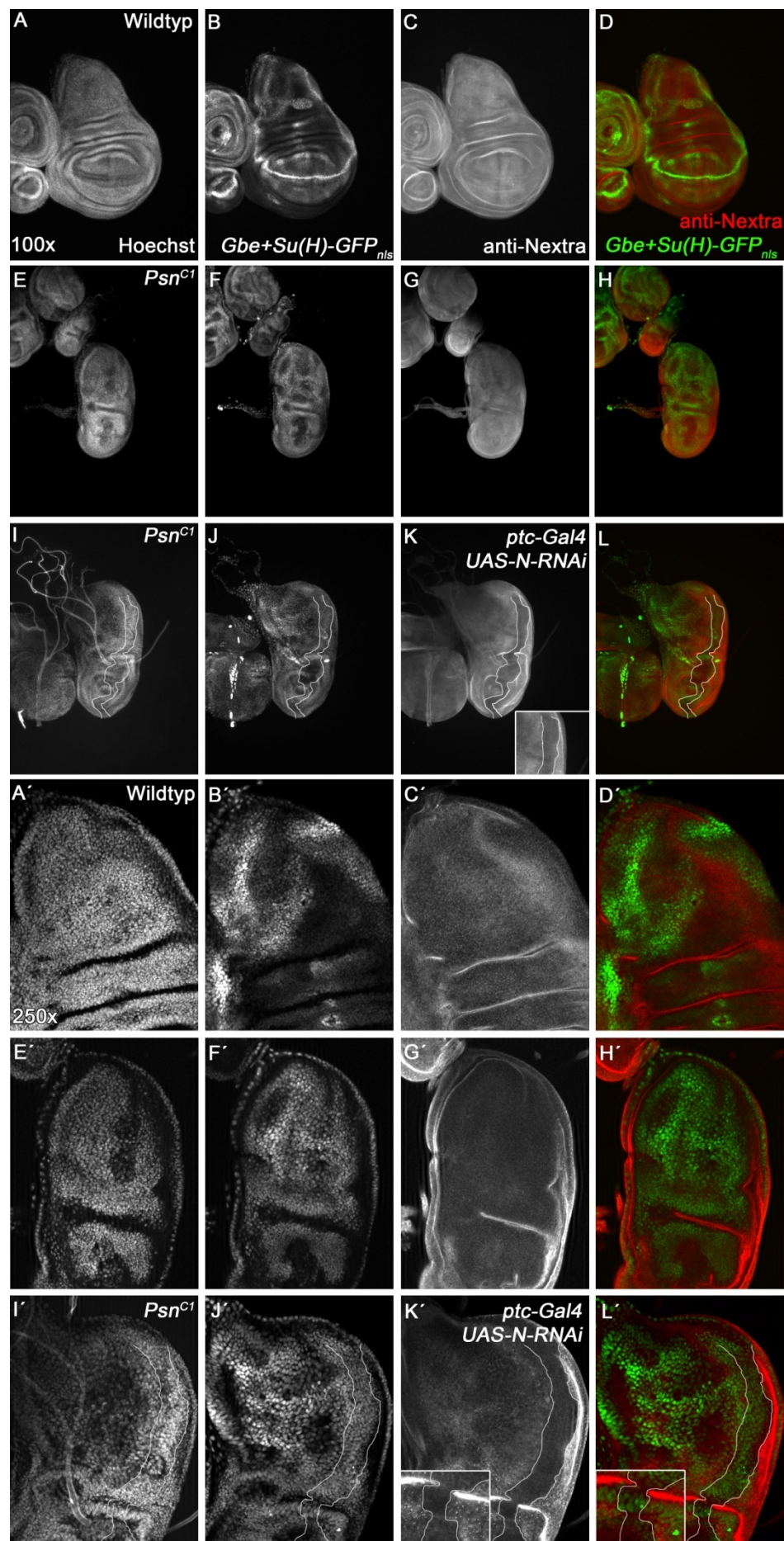


Abb.11: Der Verlust der *Psn*-Funktion resultiert in der Unterdrückung der Expression des Reporters *Gbe+Su(H)-GFP_{nls}*

In der Abbildung sind die Expressionsmuster von *Gbe+Su(H)-GFP_{nls}* in einer wildtypischen (A,A'-D,D'), einer *Psn^{CL}*-homozygot mutanten (E,E'-H,H) und in einer *Psn^{CL}*-mutanten Flügelimaginalscheibe in der zusätzlich innerhalb der *ptc*-Expressionsdomäne *N-RNAi* angeschaltet wurde (I,I'-L,L') gegeneinander dargestellt. Der *GFP*-Reporter zeigt im *Psn^{CL}*-mutanten Hintergrund eine starke Reduzierung der Notch-Aktivität (F), verglichen mit der wildtypischen Expression (B) allerdings erscheint die sehr schwache *GFP_{nls}*-Expression nur bei sehr langer Belichtungszeit. Diese schwache *GFP_{nls}*-Expression kann nicht durch die zusätzliche Expression von *N-RNAi* und der damit verbundenen Reduktion der Notch-Rezeptor-Synthese unterdrückt werden und auf basale Promoter-Aktivität hin (J',L'). Die anti-Nextra-Antikörperfärbung bestätigt die Reduktion der Notch-Synthese (K').

Die Überexpression des Notch-Rezeptors, mittels *UAS-Notch^{lv}* und *ptc-Gal4*, führt zur ektopischen Expression von *Gbe+Su(H)-GFP_{nls}* in der *ptc*-Expressionsdomäne (**s.Abb.12 H,H',H''**), verglichen mit wildtypischen Flügelimaginalscheiben (**s.Abb.12 C,C',C''**). Allerdings ist diese ektopische *GFP_{nls}*-Expression nicht in allen Zellen der Flügelimaginalscheibe nachweisbar und ein Bereich in der Gelenk-Region zeigt keine Veränderung in der *Gbe+Su(H)-GFP_{nls}* Expression (**s.Abb.12 H'**).

Die zusätzliche Verwendung des anti-Wg Antikörpers, zur Detektion der Notch-Zielgen Expression zeigt, dass im Gegensatz zur sehr starken *Gbe+Su(H)-GFP_{nls}* Expression in der *ptc*-Domäne, nur eine vergleichbar schwache Verbreiterung der Wg-Expression an der dorsoventralen Grenze stattfindet (**s.Abb.12 I,I',I''**).

Das Ergebnis zeigt, dass die Überexpression von Notch, wie beim Ausfall von *lgd*, zur ektopischen Expression von *Gbe+Su(H)-GFP_{nls}* führt. Desweiteren bestätigt das Resultat die Funktionalität des Konstruktes und der Vergleich mit der anti-Wg-Expression deutet darauf hin, dass das *Gbe+Su(H)-GFP_{nls}* Konstrukt Notch-Aktivität in Zellen nachweist, die mit natürlichen Markern nicht nachgewiesen werden kann. Die Hemmung der Notch-Rezeptor Bildung, mittels *UAS-Notch-RNAi* und *ptc-Gal4*, resultiert in der unterdrückten Expression von *Gbe+Su(H)-GFP_{nls}* in der *ptc*-Domäne (**s.Abb.13 H,H',H''**), verglichen mit wildtypischen Flügelimaginalscheiben (**s.Abb.13 C,C',C''**). Während die Notch-Überexpression nicht zur ektopischen *Gbe+Su(H)-GFP_{nls}* Expression in allen Zellen der *ptc*-Domäne führt, scheint die Hemmung der Notch-Synthese allerdings zu einer kompletten Unterdrückung der *Gbe+Su(H)-GFP_{nls}* Expression in allen Zellen der *ptc*-Domäne zu führen (**s.Abb.13 H,H',H''**). Die zusätzliche Wg-Expression, mit Hilfe der anti-Wg Antikörperfärbung, bestätigt die Unterdrückung der Aktivität des Notch-Signalweges (**s.Abb.13 I,I',I''**), verglichen mit der wildtypischen Wg-Expression (**s.Abb.13 D,D',D''**).

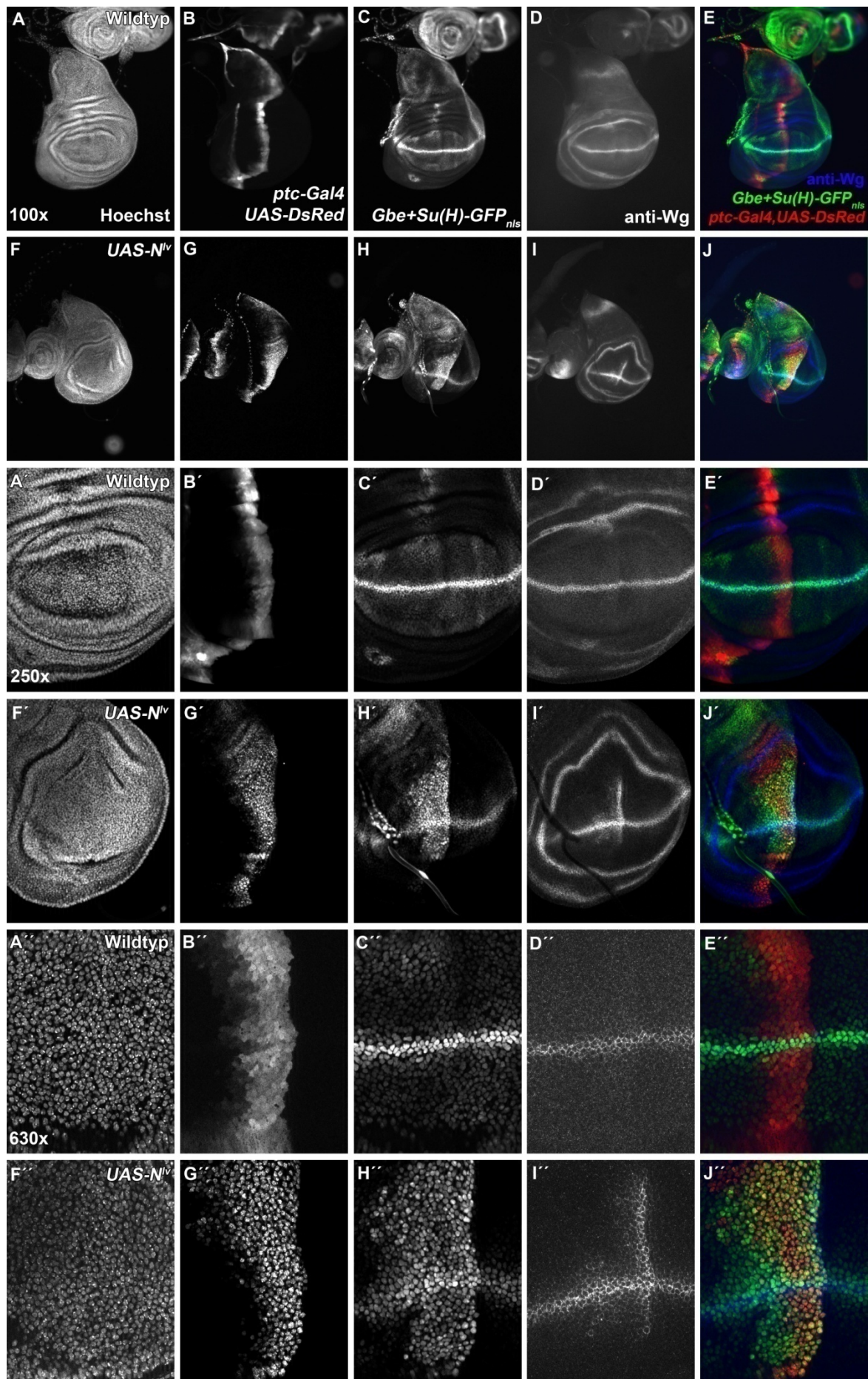


Abb.12: Die Überexpression von *UAS-N^v* in der *ptc*-Expressionsdomäne führt in allen Zellen zur Expression des Reporters *Gbe+Su(H)-GFP_{nls}*

In der Abbildung sind eine wildtypische Flügelimaginalscheibe (A,A',A''-E,E',E'') und eine in der innerhalb der *ptc*-Expressionsdomäne *UAS-N^v* exprimiert wurde (F,F',F''-J,J',J''), dargestellt. In den wildtypischen Scheiben wurde die *ptc*-Domäne zusätzlich mit *UAS-DsRed* sichtbar gemacht welches cytoplasmatisch lokalisiert ist (B,B',B'') und in den Mutanten mit einem im Kern-lokalisierenden DsRed (G,G',G''). Während die wildtypischen Imaginalscheiben sowohl das normale Muster der *wg*- bzw. der *Gbe+Su(H)-GFP_{nls}* Expression aufweisen, zeigen die Scheiben in denen die Aktivität des Notch Signalweges erhöht wurde, die Ausbeulung der Flügeltasche nach posteriori (F,F',F''), die ektopische Expression des Reporters *Gbe+Su(H)-GFP_{nls}* (H,H',H'') innerhalb des gesamten *ptc*-Streifens und die ektopische *wg*-Expression an der D/V-Grenze (I,I',I'').

Im Gegensatz zu Expression von *UAS-Notch-RNAi* in *PsnC1*-mutanten Flügelimaginalscheiben, kann bei der Expression in wildtypischen Imaginalscheiben, keine schwache Expression von *Gbe+Su(H)-GFP_{nls}* mehr nachgewiesen werden. Das Ergebnis zeigt, dass die Hemmung der Notch-Rezeptor Synthese zur Unterdrückung der Expression von *Gbe+Su(H)-GFP_{nls}* führt und bestätigt die Funktionalität des Konstruktes in der Flügelimaginalscheibe.

Da das Konstrukt für die Analyse von *lgd* in der Oogenese eingesetzt werden sollte, wurde die Expression von *Gbe+Su(H)-GFP_{nls}* in wildtypischen Ovariolschläuchen überprüft und mit der Expression von *Gbe+Su(H)-lacZ* verglichen (s.Abb.14). Die Analyse beider Expressionsmuster innerhalb des Germariums zeigt, dass *Gbe+Su(H)-GFP_{nls}*, im Gegensatz zu *Gbe+Su(H)-lacZ*, in einzelnen Zellen innerhalb des Germariums exprimiert wird (s.Abb.14 C,E,H,J). Ein Hinweis auf die Funktion von Notch bei der Bildung des Follikelepithels (Nystul and Spradling 2010). In älteren Eikammern, des Stadium S2-S5, wird Notch bei der Induktion der Polarzellen benötigt, was durch die Expression der beiden Reporter *Gbe+Su(H)-GFP_{nls}* und *Gbe+Su(H)-lacZ* (s.Abb.14 B,C,E,L,M,O) nachgewiesen werden konnte (Grammont and Irvine 2001; Althausen et al. 2005). Eine weitere wichtige Funktion nimmt der Notch-Signalweg in Stadium S6 Eikammern bei der Induktion des sogenannte M/E-Switchs ein, dem Wechsel der Follikelzellen von einem mitotischen Zyklus in den Endozyklus.

Während der Reporter *Gbe+Su(H)lacZ* in nahezu allen Zellen des Follikelepithels in unterschiedlicher Expressionsstärke exprimiert wird, außer in den anterioren Follikelzellen, wird der Reporter *Gbe+Su(H)-GFP_{nls}* hauptsächlich in den anterioren Follikelzellen und nicht im gesamten Follikelepithel exprimiert (s.Abb.14 B,C,E,Q,R,T).

Beide Reporterengenkonstrukte weisen keine Notch-Aktivität in der Keimbahn bzw. den Keimzellen oder der Oozyte nach (s.Abb.14) und deuten darauf hin, dass der Notch-Signalweg in der Keimbahn nicht aktiv ist.

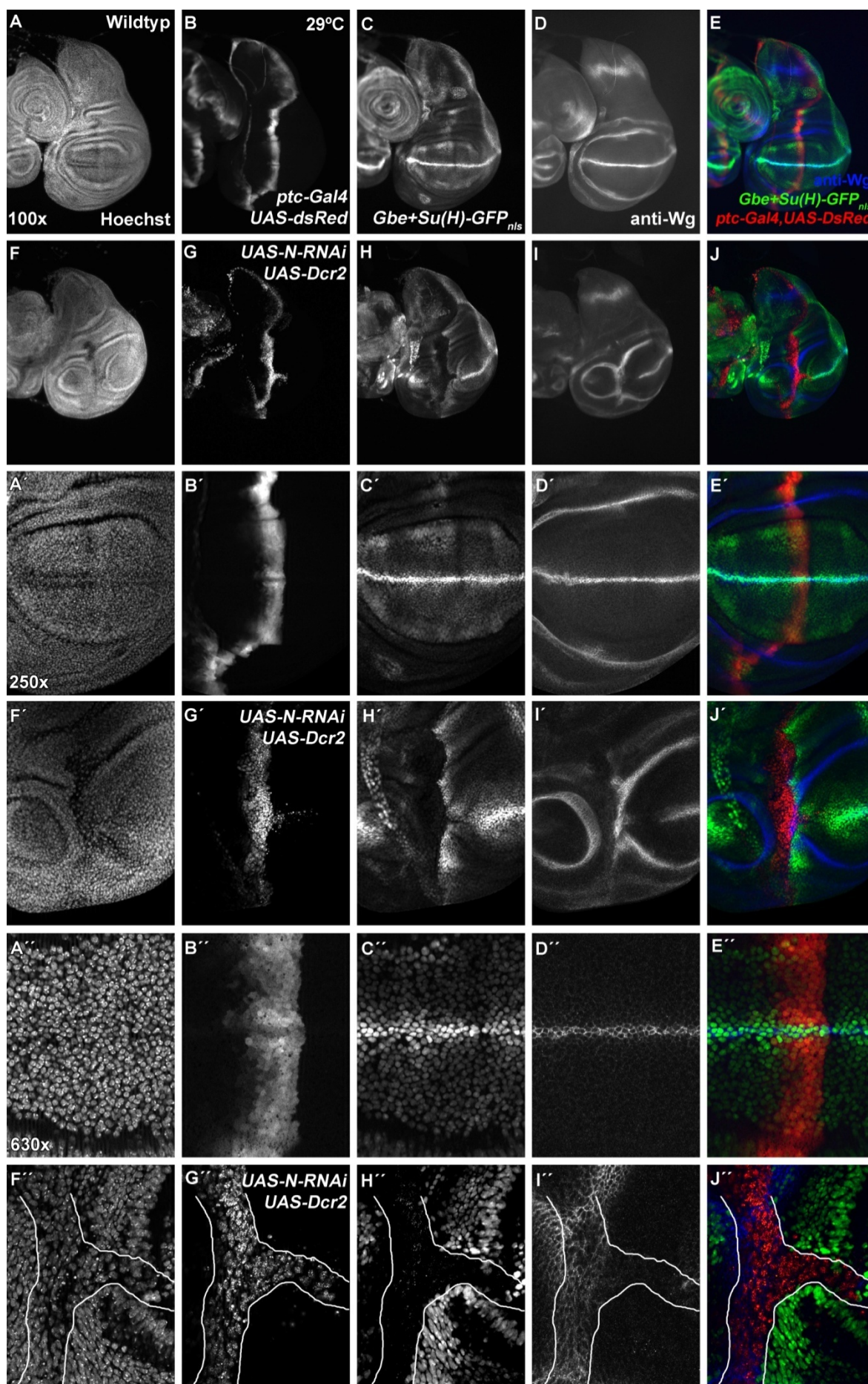


Abb.13: Die Expression von *UAS-N-RNAi* in der *ptc*-Expressionsdomäne resultiert in der Abschaltung des Reporters *Gbe+Su(H)-GFP_{nls}*

In der Abbildung sind wildtypische Flügelimaginalscheibe (A,A',A''-E,E',E'') und Flügelimaginalscheiben in die bei 29°C innerhalb der *ptc*-Expressionsdomäne, zum Einen *UAS-Dcr2* und zum Anderen *UAS-N-RNAi* exprimiert wurde (F,F',F''-J,J',J''), dargestellt. In den wildtypischen Scheiben wurde die *ptc*-Domäne zusätzlich mit *UAS-DsRed* sichtbar gemacht welches cytoplasmatisch lokalisiert ist (B,B',B'') und in den Mutanten mit einem im Kern-lokalisierenden *DsRed* (G,G',G''). Während die wildtypischen Imaginalscheiben sowohl das normale Muster der *wg*- bzw. der *Gbe+Su(H)-GFP_{nls}*-Expression aufweisen, zeigen die Scheiben in denen die Aktivität des Notch Signalweges reduziert wurde, die Bildung von zwei Flügeltaschen (F,F',F''), die Abschaltung des Reporters *Gbe+Su(H)-GFP_{nls}* (H,H',H'') innerhalb des *ptc*-Streifens und die Aufhebung der *wg*-Expression an der D/V-Grenze (I,I',I'').

Das Ergebnis zeigt, dass *Gbe+Su(H)-GFP_{nls}* während der Oogenese Notch-Aktivität detektieren kann und verglichen mit *Gbe+Su(H)-lacZ* in der Lage ist, innerhalb des Germariums, zusätzliche Zellen zu detektieren.

Die Funktionalität des *Gbe+Su(H)-GFP_{nls}* Reporterengenkonstrukts während der Oogenese bei *Drosophila melanogaster* wird mit Hilfe der Funktionsverlustanalyse des Tumorsuppressorgens *lethal (2) giant discs (lgd)* im folgenden Kapitel demonstriert.

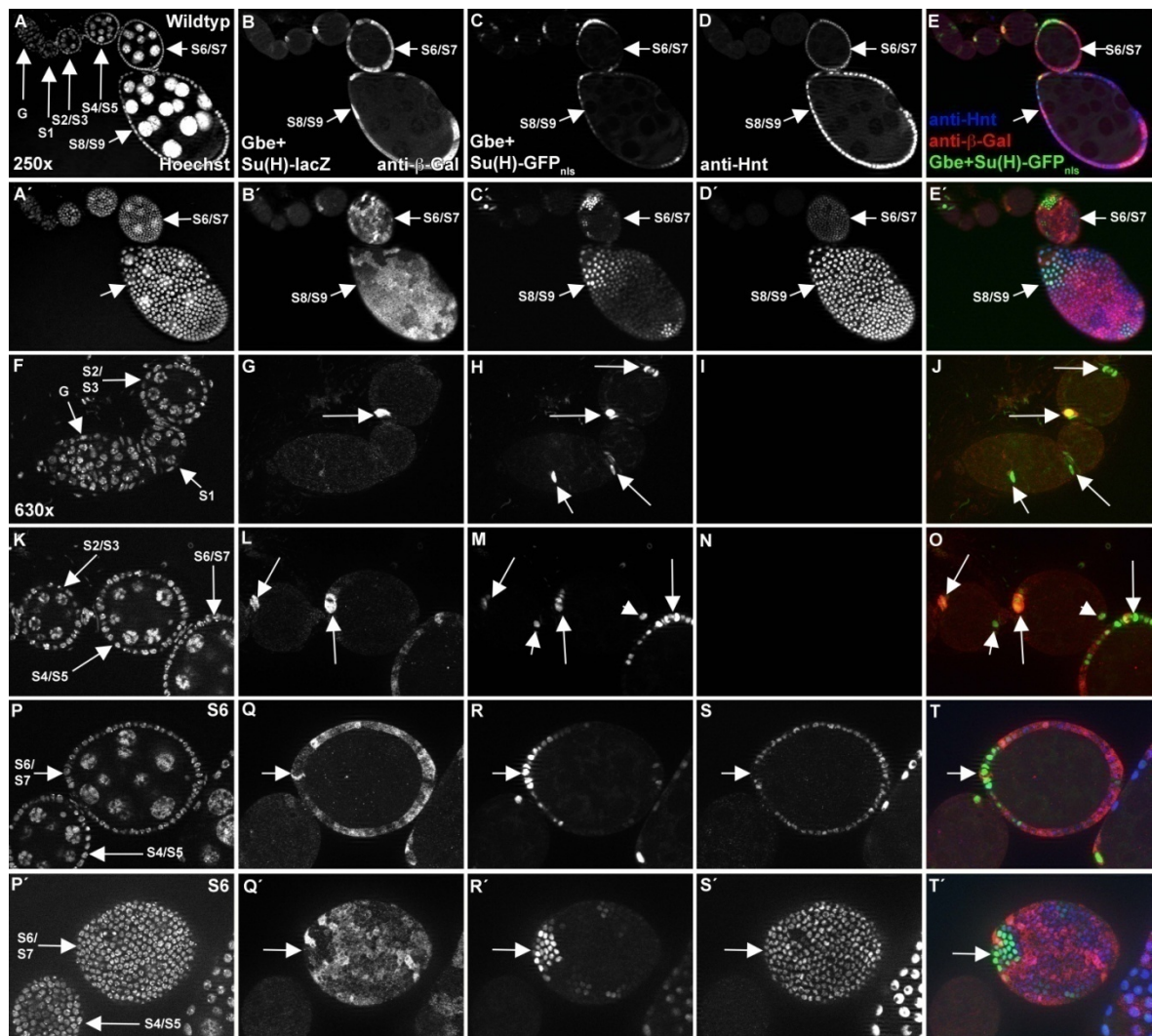


Abb.14: Vergleich der Expression von *Gbe+Su(H)-lacZ* und *Gbe+Su(H)-GFP_{nl}* in einem wildtypischen Ovariolschlauch

Die Graphik vergleicht die Expression des *Gbe+Su(H)-lacZ* und des *Gbe+Su(H)-GFP_{nl}* Reportergenkonstruktes. Die ersten beiden Reihen zeigen eine Übersicht des wildtypischen Ovariolschlauchs in einem Querschnitt und einer Aufsicht. Bei näherer Betrachtung des Germariums und von Stadium S1-S2 Eikammern in der dritten Reihe sind im Gegensatz zum *Gbe+Su(H)-lacZ*-Reporter mit Hilfe des *Gbe+Su(H)-GFP_{nl}* Reporters einige GFP-positive somatische Zellen innerhalb des Germariums zu erkennen, deren Anzahl stark variiert. In Stadium S2 und S3/S4 Eikammern ist die Expressionen beider Reporter in den Polarzellen zu erkennen. Die Betrachtung der Stadien 5-6 Eikammern zeigt, dass Die Expression des *Gbe+Su(H)-GFP_{nl}* Reporters sich auf die terminalen Follikelzellen beschränkt und die Main-Body-Follikelzellen kaum Expression aufweisen. Dagegen zeigt der *Gbe+Su(H)-lacZ* Reporter in den Main-Body-Follikelzellen Expression, die allerdings unterschiedlich stark ist, und in den terminalen Follikelzellen ist kaum Expression vorhanden. Die Expression des Zielgens *hnt* verdeutlicht den Übergang der Follikelzellen in den Endozyklus, welcher durch den Notch-Signalweg eingeleitet wird.

3.2 Die Analyse der Funktion von *Lgd* während der Oogenese bei***D. melanogaster*****3.2.1 Die Analyse des Funktionsverlustes von *lgd* im Follikelepithel von *D. melanogaster*****3.2.1.1 Der Genfunktionsverlust von *lgd* in den Follikelzellen des Germariums führt zur ektopischen Aktivierung des Notch Signalweges**

Um die Auswirkungen des Funktionsverlustes von *lgd* während der Oogenese bei *Drosophila* zu analysieren, wurden aufgrund der Letalität homozygoter *lgd^{d7}* Tiere in einer frühen puppalen Phase (Buratovich and Bryant 1995), klonale Analysen mittels FLP/FRT vermittelten mitotischen Rekombination durchgeführt (Theodosiou, 1998 #177).

Während wildtypische Eikammern über 6-8 Stielzellen miteinander verbunden sind (**s.Abb.15 A-D, A'-D'**), führt der Verlust von *lgd* in der frühen Oogenese zur Bildung langer stielartiger Strukturen zwischen benachbarten Eikammern, welche durch die deutliche Zunahme an Stielzellen gekennzeichnet und in der Abbildung durch einen weißen Pfeil hervorgehoben sind (**s.Abb.15 E-L, E'-L'**). Im Gegensatz zur einschichtigen, parallelen Anordnung der Stielzellen im Wildtyp (**s.Abb.15 A'-D'**) sieht die Positionierung der zusätzlichen *lgd^{d7}*-mutanten Stiel-Zellen unorganisierter aus und die einschichtige Struktur scheint aufgelöst zu sein (**s.Abb.15 E-L, E'-L'**). Der Phänotyp ist sehr variabel und es kommt zu unterschiedlich langen stielartigen Strukturen.

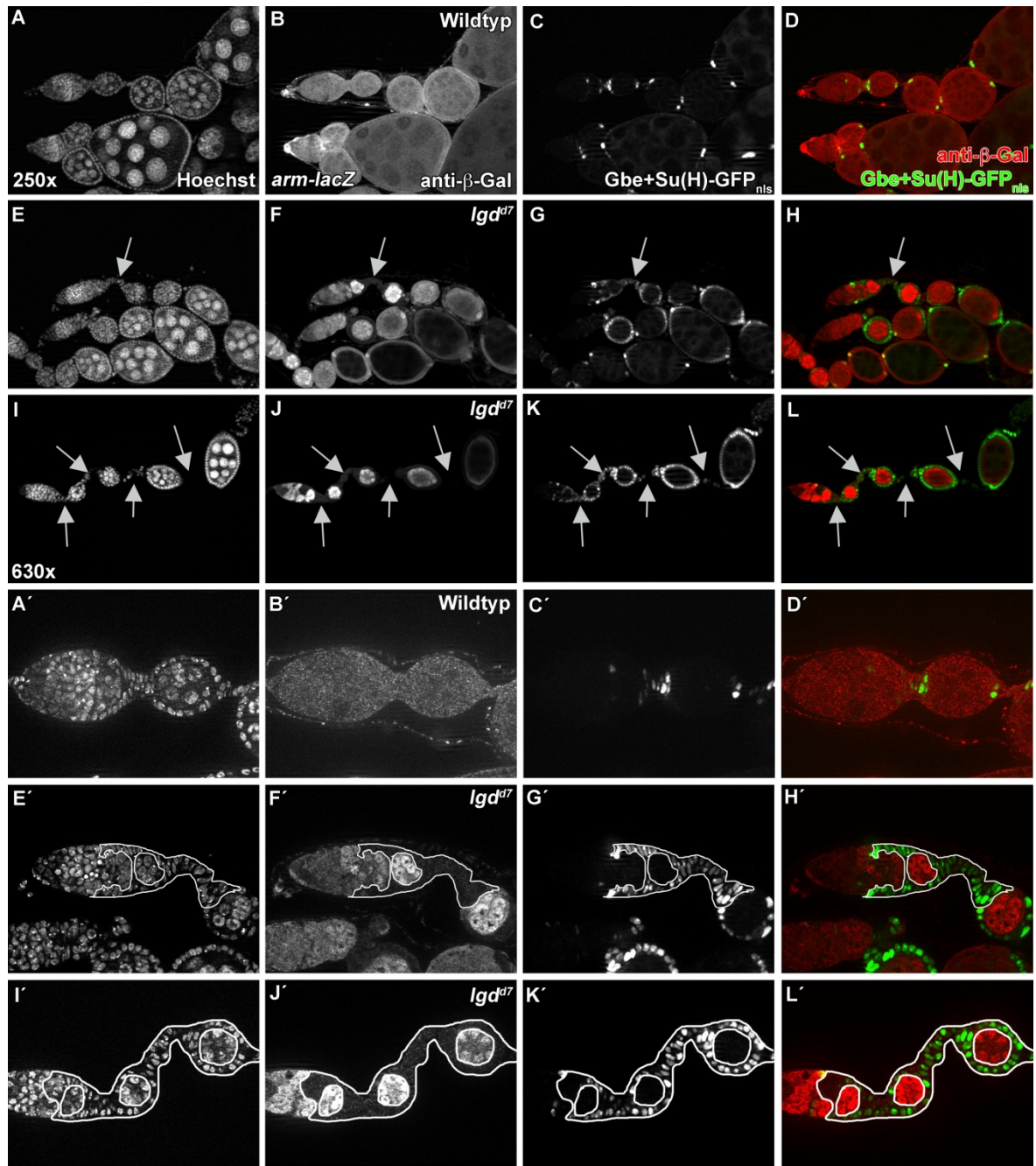


Abb.15: Der Ausfall von *lgd* im Follikelepithel resultiert in einer ectopischen Aktivierung des Notch-Signalweges und der Bildung stielartiger Strukturen zwischen benachbarten Eikammern

In der Graphik sind ein wildtypischer Ovariolschlauch (A-D und A'-D') und zwei Ovariolschläuche mit *lgd^{d7}* mutanten Follikelzellen (E-L und E'-L') abgebildet. In A-L sind die Übersichtsaufnahmen (250x Vergrößerung) und in A'-L' die Vergrößerungen (630x) der jeweiligen Genotypen dargestellt. In der 1. Spalte ist die jeweilige Hoechst Färbung gezeigt (A,A',E,E'). In der 2. Spalte ist das Markergen *arm-lacZ* abgebildet, dessen Expression mittels anti-β-Gal Antikörperfärbung detektiert wurde (B,B',F,F',J,J'). Die *lgd^{d7}*-mutanten Zellen sind durch Fehlen der *lacZ*-Markergen Expression, Pfeilen (F,J) bzw. durch weiße Umrandungen (F',J') zusätzlich hervorgehoben. In der 3. Spalte ist die Expression von *Gbe+Su(H)-GFP_{nls}* dargestellt, der die wildtypische Expression (C,C') und die ectopische Expression (G,K,G',K') im gesamten Follikelepithel zeigt, welche durch Pfeile (G,K) oder durch weiße Umrandungen (G',K') hervorgehoben wurden. Die Überlagerungen der *arm-lacZ* und der *Gbe+Su(H)-GFP_{nls}* Expressionen (D,D',H,H',L,L) zeigt, dass sich die ectopische *Gbe+Su(H)-GFP_{nls}* Expression innerhalb der *lgd^{d7}* mutanten Zellen befindet (H,L,H',L').

Die Bildung langer stielartiger Strukturen konnte bereits beobachtet werden und konnte bei der ektopischen Aktivierung des Notch-Signalweges beobachtet werden (Struhl et al. 1993; Larkin et al. 1996). Alle bisherigen Erkenntnisse des Tumorsuppressorgens *lgd* zeigen, dass der Verlust von *lgd* zur ektopischen Aktivierung des Notch Signalweges und zu einer Überproliferation des Gewebes führt (Klein 2003; Childress et al. 2006; Gallagher and Knoblich 2006; Jaekel and Klein 2006; Troost et al. 2012). Die Bildung langer stielartiger Strukturen in *lgd^{d7}*-mutanten Follikelzellen, deutet ebenfalls auf eine ektopische Notch-Aktivierung in der frühen Oogenese hin. Zur Bestätigung dieser Annahme wurde die Expression von *Gbe+Su(H)-GFP_{nls}* in *lgd^{d7}*-mutanten Follikelzellen analysiert. In wildtypischen Stielzellen bzw. deren Vorläuferzellen im Germarium ist keine *GFP_{nls}* Expression zu erkennen, die Expression in der frühen Oogenese beschränkt sich auf einzelne Zellen der Follikelstammzelllinie, den Stielzellvorläuferzellen und Polar-Zellen (**s.Abb.15 C,C'**). Im Gegensatz dazu führt der Verlust von *lgd* in der frühen Oogenese zur sofortigen Expression von *Gbe+Su(H)-GFP_{nls}* in allen *lgd^{d7}*-mutanten Follikelzellen (**s.Abb.15 G,G',K,K'**) und weist auf eine verfrühte und ektopische Aktivierung des Notch-Signalweges hin. Die *Gbe+Su(H)-GFP_{nls}* Expression in den langen stielartigen Strukturen deutet darauf hin, dass diese durch die anhaltende Notch-Aktivität gebildet werden. Zusammengefasst kann gesagt werden, dass der Verlust von *lgd* auch in der frühen Oogenese im Follikelepithel zu einer verfrühten und ektopischen Aktivierung des Notch-Signalweges führt. Die Ergebnisse verallgemeinern die Rolle von Lgd als negativen Regulator des Notch-Signalweges.

3.2.1.2 Die ektopische Notch-Aktivierung in *lgd^{d7}* mutanten Follikelzellen führt zu einem verfrühten Übergang vom mitotischen Zyklus in den Endozyklus

Eine wichtige Funktion im Follikelepithel der mittleren Oogenese nimmt der Notch-Signalweg bei der Einleitung des „M/E-Switches“, dem Übergang der Follikelzellen von einem mitotischen Zyklus in den Endozyklus, ein (Sun and Deng 2007). Die Erhöhung der Delta-Expression in der Keimbahn in Stadium S5/S6 Eikammern führt zur Aktivierung des Notch-Signalweges im umliegenden Follikelepithel (St. Johnston and López-Schier 2001). Diese Notch-Aktivierung im Follikelepithel führt zur Expression des Transkriptionsfaktors Hindsight (Hnt), welcher den M/E Übergang vermittelt (Yip et al. 1997; Sun and Deng 2007).

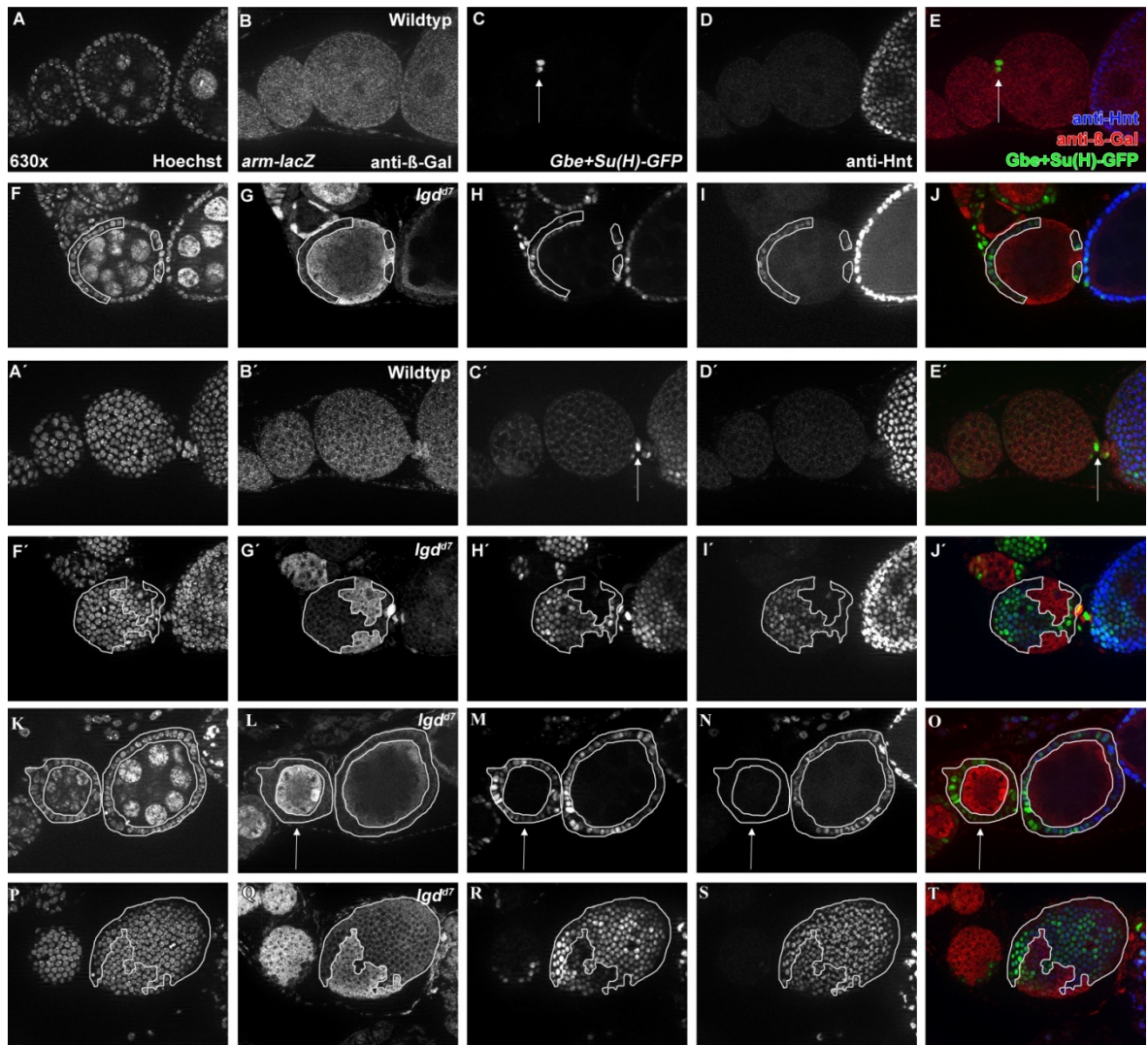


Abb.16: Der Funktionsverlust von *lgd* führt zu verfrühten Expression von Hnt ab Stadium S4/S5 und damit zu einem vorzeitigen Eintritt der Follikelzellen in den Endozyklus

In der dargestellten Graphik ist die Expression von *Gbe+Su(H)-GFP_{nl}* und Hnt in wildtypischen (A-E, A'-E') und *lgd^{d7}*-mutanten Follikelzellen (F-J, F'-J') verglichen. Dargestellt sind jeweils Vergrößerungen (630x) von vergleichbaren Eikammern des Stadiums S4/S5. In der 1. Spalte ist die Hoechstfärbung abgebildet. In der 2. Spalte ist die Expression des Markergens *arm-lacZ* gezeigt, die in *lgd^{d7}*-Follikelzellen abwesend ist (G, G', L, Q) und zusätzlich weiß umrandet ist. In der 3. Spalte die ektopische *Gbe+Su(H)-GFP_{nl}* Expression in den *lgd^{d7}*-defizienten Zellen zu erkennen (H, H', M, K), die ebenfalls weiß umrandet sind. In der 4. Spalte ist die Hnt Expression gezeigt, welche in *lgd^{d7}*-Follikelzellen einer S5 Eikammer verfrüht exprimiert wird (I, I') und in einer S6/S7 Eikammer zeigen sich stärkere Hnt Expression und leicht vergrößerte Zellkerne (N, S).

Um zu überprüfen, ob die verfrühte Notch-Aktivierung in *lgd^{d7}*-mutanten Follikelzellen zu einer ektopischen Hnt-Aktivierung führt, wurde die Hnt-Expression in *lgd^{d7}*-mutanten Follikelzellen mittels anti-Hnt Antikörperfärbung analysiert. Im Gegensatz zur sofortigen Expression von *Gbe+Su(H)-GFP_{nl}* in der frühen Oogenese in *lgd^{d7}*-Follikelzellen, führt der Ausfall von *lgd* allerdings nicht zur sofortigen Hnt-Expression (s. Abb.16). Es konnte keine Hnt-Expression in *lgd^{d7}*-mutanten Follikelzellen des Germariums oder S1-S4

Eikammern nachgewiesen werden. Allerdings konnte gezeigt werden, dass der Verlust von *lgd* in einer verfrühten Expression von Hnt in Eikammern ab Stadium S5 resultiert (**s.Abb.16 I,I'**), statt der wildtypischen Expression in Stadium S6/S7 (**s.Abb.16 D,D'**). In älteren Eikammern der Stadien S6/S7 ist außerdem zu erkennen, dass die *lgd^{d7}*-mutanten Zellen eine stärkere Hnt-Expression und größere Zellkerne, verglichen mit wildtypischen Nachbarzellen, aufweisen (**s.Abb.16 N,O,S,T**). Zusammengefasst kann gesagt werden, dass der Verlust von *lgd* im Follikelepithel zu vorzeitiger Expression des Notch-Zielgens *hnt* in Stadium S5 Eikammern führt.

Der Nachweis stärkerer Hnt Expression und leicht vergrößerter Zellkerne in den *lgd^{d7}*-mutanten Follikelzellen deutet darauf hin, dass diese früher aus dem mitotischen Zyklus in den Endozyklus übergetreten sind.

3.2.1.3 Die ektopische Notch-Aktivierung in *lgd^{d7}*-mutanten Follikelzellen ist ligandenunabhängig, aber γ -Secretase-abhängig

Die *loss-of-function* Analyse von *lgd* in der Flügelimaginalscheibe hat gezeigt, dass die ektopische Notch-Aktivierung ligandenunabhängig erfolgt (Childress et al. 2006; Gallagher and Knoblich 2006; Jaekel and Klein 2006).

Um zu überprüfen, ob die ektopische Notch-Aktivierung in *lgd^{d7}*-Follikelzellen ebenfalls Ligandenunabhängig erfolgt, wurden *lgd^{d7},kuz^{ES24}*-doppelmutante Follikelzellklone erzeugt. Die Metalloprotease Kuzbanian (Kuz) vermittelt die S2-Spaltung der extrazellulären Notch-Rezeptor-Domäne und schneidet nur nach der Bindung der Liganden, Delta oder Serrate, den Rezeptor. Der Verlust von *kuz* führt zur Unterdrückung der Notch-Aktivität (Rooke et al. 1996; Pan and Rubin 1997; Sotillos et al. 1997; Klein 2002; Lieber et al. 2002).

Als Kontrolle, ob der Verlust der *kuz* Funktion die Aktivität des Notch-Signalweges im Follikelepithel verhindern kann, wurden *kuz^{ES24}* Follikelzellklone erzeugt. Diese zeigten in der mittleren Oogenese fehlende *Gbe+Su(H)-GFP_{nls}* und Hnt Expression und fusionierte Eikammern (**s.Abb.17 F-J,F'-J'**), was Hinweise auf die Inaktivierung des Notch-Signalweges sind (Xu et al. 1992; Sun and Deng 2007).

Die Analyse doppelmutanter *lgd^{d7},kuz^{ES24}* Follikelzellklone zeigt, dass die ektopische Expression von *Gbe+Su(H)-GFP_{nls}* und die verfrühte Hnt-Expression durch den zusätzlichen Verlust von *kuz* nicht unterdrückt werden können (**s.Abb.17 K-O,K'-O'**).

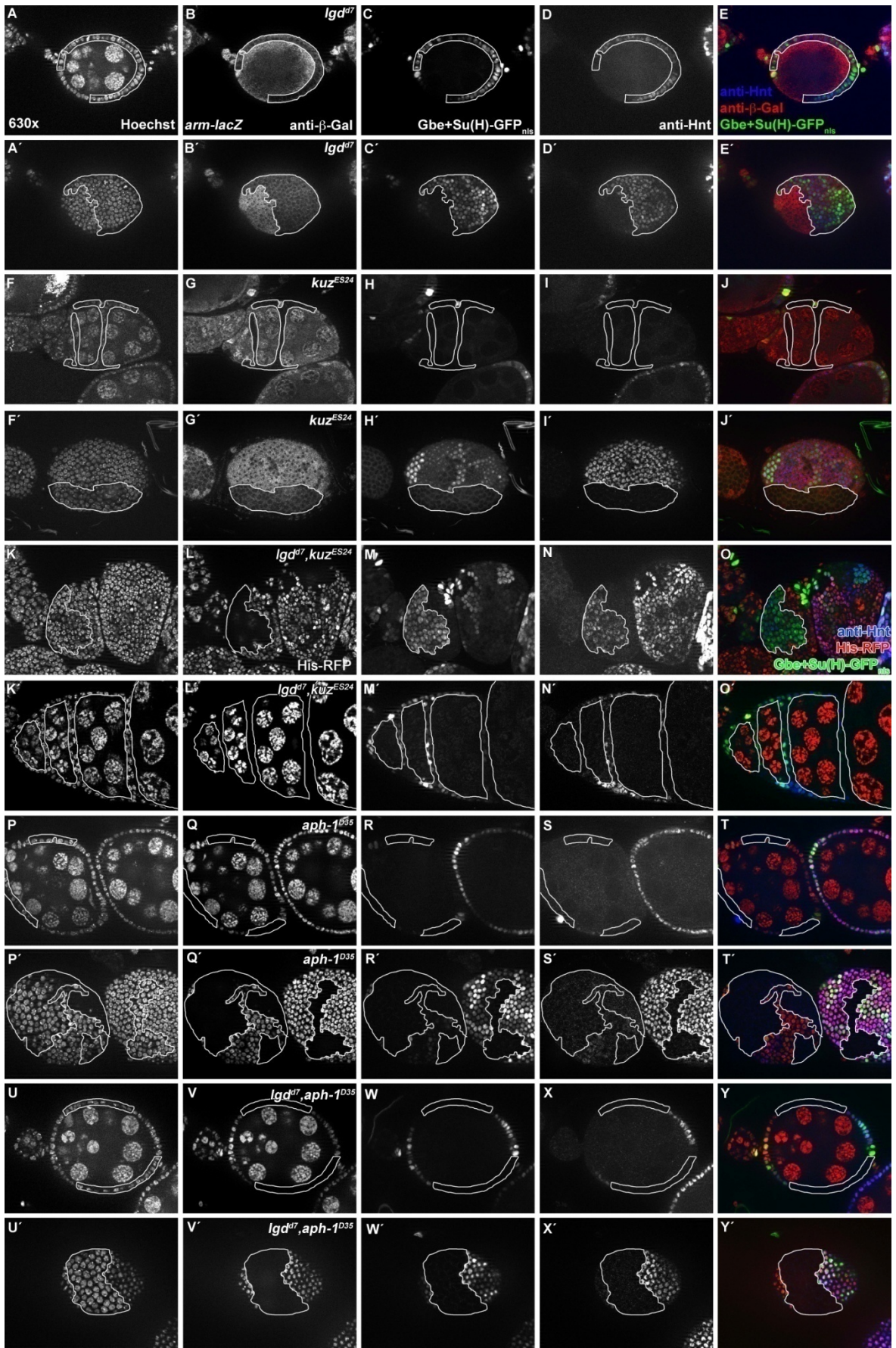


Abb.17: Der Ausfall der Funktion von *lgd* führt zur ligandenunabhängigen, γ -Secretase-abhängigen Notch-Aktivierung im Follikelepithel

In der Graphik ist der Vergleich der Hnt- und der *Gbe+Su(H)-GFP_{nls}*-Expression in *lgd^{d7}*- und *kuz^{ES24}*- und *aph-1^{D35}*, sowie in *lgd^{d7},kuz^{ES24}*- und *lgd^{d7},aph-1^{D35}* doppelmutanten Follikelzellen dargestellt. Es sind die jeweiligen Vergrößerungen (630x) annähernd gleich altriger Eikammern S5-S7 abgebildet. Die Klone sind in der 2. Spalte negativ markiert für die Expression des Markergens *lacZ* (B,B',G,G') oder für *RFP* (L,L',Q,Q',V,V') und zusätzlich weiß umrandet. In den Reihen A-E' ist die ektopische Aktivierung von *Gbe+Su(H)-GFP_{nls}* (C,E) und Hnt (D,E), in einem für *lgd^{d7}* mutanten Klon (B,E) dargestellt. In den Reihen F-J' sind Beispiele für *kuz^{ES24}*-mutante Follikelzellklone abgebildet, die als Kontrolle dienen. Diese zeigen fusionierte Eikammern und fehlende Hnt- und *Gbe+Su(H)-GFP_{nls}* Expression in den *kuz^{ES24}*-defizienten Zellen (H',I',J'). In den Reihen K-O' sind dagegen die jeweiligen Expressionen in *lgd^{d7},kuz^{ES24}*-doppelmutanten Follikelzellklonen abgebildet. Diese zeigen starke *Gbe+Su(H)-GFP_{nls}*- (M,M',O,O') und Hnt-Expression (N,N',O,O'), allerdings auch fusionierte Eikammern. In den Reihen P-T' sind die Expressionen von Hnt und *Gbe+Su(H)-GFP_{nls}* in *aph-1^{D35}*-mutanten Follikelzellklonen abgebildet, welche als Kontrolle dienen. Diese zeigen weder Hnt (S,S',T,T') noch *Gbe+Su(H)-GFP_{nls}* (R,R',T,T') Expression in den *aph-1^{D35}*-mutanten Follikelzellen. In den Reihen U-Y' ist zu erkennen, dass ebenfalls keine Expression von *Gbe+Su(H)-GFP_{nls}* (W,W',Y,Y') oder Hnt (X,X,Y,Y') in *lgd^{d7},aph-1^{D35}*-mutanten Follikelzellen detektiert werden kann.

Interessanterweise konnten keine langen stielartigen Strukturen in *lgd^{d7},kuz^{ES24}*-Follikelzellklonen beobachtet werden, die für den *lgd*-Ausfall charakteristisch sind. Es wurden allerdings in einigen Fällen fusionierte Eikammern beobachtet, welche auf den Verlust der Notch-Aktivität hinweisen (**s.Abb.17 K'-O'**).

Zusammengefasst deutet die Analyse *lgd^{d7},kuz^{ES24}*-mutanter Follikelzellklone darauf hin, dass, ähnlich wie in der Flügelimaginalscheibe, die ektopische Notch-Aktivierung in *lgd^{d7}*-mutanten Zellen ligandenunabhängig erfolgt. Die Analyse des Ausfalls der *lgd* Genfunktion in der Flügelimaginalscheibe hat gezeigt, dass die ligandenunabhängige ektopische Aktivierung des Notch-Signalweges abhängig ist vom γ -Secretase Komplex (Childress et al. 2006; Gallagher and Knoblich 2006; Jaekel and Klein 2006).

Um dies im Follikelepithel zu analysieren, wurden doppelmutante *lgd^{d7},aph-1^{D35}* Zellklone erzeugt.

Aph-1 (Anterior pharynx defective-1) ist eine Komponente des γ -Secretase-Komplexes und entscheidend für die Aktivität des Komplexes und der S3/S4 Spaltung des Notch-Rezeptors. Der *aph-1*-Verlust führt zur Unterdrückung der Notch-Aktivität (Cooper et al. 2009). Zur Kontrolle, ob der Verlust der *aph-1* Genfunktion die Aktivität des Notch-Signalweges im Follikelepithel verhindern kann, wurden *aph-1^{D35}*-mutanten Follikelzellklone generiert, die ähnlich wie *kuz^{ES24}*-mutante Follikelzellklone, zu fehlender *Gbe+Su(H)-GFP_{nls}*, Hnt-Expression und fusionierten Eikammern führten (**s.Abb.17 R-T'**). Die Analyse doppelmutanter *lgd^{d7},aph-1^{D35}*-Follikelzellklone zeigt, dass es in allen mutanten Zellen zu einer kompletten Unterdrückung der *Gbe+Su(H)-GFP_{nls}* und Hnt Expression kommt, wie in *aph-1^{D35}* Follikelzellklonen. Auch in Eikammern des Stadiums S6/S7 ist keine Expression von *Gbe+Su(H)-GFP_{nls}* und Hnt mehr nachweisbar und es

kommt zu fusionierten Eikammern (**s.Abb.17 W,W',X,X',Y,Y'**). Interessanterweise konnte sowohl in *aph-I^{D35}*- als auch in doppelmutanten *lgd^{d7},aph-I^{D35}*-Follikelzellklonen eine Abflachung der Zellkerne bzw. der Zellen beobachtet werden, was dazu führt, dass die Kerne in den Aufnahmen größer als ihre wildtypischen Nachbarn erscheinen und mit großen endozyklischen Zellen verwechselt werden können.

Zusammengefasst weist die Analyse *lgd^{d7},aph-I^{D35}* mutanter Follikelzellklone darauf hin, dass, genau wie in der Flügelimaginalscheibe, die ektopische ligandenunabhängige Notch-Aktivierung in *lgd^{d7}*-mutanten Zellen abhängig von der Funktion des γ -Secretase-Komplexes ist.

3.2.1.4 Die ektopische Notch-Aktivierung in *lgd^{d7}*-Follikelzellen kann durch den zusätzlichen Verlust von *hrs* unterdrückt werden

Die Analyse des Genfunktionsverlustes von *lgd* hat gezeigt, dass die ektopische Notch-Aktivierung in *lgd^{d7}*-Zellen, nicht nur durch Ausfall des γ -Secretase-Komplexes, sondern auch durch den zusätzlichen Verlust Komponenten des ESCRT-0-Komplexes, wie *hrs* (*hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate*), unterdrückt werden kann (Childress et al. 2006; Gallagher and Knoblich 2006; Jaekel and Klein 2006; Troost et al. 2012).

Das Ergebnis deutet darauf hin, dass der Lgd *downstream* von Hrs fungiert und dass in Bezug auf den Notch-Signalweg eine antagonistische Beziehung zwischen beiden Proteine vorliegt (Childress et al. 2006; Gallagher and Knoblich 2006; Jaekel and Klein 2006; Troost et al. 2012).

Um zu überprüfen, ob die ektopische Notch-Aktivierung in *lgd^{d7}*-Follikelzellen ebenfalls durch den zusätzlichen Verlust der *hrs* Genfunktion unterdrückt werden kann, wurden doppelmutante *lgd^{d7},hrs^{D28}* Follikelzellklonen generiert (**s.Abb.18**).

Hrs bildet zusammen mit Stam den ESCRT-0-Komplex und wird innerhalb des endosomalen Transportweges bei der MVB-Biogenese und dem Abbau vieler Membranrezeptoren benötigt (Chanut-Delalande et al. 2010). Der Verlust von *hrs* führt im Gegensatz zu *lgd* allerdings nicht zu einer ektopischen Notch-Aktivierung. Als Kontrolle, wurden *hrs^{D28}*-Follikelzellklone erzeugt, welche weder ektopische Expression des Notch-Markers *Gbe+Su(H)-GFP_{nls}* aufwiesen, noch das wildtypische Expressionsmuster veränderten (**s.Abb.18 H,H'**).

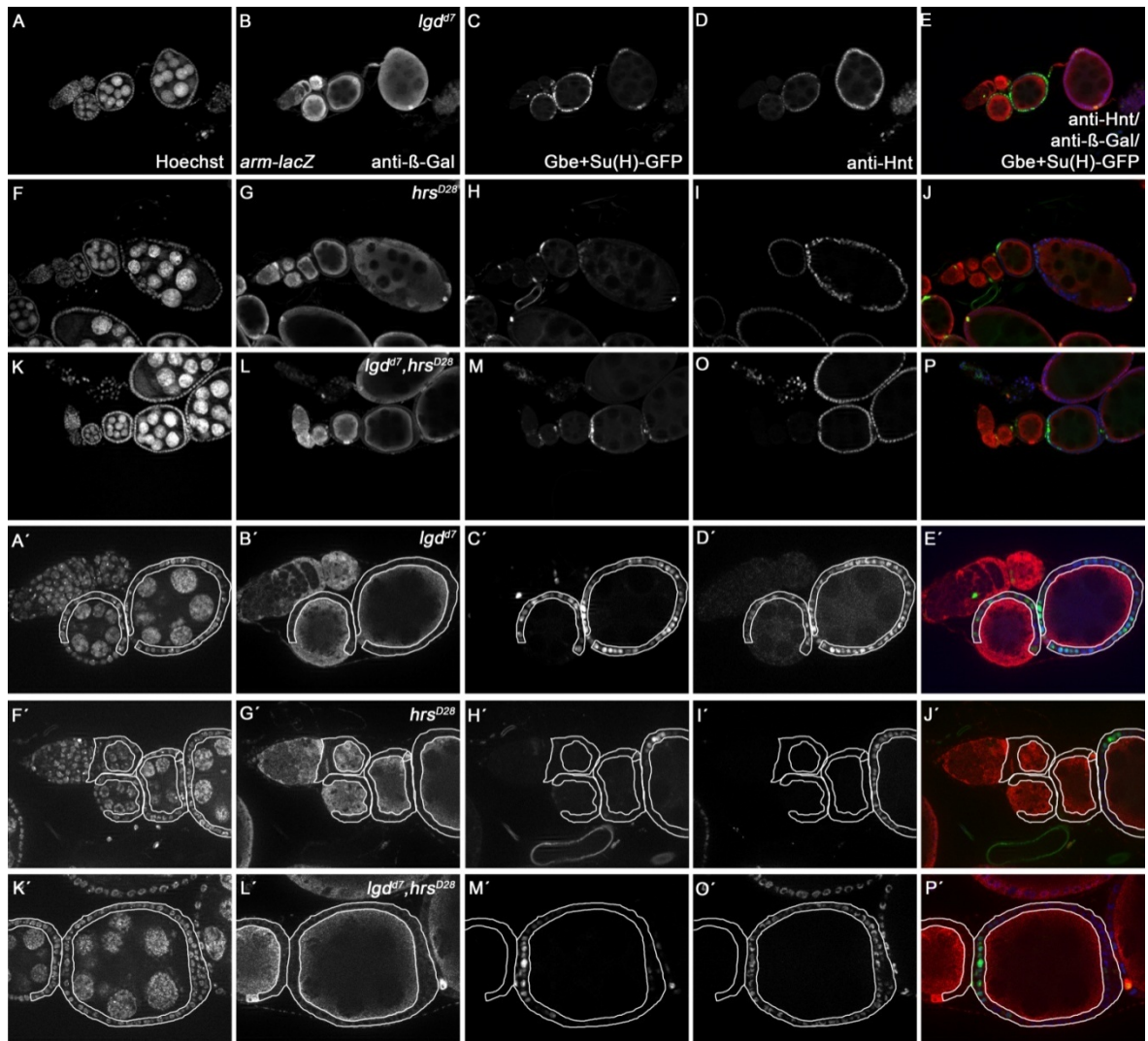


Abb.18: Der zusätzliche Verlust von *hrs* führt zu Unterdrückung der ektopischen Notch Aktivität in *lga^{d17}*-mutanten Follikelzellen

In der Abbildung ist ein Vergleich der Expressionen des Notch-Aktivitätsmarkers *Gbe+Su(H)-GFP_{nl}* und des Zielgens *hnt* in *lga^{d17}* und *hrs^{D28}*, sowie in *lga^{d17},hrs^{D28}*-doppelmutanten Follikelzellklonen dargestellt. In den ersten drei Reihen sind Übersichtsaufnahmen von den jeweiligen Ovarienschläuchen (A-L) und in den unteren drei Reihen die jeweiligen Vergrößerungen (A'-L'), in denen die Klone durch die Abwesenheit der β -Gal Färbung und durch die weiße Umrandung markiert sind (B',G',L'). In *lga^{d17}*-Klonen (B',E') wird der Notch-Reporter ektopisch aktiviert (C',E') und Hnt verfrüht exprimiert (D',E'). Der Verlust des ESCRT-0-Komplex-Gens in *hrs^{D28}*-Zellen (G',J') hat keinen Einfluss auf die Notch-Aktivität (H',J'), weder löst sie eine ektopische Aktivierung aus noch verhindert sie die wildtypische Aktivierung. Auch die Expression von *hnt* in *hrs^{D28}*-Zellen ist nicht beeinträchtigt (I',J'). Die *lga^{d17},hrs^{D28}*-Follikelzellklone (L',P') weisen im Gegensatz zu den *lga^{d17}*-Zellen (B',E') keine Expression des Notch-Markers (M') bzw. des Zielgens (O',P') mehr auf und zeigen eine Unterdrückung des *lga*-Phänotyps

Die Hnt-Expression in Stadium S6/S7 Eikammern war ebenfalls unverändert (**s.Abb.18 I,I'**). Die Untersuchung doppelmutanter *lga^{d17},hrs^{D28}*-Follikelzellklonen zeigte, dass sowohl die ektopische Expression von *Gbe+Su(H)-GFP_{nl}* als auch die verfrühte Expression von Hnt unterdrückt wurden. Die Expression von *Gbe+Su(H)-GFP_{nl}* in Polarzellen oder terminalen Follikelzellen, oder die Hnt-Expression in S6/S7 Eikammern, welche durch

ligandenabhängige Notch-Aktivierung erfolgen, war nicht betroffen. (**s.Abb.18 M,M',O,O'**).

Die Analyse *lgd^{d7},hrs^{D28}*-doppelmutanter Follikelzellklonen deutet darauf hin, dass die ektopische Notch-Aktivierung in *lgd^{d7}*-Follikelzellen, ähnlich wie in der Flügelimaginalscheibe, durch den Verlust der ESCRT-0-Komponente, *hrs*, reprimierbar ist. Des Weiteren bestätigt das Ergebnis, dass Lgd downstream von Hrs fungiert.

3.2.1.5 Der Genfunktionsverlust von *ept*, *vps25* oder *shrub* in den Follikelzellen führt ebenfalls zur ektopischen Notch-Aktivierung

Im Gegensatz zum Verlust von *hrs* (ESCRT-0), führt der Verlust von anderen ESCRT-Mitgliedern, genau wie beim *lgd*-Ausfall, zur ligandenunabhängigen ektopischen Aktivierung des Notch-Signalweges (Moberg et al. 2005; Thompson et al. 2005; Herz et al. 2006).

Um dies für das Follikelepithel zu überprüfen, wurde exemplarisch für jede ESCRT-Komplexgruppe, der Ausfall der Genfunktion von *erupted* (*ept/tsg101*, ESCRT-I), *vps25* (ESCRT-II) und *shrub* (ESCRT-III) untersucht und mit *lgd^{d7}*- und *hrs^{D28}*-mutanten Follikelzellen verglichen. Die Verwendung des hypomorphen Allels *ept^{P26}* und die Generierung *ept^{P26}*-mutanter Follikelzellklone zeigt, dass der Ausfall der ESCRT-I Komponente zur Expression des Reporter *Gbe+Su(H)-DsRed_{nls}* ab der frühen Oogenese und zur verfrühten Hnt Expression in der mittleren Oogenese führt (**s.Abb.19 K-O**). Verglichen mit der Hnt-Expression in *lgd^{d7}*-Mutanten scheint die Hnt-Expression in *ept^{P26}*-mutanten Follikelzellen allerdings stärker zu sein und schon in Stadium S3 Eikammern zu erfolgen (**s.Abb.19 N**). Außerdem sind die Zellkerne im Gegensatz zu den wildtypischen Nachbarzellen und *lgd^{d7}*-mutanten Follikelzellklonen deutlich größer (**s.Abb.19 K-O**). Mit Hilfe des hypomorphen Allels *vps25^{Pb2931}* wurden *vps25^{Pb2931}*-mutante Zellklone erzeugt, die ebenfalls eine vorzeitige Hnt-Expression zeigten. Aus Kreuzungs-technischen Gründen konnte keine sofortige Expression von *Gbe+Su(H)-GFP_{nls}* oder *-DsRed_{nls}* in diesen ESCRT-II-mutanten Follikelzellen dargestellt werden (**s.Abb.19 P-T**). Die ESCRT-III-Komponente Shrub, konnte als Interaktionspartner von Lgd nachgewiesen werden (Troost et al. 2012). Die Analyse *shrub⁴⁻¹*-mutanter Follikelzellen zeigt, wie der Verlust von *lgd* und *ept*, die ektopische Expression von *Gbe+Su(H)-GFP_{nls}* ab der frühen Oogenese und die vorzeitige Expression des Notch-Zielgens *hnt* (**s.Abb.19 U-Y**).

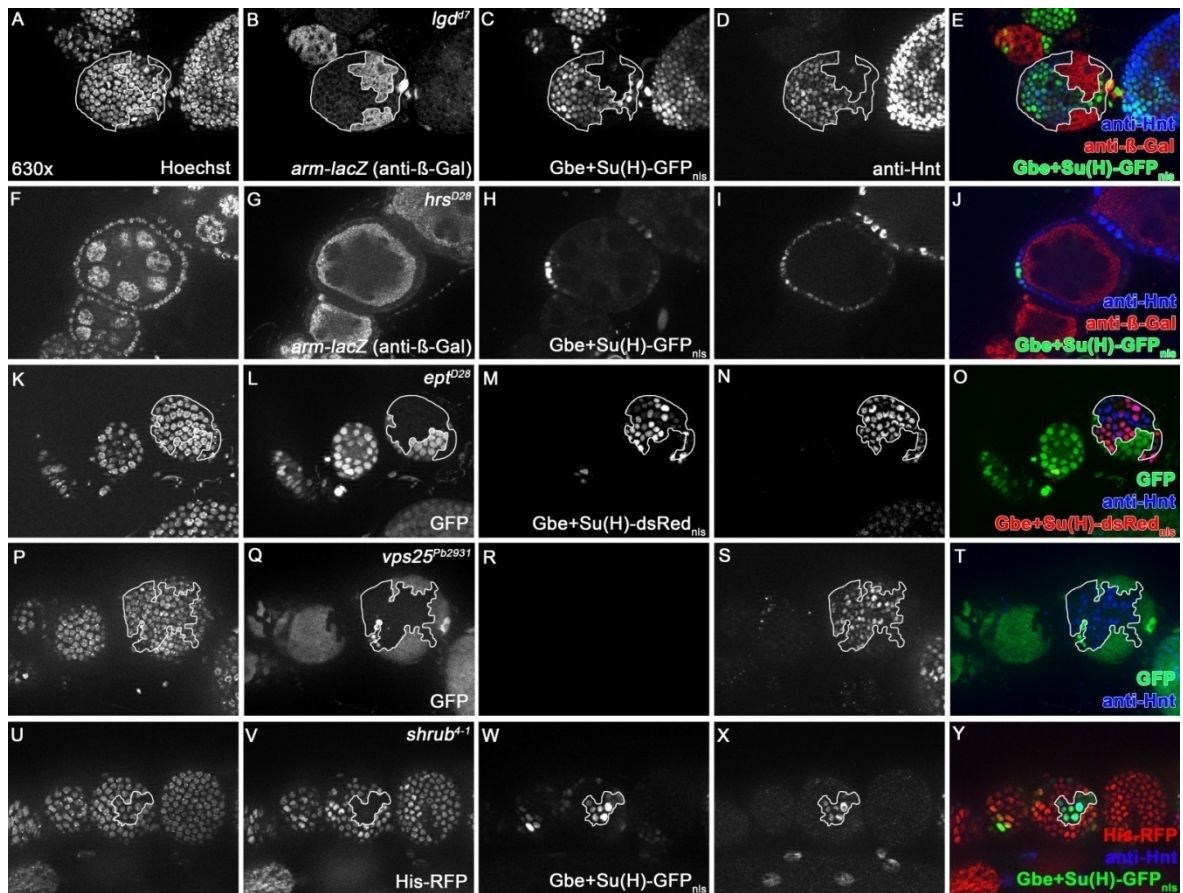


Abb.19: Der Verlust von *ept*, *vps25* oder *shrub* führt im Gegensatz zu *hrs* ebenfalls zur ectopischen Aktivierung des Notch-Signalweges

In der Graphik sind die Expressionsmuster der Notch-Aktivitätsmarker *Gbe+Su(H)-GFP_{nls}/DsRed_{nls}* und des Notch-Zielgens *hnt* in *lgd^{d7}*, *ept^{D28}*, *vps25^{Pb2931}*, und *shrub⁴⁻¹* mutanten Follikelzellklonen abgebildet.

In der Reihe A-E ist die ectopische Expression von *Gbe+Su(H)-GFP_{nls}* (C,E) und die verfrühte Hnt Expression (D,E) in *lgd^{d7}*-Follikelzellklonen abgebildet. In Reihe F-J ist zu erkennen, dass die wildtypische Expression von Hnt (H,J) und *Gbe+Su(H)-GFP_{nls}* (I,J) durch den Verlust von *hrs* nicht beeinträchtigt ist. In Reihe K-O ist ectopische *Gbe+Su(H)-DsRed_{nls}* (M,O) und Hnt Expression (N,O) und *ept^{P26}*-mutanten Follikelzellen gezeigt. In Reihe P-T ist verfrühte Hnt Expression beim Verlust von *vps25* zu erkennen (S,T). In Reihe U-Y ist ebenfalls ectopische Expression von *Gbe+Su(H)-GFP_{nls}* und Hnt in *shrub⁴⁻¹* mutanten Follikelzellklonen sichtbar.

3.2.1.6 Der Ausfall von *lgd* führt zu einer Notch-unabhängigen ectopischen Aktivierung des Dpp-Reportergenkonstrukts *Dad-lacZ* im Follikelepithel

Vergleichbar mit *ept^{P26}*-mutanten Follikelzellen scheint die Hnt-Expression in *shrub⁴⁻¹*-mutanten Follikelzellen stärker zu sein, als bei *lgd* und *vps25*, und die mutanten Zellkerne sind deutlich vergrößert (s.Abb.19 X). Die vergleichende Analyse ESCRT-mutanter mit *lgd^{d7}*-mutanter Follikelzellklone zeigt, dass es in allen Fällen zur sofortigen ectopischen Aktivierung des Notch-Signalweges kommt. Die Unterschiede im Zeitpunkt der Hnt-

Expression deuten allerdings darauf hin, dass der Verlust von *ept* und *shrub*, verglichen mit dem *lgd*-Ausfall, zu einer stärkeren Aktivierung des Notch-Signalweges führt.

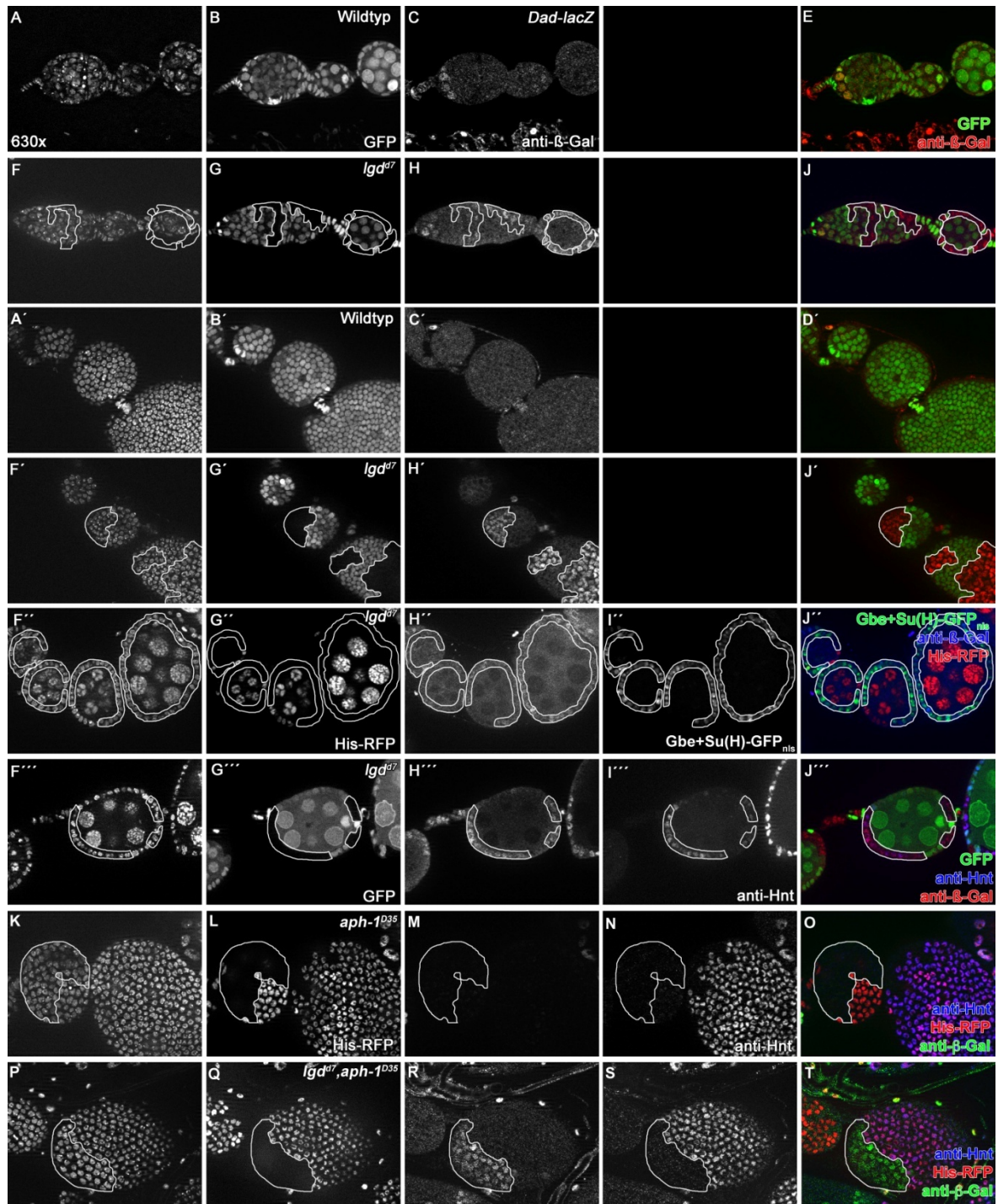


Abb.23: Der *lgd*-Verlust im Follikelepithel führt zu Notch-unabhängiger ektopischer *Dad-lacZ* Expression

Die wildtypische *Dad*-Expression während der Oogenese ist beschränkt auf die Keimbahnstammzellen (C,E) und die anterioren Follikelzellen ab Stadium 9 (nicht abgebildet). In den dargestellten wildtypischen Eikammern (Stadium 2-6) findet keine *Dad*-Expression im Follikelepithel statt (C,C',E,E'). Dagegen zeigt sich innerhalb der *lgd*^{d7}-mutanten Follikelzellen (G,G',J,J') eine ektopische Aktivierung von *Dad* (H,H'). Die zusätzliche Verwendung des Notch-Aktivitätsmarkers *Gbe+Su(H)-GFP_{nls}* (I',J') zeigt, dass die Expression von *Dad* (H') mit der des Notch-Markers (I') übereinstimmt, was in der Überlagerung (J') verdeutlicht wird. Die Expression des Zielgens *hnt* (I''',J''') und die Überlagerung mit der *Dad*-Expression (H''') in einem *lgd*^{d7}-Klon (G''',J''') zeigt die Expression beider Marker kurz vor dem M/E-Switch der

Follikelzellen. Die Analyse *aph-1^{D35}*-mutanter (L,O) Zellklone zeigt keine ektoische Expression von *Dad-lacZ* (M,O) und keine verfrühte Hnt-Expression (N,O). Dagegen weisen *lgd^{d7},aph-1^{D35}*-mutante Follikelzellklone trotz fehlender Hnt-Expression (S,T), die ektoische Expression von *Dad-lacZ* (R,T) auf. Die bisherigen Analysen von *lgd* in der Flügelimaginalscheibe und im Follikel epithel haben gezeigt, dass *Lgd* für die negative Regulation des Notch-Signalweges benötigt wird (Childress et al. 2006; Gallagher and Knoblich 2006; Jaekel and Klein 2006; Troost et al. 2012).

Um zu überprüfen, ob der Verlust von *lgd* auch die Aktivität anderer Signalwege beeinträchtigt, wurde die Aktivität des Decapentaplegic-(Dpp) Signalweges, mit Hilfe des Reporter genkonstrukts *Dad-lacZ* untersucht (Twombly et al. 1996).

Daughter against Dpp (Dad) stellt eines der natürlichen Zielgene des Dpp-Signalweges dar und wird nach Aktivierung des Signalweges in den Keimbahnstammzellen innerhalb des Germariums und den anterioren Follikel epithelzellen ab Stadium 9 der Oogenese exprimiert (Inoue et al. 1998; Ogiso et al. 2011). Die Analyse der *Dad-lacZ* Expression in homozygoten *lgd^{d7}*-Flügelimaginalscheiben bzw. *lgd^{d7}*-Zellklonen konnte keine Veränderung der Expression des Reporters nachweisen.

Die Analyse der *lgd^{d7}*-mutanten Follikelzellklone zeigt, dass der Verlust von *lgd* zu einer sofortigen ektoischen Expression des Dpp-Zielgens *Dad-lacZ* führt, welche sowohl in der frühen als auch in der mittleren Oogenese und in posterioren Follikelzellen nachgewiesen werden konnte (**s.Abb.20 F-J,F'-J'**).

Die Expression von *Dad-lacZ* in *lgd^{d7}*-mutanten Follikelzellen korreliert mit der ektoischen Aktivierung der *Gbe+Su(H)-GFP_{nls}* Expression (**s.Abb.20 H'',I''**) und der verfrühten Hnt-Expression in Stadium S5 Eikammern (**s.Abb.20 H''',I'''**).

Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass der Verlust der *lgd* Funktion zu einer ektoischen Aktivierung des Dpp-Signalweges führt, welche durch die Verwendung des Reporters *Dad-lacZ* in *lgd^{d7}*-mutanten Zellen der Flügelimaginalscheibe nicht nachgewiesen werden konnte.

Um zu überprüfen, ob die ektoische Aktivierung von *Dad-lacZ* direkt durch den Verlust von *lgd* oder durch die ligandenunabhängige Aktivität des Notch-Signalweges ausgelöst wird, wurden *lgd^{d7},aph-1^{D35}*-Follikelzellklone hinsichtlich ihrer *Dad-lacZ* Expression untersucht (**s.Abb.20 P-T**). Wie bereits zuvor gezeigt, führt der Verlust von *aph-1* in *lgd^{d7}*-mutanten Follikelzellen sowohl zur Inaktivierung der Ligandenunabhängigen als auch der -unabhängigen des Notch Signalisierung.

Um auszuschließen, dass der Verlust von *aph-1* eine ektoische *Dad-lacZ* Expression verursacht, wurden *aph-1^{D35}*-Follikelzellklone erzeugt, welche keine ektoische

Expression des Dpp-Reporters in den *aph-1^{D35}*-mutanten Zellen aufwiesen, durch fusionierte Eikammern gekennzeichnet waren (s.Abb.20 K-O).

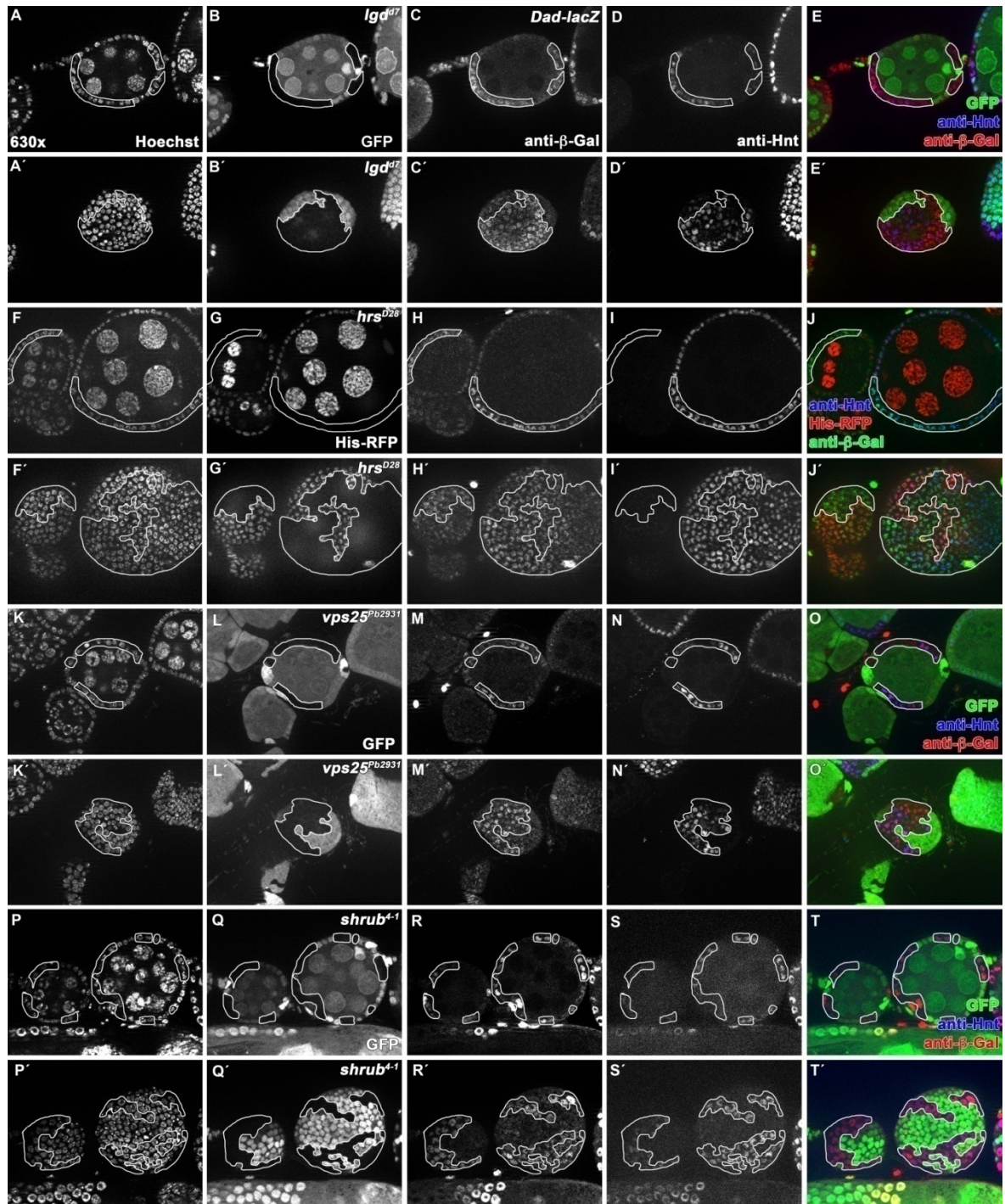


Abb.21: Der Ausfall von *lgd*, *hrs*, *vps25* und *shrub* resultiert in der Expression des Dpp-Reporters *Dad-lacZ*

In der Graphik ist eine Gegenüberstellung der ektopischen Expression von *Dad-lacZ* in *lgd^{d7}*, *hrs^{D28}*, *vps25^{Pb2931}* und *shrub⁴⁻¹*-mutanten Follikelzellen dargestellt. Abgebildet sind Vergrößerungen (630x) von Eikammern der Stadien S5-S7, verschiedener Genotypen. In der 2.Spalte sind die mutanten Bereiche durch fehlende Expression des Markergens *GFP* oder *DsRed* dargestellt und durch zusätzliche weiße Umrandungen hervorgehoben (B,B',G,G',L,L',Q,Q').

In der 3. Spalte ist zu erkennen, dass in allen Fällen innerhalb der mutanten Zellen ektopische *Dad-lacZ* Expression nachweisbar ist (C,C',H,H',M,M',R,R'). Während der Verlust von *hrs* keine ektopische Notch-Aktivierung auslöst, ist ektopische *Dad*-Expression nachweisbar (H,H'). Die 4. Spalte zeigt, bis auf den

Verlust von *hrs* (I,I'), die verfrühte Hnt-Expression, die durch den Ausfall von *lgd* (D,D') und der ESCRT-II-III Gene (N,N',S,S') ausgelöst wird.

Die Analyse der *Dad*-Expression in den *lgd^{d7},aph-1^{D35}*-doppelmutanten Follikelzellklonen zeigt, dass die ektopische Aktivierung von *Dad-lacZ*, im Gegensatz zur Hnt-Expression, durch den zusätzlichen Verlust von *aph-1*, nicht unterdrückt werden kann (**s.Abb.21 P-T**). Zusammengefasst weisen die Ergebnisse daraufhin, dass der Verlust von *lgd* zu einer Notch-unabhängigen Expression des Dpp-Reportergens *Dad-lacZ* führt und deuten auf die ektopische Aktivierung des Dpp-Signalweges hin.

Um zu überprüfen, ob der Verlust der ESCRTs ebenfalls zu einer ektopischen Expression des Reporters *Dad-lacZ* führt, wurde der Verlust von *hrs*, *vps25* und *shrub* hinsichtlich der *Dad* Expression untersucht. Aus Kreuzungs-technischen Gründen konnte keine Untersuchung der *Dad-lacZ* Expression in *ept^{P26}*-mutanten Follikelzellen durchgeführt werden. Die Analyse *hrs^{D28}-*, *vps25^{Pb2931}*- und *shrub⁴⁻¹*-mutanter Follikelzelleklone zeigt, dass in allen mutanten Klonen der Verlust der Genfunktion zu einer ektopischen Expression des Dpp-Reporters *Dad-lacZ* führt, die schon in der frühen Oogenese nachweisbar ist (**s.Abb.21 F-T'**). Interessanterweise resultiert der Verlust von *hrs*, obwohl er nicht zu einer ektopischen Aktivierung des Notch-Signalweges führt (**s.Abb.21 I,I',J,J'**), zur ektopischen *Dad-lacZ* Expression (**s.Abb.21 M,M',J,J'**).

Die Analyse *lgd^{d7}-*, *hrs^{D28}-*, *vps25^{Pb2931}*- und *shrub⁴⁻¹*-mutanter Follikelzellklone zeigt, dass in allen mutanten Klonen der Verlust der Genfunktion zu einer sofortigen ektopischen Expression des Dpp-Reporters *Dad-lacZ* führt (**s.Abb.21 A-T'**).

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass *Lgd* und die ESCRT-0 – ESCRT-III Komplexe an der negativen Regulation des Dpp-Signalweges im Follikelepithel beteiligt sind.

3.2.1.7 Der Verlust von *lgd* im Follikelepithel führt zur Akkumulation des Notch-Rezeptors in einem späten endosomalen Kompartimenten

Es konnte gezeigt werden, dass der Verlust von *lgd* und der Funktion der ESCRT-I-ESCRT-III Komplexe zur ligandenunabhängigen Aktivierung des Notch-Signalweges führt (Moberg et al. 2005; Thompson et al. 2005; Vaccari and Bilder 2005; Jaekel and Klein 2006). Diese ektopische Aktivierung wird wahrscheinlich durch den Defekt im Abbaudes Notch-Rezeptors durch den endosomalen Transportweg ausgelöst. (Moberg et al. 2005; Thompson et al. 2005; Vaccari and Bilder 2005).

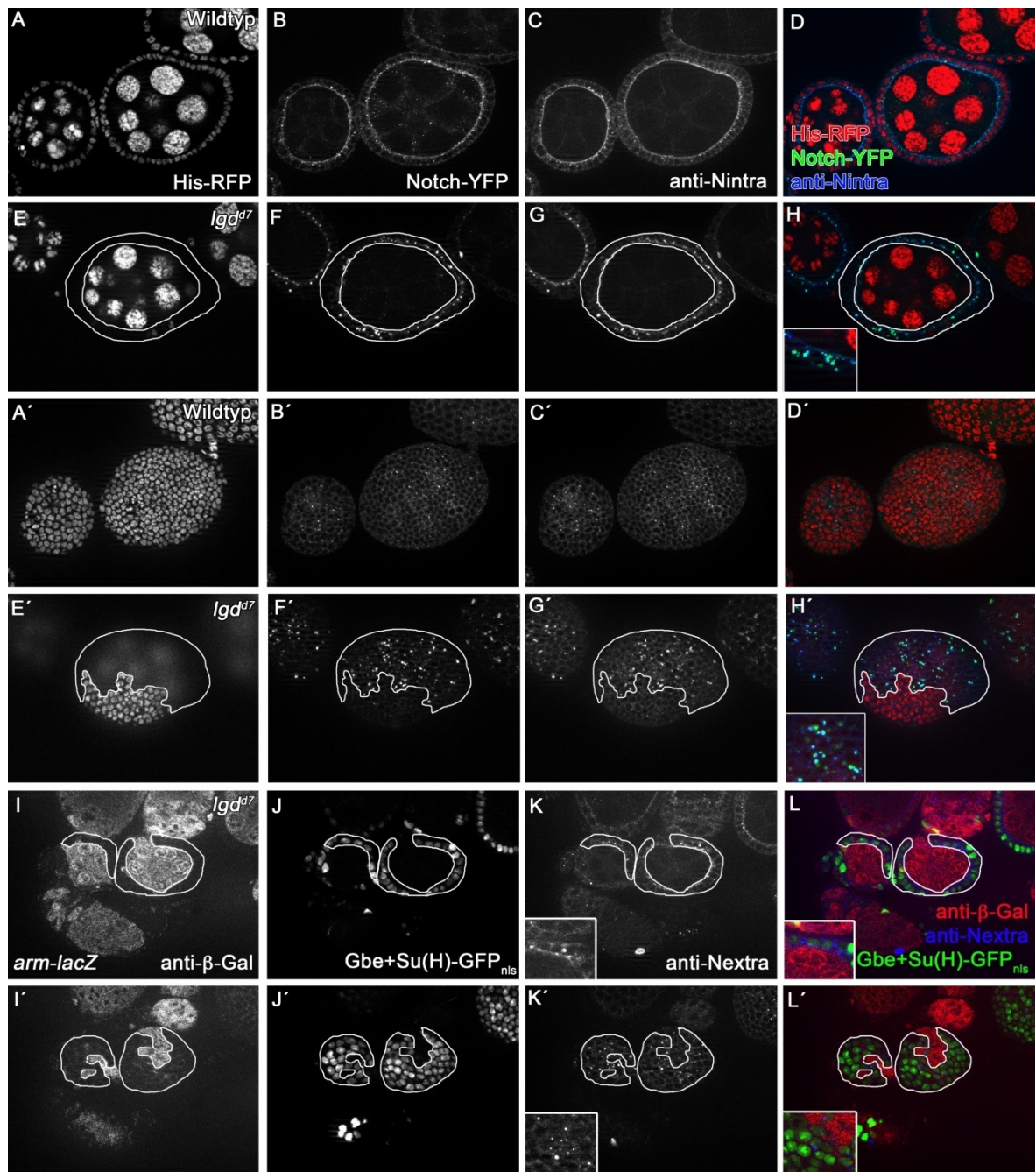


Abb.22: Der Ausfall von *lgd* führt zur Akkumulation des Notch-Rezeptors im Follikel epithel

Die Graphik zeigt die subzelluläre Verteilung des Notch-Rezeptors in wildtypischen Follikelzellen (A-D, A'-D') und in *lgd^{d7}*-mutanten Follikelzellen (E-H und E'-L'). Dargestellt sind Vergrößerungen (630x) von Eikammern der Stadien S6/S7 (A-E') und S2/S3 (I-L'). Die 1. Spalte zeigt die Expression des Markergens *arm-lacZ* (I,I') bzw. *His-RFP* (A,A',E,E') und deren Abwesenheit und die weiße Umrandung markiert die mutanten *lgd^{d7}*-Zellen (E,E',I,I'). In der 2. Spalte ist Verteilung der extrazelluläre Notch-Rezeptor-Domäne durch die Protein-Trap-Linie Notch-YFP in wildtypischen Eikammern (B,B') und *lgd^{d7}*-Follikelzellen (F,F') dargestellt. *lgd^{d7}*-Zellen weisen die Akkumulation der extrazellulären Notch-Rezeptor-Domäne in großen vesikelähnlichen Strukturen auf (F,F'). In der 3. Spalte ist die Verteilung der intrazelluläre Domäne, durch eine anti-Nintra Antikörperfärbung, in einer wildtypischen Eikammer (C,C') und in *lgd^{d7}*-Follikelzellen (G,G') abgebildet. Auch die intrazelluläre Notch-Rezeptor-Domäne akkumuliert in *lgd^{d7}*-Zellen (G,G'). Die Überlagerungen in der 4. Spalte zeigen, dass die extra- und intrazelluläre Notch-Rezeptor-Domänen kolo-kalisieren (H,H'). Während *lgd^{d7}*-mutante Follikelzellen alle die Expression von *Gbe+Su(H)-GFP_{nls}* (J,J') aufweisen und Notch-Aktivität suggerieren, ist der Abbaudefekt des Notch-Rezeptors, diesmal sichtbar gemacht durch eine anti-Nextra Antikörperfärbung, allerdings nicht in allen *lgd^{d7}*-Zellen nachweisbar (K,K'), was in der Überlagerung der *GFP_{nls}*-Expression mit der anti-Nextra-Färbung verdeutlicht wird (L,L').

Um zu überprüfen, ob der Verlust von *lgd* im Follikelepithel ebenfalls einen Defekt im endosomalen Transportweg und im Abbau des Notch-Rezeptors verursacht, wurde die subzelluläre Lokalisation des Notch-Rezeptors in *lgd^{d7}*-mutanten Follikelzellen untersucht. Zur Detektion der extrazellulären Domäne des Notch-Rezeptors wurde die Protein-Trap-Linie Notch-YFP (Rees et al. 2011) bzw. der anti-Nextra Antikörper und, zum Nachweis der intrazellulären Domäne, der anti-Nintra Antikörper verwendet.

In wildtypischen Eikammern ist sowohl die extra- als auch die intrazelluläre Domäne des Notch-Rezeptors an der apikalen Membran des Follikelepithels und in kleinen Vesikeln innerhalb des Epithels lokalisiert (**s.Abb.22 B,B',C,C'**). Die Analyse *lgd^{d7}*-mutanter Follikelzellklone zeigt, dass der *lgd*-Verlust zur Akkumulation des Notch-Rezeptors in vielen Zellen des Follikelepithels in der mittleren Oogenese führt (**s.Abb.22 F,F',G,G'**).

Durch die simultane Verwendung der Protein-Trap-Linie Notch-YFP mit dem anti-Nintra Antikörper konnte, aufgrund der Ko-Lokalisierung, bestätigt werden, dass es sich bei dem angesammelten Notch-Rezeptor um den *full-length* Rezeptor handelt (**s.Abb.22 H,H**).

In allen *lgd^{d7}*-Zellen findet man die ligandenunabhängige Aktivierung des Notch-Signalweges (**s.Abb.15,16 und 22 J**). Im Gegensatz dazu ist eine Ansammlung des Notch-Rezeptors in der mittleren Oogenese nicht in allen mutanten Zellen nachweisbar, was durch die Expression von *Gbe+Su(H)-GFP_{nls}* und der gleichzeitigen Verwendung des anti-Nextra Antikörpers gezeigt werden konnte (**s.Abb.22 J,J',K,K',L,L'**). Während in der frühen Oogenese kaum Notch Akkumulation nachweisbar ist, zeigen ältere Eikammern eine immer stärker werdende Ansammlung des Rezeptors in vesikelähnlichen Strukturen. Zusammengefasst weist das Ergebnis darauf hin, dass der Verlust von *lgd* im Follikelepithel, genau wie in der Flügelimaginalscheibe, zur Akkumulation des *full-length* Notch-Rezeptors führt und deutet auf einen Abbaudefekt des Rezeptors hin. Allerdings deutet der geringe Nachweis der Rezeptor-Ansammlung darauf hin, dass die Akkumulation des Notch-Rezeptors und die ektopische ligandenunabhängige Aktivierung des Notch-Signalweges nicht unbedingt in Zusammenhang stehen müssen.

Um zu überprüfen, ob der Notch-Rezeptor in den *lgd^{d7}*-defizienten Follikelzellen, genau wie in der Flügelimaginalscheibe, in einem späten endosomalen Kompartiment akkumuliert, wurde die Expression der früh- bzw. spät-endosomalen Marker, *tub-Rab5-CFP* bzw. *tub-Rab7-YFP*, zusammen mit der Verteilung der extrazellulären Notch-Domäne verglichen (Marois et al. 2006).

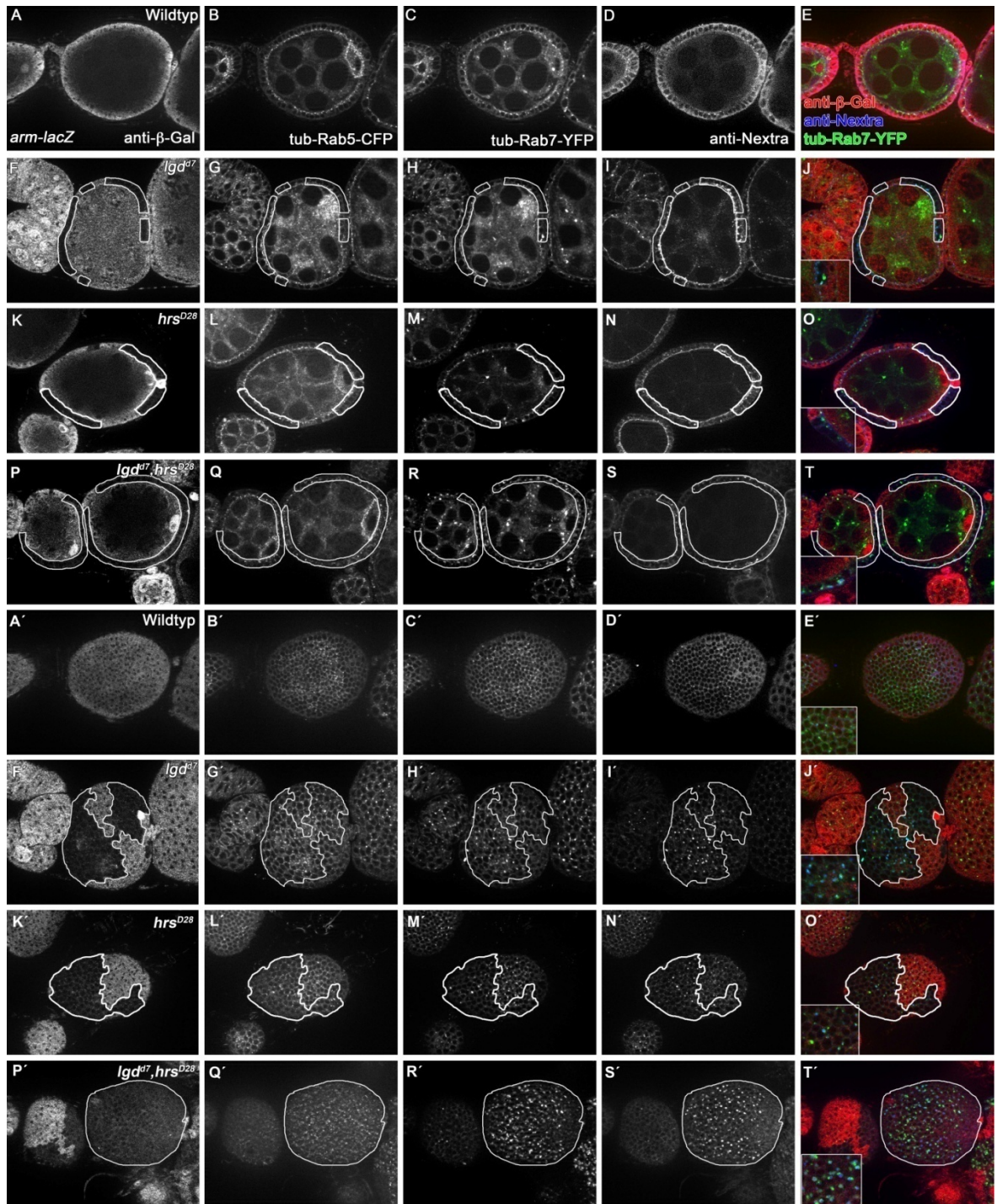


Abb.23: Die Akkumulation des Notch-Rezeptors in *lgd^{d7}*-mutanten Follikelzellen erfolgt in späten endosomalen Kompartimenten und kann durch den zusätzlichen Verlust von *hrs* verstärkt werden

Die Graphik zeigt die Expression von *tub-Rab5-CFP*, *tub-Rab7-YFP* und die Verteilung des Notch-Rezeptors in wildtypischen (A-E, A'-E), *lgd^{d7}*-(F-J, F'-J'), *hrs^{D28}*-(K-O, K'-O') und *lgd^{d7}, hrs^{D28}*-mutanten Follikelzellen (P-T, P'-T'). In A-T sind optische Querschnitte der jeweiligen Genotypen und in A'-T' Aufsichtsaufnahmen dargestellt. Abgebildet sind jeweils Eikammern der Stadien S5-S7. In der 1. Spalte ist die Expression des Markergens *arm-lacZ* gezeigt und die mutanten Zellen sind durch abwesende Expression und durch die weiße Umrandung dargestellt. In den Spalten 2, 3 und 4 sind die Expressionen von *tub-Rab5-CFP* bzw. *tub-Rab7-YFP* und die Verteilung der extrazellulären Notch-Domäne gezeigt, welche in *lgd^{d7}*-Zellen (G, G', H, H', I, I') und *hrs^{D28}*-Zellen (L, M, L', M', N, N') in einigen Zellen in vergrößerten vesikelähnlichen Strukturen ko-lokalisieren (J, J', O, O'). Dagegen zeigt die Expression von *tub-Rab5-CFP*, *tub-Rab7-YFP* und die Verteilung von Nextra in *lgd^{d7}, hrs^{D28}*-defiziente Follikelzellen eine deutliche Verstärkung des Phänotyps und die Ansammlung von Rab5-CFP, Rab7-YFP und Nextra in späten Endosomen nahezu jeder mutanten Zelle (T, T').

In wildtypischen Eikammern sind Rab5-CFP und Rab7-YFP ähnlich wie Notch, als kleine Punkte innerhalb des Follikelepithels und der apikalen Follikelzellmembran detektierbar (**s.Abb.23 C,C',D,D',E,E'**). Die Analyse der *tub-Rab5-CFP* und *tub-Rab7-YFP* Expression und der Notch-Rezeptor Verteilung in *lgd^{d7}*-mutanten Follikelzellen zeigt, dass der akkumulierte Notch-Rezeptor mit Rab5-CFP und Rab7-YFP ko-lokalisiert (**s.Abb.23 L,L'**). Das Ergebnis deutet darauf hin, dass der Verlust von *lgd* im Follikelepithel, genau wie in der Flügelimaginalscheibe, zu einer Ansammlung des Notch-Rezeptors in einem späten endosomalen Kompartiment führt.

Es konnte gezeigt werden, dass der zusätzliche Ausfall von *hrs* in *lgd^{d7}*-mutanten Flügelimaginalscheiben zu einer Ansammlung des Notch-Rezeptors in vergrößerten endosomalen Kompartimenten führt, welche deutlicher stärker ist als der Ausfall von *lgd* oder *hrs* allein (unveröffentlichte Daten). Das Ergebnis deutet darauf hin, dass in Bezug auf die endosomalen Morphologie eine synergistische Beziehung zwischen *Lgd* und *Hrs* vorliegt. Um zu überprüfen, ob der zusätzliche Verlust von *hrs* in *lgd^{d7}*-Follikelzellklonen ebenfalls zu einer deutlicheren Ansammlung des Notch-Rezeptors führt und womöglich den Abbaufekt des Notch-Rezeptors verstärkt, wurde die Expression von *tub-Rab5-CFP* und *tub-Rab7-YFP*, sowie die Verteilung des Notch-Rezeptors, in *lgd^{d7},hrs^{D28}*-Doppelmutanten Follikelzellklonen analysiert.

Es konnte bereits zuvor gezeigt werden, dass der Verlust von *hrs* zur Akkumulation des Notch-Rezeptors in einem frühen endosomalen Kompartiment führt (Jekely and Rorth 2003).

Als Kontrolle wurde zunächst die Verteilung von Nextra, Rab5-CFP und Rab7-YFP in *hrs^{D28}*-Follikelzellklone untersucht (**s.Abb.23 K-O,K'-O'**). Ähnlich wie *lgd^{d7}*-Zellen führt der Verlust von *hrs* zur Ansammlung des extrazellulären Notch-Rezeptor-Domäne in vesikelähnlichen Strukturen (**s.Abb.23 L,L',M,M',N,N'**). Allerdings zeigt die Überlagerung, dass die extrazelluläre Notch-Domäne auch mit Rab7-YFP ko-lokalisiert, was auf die Ansammlung in einem späten Endosom hindeutet (**s.Abb.23 O**).

Die Analyse der doppelmutanten *lgd^{d7},hrs^{D28}*-Follikelzellen zeigte, dass genau wie in der Imaginalscheibe, der Ausfall beider Gene zu einer stärkeren Ansammlung des Notch-Rezeptors in Endosomen führt (**s.Abb.23 P-T,P'-T'**). Während der Ausfall von *lgd* nicht in allen Zellen zur Akkumulation des Notch-Rezeptors führt, resultiert der zusätzliche Ausfall von *hrs* in *lgd^{d7}*-Follikelzellen in der Ansammlung von Rezeptoren in nahezu jeder mutanten Zelle, welche sowohl mit Rab5-CFP als auch mit Rab7-YFP ko-lokalisieren

(s.Abb.23 T, T'). Genau wie in den *hrs*^{D28}-Follikelzellen akkumuliert der Notch-Rezeptor in *lgd*^{d7}, *hrs*^{D28}-defizienten Zellen wahrscheinlich in einem späten Endosom.

Bezogen auf die Akkumulation des Notch-Rezeptors bzw. des endosomalen Transport deutet das Ergebnis daraufhin, dass der Verlust beider Gene zu einer verstärkten Ansammlung des Rezeptors in späten Endosomen führt und suggeriert das *Lgd* und *Hrs* eine synergistische Beziehung hinsichtlich der endosomalen Transportes besitzen.

3.2.1.8 Der Verlust der Funktion von Mitgliedern der ESCRT-Komplexe I-III resultiert in einer verstärkten Akkumulation des Notch-Rezeptors

Der Ausfall der Funktion von Mitgliedern der ESCRT-Komplexe ist ebenfalls mit ektopischer Notch-Aktivierung und dem Abbaufekt des Notch-Rezeptors assoziiert (Moberg et al. 2005; Thompson et al. 2005).

Um zu überprüfen, ob der Verlust der ESCRT-0 - ESCRT-III Mitglieder ebenfalls zu einem Abbaufekt des Notch-Rezeptors im Follikel epithel führt und um den möglichen Vesikelphänotyp mit dem in *lgd*^{d7}-mutanten Follikelzellklonen zu vergleichen, wurden *hrs*^{D28}-, *ept*^{P26} und *shrub*⁴⁻¹-mutante Follikelzellklone erzeugt und die Verteilung des Notch Rezeptors, mit Hilfe einer anti-Nextra Antikörperfärbung, in den jeweiligen mutanten Zellen untersucht (s.Abb.24). Die Analyse aller mutanten Follikelzellklone hat gezeigt, dass der Verlust der jeweiligen Genfunktion zur Akkumulation des Notch-Rezeptors in vesikelähnlichen Strukturen führt, welche sich allerdings in ihrer Ausprägungsstärke deutlich unterscheiden. Während der Verlust von *lgd* und *hrs* zu einer relativ schwachen Ansammlung des Notch-Rezeptors und demnach zu einem schwachen Defekt im Abbau des Rezeptors führt, welcher schon im vorherigen Kapitel beschrieben wurde, und nicht in allen defizienten Zellen nachweisbar ist (s.Abb.24 A-H'), bewirkt der Ausfall von *ept* und *shrub* eine Rezeptor-Ansammlung in nahezu jeder mutanten Zelle (s.Abb.24 I-L').

Die Analyse und der Vergleich des Abbaufektes des Notch-Rezeptors in *lgd*^{d7}-, ESCRT-0-, ESCRT-I- und ESCRT-III-mutanten Follikelzellen hat gezeigt, dass bei allen der Ausfall der Genfunktion zu einem Abbaufekt des Notch-Rezeptors führt und dass der Abbau des Notch-Rezeptors bei Verlust von *ept* und *shrub* deutlicher stärker ist als bei *lgd* und *hrs*.

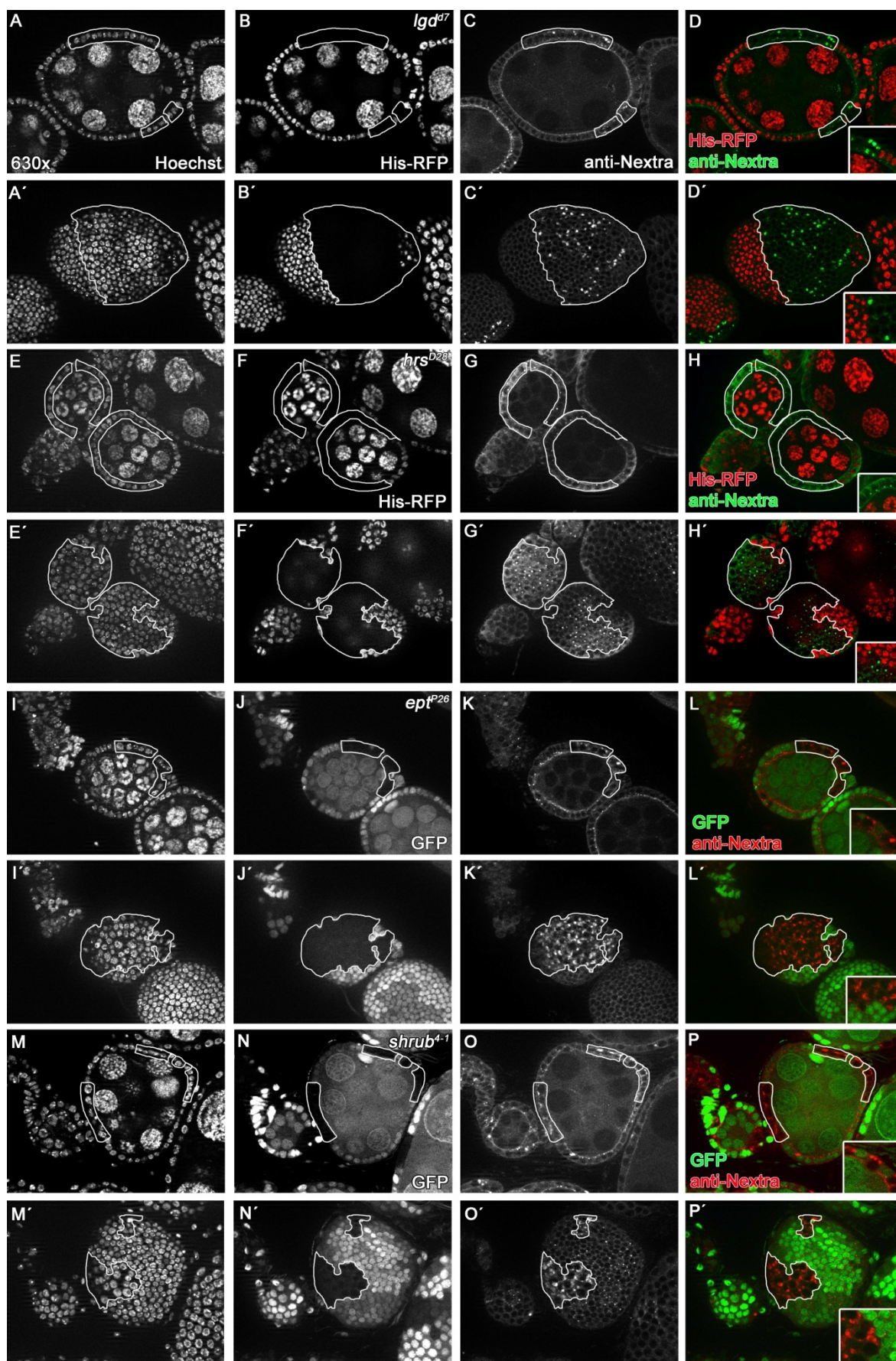


Abb.24: Die Akkumulation der extrazellulären Notch Rezeptor Domäne ist bei Ausfall von *ept* und *shrub* stärker als beim Ausfall von *lgd*

In der Abbildung ist die Akkumulation des extrazellulären Teils der Notch-Rezeptor-Domäne in *lgd^{d7}*-(A-D'), *hrs^{D28}*-(E-H'), *ept^{P26}*-(I-L') und *shrub⁴⁻¹*-(M-P') mutanten Follikelzellklonen mit Hilfe einer anti-Nextra Antikörperfärbung dargestellt. Dargestellt sind annähernd gleichaltrige Eikammer der verschiedenen Genotypen. In der 2. Spalte sind die mutanten Zellen durch die Abwesenheit der Expression der Markergene *GFP* oder *His-RFP* dargestellt. In der 3. Spalte ist die Verteilung der extrazellulären Notch-Rezeptor-Domäne abgebildet, welche in *lgd^{d7}*-(C,C') und in *hrs^{D28}*-(G,G') in vesikelähnlichen Strukturen akkumuliert, aber nicht in allen Zellen nachgewiesen werden kann. Der Vergleich der Akkumulation des Rezeptors mit *ept^{P26}*-(K,K') und *shrub⁴⁻¹*-(O,O') mutanten Follikelzellen zeigt die deutliche Zunahme der Ansammlung der extrazellulären Notch-Rezeptor-Domäne in nahezu jeder defizienten Zelle. Die Überlagerung der mutanten Regionen mit der anti-Nextra-Färbung in der letzten Spalte zeigt, dass der Rezeptor in den mutanten Zellen akkumuliert. In A-P sind optische Querschnitte und in A'-P' Aufsichtsaufnahmen der Eikammern dargestellt.

3.2.1.9 Die Aktivierung von Notch in *lgd^{d7}*-mutanten Follikelzellklonen benötigt, im Gegensatz zu *shrub⁴⁻¹*-mutanten Follikelzellklonen, die Fusion mit dem Lysosomen

Bei der Analyse des Funktionsverlustes von *lgd* in der Flügelimaginalscheibe konnte gezeigt werden, dass der zusätzliche Verlust von *Rab7*, durch Expression eines *UAS-Rab7-RNAi* Konstrukts, zur Unterdrückung der ektopischen Aktivierung von Notch in *lgd^{d7}*-mutanten Flügelimaginalscheiben führt (**unveröffentlichte Daten**).

Da *Rab7* die Fusion später Endosomen mit Lysosomen vermittelt deutet das Ergebnis darauf hin, dass für die ligandenunabhängige Notch-Aktivierung in *lgd^{d7}*-Zellen nur ausgelöst wird, wenn späte Endosomen mit Lysosomen fusionieren (unveröffentlichte Daten). Um zu testen, ob die ektopischLigandenunabhängige Aktivierung von Notch in *lgd^{d7}*- mutanten Follikelzellklonen ebenfalls nur durch Fusion später Endosomen mit Lysosomen ausgelöst wird, wurden mit Hilfe des MARCM-Systems *lgd^{d7}*-mutante Follikelzellklone generiert, in denen zusätzlich das *UAS-Rab7-RNAi* Konstrukt exprimiert wurde, um die Synthese des *Rab7* Proteins zu verringern (**s.Abb.25**).

Um auszuschließen dass die Unterdrückung der *Rab7* Synthese zur Inaktivierung des Notch-Signalweges und zur Unterdrückung der *Hnt*-Expression führt, wurde *UAS-Rab7-RNAi* zunächst in Kontroll-Klonen exprimiert, in denen das *lgd*-Gen funktional ist, (**s.Abb.25 F-J,F'-J'**).

Die Analyse dieser Kontroll-Klone zeigte, dass die *Hnt*-Expression durch die Unterdrückung der *Rab7* Synthese nicht beeinträchtigt war und die zusätzliche anti-*Rab7* Antikörperfärbung bestätigte, durch Abwesenheit *Rab7*-positiver Vesikel, das fehlende *Rab7* Protein (**s.Abb.25 F-J,F'-J'**).

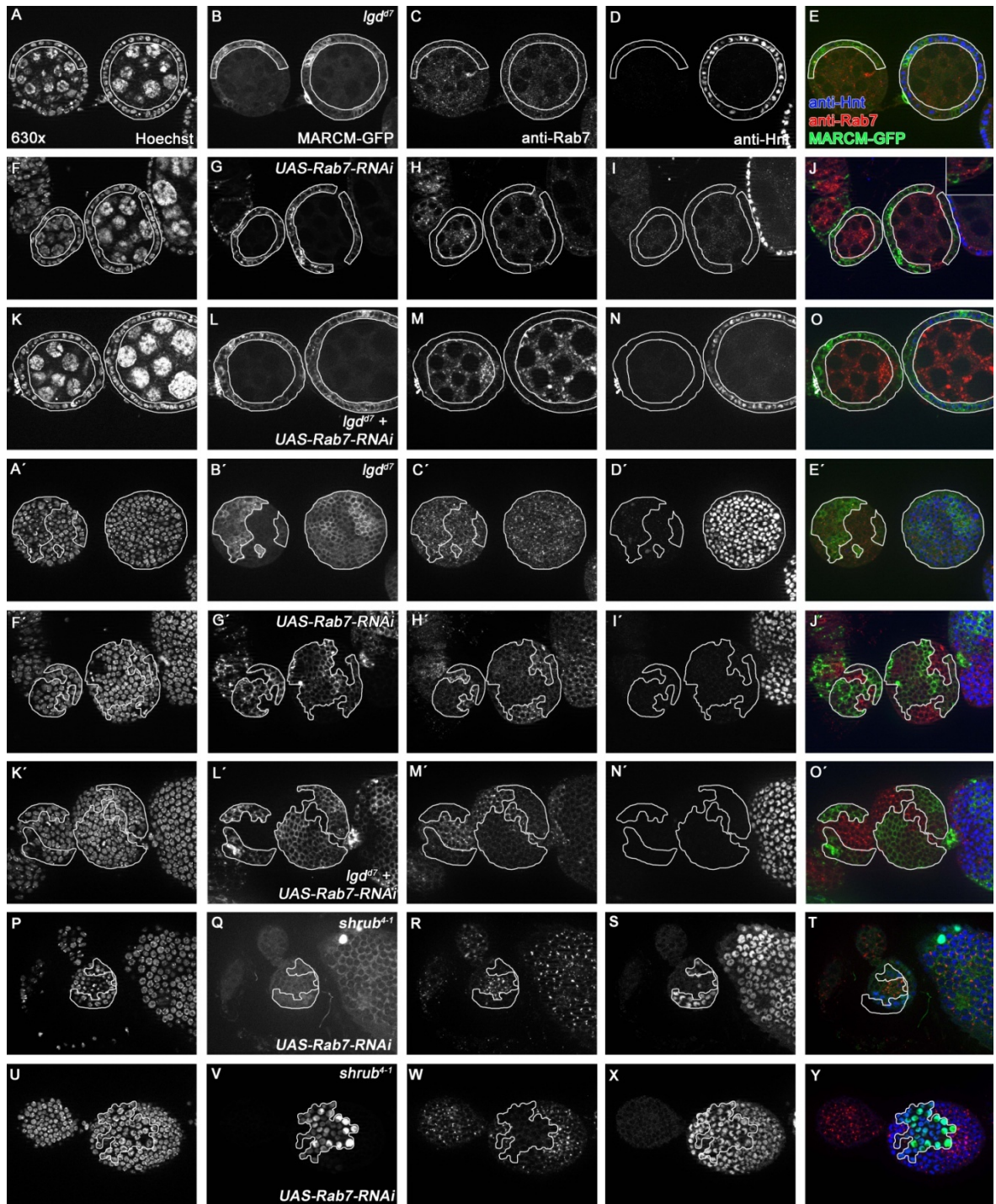


Abb.25: Ligandenunabhängige Aktivierung in *lgd^{d7}*-Zellen benötigt im Gegensatz zu *shrub⁴⁻¹*-Zellen die Fusion später Endosomen mit Lysosomen

Die Graphik demonstriert die Notwendigkeit der Fusion von späten Endosomen mit Lysosomen für die ektopische Notch-Aktivierung in *lgd^{d7}*-mutanten Follikelzellen. Abgebildet sind jeweils Eikammern der Stadien 3-6. Der Ausfall von *lgd* (B,B',E,E') führt zu ektopischen Aktivierung von Notch (D,D',E,E'), die mittels anti-Hnt Antikörperfärbung sichtbar gemacht wurde. Die Verwendung des anti-Rab7-Antikörpers deckt, verglichen mit den wildtypischen Zellen, in den *lgd^{d7}*-Zellen vergrößerte Rab7-positive Vesikel auf (C,C',E,E'). Die Expression von *UAS-Rab7-RNAi* in einem MARCM-Klon (G,G',J,J') führt zur Reduktion der Rab7-Synthese, detektierbar durch das Fehlen von Rab7-positiven Vesikeln (H,H',J,J'), und führt nicht zur Aktivierung des Notch-Signalweg (I,I',J,J'). Dagegen resultiert die Expression von *UAS-Rab7-RNAi*, in einem *lgd^{d7}*-MARCM-Klon (L,L',O,O'), in der Aufhebung der ektopischen Notch-Aktivierung (N,N'). Bestätigt wird die Reduktion der Rab7-Synthese durch die anti-Rab7 Antikörperfärbung (M,M',O,O'). Im

Gegensatz dazu zeigt die Expression von *UAS-Rab7-RNAi* in *shrub⁴⁻¹*-MARCM Follikelzellklonen (Q,V) keine Unterdrückung der Hnt-Expression (S,X).

Die Untersuchung der *lgd^{d7}*-MARCM-Klone mit zusätzlicher *UAS-Rab7-RNAi* Expression zeigte, dass die Unterbindung der Rab7-Proteinsynthese zur Unterdrückung der verfrühten Hnt-Expression führt (**s.Abb.25 K-O,K'-O'**).

Das Ergebnis deutet daraufhin, dass, wie in der Flügelimaginalscheibe, die Fusion mit den Lysosomen benötigt, damit der Notch-Signalweg auf Ligandenunabhängige Weise aktiviert wird.

Um zu klären, ob die ligandenunabhängige Notch-Aktivierung in *shrub⁴⁻¹*-mutanten Follikelzellen ebenfalls von der Fusion später Endosomen mit Lysosomen abhängig ist, wurde *UAS-Rab7-RNAi* in *shrub⁴⁻¹*-MARCM-Klonen exprimiert.

Die Analyse der *shrub⁴⁻¹*-MARCM-Klone, in denen *UAS-Rab7-RNAi* exprimiert wird, zeigt allerdings, dass, im Gegensatz zu *lgd*, die verfrühte Hnt-Expression nicht unterdrückt werden kann (**s.Abb.25 P-Y**).

Mit Hilfe der Rab7-Antikörperfärbung konnte aber gezeigt werden, dass in den mutanten Zellen die Rab7-Synthese runterreguliert ist (**s.Abb.25 R,W**).

Das Ergebnis deutet daraufhin, dass die Unterdrückung der Rab7-Proteinsynthese in *shrub⁴⁻¹*-mutanten Follikelzellen, im Gegensatz zu *lgd^{d7}*-Follikelzellen, die ligandenunabhängige Notch-Aktivierung nicht verhindern kann. Des Weiteren deutet dass Ergebnis darauf hin, dass die ektopischen Aktivierung des Notch-Signalweg in *shrub⁴⁻¹* mutanten Follikelzellen, verglichen mit der in *lgd^{d7}*-Zellen, über einen anderen Mechanismus ausgelöst werden muss.

3.2.2 Die Analyse des Funktionsverlustes von *lgd* in der Keimbahn von *D. melanogaster*

3.2.2.1 Der Verlust von *lgd* in der Keimbahn führt zur Bildung von 32 Keimzellen

Um die Auswirkungen des Funktionsverlustes von *lgd* in der Keimbahn während der Oogenese zu analysieren, wurden mit Hilfe des FLP/FRT-Systems und der dadurch verbundenen mitotischen Rekombination *lgd^{d7}*-mutante Keimbahnklone erzeugt (Theodosiou, 1998).

Zunächst wurden die Effekte auf die Morphologie und auf die Anzahl der Keimzellen studiert, da in einer früheren Veröffentlichung eine Vermehrung der Keimzell-Anzahl beschrieben wurde (Szabad et al. 1991).

Eine wildtypische Eikammer besteht aus 16 Keimzellen (15 Nährzellen und eine Oocyte) (**s.Abb.26 A-C,A'-C'**), während der Verlust der *lgd* Funktion in der Keimbahn in einigen Fällen zu einer Erhöhung der Anzahl der Keimzellen führt (**s.Abb.26 D-F,D'-F'**). Interessanterweise konnte die Bildung zusätzlicher Keimzellen allerdings nicht in allen *lgd^{d7}*-mutanten Eikammern beobachtet werden. Die Kerne der zusätzlichen Keimzellen, innerhalb der *lgd^{d7}*-Keimbahnklone (**s.Abb.26 E'**), sind verglichen mit den Keimzellkernen in vergleichbaren wildtypischen Eikammern (**s.Abb.26 B'**) deutlich kleiner. Dieses Ergebnis bestätigt die Beobachtungen von Szabad et al. (1991) und bekräftigt die Funktion von Lgd bei der Keimbahnentwicklung. Desweiteren deutet das Ergebnis darauf hin, dass der Verlust von *lgd* zu verstärkter Proliferation der Keimzellen führt.

Um zu überprüfen, ob die Anzahl der zusätzlichen Keimzellen in *lgd^{d7}*-mutanten Keimbahnklonen variabel ist, wurde die Anzahl der Keimzellen mit Hilfe von Stapelaufnahmen am Fluoreszenzmikroskop bestimmt. Dabei konnte festgestellt werden, dass in allen Fällen insgesamt 32 Keimzellen vorhanden waren. Bei diesen 32 Zellen konnten 31 große Zellkerne und ein kleiner Zellkern, der am posterioren Ende der Eikammer lokalisiert war, detektiert werden, der wahrscheinlich den Oocytenkern darstellt. Das Ergebnis zeigt, dass es der Verlust der *lgd* Funktion in der Keimbahn zu einer Verdopplung der Anzahl der Keimzellen führt und deutet entweder auf die Fusion von zwei benachbarten Eikammern oder einer zusätzlichen Mitose hin.

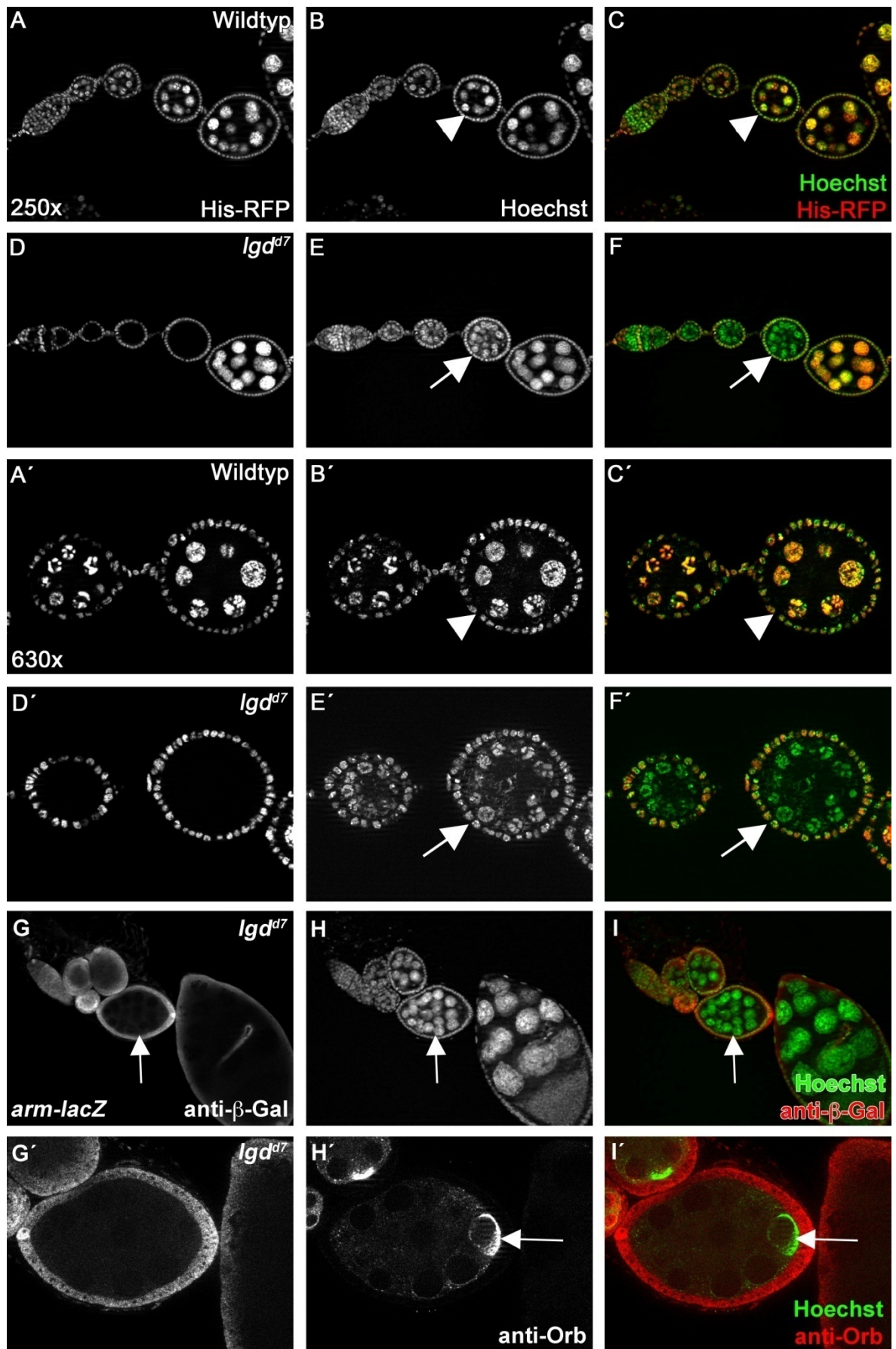


Abb.26: Der Verlust der *lgd* Funktion in der Keimbahn führt in einigen Fällen zur Bildung von 32 Keimzellen, die vermutlich durch eine zusätzliche Mitose gebildet werden

Der Vergleich eines wildtypischen Ovariolschlauchs (A-C) mit einem Ovariolschlauch der *lgd^{d7}*-mutante Keimbahnklone enthält (Howard-Filler and Lindquist), zeigt eine Erhöhung der Anzahl der Keimzellen innerhalb der mutanten Region, welche durch Hoechst-Färbung sichtbar gemacht wurden (B und E). In den Vergrößerungen (A'-F') werden wildtypische Eikammer der Stadien 2/3 und 4/5 (A'-C') mit entsprechenden *lgd^{d7}*-mutanten Eikammern (D'-F') verglichen. Die Hoechst-Färbung in E' zeigt (Pfeil), verglichen mit der in B' (Pfeilkopf) eine Zunahme der Keimzellanzahl im *lgd^{d7}*-mutanten Keimbahnklon, welcher zudem kleinere Zellkerne als die wildtypische Eikammer aufweist (A-C und A'-C') stellen wildtypische Ovariolschläuche bzw. Eikammern dar; D-E und D'-E' stellen Ovariolschläuche bzw. Eikammern mit *lgd^{d7}*-mutanten Keimbahnklonen dar.) In G-I ist ein Ovariolschlauch dargestellt der einen *lgd^{d7}*-Keimbahnklon enthält (G) der zusätzliche Keimzellen aufweist (H), welcher zusätzlich durch einen weißen Pfeil markiert ist (G-I). In der Vergrößerung dieser *lgd^{d7}*-mutanten Eikammer (630x) in G'-I' ist zu erkennen, dass nur eine einzige Zelle am posterioren Ende der Eikammer Orb exprimiert (H').

Die Anwesenheit eines einzigen Oocytenkerns deutet allerdings auf die zusätzliche Mitose hin, weil bei Fusionen von Eikammern häufig zwei Oocytenkerne auftreten. Im Gegensatz zu den Nährzellen ist die Oocyte durch die Expression von Orb gekennzeichnet (Christerson and McKearin 1994; McKearin and Christerson 1994).

Um zu überprüfen, ob die 32 Keimzellen in *lgd^{d7}*-Keimbahnklonen, nur eine Oocyte aufweisen, wurde eine anti-Orb Antikörperfärbung durchgeführt (s.Abb.26 G,G'-I,I').

Die Analyse von *lgd^{d7}*-Keimbahnklonen die 32 Keimzellen beinhalten zeigte, dass immer nur eine Zelle Orb exprimiert (s.Abb.26 H').

Das Ergebnis deutet daraufhin, dass der Verlust von *lgd* in der Keimbahn zu einer zusätzlichen Mitose der Keimzellen führt. Da nicht alle *lgd^{d7}*-mutanten Eikammern vermehrte Keimzellen aufwiesen sollte die Häufigkeit von 32 Keimzellen in insgesamt 500 *lgd^{d7}*-Keimbahnklone hinsichtlich ihres Keimzell-Phänotyps untersucht werden.

Um auszuschließen, dass die Bildung von 32 Keimzellen natürlichen Ursprungs ist oder durch Balancer und nicht durch den Verlust von *lgd* ausgelöst wird, wurden auch 500 Eikammern wildtypischer und Balancer-tragender (MB und DB) Fliegen untersucht. Um zu überprüfen, ob schon der Verlust einer Kopie von *lgd* zu zusätzliche Keimzellen führt, wurden außerdem *lgd^{d7}*-heterozygote Tiere, einmal mit (*lgd^{d7}/CyO^{wglacZ}*) und einmal ohne Balancer (*lgd^{d7}/+*), analysiert.

Die Auswertung der 500 *lgd^{d7}*-Keimbahnklone und der Kontrollen zeigte, dass nur der komplette Ausfall von *lgd* zu einer Verdopplung der Keimzellen führt. Von den 500 ausgezählten *lgd^{d7}*-mutanten Eikammern konnte in 73 Eikammern die doppelte Anzahl an Keimzellen beobachtet werden (s.Tabelle.10).

Das Ergebnis bestätigt, dass der Verlust von *lgd* für die Verdopplung der Anzahl der Keimzellen verantwortlich ist.

Genotyp n=500	16-Keim- zellen:	32-Keim- zellen:	16-Keim- zellen in %:	32-Keim- zellen in %:
Wildtyp	500	0	100	0,00
MB	500	0	100	0,00
DB	500	0	100	0,00
<i>lgd^{d7}</i> / +	500	0	100	0,00
<i>lgd^{d7}</i> -Keimbahnklone	427	73	85,40	14,60
<i>kuz^{ES24}</i> / +	500	0	100	0,00
<i>kuz^{ES24}</i> -Keimbahnklone	500	0	100	0,00
<i>lgd^{d7},kuz^{ES24}</i> / +	500	0	100	0,00
<i>lgd^{d7},kuz^{ES24}</i> -Keimbahnklone	428	72	85,60	14,40
<i>aph1^{D35}</i> / +	500	0	100	0,00
<i>aph1^{D35}</i> -Keimbahnklone	500	0	100	0,00
<i>lgd^{d7},aph1^{D35}</i> / +	500	0	100	0,00
<i>lgd^{d7},aph1^{D35}</i> -Keimbahnklone	404	96	80,80	19,20

Tabelle 10: Prozentualer Vergleich der Anzahl der Keimzellen in verschiedenen Genotypen

Die Tabelle zeigt die Auswertung der Anzahl der Keimzellen verschiedener Genotypen. Es wurden jeweils 500 Eikammern der Stadien S1-S8 analysiert. Als Kontrolle dienen wildtypische Eikammern und Eikammern aus Multi- und Double-Balancer Weibchen (genauer Genotyp in Material und Methoden) und die jeweiligen Allele in Heterozygose, welche alle die wildtypische Anzahl von 16 Keimzellen aufweisen. Dagegen zeigen 14,60 % der untersuchten *lgd^{d7}*-Keimbahnklone, 14,40% der *lgd^{d7},kuz^{ES24}*-Keimbahnklonen und 19,20% der *lgd^{d7},aph1^{D35}*-Keimbahnklone eine Verdopplung der Keimzellanzahl von 16 auf 32.

3.2.2.2 Die Bildung von 32 Keimzellen in *lgd^{d7}*-Keimbahnklonen wird durch einen Notch-unabhängigen Prozess ausgelöst

Die Analyse der Funktion von *lgd* in den Flügelimaginalscheibe und im Follikelepithel zeigt, dass der Verlust von *lgd* mit der ligandenunabhängigen Aktivierung des Notch-Signalweges und Defekten im endosomalen Transportweg assoziiert ist (Klein 2003; Childress et al. 2006; Gallagher and Knoblich 2006; Jaekel and Klein 2006).

Bisher gibt es keine bekannte Funktion des Notch-Signalweges in der Keimbahn und die Notch-Aktivitätsmarker *Gbe+Su(H)-lacZ* oder *-GFP_{nls}* werden ebenfalls nicht in der Keimbahn exprimiert, was darauf hindeutet, dass der Notch-Signalweg für die Keimbahnentwicklung nicht benötigt wird. Diese Tatsache deutet desweiteren darauf hin,

dass die Verdopplung der Anzahl der Keimzellen in *lgd^{d7}*-Keimbahnklonen, nicht durch die Aktivität des Notch-Signalweges ausgelöst. Um zu überprüfen, ob die Bildung zusätzlicher Keimzellen in *lgd^{d7}*-Keimbahnklonen auf Notch-unabhängige Weise verursacht wird, wurden doppelmutante *lgd^{d7},kuz^{ES24}*- und *lgd^{d7},aph-1^{D35}*-Keimbahnklone hinsichtlich ihrer Keimzell-Anzahl analysiert. Um auszuschließen, dass der Verlust von *kuz* oder *aph-1* zu Veränderungen in der Anzahl der Keimzellen führt, wurden zusätzlich *kuz^{ES24}*- und *aph-1^{D35}*-mutante Keimbahnklone untersucht und es konnte gezeigt werden, dass der Ausfall von *kuz* und *aph-1* weder, in einer Verringerung noch in einer Erhöhung der Anzahl der Keimzellen resultiert, was darauf hindeutet, dass der Notch-Signalweg nicht für die Keimbahnentwicklung benötigt wird. Das Resultat deutet ebenfalls darauf hin, dass der Notch-Signalweg nicht bei der Keimbahnentwicklung benötigt wird.

Die Analyse *lgd^{d7},kuz^{ES24}*- und *lgd^{d7},aph-1^{D35}*-mutanter Keimbahnklone zeigt, dass es in beiden Fällen zur Bildung zusätzlicher Keimzellen kommt und eine Auszählung der Keimzellen durch die Stapelaufnahmen am Fluoreszenzmikroskop bestätigt, genau wie bei *lgd^{d7}*-Keimbahnklonen. die Anwesenheit von exakt 32 Keimzellen (**s.Abb.27 B,B',E,E',H,H'**). Der zusätzlicher Verlust von *kuz* oder *aph-1* in *lgd^{d7}*-mutanten Keimbahnklonen scheint also nicht in der Lage ist die Bildung zusätzlicher Keimzellen bzw. die Verdopplung der Anzahl der Keimzellen zu verhindern, was darauf hin deutet, dass die Bildung von 32 Keimzellen durch einen Notch-unabhängigen Prozess ausgelöst wird. Auch die Häufigkeit der 32-Keimzellen in *lgd^{d7},kuz^{ES24}*- (14,40%) und *lgd^{d7},aph-1^{D35}*-mutanter Keimbahnklone (19,20%) ist verglichen mit *lgd^{d7}*-mutanten Keimbahnklonen annähernd gleich. Das Ergebnis verstärkt die Annahme, dass die Bildung zusätzlicher Keimzellen in *lgd^{d7}*-mutanten Keimbahnklonen durch einen Prozess ausgelöst wird, der unabhängig von der Aktivität des Notch-Signalweges ist.

3.2.2.3 Der Verlust von *hrs* kann die Bildung zusätzlicher Keimzellen in *lgd^{d7}*-Keimbahnklonen nicht unterdrücken

Hinsichtlich der Notch-Aktivität konnte gezeigt werden, dass der zusätzliche Verlust des ESCRT-0 Mitglieds *hrs*, zur Unterdrückung der ligandenunabhängigen Aktivierung des Notch-Signalweges führt (Jaekel and Klein 2006). In Bezug auf die endosomale Morphologie zeigte sich eine Verstärkung und es konnten mehr Notch-enthaltende Endosomen detektiert werden.

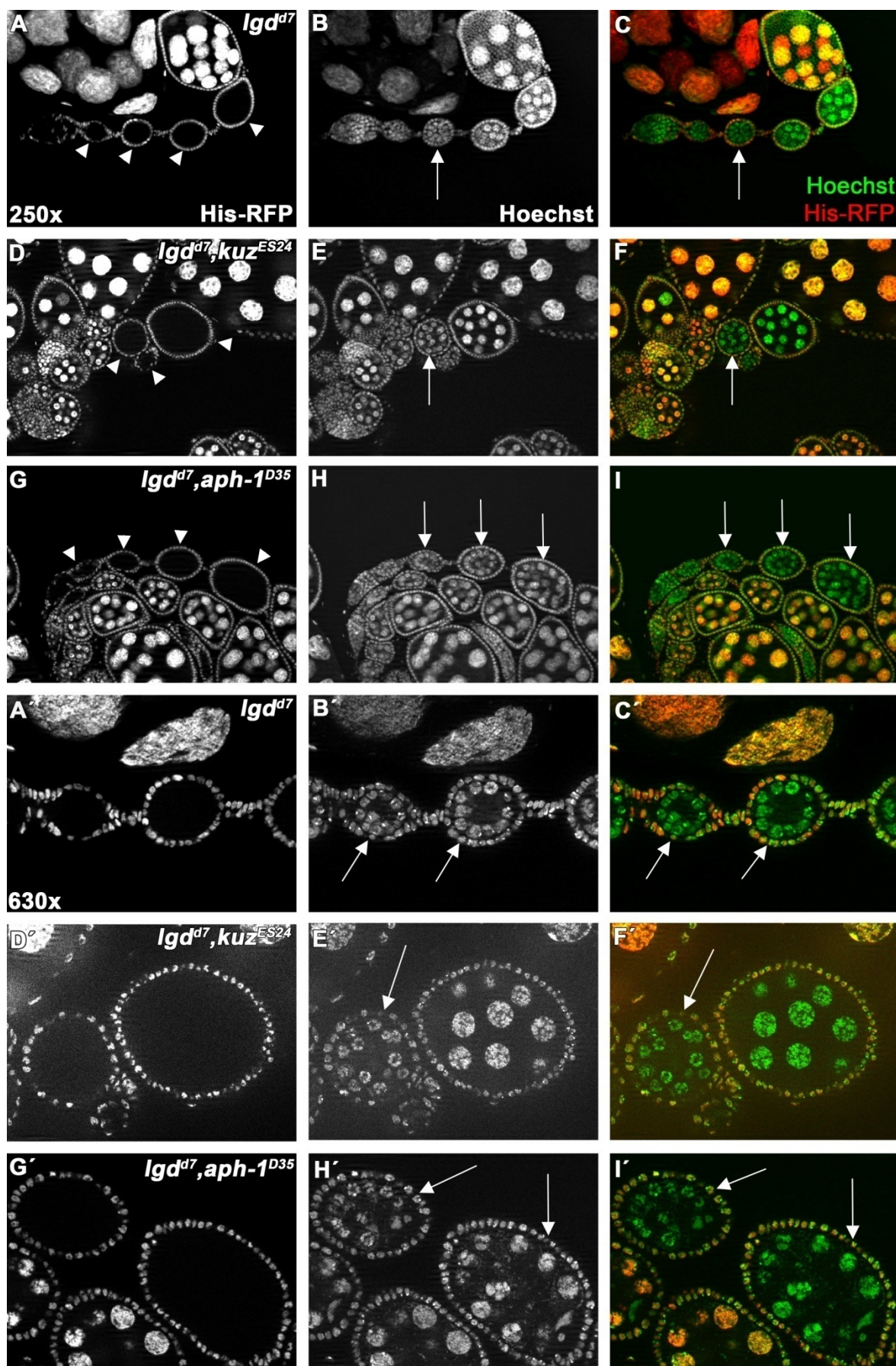


Abb.27: Die Bildung zusätzlicher Keimzellen in *lgd^{d7}*-mutanten Keimbahnklonen ist unabhängig vom Notch-Signalweg

Die Abbildung zeigt Beispiele für *lgd^{d7}*- (A und A'- C und C'), *lgd^{d7},kuz^{ES24}*-(D und D'- F und F') und *lgd^{d7},aph-I^{D35}*-Keimbahnklone (G und G'- I und I'). In der linken Spalte sind die Keimbahnklone durch die Abwesenheit des Markers His-RFP gekennzeichnet (A,D,G,A',D',G'). Die mittlere Spalte zeigt die Kerne der Keimzellen mittels Höchst-Färbung (B,E,H,B',E',H'). In der rechten Spalte ist die Überlagerung von His-RFP mit Höchst dargestellt (C,F,I,C',F',I'). Die Analyse der unterschiedlichen Keimbahnklone zeigt in allen Genotypen in einigen Fällen eine Verdoppelung der Keimzellen, welche durch Pfeile zusätzlich markiert sind (B,E,H,B',E',H' und C,F,I,C',F',I').

Um die Beziehung zwischen *hrs* und *lgd* hinsichtlich der Bildung von 32 Keimzellen zu untersuchen, wurden *lgd^{d7},hrs^{D28}*-doppelmutante Keimbahnklone erzeugt. Um zu überprüfen, ob auch *hrs* eine Funktion bei der Keimbahnentwicklung besitzt wurden außerdem *hrs^{D28}*-mutante Follikelzellklone analysiert und es konnte gezeigt werden, dass der Verlust nicht zur Verdopplung der Anzahl der Keimzellen führt, allerdings konnte in einigen wenigen Fällen eine Verringerung der Anzahl der Keimzellen detektiert werden (**s.Abb.28 H,H',I,I'**). Genau wie beim Verlust von *lgd* ist diese Anzahl nicht variabel und es konnten in allen Fällen genau 8 Keimzellen (7 Nährzellen und eine Oocyte) bestimmt werden. Die Häufigkeit dieser 8 Keimzellen in *hrs^{D28}*-mutanten Keimbahnklone wurde nicht bestimmt. Das Ergebnis deutet darauf hin, dass *hrs*, genau wie *lgd*, eine Funktion in der Keimbahnentwicklung besitzt, aber, im Gegensatz zu *lgd*, die Proliferation der Keimzellen hemmt. Die Analyse *lgd^{d7},hrs^{D28}*-doppelmutante Keimbahnklone zeigt, dass die Verdopplung der Keimzellen in *lgd^{d7}*-Keimbahnklonen durch den zusätzlichen Verlust von *hrs* nicht unterdrückt werden kann und immer noch Eikammern mit 32 Keimzellen nachgewiesen werden können (**s.Abb.28 K,K',L,L'**). Die Anwesenheit von 8 Keimzellen in doppelmutanten *lgd^{d7},hrs^{D28}*-Keimbahnklonen konnte nicht beobachtet werden. Das Ergebnis deutet darauf hin, dass *lgd* und *hrs* beide für die Entwicklung der Keimbahn benötigt werden. Allerdings ist Verlust von *lgd* diesmal in der Lage den *hrs*-Phänotyp zu unterdrücken.

3.2.2.4 Der Ausfall der *lgd*-Funktion in der Keimbahn führt zur Notch-unabhängigen ektopischen Expression des Dpp-Reportergens *Dad-lacZ*

Die Erhöhung der Anzahl der Keimzellen bzw. die Bildung von 32 Keimzellen, konnte bereits bei anderen Mutanten beobachtet werden und wird durch eine zusätzliche fünfte Mitose ausgelöst (Hawkins et al. 1996).

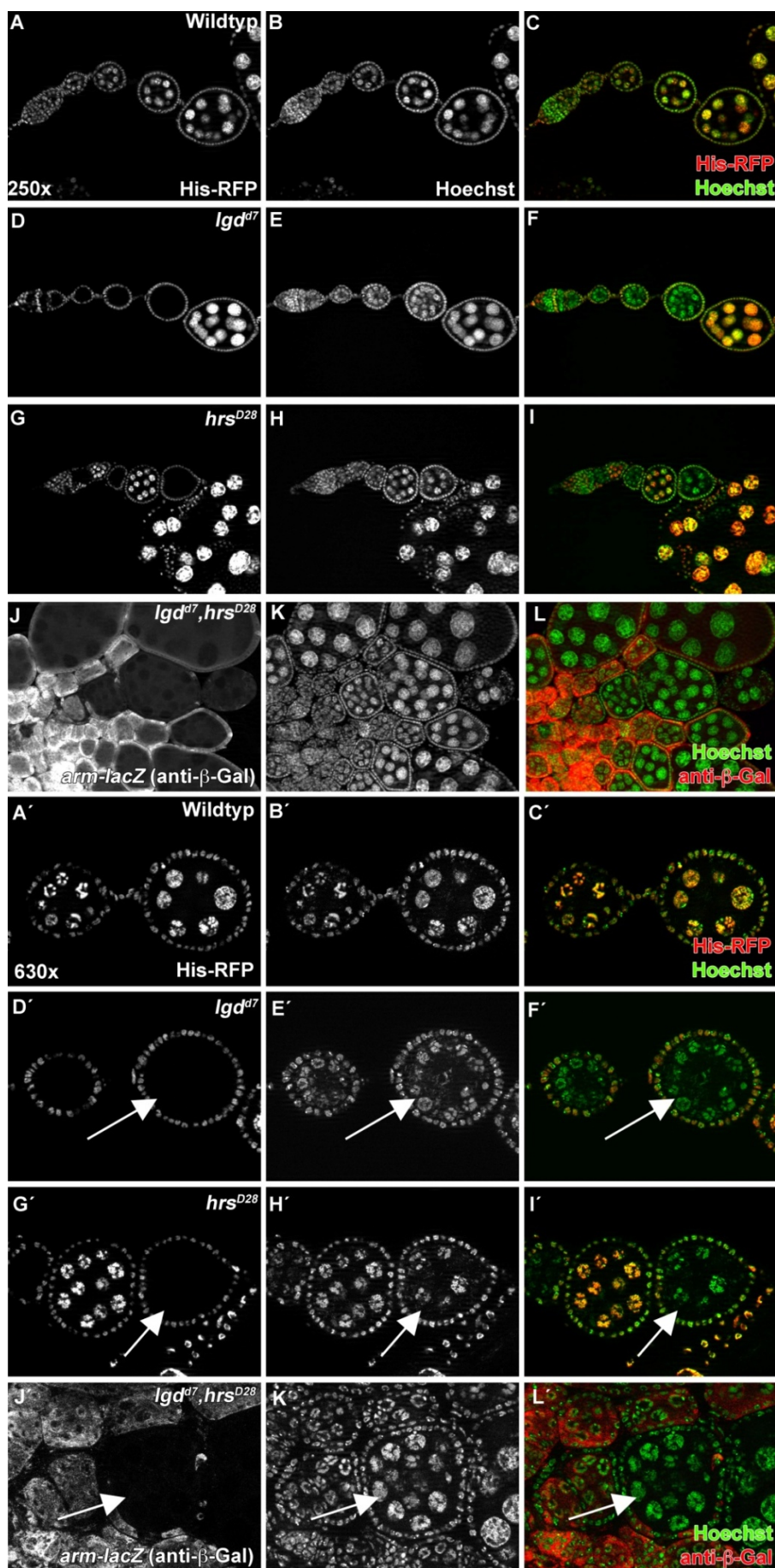


Abb.28: Der Verlust von *hrs* in *lga^{d7}*-Keimbahnklonen kann die Bildung zusätzlicher Keimzellen nicht unterdrücken

Vergleich von *lga^{d7}*- (D,D',E,E',F,F'), *hrs^{D28}*- (G,G',H,H',I,I') und *lga^{d7},hrs^{D28}*-doppelmutanten Keimbahnklonen (J,J',K,K',L,L'). A-L zeigen 250er Übersichtsaufnahmen der jeweiligen Ovariolschläuche und A'-L' zeigen 630er Vergrößerungen von Stadium S2-S5 Eikammern. In der linken Spalte sind die jeweiligen Klone durch Abwesenheit des Markergens His-RFP zu erkennen (A,D,G,J,A',D',G',J'). Die mittlere Spalte zeigt die Höchst-Färbungen der verschiedenen Genotypen (B,E,H,K,B',E',H',K'). Diese zeigen in den 630er Vergrößerungen, dass, verglichen mit dem Wildtyp (B',C'), in *lga^{d7}*-Klonen mehr (32 Keimzellen; E,E'), in *hrs^{D28}*-Klonen weniger (8 Keimzellen; H,H') und in *lga^{d7},hrs^{D28}*-Klonen wiederum mehr Keimzellen (32 Keimzellen; K,K') auftreten. Die rechte Spalte zeigt die Überlagerung des Markergens His-RFP und der Höchstfärbung und zeigt die Anwesenheit von 8 oder 32 Keimzellen in der mutanten Keimbahn.

Es konnte gezeigt werden, dass *bag-of-marbels (bam)* für die Regulation der Cystocysten Teilung und der Differenzierung der Keimbahnstammzell-Töchter benötigt und direkt über den Dpp-Signalweg negativ reguliert wird (McKearin and Spradling 1990; Chen and McKearin 2003).

Um zu überprüfen, ob der Verlust von *lga* in der Keimbahn zu einer Veränderung in der Aktivität des Dpp-Signalweges führt, welche für die Bildung von 32 Keimzellen verantwortlich sein könnte, wurden *lga^{d7}*-Keimbahnklone erzeugt und die Expression des Dpp-Reportergens *Dad-lacZ* untersucht.

Wie schon bei der Analyse von *lga* im Follikelepithel erwähnt, wird *Dad-lacZ* im Wildtyp in den beiden Keimbahnstammzellen und schwach im Cystoblasten exprimiert (Song et al. 2004). Die Analyse *lga^{d7}*-mutanter Keimbahnklone zeigt, dass der Verlust von *lga* zu einer ektopischen Aktivierung des Reportergenkonstruktes *Dad-lacZ* führt. Neben der Expression in den Keimbahnstammzellen wird *Dad* auch in 16-Zell-Cysten und in Stadium S1-S4 Eikammern exprimiert (s.Abb.29 G,G',G''). In Eikammern die 32-Keimzellen besitzen scheint die *Dad*-Expression besonders stark zu sein. Interessanterweise kann, im Gegensatz zur Bildung von 32 Keimzellen eine ektopische *Dad-lacZ* Expression in allen *lga^{d7}*-mutanten Keimbahnklonen nachgewiesen werden.

Das Ergebnis deutet daraufhin, dass der Verlust von *lga* in der Keimbahn zur ektopischen Aktivierung des Dpp-Signalweges führt und diese womöglich für die Bildung zusätzlicher Keimzellen in *lga^{d7}*-Keimbahnklonen verantwortlich ist.

Um auszuschließen, dass es sich bei der ektopischen *Dad-lacZ* Expression in *lga^{d7}*-Keimbahnklonen um eine Notch-abhängige Expression handelt, wurde die *Dad* Expression in *lga^{d7},aph-1^{D35}*-mutanten Keimbahnklonen analysiert.

Um zu überprüfen ob der Verlust von *aph-1* zu Veränderungen in der *Dad*-Expression führt, wurden *aph-1^{D35}*-Keimbahnklone erzeugt und es konnte gezeigt werden, dass *Dad-lacZ* nicht ektopisch exprimiert wird (s.Abb.30 F,F',G,G',H,H').

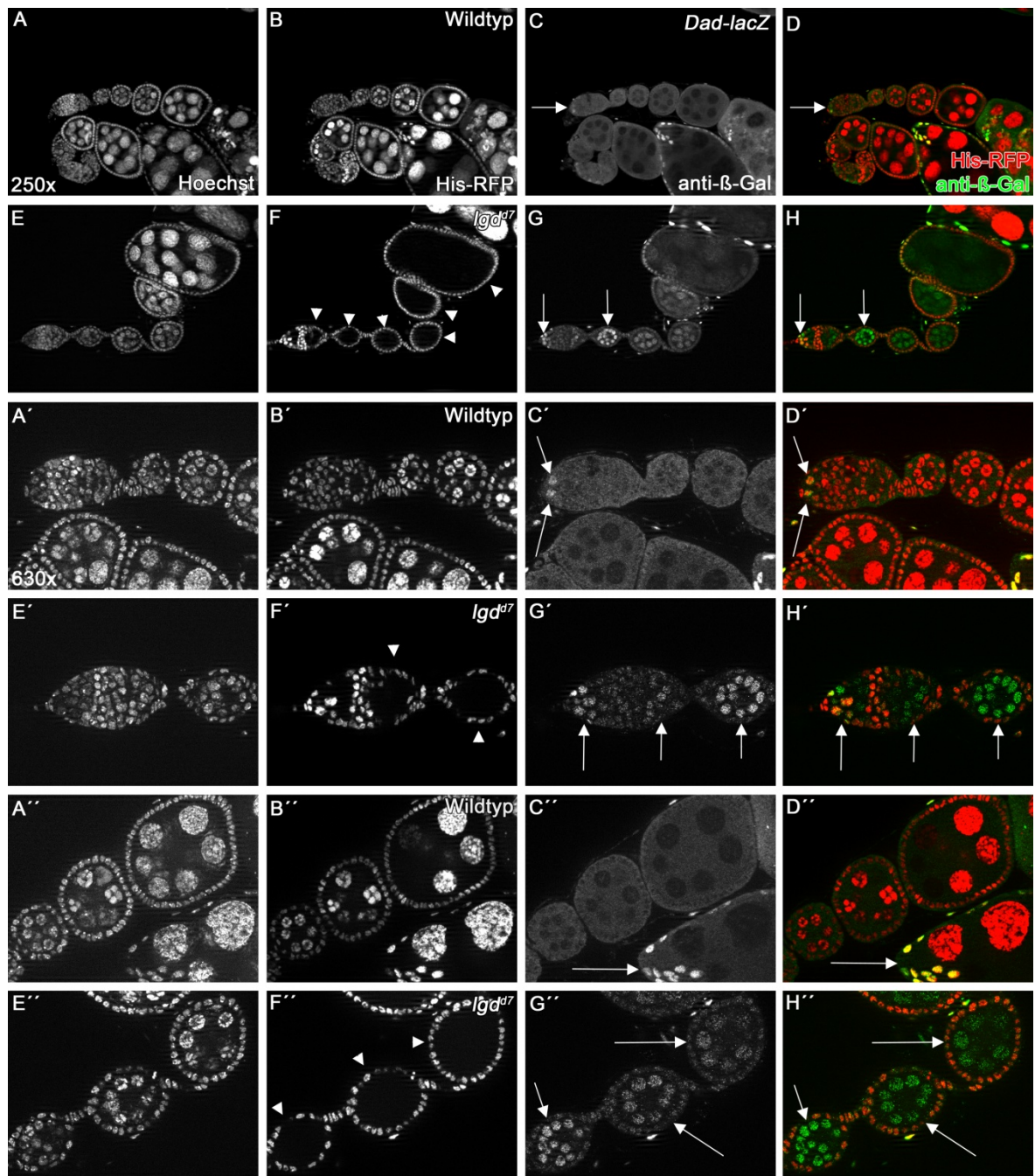


Abb.29: Der Verlust von *lgd* führt zu ektoptischen Expression des Dpp-Reportergens *Dad-lacZ* in der Keimbahn von *Drosophila*

In der hier dargestellten Graphik wird die wildtypische Expression von *Dad-lacZ* (C,C',C'') mit der in *lgd^{d7}*-Keimbahnklonen (G,G',G'') der frühen Oogenese verglichen. In der ersten Spalte sind die jeweiligen Höchst-Färbungen des Wildtyps (A,A',A'') und der *lgd^{d7}*-Keimbahnklone (E,E',E'') dargestellt. In der zweiten Spalte ist die Expression des Markergens *RFP* im Wildtyp (B,B',B'') und die Abwesenheit der Expression in *lgd^{d7}*-Keimbahnklonen (F,F',F'') zu sehen. In C und C' ist die wildtypische *Dad*-Expression in den Keimbahnstammzellen und in C'' das Fehlen des Expression zu erkennen. Im Vergleich dazu ist in den *lgd^{d7}*-Keimbahnklonen eine ektoptische *Dad*-Expression innerhalb des Germariums und auch in Stadium 1 Eikammern und älteren Eikammern zu erkennen (G,G',G'').

Die Analyse *lgd^{d7},aph-1^{D35}*- mutanten Keimbahnklonen zeigt, dass der zusätzliche Verlust von *aph-1* nicht in der Lage ist die ektoptische *Dad*-Expression in *lgd^{d7}*-mutanten

Keimbahnklonen zu unterdrücken. Genau wie in den *lgd^{d7}*-Keimbahnklonen ist die Expression von *Dad-lacZ* in 16-Zell-Cysten und in Eikammern der Stadien S1-S4 detektierbar und besonders stark in *lgd^{d7},aph-1^{D35}*-Klonen die über 32 Keimzellen verfügen (**s.Abb.30 J,J',K,K',L,L'**).

Zusammengefasst weist das Ergebnis darauf hin, dass die ektopische *Dad*-Expression in *lgd^{d7}*-mutanten Keimbahnklonen auf Notch-unabhängige Weise ausgelöst wird und dass der Verlust von *lgd* möglicherweise zur ektopischen Aktivierung des Dpp-Signalweges führt, welche eine zusätzliche fünfte Mitose verursacht.

3.2.2.5 Der Verlust der Funktion von *lgd* in der Keimbahn führt zu einem Defekt im endosomalen Transport und zur Akkumulation von Delta und der extrazellulären Notch-Rezeptor-Domäne in Endosomen

Der Verlust von *lgd* in Imaginalscheiben und im Follikelepithel ist mit einem Defekt im endosomalen Transport und der Akkumulation des Notch-Rezeptors assoziiert (Jackel and Klein 2006). Um zu überprüfen, ob der Verlust von *lgd* innerhalb der Keimbahn ebenfalls zu einem Defekt im endosomalen Transportweg führt und ob der Abbau des Notch-Rezeptors beeinträchtigt ist, wurden *lgd^{d7}*-Keimbahnklone erzeugt und die Expression der endosomalen Marker *tub-Rab5-CFP* und *tub-Rab7-YFP* sowie die subzelluläre Verteilung des Notch-Rezeptors untersucht. In wildtypischen Eikammern sind Rab5 und Rab7 in der Keimbahn als größere Punkte nachweisbar und der Notch-Rezeptor, kann mittels anti-Nextra Antikörperfärbung an der apikalen Follikelmembran detektiert werden (**s.Abb.31**). Die Analyse der *lgd^{d7}*-Keimbahnklone zeigt, dass der Verlust von *lgd* in der Keimbahn, zu einer Ansammlung großer Rab5-, Rab7- und anti-Nextra-positiver Strukturen unterschiedlicher Größe führt (**s.Abb.31**). Diese Strukturen sind in nahezu allen Follikelstadien nachweisbar und sind, im Gegensatz zur Bildung der 32 Keimzellen, in *lgd^{d7}*-Keimbahnklonen immer detektierbar. Am auffälligsten sind Vesikel-ähnliche Strukturen, welche positiv markiert sind für Rab5 bzw. Rab7 und die Anwesenheit der extrazellulären Notch-Rezeptor-Domäne zeigen. Während Rab5 und Rab7 in den unterschiedlichen Strukturen ko-lokalisieren, ist Nextra in diesen nicht immer sichtbar und kann zudem aufgrund der Ko-Lokalisierung von Rab5, Rab7 und Nextra weder einem frühen noch einem späten Endosom zugeordnet werden (**s.Abb.31**).

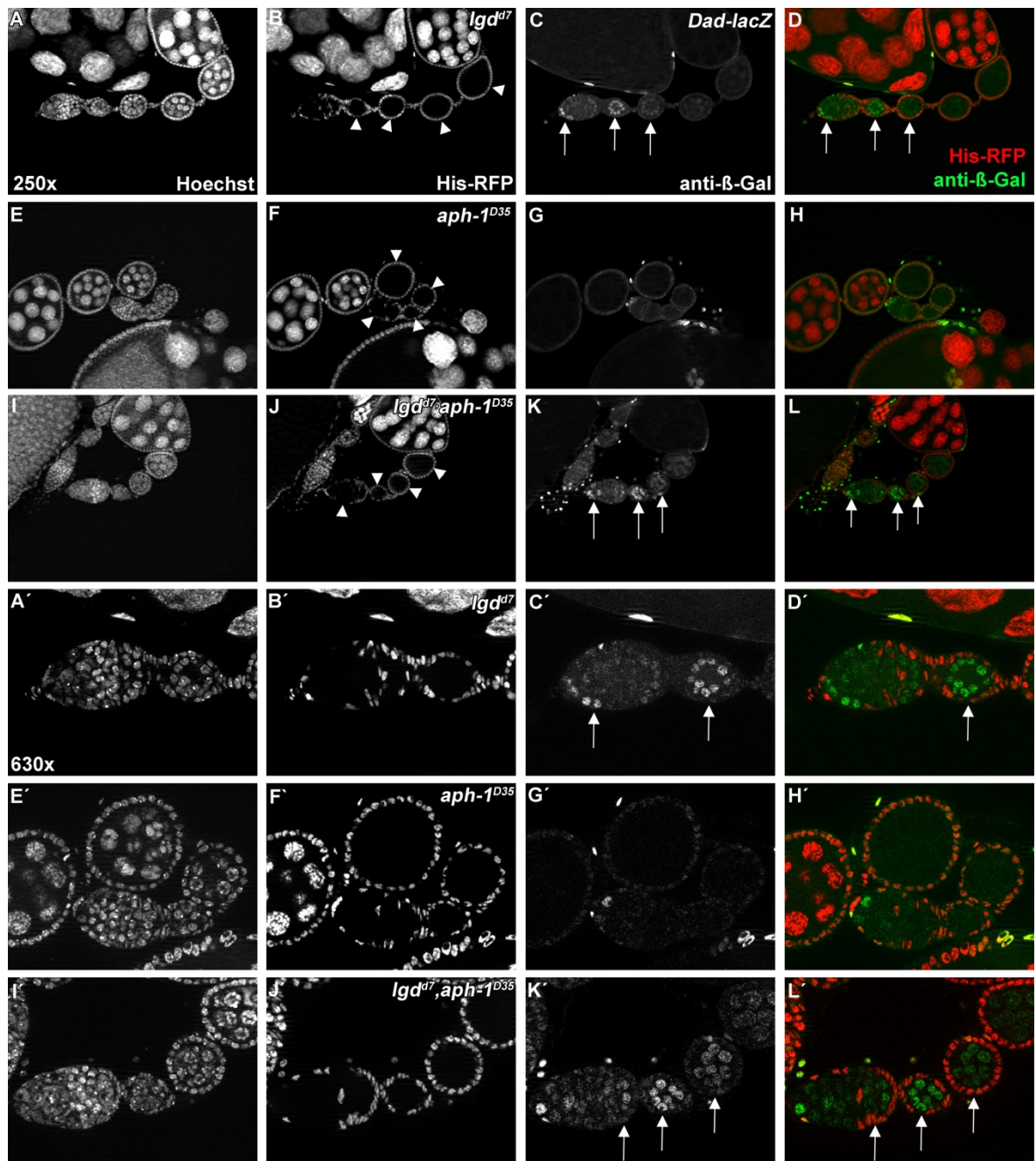


Abb.30: Die ektopische *Dad-lacZ* Expression in *lgd^{d7}*-mutanten Keimbahnklonen ist Notch-unabhängig. Die Graphik zeigt die *Dad-lacZ* Expression in *lgd^{d7}*- (A,A'-D,D') und *aph-1^{D35}*- (E,E'-H,H'), sowie in *lgd^{d7},aph-1^{D35}*-Keimbahnklonen (I,I'-L,L'). Die mutanten Bereiche sind durch die Abwesenheit der Expression des Markergens *His-RFP* und durch Pfeilköpfe (B,F,J) zu erkennen. In einem *lgd^{d7}*-mutanten Ovariolschlauch (A-D) und in der Vergrößerung des Germariums und einer S1-Eikammer (A'-D') ist die ektopische *Dad-lacZ* Expression in der mutanten Keimbahn zu erkennen und durch Pfeile hervorgehoben. Dagegen zeigt ein *aph-1^{D35}*-mutanter Ovariolschlauch (E-H) und die Vergrößerung des Germariums und folgender Eikammern (E'-H') nur die wildtypische *Dad-lacZ* Expression in den Keimbahnstammzellen. Die *lgd^{d7},aph-1^{D35}*-mutante Keimbahnklone wiederum zeigen die ektopische Expression von *Dad-lacZ* (I-L), hervorgehoben in der Vergrößerung des Germariums und nachfolgender Eikammern (I'-L').

Zusammengefasst bestätigt das Ergebnis, dass der *lgd*-Ausfall zu einem Defekt im endosomalen Transport führt und zur Akkumulation der extrazellulären Notch-Rezeptor-Domäne in Endosomen.

Interessanterweise ist die Ansammlung des Notch-Rezeptors, im Gegensatz zum Ausfall von *lgd* in Flügelimaginalscheiben und dem Follikelepithel, nicht mit der Ligandenunabhängigen Aktivierung des Notch-Signalweges assoziiert.

Um zu überprüfen, ob es sich bei der Ansammlung von Notch in Endosomen nur um die extrazelluläre Domäne des Notch-Rezeptors oder um den full-length Notch-Rezeptor handelt, wurde die Verteilung der extrazellulären Domäne mit Notch-YFP und die der intrazellulären mit einer anti-Nintra Antikörperfärbung in *lgd^{d7}*-Keimbahnklonen untersucht.

Wie schon zuvor erwähnt befinden sich Notch-YFP und Nintra vorwiegend an der apikalen Follikelmembran und sind als kleine Punkte innerhalb des Epithels sichtbar (**s.Abb.32 B,B',C,C,D,D'**). Im Gegensatz dazu zeigt die Analyse der *lgd^{d7}*-mutante Keimbahnklone, dass ähnlich wie bei der anti-Nextra Antikörperfärbung, Notch-YFP in unterschiedlichen Strukturen akkumuliert (**s.Abb.32 F,G,H**), aber keine Akkumulation der intrazellulären Notch-Rezeptor-Domäne und Ko-Lokalisierung mit der extrazellulären Domäne sichtbar ist (**s.Abb.32 F',G',H'**). Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse, dass der Verlust von *lgd* in der Keimbahn, im Gegensatz zu Flügelimaginalscheiben und dem Follikelepithel, nur zur Akkumulation der extrazellulären Notch-Rezeptor-Domäne und nicht des gesamten Rezeptors führt. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass der Notch-Rezeptor an der apikalen Follikelmembran geschnitten wurde und der Abbau der extrazellulären Rezeptor-Domäne, durch den Verlust von *lgd* in der Keimbahn, gestört ist.

Bei wildtypischen Eikammern ist Delta, genau wie der Notch-Rezeptor, an der apikalen Follikelmembran lokalisiert und zusätzlich in der Keimbahn an den Grenzen der Nährzellen (**s.Abb.32 B'',C'',D''**). Die Analyse der *lgd^{d7}*-mutanter Keimbahnklone zeigt, dass Delta ebenfalls in der Keimbahn akkumuliert und zusammen mit der extrazellulären Domäne des Notch Rezeptors in den unterschiedlich großen Strukturen ko-lokalisiert (**s.Abb.32 F'',G'',H''**). Desweiteren weist die Anwesenheit des extrazellulären Rezeptors darauf hin, dass es sich um den Teil des Rezeptors handelt, der nach der Notch-Signalisierung in die Signal-sendende Zell, in diesem Fall die Keimbahn, durch *trans*-Endozytose aufgenommen wird (Klug and Muskavitch 1999).

Um zu überprüfen, ob es sich bei dem extrazellulären Notch-Rezeptor um den trans-endozytierte Teil handelt, wurde die Verteilung von Notch-YFP zusammen mit der des Notch-Liganden Delta in *lgd^{d7}*-Keimbahnklonen untersucht, welcher zusammen mit der extrazellulären Rezeptor-Domäne assoziiert sein sollte.

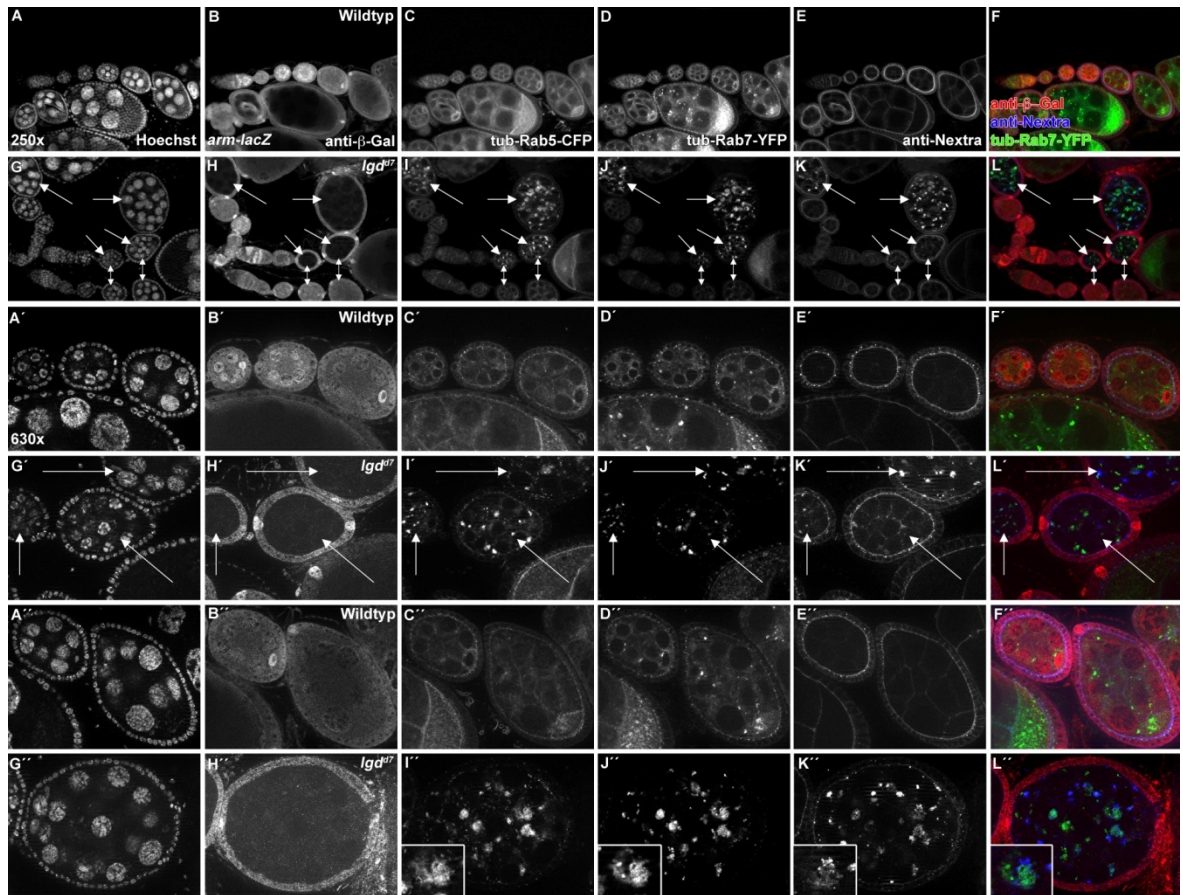


Abb.31: Der Verlust der *lgd* Funktion in der Keimbahn führt zu einem starken Defekt im endosomalen Transport

Die Graphik zeigt die Expression von tub-Rab5-CFP, tub-Rab7-YFP und die Verteilung der extrazellulären Notch-Domäne in einem wildtypischen Ovariolschlauch (A,A',A''-F,F',F'') und eine Ovariolschlauch mit *lgd^{d7}*-mutanten Keimbahnklonen (G,G',G''-L,L',L''), welche durch die Abwesenheit der Expression des Markergens lacZ gekennzeichnet sind (H,H',H''). Verglichen mit dem wildtypischen Ovariolschlauch findet eine starke Akkumulation Rab5-(I,I',I''), Rab7-(J,J',J'') und Nextra-(K,K',K'') positiver Strukturen unterschiedlicher Größe statt. Die Akkumulation von Nextra ist in Einhämmern der Stadien S2-S5 geringer (K') als in den folgenden Stadien ab S6 (K''). Außerdem ist der Defekt im endosomalen Transport mit der Bildung von 32 Keimzellen assoziiert. Dargestellt durch die Pfeile in G und H.

Dabei konnten weder Strukturen detektiert werden die nur Delta noch Strukturen die nur die extrazelluläre Notch-Rezeptor-Domäne aufwiesen. Das Ergebnis zeigt, dass der Verlust von *lgd* in der Keimbahn ebenfalls zur Akkumulation des Notch-Liganden Delta führt und weist darauf hin, dass der Abbau des Liganden genau wie der des extrazellulären Teils des Notch-Rezeptors gestört ist. Zusammengefasst weist die Ko-Lokalisierung der extrazellulären Notch-Rezeptor-Domäne mit dem Notch-Liganden Delta und die fehlende Ansammlung der intrazellulären Notch-Domäne darauf hin, dass der trans-endozytierte Nextra/Delta Komplex in Endosomen akkumuliert und dessen Abbau durch den Verlust von *lgd* in der Keimbahn gestört ist.

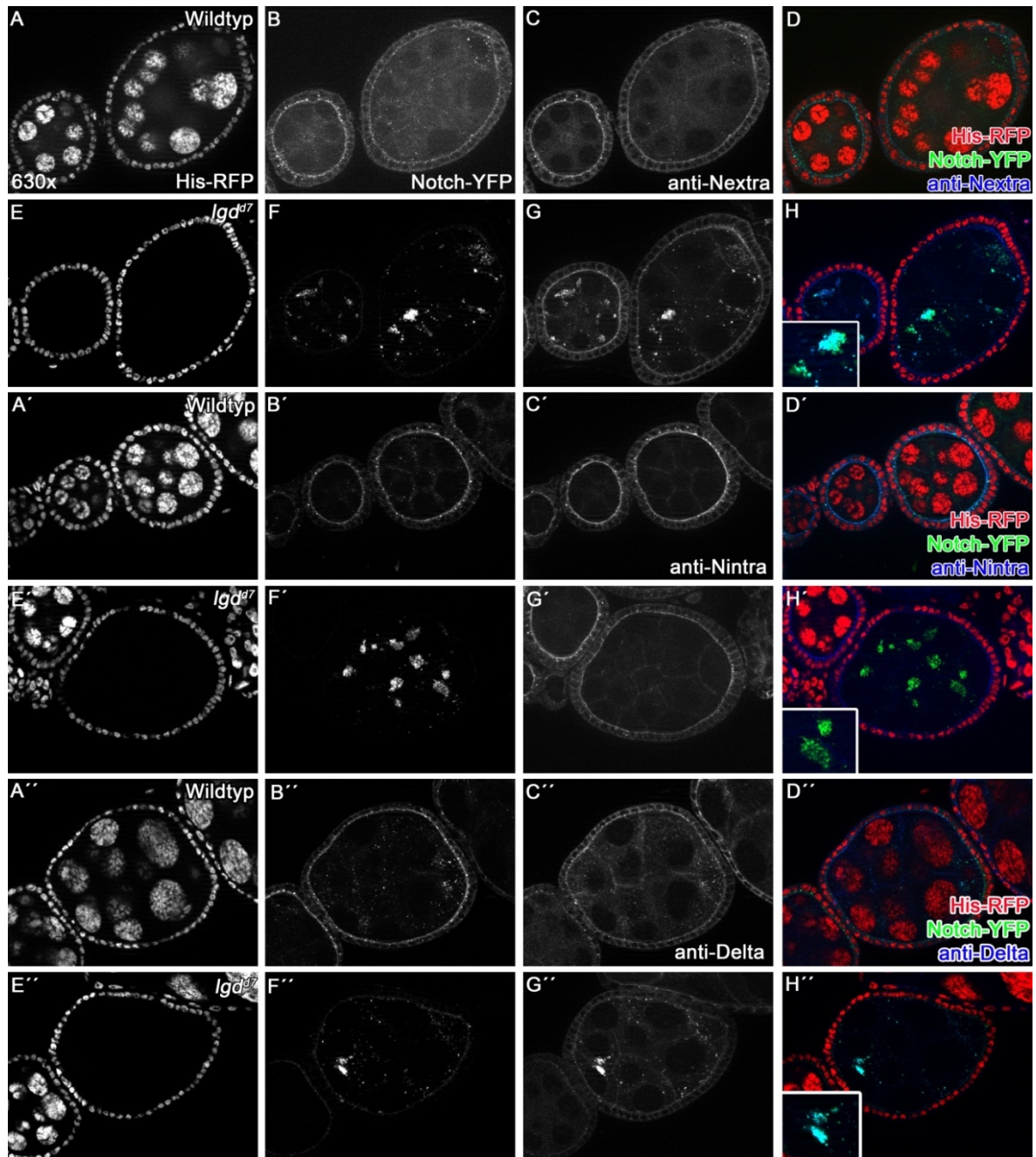


Abb.32: Der Verlust von *lgd* in der Keimbahn führt zum Abbaufekt der extrazellulären Notch-Rezeptordomäne und des Notch-Liganden Delta

Die Graphik zeigt die subzelluläre Verteilung des Notch-Rezeptors und des Liganden Delta in wildtypischen und *lgd^{d7}*-mutanten Eikammern. Mit Hilfe der Protein-Trap-Linie Notch-YFP (B,D) und der anti-Nextra-Antikörperfärbung (C,D) kann die extrazelluläre Domäne des Notch-Rezeptors in kleinen Punkten innerhalb des Follikelepithels, an der apikalen Follikelmembran und innerhalb der Keimbahn in einer wildtypischen Eikammer detektiert werden. Dagegen zeigt sich in *lgd^{d7}*-mutanten Eikammern (E), die Ansammlung der extrazellulären Rezeptor-Domäne in Vesikel-ähnlichen Strukturen und großen Klustern (F,G,H). Die intrazelluläre Notch-Rezeptor-Domäne, mittels anti-Nintra-Antikörperfärbung sichtbar gemacht (C',D'), ist im Wildtyp nur an der apikalen Membran und in Punkten im Follikelepithel nachweisbar. Die gleichzeitige Verwendung von Notch-YFP und anti-Nintra in *lgd^{d7}*-Keimbahnklonen zeigt, dass nur die extrazelluläre Domäne des Notch-Rezeptors akkumuliert (F',H') und nicht die intrazelluläre (G',H'). Der Notch Ligand Delta, durch anti-Delta-Färbung detektiert (C'',D''), ist in wildtypischen Eikammern ebenfalls in Punkten an der apikalen Membran, im Follikelepithel und in der Keimbahn lokalisiert. Die gleichzeitige Verwendung von Notch-YFP und anti-Delta in *lgd^{d7}*-Keimbahnklonen zeigt, dass Delta ebenfalls in Vesikel-ähnlichen Strukturen und Kluster akkumuliert und mit der extrazellulären Notch-Rezeptor-Domäne ko-lokalisiert.

3.3 Die Analyse der Determination der sensorischen Vorläuferzellen im peripheren Nervensystem der Flügelimaginalscheibe bei *Drosophila melanogaster*

3.3.1 Die Aktivität des Notch Signalweges im Verhältnis zur proneuralen Aktivität und zu den SOPs

Um die Determination der sensorischen Vorläuferzellen (SOP, sensory organ precursor) im PNS zu überprüfen und die Rolle der lateralen Inhibition bei diesem Prozess genauer zu untersuchen, wurde zum Einen die Expression des Notch-Aktivitätsmarkers *Gbe+Su(H)-lacZ* (Furriols and Bray 2001) zusammen mit dem SOP-Marker Hindsight (Hnt) (Kaspar et al. 2008; Buffin and Ghosh 2010), und zum Anderen die Expression von *Gbe+Su(H)-GFP_{nls}* zusammen mit der des proneuralen Markers *sca-lacZ* (Baker et al. 1990; Mlodzik et al. 1990; Ellis et al. 1994) und Hnt untersucht (**s.Abb.33 und 34**). Aufgrund der Tatsache, dass SOPs zu unterschiedlichen Zeitpunkten in der larvalen und puppalen Entwicklung determiniert werden (Huang et al. 1991), wurden Flügelimaginalscheiben des 3. Larvenstadiums (3LS) bis 1h nach Puppenbildung (1h APF) analysiert. Der Zink-Finger-Transkriptionsfaktor Hnt, welcher durch das Gen *pebbled* (Pebody et al.) kodiert wird (Kaspar et al. 2008; Buffin and Ghosh 2010), wird nur innerhalb der SOPs exprimiert, welche die Determination abgeschlossen haben und kann deshalb als SOP-Marker fungieren. Die Expression des proneuralen Markers *sca-lacZ* zeigt sich in vielen Zellen des proneuralen Klusters, allerdings mit stärkster Expression in den SOPs oder den Zellen die später zu SOPs determiniert werden (**s.Abb.33 B,B',F,F'**). Während Hnt nur in determinierten SOPs exprimiert wird (**s.Abb.33 C,C',G,G'**), zeigt die *sca*-Expression schon vordeterminierte SOPs. Bei dem Gen *scabrous* (*sca*), welches für ein sekretierendes dimeres Glycoprotein kodiert, handelt es sich um das Zielgen der proneuralen bHLH (basic Helix-Loop-Helix)-Proteine Achaete (Ac) und Scute (Sc) (Lee et al. 1996). Aus diesem Grund kann das Reportergenkonstrukt *sca-lacZ* als Marker der proneuralen Aktivität innerhalb der Flügelimaginalscheibe verwendet werden.

Die proneuralen Kluster, die mit *sca-lacZ* und einer anti- β -Gal Antikörperfärbung sichtbar gemacht werden, liegen in Bereichen mit schwacher *Gbe+Su(H)-GFP_{nls}* Expression bzw. Notch-Aktivität (**s.Abb.33 D,D',H,H'**).

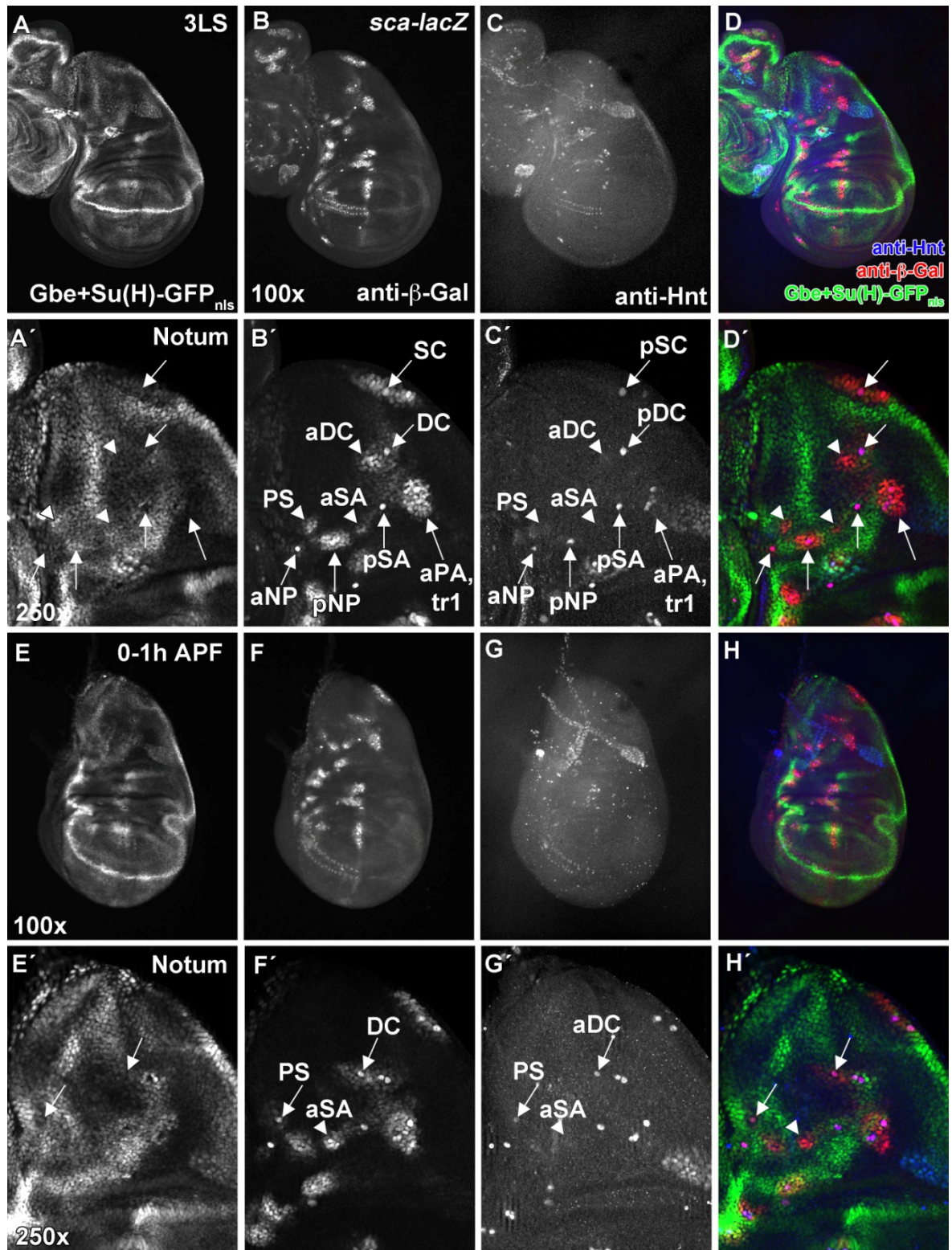


Abb.33: Darstellung der *Gbe+Su(H)-GFP_{nls}*, *sca-lacZ* und der *Hnt*-Expression in der Flügelimaginalscheibe

Die Graphik zeigt eine Flügelimaginalscheibe des späten dritten Larvenstadiums (A,A'-E,E') und eine Flügelimaginalscheibe 0-1h nach der Puppenbildung (F,F'-J,J'). In den 250x Vergrößerungen des Notums (A'-E' und F'-J') sind die Positionen der proneuralen Cluster bzw. der SOPs innerhalb des komplexen *Gbe+Su(H)-GFP_{nls}* Musters dargestellt und durch Pfeile bzw. Pfeilköpfe zusätzlich hervorgehoben. Die Pfeile und die Abkürzungen in C' zeigen die Position des proneuralen Cluster. Die entsprechenden SOPs sind in D' mit Hilfe der Pfeile markiert. Die Pfeilköpfe in C' und D' verweisen auf proneuralen Cluster in denen noch keine SOP determiniert wurde (aDC, PS, aSA). Die Pfeile in B' zeigen die Position der

proneuralen Kluster innerhalb des *Gbe+Su(H)-GFP_{nl}* Expressionsmusters und verdeutlichen, dass sich die proneuralen Kluster in Regionen mit geringer Notch-Aktivität befinden. Die Pfeile in H' und I' zeigen, dass in einer Flügelimaginalscheibe 0-1h nach der Verpuppung die PS und die aDC SOP im Gegensatz zur aSA (Pfeilkopf) determiniert sind.

Die Expression des Notch-Aktivitätsmarkers *Gbe+Su(H)-lacZ/GFP_{nl}* innerhalb der gesamten Flügelimaginalscheibe ist sehr komplex und beinhaltet sowohl starke als auch schwache Domänen (**s.Abb.33 A,A',E,E' und s.Abb.34 B,F**).

Beschränkt auf das Notum der Flügelscheibe, finden sich streifenähnliche Domänen der Notch-Aktivität, die durch schwächere Expression des Reporters voneinander getrennt sind (**s.Abb.34 B,F**). Desweiteren ist ein Halo der *Gbe+Su(H)-lacZ* Expression um einige SOPs zu erkennen (**s.Abb.34 B,B',F,F'**). Dieser Halo deutet auf die laterale Inhibition hin und ist primär in den Nachbarzellen der SOPs detektierbar (**s.Abb.34 B',F'**) (Simpson 1990). Interessanterweise zeigt sich nicht um alle determinierten SOPs ein Halo der *Gbe+Su(H)-lacZ*-Expression. Um zu überprüfen ob die Kränze um die determinierten SOPs mit der SOP-Entwicklung in Zusammenhang stehen, wurde die Expression des Konstrukts *Gbe+Su(H)-lacZ* in *sc^{10.1}* mutanten Flügelimaginalscheiben untersucht (**s.Abb.35**) (Culí and Modolell 1998). Die Mutante ist durch den Verlust der Genfunktion von *achaete* (*ac*) und *scute* (*sc*) und den Verlust aller SOPs gekennzeichnet.

Die Analyse der *Gbe+Su(H)-lacZ*-Expression in *sc^{10.1}*-mutanten Imaginalscheiben zeigt, dass die Kränze verschwinden und nur noch Streifen-ähnlichen Expressionsdomänen detektierbar sind (**s.Abb.35 F,F'**). Das Ergebnis deutet daraufhin, dass die Kränze der *Gbe+Su(H)-lacZ* Expression in Zusammenhang mit der SOP-Entwicklung stehen. Wie bereits oben erwähnt weist der Halo daraufhin, dass die determinierte SOP ein Notch-vermittelndes Signal sendet, welches von den direkten Nachbarzellen empfangen wird, wie es bei dem Modell der lateralen Inhibition erwartet wird.

Um zu testen, ob der Notch-Signalweg für den Selektionsprozess der SOP benötigt wird, wurde das *Gbe+Su(H)-lacZ* Expressionsmuster für die beiden SOPs des DC-Klusters genauer untersucht (**s.Abb.35 B',C',F',G'**). Das Cluster ist für diese Analyse besonders geeignet weil sich die beiden SOPs zu unterschiedlichen Zeiten entwickeln, was mit Hilfe der anti-Hnt Antikörperfärbung nachgewiesen werden kann. Während die pDC im mittleren bis späten larvalen Stadium determiniert wird, erscheint die aDC erst bei der Verpuppung bis 1h nach Puppenbildung (**s.Abb.34 G'**).

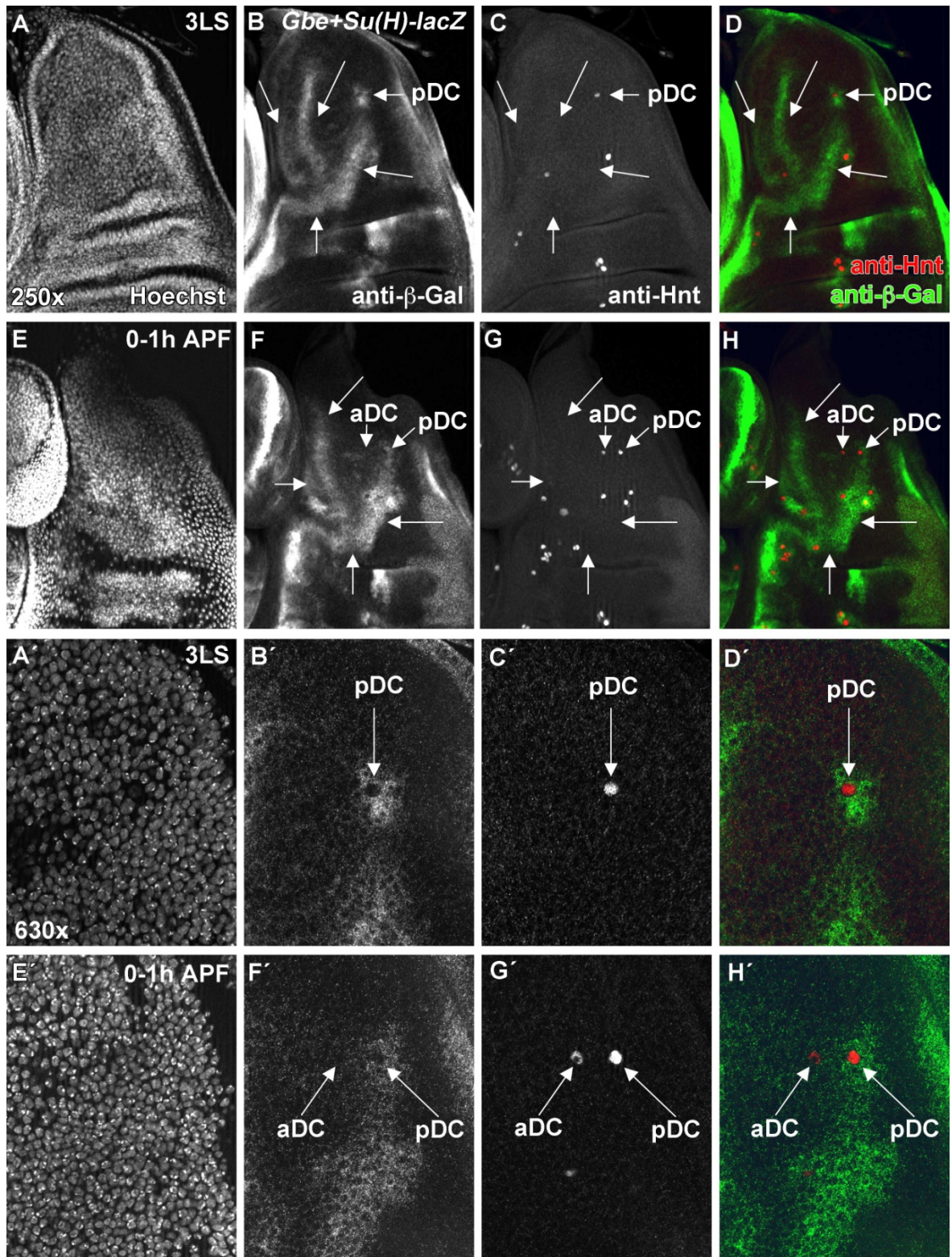


Abb.34: Streifen und Halos der Expression von *Gbe+Su(H)-lacZ* Expression in wildtypischen Imaginalscheiben

Die Graphik zeigt das komplexe Muster der *Gbe+Su(H)-lacZ* Expression und der *hnt*-Expression im Notum einer Flügelimaginalscheibe des späten dritten Larvenstadiums (3LS) und in einer 0-1h nach der Verpuppung (0-1h APF). Dargestellt sind nur die 250x Vergrößerungen des Notums (A-H) und die 630x Vergrößerung der DC Region (A'-H'). Die Pfeile in den 250x Vergrößerungen in B und F deuten auf die streifenähnliche *Gbe+Su(H)-lacZ* Expression hin. Außerdem ist in der 3LS Imaginalscheibe die Region der pDC SOP mit einem Pfeil markiert (B,C,D) und in der 0-1hAPF Imaginalscheibe zusätzlich zur pDC noch die aDC SOP (F,G,H). Die 630x Vergrößerungen der Flügelimaginalscheibe des 3LS (A'-D') zeigt, dass die pDC SOP

(C') durch einen Halo der *Gbe+Su(H)-lacZ* Expression (B') umgeben ist (D'). Dagegen weist die aDC (G') in einer 0-1h APF alten Flügelimaginalscheibe (E'-H') keinen Halo der *Gbe+Su(H)-lacZ* (F') Expression auf (H').

Während die pDC von einem Halo der *Gbe+Su(H)-lacZ* Expression umgeben ist, findet sich bei der aDC kein Halo und es ist auch nur eine sehr schwache oder gar keine Expression des Notch-Markers detektierbar (**s.Abb.34 F',G'**). Weder während, noch 1h nach der Determination der aDC ist eine Veränderung in der *lacZ*-Expression bzw. der β -Gal Antikörperfärbung zu erkennen (**s.Abb.34 F'**). Das Ergebnis deutet daraufhin, dass der Notch-Signalweg nicht für den Selektionsprozess der SOPs benötigt wird.

Wie bereits zuvor erwähnt ist das *Gbe+Su(H)-lacZ* Expressionsmuster bzw. die Notch-Aktivität innerhalb des Notums der Flügelimaginalscheibe sehr komplex und es beinhaltet einigen Domänen die nicht mit der SOP-Selektion in Verbindung stehen. Dieses komplexe Expressionsmuster zeigt, dass der Notch-Signalweg unterschiedliche Funktionen einnimmt, verkompliziert allerdings somit die Analyse der SOP-Determination.

Um dieses Problem zu umgehen, wurde die Mutante *mind bomb1* (*mib1*) verwendet. Mind bomb1 (Mib1) ist eine E3-Ubiquitin-Ligase, welche durch die Ubiquitinierung der Notch-Liganden Delta und Serrate den Notch-Signalweg reguliert (Lai et al. 2005; Le Borgne et al. 2005).

Der Verlust der *mib1*-Genfunktion führt zu Defekten bzw. zum Ausfall Notch-abhängiger Prozesse innerhalb der Flügelimaginalscheibe. Außerdem kommt es zur Bildung einiger ektopischer Macrochaeten (Lai et al. 2005). Die SOP-Bildung in den *mib1* mutanten Scheiben (*mib1²/mib1³*) scheint nicht beeinträchtigt zu sein, aber es scheint, dass SOPs zu einem frühen Zeitpunkt determiniert werden und, verglichen mit wildtypischen SOPs, vorzeitig asymmetrisch teilen. So finden sich schon in Scheiben des späten 3. Larvenstadium SOPs an Positionen, welche im Wildtyp erst im Puppenstadium auftreten, z.B. die SOPs PS und aSA. Die Bildung der ektopischen SOPs in den *mib1*-mutanten erscheint allerdings später, nach Erscheinen der wildtypischen SOPs zu beginnen.

In wildtypischen Imaginalscheiben wird *Gbe+Su(H)-lacZ* in vier Streifen-ähnlichen Domänen exprimiert, in den beschriebenen Halos um die SOPs und in einer diffusen schwachen Expression zwischen einigen Domänen (**s.Abb.36 B,B'**).

Die Analyse dieser Expression in *mib1*-Mutanten Flügelimaginalscheiben zeigte, dass die Streifen abgeschwächt oder verschwunden sind (**s.Abb.36 F,F',J,J'**). Dagegen sind die Halos um die SOPs durch den Verlust von *mib1* nicht beeinträchtigt und können immer noch detektiert werden (**s.Abb.36 F,F',J,J'**).

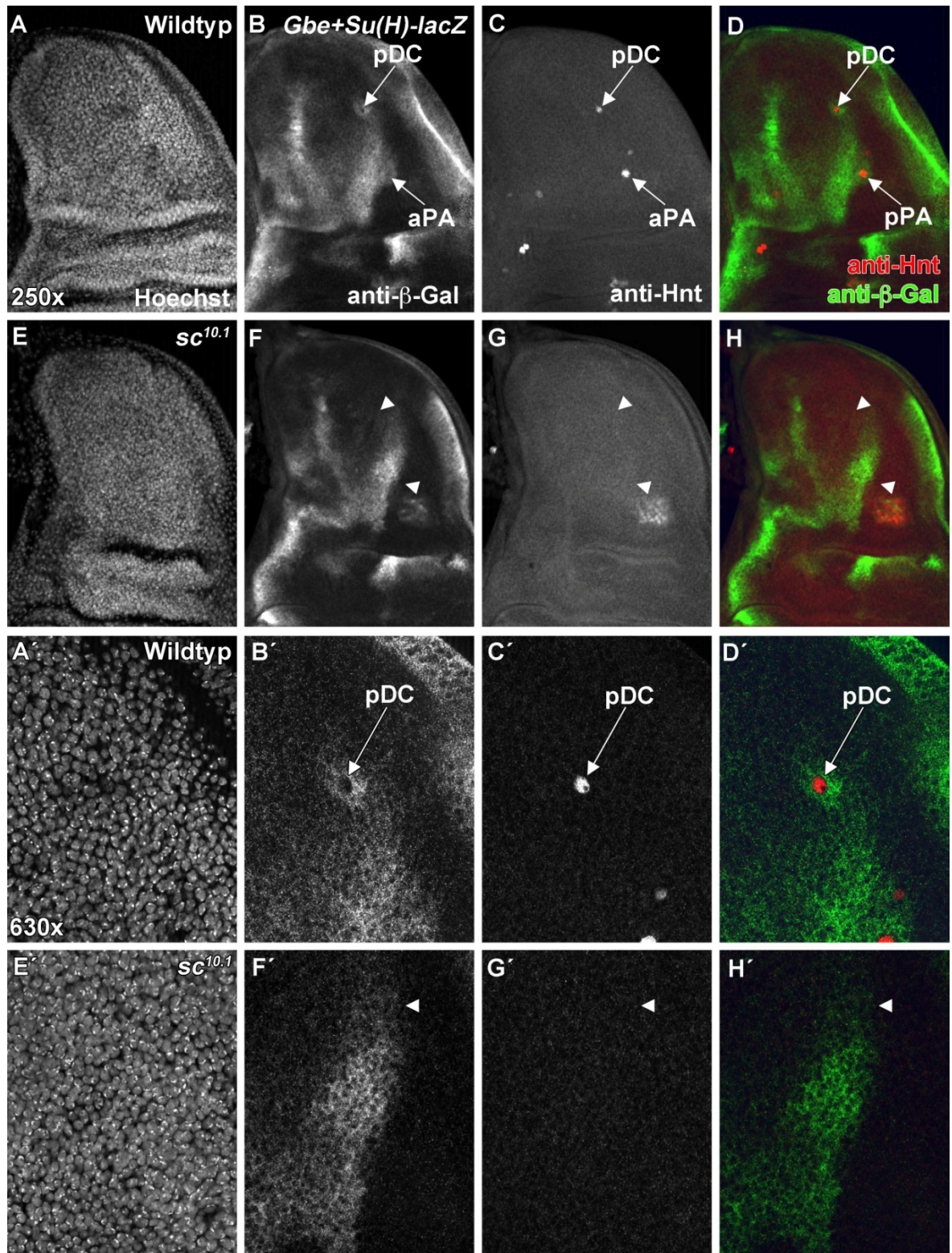


Abb.35: Der Verlust der *achaete/scute* Funktion führt zum Verschwinden der Kränze der *Gbe+Su(H)-lacZ* Expression

Die Graphik zeigt die Expression von *Gbe+Su(H)-lacZ* und Hnt in einer wildtypischen (A,A',A''-D,D',D'') und einer *sc^{10.1}*-mutanten Flügelimaginalscheibe (E,E',E''-H,H',H''). In A-H sind die 250x Vergrößerungen des Notums der Flügelimaginalscheiben abgebildet, welche sich morphologisch (A,E) und anhand des *Gbe+Su(H)-lacZ* Expressionsmusters (B,F) nicht voneinander unterscheiden. Allerdings ist in der *sc^{10.1}*-mutanten Scheibe (E-H), verglichen mit der wildtypischen, keine Hnt-Expression mehr detektierbar (G). Exemplarisch sind im Wildtyp (B-D) die pDC und die aPA SOP durch Pfeile hervorgehoben. In einer *sc^{10.1}*-mutanten Flügelimaginalscheibe sind diese und andere SOPs mehr detektierbar (G). Die vermeindliche

Position der pDC und der aPA sind durch Pfeilköpfe dargestellt (F-H). Die 630x Vergrößerungen der pDC in der wildtypischen Scheibe (A'-D') zeigt, dass die pDC (C') durch einen Halo der *Gbe+Su(H)-lacZ*-Expression (B') umgeben ist (D'). Die 630x Vergrößerung dieser Position in einer *sc^{10.1}*-mutanten Imaginalscheibe zeigt, dass der Halo der *Gbe+Su(H)-lacZ* Expression (F') genau wie die pDC SOP (G'), nicht mehr vorhanden ist.

Das Notch-Signal der Halos ist 1-2 Zelldurchmesser und nur in wenigen Fällen 3 um die SOPs herum zu erkennen (**s.Abb.36 F,J'**). Das Ergebnis deutet darauf hin, dass die laterale Inhibition nach der Determination der SOPs auftritt.

3.3.2 Die Verteilung von Serrate und Delta relativ zur Notch- und zur proneuralen Aktivität im Notum

Um die Verteilung der Notch Liganden im Verhältnis zur Notch Aktivität zu überprüfen, wurde die Expression von Delta und Serrate, mittels anti-Delta- und anti-Serrate-Antikörperfärbungen, relativ zur Expression von *sca-* und *Gbe+Su(H)-lacZ* verglichen (**s.Abb.37**).

Der Vergleich der DI-Expression mit der von *Gbe+Su(H)-lacZ* zeigt, dass die Bereiche mit starker DI-Expression nicht mit denen starker Notch-Aktivität korrelieren (**s.Abb.37 B,C,D**). Es scheint, dass schwache DI-Expression mit hoher Notch-Aktivität übereinstimmt (**s.Abb.37 D**). In den Regionen, in denen sich proneurale Cluster befinden, scheint die DI-Expression konstant zu sein mit Ausnahme des aPA/tr1-Klusters, in dem die Expression nicht detektierbar zu sein (**s.Abb.37 F,G,H**). An den Positionen an denen die SOPs noch nicht determiniert sind, konnte keine Veränderung in der Expression bzw. der Verteilung des Delta Proteins kenntlich gemacht werden (**s.Abb.37**). Bei der Betrachtung der Ser-Expression dagegen zeigte sich, dass hohe Ser-Expression deutlicher, wenn auch nicht vollständig, mit der hohen Notch-Aktivität korreliert (**s.Abb.37 J,K,L**) und verdeutlicht, dass die beiden Bereiche mit hoher Ser und hoher DI Expression sich nur teilweise überlagern (**s.Abb.37 C,K**). Ähnlich wie bei der DI-Expression findet sich auch bei der von Ser nur sehr schwache oder gar keine Expression im aPA/tr1-Kluster (**s.Abb.37 N,O,P**).

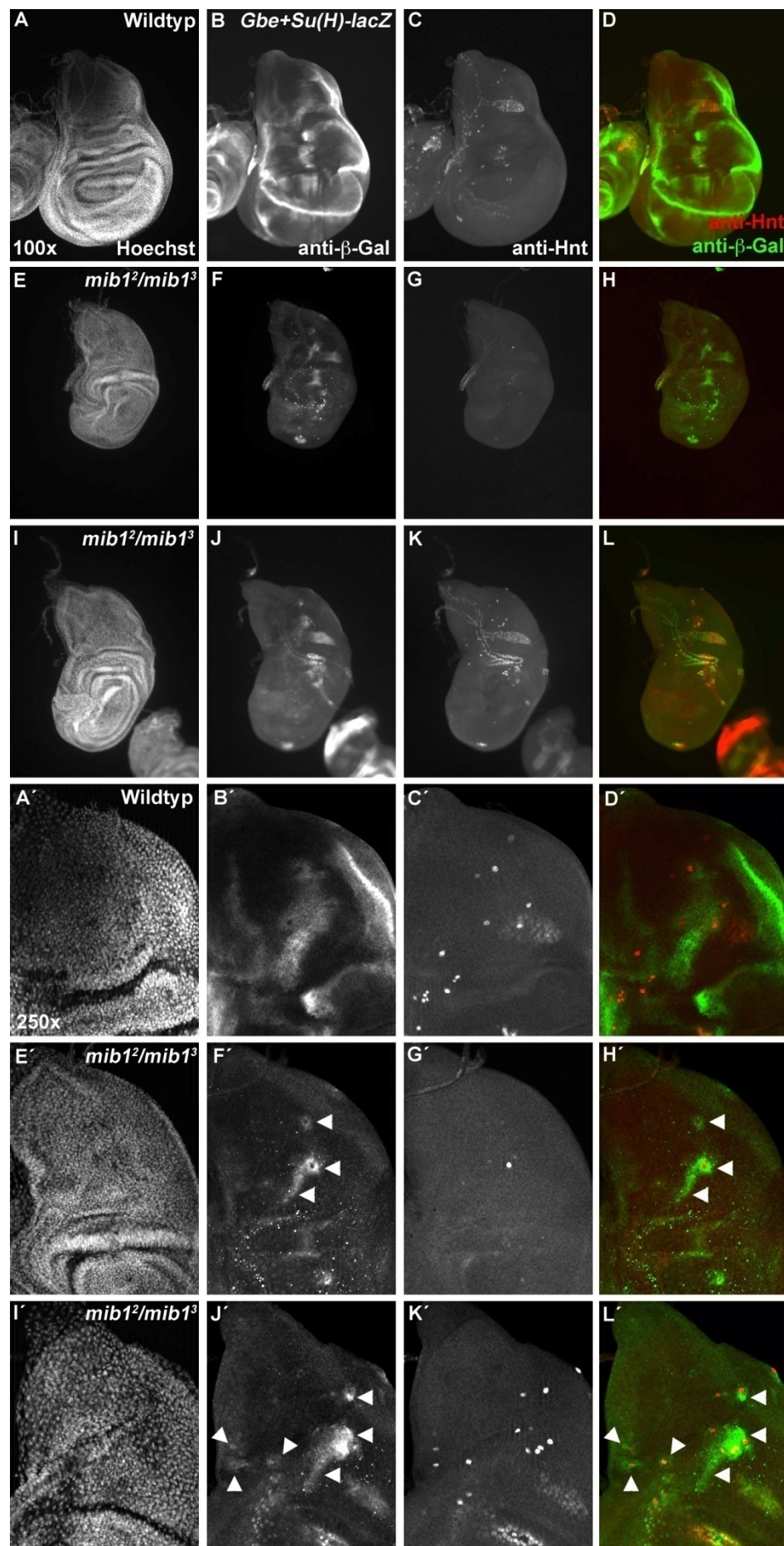


Abb.36: Die laterale Inhibition tritt nach der SOP-Determination auf

Die Graphik zeigt die *Gbe+Su(H)-lacZ* und Hnt Expression in einer wildtypischen (A,A'-D,D') und zwei *mind bomb 1* (*mib1²/mib1³*) mutanten Flügelimaginalscheiben (E,E'-L,L') unterschiedlichen Alters. Während wildtypische Imaginalscheiben das komplexe Muster der *Gbe+Su(H)-lacZ* Expression mit den Streifen-ähnlichen Domänen und den Kränzen um die SOPs aufweisen (B,B'), zeigen *mib1*-mutante Flügelimaginalscheiben nur noch die Expression um die SOPs herum und einen abgeschwächten Streifen in der Nähe des aPA-Klusters (F,F'). Während in der jüngeren *mib1*-mutanten Imaginalscheibe hauptsächlich Expression um das DC und das aPA-Kluster vorliegt (F'), zeigt die ältere *mib1*-mutanten Imaginalscheibe auch Expression von *Gbe+Su(H)-lacZ* um andere SOPs herum (J').

3.3.3 Die Notch-Aktivierung im Notum der Flügelimaginalscheibe durch die Liganden Delta (Dl) und Serrate (Ser)

Um zu klären welcher Ligand für die Notch-Aktivität bzw. für die Expression von *Gbe+Su(H)-lacZ* im Notum der Flügelimaginalscheibe verantwortlich ist, wurden klonale Analysen von *Dl^{revF10}*, von *Ser^{RX82}* und von der Doppelmutanten *Dl^{revF10},Ser^{RX82}* durchgeführt.

Der Ausfall beider Gene, durch Verwendung der Doppelmutanten *Dl^{revF10},Ser^{RX82}*, führt zur erwarteten starken Reduktion der Expression der Reportergenkonstrukte *Gbe+Su(H)-lacZ* innerhalb der mutanten Zellen, was die Reduktion der Notch-Aktivität verdeutlicht (**s.Abb.38**). Allerdings ist innerhalb der mutanten Zellen an den Klon-Grenzen eine Hochregulation der *Gbe+Su(H)-lacZ-Expression* zu erkennen, welche darauf hindeutet, dass die sogenannte *cis*-Inhibition in den mutanten Zellen aufgelöst wurde (Becam et al. 2010). Des Weiteren führt der gleichzeitige Verlust der beiden Liganden zur Bildung zahlreicher ektopischer SOPs innerhalb der Klone, allerdings sind diese nur im Innern der Klone und nicht an den Klon-Grenzen detektierbar, weil hier durch die aufgehobene *cis*-Inhibition der Notch-Signalwegs aktiviert wurde und dadurch das epidermale Schicksal bevorzugt wird (**s.Abb.38**). Bei kleinen Klonen können aufgrund der aufgehobenen *cis*-Inhibition und der Notch-Aktivitäten in allen für *Dl*- und *Ser*-mutanten Zellen keine ektopischen SOPs entstehen.

Die Analyse von *Dl^{rev10}*-Klonen in der Flügelimaginalscheibe zeigt einen sehr ähnlichen Phänotypen (**s.Abb.39**). Auch hier konnte mit Hilfe des Reporters *Gbe+Su(H)-lacZ* eine Hochregulation der Notch-Aktivität an den Klongrenzen entdeckt werden (**s.Abb.39 C',C''**). Das Ergebnis deutet daraufhin, dass auch in diesen Zellen die *cis*-Inhibition aufgehoben wurde. Außerdem konnte ein schwacher neurogener Phänotyp beobachtet werden, der durch die Bildung einiger ektopischer SOPs nachgewiesen wurde (**s.Abb.39 D,D',D''**).

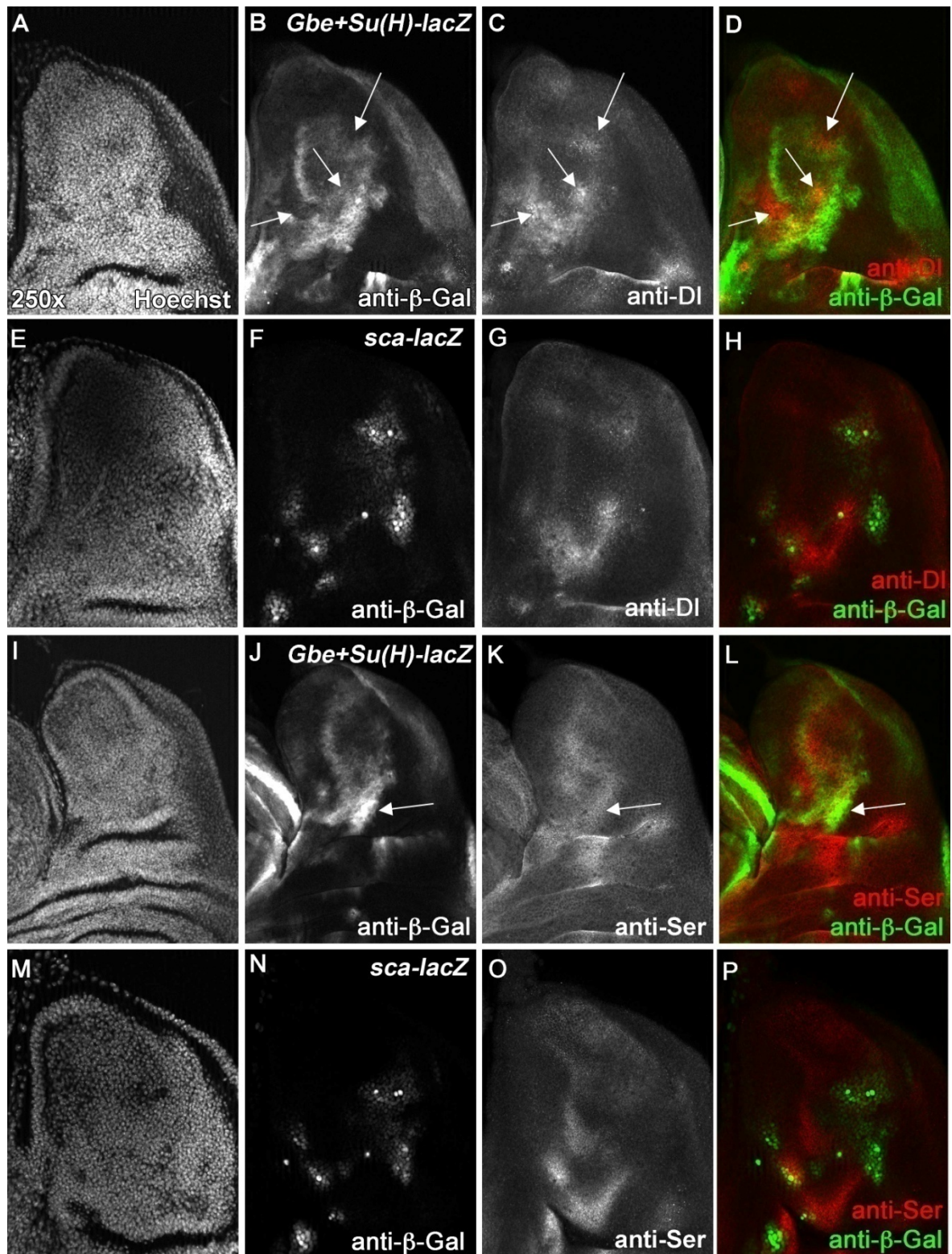


Abb.37: Verteilung von Delta und Serrate relativ zu *Gbe+Su(H)-lacZ*

Die Graphik zeigt die Verteilung der Notch-Liganden Delta und Serrate im Verhältnis zur *Gbe+Su(H)-lacZ* und zur *sca-lacZ* Expression in wildtypischen Imaginalscheiben. Dargestellt sind jeweils 250x fache Vergrößerungen des Notums (A-P). In A-D ist die Verteilung von Delta relativ zur Notch-Aktivität gezeigt. Die Pfeile (B,C,D) zeigen, dass starke Delta Ansammlung mit schwacher Notch-Aktivität assoziiert ist. In E-H ist die Verteilung von Delta relativ zur proneuralen Aktivität dargestellt. Hier zeigt sich bis auf das aPA, tr1-Kluster eine konstante Verteilung des Proteins in den proneuralen Klustern (F,G,H).

In I-L ist die Verteilung von *Serrate* im Verhältnis zur *Gbe+Su(H)-lacZ* Expression dargestellt. Die Verteilung von *Serrate* deckt sich wesentlich besser mit der Aktivität des Notch-Signalweges (J,K,L). Hinsichtlich der *sca-lacZ* Expression findet sich wenig Überlagerung mit dem Ser-Protein, und auch im aPA, tr1-Kluster findet sich keine Protein-Ansammlung (N,O,P).

Im Gegensatz zum Verlust von *Dl* oder dem Genfunktionsverlust beider Liganden, führt der Verlust von *Ser* nicht zur Bildung ektopischer SOPs noch zur Aktivierung des Notch-Signalweges an den Klongrenzen (**s.Abb.39 I',I''**). Zusammengefasst kann gesagt werden das der Verlust beider Liganden zur starken Aktivierung des Notch-Signalweges in mutanten Zellen an Klongrenzen führt, aber zum Verlust der Notch-Aktivierung in allen anderen mutanten Zellen. Der Verlust der *Delta*-Funktion alleine führt, im Gegensatz zum *Serrate* Ausfall, dagegen ebenfalls zur Aufhebung der *cis*-inhibition an den Klongrenzen. Der starke neurogene Phänotyp in der Doppelmutanten, verglichen mit dem schwachen Phänotyp in *Dl*- und dem nicht vorhandenen Phänotyp in *Ser*-Klonen zeigt, dass beide Proteine für die SOP Determination benötigt werden.

3.3.4 Die Reichweite des Notch-Signals in der Flügelimaginalscheibe

Der beobachtete Halo der starken *Gbe+Su(H)-lacZ* Expression um die SOPs herum deutet darauf hin, dass die Reichweite des Notch-Signals aus den SOPs auf höchstens ein bis zwei Zellen beschränkt ist. Übereinstimmend mit dieser Annahme ist die Beobachtung der Notch-Aktivierung an den Klongrenzen in den *Dl^{rev10},Ser^{RX82}*-Klonen durch die Aufhebung der *cis*-Inhibition, was ebenfalls darauf hinweist, dass das Notch-Signal nur die benachbarte Zelle erreicht. Um diese Annahme weiter zu bestätigen wurden *kuz^{ES24}*-mutante Zellklone erzeugt und die Signalisierung der ektopischen SOPs zu ihren wildtypischen Nachbarzellen an den Klongrenzen untersucht. Der Verlust der *kuz*-Funktion führt zur Bildung von Borstenbüscheln auf dem Thorax adulter Fliegen. Allerdings findet sich keine nackte Kutikula, welche bei Ausfall eines Gens das in allen Notch-vermittelten Prozessen während der Borstenbildung zu erwarten gewesen wäre (Sotillos et al. 1997). Die Bildung der Borstenbüschel deutet darauf hin, dass der Verlust von *kuz* nur den Selektionsprozess der SOPs innerhalb des proneuralen Kluster affektiert, aber nicht an den Notch-vermittelten Prozesse nach Teilung der SOP involviert ist.

Folglich kann man durch die Verwendung der *kuz^{ES24}*-Mutanten den Selektionsprozess innerhalb der proneuralen Klusters untersuchen ohne die Notch-Funktion in der SOP-Linie zu beeinträchtigen.

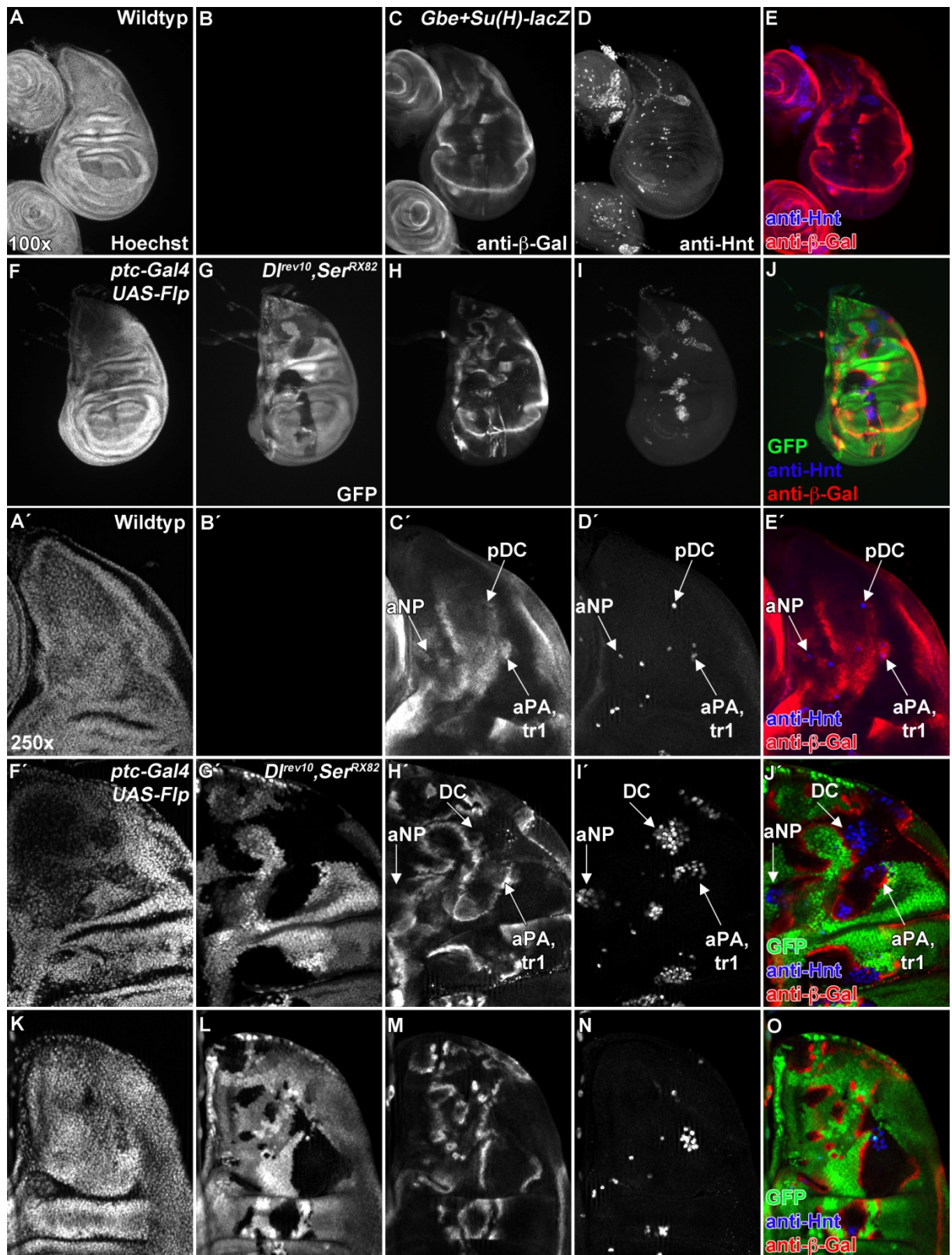


Abb.38: Der Verlust der *Dl* und *Ser* Funktion führt zur Bildung ektopischer SOPs und zur Aufhebung der *cis*-Inhibition

In der Graphik wird die Expression von *Gbe+Su(H)-lacZ* und *Hnt* in einer wildtypischen Flügelimaginalscheibe A,A'-E,E') mit der Expression in einer Flügelimaginalscheibe verglichen, die *Dl^{rev10}, Ser^{RX82}*-doppelmutante Zellklone enthält (F,F'-J,J' und K-O). Die für *Dl* und *Ser* mutanten Zellen sind durch die Abwesenheit der Expression des Markergens GFP markiert (G,G',L). In den 100x Vergrößerungen sind die Übersichtsaufnahmen der wildtypischen und der Klon-enthaltenden Flügelimaginalscheibe abgebildet

und der entsprechenden Expressionsmuster (A-J). In den 250x Vergrößerung des Notums einer wildtypischen Imaginalscheibe zeigt sich das gewohnte Muster der *Gbe+Su(H)-lacZ* Expression (C'). Dagegen ist das Expressionsmuster in Imaginalscheiben, welche *Dll^{rev10},Ser^{RX82}*-Zellklone enthalten aufgehoben und es ist deutliche Expression des Reporters an den Klongrenzen zu erkennen (H'). Kleine Klone weisen eine komplette Expression im gesamten mutanten Bereich auf (M). Die Hnt-Antikörperfärbung weist, verglichen mit der wildtypischen Expression (D'), in den *Dll^{rev10},Ser^{RX82}*-Zellklonen die Bildung zahlreicher ektopischer SOPs auf (I',N).

Um zu überprüfen, ob *kuz^{ES24}*-mutante SOPs in wildtypischen Nachbarzellen mehr als einen Zelldurchmesser entfernt von der Klongrenze das Notch-Signal anschalten können, wurden *kuz^{ES24}*-mutante Zellklone in *mibl*-mutanten Flügelimaginalscheiben induziert. Der Grund für die Verwendung der *mibl*-mutanten Scheiben lag in der Abwesenheit der Streifen-ähnlichen *Gbe+Su(H)*-Expression in diesem Hintergrund der die Analyse des Notch-Signals für die SOP-Bildung vereinfacht. Das Ergebnis der Analyse zeigte, dass nur die direkten wildtypischen Nachbarzellen einer mutanten SOP in der Lage waren das Reporterogenkonstrukt *Gbe+Su(H)-lacZ* zu exprimieren (s.**Abb.40 C,C',C''**).

Das Resultat deutet daraufhin, dass die Reichweite des Notch-Signals auf den direkten Nachbarn der SOP beschränkt ist. Die gleichen Ergebnisse konnte durch die Generierung von *aph-1^{D35}*-mutanten Zellklonen im *mibl*-mutanten Hintergrund erzielt werden (s.**Abb.40 H,H',H''**).

3.3.5 Die Flügelimaginalscheibe besitzt eine Band-ähnliche Region proneuraler Aktivität die durch den Notch-Signalweg in Kluster unterteilt wird

Die Verwendung des Reporterogenkonstruktes *sca-lacZ*, einem Marker für proneurale Aktivität, hat gezeigt dass er auch in Regionen zwischen proneuralen Klustern schwach exprimiert wird (Kaspar et al. 2008). Diese Tatsache deutet daraufhin dass das Expressionsmuster des Zielgens von *Ac* und *Sc* nicht auf bestimmte Bereiche (proneurale Kluster) beschränkt ist, sondern eine Band-ähnlicher Region mit variierender proneuraler Aktivität aufweist, wobei die höchste Aktivität in den proneuralen Klustern vorliegt. Die Analyse von *sca-lacZ* in *mibl*-mutanten Flügelimaginalscheiben hat gezeigt, dass die Expression zwischen den proneuralen Klustern ausgeweitet ist (s.**Abb.41 H**). Außerdem exprimieren mehr Zellen den SOP-Marker *E(spl)m8-Sm-GFP*, welcher als frühester Marker für SOPs angesehen wird (s.**Abb.41 G**).

Das Ergebnis zeigt, dass mehr Zellen ausreichend proneurale Aktivität ansammeln und die SOP-Entwicklung antreiben.

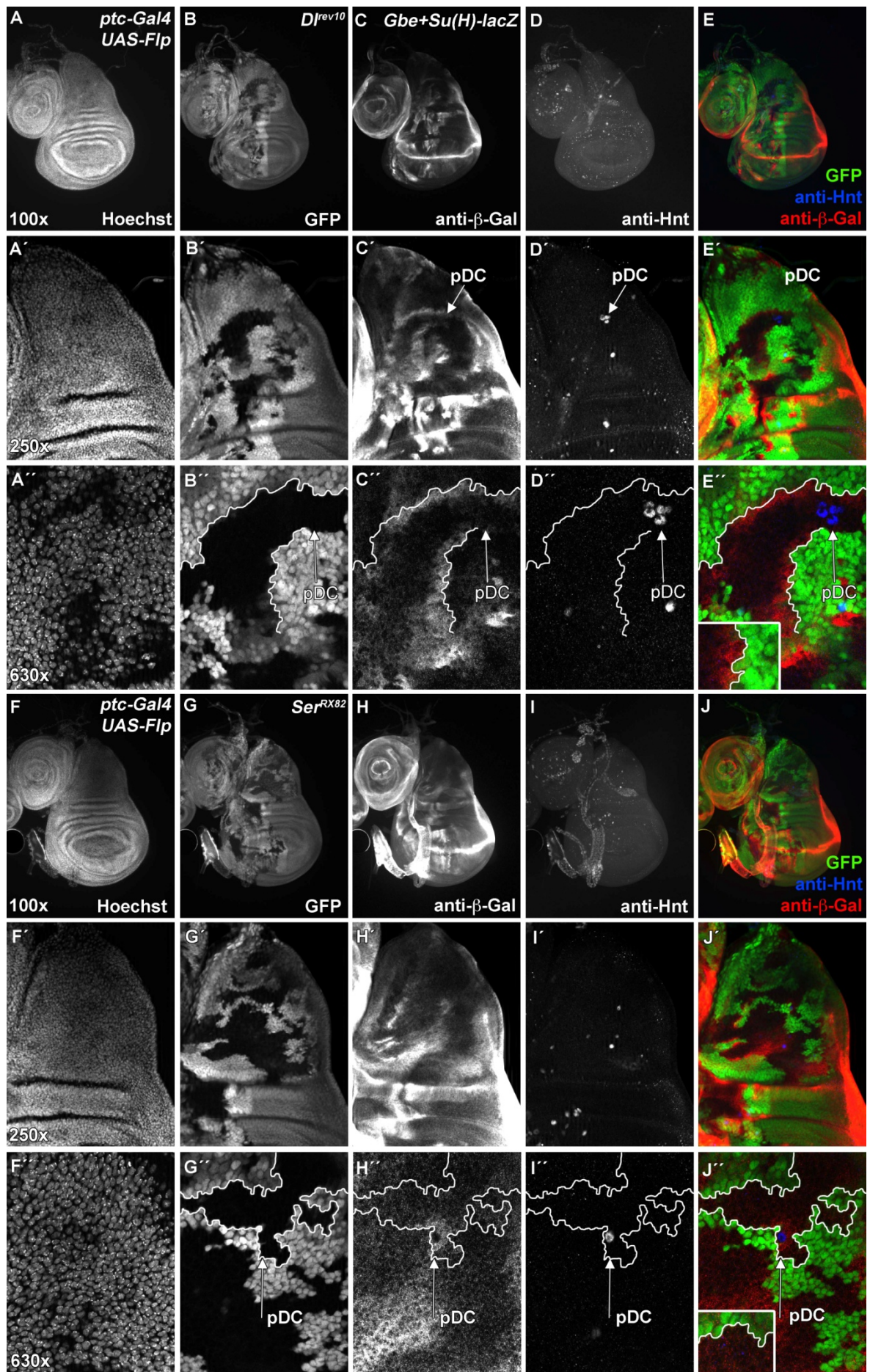


Abb.39: Der Verlust der *DI* Funktion führt, im Gegensatz zum *Ser*-Verlust, zur Bildung ectopischer SOPs und zur Aufhebung der *cis*-Inhibition

Die Graphik zeigt die Expression von *Gbe+Su(H)-lacZ* und *hnt* in *DI^{rev10}* und in *Ser^{RX82}* mutanten Zellklonen. Die mutanten Zellen sind jeweils durch die Abwesenheit der Expression des Markergens GFP detektiert (A,A',A'',G,G',G''). Während der Verlust von Delta zu einem milden neurogenen Phänotyp führt (D,D',D''), dargestellt durch die ectopischen SOPs und den Pfeil in D'' und zur Aktivierung des Notch-Signalweges an den Klongrenzen (C,C',C''), detektiert durch die Expression von *Gbe+Su(H)-lacZ*, führt der Verlust von *Ser* weder zur Bildung ectopischer SOPs (I,I',I''), noch zur Aufhebung der *cis*-Inhibition an den Klongrenzen (H,H',H'').

Außerdem suggeriert es, dass die Anzahl der Zellen, welche Kompetent sind das SOP-Schicksal anzunehmen, höher ist als angenommen und auch Bereiche zwischen den proneuralen Klustern beinhaltet.

Die Anwesenheit der streifenähnlichen Expression von *Gbe+Su(H)-GFP_{nls}* oder *-lacZ* bzw. der Notch-Aktivität zwischen den proneuralen Klustern unterstützt die Definition der Kluster und die proneurale Aktivität in den dazwischen liegenden Zellen müssen während der Entwicklung aktiv unterdrückt werden.

Um zu überprüfen, ob alle Zellen innerhalb der Band-ähnlichen, proneuralen Aktivität in der Lage sind das SOP Schicksal anzunehmen, wurden *Psn^{CI}* mutante Flügelimaginalscheiben untersucht, in denen die Notch-Aktivität ausgeschaltet wurde (s.Abb.42 K-O). Die Mutante ist in Homozygose puppal letal und der komplette Ausfall kann ohne die Generierung von Klonen analysiert werden (Struhl and Greenwald 1999).

In diesem Allel findet, im Laufe der Entwicklung, eine Vergrößerung der proneuralen Kluster und eine Fusion einzelner Kluster nach der Puppenbildung statt, welche durch *sca-lacZ*, *E(spl)m8-Sm-GFP* und durch eine anti-Hnt-Antikörperfärbung sichtbar gemacht wurden (s.Abb.42 L,M,N). Zwischen den proneuralen Klustern der DC und der SC Region, kann auch in Scheiben 3h nach der Puppenbildung keine Fusion der Kluster detektiert werden (s.Abb.42 L,M,N). Die schwache *sca*-Expression, die im Wildtyp zwischen diesen Klustern beobachtet wurde, ist beim Ausfall von *Psn* nicht verändert (s.Abb.42 L,M,N). Zwischen dem aSA und dem pNP Cluster findet ebenfalls keine Fusion statt (s.Abb.42 L,M,N), allerdings ist hier eine erweiterte *sca*- und gelegentliche Hnt-Expression in den Puppenstadien detektierbar (s.Abb.42 L,M,N). Identische Ergebnisse konnten durch den Ausfall von *nicastrin* (*nic*) erzielt werden, welches für eine Komponente der γ -Secretase kodiert (Daten nicht abgebildet).

Zusammengefasst weisen die Ergebnisse darauf hin, dass eine Band-ähnliche Region variierender, proneuraler Aktivität im Notum der Flügelimaginalscheibe existiert, und das

der Notch-Signalweg für die Selektion der SOP und für die Definition der Regionen mit hoher proneuraler Aktivität, den proneuralen Klustern, benötigt wird.

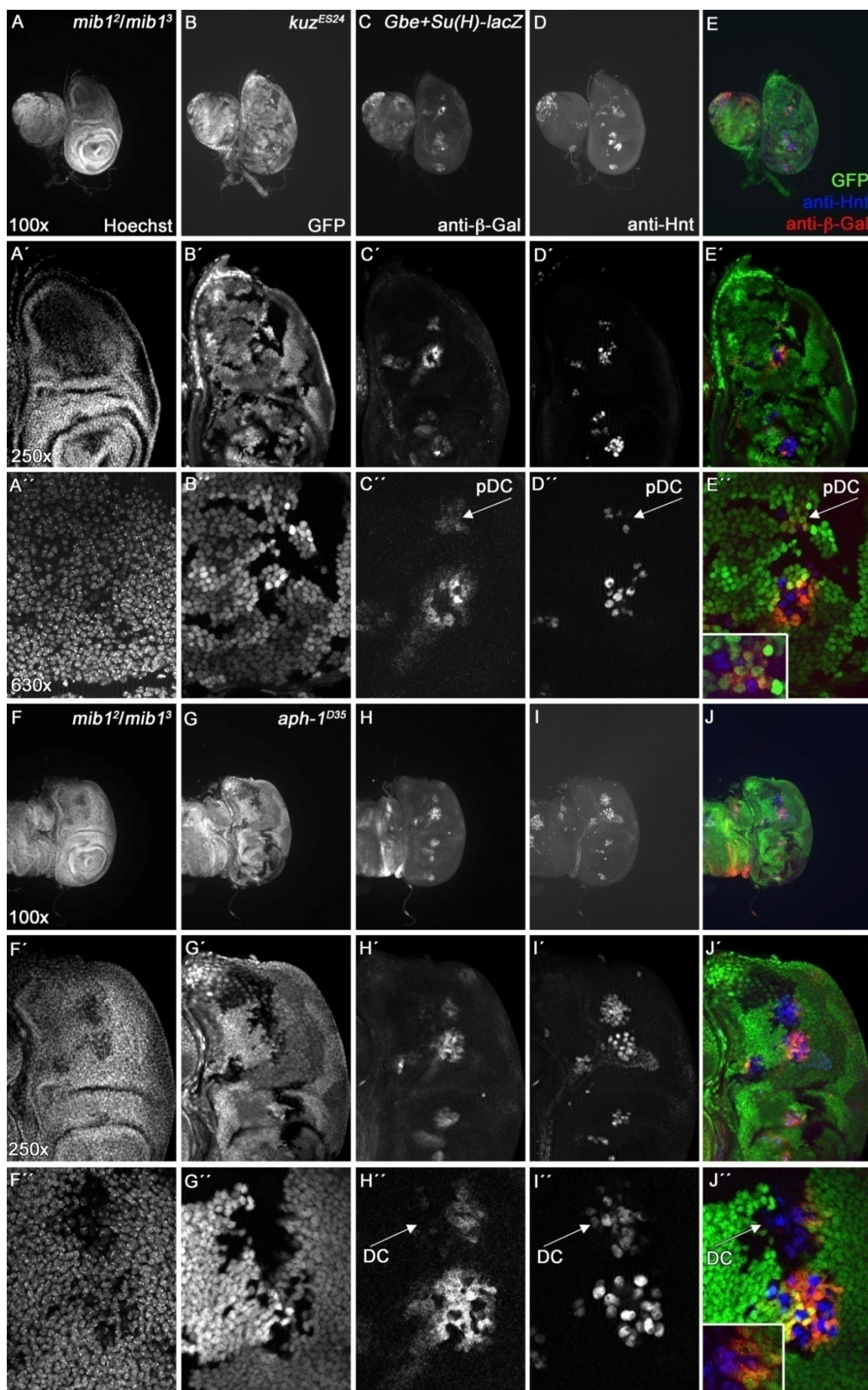


Abb.40: Die Reichweite des Notch-Signal beträgt einen Zelldurchmesser

Die Graphik zeigt *mib1*-mutante Flügelimaginalscheiben in denen entweder *kuz^{ES24}*-Klone (A,A',A'',E,E',E'') oder *aph-1^{D35}*-Klone (F,F',F'',J,J',J'') erzeugt wurden. Die Reihen A-E und F-J zeigen die Übersicht einer *mib1*-mutanten Flügelimaginalscheibe in der 100x Vergrößerung. Die Reihen A'-E' und F'-J' zeigen die 250x Vergrößerung des Notums. In B' und G' sind durch die Abwesenheit von GFP die *kuz^{ES24}*-Klone bzw. die *aph-1^{D35}*-Klone zu erkennen. Die Hnt-Färbung in D' und I' zeigt, dass der Verlust der Gene jeweils zur Bildung ectopischer SOPs führt, wenn der Klon proneurale Kluster durchzieht. Die *Gbe+Su(H)-lacZ* Expression in C' und H' zeigt, dass die Notch-Aktivität sich auf die direkte Umgebung der ectopischen SOPs beschränkt. Die 630x Vergrößerungen in A''-E'' und F''-J'' zeigen die Position des DC und des aPA, tr1-Klusters. In beiden Fällen durchzieht der mutanten Bereich (B'',G'') die proneuralen Kluster. Die Bildung der ectopischen SOPs (D'',I'') führt zur Aktivierung des Notch-Signalweges bzw. der *Gbe+Su(H)-lacZ* Expression nur in der direkten Nachbarzelle (C'',H'').

Der neurogene Phänotyp von *Psn* und *nic* ist stärker als der von *mib1* Mutanten, obwohl die meisten streifenähnlichen Domänen der *Gbe+Su(H)-lacZ* Expression verschwinden (s.Abb.40).

Das Ergebnis deutet daraufhin, dass die verbleibende schwache Expression von *Gbe+Su(H)-lacZ*, welche mit der schwachen Notch-Aktivität korreliert entscheidend ist für die Definition der proneuralen Kluster der Macrochaeten.

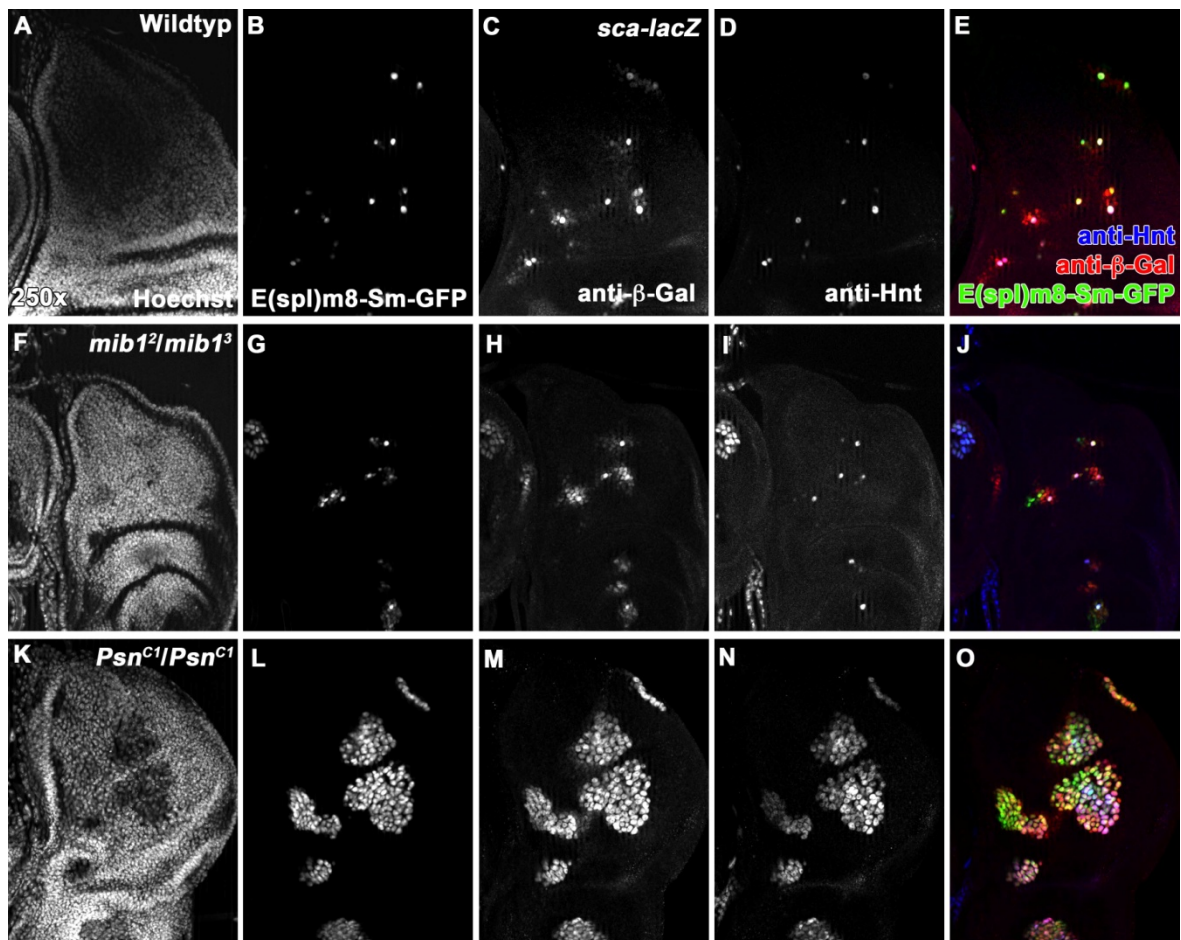


Abb.41: Der Notch-Signalweg definiert die proneuralen Kluster

Die Graphik zeigt die Expression des Reporters *E(spl)m8-Sm-GFP*, von *sca-lacZ* und von *hnt* in einer wildtypischen (A,A'-E,E'), *mibl*-mutanten (F,F'-J,J') und *Psn^{Cl}*-mutanten Flügelimaginalscheibe (K,K'-O,O'). Die Reihen A-E, F-J und K-O zeigen die Übersichtsaufnahmen der wildtypischen, *mibl*^l-mutanten und *Psn^{Cl}*-mutanten Flügelimaginalscheibe. Die Hoechstfärbungen in A,F und K zeigen dass der Verlust von *mibl* und *Psn* zu verkleinert Imaginalscheibe führt. Die 250x Vergrößerung einer *mibl*-mutante Flügelimaginalscheibe zeigt, dass die proneurale Aktivität ausgeweitet ist (H') und die Hnt- (I') und *E(spl)m8-Sm-GFP* Expression (G) zeigt, dass es zu ektopischer SOP-Bildung kommt. Die 250x Vergrößerung einer *Psn^{Cl}*-mutanten Flügelimaginalscheibe zeigt dagegen, dass die *sca-lacZ* Expression (M') noch stärker ausgeweitet ist und die einzelne proneuralen Kluster zu einem Band fusionieren. Die Hnt- (N') und *E(spl)m8-Sm-GFP* (L') Expression zeigen, dass fast alle Zellen in diesem proneuralen Band zu SOP determiniert werden.

3.3.6 Extramacrochaetae wird in den meisten, aber nicht allen Zellen der Imaginalscheibe für die Suppression der proneuralen Aktivität benötigt

Flügelimaginalscheiben, die homozygot Mutant für das schwache hypomorphe Allel *emc^{pel}* oder für die stärkere mutante Situation *emc^l/emc^{pel}* sind, zeigen die Bildung ektopischer SOPs, welche außerhalb des Bandes der proneuralen Aktivität liegen (s.Abb.43 E-L).

Die Analyse der Emc-YFP Expression in *Su(H)^{SF8}*-mutanten Flügelimaginalscheiben zeigte, dass die Bildung zusätzlicher SOPs in den Bereichen Auftritt in denen eine geringere Expression von Emc-YFP vorliegt (s.Abb.42 H,H').

Das Ergebnis deutet daraufhin, dass die *emc*-Expression an der Definition der Band-ähnlichen neurogenen Region beteiligt ist. Um weiter zu prüfen ob Emc an der Definition einer Band-ähnlichen Region beteiligt ist, wurde die proneurale Aktivität in Flügelimaginalscheiben untersucht, welche sowohl Homozygot für *Psn^{Cl}* als auch für *emc^{pel}* waren (s.Abb.44 M-P). In den *Psn^{Cl},emc^{pel}* doppelmutanten Flügelimaginalscheiben waren die Regionen aus welchen die SOPs entstehen deutlich vergrößert (s.Abb.44 N,O), verglichen mit denen aus *Psn^{Cl}*-Mutanten (s.Abb.44 J,K). Diese zusätzliche ektopische SOP Bildung deutet darauf hin, dass auch Zellen außerhalb des proneuralen Bandes in der Lage sind das SOP Schicksal anzunehmen. Dazu ist allerdings eine Verringerung der Emc-Aktivität nötig.

Allerdings nahmen nicht alle Zellen im Notum der Flügelimaginalscheibe das SOP-Schicksal an und es gab Regionen in denen keine ektopische SOP-Formation beobachtet werden konnte (s.Abb.44 N,O). Interessanterweise war die SOP-Bildung stark unterdrückt in der Region in der Wg exprimiert wurde (s.Abb.44 S,T). Die Wg-Expression und die fehlende SOP-Bildung in dieser Region könnten darauf hindeuten dass die Wg-Aktivität die SOP-Bildung antagonisiert.

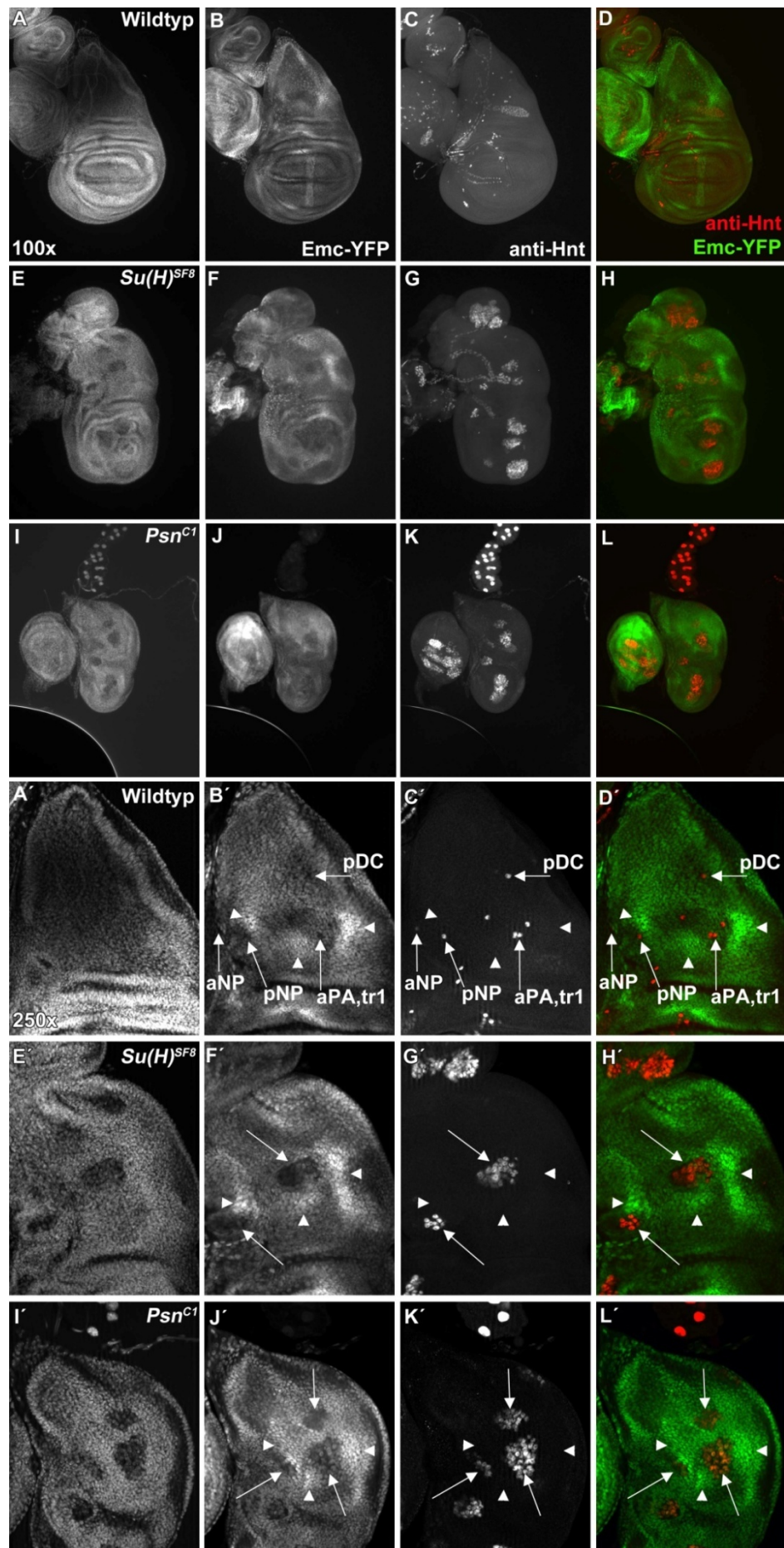


Abb.42: Ektopische SOPs in *Su(H)^{SF8}*- und *Psn^{CI}*-Mutanten entstehen in Regionen mit geringer Emc-Aktivität

Die Graphik zeigt eine wildtypische (A,A'-D,D'), *Su(H)^{SF8}*- (E,E'-H,H') und *Psn^{CI}*-mutante Flügelimaginalscheibe (I,I'-L,L'). Die Übersicht der jeweiligen Imaginalscheiben ist in der 100x Vergrößerung in A-L zu sehen. In A'-L' sind 250x Vergrößerung des jeweiligen Notums dargestellt. In der wildtypischen Vergrößerung des Notums (A'-D') ist in der Hnt-Färbung (C') die Position der SOPs mit Pfeile und Abkürzungen dargestellt und noch nicht determinierte SOPs durch einen Pfeilkopf. Diese SOPs befinden sich in Bereichen geringer Emc Aktivität (B'), was durch die Pfeile in B' und D' und durch die Überlagerung die D' zu erkennen ist. Bereiche mit hoher Emc-Aktivität sind durch Pfeilköpfe markiert (D'). Die Bildung ektopischer SOPs in den *Su(H)^{SF8}*- und *Psn^{CI}*-mutanten Flügelimaginalscheiben (G'-K') findet in Bereichen mit geringer Emc-Aktivität (F',J') statt, was durch Pfeile hervorgehoben wird. Die Pfeilköpfe in der Überlagerung der *hnt*-Expression und der Emc-Aktivität (H'-L') zeigen, dass hohe Emc-Aktivität die ektopischen SOPs umgibt.

Da es sich bei *emc^{pel}* nicht um ein Nullallel handelt, sollte getestet werden ob der komplette Verlust der *emc* Genfunktion dazu führt das noch mehr Zellen das SOP Schicksal annehmen.

Um diesen Zustand zu erreichen wurden mutante Zellklone mit den vorausgesagten amorphen Allelen *emc^I* und *emc^{AP6}* in der Flügelimaginalscheibe induziert (**s.Abb.45**). In früheren Veröffentlichungen wurde die Verwendung der Allele bzw. die Induktion der Klone in der Flügelimaginalscheibe als zell-letal beschrieben und große Klone konnten nur mit Hilfe der Minute Hintergrundmutation erzielt werden (Baonza et al. 2000).

Im Gegensatz zu diesen Beobachtungen konnten in dieser Arbeit auch ohne die *Minute* Technik sowohl für *emc^I* als auch für *emc^{AP6}*, mutante Zellklone in der Flügelimaginalscheibe induziert werden (**s.Abb.45 B,B',G**). Die Klon-Größe war allerdings bei *emc^I*-Klonen sehr gering und umfasste nur eine oder sehr wenige Zellen, welche durch die Abwesenheit des Markergens *GFP* detektiert wurden (**s.Abb.45G**). Um proneurale Aktivität oder SOP-Determination zu detektieren, wurde *sca-lacZ* und anti-Hnt verwendet (**s.Abb.45 C,C',D,D',H,I**). Alle Klone bzw. mutante Zellen, egal in welcher Region der Flügelimaginalscheibe exprimierten *sca-lacZ* (**s.Abb.45 C,C**). Sogar in Zellen des posterioren Kompartiments, in denen normalerweise keine Ac und Sc Expression vorliegt, konnte *sca*-Expression nachgewiesen werden (**s.Abb.45 C**).

Das Ergebnis deutet darauf hin, dass der Verlust der *emc*-Funktion zur Induktion der proneuralen Aktivität führt. Außerdem wiesen einige mutante Zellen auch auf der posterioren Seite Hnt-Expression auf, was auf die Bildung ektopischer SOPs hindeutet (**s.Abb.45 A'-E'**).

Der Vergleich der Klon-Größe von *emc^I* und *emc^{AP6}* zeigte, dass bei der Verwendung von *emc^I* häufig nur sehr kleine Klone mit einer einzigen mutanten Zelle ausgemacht werden konnte, welche das SOP-Schicksal angenommen hatte (**s.Abb.45 G,H,I**).

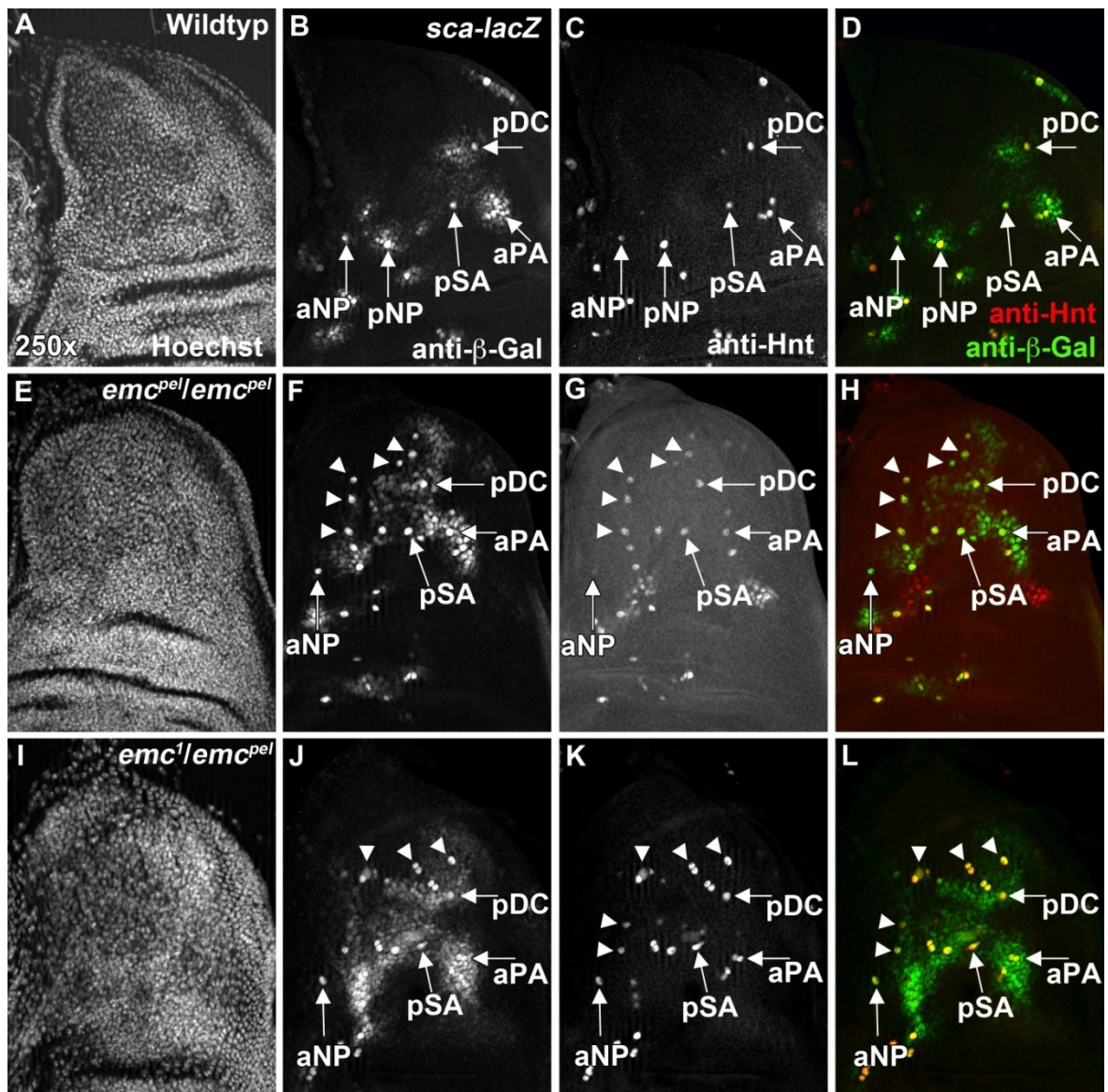


Abb.43: Der Verlust der *emc*-Funktion führt zur Bildung ectopischer SOPs

Die Graphik zeigt die *sca-lacZ* und Hnt Expression in wildtypischen (A,A'-D,D'), *emc^{pel}*-homozygoten (E,E'-H,H') und *emc^{pel}/emc¹*-mutanten Flügelimaginalscheiben (I,I'-L,L'). In A-L sind die jeweiligen 250x Vergrößerungen des Notums einer Flügelimaginalscheiben dargestellt. In der wildtypische Expression von *sca-lacZ* (B), sind mit Pfeilen und Abkürzungen die Positionen der proneuralen Kluster markiert und in der Hnt-Expression (C) die entsprechenden SOPs. In den *emc^{pel}* homozygoten Scheiben (E-H), zeigen sich mit Hilfe der *sca-lacZ*- (F) und der Hnt-Expression (G) ausgedehnte proneurale Aktivität und ectopische SOPs, welche durch Pfeilköpfe hervorgehoben sind. In der *emc^{pel}/emc¹*-mutanten Scheibe (I-L) zeigt die *sca-lacZ* Expression (J) eine noch stärkere Erhöhung der proneuralen Aktivität und die Hnt-Expression (K) und die Pfeilköpfe zeigen, dass sich viele ectopische SOPs schon geteilt haben.

Das Ergebnis deutet daraufhin, dass diese eine Zelle ausreichend proneurale Aktivität angesammelt hat um sofort das SOP Schicksal einzuleiten und die Proliferation zu stoppen. Ein weiterer Hinweis des Ergebnisses ist, dass *emc¹* ein stärkeres Allel sein könnte, da im Gegensatz zu *emc^{AP6}* höheres Level an proneuraler Aktivität in *emc¹* mutanten Zellen zu beobachten sind.

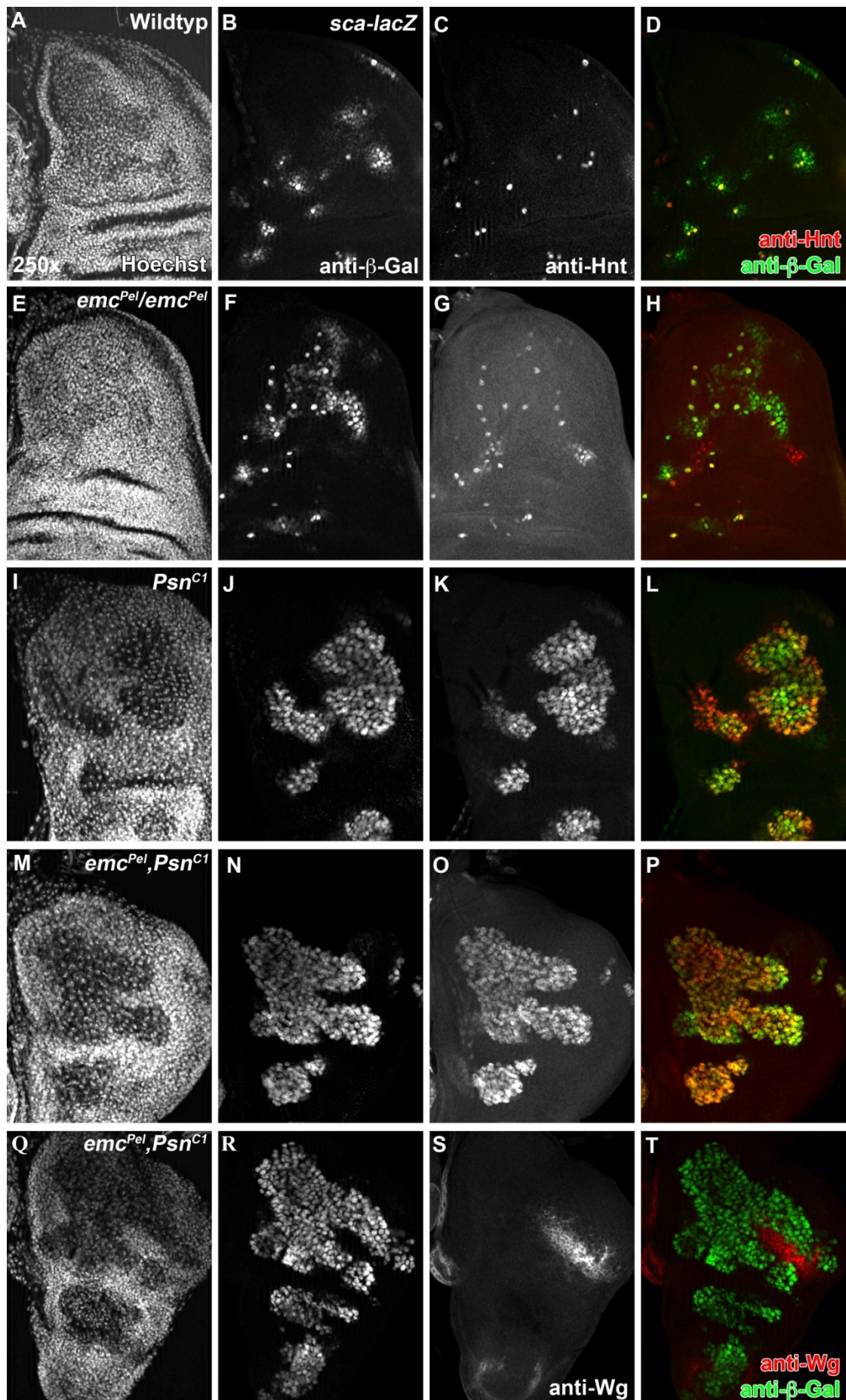


Abb.44: Der Verlust von *emc* führt zur Bildung ektoptischer SOPs außerhalb des proneuralen Bandes
 Die Graphik zeigt proneurale Aktivität und SOPs in einer wildtypischen (A-D), *emc^{Pel}*-homozygoten (E-H), *PsnC1*-homozygoten (I-L) und *emc^{Pel},PsnC1*-homozygoten Flügelimaginalscheibe (M-T). Dargestellt sind 250x Vergrößerungen des jeweiligen Notums der Scheiben. In der *emc^{Pel}*-homozygoten Scheibe ist die Erweiterung der proneuralen Aktivität (F') und die Bildung ektoptischer SOPs (G) zu erkennen. In *PsnC1*-mutanten Scheiben fusioniere einzelne proneurale Kluster zu einem Band proneuraler Aktivität (J), in welchem alle Zelle zu SOPs werden (O). In *emc^{Pel},PsnC1*-mutanten Scheiben ist zu erkennen, dass sich die proneurale Aktivität auf Bereiche außerhalb des in *PsnC1* beobachteten proneuralen Bandes ausdehnt (N) und sich auch dort ektoptische SOPs bilden (O). Die verbleibende Wg-Expression (S) in einer *emc^{Pel},PsnC1*-mutanten Scheiben zeigt, dass dieser Bereich von proneuraler Aktivität (R) und ektoptischer SOP-Bildung ausgenommen ist.

Ein weiterer Hinweis auf diese Tatsache ist die Beobachtung dass in heterozygoten *emc^l* Tiere eine ektoptische Macrochaete bzw. eine ektoptische SOP auf dem Notum auftritt, welche bei *emc^{AP6}* nicht sichtbar ist. Die Größe der *emc^{AP6}*-Klone scheint verglichen mit denen von *emc^l* mehrere Zellen zu umfassen (s.Abb.45 B,B',G). Interessanterweise befindet sich die ektoptisch auftretende SOP häufig genau im Zentrum dieser mutanten Zellen und nicht an der Klongrenze.

3.3.7 Die Entwicklung einer SOP in einem Feld der Notch und Emc Aktivität innerhalb der Flügelimaginalscheibe

Zur Bestimmung der Verteilung von Emc in der Flügelimaginalscheibe wurden bisher anti-Emc Antikörperfärbungen oder X-Gal bzw. β -Gal-Färbungen gegen das *emc-lacZ* Konstrukt durchgeführt (Garrell and Modolell 1990). In dieser Arbeit wurde die seit kurzem erhältliche Protein-Trap-Linie Emc-YFP benutzt. Hierbei handelt es sich um ein in Homozygose funktionales Protein, welches durch die Kreuzung gegen *emc^l* bestätigt wurde. Die Expression von Emc-YFP stimmt mit der Emc-Antikörperfärbung und der Expression von *emc-lacZ* überein und folglich repräsentiert Emc-YFP die Expression von Emc. Die Expression von Emc-YFP ist relativ einheitlich, allerdings sind deutlich Regionen starker und schwacher Expression zu erkennen (s.Abb.45 L,R). Die schwach exprimierenden Regionen liegen in den Bereichen mit proneuraler Aktivität, welche durch die Verwendung der *sca-lacZ* Linie gezeigt werden konnte (s.Abb.45 S,U). Aufgrund der Unterschiedlichen Verteilung von Emc-YFP und *emc-lacZ*, wurde das Auftreten der SOPs relativ zur Expression von Emc hin untersucht. Hierzu wurde die *sca-lacZ* Expression bzw. die anti-Hnt Antikörperfärbung zu verschiedenen Stadien der SOP-Entwicklung untersucht.

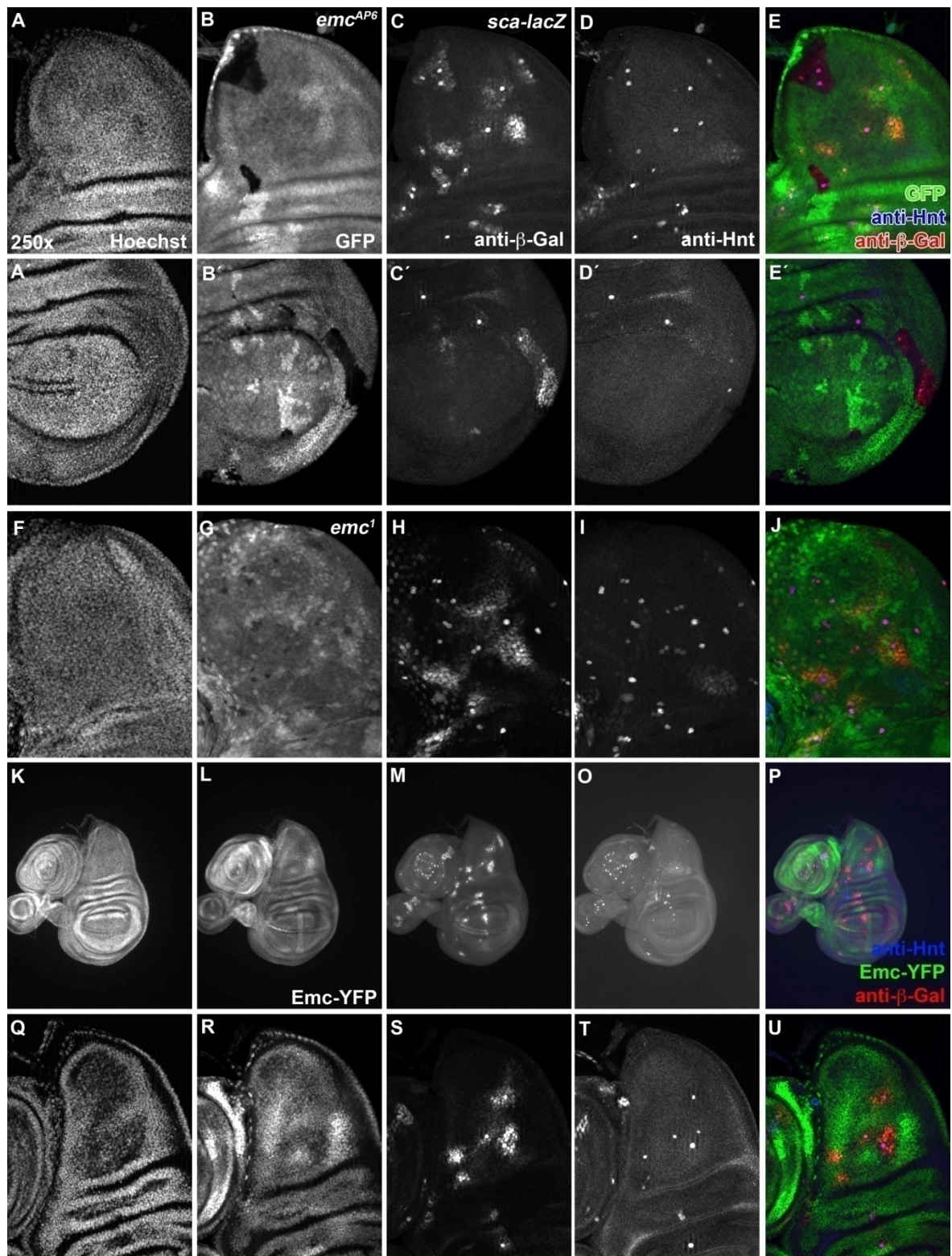


Abb.45: Der Verlust von *emc* führt zur Erhöhung der proneuralen Aktivität und der Bildung ektopischer SOPs in der gesamten Flügelimaginalscheibe

Dargestellt ist eine Flügelimaginalscheibe mit *emc*^{AP6}-Klonen (A,A'-E,E') und eine mit *emc*¹-Klonen (F-J). Die mutanten Zellen sind durch fehlende GFP-Expression in B,B' und G zu erkennen. In großen *emc*^{AP6}-Klonen (B) ist in allen mutanten Zellen, sowohl im Notum (Garcia-Eroles et al.), als auch im Flügel (A'-E') *sca-lacZ* Expression (C,C') detektierbar. Außerdem finden sich einige ektopische SOPs (D,D') in den mutanten Bereichen. Proneurale Aktivität und ektopische SOP Bildung sind auch im posterioren Teil der Flügelimaginalscheibe detektierbar. (C',D'). Die Emc-Aktivität (L,R) relativ zur *sca-lacZ* (H,S) und Hnt-Expression (O;T) sind in einer wildtypischen Imaginalscheibe dargestellt (K-U). Die *sca-lacZ* Expression (S)

und die Emc-Aktivität (R) in der Überlagerung (U) verdeutlichen, dass sich die proneuralen Kluster bzw. die proneurale Aktivität in Bereichen mit geringer Emc-Aktivität befinden.

Das früheste Zeichen der SOP-Determination ist die Ansammlung proneuraler Aktivität innerhalb der Flügelimaginalscheibe, welche durch die *sca-lacZ* Färbung aufgedeckt werden kann. Innerhalb der proneuralen Kluster scheint es keine Unterschiede in der Emc-Verteilung zu geben, womit man eine mögliche Erklärung hätte warum alle Zellen eines proneuralen Klusters die Fähigkeit besitzen sich zu einer SOP zu entwickeln.

Zusammengefasst weisen die Daten daraufhin, dass Emc genau wie Notch an der Definition der proneuralen Kluster beteiligt ist, aber nicht am Selektionsprozess einer einzigen Zelle an einer bestimmten Position.

4. Diskussion

4.1 Die Herstellung und Charakterisierung der Reportergenkonstrukte *Gbe+Su(H)-GFP_{nls}* und *Gbe+Su(H)-DsRed_{nls}* zur Analyse der Aktivität des Notch-Signalweges

In bisherigen Experimenten wurde das Reportergenkonstrukt *Gbe+Su(H)-lacZ* verwendet (Furriols and Bray 2001), um die wildtypische Aktivierung und Veränderungen in den Aktivitäten des Notch-Signalweges in verschiedenen Entwicklungsprozessen bei *Drosophila melanogaster* zu untersuchen. Dazu waren X-Gal und anti- β -Gal Antikörperfärbungen nötig. Deshalb wurden in dieser Arbeit die beiden grün- und rot-fluoreszierenden Reportergenkonstrukte *Gbe+Su(H)-GFP_{nls}* und *Gbe+Su(H)-DsRed_{nls}*, die eine zusätzliche Kernlokalisierung enthalten, hergestellt.

Die Charakterisierung der hergestellten Reportergenkonstrukte bzw. Notch-Aktivitätsmarker und der Vergleich zum zuvor verwendeten *Gbe+Su(H)-lacZ* konnten zeigen, dass durch das im Kern lokalisierte grün- bzw. rot-fluoreszierende Protein (*GFP*, *DsRed*), im Gegensatz zur cytoplasmatischen Verteilung der β -Galactosidase, ein sensitiveres Signal der Notch-Aktivität erreicht wird (**s.Abb.13 und 17**).

Desweiteren konnte gezeigt werden, dass die Aktivität des Notch-Signalweges innerhalb der Flügelimaginalscheibe nicht auf einzelne Zellen bzw. Domänen beschränkt ist, sondern womöglich aufgrund einer basalen Promoter-Aktivität des Reporters, in jeder Zelle der Flügelimaginalscheibe vorhanden ist (**s.Abb.13 und 14**).

Eine genaue Überlagerung des Aktivitätsnachweises der verschiedenen Reportergenkonstrukte ist aufgrund der unterschiedlichen Lokalisierung innerhalb der Zelle schwierig. Während sich die beiden fluoreszierenden Proteine im Zellkern befinden und mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops scharf gestellt werden können, verteilt sich die β -Galactosidase in der ganzen Zellen, ist wesentlich diffuser verteilt und lässt sich mit der im Kern lokalisierten Marker bei höheren Vergrößerungen (250x und 630x) nur schwer vergleichen.

Es konnte gezeigt werden, dass der Reporter in der Lage ist die Veränderungen sowohl durch Expression von *GFP* (also positiv) als auch durch Reduktion der *GFP*-Expression (also negativ) kenntlich zu machen (**s.Abb.15 und 16**). Hierbei konnte gleichzeitig gezeigt

werden, dass die Notch-Aktivierung nicht immer die Genexpression von Zielgenen auslöst und diese gewebespezifisch bzw. positionsspezifisch ist (**s.Abb.15**). Damit konnte die Funktionalität und die Sensitivität der hergestellten Reportergenkonstrukte, verglichen mit dem *Gbe+Su(H)-lacZ* Reporter, bestätigt werden.

Die Charakterisierung des Reporters *Gbe+Su(H)-GFP_{nls}* in der Oogenese zeigte, dass Zellen innerhalb des Germariums häufig GFP exprimierten, was auf eine Funktion des Notch-Signalweges in der Follikelstammzelllinie hindeutet (**s.Abb.17**).

Unter Verwendung des Reporters *Gbe+Su(H)-lacZ* sind einzelne Zellen im Germarium β -Gal positiv, wodurch eine Beteiligung des Notch-Signalweges an der Ersetzung der Follikelstammzellen und der Bildung des Follikel epithels nachgewiesen werden konnte (Nystul and Spradling 2010). Der Vergleich beider Reporter im Germarium hat gezeigt, dass wesentlich mehr Zellen im Germarium GFP-positiv als β -Gal positiv sind (**s.Abb.17**). Dies bestätigt zum Einen die Funktion des Notch-Signalweges in der frühen Oogenese bestätigt, zum Anderen zeigt es aber auch, dass wesentlich mehr Zellen den Notch-Signalweg aktivieren. Ein weiterer Unterschied in der Expression von *Gbe+Su(H)-GFP_{nls}* und *Gbe+Su(H)-lacZ* zeigte sich in Stadium S6 Eikammern (**s.Abb.17**). Während der *lacZ*-Reporter im gesamten Follikel epithel exprimiert wird, was mit einer Aktivität des Notch-Signalweges beim M/E-Switch übereinstimmt (Sun and Deng 2005; Sun and Deng 2007), zeigt der *GFP*-Reporter hauptsächlich Expression in den anterioren Follikelzellen, was mit der Funktion von Notch bei der terminalen Follikelzelldifferenzierung übereinstimmt (Larkin et al. 1999).

Übereinstimmend zeigen beide Reporter Co-Lokalisierung in den Polarzellen an den Enden der Eikammern (**s.Abb.17**), was mit der Funktion von Notch bei der Spezifizierung der Polarzellen übereinstimmt (Grammont and Irvine 2001).

Mit Hilfe beider Reporter kann außerdem der Notch-Signalweg z.B. bei Verlust von *lgl* auch in anderen Geweben, neben der Flügelimaginalscheibe und der Oogenese, analysiert werden ohne eine zusätzliche X-Gal oder anti- β -Gal Antikörperfärbung. Außerdem können die beiden Marker aufgrund der fluoreszierenden Proteine und der Kern-Lokalisierung für Live-Aufnahmen von lebendem Gewebe verwendet werden. In einer aktuellen Veröffentlichung wird der *Gbe+Su(H)-GFP_{nls}* Notch-Aktivitätsmarker erstmals in den Enteroblasten (EBs) des adulten Darms bei *Drosophila* beschrieben (de Navascues et al. 2012).

4.2 Der Funktionsverlust von *lgd* im Follikelepithel bei *Drosophila* führt zur ligandenunabhängigen, γ -Secretase-abhängigen Aktivierung des Notch-Signalweges und zur ektoptischen Expression des Dpp-Zielgens *Dad*

Bereits vor über zwei Jahrzehnten wurden mit Hilfe der mitotischen Rekombination *lgd*-mutante Follikelzellklone erzeugt, um zu testen, ob das Tumorsuppressorgen *lethal* (2) *giant discs* (*lgd*) innerhalb des Follikelepithels eine Funktion besitzt. Die Verwendung des hypomorphen *lgd^{d3}* Allels und die damit erzeugten Mosaiken, zeigten keine sichtbaren Veränderungen, verglichen mit den wildtypischen Kontrollen, was zu der Annahme führte, dass *lgd* keine Funktion im Follikelepithel besitzt (Szabad et al. 1991).

Die in dieser Arbeit vorgelegten Resultate, unter der Verwendung des amorphen Nullallels *lgd^{d7}*, zeigen allerdings, dass der Tumorsuppressor Lgd eine Funktion innerhalb des Follikelepithels hat und, dass der Funktionsverlust von *lgd*, genau wie in der Flügelimaginalscheibe, zur ektoptischen Aktivierung des Notch Signalweges führt (**s.Abb.18**) (Klein 2003; Childress et al. 2006; Gallagher and Knoblich 2006; Jaekel and Klein 2006).

Mit Hilfe des Notch-Aktivitätsmarkers *Gbe+Su(H)-GFP_{nls}* konnte gezeigt werden dass der Verlust von *lgd* zur sofortigen Notch-Aktivierung in allen *lgd^{d7}*-mutanten Zellen des Follikelepithels führt, was Hinweise auf eine Rolle von Lgd als negativen Regulator des Notch-Signalweges liefert (**s.Abb.18**).

Die ektoptische Aktivierung des Notch-Signalweges in den Follikelzellen der frühen Oogenese führt zur Bildung stielartiger Strukturen und wahrscheinlich zu einer Blockade der Stielzell-Differenzierung (**s.Abb.18**). Die Bildung langer stielartiger Strukturen konnte bereits früher beobachtet werden (Struhl et al. 1993). Zum Einen durch kurzzeitige Expression von konstitutiv aktivem Notch (*HS-Gal4 UASΔEN*) und zum Anderen durch anhaltende Expression von konstitutiv aktivem Notch (*Act5c>y⁺>N(intra)*) in Follikelzellen des Germariums (Struhl et al. 1993; Larkin et al. 1996). Die Überexpression von Delta im Germarium führt ebenfalls zur Bildung stielartiger Strukturen (Larkin et al. 1999), genauso wie der Verlust von Hairless, einem Antagonisten des Notch-Signalweges (St. Johnston and López-Schier 2001). Die Expression von konstitutiv aktivem Notch bzw. von Delta oder der Verlust von Hairless führen zur Blockade der Differenzierung der Stielzellen, welche in einem spezifischen Vorläuferzustand verharren und weiterproliferieren.

Zur Bestätigung, dass die ektopische Notch-Aktivierung in den stielartigen Strukturen zur Blockade der Stielzell-Differenzierung führt, könnten weitere Analysen durchgeführt werden mit Markern für Stielzellen bzw. Markern für undifferenzierte Zellen, wie Fasciclin III (FasIII) und Big brain (Bib).

Desweiteren führt die durch den Verlust von *lgd* ausgelöste ektopische Notch-Aktivierung in der mittleren Oogenese zu einer verfrühten Expression des Notch-Zielgens *hindsight* (*hnt*; **s.Abb.19**). Da Hnt für die Differenzierung der Follikelzellen benötigt wird, könnte die Hnt-Expression dazu führen, dass die *lgd^{d7}*-Zellen vorzeitig den mitotischen Zyklus verlassen und in den Endozyklus eintreten. Einen Hinweis für den vorzeitigen Endozyklus liefern vergrößerte Zellkerne innerhalb der *lgd^{d7}*-mutanten Bereiche. Ob die *lgd^{d7}*-mutanten Hnt exprimierenden Zellen, wirklich den mitotischen Zyklus verlassen haben und in den Endozyklus eingetreten sind, könnte mit Hilfe von Mitose-Markern, wie Phospho-Histone-3 (PH3), Cyclin A (CycA) oder Cyclin B (CycB) geklärt werden, welche in *lgd^{d7}*-Zellen, die Hnt exprimieren, nicht nachweisbar sein sollten. Dagegen könnten mögliche endozyklische *lgd^{d7}*-Follikelzellen, mittels Cyclin E (CycE) nachgewiesen werden.

Wildtypische Follikelzellen durchlaufen nach dem M/E-Switch drei Endozyklen und beginnen mit der Chorion Gen Amplifikation. Damit der Wechsel vom Endozyklus zur Chorion Gen Amplifikation (E/A-Switch) eingeleitet werden kann, muss der Notch-Signalweg runter reguliert und der Ecdysone Rezeptor (Brunser et al.) aktiviert werden. Ausgedehnte Notch-Aktivität unterdrückt die EcR-Aktivierung und verhindert den Austritt aus dem Endozyklus (Sun, Jianjun et al. 2008). Ob der Verlust von *lgd* und die damit verbundene ektopische Notch-Aktivierung ebenfalls den Austritt der Follikelzellen aus dem Endozyklus verhindern und ob ein Zusammenhang zwischen anhaltender Notch-Aktivität und degenerierten Eikammer besteht, wurde in dieser Arbeit nicht untersucht. Obwohl die Notch-Aktivität sofort durch den Verlust von *lgd* ausgelöst wird und mit Hilfe des Notch-Aktivitätsmarkers *Gbe+Su(H)-GFP_{nls}* sowohl in früher als auch mittlerer Oogenese nachgewiesen werden kann, führt diese frühe ektopische Aktivierung nicht gleichzeitig zur *hnt*-Expression und zum Übergang der Follikelzellen vom mitotischen Zyklus in den Endozyklus.

Diese Beobachtung kann durch mehrere Möglichkeiten erklärt werden:

1. Für die *hnt*-Expression werden neben der Aktivität des Notch-Signalweges zusätzliche Faktoren benötigt, die erst zu einem späteren Zeitpunkt in der Oogenese aktiv sind.

2. Die Aktivierung des Notch-Signalweges ist ausreichend um die Expression der Reportergenkonstruktes *Gbe+Su(H)-GFP_{nls}* auszulösen, allerdings nicht stark genug um einen möglichen Schwellenwert zu erreichen, der für die Hnt-Expression benötigt wird.

Durch die Verwendung der Doppelmutanten *lgd^{d7},kuz^{ES24}* im Follikelepithel konnte bestätigt werden dass, genau wie in der Flügelimaginalscheibe, die auftretende ektopische Notch-Aktivierung in *lgd^{d7}*-Zellen ligandenunabhängig erfolgt (Jaekel and Klein 2006). So konnte der Verlust von *kuz* in *lgd^{d7}*-Zellen, weder die Expression von *Gbe+Su(H)-GFP_{nls}* noch die von *hnt* unterdrücken (**s.Abb.20**). Allerdings konnten in einigen wenigen Fällen Fusionen *lgd^{d7},kuz^{ES24}*-mutanter Eikammern beobachtet werden die ein klarer Hinweis für den Ausfall der Notch-Aktivität sind, und keine langen stielartigen Strukturen (Xu et al. 1992). Da in fusionierten Eikammern trotzdem *Gbe+Su(H)-GFP_{nls}* und *hnt* Expression im Follikelepithel nachweisbar ist, deutet das Ergebnis darauf hin, dass die Aktivität des Notch-Signalweges in der Stielzelllinie unterdrückt wird. Es besteht die Möglichkeit, dass für die Bildung langer stielartiger Strukturen, die beim Ausfall von *lgd* gebildet werden, neben der ligandenunabhängigen Notch-Aktivierung zusätzlich auch die ligandenunabhängige Notch-Aktivierung benötigt wird, welche allerdings durch den Verlust von *kuz* verhindert wird.

Mit Hilfe der Doppelmutanten *lgd^{d7},aph-I^{D35}* konnte außerdem, genau wie in der Flügelimaginalscheibe, die Notwendigkeit eines funktionalen γ -Secretase-Komplexes bei der ligandenunabhängigen Notch-Aktivierung in *lgd^{d7}*-Zellen gezeigt werden (Jaekel and Klein 2006). Weder die Expression des Notch-Aktivitätsmarkers *Gbe+Su(H)-GFP_{nls}* noch von *hnt*, konnte in *lgd^{d7},aph-I^{D35}*-Zellen nachgewiesen werden (**s.Abb.20**). Interessanterweise zeigen die *lgd^{d7},aph-I^{D35}*-Follikelzellen eine morphologische Veränderung der Zelle bzw. des Zellkerns, welche sich in der Abflachung der Zelle bzw. des Kerns äußert. Der Grund für diese Veränderung ist unklar und konnte nicht weiter analysiert werden. Da dieser Phänotyp ebenfalls in *aph-I^{D35}*-mutanten Follikelzellen beobachtet wird, ist zu vermuten, dass er durch die Inaktivierung des Notch-Signalweges bedingt ist.

Es konnte gezeigt werden, dass ESCRT-I, ESCRT-II und ESCRT-III Komponenten, aber nicht Hrs (ESCRT-0), ebenfalls benötigt werden, um eine ektopischen Notch-Aktivierung

in *Drosophila* zu verhindern (Moberg et al. 2005; Thompson et al. 2005; Vaccari and Bilder 2005).

Die Analyse des Notch-Signalweges beim Ausfall der ESCRT-0 – ESCRT-III Komponenten und der Vergleich mit dem *lgd* Verlust im Follikelepithel bestätigte dies. Mit Ausnahme von *hrs* (ESCRT-0), führte der Verlust der ESCRT-Komponenten ebenfalls zu einer sofortigen ektopischen Aktivierung des Notch-Signalweges innerhalb des Follikelepithels (**s.Abb.21**). In allen mutanten Zellen, mit Ausnahme von *hrs*, konnte die ektopische Expression des Notch-Reporters *Gbe+Su(H)-GFP_{nls}* und die verfrühte *hnt*-Expression detektiert werden (**s.Abb.22**). Es wurde bereits zuvor gezeigt, dass der Verlust von *ept/tsg101* (ESCRT-I) in Follikelzellen zu einer verfrühten *hnt*-Expression in Stadium S5 führt und der Ausfall von *hrs* keinen Einfluss auf die *hnt*-Expression besitzt (Vaccari et al. 2008). Allerdings konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass der Reporter *Gbe+Su(H)-GFP_{nls}* schon weit vor Stadium S5 Notch-Aktivität in *ept^{P26}*-mutanten Follikelzellen detektieren kann.

Der zusätzliche Verlust von *hrs* in *lgd^{d7}*-mutanten Follikelzellen, durch die Verwendung der Doppelmutante *lgd^{d7},hrs^{D28}* zeigte außerdem, dass, genau wie in der Flügelimaginalscheibe, die durch den *lgd* Verlust ausgelöste ektopische Notch-Aktivierung unterdrückt werden kann und bekräftigt die Annahme, dass Lgd „downstream“ von Hrs fungiert. Desweiteren deutet das Ergebnis auf eine bereits zuvor aufgestellte Vermutung hin, dass Lgd und Hrs in Bezug auf die Notch-Aktivität eine antagonistische Beziehung besitzen (Childress et al. 2006; Gallagher and Knoblich 2006; Jaekel and Klein 2006; Troost et al. 2012).

Bei der Analyse der *lgd^{d7}*, *ept^{P26}*, *vps25^{Pb2931}* und *shrub⁴⁻¹*-mutanten Follikelzellen konnte gezeigt werden, dass die verfrühte *hnt*-Expression in *lgd^{d7}*-Zellen ab Stadium S5 und beim Verlust der ESCRTs schon ab Stadium S3/S4, und womöglich früher, auftritt. Dies Ergebnis deutet daraufhin, dass der Verlust von ESCRT-I – ESCRT-III zu einer deutlich stärkeren Notch-Aktivierung führt als der Verlust von *lgd* (**s.Abb.22**). Die Tatsache, dass die *hnt*-Expression, im Gegensatz zum Ausfall von *lgd*, auch zu einem früheren Zeitpunkt aktiviert werden kann, spricht gegen die zuvor aufgestellte Vermutung, dass zusätzliche Faktoren für die *hnt*-Expression benötigt werden.

Sie verstärken allerdings die Annahme, dass ausreichend Notch-Aktivität für diese Expression vorhanden sein muss, die durch den Ausfall der ESCRT-I-III Komponenten schon zu einem früheren Zeitpunkt gewährleistet wird.

Vermutlich muss ein Schwellenwert der Notch-Aktivität für die *hnt*-Expression überschritten werden, der durch den Ausfall von ESCRT Komponenten im Gegensatz zu dem von *lgd* früher erreicht wird.

Bei der Untersuchung eines anderen Signalweges konnte gezeigt werden, dass der Verlust von *lgd* zu einer ektopischen Expression des Reportergenkonstruktes *Dad-lacZ* in der frühen und mittleren Oogenese im Follikelepithel führt (s. **Abb.23**).

Da es sich bei *Dad*, um das natürliche Zielgen des Dpp-Signalweges handelt, deutet das Ergebnis darauf hin, dass der Ausfall von *lgd* im Follikelepithel nicht ausschließlich zu einer ektopischen Aktivierung des Notch-Signalweges, sondern auch zu einer ektopischen Dpp-Aktivierung führt. In der Flügelimaginalscheibe konnte in *lgd^{d7}*-homozygoten Flügelimaginalscheiben und auch in *lgd^{d7}*-mutanten Zellklonen, keine Veränderung der Expression von *Dad-lacZ* oder einem anderen Zielgen des Dpp-Signalweges beobachtet werden (unveröffentlichte Daten).

Dpp (Decapentaplegic) gehört zur Familie der TGF- β -Signal-Moleküle (Transforming Growth Factor- β), zu denen in *Drosophila* auch noch *60A* und *screw* gehören und kann als Morphogen sowohl über kurze als auch über längere Distanzen signalisieren (Padgett et al. 1987; Wharton et al. 1991; Doctor et al. 1992; Ferguson and Anderson 1992; Arora et al. 1994; Lecuit et al. 1996; Nellen et al. 1996). *dpp* kodiert für das Vertebraten Homolog BMP2/4 (bone morphogenetic protein) und wird unter anderem in einem Teil der anterioren Follikelzellen exprimiert, wo es für die Etablierung der Eihülle und der Polarität in der späten Oogenese benötigt wird (Padgett et al. 1987; Twombly et al. 1996). *dpp* wird ebenfalls in den Kappen-Zellen (Cps) und den meisten posterior gelegenen inneren Hüll-Zellen exprimiert (Xie and Spradling 1998; Zhu and Xie 2003). Zu den weiteren Komponenten des Dpp-Signalweges gehören die Typ-I Serin/Threonin-Kinase-Transmembranrezeptoren Saxophone (Sax) und Thick veins (Tkv), sowie der Typ-II Serin-/Threonin-Kinase-Transmembranrezeptor Punt (Brummel et al. 1994; Penton et al. 1994; Xie et al. 1994; Letsou et al. 1995; Ruberte et al. 1995; Nellen et al. 1996; Xie and Spradling 1998). Die Komponenten *mothers against dpp* (*mad*), *Medea* (*Med*) und *Daughters against dpp* (*Dad*) kodieren für eine Familie konservierter TGF- β -Vermittler (Sekelsky et al. 1995; Tsuneizumi et al. 1997; Das et al. 1998; Hudson et al. 1998; Wisotzkey et al. 1998).

In *Drosophila* bindet Dpp den Typ-I (Sax und Tkv) und den Typ-II Rezeptor (Abadie et al.) und erlaubt so der konstitutiv aktiven Punt-Kinase die Typ-I-Kinasen zu phosphorylieren und somit zu aktivieren. Diese phosphorylieren wiederum den Vermittler

Mother against dpp (Mad) und es entsteht phosphoryliertes Mad (pMad), welches sich mit Medea (Med) verbindet und in den Zellkern wandert um dort als Transkriptionsaktivator die *dpp*-Zielgen-Expression zu induzieren (s.Abb.46) (Xie and Spradling 1998).

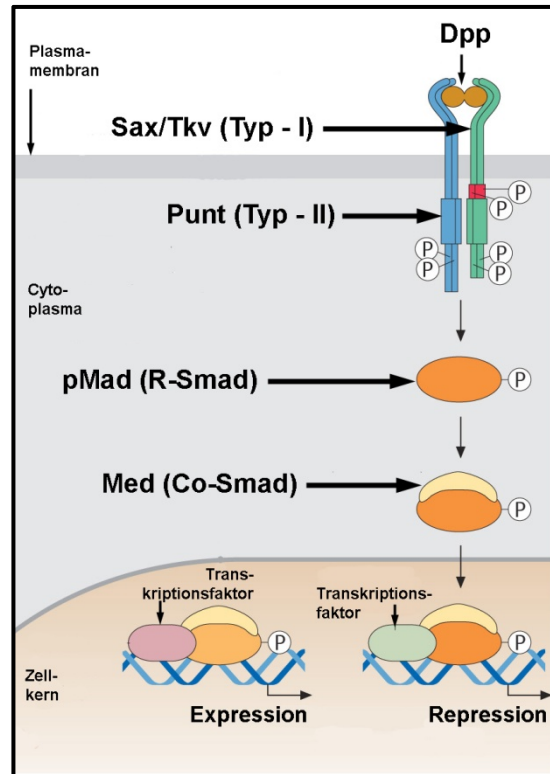


Abb.46: Schematische Darstellung des Decapentaplegic (Dpp)-Signalweges

Der Ligand Dpp bindet an den Typ-I Rezeptor (Sax/Tkv) und den Typ-II Rezeptor (Abadie et al.), wodurch die konstitutiv aktive Punkt-Kinase Sax/Tkv phosphoryliert. Diese phosphorylieren Mad (pMad), welches einen Komplex mit Med eingeht und in den Zellkern wandert um die Genexpression zu starten oder zu unterdrücken. (Entnommen und modifiziert aus Janning/Knust-Genetik)

Durch die Verwendung der Doppelmутanten *lgd^{d7},aph-1^{D35}* konnte gezeigt werden, dass diese ektopische *Dad-lacZ* Expression unabhängig vom Notch-Signalweg ist, da in den *lgd^{d7},aph-1^{D35}*-Follikelzellen die *Dad*-Expression nicht unterdrückt werden konnte (s.Abb.23). Die Analyse der *Dad-lacZ* Expression beim Ausfall der ESCRT-0 - ESCRT-III Komponenten zeigte, dass der Ausfall aller Mitglieder, *hrs* eingeschlossen, ebenfalls zur ektopischen *Dad*-Expression in der frühen und mittleren Oogenese führt im Follikelepithel (s.Abb.24).

Im Gegensatz zur Notch-Aktivierung, konnte beim Ausfall von *hrs* (ESCRT-0), eine ektopische *Dad* Expression detektiert werden. Es konnte bereits zuvor gezeigt werden, dass Hrs für den Dpp-Signalweg nicht benötigt wird, aber der Ausfall von *hrs* zur

schwachen Expression des Dpp-Zielgens *spalt* in der Flügelimaginalscheibe führt, was auf eine Rolle von Hrs als negativer Regulator des Dpp-Signalweges hinweist (Jekely and Rorth 2003). Desweiteren konnte gezeigt werden, dass der Verlust von *vps25* in der Flügelimaginalscheibe zur ektopischen Expression des Dpp-Zielgens *omb* (*optomotor blind*) führt, was ebenfalls auf eine negative Regulation des Dpp-Signalweges hinweist (Thompson et al. 2005). Der Ausfall von *ept* (ESCRT-0) und *shrub* (ESCRT-III) konnte bisher nicht mit der ektopischen Expression von *Dad*, einem anderen Dpp-Zielgen, oder der negativen Regulation des Dpp-Signalweges assoziiert werden. Die ektopische *Dad*-Expression in *lgd*- und ESCRT-mutanten Follikelzellen deutet zwar auf die Aktivierung des Dpp-Signalweges hin, da es sich bei *Dad* um das natürliche Zielgen handelt, aber um die Abhängigkeit der *Dad*-Expression vom Dpp-Signalwege zu beweisen, müssen zusätzliche Experimente durchgeführt werden.

Zum Einen sollte die Expression von *dpp-lacZ* in *lgd^{d7}*-mutanten Follikelzellklonen untersucht werden um zu überprüfen, ob es zur Hochregulation der Expression des Liganden Dpp kommt. Die wildtypische Expression von *dpp-lacZ* beschränkt sich auf die somatischen Zellen des Germariums welche die Keimbahnstammzellen umgeben (Kappen-Zellen, Escort-Zellen und Hüll-Zellen) und auf die anterioren Follikelzellen ab Stadium 9, genau wie *Dad-lacZ* (Twombly et al. 1996). Eine ektopische Expression von *dpp-lacZ* in den *lgd^{d7}*-Zellen würde darauf hinweisen, dass der Verlust von *lgd* die Expression von Dpp auslöst. Fehlende *dpp-lacZ* Expression in *lgd^{d7}*-mutanten Zellen dagegen würde dafür sprechen, dass die ektopische Expression von *Dad-lacZ* womöglich ligandenunabhängig erfolgt. Die Analyse der *dpp-lacZ* Expression in *ept^{P26}*-mutanten Follikelzellklonen konnte keine Expression des Liganden zeigen (Daten der Masterarbeit vom Kim Morawa) und auch die Untersuchung der *dpp-lacZ* Expression in *vps25*-mutanten Flügelimaginalscheiben zeigte ebenfalls keine ektopische *dpp*-Expression (Thompson et al. 2005). Die ektopische *dpp-lacZ* Expression *vps25*-mutanter Beinimaginalscheiben wird aufgrund einer antagonistischen Dpp-Wg Schleife ausgelöst, die im Flügel nicht vorliegt und im Follikelepithel bisher ebenfalls nicht beschrieben wurde (Thompson et al. 2005).

Diese Beobachtungen deuten daraufhin, dass es auch in *lgd^{d7}*, *hrs^{D28}*, *vps25^{Pb2931}* und *shrub⁴⁻¹*-mutanten Follikelzellklonen nicht zur ektopischen *dpp*-Expression kommt und die Expression von *Dad-lacZ* ligandenunabhängig erfolgt. Um zu überprüfen, ob die Rezeptoren des Dpp-Signalweges für die ektopische Expression von *Dad-lacZ* in *lgd^{d7}*-Follikelzellen benötigt werden, wurde bereits die Doppelmutante *lgd^{d7},tkv^{a12}* hergestellt.

Die Analyse der *Dad-lacZ* Expression in *lgd^{d7},tkv^{a12}*-mutanten Follikelzellen soll klären, ob die *Dad*-Expression abhängig vom Dpp-Signalweg ist (Masterarbeit Kim Morawa). Eine weitere Methode um zu prüfen, ob die ektopischen *Dad*-Expression in *lgd^{d7}*-Zellen abhängig vom Dpp-Signalweges ist, stellt die anti-pMad Antikörperfärbung dar. Mad wird nur durch die Aktivität des Typ-I-Rezeptors Tkv phosphoryliert. Aus diesem Grund dient die pMad Antikörperfärbung als Indikator einer erhöhten Aktivierung des Dpp-Signalweges (Wiersdorff et al. 1996; Inoue et al. 1998).

4.3 Der Funktionsverlust von *lgd* im Follikelepithel bei *Drosophila* führt zu einem Abbaudefekt des Notch-Rezeptors, welcher vermutlich für die ektopische Notch-Aktivierung verantwortlich ist

Lgd und die ESCRT-I - ESCRT-III Komponenten sind am konstitutiven Transport des Notch-Rezeptors durch den endosomalen Transportweg beteiligt und der Verlust der *lgd* Funktion führt zur Akkumulation des Notch-Rezeptors in vergrößerten späten endosomalen Kompartimenten. Diese Notch-Rezeptor Anreicherung in den Endosomen scheint für die ligandenunabhängige Aktivierung des Notch-Signalweges verantwortlich zu sein (Moberg et al. 2005; Thompson et al. 2005; Jaekel and Klein 2006; Vaccari et al. 2008).

Durch die Verwendung der früh- und spät-endosomalen Markers Rab5 und Rab7 und des anti-Nextra und anti-Nintra Antikörpers, konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass genau wie in den *lgd^{d7}*-Zellen der Flügelimaginalscheibe, der Verlust von *lgd* im Follikelepithel zu einem Defekt im endosomalen Transportweg und zu einer Akkumulation des Notch-Rezeptors in späten endosomalen Kompartimenten führt (**s.Abb.25 und 26**). Die gleichzeitige Verwendung des anti-Nintra Antikörpers und der Protein-Trap-Linie Notch-YFP bestätigte durch Ko-Lokalisierung die Akkumulation des „full-length“ Notch-Rezeptors im Follikelepithel (**s.Abb.25**).

Der Defekt im endosomalen Transport und die Akkumulation des Notch-Rezeptors in vergrößerten Endosomen, deuten auf einen fehlerhaften Abbau des Notch-Rezeptors hin, welcher für die ektopische Notch-Aktivierung verantwortlich sein könnte.

Während in allen *lgd^{d7}*-mutanten Follikelzellen eine Aktivierung des Notch-Signalweges, mit Hilfe des Notch-Markers *Gbe+Su(H)-GFP_{nls}*, nachweisbar ist (**s.Abb.25**), können die

Antikörper anti-Nextra und anti-Nintra, sowie die Notch-YFP-Linie, die Notch-Rezeptor Akkumulation nicht in jeder *lgd^{d7}*-mutanten Follikelzellen nachweisen (**s.Abb.25**).

Das Ergebnis deutet möglicherweise daraufhin, dass die Ligandenunabhängige Aktivierung in *lgd^{d7}*-Follikelzellen nicht durch die Notch-Rezeptor Akkumulation in Endosomen ausgelöst wird. Es besteht allerdings auch die Möglichkeit, dass mit Hilfe der verwendeten Marker für den Notch-Rezeptor eine ausreichende Akkumulation nicht nachweisbar ist.

Der Verlust von *hrs* in *lgd*-mutanten Zellen der Flügelimaginalscheibe verhindert die ektopische Aktivierung des Notch-Signalweges, was darauf hindeutet dass die Funktion von Lgd downstream von Hrs benötigt wird (Childress et al., 2006; Gallagher und Knoblich, 2006; Jaekel und Klein, 2006; Troost et al., 2011).

Der Funktionsverlust von *lgd* im Follikelepithel führt ebenfalls zu einer ektopischen Aktivierung des Notch-Signalweges und diese ektopische Aktivierung kann durch den Verlust von *hrs* in *lgd*-mutanten Follikelzellen unterdrückt werden (**s.Abb.21**).

In Bezug auf die Notch-Aktivität liegt also vermutlich in den Zellen der Flügelimaginalscheibe und im Follikelepithel eine antagonistische Beziehung zwischen Lgd und Hrs vor (Childress et al. 2006; Gallagher and Knoblich 2006; Jaekel and Klein 2006; Troost et al. 2012).

Dagegen konnte gezeigt werden, dass zwischen Lgd und Hrs in Bezug auf die endosomale Morphologie und die Akkumulation des Notch-Rezeptors in Endosomen eine mögliche synergistische Beziehung vorliegt, da der Verlust beider Proteine zusammen zu einer verstärkten Notch-Rezeptor-Akkumulation führt (unveröffentlichte Daten).

Durch die Detektion des Notch-Rezeptors in *lgd^{d7}* und *hrs^{D28}*-mutanten Follikelzellen, verglichen mit *lgd^{d7},hrs^{D28}*-Follikelzellen, konnte diese synergistische Beziehung zwischen Lgd und Hrs auch für das Follikelepithel gezeigt werden, da der Verlust beider Proteine zu einer starken Zunahme Nextra-positiver Endosomen in nahezu allen mutanten Follikelzellen führt (**s.Abb.26**).

Wie bereits zuvor erwähnt ist der Verlust der ESCRT-I – ESCRT-III Komponenten ebenfalls mit der Akkumulation des Notch-Rezeptors und der ektopischen Notch-Aktivierung assoziiert (Moberg et al. 2005; Thompson et al. 2005).

Durch die vergleichende Analyse der Notch-Rezeptor-Akkumulation in *hrs^{D28}*- (ESCRT-0), *ept^{P26}*-(ESCRT-I) und *shrub⁴⁻¹*-(ESCRT-III) mutanter mit *lgd^{d7}*-mutanter Follikelzellen, konnte gezeigt werden, dass die Akkumulation beim Ausfall von *lgd* und *hrs* relativ

schwach ist und nur in einigen mutanten Zellen beobachtet wird und beim Verlust von *ept* und *shrub* sehr stark und in nahezu jeder Zelle nachweisbar ist (s. **Abb.27**).

Bezogen auf die endosomale Morphologie erscheinen die Endosomen beim *hrs* Ausfall kleiner als beim *lgd* Verlust, wogegen die Endosomen in *ept* und *shrub* mutanten Zellen deutlich größer sind als in *lgd* Zellen.

Die deutliche Erhöhung der Notch-Rezeptor-Akkumulation und der Nachweis in fast allen Zellen in *ept* und *shrub* Klonen deutet, deutlicher als in *lgd*-Zellen, darauf hin, dass die Notch-Akkumulation im Follikelepithel verantwortlich ist für die ligandenunabhängige Notch-Aktivierung. Ob es hier zu einem Defekt im Abbau des Notch-Rezeptors kommt, wurde nicht untersucht.

Diese stärkere Notch-Anreicherung in Endosomen könnte außerdem verantwortlich sein für die beobachtete frühere *hnt*-Expression in *ept* und *shrub*, verglichen mit *lgd*-Zellen, welche durch eine höhere Notch-Aktivität ausgelöst werden könnte.

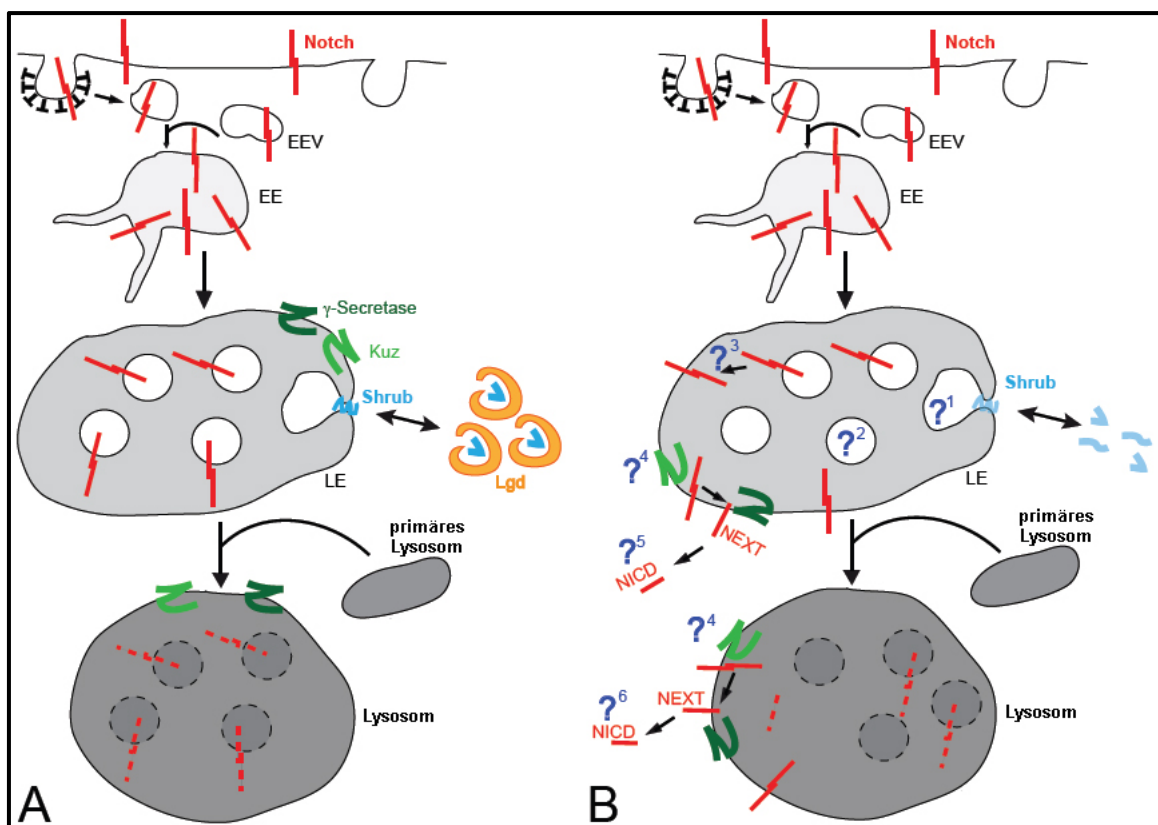


Abb.47: Modell der Notch Aktivierung in *lgd* mutanten Zellen

A) Abbau des Notch Rezeptors in wildtypischen Zellen. Notch (rot) wird in frühe endosomale Vesikel (EEV, early endosomal vesicle) endozytiert, welche fusionieren und frühe Endosomen (EE, early endosome) bilden. Während der Reifung der EE zu einem späten Endosom (LE, late endosome) wird der Notch Rezeptor in intraluminalen Vesikeln (ILV) einverleibt. Die Bildung der ILV wird durch die ESCRT Komplexe vermittelt, welche in der Graphik durch die ESCRT-III Komponente Shrub dargestellt sind. Für die volle Shrub-Aktivität wird die Interaktion mit Lgd im Cytosol benötigt. Durch die Fusion des LE mit dem Lysosom, wird der luminalen Inhalt mit den ILV abgebaut. B) Fehlerhafter Abbau des Notch Rezeptors in *lgd*-mutanten

Zellen. Der Notch Rezeptor wird anfänglich noch normal ins EE endozytiert. Der Verlust von *lgd* führt auf unbekannte Weise zu einer verringerten Shrub Aktivität, welche womöglich in fehlerhafter Bildung von ILV resultiert (?¹), einer niedrigeren Effizienz in der Einbringung des Rezeptors in ILV (?²) oder einer möglichen Rück-Fusion der ILV mit der limitierenden Membran (?³). In allen Fällen verbleiben ein Anteil oder alle Notch Rezeptoren an der limitierenden Membran was zur Aktivierung des Signalweges im LE (?⁴) oder im Lysosom (?⁵) führt, auf Kuz-abhängige oder unabhängige (hellgrün), aber definitiv γ -Secretase-abhängige (dunkelgrün) Art und Weise. (Troost et al., 2012; Graphik entnommen und modifiziert aus Troost et al., 2012)

Alle Ergebnisse bei der Analyse von Lgd im Follikelepithel deuten darauf hin, dass Lgd ein negativer Regulator des Notch-Signalweges ist und für den Transport des Notch-Rezeptors durch den endosomal Transportweg benötigt wird.

Allerdings klären die Resultate nicht wie es zur eigentlichen Aktivierung des Notch-Signalweges in den Endosomen kommt. Mit Hilfe eines kürzlich veröffentlichten Modells soll versucht werden Möglichkeiten für die Aktivierung darzustellen (Troost et al. 2012).

Es konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von Notch in *lgd*^{d7}-mutanten Zellen, sowohl in der Flügelimaginalscheibe als auch im Follikelepithel, ligandenunabhängig aber γ -Secretase-abhängig erfolgt (Childress et al. 2006; Gallagher and Knoblich 2006; Jaekel and Klein 2006; Troost et al. 2012). Die Abspaltung der intrazellulären Notch-Rezeptor-Domäne wird durch den γ -Secretase-Komplex vermittelt und benötigt zuvor die Entfernung der extrazellulären Rezeptor-Domäne (De Strooper et al. 1999; Struhl and Greenwald 2001; Troost et al. 2012). Die Abspaltung der Ectodomäne wird normalerweise auf ligandenabhängige Weise durch die Metalloprotease Kuzbanian (Kuz) vermittelt. Allerdings konnte u.a in dieser Arbeit gezeigt werden, dass deren Aktivität für die Notch-Aktivierung in den *lgd*-Zellen anscheinend nicht mehr benötigt wird (**s.Abb.20**).

Folglich muss in den Endosomen die Entfernung der extrazellulären Notch-Rezeptor-Domäne über einen alternativen Mechanismus erfolgen. *lgd* mutante Endosomen könnten ein Lumen aufweisen, welches die Interaktion des Notch-Heterodimers schwächt oder zu einer Konformationsänderung führt, wodurch die Spaltungsstelle für die γ -Secretase freigelegt wird und ligandenunabhängige Notch-Aktivierung ausgelöst wird. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass die γ -Secretase in Endosomen agiert und die optimale Aktivität bei einem niedrigen pH besitzt, welche typisch für späte Endosomen ist (Lah and Levey 2000; Pasternak et al. 2003; Gupta-Rossi et al. 2004; Urra et al. 2007).

Es besteht auch die Möglichkeit, dass die extrazelluläre Domäne durch aktivierte Peptidasen in der sauren Umgebung später Endosomen oder Lysosomen abgebaut wird und der verbleibende Notch-Rezeptor kann anschließend durch die γ -Secretase geschnitten werden. Das oben dargestellte Modell kann auch erklären warum der Ausfall der ESCRT-I - ESCRT-III Komponenten zur Aktivierung des Notch-Signalweges führt. Da die

ESCRT-mutanten Zellen keine ILVs mehr bilden können, kann der Notch-Rezeptor auf ähnliche Weise aktiviert werden.

Allerdings bleibt weiter unklar warum der Verlust von ESCRT-0 nicht zu einer ligandenunabhängigen Aktivierung des Notch-Rezeptors führt.

Durch ein kürzlich veröffentlichtes Modell kann dieser Unterschied möglicherweise erklärt werden (**s.Abb.48**). Wahrscheinlich besteht die Funktion des ESCRT-0-Komplexes in der Rekrutierung und Ansammlung ubiquitinierten Fracht an der endosomalen Membran (Mayers et al. 2011). Durch die Oligomerisierung von ESCRT-0 an der endosomalen Membran, werden zahlreiche UBDs (ubiquitinierungsbinde Domänen) zusammengefügt, welche wahrscheinlich für die Konzentrierung der ubiquitinierten Rezeptoren in Microdomänen entscheidend sind (Mayers et al. 2011).

Da in *lga^{dl7}*-Follikelzellen diese mögliche Aufkonzentrierung des Notch-Rezeptors aufgrund des funktionellen ESCRT-0 Komplexes noch stattfinden kann, wird die ligandenunabhängige Notch-Aktivierung begünstigt. Vermutlich verhindert die fehlerhafte Ansammlung des Notch-Rezeptors in Microdomänen in *hrs*-Zellen die ligandenunabhängige Notch-Aktivierung.

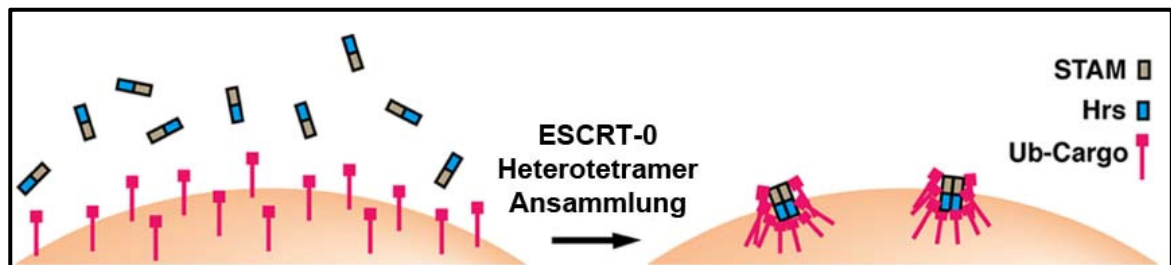


Abb.48: ESCRT-0 rekrutiert und konzentriert ubiquitinierte Fracht an der endosomalen Membran

Die Hrs:STAM Bindung an endosomalen Membranen vermittelt eine homotypische Interaktion zwischen Hrs Molekülen, welche in der Oligomerisierung resultiert. Der Hauptteil von ESCRT-0 scheint aus Heterotetrameren aus Hrs und STAM zu bestehen, welche gleichzeitig zahlreiche ubiquitinierte Fracht aufnehmen. Dies führt zur Clusterbildung der ubiquitinierten Fracht in Microdomänen der endosomalen Membran (Mayers et al. 2011).

4.4 Der Funktionsverlust von *lga* in der Keimbahn führt zur Bildung zusätzlicher Keimzellen, der ektopischen Expression des Dpp-Reportergens *Dad-lacZ*, einem Defekt im endosomalen Transport und der Akkumulation von Delta und der extrazellulären Notch-Rezeptor-Domäne in Endosomen

Ältere Untersuchungen der Funktion von Lgd während der Oogenese bzw. der Embryogenese zeigten, dass Lgd für die normale Keimbahnentwicklung bzw. für die anschließende Embryogenese benötigt wird (Szabad et al. 1991).

Die Bildung mutanter *lgd*-Keimbahnklone, welche durch mitotische Rekombination mit Hilfe der DFS-Technik (Dominant-Female-Sterile) hergestellt wurden (Perrimon and Gans 1983), führte zur Bildung sehr weniger Embryonen (ca.4% verglichen mit dem Wildtyp), welche durch zahlreiche Defekte gekennzeichnet waren (Szabad et al. 1991). Außerdem konnte gezeigt werden dass der Verlust von *lgd* zur Degeneration von Eikammern führt und zur Bildung zusätzlicher Keimzellen, einem Merkmal für die „ovarian tumore mutants“ (Storto and King 1989; Szabad et al. 1991).

Um eine detailliertere Analyse der Funktion von Lgd während der Oogenese bzw. der frühen Embryogenese und die Auswirkungen auf den Notch Signalweg und das zentrale und periphere Nervensystem durchzuführen, wurde das hypomorphe Allel *lgd^{d3}*, welches von Szabad et al. verwendet wurde, durch das amorphe Nullallel *lgd^{d7}* ersetzt und die Analyse des Verlustes von *lgd* in Keimbahnklonen wiederholt (Szabad et al. 1991).

Zunächst wurden mit Hilfe der FLP/DFS- und des FLP/FRT-Systems *lgd^{d7}*-mutante *ovo^D*-Keimbahnklone erzeugt und deren Phänotyp analysiert (Perrimon and Gans 1983; Golic and Lindquist 1989; Chou and Perrimon 1992; Chou and Perrimon 1996).

Wie bereits bei Szabad et al. beschrieben, konnten auch mit dem Nullallel *lgd^{d7}* nur sehr wenige *lgd^{d7}*-mutante Embryonen generiert werden. Diese zeigten so dramatische Defekte dass eine Analyse der Embryonen nicht möglich war.

Das Ergebnis bestätigt die bereits bekannten Beobachtungen des Funktionsverlustes von *lgd* in der Keimbahn und erhärtet die notwendige Funktion von Lgd bei der Keimbahnentwicklung bzw. der Embryogenese.

Um die Funktion von Lgd bei der Keimbahnentwicklung detaillierter zu untersuchen und eine Beteiligung des Notch-Signalweges aufzudecken wurde der Ausfall von *lgd* in der Oogenese studiert.

Bei der Funktion von Lgd in der Keimbahn bei *Drosophila* konnte gezeigt werden, dass der Verlust der *lgd* Genfunktion in einigen Fällen zur Vermehrung der Anzahl der Keimzellen führt, welche aufgrund fehlender Notch-Aktivität in der Keimbahn, durch einen Notch-unabhängigen Mechanismus ausgelöst wird (**s.Abb.29 und 30**).

Dieses Phänomen wurde auch bei der Verwendung des hypomorphen Allels *lgd^{d3}* in den Experimenten von Szabad et al (1991), dokumentiert (Szabad et al. 1991), allerdings

wurden hier weder auf die Anzahl noch die Häufigkeit der zusätzlichen Keimzellen eingegangen.

Mit Hilfe von Stapelaufnahmen am Fluoreszenzmikroskop konnte gezeigt werden, dass einige *lgd* mutanten Keimbahnklone 32 Keimzellen statt der wildtypischen 16 Keimzellen aufwiesen (**s.Abb.29**) und durch eine statistische Auswertung von 500 *lgd* mutanten Eikammern konnte ca. 15% mit zusätzliche Keimzellen identifiziert werden (**s.Tabelle 10**). Außerdem konnten viele degenerierte Eikammern in der späten Oogenese beobachtet werden, aber ob diese durch den Verlust der *lgd* Funktion bzw. durch zusätzliche Keimzellen verursacht werden, konnte nicht bestätigt werden.

Sie könnten allerdings die geringe Anzahl an Embryonen erklären, die durch die Induktion von *lgd ovo^D*-Klonen auftraten. Bei einigen Weibchen war es unmöglich *lgd^{d7}*-mutante Ovarien zu analysieren, weil die Ovarien vollständig zerstört und durch weiße Kügelchen im Innern des Abdomens ersetzt wurden. Eine Analyse dieser Kügelchen schlug fehl. Ob die Zerstörung der Ovarien durch den *lgd* Verlust oder den Heatshock ausgelöst wurde oder natürlichen Ursprungs ist, konnte nicht festgestellt werden.

Die Anwesenheit der doppelten Keimzellanzahl kann durch zwei Möglichkeiten erklärt werden: erstens durch eine zusätzliche fünfte Mitose der Cysten im Germarium oder zweitens durch eine Fusion zweier benachbarter Eikammern aufgrund fehlerhafter Stielbildung.

Eine Fusion zweier Eikammern wird häufig durch den Verlust einer Komponente des Notch-Signalweges ausgelöst (Xu et al. 1992). Es konnte allerdings gezeigt werden, dass der Notch-Signalweg in der Keimbahn nicht aktiv ist und dass die Bildung zusätzliche Keimzellen durch einen Notch-unabhängigen Mechanismus ausgelöst wird. Außerdem treten bei einer Fusion benachbarter Eikammer häufig 2 Oocytenkerne auf, die beim Verlust von *lgd* allerdings nicht beobachtet wurden. Es konnte immer die Anwesenheit eines Oocytenkern und 31 Nährzellen ausgemacht werden. Deshalb deutet die Anwesenheit überzähliger Keimzellen in *lgd^{d7}*-mutanten Keimbahnklonen auf eine zusätzliche fünfte Mitose im Germarium hin.

In einer wildtypischen 16-Zell-Zyste sind die Zellen über sogenannte Ring-Kanäle miteinander verbunden. Von diesen 16 Zellen besitzen zwei Zellen vier Ring-Kanäle, zwei Weitere drei Ring-Kanäle, vier Andere zwei Ring-Kanäle und acht Zellen einer 16-Zell-Zyste besitzen nur einen einzigen Ring-Kanal. Bei einer inkorrekten Verpackung zweier 16-Zell-Zysten würden dagegen vier Zellen mit vier Ring-Kanälen entstehen. Wenn man davon ausgeht das die beiden 16-Zell-Zysten unabhängig agieren, dann sollten sich

allerdings zwei Oocyten bilden. Dagegen würden bei einer extra Runde der Mitose in zwei Zellen einer 16-Zell-Zyste mit fünf-Ring-Kanälen resultieren und es wäre keine zweite Oocyte zu erwarten. Die Auswertungen der Hoechst-Färbungen an *lgd*-mutanten Eikammern, konnte die Anwesenheit eines einzelnen Oocytenkerns bestätigen, was für eine zusätzliche Mitose spricht.

Zur Bestätigung dieser Annahme müssten *lgd*-mutante Keimbahnklone einer anti-Orb Antikörperfärbung unterzogen werden, da Orb (oo 18 RNA-binding protein) nur in der Oocyte exprimiert wird und als Oocytenmarker dient, und mit Hilfe des Konstruktes *nos-Gal4,UASp-VP16-Act5c-GFP*, welches Ringkanäle markiert, die Anzahl der Ringkanäle innerhalb der Eikammern bestimmt werden.

Die Hinweise, dass der Verlust von *lgd* zu einer zusätzlichen Mitose und der Bildung von 32 Keimzellen führt, deuten daraufhin, dass Lgd für die Regulation der Mitose in der Keimbahn benötigt wird.

Die Bildung von 32 Keimzellen durch eine fünfte Mitose konnte bereits in anderen Mutanten beobachtet werden (Hawkins et al. 1996; Narbonne-Reveau et al. 2006).

Es konnte gezeigt werden, dass das Gen *encore* (*enc*) für die Keimbahn Mitose und die Oocyten Differenzierung benötigt wird und dass Mutationen im *enc* Gen zu einer zusätzlichen Mitose und der Bildung von 31 Keimzellen und einer Oocyte führen. (Hawkins et al. 1996). Das *encore* Genprodukt ist mit dem SCF-UPS-Komplex (Skp/Cullin/Rbx1/F-Box Protein und Ubiquitin-Proteasom-System), welcher den Übergang von der G1 in die S-Phase reguliert, assoziiert und wird für den korrekten Austritt aus der Mitose benötigt. Die fehlerhafte Runterregulation von Cyclin E nach vier Zellteilungen in Verbindung mit der Akkumulation von Cyclin A liefert Konditionen für eine zusätzliche Mitose (Ohlmeyer and Schüpbach 2003).

Bislang gibt es keine Hinweise darauf, dass Lgd mit dem SCF-UPS-Komplex in Verbindung steht. Ob die in *lgd*-mutanten Keimbahnklonen auftretenden 32 Keimzellen ebenfalls durch eine zusätzliche Mitose aufgrund einer Veränderung in der Cyclin A und Cyclin E Verteilung zustande kommen, könnte mit Hilfe von Antikörperfärbungen gegen CycA und CycE gezeigt werden.

Mutationen im Gen *fused* (*fu*), welches für eine Serin/Threonin-Kinase kodiert und einen positiven Regulator des Hedgehog-Signalweges darstellt, führen ebenfalls in einigen Fällen zu einer zusätzlichen Mitose der Keimbahnzysten und zeigen, dass Fused für die Regulation der Mitose der Keimbahn Zysten benötigt wird. Der Verlust der *fu* Funktion in

der Keimbahn ist mit einer ektopischen Expression des Dpp-Zielgens *Dad* im Germarium und in älteren Eikammern assoziiert (Narbonne-Reveau et al. 2006).

Es konnte gezeigt werden, dass Fused zusammen mit der E3-Ubiquitin-Ligase Smurf die Ubiquitinierung und Proteolyse des Dpp-Rezeptors Thick veins (Tkv) in den Cystoblasten reguliert und auf diese Weise einen steilen Gradienten des Dpp-Signalweges zwischen Keimbahnstammzelle und Cystoblasten herstellt (Xia et al.).

Der Verlust der Fused Funktion führt dazu, dass der Tkv-Rezeptor nicht mehr ausreichend abgebaut wird und sich der Dpp-Gradient verschiebt und Dpp-Signaling und *Dad*-Expression auch in ektopischen Position nachweisbar ist.

In dieser Arbeit konnte ebenfalls gezeigt werden, dass der Verlust von *lgd* in der Keimbahn zu einer ektopischen Expression von *Dad-lacZ* führt (**s.Abb.32**). Außerdem konnte beobachtet werden, dass *lgd*-Klone die 32 Keimzellen enthielten eine stärkere *Dad-lacZ* Expression aufwiesen. Ob ein Zusammenhang zwischen der ektopischen *Dad*-Expression und der Bildung der zusätzlichen Keimzellen besteht, wurde bisher nicht überprüft. Desweiteren konnte festgestellt werden, dass es sich bei dieser *Dad*-Expression um einen Notch-unabhängigen Prozess handelt, da auch beim Verlust von *aph-1* in *lgd^{d7}*-mutanten Keimbahnzellen, immer noch ektopische *Dad*-Expression nachgewiesen werden konnte (**s.Abb.32**).

Genau wie im Follikelepithel, deutet die ektopische *Dad*-Expression auf die Aktivierung des Dpp-Signalweges hin und erhärtet die Rolle von Lgd als negativer Regulator des Dpp-Signalweges in der Oogenese bei *Drosophila*.

Genau wie im Follikelepithel kann die *Dad*-Expression in *lgd*-Zellen mehrere Gründe haben. Der Verlust von *lgd* könnte zur Expression des Liganden Dpp führen. Um diese Möglichkeit zu überprüfen, sollte die Expression von *Dpp-lacZ* in *lgd^{d7}*-mutanten Keimbahnklonen untersucht werden (Masterarbeit von Kim Morawa).

Die Expression von *Dad-lacZ* könnte allerdings auch Ligandenunabhängig erfolgen. Um diese Behauptung zu überprüfen, sollte die *Dad-lacZ* Expression in *lgd^{d7},tkv^{al2}*-mutanten Keimbahnklone untersucht werden (Masterarbeit von Kim Morawa).

Wenn Lgd eine Funktion als negativer Regulator des Dpp-Signalweges besitzt und neben dem Abbau des Notch-Rezeptors auch für den Abbau des Tkv-Rezeptors verantwortlich ist, dann könnte der Verlust von *lgd* auch zur Akkumulation des Rezeptors in endosomalen Kompartimenten führen. Um diese Behauptungen zu überprüfen, könnte die Verteilung des Tkv-Rezeptors in *lgd*-mutanten Keimbahnklonen mit Hilfe des anti-Tkv Antikörpers untersucht werden. Erste Versuche zeigten Akkumulationen des Tkv-Rezeptors in *lgd*-

mutanten Keimbahnklonen (Masterarbeit Kim Morawa). Zur Bestätigung wurde eine Rekombinante zwischen *lgdd7* und der Protein-Trap-Linie Tkv-YFP hergestellt, welche eindeutigere Beweise liefern soll (Masterarbeit Kim Morawa).

Ob der Verlust der ESCRT-0 - ESCRT-III-Komplexe ebenfalls zur Bildung zusätzlicher Keimzellen führt und zu einer ektopischen *Dad-lacZ* Expression wird ebenfalls momentan untersucht. Erste Analysen der Funktion von Shrub während der Oogenese zeigen, dass schon heterozygote *shrub*-Einklammern zusätzliche Keimzellen aufweisen und auch das Dpp-Zielgen *Dad* ektopisch exprimiert wird (Masterarbeit Kim Morawa).

Die ektopische Expression von *Dad-lacZ* sowohl im Follikelepithel als auch in der Keimbahn in *lgd^{d7}*-Zellen deutet darauf hin, dass der Dpp-Signalweg aktiviert wird. Allerdings bleibt die Art und Weise der Dpp-Aktivierung unklar. Es gibt allerdings Hinweise die auf eine ligandenunabhängige Aktivierung des Dpp-Signalweges hinweisen. Der Abbaufekt des Tkv-Rezeptors in *hrs*- oder in *fu*- mutanten Zellen führt zur ektopischen Expression von *Dad-lacZ* (Jekely and Rorth 2003; Narbonne-Reveau et al. 2006). Da Lgd eine Funktion im endosomalen Transport einnimmt besteht die Möglichkeit, dass der Abbau des Rezeptors in *lgd^{d7}*-Zellen ebenfalls gestört ist.

Allerdings wird durch den Abbaufekt des Tkv-Rezeptors die Frage aufgeworfen, wie es zu einer ligandenunabhängigen Aktivierung des Signalweges kommen kann, wenn der Rezeptor in Endosomen gefangen ist.

Da Lgd für die volle Funktion von Shrub benötigt wird, ist es möglich dass der Tkv-Rezeptor nicht in intraluminale Vesikel verpackt werden kann und seine intrazelluläre Domäne, wie die des Notch-Rezeptors, dem Cytoplasma zugewandt ist und die Möglichkeit besitzt zu signalisieren.

Damit der Tkv-Rezeptor signalisieren kann, muss er allerdings Heterodimere mit den anderen Dpp-Rezeptoren Saxophone (Sax) und Punt eingehen. Das bedeutet dass auch der Abbau dieser Rezeptoren Defekt sein muss und eine Akkumulation in Endosomen vorliegt. Die Ansammlung der verschiedenen Dpp-Rezeptoren in Endosomen könnte dazu führen, dass sie auch ohne den Liganden, aufgrund der geringen Distanz zueinander, autophosphorylieren und da die intrazelluläre Domäne dem Cytoplasma zugewandt ist, Mad phosphoryliert werden kann und somit der Dpp-Signalweg ligandenunabhängig ausgelöst wird. Da die Dpp-Aktivierung auch in *hrs*-Zellen stattfindet, besteht die Möglichkeit, dass der Rezeptor nicht in einem späten Endosom akkumulieren muss oder mit dem Lysosom fusionieren muss um aktiviert zu werden.

Bei der Analyse *lga^{d7}*-mutanter Keimbanklone konnte mit Hilfe der früh- und spätendosomalen Marker *tub-Rab5-CFP* und *tub-Rab7-YFP* ein sehr starker Defekt des endosomalen Transportes gezeigt werden (**s.Abb.34**). Dieser wird mit zunehmendem Alter der Eikammern immer gravierender und führt zu sehr großen Rab5 und Rab7 positiven Vesikeln und Klustern im Innern der Keimbahn und bestätigt auch in der Keimbahn die Funktion von Lgd beim endosomalen Transport. Es konnte nicht festgestellt werden, ob es sich dabei um frühe oder späte Endosomen handelt, aufgrund der starken Ko-Lokalisierung der beiden Marker.

Im Gegensatz zur Bildung der 32-Keimzellen in *lga^{d7}*-Keimbahnklonen, ist der Defekt im endosomalen Transport, genau wie die ektopische Expression von *Dad-lacZ* in jeder mutanten Eikammer nachweisbar.

Ob ein Zusammenhang zwischen defektem endosomalem Transport und der ektopischen *Dad*-Expression besteht wurde nicht untersucht. Allerdings konnte inzwischen gezeigt werden, dass der Dpp-Rezeptor Tkv in *lga^{d7}*-Keimbahnklonen in Endosomen akkumuliert (Mishra-Gorur et al. 2002) im Follikelepithel auf die Aktivierung des Signalweges hindeuten.

Desweiteren konnte mit Hilfe der Protein-Trap-Linie Notch-YFP und einer anti-Delta Antikörperfärbung gezeigt werden, dass die extrazelluläre Domäne des Notch-Rezeptors zusammen mit dem Liganden in großen Vesikeln in *lga^{d7}*-Keimbahnklonen akkumuliert. Da die Anwesenheit der intrazellulären Notch-Rezeptor Domäne nicht gezeigt werden konnte, deutet das Ergebnis darauf hin, dass der extrazelluläre Teil des Rezeptors durch *trans*-Endozytose in die Keimbahn aufgenommen wurde und, dass der Abbau des Komplexes gestört ist. Der Abbaufekt des extrazellulären Teils des Rezeptors in *lga^{d7}*-Keimbahnklonen hat keine Auswirkungen auf die Notch-Aktivität im wildtypischen Follikelepithel. Ob der Defekt im endosomalen Transport im Zusammenhang mit degenerierten Eikammern steht wurde nicht untersucht.

Um dem endosomalen Defekt auf den Grund zu gehen und die Morphologie der Endosomen in *lga^{d7}*-Keimbahnklonen auf elektronenmikroskopischer Ebene zu untersuchen wurden während dieser Arbeit eine *UASp-lgd-RNAi* und eine *UASp-Dcr2*-Linie hergestellt. Allerdings konnte noch keine Transformanten gewonnen werden.

Mit Hilfe dieser und der *nos-Gal4*-Treiberlinie (maternales *nanos*-Gal4), einem Keimbahnspezifischen Treiber, soll gezielt innerhalb der Keimbahn die Lgd-Synthese runtergeschaltet werden, um den Ausfall der *lga*-Funktion ohne Klon-Induktion zu analysieren.

4.5 Die Analyse der Determination der sensorischen Vorläuferzellen im peripheren Nervensystem von *D. melanogaster*

Eine sehr wichtige Aufgabe des Notch-Signalweges bei der Entwicklung des peripheren Nervensystems, ist die Verwirklichung der lateralen Inhibition (Simpson 1990). Durch diesen Mechanismus ist der Notch-Signalweg in der Lage anfänglich identischen Zelltypen, zwei unterschiedliche Zellschicksale zu vermitteln (neurales oder epidermales Schicksal). Während der lateralen Inhibition gibt es minimale Unterschiede in der proneuralen Aktivität, welche durch einen transkriptionellen Feedback Mechanismus zwischen gleichen Nachbarzellen zustande kommen. Dies führt zu einer Alles oder Notch Situation in welcher zwei verschiedene Zelltypen entstehen.

Innerhalb der proneuralen Kluster, führt die Notch-Aktivität zur Expression der *E(spl)*-Komplex-Gene, welche antagonistisch zur proneuralen Aktivität wirken. Eine Zelle die das Notch Signal empfängt ist weniger anfällig das SOP Schicksal anzunehmen, aufgrund der verringerten proneuralen Aktivität. Ein wichtiges Merkmal des Modells der lateralen Inhibition ist die Regulation der Expression des Notch-Liganden Delta durch die Aktivität der proneuralen Proteine. Folglich korreliert die hohe proneurale Aktivität mit hoher inhibitorischer Fähigkeit. Die Hemmung der proneuralen Aktivität resultiert in der Reduktion des Delta Levels und somit die Fähigkeit der Zellen seine Nachbarn zu hemmen.

In der simpelsten Vorstellung des Modells exprimieren anfänglich alle Zellen identische Level proneuraler Proteine und besitzen somit alle das Gleiche proneurale Potential. Diese Zellen hemmen sich gegenseitig über den Notch-Signalweg. Diese gegenseitige Hemmung hält den Level der proneuralen Aktivität unter einem Schwellenwert der für die Annahme des SOP Schicksals benötigt wird. Kleine Unterschiede in der Signalisierung unter den Zellen der proneuralen Kluster resultieren in kleinen Unterschieden in der proneuralen Aktivität, welche in kleinen Unterschieden in ihrer Fähigkeit ihre Nachbarn durch Delta (Dl) zu hemmen resultieren.

Durch den Feedback-Mechanismus werden anfänglich kleine Unterschiede in eine Alles-oder-Nichts Situation verstärkt und die nicht-inhibierten Zellen werden das SOP Schicksal annehmen, wogegen die inhibierten das epidermale Schicksal annehmen. Die *cis*-Inhibition hilft womöglich bei der Entscheidungsfindung und der Fehler Minimierung, wenn die erhöhten Deltalevel in der werdenden SOP die Notch-Aktivierung Zellautonom hemmen. Im Falle der Macrochaeten treten die SOPs an spezifischen Positionen innerhalb der proneuralen Cluster auf, was darauf hinweist das ihre Positionen vordeterminiert sind. Entsprechen dem aktuellen lateralen Inhibitions Models stellt die ungleiche Verteilung von *Emc* um die Zellen des proneuralen Cluster einen prädestinierenden Faktor dar, der den Selektionsprozess beeinflusst.

Die laterale Inhibition stellt ein simples Model dar, welches die Selektion einer sensorischen Vorläuferzelle und die Bildung epidermaler Nachbarzellen verdeutlicht (Cabrera 1990; Simpson 1990; Kunisch et al. 1994; Schweisguth 1995). Allerdings kann es einige Beobachtungen und neueste Resultate nicht erklären.

1. Frühere Arbeiten haben gezeigt, dass die uniforme Expression von Delta mit einem heterologen Promoter in *Delta*-mutanten Embryonen oder Imaginalscheiben in nahezu normaler Selektion der Neuroblasten bzw. der SOPs führt. Eine Beobachtung die suggeriert, dass der Feedback-Loop für die Selektion der Neuroblasten bzw. der SOPs nicht benötigt wird (Seugnet et al. 1997a; Seugnet et al. 1997b; Pitsouli and Delidakis 2005).
2. Desweiteren deckten die Analysen verschiedener neurogener Mutanten auf, dass die proneuralen Cluster der Flügelimaginalscheibe viel mehr Zellen umfasst als von der auftretenden SOP gehemmt werden könnten (Ye and Fortini 1998).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Verlust der Notch-Aktivität, durch den Ausfall der *Psn* Genfunktion, zur Fusion der proneuralen Cluster und der Bildung eines proneuralen Bandes innerhalb des Notums der Flügelimaginalscheibe führt und somit zur Neuralisierung des Gewebes (**s.Abb.41 und 44**). Die Bildung dieses proneuralen Bandes konnte auch bei *nic^{A7}*-mutanten (*nicastrin*) Flügelimaginalscheiben beobachtet werden (**unveröffentlichte Daten**). Die klonale Analyse von *kuz* und *aph-1* zeigte ebenfalls die Fusion einzelner proneuraler Cluster in der Flügelimaginalscheibe (**unveröffentlichte Daten**). Die Ergebnisse zeigen, dass wesentlich mehr Zellen in der Flügelimaginalscheibe das proneurale Schicksal annehmen können und dass nicht nur die Zellen eines proneuralen Clusters die Fähigkeit besitzen sich zur SOP zu entwickeln, sondern auch die

Zellen, die sich zwischen den proneuralen Klustern befinden. Allerdings konnte nie eine Fusion zwischen dem DC und dem SC Cluster und die Bildung ektopischer SOPs außerhalb des proneuralen Bandes nachgewiesen werden.

Der Vergleich der *sca-lacZ*- mit der *Gbe+Su(H)-GFP_{nls}*-Expression hat gezeigt, dass die proneuralen Cluster durch starke Notch-Aktivität voneinander getrennt werden (**s.Abb.33**). Die Tatsache, dass diese Cluster beim Ausfall des Notch-Signalweges fusionieren deuten darauf hin, dass der Notch-Signalweg an der Definition der proneuralen Cluster beteiligt ist.

Des Weiteren konnten in dieser Arbeit gezeigt werden, dass der Verlust der *emc*-Funktion zur Expression des proneuralen Zielgens *sca* in nahezu allen Zellen der Flügelimaginalscheibe führt (**s.Abb.43,44,45**). Die Analyse der *sca-lacZ* Expression und der Bildung ektopischer SOPs, durch Hnt-Färbungen, in *emc^{pel}*-homozygoten oder *emc^{pel}/emc^l*-transheterozygoten Flügelimaginalscheiben hat gezeigt, dass auch Zellen außerhalb des proneuralen Bandes proneurale Aktivität aufweisen und sich zu SOPs entwickeln können (**s.Abb.43,44**). Die klonale Analyse von *emc* und der damit verbundene komplette Verlust der *emc*-Funktion zeigte außerdem, dass alle Zellen der Flügelimaginalscheibe proneurale Aktivität aufweisen und sich einige zu SOPs determinieren (**s.Abb.45**). Außerdem konnte im Gegensatz zum *Psn*-Verlust und anderer Notch Komponenten auch eine starke proneurale Aktivität und die Bildung ektopischer SOPs zwischen dem DC und dem SC Cluster nachgewiesen werden (**s.Abb.43,44**).

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Emc einer der Faktoren ist, der außerhalb des proneuralen Bandes die proneurale Aktivität maßgeblich unterdrückt. Die Funktion des HLH-Proteins Extramacrochaetae besteht in der Inaktivierung der funktionell inaktiven Heterodimere mit den proneuralen bHLH-Proteinen über deren gemeinsamen Helix-Loop-Helix Domänen. Bis dato gibt es keine Hinweise darauf dass Emc die Genregulation beeinträchtigt (Campuzano 2001).

Die Anwesenheit der *sca*-Expression in *emc*-mutanten Zellen und die mangelnde Beteiligung von Emc an der Genregulation, deutet darauf hin, dass alle Zellen der Flügelimaginalscheibe die ganze Zeit proneurale Proteine exprimieren müssen (**s.Abb.43,44,45**). Allerdings ist diese ubiquitäre Expression von *ac* und *sc* nicht nachweisbar, da durch *in situ* Hybridisierungen, zur Detektion der *ac* und *sc* RNA, nur Transkript in den vorgesehenen proneuralen Klustern nachgewiesen werden konnten (Cubas et al. 1991; Kaspar et al. 2008). In allen anderen Zellen außerhalb der proneuralen Cluster muss die Expression von *ac* und *sc* verhindert werden.

Verantwortlich für die proneurale Aktivität außerhalb der wildtypischen proneuralen Kluster könnte das proneurale Protein Daughterless (Da) sein, welches, im Gegensatz zu *ac* und *sc* ubiquitär in der Flügelimaginalscheibe exprimiert wird (Massari and Murre 2000). Durch die Interaktion mit anderen, unbekannten proneuralen bHLH Proteinen oder durch Homodimerisierung könnte Da die Expression von *sca* und die Bildung ektopischer SOPs auslösen. Es konnte gezeigt werden, dass Emc die Bildung von Da Homodimeren verhindern kann (Cabrera et al. 1994; Bhattacharya and Baker 2011). Folglich führt der Verlust von *emc* zur Hochregulation der proneuralen Aktivität und zur Annahme des SOP Schicksals einiger Zellen. Zusammengefasst deuten die Ergebnisse daraufhin dass der Grundzustand aller Zellen der Flügelimaginalscheiben proneural bzw. neural ist.

Diese Behauptung wurde bereits zuvor aufgestellt bei der Charakterisierung des Zink-Finger-Proteins Klumpfuss, welches für die Determinierung einiger SOPs benötigt wird und die proneurale Aktivität verstärkt (Kaspar et al. 2008).

Die Verwendung der Protein-Trap-Linie Emc-YFP und der Vergleich mit der Enhancer-Trap-Linie *emc-lacZ*, welche in anderen Publikationen verwendet wurde, zeigten, im Gegensatz zum *emc-lacZ*, keine großen Unterschiede im Proteinlevel von Emc in Bereichen in denen SOPs entstehen (**s.Abb.45**). Die Emc-YFP-Linie ist voll funktionstüchtig ist und es konnte kein Borstenphänotyp in Homozygose festgestellt werden, deshalb scheint es die Expression des endogenen Emc widerzuspiegeln und für weitere Analysen geeigneter zu sein als die Enhancer-Trap-Linie *emc-lacZ*. durch den Vergleich der Emc-YFP mit der *sca-lacZ* Expression, konnte gezeigt werden, dass *emc* nahezu überall in der Imaginalscheibe exprimiert wird und die proneuralen Kluster in Regionen mit schwacher Emc Aktivität liegen (**s.Abb.45**). Das Ergebnis deutet darauf hin, dass Emc ebenfalls an der Definition proneuralen Kluster beteiligt ist.

Die bisherigen Daten weisen darauf hin, dass Emc und Notch an der Definition proneuraler Kluster beteiligt sind, könne aber die Determination einer SOP nicht erklären.

Das Modell der lateralen Inhibition erklärt nur wie die direkten Nachbarzellen der SOP gehemmt werden das Gleiche Schicksal anzunehmen, es begründet allerdings nicht wie Zellen über eine Distanz von mehreren Zelldurchmessern inhibiert werden können.

Es gibt mehrere Theorien wie Signale über eine längere Distanz ihr Ziel erreichen können (**s.Abb.49**) (Cohen 2003).

1. Diffusionsgradient (Sekretion eines Signalproteins)
2. Zellrelais (Signalübertragung von Zelle zu Zelle)

3. direkter Kontakt (Filopodien)

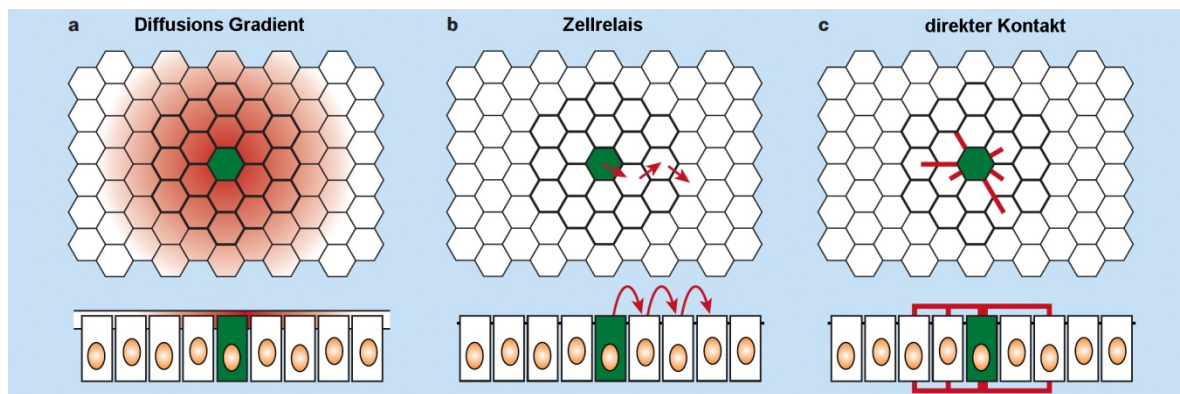


Abb.49: Entsendung eines Signals über eine längere Distanz

Gruppen aus anfänglich gleichen Zellen produzieren sensorische Organe. Eine Zelle in jeder Gruppe wird zur sensorischen Vorläuferzelle (SOP; grün). Diese Zelle sendet Instruktionen an die umgebenden Zellen der Equivalenzgruppe. a) Die Sekretion eines Signalproteins diffundiert davon und hemmt umgebende Zellen. b) Eine Zelle signalisiert zur direkten Nachbarzelle, welche daraufhin zu einer weiter entfernten Zelle signalisiert, usw. c) SOPs sende Filopodien aus, die Delta enthalten und über große Distanzen Kontakt aufnehmen (entnommen und modifiziert aus Cohen, 2003)

Während die ersten beiden Möglichkeiten für die Inhibition über eine längere Distanz ausgeschlossen wurden, stellt die Bildung von Filopodien durch die SOP eine alternative Erklärung dar (Simpson 1997; Parks et al. 2000; Mishra-Gorur et al. 2002; De Joussineau et al. 2003).

Diese Filopodien besitzen sowohl DL als auch Notch und könnten in der Lage sein in entferntere Zellen das SOP-Schicksal zu verhindern. Die Verhinderung der Bildung der Filopodien resultiert im Auftreten zusätzlicher Borsten bei der adulten Fliege (De Joussineau et al. 2003). Diese Theorie konnte bisher nicht bestätigt werden.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das von der SOP ausgehende inhibierende Signal nur die direkte Nachbarzelle erreicht und nicht über mehrere Zelldurchmesser wirkt (**s.Abb.40**). Des Weiteren zeigen Analysen von *kuz*, *Psn*, und *aph-1* mutanter Zellklone, dass eine wildtypische SOP nicht durch eine ektopische SOP gehemmt werden kann, auch wenn sie in direkter Nachbarschaft liegt (**unveröffentlichte Daten**).

Eine ähnliche Beobachtung konnte bereits zuvor durch die klonale Analyse von *Su(H)* erzielt werden (Koelzer and Klein 2003). In *Su(H)*-mutanten SOPs wird die SOP-Entwicklung in einem früheren Stadium angehalten als beim Verlust anderer neurogener

Gene, wie *kuz* und *Psn*, und diese Zellen sind durch die schwache Expression des SOP-Markers *neur^{A101}-lacZ* gekennzeichnet (Koelzer and Klein 2003).

Da Neuralized (Neur) für die Aktivität des Liganden Delta (Dl) innerhalb der SOP benötigt wird, um die laterale Inhibition zu vermitteln, könnte diese Tatsache bedeuten, dass mutante *Su(H)* SOPs in ihrer Fähigkeit beeinträchtigt sind ihre wildtypischen Nachbarzellen zu hemmen. Die klonale Analyse von *kuz* und *aph-1* und die Analyse der *neur^{A101}-lacZ* Expression deckte hingegen eine sehr starke Expression von *neur* in *kuz* und *aph-1* mutanten SOPs auf, welcher sehr wohl in der Lage sind zu ihren wildtypischen Nachbarzellen zu signalisieren (**unveröffentlichte Daten**). Diese mutanten SOPs sind allerdings nicht in der Lage die SOP Determination in der dafür vorgesehenen Position innerhalb der proneuralen Cluster zu verhindern, allerdings können sie Notch-Signalling nur in der direkten wildtypischen Nachbarzelle aktivieren, wenn sie an der Klongrenze lokalisiert sind.

Außerdem konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass der gleichzeitige Verlust der Notch-Liganden Delta und Serrate in einer Aufhebung der *cis*-Inhibition in fast allen Zellen des Notums resultiert (**s.Abb.38**). Die Notch-Aktivierung ist allerdings beschränkt auf die mutanten Zellen an den Klongrenzen. Für den Fall, dass die Klongrenze durch ein proneurales Cluster verläuft, werden nur die mutanten Grenzzellen daran gehindert das SOP-Schicksal anzunehmen. Ein Hinweis darauf, dass das Signal nur die direkte Nachbarzelle erreicht. Zusammengefasst weisen die Daten der Experimente daraufhin, dass das Notch-Signal sehr kurz ist und nur die direkten Nachbarzellen erreicht (*short-range*), schließt aber die Anwesenheit von Filopodien die über eine längerer Distanz signalisieren (*long-range*) nicht aus.

Die Halos, die mit Hilfe der *Gbe+Su(H)-lacZ* Expression um die SOPs in wildtypischen (**s.Abb.34,35,36**) und *mibl*-mutanten Flügelimaginalscheiben (**s.Abb.36**) beobachtet wurden, bestätigen ebenfalls, dass das inhibierende Signal sehr kurz ist und deutet auf die die laterale Inhibition hin. Es konnte allerdings gezeigt werden, dass der Halo erst nach der SOP Determination auftritt, was darauf hindeutet, dass die laterale Inhibition auftritt wenn die SOP determiniert wurde. Diese Tatsache deutet des Weiteren darauf hin, dass der Notch Signalweg und die laterale Inhibition nicht am SOP Determinationsprozess beteiligt sind.

Anhand eines Modells soll erklärt werden wie es zur Definition proneuraler Cluster und der SOP Entwicklung kommt (**s.Abb.50**). Alle Zellen einer Flügelimaginalscheibe besitzen womöglich die Fähigkeit sich zu einer SOP zu entwickeln. Für die SOP Determination

mus ein Schwellenwert der Expression der proneuralen Gene *ac* und *sc* überschritten werden (**s.Abb.50**). In einem frühen Entwicklungsstadium liegt eine geringe proneurale Genexpression vor und eine hohe Aktivität der Antagonisten proneuraler Aktivität (**s.Abb.50A**). Durch Verringerung der *emc* Expression und der Notch-Aktivität im weiteren Verlauf der Entwicklung kommt es in den Bereichen der proneuralen Kluster (PNC) zur stärkeren Genexpression, welche den benötigten Schwellenwert übertrifft (**s.Abb.50B**). Innerhalb dieser Zellen kann anschließend eine einzige Zelle zur SOP determiniert werden während alle umliegenden durch die Aktivität von *Emc* und des Notch-Signalweges daran gehemmt werden (**s.Abb.50.C**)

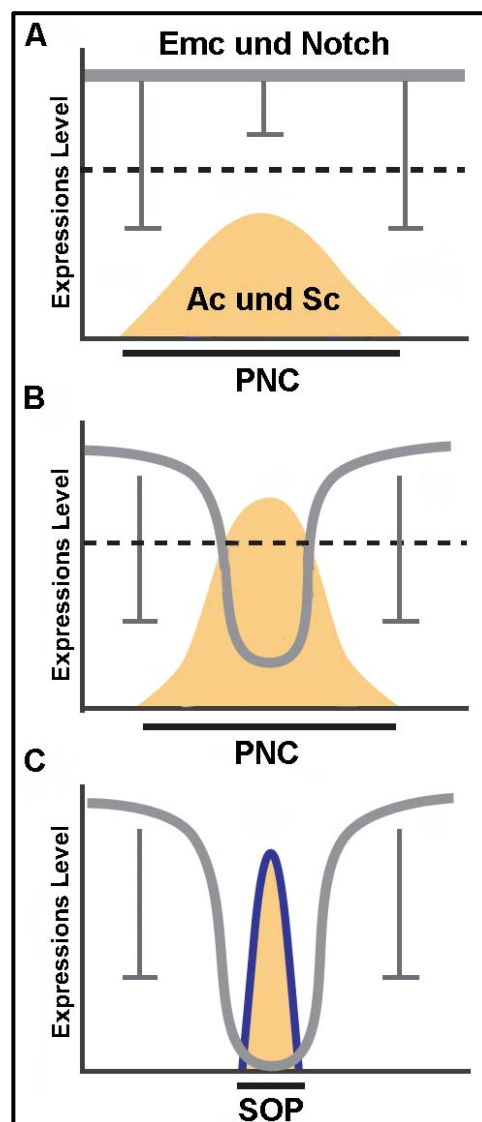


Abb.50: Modell der Aktivität von *Emc* und dem Notch-Signalweg bei der Definition proneuraler Kluster

A) In der frühen Entwicklung verhindern die Aktivitäten des Notch-Signalweges und von *Emc*, dass die proneurale Genexpression einen Schwellenwert übertrifft der für die Auslösung der proneuralen Schicksals benötigt wird. B) Im Verlauf der Entwicklung für die Aktivität der Antagonisten (*Notch* und *Emc*) in einigen

Bereichen gesenkt, wodurch proneurale Kluster definiert werden, da in diesen Bereichen die proneurale Genexpression den nötigen Schwellenwert übertrifft. C) Innerhalb dieser Kluster bleibt die Emc und die Notch Aktivität gering, wodurch sich eine Zelle zur SOP entwickeln kann. (Graphik entnommen und modifiziert nach Yamasaki et al.2011)

5. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die Funktion des Tumorsuppressors Lethal (2) giant discs (Lgd) während der Oogenese und die Determination der sensorischen Vorläuferzellen (SOP, *sensory organ precursor*) in Flügelimaginalscheiben von *Drosophila melanogaster* analysiert. Beide Projekte stehen in Verbindung mit dem Notch Signalweg, einem hoch konservierter Mechanismus, der über Zell-Zell-Kommunikation das Schicksal, die Proliferation und die Apoptose von Zellen, während der Entwicklung von Metazoen reguliert. Der Ausfall von *lgd* in Flügelimaginalscheiben führt zu einer ektopischen, ligandenunabhängigen Aktivierung des Notch Signalweges und der Akkumulation vollständiger Notch Rezeptoren in späten endosomalen Kompartimenten. Daraus kann geschlossen werden dass Lgd beim Abbau des Notch Rezeptors über den endosomalen Transportweg beteiligt ist.

Um zu überprüfen, ob Lgd diese Funktionen auch in einem anderen Gewebe besitzt, wurde der Verlust von *lgd* während der Oogenese untersucht. Im Follikelepithel führt der Verlust von *lgd* hinsichtlich des Notch Signalweges zu ähnlichen Phänotypen. Das Ergebnis deutet darauf hin, dass Lgd eine allgemeine Funktion beim endosomalen Transport und der Regulation von Notch besitzt. Des Weiteren konnten bei der Analyse eines anderen Signalweges im Follikelepithel und in der Keimbahn *lgd*-nullmutanter Zellen erstmals Hinweise auf eine Decapentaplegic (Dpp) Aktivierung erzielt werden. Diese Beobachtungen zeigen, dass die Funktion von Lgd nicht auf die Regulation eines Signalweges beschränkt ist. In der Keimbahn ist diese ektopische Dpp Aktivierung mit der Bildung zusätzlicher Keimzellen assoziiert.

Die mechanosensorischen Organe des peripheren Nervensystems der adulten Fliege entstehen aus einer einzelnen SOP. Der Prozess der SOP Determination kann nur begrenzt durch das Model der lateralen Inhibition, vermittelt durch den Notch-Signalweg, erklärt werden. Eine genauere Analyse deutet darauf hin, dass der Notch Signalweg nicht an der Determination beteiligt ist, sondern erst nach Bildung der SOP in den Nachbarzellen das epidermale Schicksal einleitet. Des Weiteren wurde gezeigt, dass das Grundsicksal einer jeden Zelle der Flügelimaginalscheibe nicht epidermal sondern proneural ist und dieses Schicksal durch die Aktivitäten des Notch Signalweges und Extramacrochaetae auf proneurale Zellgruppen stark eingegrenzt wird.

6. Summary

This thesis analyses the function of the tumour suppressor Lethal (2) giant discs (Lgd) during oogenesis and the determination of sensory organ precursors (SOP) in the wing disc of *Drosophila melanogaster*.

Both projects are connected to the Notch signalling pathway, a highly conserved mechanism, which regulates the cells' fate, proliferation and apoptosis during metazoan development via cell-cell communication.

The loss of *lgd* in wing discs leads to an ectopic ligand-independent activation of the Notch signalling pathway and accumulation of full-length Notch receptors in late endosomal compartments. This suggests that Lgd is relevant in the degradation of the Notch receptor during endosomal transport.

To clarify whether Lgd has the same function in other tissues the loss of *lgd* was investigated during oogenesis. In the follicle epithelium the loss of *lgd* leads to similar phenotypes regarding the Notch signalling pathway. This implies that Lgd has a general function in the endosomal transport and regulation of Notch.

Moreover, during the analysis of another signalling pathway both the follicle epithelium and the germ line of *lgd*-nullmutant cells indicates the activation of Decapentaplegic (Dpp).

This shows that the function of Lgd is not limited to one signalling pathway's regulation. In the germ line this ectopic activation of Dpp is associated to the generation of additional germ cells.

The peripheral nervous system of the adult fly develops from single SOPs. The process of SOP determination can only partially be explained by the model of lateral inhibition facilitated via the Notch signalling pathway. Further analyses indicated that the Notch signalling pathway is not involved in the determination but triggers the epidermal fate in the neighbouring cells after the SOP is determined. Additionally, it was shown that the original fate of all cells in wing disc is proneural, not epidermal. The proneural fate is limited to proneural cell groups by the activity of the Notch signalling pathway and Extramacrochaetae.

7. Literaturverzeichnis

- Abadie, J., B. P. Abbott, et al. "Directional limits on persistent gravitational waves using LIGO S5 science data." Phys Rev Lett **107**(27): 271102.
- Althausen, C., K. C. Jordan, et al. (2005). "Fringe-dependent notch activation and tramtrack function are required for specification of the polar cells in *Drosophila* oogenesis." Developmental Dynamics **232**(4): 1013-1020.
- Arora, K., M. S. Levine, et al. (1994). "The screw gene encodes a ubiquitously expressed member of the TGF-beta family required for specification of dorsal cell fates in the *Drosophila* embryo." Genes Dev **8**(21): 2588-601.
- Artavanis-Tsakonas, S., K. Matsuno, et al. (1995). "Notch signaling
10.1126/science.7716513 " Science **268** (5208): 225-232
- Babst, M. (2005). "A protein's final ESCRT." Traffic **6**(1): 2-9.
- Babst, M., D. J. Katzmann, et al. (2002a). "Escrt-III: an endosome-associated heterooligomeric protein complex required for mvb sorting." Developmental cell **3**(2): 271-82.
- Babst, M., D. J. Katzmann, et al. (2002b). "Endosome-associated complex, ESCRT-II, recruits transport machinery for protein sorting at the multivesicular body." Developmental cell **3**(2): 283-9.
- Bailey, A. M. and J. W. Posakony (1995). "Suppressor of hairless directly activates transcription of enhancer of split complex genes in response to Notch receptor activity.
10.1101/gad.9.21.2609 " Genes & Development **9** (21): 2609-2622
- Baker, N., M. Mlodzik, et al. (1990). "Spacing differentiation in the developing *Drosophila* eye: a fibrinogen-related lateral inhibitor encoded by scabrous." Science **250**(4986): 1370-1377.
- Baonza, A., J. F. de Celis, et al. (2000). "Relationships between extramacrochaetae and Notch signalling in *Drosophila* wing development." Development **127**(11): 2383-93.
- Basel-Vanagaite, L., R. Attia, et al. (2006). "The CC2D1A, a member of a new gene family with C2 domains, is involved in autosomal recessive non-syndromic mental retardation." J Med Genet **43**(3): 203-10.
- Bastock, R. and D. St Johnston (2008). "*Drosophila* oogenesis." Current biology : CB **18**(23): R1082-7.
- Becam, I., U.-M. Fiuza, et al. (2010). "A Role of Receptor Notch in Ligand cis-Inhibition in *Drosophila*." Current biology : CB **20**(6): 554-560.
- Bhattacharya, A. and N. E. Baker (2011). "A network of broadly expressed HLH genes regulates tissue-specific cell fates." Cell **147**(4): 881-92.
- Blair, S. S. (2000). "Notch signaling: Fringe really is a glycosyltransferase." Current biology : CB **10**(16): R608-R612.
- Blaumueller, C. M. and S. Artavanis-Tsakonas (1997). "Comparative aspects of Notch signaling in lower and higher eukaryotes." Perspect Dev Neurobiol **4**(4): 325-43.
- Brand, A. H. and N. Perrimon (1993). "Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes." Development **118**(2): 401-15.
- Bray, S. J. (2006). "Notch signalling: a simple pathway becomes complex." **7**(9): 678-689.

- Brou, C., F. Logeat, et al. (2000). "A novel proteolytic cleavage involved in Notch signaling: the role of the disintegrin-metalloprotease TACE." *Mol Cell* **5**(2): 207-16.
- Brummel, T. J., V. Twombly, et al. (1994). "Characterization and relationship of Dpp receptors encoded by the saxophone and thick veins genes in *Drosophila*." *Cell* **78**(2): 251-61.
- Brunser, O., M. Araya, et al. (1989). "Effect of an acidified milk on diarrhoea and the carrier state in infants of low socio-economic stratum." *Acta Paediatr Scand* **78**(2): 259-64.
- Bryant, P. J. and G. Schubiger (1971). "Giant and duplicated imaginal discs in a new lethal mutant of *Drosophila melanogaster*." *Dev Biol* **24**(2): 233-63.
- Buffin, E. and M. Ghob (2010). "Laser Microdissection of Sensory Organ Precursor Cells of *Drosophila* Microchaetes." *PLoS ONE* **5**(2): e9285.
- Bulman, M. P., K. Kusumi, et al. (2000). "Mutations in the human Delta homologue, DLL3, cause axial skeletal defects in spondylocostal dysostosis." *24*(4): 438-441.
- Buratovich, M. A. and P. J. Bryant (1995). "Duplication of l(2)gd Imaginal Discs in *Drosophila* Is Mediated by Ectopic Expression of wg and dpp." *Developmental Biology* **168**(2): 452-463.
- Cabrera, C. V. (1990). "Lateral inhibition and cell fate during neurogenesis in *Drosophila*: the interactions between scute, Notch and Delta." *Development* **110**(1): 733-42.
- Cabrera, C. V. and M. C. Alonso (1991). "Transcriptional activation by heterodimers of the achaete-scute and daughterless gene products of *Drosophila*." *EMBO J* **10**(10): 2965-73.
- Cabrera, C. V., M. C. Alonso, et al. (1994). "Regulation of scute function by extramacrochaete in vitro and in vivo." *Development* **120**(12): 3595-603.
- Calleja, M., O. Renaud, et al. (2002). "How to pattern an epithelium: lessons from achaete-scute regulation on the notum of *Drosophila*." *Gene* **292**(1-2): 1-12.
- Campuzano, S. (2001). "Emc, a negative HLH regulator with multiple functions in *Drosophila* development." *Oncogene* **20**(58): 8299-307.
- Campuzano, S., L. Carramolino, et al. (1985). "Molecular genetics of the achaete-scute gene complex of *D. melanogaster*." *Cell* **40**(2): 327-38.
- Chanut-Delalande, H., A. C. Jung, et al. (2010). "The Hrs/Stam Complex Acts as a Positive and Negative Regulator of RTK Signaling during *Drosophila* Development." *PLoS ONE* **5**(4): e10245.
- Chanut-Delalande, H., A. C. Jung, et al. (2010). "The Hrs/Stam complex acts as a positive and negative regulator of RTK signaling during *Drosophila* development." *PLoS ONE* **5**(4): e10245.
- Chen, D. and D. McKearin (2003). "Dpp Signaling Silences bam Transcription Directly to Establish Asymmetric Divisions of Germline Stem Cells." *Current biology : CB* **13**(20): 1786-1791.
- Childress, J. L., M. Acar, et al. (2006). "Lethal Giant Discs, a Novel C2-Domain Protein, Restricts Notch Activation during Endocytosis." *Current biology : CB* **16**(22): 2228-2233.
- Chitnis, A. (2006). "Why is delta endocytosis required for effective activation of notch?" *Developmental Dynamics* **235**(4): 886-894.
- Chou, T. B. and N. Perrimon (1992). "Use of a Yeast Site-Specific Recombinase to Produce Female Germline Chimeras in *Drosophila*." *Genetics* **131**(3): 643-653.
- Chou, T. B. and N. Perrimon (1996). "The Autosomal FLP-DFS Technique for Generating Germline Mosaics in *Drosophila melanogaster*." *Genetics* **144**(4): 1673-1679.

- Christerson, L. B. and D. M. McKearin (1994). "orb is required for anteroposterior and dorsoventral patterning during *Drosophila* oogenesis." *Genes Dev* **8**(5): 614-28.
- Cohen, S. M. (2003). "Developmental biology: long-range signalling by touch." *Nature* **426**(6966): 503-4.
- Cooper, E., W.-M. Deng, et al. (2009). "Aph-1 is required to regulate Presenilin-mediated γ -secretase activity and cell survival in *Drosophila* wing development." *genesis* **47**(3): 169-174.
- Cox, D. N., A. Chao, et al. (2000). "piwi encodes a nucleoplasmic factor whose activity modulates the number and division rate of germline stem cells." *Development* **127**(3): 503-14.
- Cubadda, Y., P. Heitzler, et al. (1997). "u-shaped encodes a zinc finger protein that regulates the proneural genes achaete and scute during the formation of bristles in *Drosophila*." *Genes Dev* **11**(22): 3083-95.
- Cubas, P., J. F. de Celis, et al. (1991). "Proneural clusters of achaete-scute expression and the generation of sensory organs in the *Drosophila* imaginal wing disc." *Genes Dev* **5**(6): 996-1008.
- Cubas, P. and J. Modolell (1992). "The extramacrochaetae gene provides information for sensory organ patterning." *EMBO J* **11**(9): 3385-93.
- Culi, J. and J. Modolell (1998). "Proneural gene self-stimulation in neural precursors: an essential mechanism for sense organ development that is regulated by Notch signaling." *Genes Dev* **12**(13): 2036-47.
- Culí, J. and J. Modolell (1998). "Proneural gene self-stimulation in neural precursors: an essential mechanism for sense organ development that is regulated by Notch signaling." *Genes & Development* **12**(13): 2036-2047.
- Das, P., L. L. Maduzia, et al. (1998). "The *Drosophila* gene Medea demonstrates the requirement for different classes of Smads in dpp signaling." *Development* **125**(8): 1519-28.
- Davies, B. A., I. F. Azmi, et al. (2009). "Regulation of Vps4 ATPase activity by ESCRT-III." *Biochem Soc Trans* **37**(Pt 1): 143-5.
- de Cuevas, M., M. A. Lilly, et al. (1997). "Germline cyst formation in *Drosophila*." *Annu Rev Genet* **31**: 405-28.
- De Jossineau, C., J. Soule, et al. (2003). "Delta-promoted filopodia mediate long-range lateral inhibition in *Drosophila*." *Nature* **426**(6966): 555-9.
- de Navascues, J., C. N. Perdigoto, et al. (2012). "*Drosophila* midgut homeostasis involves neutral competition between symmetrically dividing intestinal stem cells." *EMBO J* **advance online publication**.
- De Strooper, B., W. Annaert, et al. (1999). "A presenilin-1-dependent gamma-secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain." *Nature* **398**(6727): 518-22.
- Di Fiore, P. P. and P. De Camilli (2001). "Endocytosis and Signaling: An Inseparable Partnership." *Cell* **106**(1): 1-4.
- Doctor, J. S., P. D. Jackson, et al. (1992). "Sequence, biochemical characterization, and developmental expression of a new member of the TGF-beta superfamily in *Drosophila melanogaster*." *Dev Biol* **151**(2): 491-505.
- Elliott, D. A. and A. H. Brand (2008). "The GAL4 system : a versatile system for the expression of genes." *Methods Mol Biol* **420**: 79-95.
- Ellis, H. M., D. R. Spann, et al. (1990). "extramacrochaetae, a negative regulator of sensory organ development in *Drosophila*, defines a new class of helix-loop-helix proteins." *Cell* **61**(1): 27-38.

- Ellis, M. C., U. Weber, et al. (1994). "Confrontation of scabrous expressing and non-expressing cells is essential for normal ommatidial spacing in the *Drosophila* eye." Development **120**(7): 1959-1969.
- Enerly, E., J. Larsson, et al. (2002). "Reverse genetics in *Drosophila*: from sequence to phenotype using UAS-RNAi transgenic flies." genesis **34**(1-2): 152-5.
- Ferguson, E. L. and K. V. Anderson (1992). "Decapentaplegic acts as a morphogen to organize dorsal-ventral pattern in the *Drosophila* embryo." Cell **71**(3): 451-61.
- Fortini, M. E. (2001). "Notch and Presenilin: a proteolytic mechanism emerges." Current Opinion in Cell Biology **13**(5): 627-634.
- Fortini, M. E. and S. Artavanis-Tsakonas (1994). "The suppressor of hairless protein participates in notch receptor signaling." Cell **79**(2): 273-282.
- Francis, R., G. McGrath, et al. (2002). "aph-1 and pen-2 Are Required for Notch Pathway Signaling, ³-Secretase Cleavage of ²APP, and Presenilin Protein Accumulation." Developmental cell **3**(1): 85-97.
- Furriols, M. and S. Bray (2001). "A model Notch response element detects Suppressor of Hairless dependent molecular switch." Current biology : CB **11**(1): 60-64.
- Gallagher, C. M. and J. A. Knoblich (2006). "The Conserved C2 Domain Protein Lethal (2) Giant Discs Regulates Protein Trafficking in *Drosophila*." Developmental cell **11**(5): 641-653.
- Gao, F. B., J. E. Brenman, et al. (1999). "Genes regulating dendritic outgrowth, branching, and routing in *Drosophila*." Genes Dev **13**(19): 2549-61.
- Garcia-Eroles, X., V. Mayoral, et al. (2007). "Celiac plexus block: a new technique using the left lateral approach." Clin J Pain **23**(7): 635-7.
- Garrell, J. and J. Modolell (1990). "The *Drosophila* extramacrochaetae locus, an antagonist of proneural genes that, like these genes, encodes a helix-loop-helix protein." Cell **61**(1): 39-48.
- Gho, M., Y. Bellaiche, et al. (1999). "Revisiting the *Drosophila* microchaete lineage: a novel intrinsically asymmetric cell division generates a glial cell " Development **126** (16): 3573-3584
- Giagtzoglou, N., P. Alifragis, et al. (2003). "Two modes of recruitment of E(spl) repressors onto target genes." Development **130**(2): 259-70.
- Gibert, J. M. and P. Simpson (2003). "Evolution of cis-regulation of the proneural genes." Int J Dev Biol **47**(7-8): 643-51.
- Gill, D. J., H. Teo, et al. (2007). "Structural insight into the ESCRT-I/-II link and its role in MVB trafficking." EMBO J **26**(2): 600-12.
- Glittenberg, M., C. Pitsouli, et al. (2006). "Role of conserved intracellular motifs in Serrate signalling, cis-inhibition and endocytosis." EMBO J **25**(20): 4697-706.
- Golic, K. G. and S. Lindquist (1989). "The FLP recombinase of yeast catalyzes site-specific recombination in the *drosophila* genome." Cell **59**(3): 499-509.
- Gómez-Skarmeta, J. L., S. Campuzano, et al. (2003). "Half a century of neural prepattern: the story of a few bristles and many genes." **4**(7): 587-598.
- Gordon, W. R., D. Vardar-Ulu, et al. (2007). "Structural basis for autoinhibition of Notch." Nat Struct Mol Biol **14**(4): 295-300.
- Grammont, M. and K. D. Irvine (2001). "fringe and Notch specify polar cell fate during *Drosophila* oogenesis." Development **128**(12): 2243-2253.
- Gridley, T. (2003). "Notch signaling and inherited disease syndromes 10.1093/hmg/ddg052 " Human Molecular Genetics **12** (suppl 1): R9-R13
- Gudmundsson, J., P. Sulem, et al. (2007). "Two variants on chromosome 17 confer prostate cancer risk, and the one in TCF2 protects against type 2 diabetes." Nat Genet **39**(8): 977-83.

- Gupta-Rossi, N., E. Six, et al. (2004). "Monoubiquitination and endocytosis direct gamma-secretase cleavage of activated Notch receptor." *J Cell Biol* **166**(1): 73-83.
- Hadjighassem, M. R., M. C. Austin, et al. (2009). "Human Freud-2/CC2D1B: a novel repressor of postsynaptic serotonin-1A receptor expression." *Biological psychiatry* **66**(3): 214-22.
- Hadjighassem, M. R., K. Galaraga, et al. (2011). "Freud-2/CC2D1B mediates dual repression of the serotonin-1A receptor gene." *Eur J Neurosci* **33**(2): 214-23.
- Haenlin, M., Y. Cubadda, et al. (1997). "Transcriptional activity of pannier is regulated negatively by heterodimerization of the GATA DNA-binding domain with a cofactor encoded by the u-shaped gene of Drosophila." *Genes Dev* **11**(22): 3096-108.
- Haines, N. and K. D. Irvine (2003). "Glycosylation regulates Notch signalling." **4**(10): 786-797.
- Hartenstein, V. and J. W. Posakony (1989). "Development of adult sensilla on the wing and notum of Drosophila melanogaster." *Development* **107** (2): 389-405.
- Hawkins, N. C., J. Thorpe, et al. (1996). "Encore, a gene required for the regulation of germ line mitosis and oocyte differentiation during Drosophila oogenesis." *Development* **122**(1): 281-290.
- Heitzler, P., M. Bourouis, et al. (1996). "Genes of the Enhancer of split and achaete-scute complexes are required for a regulatory loop between Notch and Delta during lateral signalling in Drosophila." *Development* **122**(1): 161-71.
- Herz, H.-M., Z. Chen, et al. (2006). "vps25 mosaics display non-autonomous cell survival and overgrowth, and autonomous apoptosis." *Development* **133**(10): 1871-1880.
- Hierro, A., J. Sun, et al. (2004). "Structure of the ESCRT-II endosomal trafficking complex." *Nature* **431**(7005): 221-5.
- Hori, K., A. Sen, et al. (2011). "Synergy between the ESCRT-III complex and Deltex defines a ligand-independent Notch signal." *J Cell Biol* **195**(6): 1005-15.
- Horne-Badovinac, S. and D. Bilder (2005). "Mass transit: epithelial morphogenesis in the Drosophila egg chamber." *Dev Dyn* **232**(3): 559-74.
- Howard-Filler, S. R. and K. Lindquist (1987). "Douglas Houghton." *Mich Hist* **71**(6): 12-9.
- Hu, X., E. C. Lee, et al. (1995). "Molecular analysis of scabrous mutant alleles from Drosophila melanogaster indicates a secreted protein with two functional domains." *Genetics* **141**(2): 607-17.
- Huang, F., C. Dambly-Chaudiere, et al. (1991). "The emergence of sense organs in the wing disc of Drosophila." *Development* **111**(4): 1087-1095.
- Hudson, J. B., S. D. Podos, et al. (1998). "The Drosophila Medea gene is required downstream of dpp and encodes a functional homolog of human Smad4." *Development* **125**(8): 1407-20.
- Hurley, J. H. and S. D. Emr (2006). "The ESCRT complexes: structure and mechanism of a membrane-trafficking network." *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **35**: 277-98.
- Inoue, H., T. Imamura, et al. (1998). "Interplay of Signal Mediators of Decapentaplegic (Dpp): Molecular Characterization of Mothers against dpp, Medea, and Daughters against dpp." *Molecular Biology of the Cell* **9**(8): 2145-2156.
- Jaekel, R. and T. Klein (2006). "The Drosophila Notch Inhibitor and Tumor Suppressor Gene lethal (2) giant discs Encodes a Conserved Regulator of Endosomal Trafficking." *Developmental cell* **11**(5): 655-669.
- Jan, Y. N. and L. Y. Jan (1994). "Neuronal cell fate specification in Drosophila." *Curr Opin Neurobiol* **4**(1): 8-13.
- Jekely, G. and P. Rorth (2003). "Hrs mediates downregulation of multiple signalling receptors in Drosophila." *EMBO Rep* **4**(12): 1163-8.

- Jundt, F., R. Schwarzer, et al. (2008). "Notch signaling in leukemias and lymphomas." Curr Mol Med **8**(1): 51-9.
- Kaspar, M., M. Schneider, et al. (2008). "Klumpfuss is involved in the determination of sensory organ precursors in *Drosophila*." Developmental Biology **324**(2): 177-191.
- Katzmann, D. J., M. Babst, et al. (2001). "Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-I." Cell **106**(2): 145-55.
- King, F. J., A. Szakmary, et al. (2001). "Yb modulates the divisions of both germline and somatic stem cells through piwi- and hh-mediated mechanisms in the *Drosophila* ovary." Mol Cell **7**(3): 497-508.
- Klein, T. (2002). "kuzbanian is required cell autonomously during Notch signalling in the *Drosophila* wing." Development Genes and Evolution **212**(5): 251-255.
- Klein, T. (2003). "The tumour suppressor gene *l(2)giant discs* is required to restrict the activity of Notch to the dorsoventral boundary during *Drosophila* wing development." Developmental Biology **255**(2): 313-333.
- Klein, T. and A. M. Arias (1998). "Different Spatial and Temporal Interactions between Notch, wingless, and vestigial Specify Proximal and Distal Pattern Elements of the Wing in *Drosophila*." Developmental Biology **194**(2): 196-212.
- Klein, T., K. Brennan, et al. (1997). "An Intrinsic Dominant Negative Activity of Serrate That Is Modulated during Wing Development in *Drosophila*." Developmental Biology **189**(1): 123-134.
- Klueg, K. M. and M. A. Muskavitch (1999). "Ligand-receptor interactions and trans-endocytosis of Delta, Serrate and Notch: members of the Notch signalling pathway in *Drosophila*." Journal of Cell Science **112**(19): 3289-3297.
- Klusza, S. and W. M. Deng (2010). "At the crossroads of differentiation and proliferation: precise control of cell-cycle changes by multiple signaling pathways in *Drosophila* follicle cells." BioEssays **33**(2): 124-34.
- Koelzer, S. and T. Klein (2003). "A Notch-independent function of Suppressor of Hairless during the development of the bristle sensory organ precursor cell of *Drosophila*." Development **130**(9): 1973-88.
- Komada, M. and N. Kitamura (2005). "The Hrs/STAM complex in the downregulation of receptor tyrosine kinases." J Biochem **137**(1): 1-8.
- Komada, M., R. Masaki, et al. (1997). "Hrs, a Tyrosine Kinase Substrate with a Conserved Double Zinc Finger Domain, Is Localized to the Cytoplasmic Surface of Early Endosomes." Journal of Biological Chemistry **272**(33): 20538-20544.
- Krantz, I. D., D. A. Piccoli, et al. (1997). "Alagille syndrome." J Med Genet **34**(2): 152-7.
- Kunisch, M., M. Haenlin, et al. (1994). "Lateral inhibition mediated by the *Drosophila* neurogenic gene delta is enhanced by proneural proteins." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(21): 10139-43.
- Lah, J. J. and A. I. Levey (2000). "Endogenous presenilin-1 targets to endocytic rather than biosynthetic compartments." Mol Cell Neurosci **16**(2): 111-26.
- Lai, E. C. (2002). "Protein Degradation: Four E3s For The Notch Pathway." Current biology : CB **12**(2): R74-R78.
- Lai, E. C., F. Roegiers, et al. (2005). "The ubiquitin ligase *Drosophila* Mind bomb promotes Notch signaling by regulating the localization and activity of Serrate and Delta." Development **132**(10): 2319-2332.
- Larkin, M. K., W. M. Deng, et al. (1999). "Role of Notch pathway in terminal follicle cell differentiation during <i>Drosophila</i> oogenesis." Development Genes and Evolution **209**(5): 301-311.

- Larkin, M. K., K. Holder, et al. (1996). "Expression of constitutively active Notch arrests follicle cells at a precursor stage during *Drosophila* oogenesis and disrupts the anterior-posterior axis of the oocyte." *Development* **122**(11): 3639-3650.
- Le Borgne, R., S. Remaud, et al. (2005). "Two Distinct E3 Ubiquitin Ligases Have Complementary Functions in the Regulation of Delta and Serrate Signaling in *Drosophila*." *PLoS Biol* **3**(4): e96.
- Lecourtois, M. and F. Schweisguth (1995). "The neurogenic suppressor of hairless DNA-binding protein mediates the transcriptional activation of the enhancer of split complex genes triggered by Notch signaling.
10.1101/gad.9.21.2598 " *Genes & Development* **9** (21): 2598-2608
- Lecourtois, M. and F. Schweisguth (1997). "Role of suppressor of hairless in the delta-activated Notch signaling pathway." *Perspect Dev Neurobiol* **4**(4): 305-11.
- Lecuit, T., W. J. Brook, et al. (1996). "Two distinct mechanisms for long-range patterning by Decapentaplegic in the *Drosophila* wing." *Nature* **381**(6581): 387-93.
- Lee, E. C., X. Hu, et al. (1996). "The scabrous gene encodes a secreted glycoprotein dimer and regulates proneural development in *Drosophila* eyes." *Molecular and Cellular Biology* **16**(3): 1179-88.
- Lee, T. and L. Luo (2001). "Mosaic analysis with a repressible cell marker (MARCM) for *Drosophila* neural development." *Trends in Neurosciences* **24**(5): 251-254.
- Lei, L., A. Xu, et al. (2003). "An O-fucose site in the ligand binding domain inhibits Notch activation
10.1242/dev.00883 " *Development* **130** (26): 6411-6421
- Letsou, A., K. Arora, et al. (1995). "*Drosophila* Dpp signaling is mediated by the punt gene product: a dual ligand-binding type II receptor of the TGF beta receptor family." *Cell* **80**(6): 899-908.
- Li, L. and T. Xie (2005). "Stem cell niche: structure and function." *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**: 605-31.
- Lieber, T., S. Kidd, et al. (2002). "kuzbanian-mediated cleavage of *Drosophila* Notch." *Genes & Development* **16**(2): 209-221.
- Lin, H., L. Yue, et al. (1994). "The *Drosophila* fusome, a germline-specific organelle, contains membrane skeletal proteins and functions in cyst formation." *Development* **120**(4): 947-56.
- Lin, Y., L. A. Kimpler, et al. (2005). "Interaction of the mammalian endosomal sorting complex required for transport (ESCRT) III protein hSnf7-1 with itself, membranes, and the AAA+ ATPase SKD1." *J Biol Chem* **280**(13): 12799-809.
- Luhtala, N. and G. Odorizzi (2004). "Bro1 coordinates deubiquitination in the multivesicular body pathway by recruiting Doa4 to endosomes." *J Cell Biol* **166**(5): 717-29.
- Marcellini, S., J. M. Gibert, et al. (2005). "achaete, but not scute, is dispensable for the peripheral nervous system of *Drosophila*." *Dev Biol* **285**(2): 545-53.
- Marois, E., A. Mahmoud, et al. (2006). "The endocytic pathway and formation of the Wingless morphogen gradient." *Development* **133**(2): 307-317.
- Martinez, C. and J. Modolell (1991). "Cross-regulatory interactions between the proneural achaete and scute genes of *Drosophila*." *Science* **251**(5000): 1485-7.
- Martinez, C., J. Modolell, et al. (1993). "Regulation of the proneural gene achaete by helix-loop-helix proteins." *Mol Cell Biol* **13**(6): 3514-21.
- Massari, M. E. and C. Murre (2000). "Helix-loop-helix proteins: regulators of transcription in eucaryotic organisms." *Mol Cell Biol* **20**(2): 429-40.

- Mayers, J. R., I. Fyfe, et al. (2011). "ESCRT-0 assembles as a heterotetrameric complex on membranes and binds multiple ubiquitinated cargoes simultaneously." J Biol Chem **286**(11): 9636-45.
- Mayor, S. and R. E. Pagano (2007). "Pathways of clathrin-independent endocytosis." **8**(8): 603-612.
- McKearin, D. and L. Christerson (1994). "Molecular genetics of the early stages of germ cell differentiation during *Drosophila* oogenesis." Ciba Found Symp **182**: 210-9; discussion 219-22.
- McKearin, D. M. and A. C. Spradling (1990). "bag-of-marbles: a *Drosophila* gene required to initiate both male and female gametogenesis." Genes & Development **4**(12b): 2242-2251.
- Mezencev, R., T. Updegrave, et al. "Camalexin induces apoptosis in T-leukemia Jurkat cells by increased concentration of reactive oxygen species and activation of caspase-8 and caspase-9." J Nat Med **65**(3-4): 488-99.
- Micchelli, C. A., E. J. Rulifson, et al. (1997). "The function and regulation of cut expression on the wing margin of *Drosophila*: Notch, Wingless and a dominant negative role for Delta and Serrate." Development **124**(8): 1485-95.
- Mishra-Gorur, K., M. D. Rand, et al. (2002). "Down-regulation of Delta by proteolytic processing." J Cell Biol **159**(2): 313-24.
- Mlodzik, M., N. E. Baker, et al. (1990). "Isolation and expression of scabrous, a gene regulating neurogenesis in *Drosophila*." Genes & Development **4**(11): 1848-1861.
- Moberg, K. H., S. Schelble, et al. (2005). "Mutations in erupted, the *Drosophila* Ortholog of Mammalian Tumor Susceptibility Gene 101, Elicit Non-Cell-Autonomous Overgrowth." Developmental cell **9**(5): 699-710.
- Modolell, J. (1997). "Patterning of the adult peripheral nervous system of *Drosophila*." Perspect Dev Neurobiol **4**(4): 285-96.
- Modolell, J. and S. Campuzano (1998). "The achaete-scute complex as an integrating device." Int J Dev Biol **42**(3): 275-82.
- Mumm, J. S. and R. Kopan (2000). "Notch Signaling: From the Outside In." Developmental Biology **228**(2): 151-165.
- Muziol, T., E. Pineda-Molina, et al. (2006). "Structural basis for budding by the ESCRT-III factor CHMP3." Developmental cell **10**(6): 821-30.
- Nalefski, E. A. and J. J. Falke (1996). "The C2 domain calcium-binding motif: structural and functional diversity." Protein Sci **5**(12): 2375-90.
- Narbonne-Reveau, K., F. Besse, et al. (2006). "fused regulates germline cyst mitosis and differentiation during *Drosophila* oogenesis." Mechanisms of Development **123**(3): 197-209.
- Nellen, D., R. Burke, et al. (1996). "Direct and long-range action of a DPP morphogen gradient." Cell **85**(3): 357-68.
- Nystul, T. and A. Spradling (2010). "Regulation of Epithelial Stem Cell Replacement and Follicle Formation in the *Drosophila* Ovary." Genetics **184**(2): 503-515.
- Odorizzi, G. (2006). "The multiple personalities of Alix." J Cell Sci **119**(Pt 15): 3025-32.
- Oellers, N., M. Dehio, et al. (1994). "bHLH proteins encoded by the Enhancer of split complex of *Drosophila* negatively interfere with transcriptional activation mediated by proneural genes." Mol Gen Genet **244**(5): 465-73.
- Ogiso, Y., K. Tsuneizumi, et al. (2011). "Robustness of the Dpp morphogen activity gradient depends on negative feedback regulation by the inhibitory Smad, Dad." Development, Growth & Differentiation **53**(5): 668-678.

- Ohlmeyer, J. T. and T. Schüpbach (2003). "Encore facilitates SCF-Ubiquitin-proteasome-dependent proteolysis during *Drosophila* oogenesis." Development **130**(25): 6339-6349.
- Okajima, T. and K. D. Irvine (2002). "Regulation of notch signaling by o-linked fucose." Cell **111**(6): 893-904.
- Ou, X. M., S. Lemonde, et al. (2003). "Freud-1: A neuronal calcium-regulated repressor of the 5-HT1A receptor gene." J Neurosci **23**(19): 7415-25.
- Padgett, R. W., R. D. St Johnston, et al. (1987). "A transcript from a *Drosophila* pattern gene predicts a protein homologous to the transforming growth factor-beta family." Nature **325**(6099): 81-4.
- Pan, D. and G. M. Rubin (1997). "Kuzbanian Controls Proteolytic Processing of Notch and Mediates Lateral Inhibition during *Drosophila* and Vertebrate Neurogenesis." Cell **90**(2): 271-280.
- Parks, A. L., K. M. Klueg, et al. (2000). "Ligand endocytosis drives receptor dissociation and activation in the Notch pathway." Development **127**(7): 1373-85.
- Paroush, Z., R. L. Finley, Jr., et al. (1994). "Groucho is required for *Drosophila* neurogenesis, segmentation, and sex determination and interacts directly with hairy-related bHLH proteins." Cell **79**(5): 805-15.
- Pasternak, S. H., R. D. Bagshaw, et al. (2003). "Presenilin-1, nicastrin, amyloid precursor protein, and gamma-secretase activity are co-localized in the lysosomal membrane." J Biol Chem **278**(29): 26687-94.
- Pebody, R. G., N. Andrews, et al. (2004). "The seroepidemiology of herpes simplex virus type 1 and 2 in Europe." Sex Transm Infect **80**(3): 185-91.
- Penton, A., Y. Chen, et al. (1994). "Identification of two bone morphogenetic protein type I receptors in *Drosophila* and evidence that Brk25D is a decapentaplegic receptor." Cell **78**(2): 239-50.
- Perrimon, N. and M. Gans (1983). "Clonal analysis of the tissue specificity of recessive female-sterile mutations of *Drosophila melanogaster* using a dominant female-sterile mutation Fs(1)K1237." Developmental Biology **100**(2): 365-373.
- Phelps, C. B. and A. H. Brand (1998). "Ectopic Gene Expression in *Drosophila* Using GAL4 System." Methods **14**(4): 367-379.
- Pitsouli, C. and C. Delidakis (2005). "The interplay between DSL proteins and ubiquitin ligases in Notch signaling." Development **132**(18): 4041-50.
- Ponting, C. P. and R. R. Russell (2002). "The natural history of protein domains." Annu Rev Biophys Biomol Struct **31**: 45-71.
- Ramain, P., P. Heitzler, et al. (1993). "pannier, a negative regulator of achaete and scute in *Drosophila*, encodes a zinc finger protein with homology to the vertebrate transcription factor GATA-1." Development **119**(4): 1277-91.
- Ramain, P., R. Khechumian, et al. (2000). "Interactions between chip and the achaete/scute-daughterless heterodimers are required for pannier-driven proneural patterning." Mol Cell **6**(4): 781-90.
- Raymond, C. K., C. J. Roberts, et al. (1992). "Biogenesis of the vacuole in *Saccharomyces cerevisiae*." Int Rev Cytol **139**: 59-120.
- Rees, J. S., N. Lowe, et al. (2011). "In Vivo Analysis of Proteomes and Interactomes Using Parallel Affinity Capture (iPAC) Coupled to Mass Spectrometry." Molecular & Cellular Proteomics **10**(6).
- Renaud, O. and P. Simpson (2001). "scabrous Modifies Epithelial Cell Adhesion and Extends the Range of Lateral Signalling during Development of the Spaced Bristle Pattern in *Drosophila*." Developmental Biology **240**(2): 361-376.

- Rodriguez, A., R. Hernandez, et al. (1990). "Competence to develop sensory organs is temporally and spatially regulated in *Drosophila* epidermal primordia." EMBO J **11**: 3583-92.
- Rogaeva, A., K. Galaraga, et al. (2007). "The Freud-1/CC2D1A family: Transcriptional regulators implicated in mental retardation." Journal of Neuroscience Research **85**(13): 2833-2838.
- Romani, S., S. Campuzano, et al. (1989). "Expression of achaete and scute genes in *Drosophila* imaginal discs and their function in sensory organ development." Genes Dev **3**(7): 997-1007.
- Rooke, J., D. Pan, et al. (1996). "KUZ, a Conserved Metalloprotease-Disintegrin Protein with Two Roles in *Drosophila* Neurogenesis." Science **273**(5279): 1227-1231.
- Roth, S. (2001). "*Drosophila* oogenesis: coordinating germ line and soma." Current biology : CB **11**(19): R779-81.
- Ruberte, E., T. Marty, et al. (1995). "An absolute requirement for both the type II and type I receptors, punt and thick veins, for dpp signaling in vivo." Cell **80**(6): 889-97.
- Rubin, G. M. and A. C. Spradling (1982). "Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors." Science **218**(4570): 348-53.
- Saksena, S. and S. D. Emr (2009). "ESCRTs and human disease." Biochem Soc Trans **37**(Pt 1): 167-72.
- Saksena, S., J. Wahlman, et al. (2009). "Functional reconstitution of ESCRT-III assembly and disassembly." Cell **136**(1): 97-109.
- Sasamura, T., N. Sasaki, et al. (2003). "neurotic, a novel maternal neurogenic gene, encodes an O-fucosyltransferase that is essential for Notch-Delta interactions 10.1242/dev.00679 " Development **130** (20): 4785-4795
- Schweisguth, F. (1995). "Suppressor of Hairless is required for signal reception during lateral inhibition in the *Drosophila* pupal notum." Development **121**(6): 1875-84.
- Schweisguth, F. (2004). "Regulation of notch signaling activity." Current biology : CB **14**(3): R129-38.
- Scott, A., H. Y. Chung, et al. (2005). "Structural and mechanistic studies of VPS4 proteins." EMBO J **24**(20): 3658-69.
- Sekelsky, J. J., S. J. Newfeld, et al. (1995). "Genetic characterization and cloning of mothers against dpp, a gene required for decapentaplegic function in *Drosophila melanogaster*." Genetics **139**(3): 1347-58.
- Seto, E. S., H. J. Bellen, et al. (2002). "When cell biology meets development: endocytic regulation of signaling pathways." Genes Dev **16**(11): 1314-36.
- Seugnet, L., P. Simpson, et al. (1997a). "Requirement for dynamin during Notch signaling in *Drosophila* neurogenesis." Dev Biol **192**(2): 585-98.
- Seugnet, L., P. Simpson, et al. (1997b). "Transcriptional regulation of Notch and Delta: requirement for neuroblast segregation in *Drosophila*." Development **124**(10): 2015-25.
- Simpson, P. (1990). "Lateral inhibition and the development of the sensory bristles of the adult peripheral nervous system of *Drosophila*." Development **109**(3): 509-519.
- Simpson, P. (1997). "Notch signalling in development: on equivalence groups and asymmetric developmental potential." Current Opinion in Genetics & Development **7**(4): 537-542.
- Simpson, P., R. Woehl, et al. (1999). "The development and evolution of bristle patterns in Diptera " Development **126** (7): 1349-1364
- Skeath, J. B. and S. B. Carroll (1991). "Regulation of achaete-scute gene expression and sensory organ pattern formation in the *Drosophila* wing." Genes Dev **5**(6): 984-95.

- Slagsvold, T., R. Aasland, et al. (2005). "Eap45 in mammalian ESCRT-II binds ubiquitin via a phosphoinositide-interacting GLUE domain." *J Biol Chem* **280**(20): 19600-6.
- Smythe, L. D., V. Wuthiekanun, et al. (2009). "The microscopic agglutination test (MAT) is an unreliable predictor of infecting *Leptospira* serovar in Thailand." *Am J Trop Med Hyg* **81**(4): 695-7.
- Soldati, T. and M. Schliwa (2006). "Powering membrane traffic in endocytosis and recycling." *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**(12): 897-908.
- Song, X., M. D. Wong, et al. (2004). "Bmp signals from niche cells directly repress transcription of a differentiation-promoting gene, bag of marbles, in germline stem cells in the *Drosophila* ovary." *Development* **131**(6): 1353-1364.
- Song, X., C. H. Zhu, et al. (2002). "Germline stem cells anchored by adherens junctions in the *Drosophila* ovary niches." *Science* **296**(5574): 1855-7.
- Sotillos, S., F. Roch, et al. (1997). "The metalloprotease-disintegrin Kuzbanian participates in Notch activation during growth and patterning of *Drosophila* imaginal discs." *Development* **124**(23): 4769-4779.
- Spradling, A. C. (1993). "Germline cysts: communes that work." *Cell* **72**(5): 649-51.
- Spradling, A. C. (2004). "Stem cells: more like a man." *Nature* **428**(6979): 133-4.
- Spradling, A. C., M. de Cuevas, et al. (1997). "The *Drosophila* germarium: stem cells, germ line cysts, and oocytes." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **62**: 25-34.
- Spradling, A. C. and G. M. Rubin (1982). "Transposition of cloned P elements into *Drosophila* germ line chromosomes." *Science* **218**(4570): 341-7.
- St. Johnston, D. and H. López-Schier (2001). "Delta signaling from the germ line controls the proliferation and differentiation of the somatic follicle cells during *Drosophila* oogenesis." *Genes & Development* **15**(11): 1393-1405.
- Storto, P. D. and R. C. King (1989). "The role of polyfusomes in generating branched chains of cystocytes during *Drosophila* oogenesis." *Dev Genet* **10**(2): 70-86.
- Struhl, G. and A. Adachi (1998). "Nuclear Access and Action of Notch In Vivo." *Cell* **93**(4): 649-660.
- Struhl, G., K. Fitzgerald, et al. (1993). "Intrinsic activity of the lin-12 and Notch intracellular domains in vivo." *Cell* **74**(2): 331-345.
- Struhl, G. and I. Greenwald (1999). "Presenilin is required for activity and nuclear access of Notch in *Drosophila*." *Nature* **398**(6727): 522-525.
- Struhl, G. and I. Greenwald (2001). "Presenilin-mediated transmembrane cleavage is required for Notch signal transduction in *Drosophila*." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98**(1): 229-234.
- Sun, J. and W.-M. Deng (2005). "Notch-dependent downregulation of the homeodomain gene cut is required for the mitotic cycle/endocycle switch and cell differentiation in *Drosophila* follicle cells." *Development* **132**(19): 4299-4308.
- Sun, J. and W.-M. Deng (2007). "Hindsight Mediates the Role of Notch in Suppressing Hedgehog Signaling and Cell Proliferation." *Developmental cell* **12**(3): 431-442.
- Sun, J., L. Smith, et al. (2008). "Regulation of the endocycle/gene amplification switch by Notch and ecdysone signaling." *The Journal of Cell Biology* **182**(5): 885-896.
- Sun, J., L. Smith, et al. (2008). "Regulation of the endocycle/gene amplification switch by Notch and ecdysone signaling." *J Cell Biol* **182**(5): 885-96.
- Sweeney, N. T., J. E. Brenman, et al. (2006). "The coiled-coil protein shrub controls neuronal morphogenesis in *Drosophila*." *Current biology : CB* **16**(10): 1006-11.
- Szabad, J., V. A. Jursnich, et al. (1991). "Requirement for Cell-Proliferation Control Genes in *Drosophila* Oogenesis." *Genetics* **127**(3): 525-533.

- Teo, H., O. Perisic, et al. (2004). "ESCRT-II, an endosome-associated complex required for protein sorting: crystal structure and interactions with ESCRT-III and membranes." *Developmental cell* **7**(4): 559-69.
- Theodosiou, N. A. and T. Xu (1998). "Use of FLP/FRT system to study Drosophila development." *Methods* **14**(4): 355-65.
- Thompson, B. J., J. Mathieu, et al. (2005). "Tumor Suppressor Properties of the ESCRT-II Complex Component Vps25 in Drosophila." *Developmental cell* **9**(5): 711-720.
- Tien, A. C., A. Rajan, et al. (2009). "A Notch updated." *J Cell Biol* **184**(5): 621-9.
- Troost, T., S. Jaeckel, et al. (2012). "The tumour suppressor Lethal (2) giant discs is required for the function of the ESCRT-III component Shrub/CHMP4
10.1242/jcs.097261 " *Journal of Cell Science* **125** (3): 763-776
- Tsuneizumi, K., T. Nakayama, et al. (1997). "Daughters against dpp modulates dpp organizing activity in Drosophila wing development." *Nature* **389**(6651): 627-631.
- Twombly, V., R. K. Blackman, et al. (1996). "The TGF-beta signaling pathway is essential for Drosophila oogenesis." *Development* **122**(5): 1555-1565.
- Urbe, S. (2005). "Ubiquitin and endocytic protein sorting." *Essays Biochem* **41**: 81-98.
- Urra, S., C. A. Escudero, et al. (2007). "TrkA receptor activation by nerve growth factor induces shedding of the p75 neurotrophin receptor followed by endosomal gamma-secretase-mediated release of the p75 intracellular domain." *J Biol Chem* **282**(10): 7606-15.
- Uv, A. E., E. J. Harrison, et al. (1997). "Tissue-specific splicing and functions of the Drosophila transcription factor Grainyhead." *Molecular and Cellular Biology* **17**(11): 6727-35.
- Vaccari, T. and D. Bilder (2005). "The Drosophila Tumor Suppressor vps25 Prevents Nonautonomous Overproliferation by Regulating Notch Trafficking." *Developmental cell* **9**(5): 687-698.
- Vaccari, T., H. Lu, et al. (2008). "Endosomal entry regulates Notch receptor activation in Drosophila melanogaster
10.1083/jcb.200708127 " *The Journal of Cell Biology* **180** (4): 755-762
- Vaccari, T., T. E. Rusten, et al. (2009). "Comparative analysis of ESCRT-I, ESCRT-II and ESCRT-III function in Drosophila by efficient isolation of ESCRT mutants." *J Cell Sci* **122**(Pt 14): 2413-23.
- Van Doren, M., H. M. Ellis, et al. (1991). "The Drosophila extramacrochaetae protein antagonizes sequence-specific DNA binding by daughterless/achaete-scute protein complexes." *Development* **113**(1): 245-55.
- Van Doren, M., P. A. Powell, et al. (1992). "Spatial regulation of proneural gene activity: auto- and cross-activation of achaete is antagonized by extramacrochaetae." *Genes Dev* **6**(12B): 2592-605.
- Wharton, K. A., G. H. Thomsen, et al. (1991). "Drosophila 60A gene, another transforming growth factor beta family member, is closely related to human bone morphogenetic proteins." *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(20): 9214-8.
- Wiersdorff, V., T. Lecuit, et al. (1996). "Mad acts downstream of Dpp receptors, revealing a differential requirement for dpp signaling in initiation and propagation of morphogenesis in the Drosophila eye." *Development* **122**(7): 2153-62.
- Williams, R. L. and S. Urbe (2007). "The emerging shape of the ESCRT machinery." *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**(5): 355-68.
- Wisotzkey, R. G., A. Mehra, et al. (1998). "Medea is a Drosophila Smad4 homolog that is differentially required to potentiate DPP responses." *Development* **125**(8): 1433-45.
- Wu, J. S. and L. Luo (2006). "A protocol for mosaic analysis with a repressible cell marker (MARCM) in Drosophila." *Nat Protoc* **1**(6): 2583-9.

- Xia, L., S. Jia, et al. (2010). "The Fused/Smurf complex controls the fate of *Drosophila* germline stem cells by generating a gradient BMP response." Cell **143**(6): 978-90.
- Xie, T., A. L. Finelli, et al. (1994). "The *Drosophila* saxophone gene: a serine-threonine kinase receptor of the TGF-beta superfamily." Science **263**(5154): 1756-9.
- Xie, T. and A. C. Spradling (1998). "decapentaplegic is essential for the maintenance and division of germline stem cells in the *Drosophila* ovary." Cell **94**(2): 251-60.
- Xie, T. and A. C. Spradling (2000). "A niche maintaining germ line stem cells in the *Drosophila* ovary." Science **290**(5490): 328-30.
- Xu, A., L. Lei, et al. (2005). "Regions of *Drosophila* Notch That Contribute to Ligand Binding and the Modulatory Influence of Fringe
10.1074/jbc.M505569200 " Journal of Biological Chemistry **280** (34): 30158-30165
- Xu, T., L. A. Caron, et al. (1992). "The involvement of the Notch locus in *Drosophila* oogenesis." Development **115**(4): 913-922.
- Ye, Y. and M. E. Fortini (1998). "Characterization of *Drosophila* Presenilin and its colocalization with Notch during development." Mechanisms of Development **79**(1-2): 199-211.
- Yip, M. L., M. L. Lamka, et al. (1997). "Control of germ-band retraction in *Drosophila* by the zinc-finger protein HINDSIGHT." Development **124**(11): 2129-2141.
- Zamborlini, A., Y. Usami, et al. (2006). "Release of autoinhibition converts ESCRT-III components into potent inhibitors of HIV-1 budding." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(50): 19140-5.
- Zeiss, C. R., N. S. Hatoum, et al. (1992). "Localization of inhaled trimellitic anhydride to lung with a respiratory lymph node antibody secreting cell response." J Allergy Clin Immunol **90**(6 Pt 1): 944-52.
- Zhu, C. H. and T. Xie (2003). "Clonal expansion of ovarian germline stem cells during niche formation in *Drosophila*." Development **130**(12): 2579-88.

8. Danksagung

Ich bedanke mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. Thomas Klein für die Bereitstellung der Projekte, die Betreuung dieser Doktor Arbeit und für seine Unterstützung in den letzten Jahren.

Des Weiteren danke ich Prof. Dr. Hermann Aberle für die Mitbetreuung der Doktor Arbeit.

Ganz herzlich bedanke ich mich bei allen Kollegen der Arbeitsgruppe Klein in Düsseldorf, ehemaligen Mitarbeitern und Praktikanten, meinen ehemaligen Kollegen aus Köln.

Auch meiner Familie, meiner Freundin Johanna und meinem gesamten Freundeskreis bin ich zu großem Dank verpflichtet.

9. Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen –, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie - abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen - noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluß des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen der Promotionsordnung sind mir bekannt.

Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. Thomas Klein und Prof Dr. Hermann Aberle betreut worden.

Düsseldorf, Mai 2012

Markus Schneider

Teilpublikationen im Rahmen dieser Arbeit:

EMBO J. 2012 Apr 20. doi: 10.1038/emboj.2012.106. [Epub ahead of print]

***Drosophila* midgut homeostasis involves neutral competition between symmetrically dividing intestinal stem cells.**

de Navascués J, Perdigoto CN, Bian Y, Schneider MH, Bardin AJ, Martínez-Arias A, Simons BD.

Department of Genetics, University of Cambridge, Cambridge, UK.

