

**Kartierung von *Dmon1^{mut4}* und
Charakterisierung der Rolle von Dmon1
bei der Rekrutierung von Rab7
an reife/späte Endosomen
in *Drosophila melanogaster***

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Jahan Forough Yousefian
aus Teheran/Iran

Düsseldorf, Juni 2013

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: 18. Juli 2013

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	6
1.1. ENDOZYTOTOSE UND DER ENDOSOMALE TRANSPORTWEG	6
1.2. ESCRT-MASCHINERIE.....	9
1.3. RAB-GTPASEN.....	13
1.4. DIE ROLLE VON SAND-1/MON1 UND DESSEN INTERAKTIONSPARTNER CCZ1 BEIM AUSTAUSCH VON RAB5 GEGEN RAB7	16
1.4.1. SAND-1/MON1 ALS EIN SCHALTER FÜR DIE UMWANDLUNG DER ENDOSOMEN VON FRÜHEN BIS SPÄTEN ENDOSOMEN.....	16
1.4.2. MON1-CCZ1-KOMPLEX IST DER GEF VON YPT7/RAB7	18
1.4.3. SAND-1/MON1-CCZ1 ALS GDF FÜR DIE REKRUTIERUNG VON RAB7	19
1.5. HOPS/CORVET-KOMPLEXE.....	21
1.6. FLÜGELIMAGINALSCHEIBE VON <i>D. MELANOGASTER</i> ALS UNTERSUCHUNGSMODELL	23
1.7. ZIELSETZUNG DER ARBEIT	26
2. ERGEBNISSE	27
2.1. DER PHÄNOTYP VON <i>MUT4</i>	28
2.2. DIE VERGRÖßERTEN VESIKEL IN <i>MUT4</i> -MUTANTEN ZELLEN ENTHALTEN NEBEN NOTCH AUCH ANDERE TRANSMEMBRAN- UND SEKRETIERTE PROTEINE.....	31
2.3. DIE NOTCH-ENTHALTENDEN VESIKEL SIND ENDOSOMEN.....	33
2.4. CHARAKTERISIERUNG DER <i>MUT4</i> -VERGRÖßERTEN ENDOSOMEN	35
2.5. QUANTIFIZIERUNG DER KOLOKALISATION DER RAB-PROTEINE MIT NOTCH ENTHALTENDEN ENDOSOMEN	39
2.6. SAURES MILIEU DER ENDOSOMEN IN <i>MUT4</i> -MUTANTEN ZELLKLONEN	50
2.7. KARTIERUNG DER <i>MUT4</i> -MUTATION.....	56
2.7.1. DIE EXPRESSION VON <i>DMON1</i> -RNAi ZEIGT EINEN ÄHNLICHEN PHÄNOTYP WIE DIE <i>MUT4</i> -MUTATION 58	
2.7.2. <i>MUT4</i> UND <i>CS084</i> SIND ALLELE VON <i>DMON1</i>	60
2.7.3. RETTUNG DES <i>MUT4</i> -PHÄNOTYPS MITTELS <i>DMON1</i> (CG11926)-EXPRESSION	62
2.8. DIE EXPRESSION VON MON1P AUS DER HEFE KANN DEN AUSFALLPHÄNOTYP VON <i>DMON1</i> NICHT RETTEN	68
2.9. <i>DMON1</i> SCHEINT IN <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i> MIT <i>DCCZ1</i> ZU INTERAGIEREN	71
2.9.1. EXPRESSION VON <i>DCCZ1</i> -RNAi ZEIGT ÄHNLICHEN PHÄNOTYP WIE DIE <i>DMON1</i> ^{MUT4} -MUTATION	71
2.9.2. EXPRESSION VON <i>DCCZ1</i> -EOS RETTET NICHT DEN AUSFALLPHÄNOTYP VON <i>DMON1</i>	73
2.9.3. DIE KOEXPRESSION VON <i>DMON1</i> UND <i>DCCZ1</i> FÜHRT ZU ENTSTEHUNG NOTCH-ENTHALTENDER VESIKEL UND EINER VERÄNDERUNG DER LOKALISATION VON RAB5 UND RAB7	74

2.10. QUANTITATIVE ANALYSE DES VESIKEL-PHÄNOTYPS BEI BEEINTRÄCHTIGTER <i>DMON1/DCCZ1</i>	
FUNKTION	77
2.11. SUBZELLULÄRE LOKALISATION VON <i>DMON1</i> UND <i>DCCZ1</i>	82
2.12. <i>DMON1</i> UND <i>DCCZ1</i> HABEN KEINEN EINFLUSS AUF DIE LOKALISATION VON RABEX-5	87
2.13. <i>MON1</i> UND AUTOPHAGIE.....	92
2.14. DER PHÄNOTYP VON <i>DMON1^{MUT4}</i> WIRD BEDINGT DURCH EINE FEHLFUNKTION VON RAB7	94
2.15. DIE SIGNALÜBERTRAGUNG DURCH SIGNALTRANSDUKTIONSWEGE IST NICHT DURCH DIE <i>DMON1^{MUT4}</i>-MUTATION BETROFFEN	98
<u>3. DISKUSSION.....</u>	<u>101</u>
3.1. AUSFALL VON <i>DMON1</i> FÜHRT ZUR ENTSTEHUNG VERGRÖßERTER ENDOSOMEN	101
3.2. <i>DMON1^{MUT4}</i>-ENDOSOMEN KOLOKALISIEREN MIT SPÄTENDOSOMALEN MARKERN.....	102
3.3. DIE FUSION MIT DEM LYSOSOM ABER NICHT DIE REIFUNG VON ENDOSOMEN IST RAB7-ABHÄNGIG	105
3.4. DIE RAB-KONVERSION SCHEINT BETROFFEN ZU SEIN IN <i>DMON1^{MUT4}</i> ZELLEN	106
3.5. <i>MON1</i> IST IN VERSCHIEDENEN ORGANISMEN KONSERVIERT	107
3.5.1. EINE INTERAKTION ZWISCHEN <i>DMON1</i> UND <i>DCCZ1</i> SCHEINT AUCH IN <i>DROSOPHILA</i> ZU BESTEHEN	108
3.5.2. DER AUSFALL ODER DIE ÜBEREXPRESSION VON <i>DMON1</i> HAT KEINEN EINFLUSS AUF DIE VERTEILUNG VON RABEX5	109
3.5.3. DER AUSFALL VON <i>DMON1</i> BEEINTRÄCHTIGT NICHT DIE MOTILITÄT DER ENDOSOMEN	110
3.5.4. <i>DMON1^{MUT4}</i> -ENDOSOMEN ZEIGEN KEINE KOLOKALISATION MIT AUTOPHAGOSOMALEN MARKERN..	111
3.5.5. DER AUSFALL VON <i>DMON1</i> UND <i>DCCZ1</i> HAT ANDERS ALS IN DER HEFE KEINEN EINFLUSS AUF DIE MORPHOLOGIE DER LYSOSOMEN	112
3.6. DER <i>DMON1</i>-AUSFALL HAT KEINEN EINFLUSS AUF DIE AKTIVITÄT VERSCHIEDENER SIGNALWEGE	114
<u>4. MATERIAL UND METHODEN.....</u>	<u>117</u>
4.1. MATERIAL	117
4.1.1. GERÄTE UND ARBEITSMATERIALIEN	117
4.1.2. ENZYME	117
4.1.3. FEINCHEMIKALIEN UND REAKTIONS-KITS	117
4.1.4. BAKTERIENSTÄMME.....	117
4.1.5. LÖSUNGEN:	118
4.1.6. ANTIKÖRPER.....	118
4.1.7. VERWENDETE FLIEGENSTÄMME	119
4.1.8. IN DIESER ARBEIT HERGESTELLTE FLIEGENSTÄMME.....	120
4.2. METHODEN.....	120

4.2.1.	CHEMISCHE TRANSFORMATION DER BAKTERIEN	120
4.2.2.	DNA-MINIPRÄPARATION NACH TENS-PROTOKOLL	121
4.2.3.	DNA-MIDIPRÄPARATION	121
4.2.4.	DNA RESTRIKTIONSVERDAU	122
4.2.5.	GEWINNUNG GENOMISCHER DNA AUS FLIEGEN/LARVEN.....	122
4.2.6.	SEQUENZIERUNG DER <i>DMON1</i> -ALLELE	123
4.2.7.	DNA-KONZENTRATIONSBESTIMMUNG	124
4.2.8.	LIGATIONEN IN DEN PGEM-T EASY-VEKTOR.....	125
4.2.9.	DNA-SEQUENZIERUNG.....	125
4.2.10.	SOEING-PCR.....	125
4.2.11.	HERGESTELLTE DNA/HYBRID-KONSTRUKTE UND VERWENDETE PRIMER.....	126
4.3.	ALLGEMEINE <i>DROSOPHILA</i>-METHODEN	131
4.3.1.	HALTUNG VON <i>DROSOPHILA</i> -STÄMMEN.....	131
4.3.2.	HERSTELLUNG VON TRANSGENEN FLIEGEN	132
4.3.3.	PRÄPARATION UND ANTIKÖRPERFÄRBUNG VON FLÜGELIMAGINALSCHEIBEN	133
4.3.4.	FIXIERUNG UND PRÄPARATION DER FLÜGELIMAGINALSCHEIBEN FÜR ELEKTRONENMIKROSKOPIE	134
4.3.5.	<i>UPTAKE</i> -EXPERIMENT	134
4.4.	LYSOTracker FÄRBUNG	136
4.4.1.	UAS/GAL4-SYSTEM	136
4.4.2.	HERSTELLUNG DER KLONE (FLP/FRT SYSTEM)	136
4.4.3.	ERZEUGUNG DER MARCM-KLONE.....	136
4.4.4.	RNA-INTERFERENZ (RNAi)	137
4.5.	PROTEINSEQUENZ-ALIGNMENTS UND PHYLOGENIE	138
5.	<u>ZUSAMMENFASSUNG.....</u>	<u>140</u>
6.	<u>SUMMARY</u>	<u>141</u>
7.	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	<u>142</u>
8.	<u>DANKSAGUNG.....</u>	<u>154</u>
9.	<u>ERKLÄRUNG</u>	<u>155</u>

1. EINLEITUNG

Wie mittelalterliche Städte ist jede Zelle von einer Barriere, der Zellmembran, umgeben. Sie dient als ein Schutz für die Zelle, welcher unter anderem dazu dient, den Transport aus und in die Zelle hinein sei es für Wasser, Ionen, Nähr-/Botenstoffe, Bestandteile der Zellmembran wie Transmembranproteine oder andere Substanzen und Materialien zu begrenzen und zu regulieren. Sie spielt allerdings nicht nur eine passive Rolle als Barriere sondern ist auch aktiv bei der Aufnahme wie bei der Sekretion von Substanzen und auch bei deren innerzellulärem Transport beteiligt. Die vorliegende Arbeit betrifft einen Aspekt am Ende des Aufnahmeprozesses und des nachfolgenden intrazellulären Transportes in der Zelle, der auch als Endozytose und anschließend daran endosomaler Transportweg bezeichnet wird.

1.1. Endozytose und der endosomale Transportweg

Die Aufnahme von Materien von der Zellmembran wird im Allgemeinen als Endozytose (endo=innen; Cytosis=Zelle) bezeichnet. Dabei wird ein Teil der Plasmamembran mit in das Zytoplasma der Zelle aufgenommen. Die so aufgenommenen Vesikel werden als Endosomen bezeichnet. Die Endozytose wird unterteilt in Phagozytose, Pinozytose und die Rezeptor-vermittelte Endozytose (Soldati und Schliwa, 2006). Durch die Phagozytose werden größere Frachten wie Pathogene, z.B. Bakterien und Viren aufgenommen. Bei der Pinozytose werden Flüssigkeiten aber auch Ionen aufgenommen. Bei der Rezeptor-vermittelten Endozytose werden Moleküle wie Rezeptoren und Liganden, Hormone und Antikörper aufgenommen. (Abb.1.1).

Die Internalisierung und die Aufnahme von Frachten mittels Endozytose läuft über verschiedene Mechanismen, von denen die Clathrin-vermittelte Endozytose, die am besten erforschte ist (Doherty und McMahon, 2009). Dabei findet eine Serie koordinierter Ereignisse statt, die wie folgt zusammengefasst werden kann:

- Rekrutierung der Frachten zu einem kleinen Bereich der Plasmamembran
- Zusammensetzung von Clathrin als triskelstrukturförmiger Käfig mittels seiner Adapter und akzessorischen Proteine
- Einstülpung der Membran und Bildung eines Vesikels
- Ablösung des Vesikels von der Membran mittels der GTPase Dynamin
- Befreiung des Vesikels vom Clathrin durch seine Auflösung

Endozytose

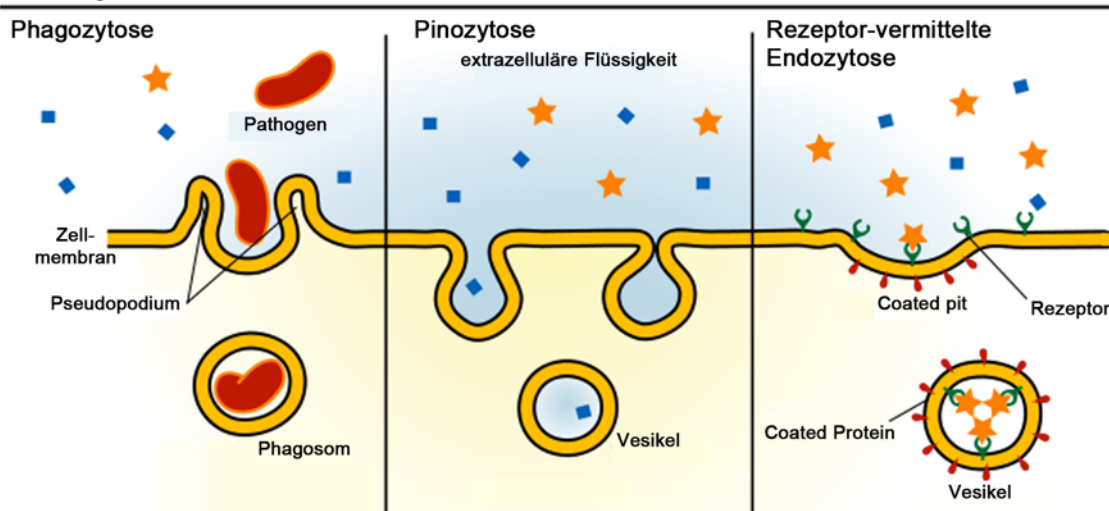


Abb.1.1: Die Endozytose. Endozytose wird unterteilt in Phagozytose, Pinozytose und der Rezeptor-vermittelte Endozytose. Bei der Phagozytose werden größere Frachten wie Bakterien und Viren aufgenommen und anschließend verdaut. Bei der Pinozytose werden Flüssigkeiten aber auch die darin schwimmenden Substanzen aufgenommen. Bei der Rezeptor-vermittelten Endozytose werden Moleküle wie Rezeptoren und Liganden, Hormone und Antikörper aufgenommen.

Verändert übernommen von Mariana Ruiz Villarreal,

http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Endocytosis_types.svg.

Nach der Endozytose und der Internalisierung in die Zelle fusionieren die endozytierten Vesikel miteinander und bilden frühe/sortierende Endosomen. Wie schon der Name dieser Endosomen verrät, werden die aufgenommenen Substanzen und Frachten in diesem Stadium sortiert. Die frühen/sortierenden Endosomen sind pleomorph, sie enthalten sowohl tubulär-förmige als auch runde Domänen (Abb.1.2). Die Aufnahme von Proteinen von der Plasmamembran kann vielfältigen Zwecken dienen. Zum einen wird dieser Mechanismus bei der Signalübertragung benutzt wie z.B. im Falle des Notch-Signalweges. Andererseits unterliegen aber auch die meisten membranassoziierten Proteine, wie alle Proteine einer Zelle, einem Gleichgewichtskreislauf (*steady-state*), werden also je nach Bedarf auf- und abgebaut (Übersicht in Sorkin und von Zastrow, 2009). Im Rahmen des Abbaus werden die Proteine zu speziellen Zellorganellen, den Lysosomen, transportiert in denen der eigentliche Abbau stattfindet. Die Lysosomen sind hoch dynamische Organellen, deren auffälligster Unterschied zu den Endosomen das Fehlen von Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren (MPR) ist (Übersicht in Luzio, Pryor und Bright, 2007). Lysosomen enthalten hydrolysierende Enzyme (saure Hydrolasen) für den Verdau der angelieferten Frachten. Auf der Membran der Lysosomen befinden sich integrierte Proteine, sogenannte LMPs (*lysosomal membrane protein*), welche die Membran der Lysosomen vom Abbau durch die Hydrolasen schützen. Lysosomen sind das Kompartiment am Ende des endosomalen Transportweges. Im Lysosom

werden außer den durch die Endozytose aufgenommenen Frachten auch intrazelluläre Organellen wie Phagosomen und Autophagosomen degradiert. Zusätzlich zu den zum Abbau bestimmten Frachten bzw. oben genannten Organellen werden auch Hydrolasen und Membranproteine zum Lysosom transportiert. Sie sind für die Aufrechterhaltung der Funktion des Lysosoms, seine Stabilität, Azidität und perinukleäre Lokalisation von Bedeutung (Bucci *et al.*, 2000; Übersicht in Huotari und Helenius, 2011; Pryor und Luzio, 2009).

Die zum Abbau im Lysosom bestimmten Proteine werden in intraluminale Vesikel (ILV) der Endosomen verpackt. Währenddessen verbleiben diejenigen Proteine, die recycelt werden sollen, auf der limitierenden Membran zurück. Die zu recycelnden Proteine werden von den tubulärförmigen Strukturen der frühen/sortierenden Endosomen entweder direkt an die Plasmamembran recycelt oder sie werden zuerst zum Recycling-Kompartiment transportiert und von dort aus recycelt. Die abzubauenen Frachten werden mittels der ESCRT-Maschinerie in intraluminale Vesikel eingepackt. Dabei ändert sich die Struktur der Endosomen und sie nehmen eine ovale bis runde Form an. Endosomen mit zum Abbau bestimmten Inhalt entwickeln sich zu reifen/späten Endosomen in einem sogenannten Reifungsprozess. Während dieser Reifung ändert sich die Komposition von den Proteinen und Lipiden, die sich auf der Membran der Endosomen befindet (Abb.1.2) (Übersicht in Huotari und Helenius, 2011). Während des Reifungsprozesses bewegen sich die Endosomen von der Zellperipherie Richtung Zellmitte entlang von Mikrotubuli. Das gleiche gilt in umgekehrter Richtung für Recyclingendosomen (Übersicht in Huotari und Helenius, 2011).

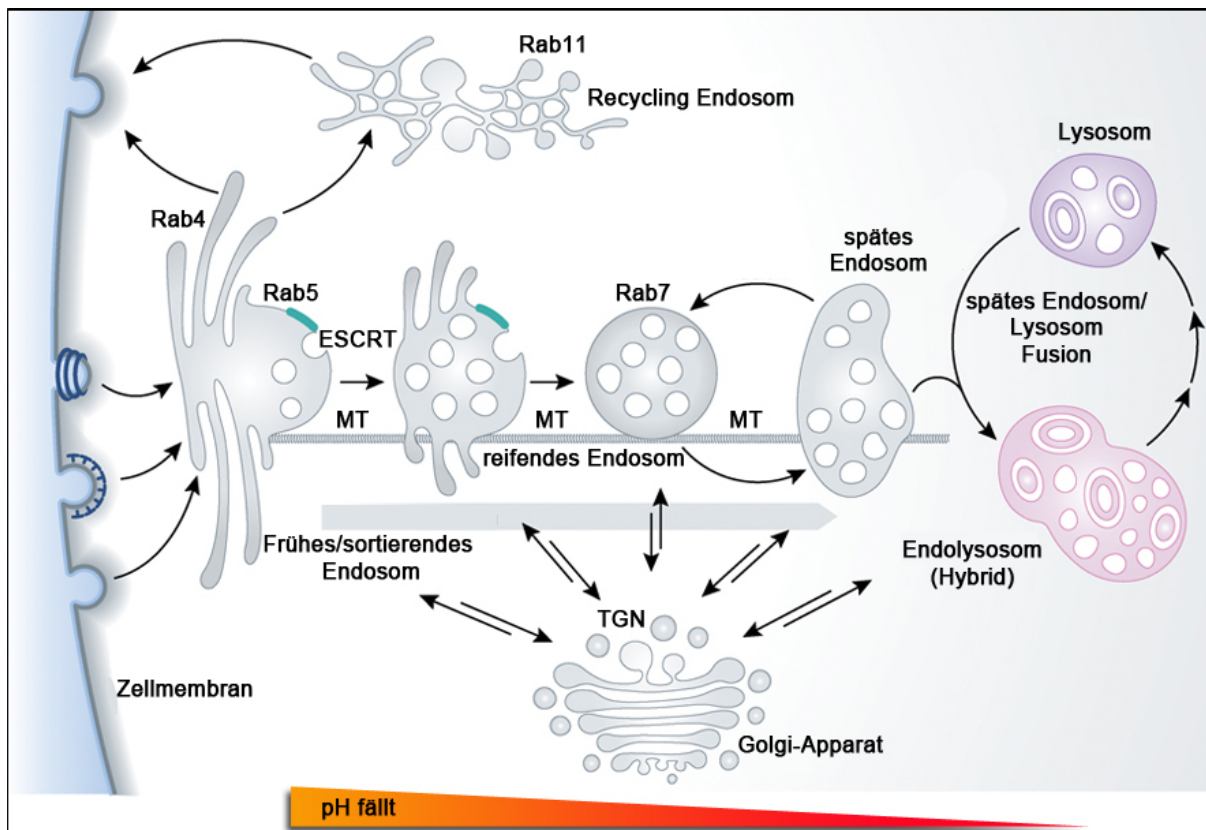


Abb.1.2: Reifungsprozess der Endosomen. Nach der Internalisierung fusionieren Endosomen miteinander und bilden das sortierende/frühe Endosom. Von dort aus werden Frachten, die recycelt werden sollen, entweder direkt recycelt, oder sie werden zum Recycling-Kompartiment transportiert und dann recycelt. Frachten, die zum Abbau im Lysosom bestimmt sind bleiben in den Endosomen, die zu späten Endosomen reifen und sich entlang der Mikrotubuli Richtung Lysosom bewegen. Die späten Endosomen fusionieren mit dem Lysosom und bilden sogenannte Hybridkompartimente. Nach dem Abbau der Frachten im Lysosom regeneriert sich das Lysosom. pH-Wert des Innenmilieus der Endosomen fällt in Richtung des Zellinneren ab. Die Abbildung wurde entnommen und modifiziert von Huotari und Helenius, 2011.

Die für diese Arbeit wesentlichen Bestandteile der endosomalen Transportweges, welche an der Reifung der Endosomen beteiligt sind, werden im folgenden Abschnitt ausführlicher dargestellt.

1.2. ESCRT-Maschinerie

Einer der wichtigen Prozesse während der endosomalen Reifung ist die vollständige Aufnahme von aufgenommenen Frachten in die ILV der Endosomen. Eine solche vollständige Aufnahme gestaltet sich vor allem problematisch bei Strukturen, die in die Zellmembranen integriert sind wie Transmembranproteine, die mit der Zellmembran bei der Endozytose aufgenommen werden. Nach der Endozytose befinden sich solche Transmembranproteine zunächst nicht vollständig im Inneren der Endosomen sondern ragen aus deren Membran zum Teil ins Zytosol hinein. Um deren vollständigen Abbau im Lysosom

zu ermöglichen werden solche Frachten durch einen spezifischen Prozess von der limitierenden Membran der Endosomen entfernt und in die intraluminalen Vesikel (ILV) der Endosomen verpackt. Neben dem vollständigem Abbau der entsprechenden Frachten ist dieser Prozess vor allem bei der Rezeptor-vermittelten Endozytose von Bedeutung, da nach der Endozytose aktivierte Rezeptoren auf der limitierenden Membran der Endosomen sich zunächst dem Zytoplasma zugewandt befinden (Abb.1.3) und teilweise in der Lage sind von dort aus den jeweiligen Signaltransduktionsweg zu aktivieren, wie es z.B. bezüglich des RTK-Rezeptors (Rezeptor-Tyrosinkinase) gezeigt wurde (Übersicht in Sorkin und von Zastrow, 2009). Erst durch die vollständige Aufnahme in intraluminalen Vesikel (ILV) werden die Transmembranrezeptoren und andere Frachten von der limitierenden Membran der Endosomen entfernt und somit dem Kontakt zu den anderen Mitgliedern der jeweiligen Signaltransduktionswege entzogen (Abb.1.3). Weil durch diesen Prozess mehrere solcher ILV sich in den Endosomen befinden, werden solche Endosomen als MVBs (*multi vesicular bodies*) bezeichnet.

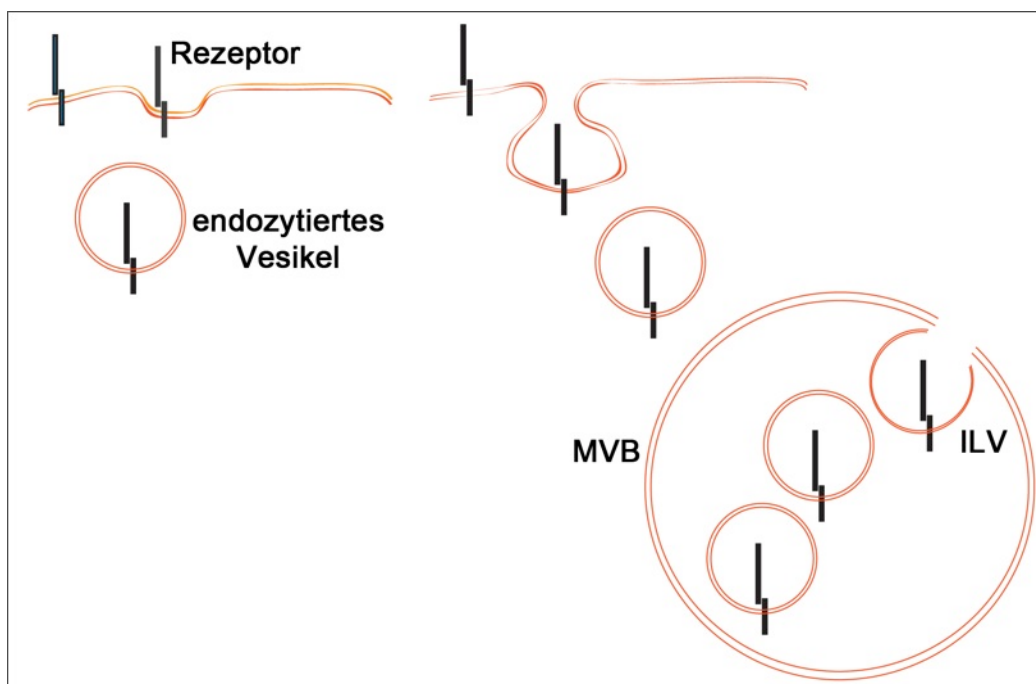


Abb.1.3: Nach der Internalisierung ragt die intrazelluläre Domäne von Transmembranrezeptoren ins Zytoplasma hinein. Dadurch sind diese Rezeptoren weiterhin aktiv oder zumindest theoretisch noch in der Lage auch weiterhin Signale senden zu können. Durch das Einpacken in intraluminalen Vesikel werden sie von der limitierenden Membran entfernt und verlieren ihre Aktivität bzw. die Möglichkeit aktiv zu werden. Anschließend können sie dem Abbau zugeführt werden, ohne dass sie den jeweiligen Signaltransduktionsweg anregen obwohl kein eigentliches Signal vorliegt.

Damit die abzubauenen Proteine in die intraluminalen Vesikel und anschließend ins Lysosom transportiert werden braucht es bestimmter Signale bzw. Markierungen dieser

Proteine. Von diesen ist die Mono-Ubiquitinierung am besten charakterisiert. Die Internalisierung der Frachten von der limitierenden Membran der Endosomen, vor allem ubiquitinierte Proteine, wird durch die Proteine der Klasse E der Vps-Proteine (*Class E VPS: vacuolar protein sorting*), bekannt aus der Hefe durchgeführt. Sie bilden zusammen vier Proteinkomplexe bekannt als die ESCRT-0-III-Komplexe (*endosomal sorting complexes required for transport*) (Übersicht in Henne *et al.*, 2011; Williams und Urbe, 2007). Sie werden im Folgenden kurz beschrieben.

Der **ESCRT-0** Komplex leitet den Anfangsschritt der Bildung von ILV ein. ESCRT-0 besteht aus zwei Untereinheiten Hrs (*hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate*; Vps27 in Hefe) und Stam (*signal transducing adaptor molecule*; Hse1 in Hefe) (Abb.1.4). Hrs und Stam enthalten ein je ein UIM-Motiv (*ubiquitin interacting motif*). Über dieses Motiv erkennen sie ubiquitinierte Frachten, binden an diese und umhüllen sie in rekrutiertes Clathrin (McCullough *et al.*, 2006; Wollert und Hurley, 2010). Hrs enthält neben dem UIM-Motiv eine FYVE-Domäne am N-Terminus (Raiborg *et al.*, 2001; Mao *et al.*, 2000). Die FYVE-Domäne wurde nach den ersten Proteinen benannt, in denen deren Vorkommen entdeckt wurde (**F**ab1p, **Y**OTB, **V**ac1p und **E**EA1). Sie stellt eine Zink-Finger-bindende, cysteinreiche Domäne aus 60-70 Aminosäuren dar und bindet spezifisch und mit hoher Affinität an Phosphoinositol-3-phosphat (PI(3)P) (Gillooly *et al.*, 2000; Kutateladze und Overduin, 2001). Durch die Fähigkeit der FYVE-Domäne an PI(3)P zu binden, wird der ESCRT-0 Komplex spezifisch an die Membran der Endosomen rekrutiert. Die Fähigkeit des ESCRT-0 Komplexes, sowohl PI(3)P als auch Ubiquitin zu binden, macht aus dem Komplex einen Detektor zum Zusammenbau und Rekrutierung der ESCRT-Komplexe an die Endosomen. Über die direkte Bindung von Tsg101 an Hrs wird der ESCRT-I-Komplex an die Membran rekrutiert (Übersicht in Henne *et al.*, 2011).

Der **ESCRT-I** Komplex besteht aus den Untereinheiten Tsg101 (Erupted), Vps28, Vps37 und Mvb12 und interagiert an gegenüberliegenden Enden sowohl mit dem ESCRT-0 wie mit dem ESCRT-II Komplex (Abb.1.4). Tsg101 interagiert mit Hrs aus ESCRT-0 und auch über eine am N-Terminus liegende UVE-Domäne (Ubiquitin-Variante E2) mit Ubiquitin. Vps28 bindet an Vps36 von ESCRT-II. Auf dieser Weise koordiniert ESCRT-I neben der Rekrutierung von anderen ESCRT-Komplexen auch die Konzentrierung ubiquitinierte Frachten auf der Membran der Endosomen (Übersicht in Henne *et al.*, 2011; Williams und Urbe, 2007).

Der **ESCRT-II** Komplex besteht aus drei Untereinheiten die zusammen ein Herterotetramer bilden. Zwei Kopien von Vps25 bilden die Arme des Y-förmigen Komplexes an denen jeweils Vps22 und Vps36 binden und die Basis von Y formen (Hierro *et al.*, 2004; Teo *et al.*, 2004). ESCRT-II bindet an ESCRT-I durch die Interaktion zwischen der GLUE-Domäne (*GRAM-like ubiquitin-binding in EAP45*) von Vps36 und dem C-Terminus von Vps28 (Gill *et al.*, 2007; Teo *et al.*, 2006; Saksena *et al.*, 2009). Über die GLUE-Domäne bindet Vps36 auch Ubiquitin und PI(3)P (Slagsvold *et al.*, 2005). An ESCRT-II bindet ESCRT-III durch die Interaktion zwischen Vps25 und Vps20 (Abb.1.4).

Der **ESCRT-III** Komplex spielt eine wichtige Rolle bei der Membranabschnürung und ist verantwortlich für das Abklemmen des „Halses“ der invaginierten Membran, was zur Bildung eines ILV führt (Wollert *et al.*, 2009, Wollert und Hurley, 2010). Der ESCRT-III-Komplex besteht aus vier Proteinen: Vps20, Vps32/Snf7, Vps24 und Vps2 (Babst *et al.*, 2002; Bajorek *et al.*, 2009) (Abb.1.4). Nach der Bindung der ESCRT-II-Untereinheit Vps25 an Vps20 an der Membran werden die weiteren ESCRT-III Untereinheiten an die Membran rekrutiert und dort zusammengesetzt (Teo *et al.*, 2004; Saksena *et al.*, 2009). Der ESCRT-III-Komplex bindet nicht an Ubiquitin. Dafür rekrutiert snf7/Vps32 die ESCRT-III-Adaptorproteine Bro1/Alix (*BCK1-like resistance to osmotic shock protein-1/apoptosis-linked gene-2 interacting protein X*). Sie wiederum rekrutieren Doa (*degradation of alpha-4*), ein Deubiquitinierungsenzym, an die Endosomen welches die Deubiquitinierung der Frachten vor deren Aufnahme in ILV vermittelt (Luhtala und Odorizzi, 2004; Odorizzi *et al.*, 2003).

Nach der Invagination des ILV wird der ESCRT-III-Komplex von der limitierenden Membran des Endosoms wieder abgelöst. Hierzu wird Energie gebraucht. Diese Energie wird von der Klasse I AAA-ATPase (*ATPase associated with various cellular activities*) Vps4 zur Verfügung gestellt, welche die katalytische Dissoziation der ESCRT-Maschinerie von der Membran von Endosomen zurück ins Zytoplasma vermittelt (Babst *et al.*, 1998) (Abb.1.4).

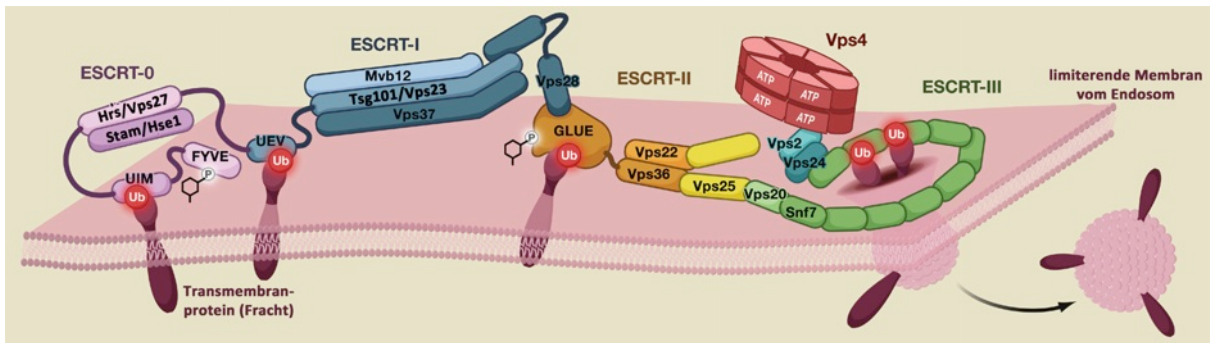


Abb.1.4: ESCRT-Komplexe im Überblick. ESCRT-Maschinerie besteht aus vier Komplexen, ESCRT-0-III. Der ESCRT-0 Komplex leitet den Anfangsschritt bei der Bildung von ILV. Als nächstes wird der ESCRT-I Komplex durch die direkte Bindung von Hrs (Komponente von ESCRT-0) an Tsg101 an die Membran rekrutiert. ESCRT-II bindet an ESCRT-I durch die Interaktion zwischen der GLUE-Domäne von Vps36 und dem C-Terminus von Vps28. ESCRT-III bindet an ESCRT-II durch Interaktion zwischen Vps25 und Vps20. Nach der Abschnürung des ILV wird der ESCRT-III Komplex durch Vps4 von der limitierenden Membran des Endosoms abgelöst.

Der Ausfall von ESCRT 0-III in *Drosophila* führt zur Überaktivierung der verschiedenen Signaltransduktionswege (Lloyd *et al.* 2002; Jekely und Rorth, 2003; Moberg *et al.*, 2005; Thompson *et al.*, 2005; Vaccari und Bilder, 2005).

Wie schon erwähnt, reguliert die Zusammensetzung der verschiedenen Proteine auf der Membran der Endosomen den Prozess des endosomalen Transports. Diese Proteine definieren zum Teil den Charakter der Endosomen auf denen sie sich befinden. Eine wichtige Gruppe der Proteine, die beim endosomalen Transportweg eine entscheidende Rolle spielen sind die Rab-GTPasen. Sie werden im folgenden Abschnitt ausführlicher erläutert.

1.3. Rab-GTPasen

Rab-Proteine bilden die größte Familie der kleinen GTPasen. Sie sind spezifisch auf Membranen der verschiedenen intrazellulären Kompartimente verteilt und regulieren den Transport zwischen Organellen. Diese Tatsache macht die Rab-GTPasen und ihre Effektoren zu ausgezeichneten Kandidaten für die Bestimmung der Kompartimentidentität der Organellen auf der sie sich befinden (Übersicht in Novick und Zerial, 1997; Stenmark, 2009; Somsel und Wandinger-Ness, 2000). Rab-Proteine regulieren das Anbinden der Vesikel an ihre Ziellmembran, welche zur Fusion zwischen den Membranen führt. Sie sind auch an der Abspaltung der Vesikel (Knospung) beteiligt. Überdies scheinen Rab-Proteine auch die Rekrutierung der Motorproteine und die Interaktion zwischen den Vesikeln und den Zytoskelettelementen zu regulieren, welche für die Motilität der Endosomen notwendig ist. Rab5 zum Beispiel reguliert den Clathrin-vermittelten Transport endozytierter Vesikel von

der Plasmamembran zu frühen Endosomen sowie die homotypische Fusion der frühen Endosomen (Gorvel *et al.*, 1991; Bucci *et al.*, 1992). Überdies reguliert Rab5 sowohl die Bindung der frühen Endosomen an Mikrotubuli als auch deren Bewegung in Richtung des minus-Endes von Mikrotubuli (Nielsen *et al.*, 1999).

Rab-Proteine und ihre Effektoren sind allem Anschein nach nicht zufällig auf der Membran der Endosomen verteilt sondern in definierten Membranabschnitten zu finden, die auch als Rab-Domänen bezeichnet werden (Übersicht in Zerial und McBride, 2001). Zum Beispiel konnten spezifische Membranabschnitte bei Vesikeln beobachtet werden von denen ein Abschnitt nur Rab5 enthält, einer sowohl Rab5 als auch Rab4 trägt und ein dritter Rab4 und Rab11 (Sönnichsen *et al.*, 2000). Die beobachteten Kombinationen der Rab-Proteine waren zudem davon abhängig, welchen Kompartimenten die Vesikel zuzurechnen waren. So wurden die beiden ersten Kombinationen auf frühen/sortierenden und die dritte Gruppe auf perinukleär lokalisierten Recycling-Endosomen beobachtet (Sönnichsen *et al.*, 2000; Zerial und McBride, 2001) (siehe auch untenstehende Abb.1.5). Durch die Rab-Zusammensetzung kann somit nicht nur das jeweilige Kompartiment sondern zum Teil auch eine spezifische Membranregion identifiziert werden.

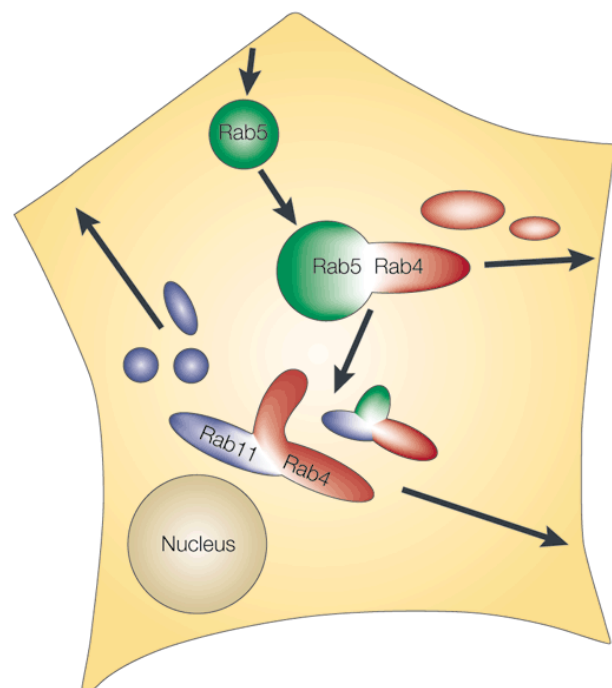


Abb.1.5: Membranen der Endosomen haben definierte Rab-Domänen. Die Verteilung von Rab5, Rab4 und Rab11 in unterschiedlichen Rab-Domänen ist hier dargestellt. Rab5 wird als Marker für die frühen/sortierenden Endosomen, Rab4 für das direkte (*fast*) Recycling aus den frühen/sortierenden Endosomen und Rab11 für das Recycling aus den Recyclingkompartimenten (*slow recycling*) eingesetzt. Die Pfeile zeigen die Richtung in der die Frachten transportiert werden (Sönnichsen *et al.*, 2000; die Abbildung wurde übernommen von Zerial und McBride, 2001).

Rab-Proteine liegen entweder in der GDP- oder der GTP-gebundenen Konformation in der Zelle vor. Der Austausch von GDP gegen GTP und umgekehrt verleiht den Rab-Proteinen die Fähigkeit wie ein molekularer Schalter eine regulatorische Funktion zu erfüllen (Übersicht in Zerial und McBride, 2001; Pfeffer und Aivazian, 2004). Für die Bindung von GTP an die Rab-Proteine ist die Funktion von GEF-Proteinen (*Guanosin exchange factor*) entscheidend. Die Umwandlung zur GDP gebundenen Form findet durch Hydrolyse von gebundenem GTP statt, was durch die Funktion von GAP-Proteinen (*GTPase activating protein*) gefördert wird (Übersicht in Pfeffer und Aivazian, 2004; Barr und Lambright, 2010). Aktuelle Modellen nach regulieren Rab-Proteine in ihrer GTP-gebundenen Form die Membran-Anbindung und Fusion. Auch die Bindung von RabGTPasen an deren Effektorproteine findet in der GTP-gebundenen Form statt. RabGTPasen werden nach der Synthese an ihrem C-Terminus durch eine kovalent gebundene hydrophobe Prenyl-Gruppe posttranslational modifiziert, welche als eine Art Membrananker dient (Pfeffer, 1994; Pfeffer und Aivazian, 2004). Ein zytoplasmatisch lokalisiertes GDI-Protein (*GDP-Dissociation inhibitor*) hat die Fähigkeit GDP-gebundene Rab-Proteine von der Membran ins Zytoplasma zurückzuziehen. GDI schirmt die Prenylgruppe von Rab-GDPs ab. Vor der Rekrutierung der Rab-Proteine an die Membran findet ein Nukleotid-Austausch statt, in dem GDP gegen GTP ausgetauscht wird. Dabei muss GDI sich vom Rab-GDP lösen wofür GDFs (*GDI-displacement factor*) zuständig sind (Pfeffer, 1994; Pfeffer und Aivazian, 2004).

Ein wichtiges Kriterium während der Reifung der Endosomen ist der Austausch von Rab5, das vorwiegend an frühen Endosomen zu finden ist (Bucci *et al.*, 1992; Stenmark, 2009; Huotari und Helenius, 2011) gegen Rab7, das charakteristisch für späte Endosomen ist (Méresse *et al.*, 1995; Stenmark, 2009; Huotari und Helenius, 2011). Dieser Prozess ist bekannt als Rab-Konversion (Rink *et al.*, 2005). Untersuchungen in *C. elegans* haben die Beteiligung eines Proteins aus der SAND-Familie, SAND-1, bei diesem Prozess aufgezeigt (Poteryaev und Spang, 2005; Poteryaev *et al.*, 2007, 2010). SAND-1 wird in den meisten anderen Organismen als Mon1 (*monensin sensitivity-1*) bezeichnet.

1.4. Die Rolle von SAND-1/Mon1 und dessen Interaktionspartner Ccz1 beim Austausch von Rab5 gegen Rab7

1.4.1. SAND-1/Mon1 als ein Schalter für die Umwandlung der Endosomen von frühen bis späten Endosomen

Poteryaev *et al.* (2007 und 2010) haben gezeigt, dass in *sand-1*-mutanten Zellen die Rekrutierung von Rab7 an die Endosomen defekt ist. Dabei ist Rab7 vorwiegend zytoplasmatisch lokalisiert. Darüber hinaus haben sie gezeigt, dass die Endosomen vergrößert sind. Zusätzlich war in den mutanten Zellen Rab5 auf den Endosomen akkumuliert. Dazu kam, dass die akkumulierten Rab5-Proteine auf den Endosomen in den mutanten Zellen noch in der Lage waren homotypische Fusionen einzugehen. Zusammengefasst legen diese Beobachtungen nahe, dass in Abwesenheit von SAND-1 Rab5 auf der endosomalen Membran zurückgehalten wird und dabei zumindest teilweise im aktiven Zustand ist (Poteryaev *et al.*, 2007 und 2010). Es wurde auch gezeigt, dass außer Rab5 auch Rabex-5 auf den Endosomen akkumuliert (Poteryaev *et al.*, 2010). Rabex-5 ist ein GEF von Rab5 mit einer hochkonservierten VPS9-Domäne welche durch ein Helix-Bündel stabilisiert wird. Es stellt den katalytischen Kern für die GEF-Aktivität dar (Delprato *et al.*, 2004). Ferner besteht Rabex-5 aus einer A20-Zinkfinger-Domäne (ZnF), die E3-Ligase-Aktivität aufweist und einer ubiquitinbindenden Domäne (UIM) mit welcher es ubiquitinierte Proteine binden kann (Lee *et al.*, 2006; Mattera *et al.*, 2006; Mattera und Bonifacino 2008). Eine Übersicht der Rabex-5-Domänenstruktur ist in der Abb.1.6 dargestellt.

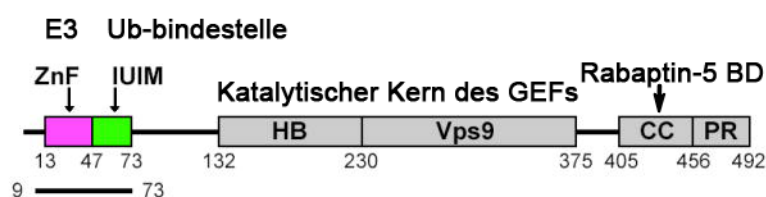


Abb.1.6: Übersicht der Rabex-5-Domänenstruktur. Rabex-5 besteht aus einer Zinkfinger-Domäne mit E3-Ligase-Aktivität, einer ubiquitinbindenden Domäne, einem katalytischen Kern für die GEF-Aktivität und einer Rabaptin-5-bindenden Domäne. HB: Helix-Bündel, CC: *coiled-coil*, PR: Prolinreiche Domäne. Übernommen und verändert aus Lee *et al.*, 2006.

Rabex-5 bindet an Rabaptin-5 und bildet mit diesem zusammen einen Komplex (Rabex-5-Rabaptin-5). Die Bindung von Rabaptin-5 an Rabex-5 erhöht die GEF-Aktivität von Rabex-5, was die Bildung des aktiven, GTP-gebundenen Rab5 beschleunigt, welches wiederum an Rabaptin-5 bindet. Somit entsteht eine positive Rückkopplungsschleife für die Aktivierung von Rab5, bei deren Etablierung der oben genannte Komplex erforderlich ist (Lippe *et al.*,

2001). Das heißt, dass der Rabex-5-Rabaptin-5-Komplex sowohl die Eigenschaft besitzt als GEF als auch als ein Effektor von Rab5 zu funktionieren (Horiuchi *et al.*, 1997). Das aktivierte Rab5-Protein vermittelt die Rekrutierung der weiteren Rab5-Effektoren.

Einer der weiteren Rab5-Effektoren ist Vps34, eine Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI(3)K) die Phosphatidyl-Inositol-3-Phosphat (PI(3)P) auf der limitierenden Membran der Endosomen produziert (Christoforidis *et al.*, 1999; Jovic *et al.*, 2010). Dieses Lipid stellt eine Andockstation für Proteine mit einer FYVE-Domäne dar (Gillooly *et al.*, 2000). Poteryaev *et al.* (2010) haben gezeigt, dass SAND-1 spezifisch aber mit schwacher Affinität an PI(3)P bindet. Das heißt ein bestimmter PI(3)P-Level könnte ein Signal für die Rekrutierung von SAND-1 an die limitierende Membran der Endosomen sein (Poteryaev *et al.*, 2010).

In der Hefe wurde gezeigt, dass die Interaktion von Rab7 mit einem Proteinkomplex bestehend aus Mon1p, dem Homologen der SAND-1 in *C. elegans*, und Ccz1p (*calcium caffeine zinc sensitivity*) für die Fusion von späten Endosomen und Vakuolen erforderlich ist (Wang *et al.*, 2002, 2003). Poteryaev *et al.* (2007) konnten ebenfalls diese Interaktion in *C. elegans* durch eine *yeast-two-hybrid* (Y2H) bestätigen (Poteryaev und Spang, 2005; Poteryaev *et al.*, 2007). Ferner zeigten Sie eine Interaktion von Mon1b mit Mitgliedern des HOPS-Komplexes in Y2H-Experimenten (für VPS18 und VPS11) sowie in *in vitro*-Experimenten für Vps16A, VPS18, VPS33A und VPS41. Dagegen konnte keine Interaktion mit dem letzten Mitglied des HOPS-Komplexes, VPS39 festgestellt werden (Poteryaev *et al.*, 2010). Der Aufbau und Funktion des HOPS-Komplexes wird weiter unten genauer beschrieben.

Das vorgeschlagene Modell von Poteryaev *et al.* (2010) aus diesen Ergebnissen war, dass SAND-1/Mon1 zwei Rollen beim Transport von frühen bis späten Endosomen spielt. Zum einen entfernt SAND-1/Mon1 Rab5, zum anderen rekrutiert es Rab7 an die Membran der Endosomen. Genauer soll hierbei die Rekrutierung von SAND-1/Mon1 an die Membran der Endosomen die positive Rückkopplungsschleife von Rab5 unterbrechen, indem es Rabex-5 von der Membran der Endosomen entfernt. Dadurch wird Rab5 inaktiv und löst sich von der limitierenden Membran der Endosomen. Anschließend rekrutiert SAND-1/Mon1, wahrscheinlich durch die festgestellte Interaktion mit HOPS-Komplex, Rab7 an die Membran der Endosomen wonach die Rab7-vermittelte Fusion mit dem Lysosom stattfindet (Abb.1.7) (Poteryaev *et al.*, 2010).

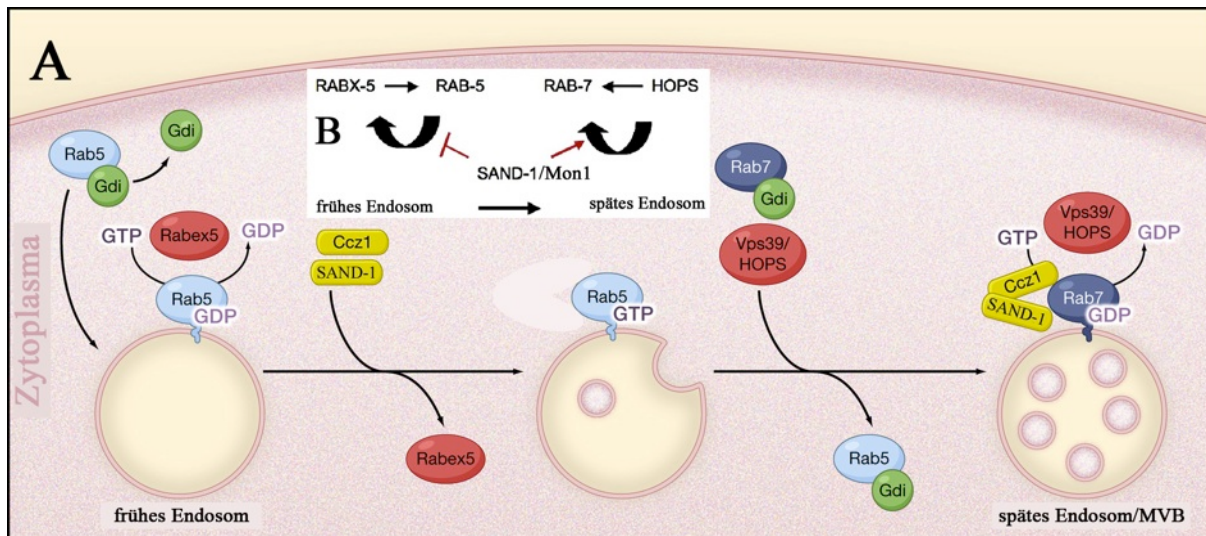


Abb.1.7: Das Modell der Funktionsweise von SAND-1/Mon1 in *C. elegans*. Poteryaev *et al.*, 2010 haben die Funktion von SAND-1 als einen Schalter bei der Umwandlung der Endosomen von frühen zu späten Endosomen dargestellt (A). SAND-1/Mon1 inaktiviert Rab5 durch die Entfernung von seinem GEF, Rabex-5, von der Membran der Endosomen. Als nächstes reguliert SAND-1/Mon1 die Rekrutierung von Rab7 an die Membran der Endosomen und seine Aktivierung durch die Interaktion mit dem HOPS-Komplex, welches bis dahin als GEF für Rab7 bekannt war (B). Abbildung A wurde aus Cabrera und Ungermann (2010) und Abbildung B aus Poteryaev *et al.*, 2010 entnommen und modifiziert.

1.4.2. Mon1-Ccz1-Komplex ist der GEF von Ypt7/Rab7

Bezüglich der Vps39-Untereinheit des HOPS-Komplexes, welche in den folgenden Abschnitt ausführlicher beschrieben wird, wurde in früheren Untersuchungen angenommen, dass sie eine Rab7-GEF-Aktivität hat (Wurmser *et al.*, 2000). Diese Annahme wurde aber von Peralta *et al.* (2010) bei späteren Untersuchungen in Zellkultur widerlegt. Hiernach konnte keine Rab7-Aktivität ausgelöst durch Vps39 beobachtet werden. Peralta *et al.* (2010) argumentierten, dass die veränderte Morphologie der Lysosomen (Clusterbildung bei Vps39-Überexpression und Fragmentierung der Lysosomen bei Expression des wahrscheinlich dominant negativen Allels mVps39_{mut}) nicht von veränderten Rab7-GTP-Bindungsstatus begleitet war und somit wahrscheinlich durch eine indirekte oder unabhängige Rab7-Aktivität zustande kommt (Peralta *et al.*, 2010). Diese Ergebnisse sprechen also gegen eine GEF-Aktivität von Vps39. Letztendlich haben Nordmann *et al.*, (2010) durch Untersuchungen in der Hefe gezeigt, dass Vps39 nicht für die GEF-Aktivität von Ypt7/Rab7 zuständig ist und wahrscheinlich als ein Effektor von Ypt7/Rab7 dient. Die GEF-Aktivität für Ypt7/Rab7 haben sie stattdessen dem Mon1-Ccz1-Komplex zugeordnet (Nordmann *et al.*, 2010). Im Gegensatz zu den oben dargestellten Ergebnissen von Poteryaev *et al.* (2010) wurde hier Vps39 als die einzige Untereinheit des HOPS-Komplexes festgestellt, die Mon1 direkt bindet. Das auf der

Basis dieser Ergebnisse vorgeschlagene Modell von Nordmann *et al.*, (2010) besagt Folgendes. Der Mon1-Ccz1-Komplex wird durch Vps21/Rab5-GTP und CORVET an die Endosomen rekrutiert. Es koordiniert die Inaktivierung von Rab5 und die Rekrutierung von Ypt7/Rab7, möglicherweise zusammen mit Vps39. Mon1-Ccz1 generiert Ypt7/Rab7-GTP durch seine GEF-Aktivität und dieses kann anschließend an den HOPS-Komplex binden (Abb.1.8). Daraufhin findet die Fusion des späten Endosoms mit der Vakuole/Lysosom statt. (Nordmann *et al.*, 2010).

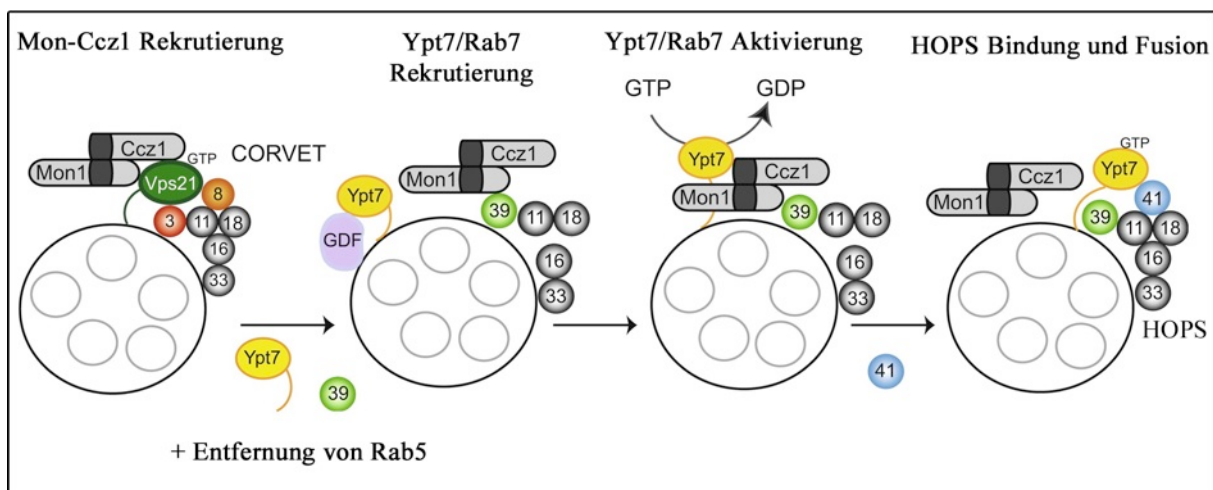


Abb.1.8: Mon1-Ccz1 dient als GEF für Rab7. Das vorgeschlagene Modell von Nordmann *et al.*, 2010 stellt Mon1 und dessen Interaktionspartner Ccz1 als GEF für Rab7 dar. Die Abbildung wurde aus Nordmann *et al.*, 2010 entnommen und modifiziert.

Das Model von Nordmann *et al.* (2010), dass der Mon1-Ccz1-Komplex als GEF für Rab7 dient, wurde auch durch Experimente in Säugtierzellen bestätigt (Gerondopoulos *et al.*, 2012). Allerdings konnte eine solche GEF-Aktivität von SAND-1 für Rab7 von Poteryaev und Spang in *C. elegans* nicht beobachtet werden (Poteryaev *et al.*, 2007).

1.4.3. SAND-1/Mon1-Ccz1 als GDF für die Rekrutierung von Rab7

Ein drittes Modell über die Funktion vom SAND-1/Mon1-Ccz1-Komplex wurde aus den Ergebnissen der Untersuchungen von Kinchen und Ravichndran (2010) in *C. elegans* und Säugertierzellen aufgestellt. Kinchen und Ravichandran haben bezüglich der Funktion von SAND-1/Mon1 in *C. elegans* gezeigt, dass SAND-1/Mon1 und Ccz1 auch beim Reifungsprozess von Phagosomen den Austausch von Rab5 gegen Rab7 ermöglicht (Kinchen und Ravichandran, 2010). Sie zeigten, dass Mon1 an Rab5-GTP bindet aber nicht an Rab5-GDP. Dies steht im Gegensatz zur Ergebnissen von Poteryaev *et al.* (2007, 2010) die keine Interaktion zwischen SAND-1/Mon1 und Rab5 feststellen konnten. Darüber hinaus konnten

Poteryaev *et al.* (2007) keine Interaktion zwischen SAND-1 und Rab7 feststellen. Kinchen und Ravichandran (2010) haben dagegen gezeigt, dass Mon-1 an Rab7 bindet, aber nur im Komplex mit seinem Bindungspartner Ccz1. SAND-1/Mon1 scheint demnach die Interaktion mit Ccz1 für die Erfüllung seiner Funktion bezüglich der Rekrutierung von Rab7 zu benötigen (Kinchen und Ravichandran, 2010). Sie haben auch gezeigt, dass die Assoziation von endogenen GDI mit Rab7 durch die Expression von Mon1 alleine oder zusammen mit Ccz1 in 293T Zellen abnahm. Dagegen blockiert die Expression von mutantern Mon1 die Dissoziation von GDI von Rab7.

Basierend auf diesen Ergebnissen wurde von Kinchen und Ravichandran (2010) das folgende Modell vorgeschlagen. Demnach wird SAND-1/Mon1 durch die Bindung an Rab5-GTP an die frühe Endosomen rekrutiert. Nach der Bindung an seinen Interaktionspartner Ccz1 wirkt dieses Protein-Komplex wie ein GDF und entfernt GDI von Rab7. Dadurch wird die Aktivität und Rekrutierung von Rab7 an die Membran der Endosomen ermöglicht. Das von ihnen vorgeschlagene Modell stellt SAND-1/Mon1 auch als einen neuen Effektor von Rab5 dar, welcher in Komplex mit Ccz1 die Rab5-Aktivität und die Rab7-Rekrutierung bewirkt.

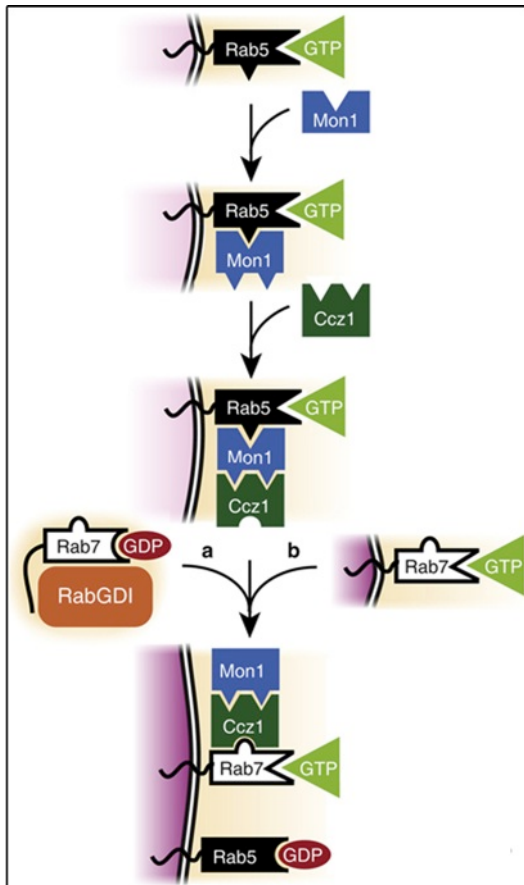


Abb. 1.9: Das Modell von Kinchen und Ravichandran zur Funktion von Mon1-Ccz1. Mon1 wurde auf Grund seiner Interaktion mit Rab-GTP von Kinchen und Ravichandran (2010) als ein neuer Effektor für Rab5 vorgeschlagen. Sie nehmen an, dass die Rekrutierung und Aktivierung von Rab7 durch Mon1-Ccz1 auf die Funktion des Komplexes als GDF zurückzuführen sein könnte. Die Abbildung wurde aus Bohdanowicz und Grinstein (2010) entnommen und modifiziert.

Für die vollständige Fusion der Membranen miteinander ist die Interaktion der Rab-GTPasen mit einer Gruppe von Effektorproteinen notwendig, die dabei als eine Art Bindungsfaktoren dienen. Durch sie werden die beiden Membranen miteinander verbunden. Die Bindungsfaktoren liegen entweder wie EEA1, der Effektor von Rab5, auf den frühen/sortierenden Endosomen, in Form von langen *coiled-coil* Proteinen vor oder sie bestehen aus mehreren Untereinheiten (*multisubunit tethering complex, MTC*). Zwei solcher Komplexe sind die heterohexameren Komplexe CORVET (*class C core vacuole/endosome tethering*) und HOPS (*homotypic fusion and protein sorting*).

1.5. HOPS/CORVET-Komplexe

Aufbau und Funktionsweise dieser Komplexe wurden hauptsächlich in der Hefe, in der sie zuerst identifiziert wurden, untersucht. Beide Komplexe sind aber konserviert und kommen auch in höheren Eukaryoten wie *Drosophila* vor. Die beiden Komplexe haben vier gemeinsame Proteine, Vps11, Vps16, Vps18 (in *Drosophila* Deep orange (Dor)) und Vps33 (in *Drosophila* Vps33A bzw. Carnation (Car) und Vps33B (CG5127)), die zu der Klasse C der Vps-Proteine gehören. Vps33 interagiert mit SNARE-Proteinen. Die beiden Komplexe haben jeweils zwei spezifische Untereinheiten. Vps3 und Vps8 sind die spezifischen Untereinheiten im CORVET Komplex, Vps39 und Vps41 diejenigen im HOPS Komplex. (Übersicht in Nickerson *et al.*, 2009; Bröcker *et al.*, 2010; Epp *et al.*, 2011; Balderhaar und Ungermann, 2013).

Die HOPS und CORVET-Bindungsfaktor-Komplexe können mit Rab-GTPasen und mit SNARE-Proteinen interagieren. Hierbei stellt CORVET das Effektorprotein von Rab5 dar und scheint bei der homotypischen Vesikelfusion und der Entstehung von MVBs eine Rolle zu spielen. Der HOPS-Komplex hingegen stellt den Effektorkomplex von Rab7 dar und ist dementsprechend an der Fusion von Endosomen mit dem Lysosom beteiligt (Übersicht in Balderhaar und Ungermann, 2013). Bei beiden Komplexen wird angenommen, dass sie die Zusammensetzung der SNARE-Proteine auf der Vesikelmembran kontrollieren. SNARE-Proteine spielen eine zentrale Rolle bei der eigentlichen Verbindung bzw. Vermischung der fusionierenden Membranen bei Endomembransystemen. (Bonifacino und Glick, 2004;

Ungermann und Langosch, 2005; Jahn und Scheller, 2006). Für den HOPS-Komplex z. B. wurde in der Hefe gezeigt, dass dieser Komplex die frühzeitige Auflösung der SNARE-Proteine hindert (Hickey und Wickner, 2010). Die Strukturanalyse des HOPS-Komplexes hat gezeigt, dass dieses eine Seepferd-ähnliche aber flexible Struktur hat (Bröcker *et al.*, 2012). Dabei kann der HOPS-Komplex als längliche Form vorliegen aber auch kontrahieren. Der HOPS-Komplex kann durch seine beiden spezifischen Untereinheiten, Vps39 und Vps41, an Rab7 binden. Diese Struktur hilft dem Komplex in seiner ausgestreckten Form an Rab7 zu binden, welches auf späten Endosomen und auf der Vakuole/Lysosom vorliegt. Durch die Kontraktion nähern sich die Membranen der beiden Kompartimente an. Dadurch kann Vps33 mit den SNARE-Proteinen interagieren und deren Zusammensetzung fördern. Anschließend findet die Fusion des späten Endosoms mit der Vakuole statt (Bröcker *et al.*, 2012 und nachfolgende Abb.1.10).

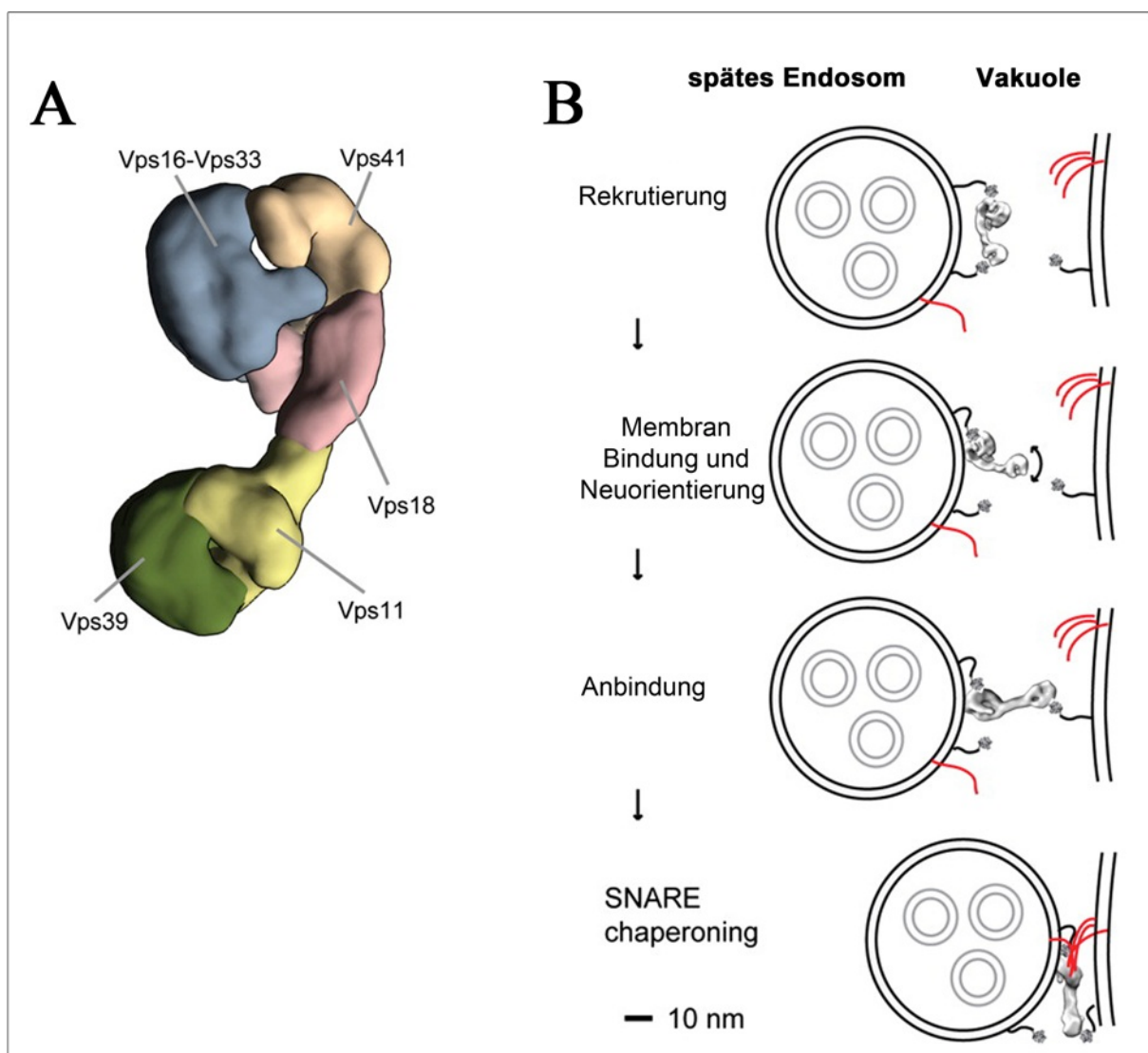


Abb.1.10: HOPS-Komplex: Struktur und Funktion. Die einzelnen Bestandteile des HOPS-Komplexes sind in einer Seepferdchen-ähnlichen Form angeordnet (**A**), die dem Komplex die Annahme einer länglichen und einer zusammengezogenen Konformation erlauben. Bei der Fusion der späten Endosomen mit der Vakuole (äquivalent zum Lysosom) nimmt ein Ende des Komplexes Kontakt mit der Membran der Vakuole auf, während das andere Ende an die Membran des späten Endosoms gebunden bleibt. Danach kontrahiert der Komplex von der langen zur verkürzten Konformation und verringert dadurch den Abstand zwischen beiden Membranen, was deren Fusion über die Funktion der SNAREs (rote Linien auf den Membranen) ermöglicht (**B**) (Bröcker *et al.*, 2012). Die Abbildungen sind übernommen und modifiziert von Bröcker *et al.*, 2012.

1.6. Flügelimaginalscheibe von *D. melanogaster* als Untersuchungsmodell

In dieser Arbeit wurde *Drosophila melanogaster* als Untersuchungsorganismus und die Flügelimaginalscheibe als Untersuchungsgewebe verwendet. *Drosophila* enthält nur vier Chromosome, wobei viele bis in die Säugetiere konservierten Gene auch bei diesem Organismus vorkommen. Durch die Verwendung von Balancerchromosomen werden die dauerhafte Haltung mutanter Allele und auch vielfältige genetische Manipulationen der zu untersuchenden Organismen ermöglicht, die zur Kartierung und Charakterisierung der betreffenden Allele benutzt werden können. Ferner sind viele Methoden etabliert, wie z.B. die klonale Analyse, mit deren Hilfe man sowohl wildtypische als auch mutante Zellen in einem Gewebe nebeneinander vorliegend miteinander vergleichen kann, was die Charakterisierung von Genfunktionen in *D. melanogaster* gut durchführbar macht. Diese und viele weitere Vorteile machen *Drosophila melanogaster* zu einem exzellenten Modellorganismus.

Die adulten Organe und Körperanhänge von *D. melanogaster* entwickeln sich aus den sogenannten Imaginalscheiben, die ausgezeichnete Systeme für die Analyse der Musterbildung und *in vivo* Experimente darstellen. Während der embryonalen Entwicklung stülpen sich die Imaginalscheiben vom embryonalen Ektoderm als einschichtige und undifferenzierte epitheliale Säckchen aus und verbleiben als solche bis zur Metamorphose. Die Zellen der Imaginalscheiben teilen sich während der larvalen Phase und differenzieren während der puppalen Phase zu den entsprechenden Teilen der Imago (Abb.1.11). Obwohl alle Imaginalscheiben oberflächlich ziemlich ähnlich sind, entwickeln sie sich entsprechend dem Segment, auf dem sie lokalisiert sind.

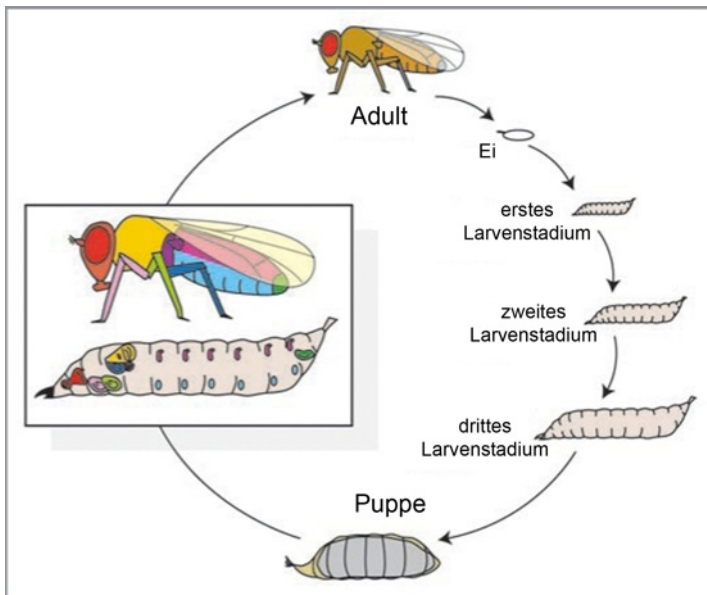


Abb.1.11: Der Entwicklungszyklus von *D. melanogaster*. Die in dieser Arbeit untersuchten Flügelimaginalscheiben wurden aus den Larven des dritten larvalen Stadiums entnommen. Die eingesetzte Abbildung zeigt die ungefähre Lage der Imaginalscheiben in der Larve und der gleich kolorierten, daraus entstandenen adulten Organe im Imago dar. Abbildung übernommen und verändert von Shingleton (2010).

Die Flügel von *Drosophila* entwickeln sich aus den Flügelimaginalscheiben. Während der Metamorphose entsteht aus dem zweidimensionalen einschichtigen Epithel der Flügel mit drei Dimensionen. Dafür werden Achsen festgelegt, die als Koordinatensystem dienen und entlang deren sich die Zellen teilen und entwickeln. Die zwei Hauptachsen in den Flügelimaginalscheiben, entlang deren die Kompartimentbildung stattfindet sind die antero-posteriore (A/P) und die dorso-ventrale (D/V) Achse. Diese Achsen bilden die sogenannten organisatorischen Zentren. Kompartimente werden von Gründerzellen erzeugt. Nachkommen der Zellen in einem Kompartiment verbleiben in dem entsprechenden Kompartiment. Die Kompartimente werden durch die Expression von entsprechenden Selektorgenen festgelegt (Siehe Abb.1.12).

Das Selektorgen des posterioren Kompartiment ist *engrailed* (*en*) (Garcia-Bellido, 1975). Alle Zellen die *en* exprimieren nehmen das posteriore Schicksal an. Die Zellen, die *engrailed* exprimieren, exprimieren auch das Gen *hedgehog* (*hh*), denn die Expression von *hh* wird durch *en* angeregt (Tabata *et al.*, 1992; Zecca *et al.*, 1995). Das Morphogen Hh wandert über eine kurze Strecke in die benachbarte Zelle auf dem anterioren Kompartiment und dort bindet an seinem Transmembranrezeptor Patched (Ptc) (Chen und Struhl, 1998). Durch diese Bindung wird die Inhibition des Transmembranproteins Smoothed aufgehoben und dieses wird aktiviert. Dabei gelangt der Transkriptionsfaktor Cubitus interruptus (Ci) in den

Nukleus, um dort die Expression von Zielgenen wie z. B. *decapentaplegic (dpp)* zu induzieren (Robbins *et al.*, 1997). Dpp wird in einem schmalen Streifen entlang der A/P-Achse in dem anterioren Kompartiment exprimiert, wandert aber von dort aus sowohl in das anteriore wie das posteriore Kompartiment. Die Zielgene von Dpp sind *spalt (sal)* und *optomotor-blind (omb)*.

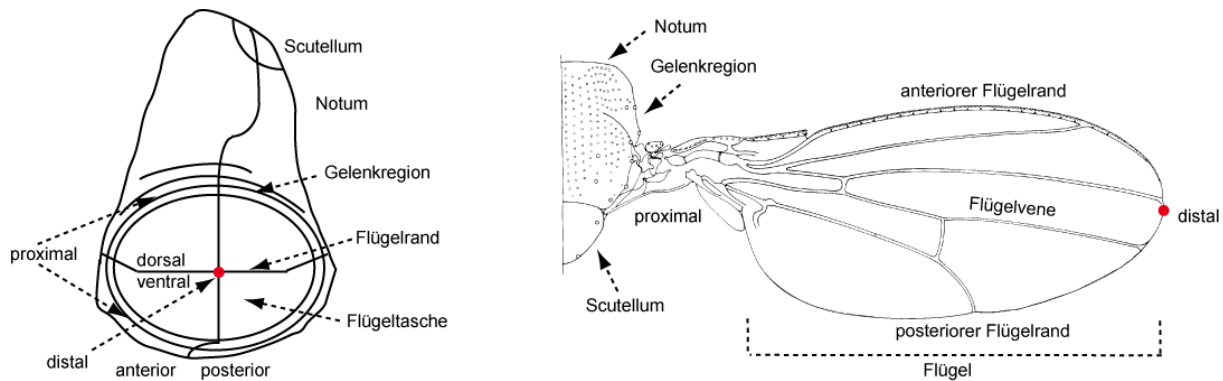


Abb.1.12: Schematische Darstellung einer Flügelimaginalscheibe und der daraus entstehenden, adulten Flügelstrukturen. Durch die Selektorgene werden die D/V- und A/P-Achsen festgelegt und die Proliferation der Zellen in der Flügelimaginalscheibe gesteuert. Die Abbildung wurde entnommen und modifiziert von Bryant, 1975: Flügelimaginalscheibe; Heitzler *et al.*, 1996: Flügel.

Das Selektorgen des dorsalen Kompartiments ist *apterous (ap)* (Diaz-Benjumea und Cohen 1993; Blair *et al.*, 1994). Apterous induziert die Expression von Serrate (Ser) auf der dorsalen Seite der Flügelimaginalscheibe (Couso *et al.*, 1995; Diaz-Benjumea *et al.*, 1995). Serrate ist einer der beiden Liganden des Notch-Rezeptors. Der zweite Ligand des Notch-Rezeptors ist Delta (Dl). Die Regulation der Aktivität des Notch-Rezeptors während der Entwicklung der Flügelimaginalscheibe ist am besten erforscht an der D/V-Grenze. Der Notch-Rezeptor ist ein Transmembranprotein und besteht aus einer extra- und einer intrazellulären Domäne. Nach der Bindung eines der beiden Liganden wird der Rezeptor durch zwei proteolytische Abspaltungen geschnitten. Dadurch wird die extrazelluläre (Nextra (NECD)) von der intrazellulären Domäne (Nintra, NICD) getrennt und diese gelangt anschließend in den Zellkern. Dort bindet NICD an das DNA-bindende Protein Su(H) (Suppressor of Hairless) und löst zusammen mit dem Ko-Aktivator Mastermind (Mam), die Transkription der Zielgene aus (Übersicht in Klein, 2001 und Bray, 2006). Die Flügelentwicklung beeinflussenden Zielgene von Notch sind unter anderem *vestigial (vg)* und *wingless (wg)* die für die Bildung des Flügels entscheidende Rolle spielen.

Durch die Expression der Selektorgene und ihrer Zielgene werden zwei wesentliche Aufgaben bewerkstelligt, zum einen die Definition der einzelnen Kompartimente und somit die korrekte Musterbildung der Flügelstrukturen, zum anderen die Steuerung der Zellproliferation während der Musterbildung.

1.7. Zielsetzung der Arbeit

Die Zielsetzung der Arbeit war die Kartierung und Charakterisierung einer unbekannten Mutation auf dem linken Arm des zweiten Chromosoms (2L) von *D. melanogaster*.

Bei Voruntersuchungen wurden bei mutanten Individuen vergrößerte Vesikel beobachtet, die Transmembranproteine wie den Notch-Rezeptor enthielten, was eine mögliche Beteiligung des betroffenen Gens bei intrazellulärem Transport von Proteinen und möglicherweise auch bei der Signalübertragung und somit auch bei der Musterbildung in Aussicht stellte.

Nachdem die Kartierung des Gens erfolgt war und dieses als das *Drosophila* Ortholog von *mon1* (*Dmon1*) festgestellt wurde sollten weitere Charakterisierungen der Genfunktion stattfinden. Hierzu sollten Konstrukte zur Expression von markierten und nicht-markierten Versionen von Mon1 und dessen vermuteten Interaktionspartnern hergestellt und zur Rettungs-, Überexpressions- und Interaktionsstudien genutzt werden. Ferner sollten auch Konstrukte zur Expression von Mon1-Orthologen in *Drosophila* hergestellt werden, um deren Konservierung zu testen.

Zur Charakterisierung der Mon1-Funktion in *Drosophila* sollten ferner zahlreiche sowohl fluoreszenz- wie elektronenmikroskopische Untersuchungen durchgeführt werden, um auch durch die Quantifizierung ihrer Charakteristika die Natur der entstandenen vergrößerten Vesikel zu bestimmen.

2. ERGEBNISSE

Der Phänotyp der *mut4*-Mutation ist zum ersten Mal im Zusammenhang mit Untersuchungen an dem Gen *big brain* beobachtet worden. In einem *big brain*-mutanten Fliegen-Stamm (in einigen *bib*¹-Allelen, die auch unter dem Synonym *bib*^{ID105} bekannt waren, Thomas Klein, persönliche Kommunikation) traten vergrößerte Vesikel auf. Durch Antikörperfärbung mit einem Antikörper, gerichtet gegen die extrazelluläre Domäne des Notch-Rezeptors (NECD), konnte gezeigt werden, dass die NECD in den vergrößerten Vesikeln akkumulierten. Dies wurde zunächst auf eine gestörte Funktion von *big brain* zurückgeführt, was zu Spekulationen bezüglich einer bis dahin unbekannten Funktion von *big brain* in dem Notch-Signalweg führte. Auffallend war jedoch, dass bei anderen *big brain*-Allelen dieser Phänotyp nicht auftrat (Thomas Klein, persönliche Kommunikation). Die Vermutung lag nahe, dass möglicherweise neben der Mutation des *big brain* Gens auch noch eine weitere Mutation auf demselben Chromosom vorlag und dass diese für den Vesikel-Phänotyp verantwortlich war. In daraufhin im Labor von Thomas Klein durchgeführten Rekombinations-Experimenten ist es gelungen diese Vermutung zu bestätigen indem die beiden Mutationen getrennt wurden. Hierbei wurden mehrere Stämme erzeugt, die über anderen *big brain* Allelen nicht komplementiert haben (über *big brain* letal waren), jedoch keinen Vesikel-Phänotypen mehr zeigten. Dies bestätigte, dass der Vesikel-Phänotyp nicht auf *big brain* sondern auf eine weitere Mutation zurückzuführen war. Dies wurde noch weiter dadurch bestätigt, dass gleichzeitig mehrere Stämme erzeugt wurden, die nur noch den Phänotyp der vergrößerten Vesikel in Flügelimaginalscheiben aufwiesen, jedoch in Transheterozygose über anderen *big brain* Allelen lebensfähig waren, d.h. *bib* komplementierten. Einer dieser Stämme, der nur noch den Vesikel-Phänotyp zeigte, wurde als *mut4* bezeichnet.

Klonale Analysen, die in Zusammenhang mit diesen ersten Untersuchungen durchgeführt worden, zeigten, dass die Mutation *mut4* sich auf dem linken Arm des zweiten Chromosoms von *Drosophila* (2L) befindet (Thomas Klein, persönliche Kommunikation; über eine FRT40A-Sequenz, welche auf 2L des *big brain*-Allels lokalisiert war). Diese Untersuchungen wurden zur genaueren Funktionsanalyse des betroffenen Gens im Rahmen der vorliegenden Arbeit wiederholt und ausgebaut, wie nachfolgend im Detail dargelegt wird.

Neben *mut4* war auch ein zweites Allel mit der Bezeichnung *CS084* für die hier beschriebenen Untersuchungen verfügbar. Dieses Allel wurde von Takeshi Sasamura aus der

Arbeitsgruppe Mark Fortini bei einem Screen des zweiten Chromosoms nach Mutanten, die den Transport vom Notch-Rezeptor beeinflussen anhand einer veränderten Notch-Lokalisation gefunden und wurde für Untersuchungen im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit bereitgestellt. Das Allel zeigt in Transheterozygoze über *mut4* einen Vesikelphänotyp ähnlich der *mut4*-Homozygose auf.

2.1. Der Phänotyp von *mut4*

Für die Untersuchung des Phänotyps der *mut4*-Mutation wurden mutante Zellklone in Flügelimaginalscheiben von *Drosophila* mit Hilfe des MARCM-Systems erzeugt. Die klonale Analyse bietet die Möglichkeit, mutante Zellen in wildtypischen Hintergrund zu beobachten. Die mutanten Zellen wurden durch die Anwesenheit des *nls*-GFP-Markers gekennzeichnet (Abb.2.1-B). Somit befanden sich die mutanten und die wildtypischen Zellen in einem Gewebe nebeneinander und konnten direkt miteinander verglichen werden.

Die klonale Analyse und der Vergleich von *mut4*-mutanten Zellklonen mit wildtypischen Zellen, mit Hilfe einer Antikörperfärbung gegen die extrazelluläre Domäne des Notch-Rezeptors (NECD) bestätigte eine Akkumulation der extrazellulären Domäne des Notch-Rezeptors in vergrößerten, Vesikeln in mutanten Zellen (Abb.2.1). Um festzustellen ob der gesamte Notch-Rezeptor in den Vesikeln vorhanden ist, wurde ebenfalls eine Antikörper-Färbung gegen die intrazelluläre Domäne des Notch-Rezeptors (NICD) durchgeführt. Diese zeigt, dass in den vergrößerten Vesikeln in den mutanten Zellen ebenfalls NICD akkumuliert (Abb.2.2). Das weist darauf hin, dass der vollständige Notch-Rezeptor sich in den vergrößerten Vesikeln befindet.

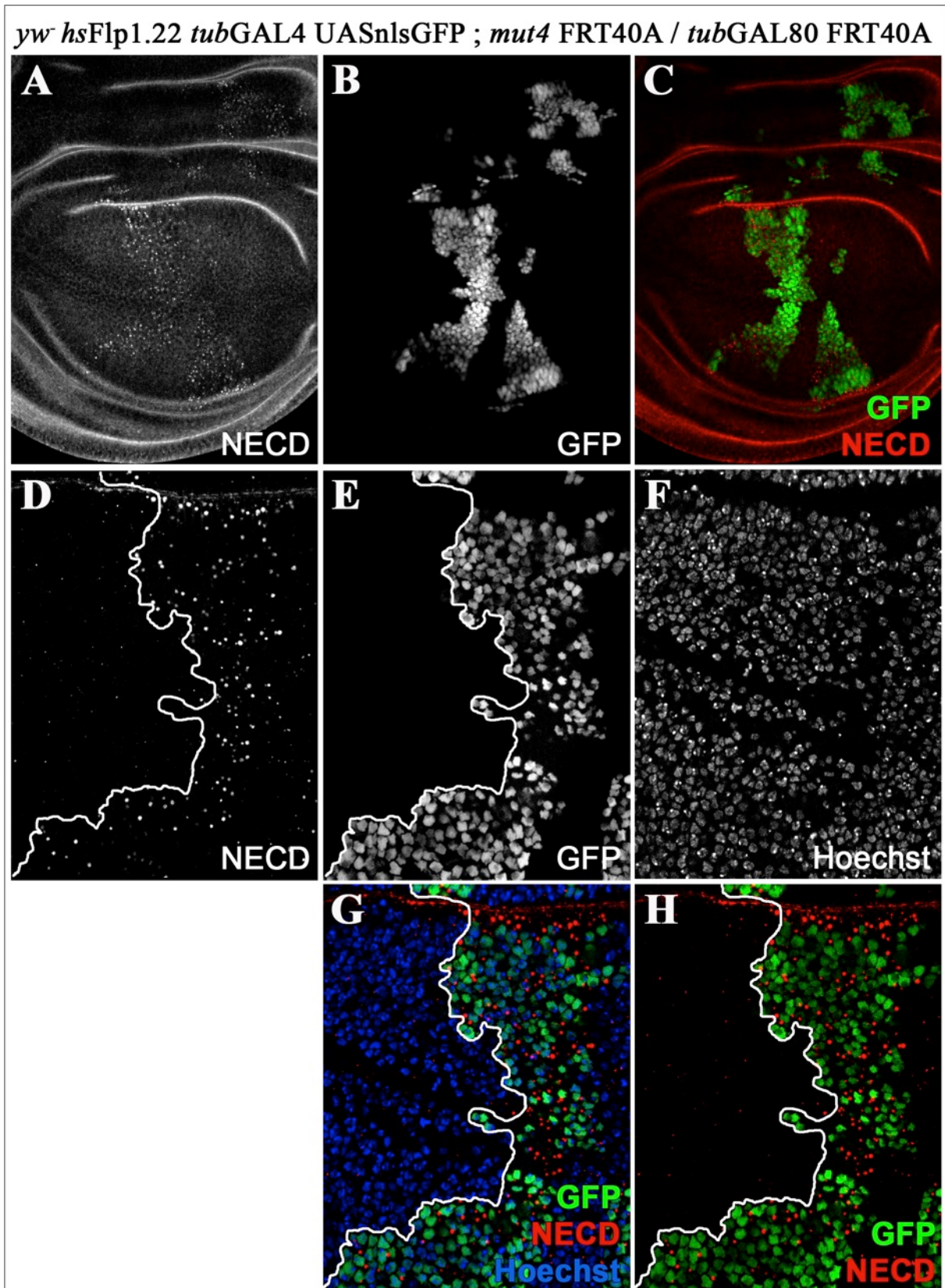


Abb.2.1: *mut4*-mutante Zellklone enthalten vergrößerte Vesikel. Mit Hilfe des MARCM-Systems wurden *mut4*-mutante Zellklone hergestellt, die an der Anwesenheit des GFP-Markers (B, C, E, G, H) zu erkennen sind. Die Antikörperfärbung gegen die extrazelluläre Domäne des Notch-Rezeptors (NECD in A, C, D, G, H) zeigt in mutanten Zellen die Akkumulation des Rezeptors in vergrößerten Vesikeln. D-H stellen Vergrößerungen der zentralen Region in Abbildungen A-C dar.

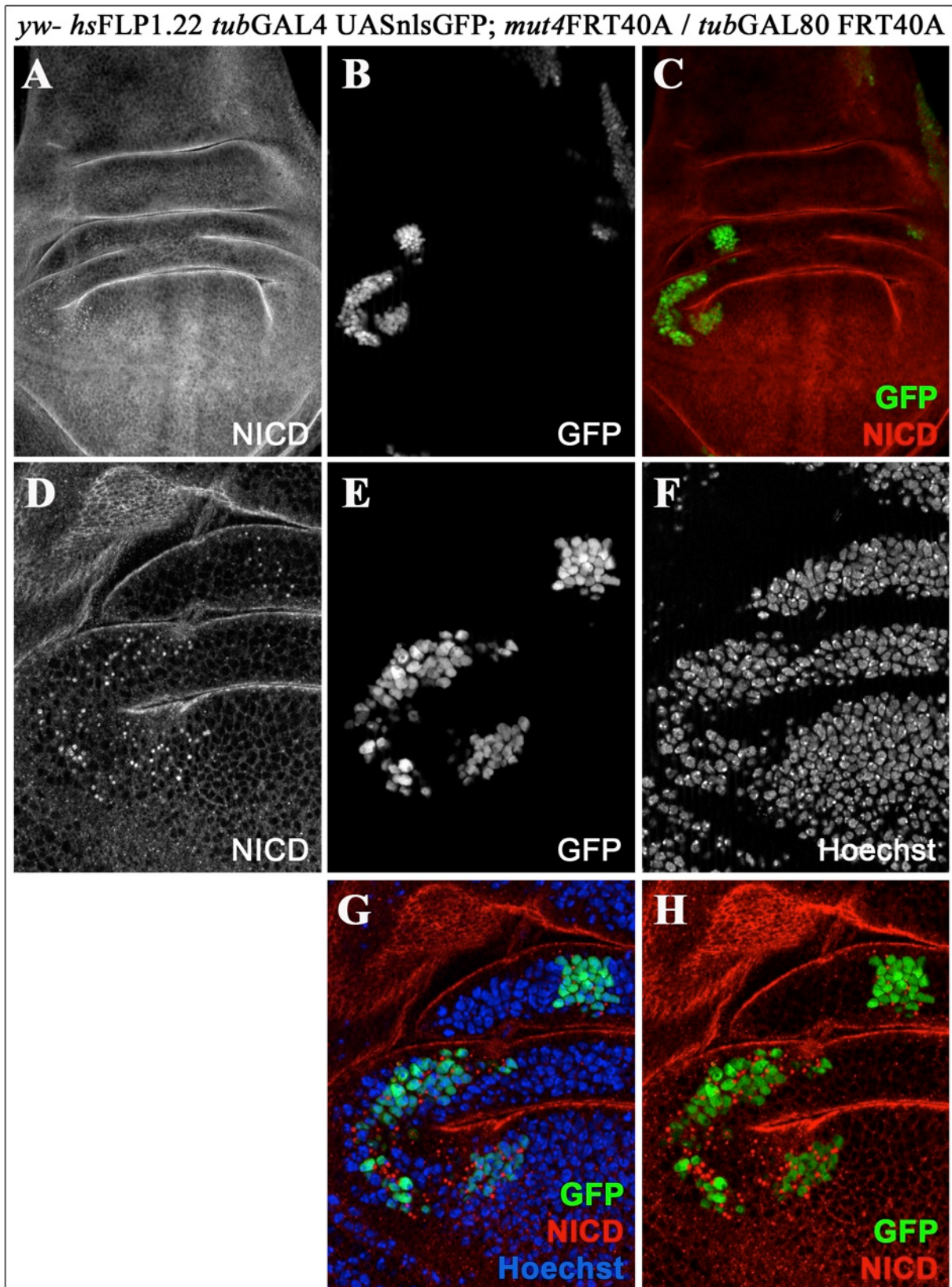


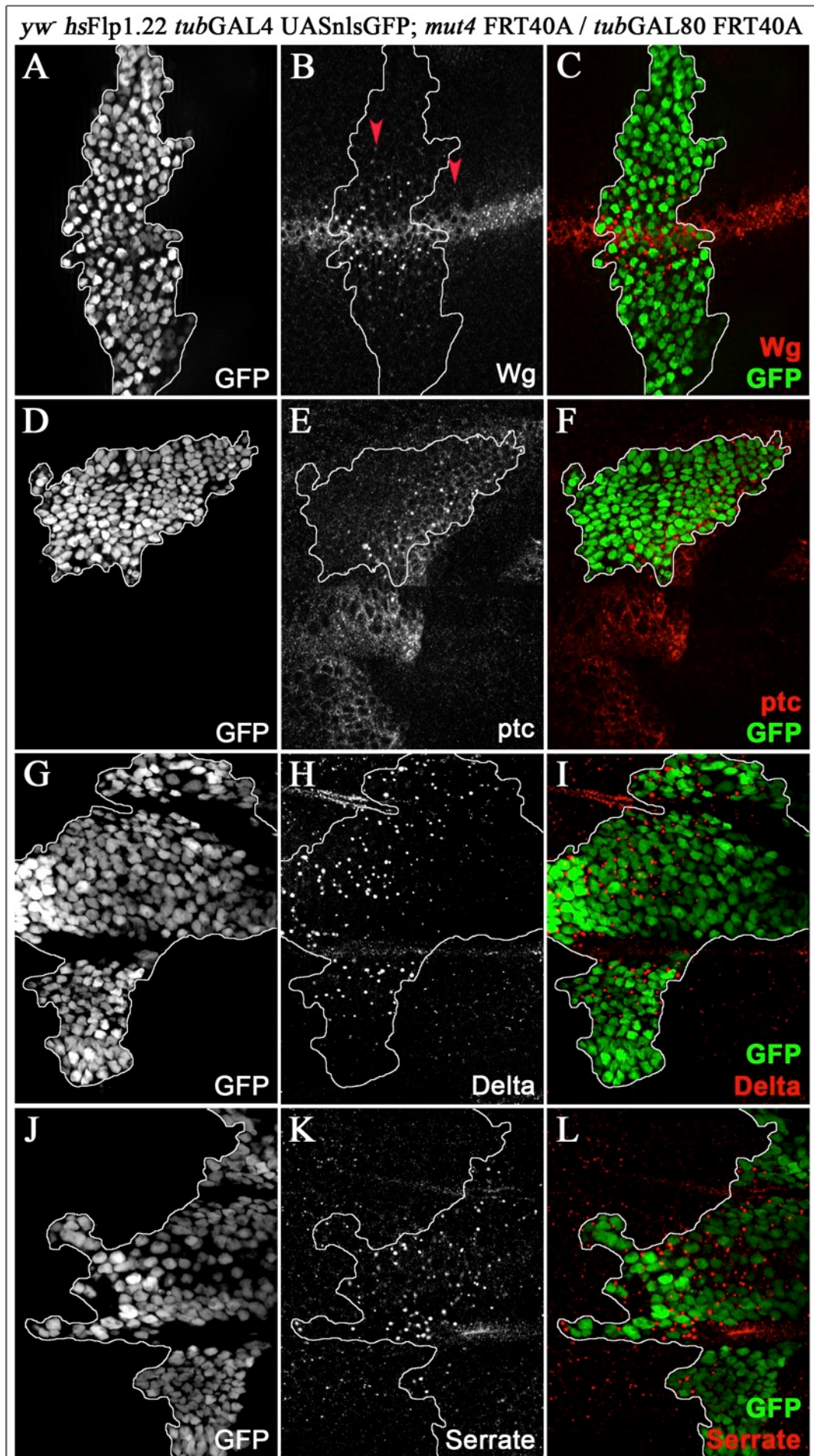
Abb.2.2: *mut4*-mutante Zellklone enthalten vergrößerte Vesikel, mit dem vollständigen Notch-Rezeptor. Die *mut4*-mutanten Zellklone, erzeugt durch das MARCM-System, sind durch die Anwesenheit des GFP-Markers (B, C, E, G, H) gekennzeichnet. Die Antikörperfärbung gegen die intrazelluläre Domäne des Notch-Rezeptors (NICD in A, C, D, G, H) zeigt in den mutanten Zellen die Akkumulation vergrößerter Vesikel, in denen NICD akkumuliert.

2.2. Die vergrößerten Vesikel in *mut4*-mutanten Zellen enthalten neben Notch auch andere Transmembran- und sekretierte Proteine

Als nächstes wurde die Frage verfolgt, ob das durch die *mut4*-Mutation betroffene Gen ein spezifischer Faktor für den Transport des Notch-Rezeptors ist, oder ob dieses Gen eine allgemeine Rolle beim Transport von verschiedenen Proteinen spielt. Um diese Frage zu beantworten, wurden *mut4*-mutante Zellklone in den Flügelimaginalscheiben mittels MARCM-Systems induziert. Die Flügelimaginalscheiben wurden mit Antikörpern gegen die Transmembranproteine Patched (Ptc), Serrate (Ser), Delta (Dl) und gegen das sekretierte Protein Wingless (Wg) gefärbt. Hierbei war zu beobachten, dass die *mut4*-mutanten Zellen (*mut4*-Zellen) vergrößerte Vesikel enthalten, in denen das sekretierte Protein Wingless (Abb.2.3-B, C) und die Transmembranproteine Patched (Abb.2.3-E, F), Delta (Abb.2.3-H, I) und Serrate (Abb.2.3-K, L) akkumulierten. In den daneben liegenden wildtypischen Zellen waren diese Transmembranproteine in Vesikeln von wildtypischer Größe enthalten.

Um festzustellen, um welche Art von Vesikeln es sich tatsächlich handelt, d.h. ob es Exosomen sind, welche Proteine an die Zellmembran bringen sollen, oder Endosomen, d.h. Vesikel die Proteine von der Plasmamembran oder von außerhalb der Zelle aufnehmen und in das Zellinnere führen, sei es im Rahmen der Signalübertragung, oder für deren Abbau (Fischer *et al.*, 2006; Le Borgne *et al.*, 2005; Sorkin und von Zastrow, 2009) wurde ein *uptake*-Experiment durchgeführt, welcher im nächsten Abschnitt beschrieben ist.

Abb.2.3: *mut4*-mutante Zellklone enthalten neben Notch auch sekretierte und weitere Transmembranproteine. Mit Hilfe des MARCM-Systems wurden *mut4*-mutante Zellklone hergestellt, die durch die Anwesenheit des GFP-Markers (A, D, G, J) zu erkennen sind. Die Antikörperfärbung gegen das sekretierte Protein Wg (B, C) und die Transmembranproteine Ptc (E, F), Delta (H, I) und Serrate (K, L) zeigen eine Akkumulation der Proteine in vergrößerten Vesikel. Wg-enthaltende Vesikel sind innerhalb des *mut4*-Klones weiter von der dorso-ventralen Grenze zu beobachten als im wildtypischen Bereich (rote Pfeile in B).



2.3. Die Notch-enthaltenden Vesikel sind Endosomen

Der Notch-Rezeptor wird nach der Synthese im Golgi-Apparat durch Exozytose an die Plasmamembran transportiert. Von da wird der Rezeptor falls er kein Signal empfängt, durch Endozytose aufgenommen und nach der Internalisierung von der Plasmamembran entweder recycelt und wieder an die Plasmamembran zurückgebracht oder im Lysosom abgebaut (Bray, 2006). Generell gilt ähnliches auch für die anderen hier beobachteten Proteine. Um festzustellen, ob es sich bei den in *mut4*-Zellen beobachteten vergrößerten Vesikeln um Endosomen handelt, wurde ein *Uptake*-Experiment durchgeführt. Hierbei wurde die Endozytose über die unspezifische Aufnahme von Stoffen, mit Dextran Texas Red als Substrat, und über spezifische Aufnahme von Antikörpern, die von außerhalb der Zelle an Transmembranproteine gebunden haben und dann zusammen mit diesen endozytotisch aufgenommen werden, verfolgt (Entchev *et al.*, 2000; Le Borgne and Schweisguth, 2003). Für die Durchführung dieses Experiments wurden die frei präparierten Flügelimaginalscheiben zuerst mit dem NECD-Antikörper bei 4°C inkubiert. In diesem Schritt findet die spezifische Bindung der NECD-Antikörper an den Notch-Rezeptor statt, wobei die Inkubation bei 4°C die Endozytose blockiert. Dadurch wurde eine unspezifische Aufnahme von ungebundenen Antikörpern aus dem Medium in die Zellen verhindert. Nach der Bindung und dem Auswaschen von ungebundenen NECD-Antikörpern werden die Flügelimaginalscheiben bei 25°C inkubiert, damit die Endozytose wieder eingeleitet wird. Dabei wird auch das zugesetzte Dextran markiert mit Texas Red unspezifisch aus der Umgebung aufgenommen (für eine detaillierte Beschreibung siehe Material und Methoden). Dextran Texas Red markiert somit die Zellen in denen Endozytose stattgefunden hat. In mutanten Zellklonen waren vergrößerte, Notch-enthaltene Vesikel zu beobachten, die gleichzeitig Dextran Texas Red enthielten (Abb.2.4). Das aufgenommene Dextran Texas Red kolokalisiert mit vergrößerten Notch-enthaltenden Vesikeln in *mut4*-Zellen, was auf eine intakte Endozytose weist. Die Akkumulation von Dextran-Texas Red und Notch in *mut4*-Zellen wiederum deutet darauf hin, dass die vergrößerten Vesikel im *mut4*-mutanten Gewebe durch einen Defekt im endosomalen Transportweg zustande kommen und es sich bei den vergrößerten Vesikeln in *mut4*-mutanten Zellklonen um Endosomen handelt.

Nach der Internalisierung wird das aufgenommene Material (Rezeptoren, etc.) in wildtypischem Gewebe normalerweise innerhalb von 10-40 min entweder recycelt oder zum Lysosom transportiert und dort abgebaut (für Review siehe Huotari und Helenius, 2011). In den in dieser Arbeit durchgeführten *uptake*-Versuchen wurden die Notch-Rezeptoren jedoch

selbst 90 min nach der Endozytose in vergrößerten Endosomen akkumuliert beobachtet (Abb. 2.4). Dies deutet auf eine Störung in dem endosomalen Transport durch die *mut4*-Mutation hin, die diesen stoppt oder zumindest verlangsamt. Dabei ist aber noch nicht klar, ob es sich bei dem Defekt, welcher die Akkumulation der vergrößerten Endosomen zur Folge hat um eine Störung im Recycling- oder degradativen Transportweg handelt.

Diese Frage wird im Abschnitt „Charakterisierung der *mut4*-vergrößerten Endosomen“ weiter unten anhand der Analyse entsprechender Marker untersucht.

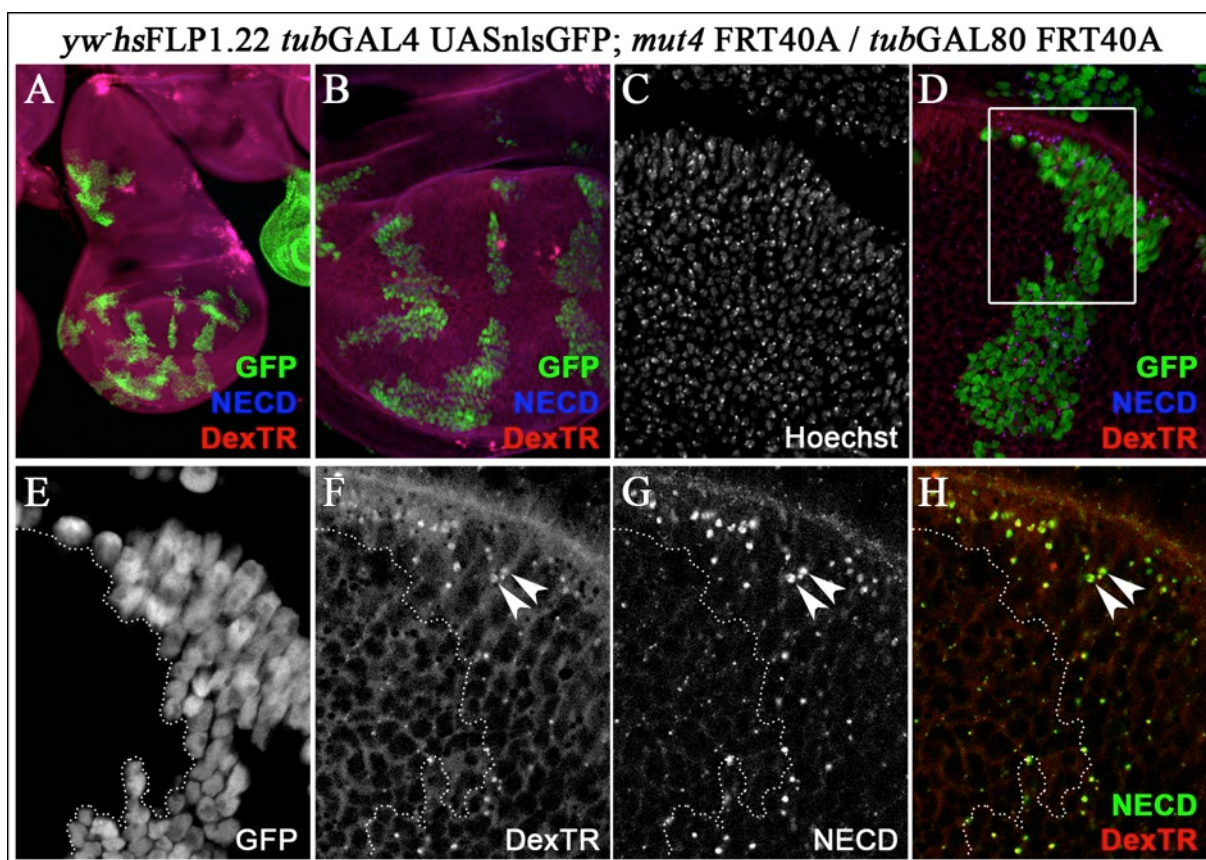


Abb.2.4: Die vergrößerten Vesikel in *mut4*-mutanten Zellen sind Endosomen. Die mutanten Zellklone wurden mit Hilfe des MARCM-Systems erzeugt. Zuerst wurde der Prozess der Endozytose durch die Inkubation bei 4°C blockiert. In der Zeit wurden die Flügelimaginalscheiben mit dem Antikörper gegen die extrazelluläre Domäne des Notch-Rezeptors inkubiert. Nach dem Waschen wurden die Flügelimaginalscheiben mit Dextran Texas Red (A, B, F und H) versetzt und bei 25°C für 90 min inkubiert, wodurch die Endozytose wieder angeregt und die an Notch gebundenen Antikörper und Dextran Texas Red endozytiert wurden (A, B, D und H). Die vergrößerten Notch-enthaltenden Vesikel sind mit Dextran Texas Red überlappend (D und H), was darauf hindeutet, dass die vergrößerten Vesikel Endosomen sind.

Eine weitere Bestätigung, dass es sich bei den vergrößerten Vesikeln in *mut4*-Zellen um die Endosomen handelt ist die auffällige Wingless-Verteilung in mutanten Klonen. Wingless wird normalerweise in einem schmalen Zellstreifen an der dorso-ventralen Grenze der

Flügelimaginalscheibe exprimiert (Abb.2.3-B, C), von diesen sekretiert und wandert anschließend über eine Distanz von bis zu einigen Zelldurchmessern weit in benachbarte Zellen ein (Gonzales et al., 1991; Strigini und Cohen, 1999). Dort wird es nach Endozytose durch den endosomalen Transportweg zum Abbau ins Lysosom transportiert (Strigini und Cohen, 2000; Marois *et al.*, 2006). In *mut4*-mutanten Flügelimaginalscheiben ist die Wg-Expression wie im Wildtyp auf den schmalen Streifen entlang der dorso-ventralen Grenze beschränkt. Allerdings können Wg-enthaltende Vesikel in mutanten Zellen mehrere Zelldurchmesser weiter von der Expressionsquelle entfernt entdeckt werden, als dies in den benachbarten wildtypischen Bereichen der Fall ist (siehe Pfeile in Abb.2.3-B und C). Diese Beobachtung legt nahe, dass Wg von den signalempfangenden, mutanten Zellen endozytiert, aber nicht entsprechend abgebaut werden kann. Das deutet darauf hin, dass es sich bei den vergrößerten Vesikeln in *mut4*-mutanten Zellen, um Endosomen und einen Defekt bei deren Abbau handelt. Ferner weist die Akkumulation der verschiedenen Transmembranproteine und auch des sekretierten Proteins Wingless in *mut4*-mutanten Zellen darauf hin, dass es sich bei dem mutierten Gen nicht etwa um einen spezifischen Faktor für den Transport des Notch-Rezeptors, sondern um einen allgemeinen Faktor im endosomalen Transportweg handelt.

2.4. Charakterisierung der *mut4*-vergrößerten Endosomen

Um die *mut4*-vergrößerten Endosomen genauer zu charakterisieren wurden verschiedene endosomale Marker, unter anderem verschiedene Rab-GTPasen, die wichtige Bestandteile des endosomalen Transportweges sind (Stenmark, 2009; Zerial und McBride; 2001) verwendet. Dazu wurden in den Flügelimaginalscheiben *mut4*-mutante Zellklone induziert, die in mutanten Zellen entstehenden Endosomen mit dem Antikörper gerichtet gegen die extrazelluläre Domäne des Notch-Rezeptors (NECD) markiert und untersucht mit welchen endosomalen Markern diese Endosomen assoziieren. Die Ergebnisse dieser Analysen sind im Folgenden dargestellt.

Um die Kolokalisation der vergrößerten, Notch-enthaltenden Endosomen in *mut4*-Zellen mit Rab5, einem Marker für frühe Endosomen, und Rab7, Marker für reife/späte Endosomen, zu untersuchen, wurden *mut4*-mutante Zellklone in den Flügelimaginalscheiben erzeugt. Gleichzeitig wurden die Fusionsproteine Rab5-CFP und Rab7-YFP unter der Kontrolle des *tubulin*-Promoters (Marois *et al.*, 2006) ubiquitär in der gesamten Flügelimaginalscheibe exprimiert. Hierbei wiesen viele der Endosomen eine Rab5-Assoziation auf (Abb.2.5-C, E, G). Die Assoziation mit beiden Markern wurde auch hier quantifiziert und ist beschrieben im

Abschnitt „Quantifizierung der Koloalisation der Rab-Proteine mit Notch enthaltenden Endosomen“.

Anders als Rab5 wurde keine Assoziation zwischen den vergrößerten, Notch-enthaltenden Endosomen in *mut4*-mutanten Zellklonen und Rab7 beobachtet (Abb.2.5-D, F, H). In daneben liegenden wildtypischen Zellen konnte eine solche Assoziation bei einigen Vesikeln beobachtet werden (Abb.2.5-H). Ferner konnte in *mut4*-mutanten Zellen eine gravierende Veränderung der Lokalisation von Rab7 beobachtet werden, welches in mutanten Bereichen nahezu keine Assoziation mit Endosomen zeigte, sondern größtenteils zytoplasmatisch verteilt war (Abb.2.5-H, L). Dies deutet darauf hin, dass die Rekrutierung von Rab7 an die Endosomen in *mut4*-mutanten Zellen nicht stattfinden könnte. Diese Beobachtung stellt neben der Vergrößerung der Endosomen eine zweite phänotypische Auffälligkeit *mut4*-mutanter Zellen dar.

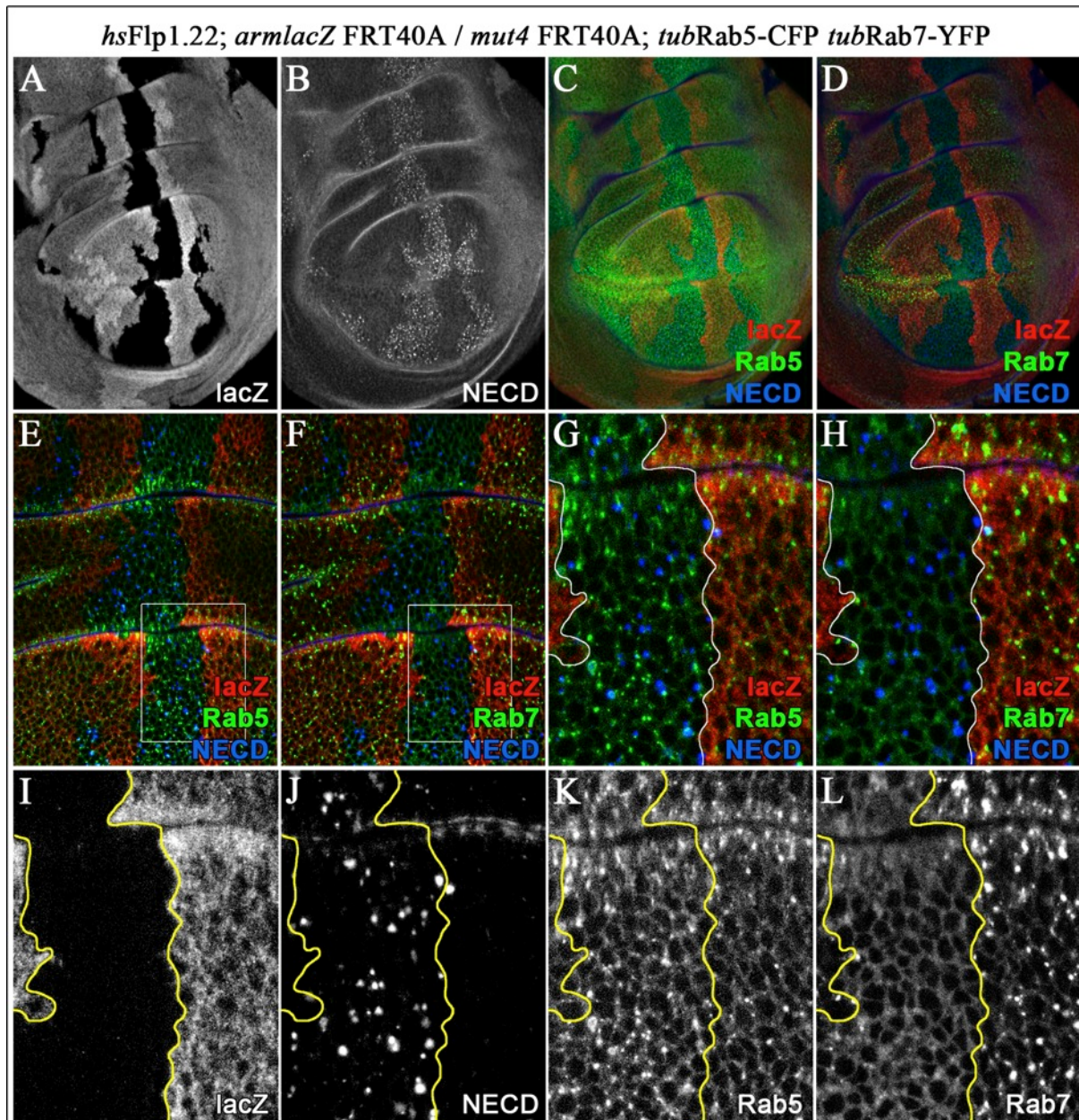


Abb.2.5: Die vergrößerten, Notch-enthaltenden Endosomen in *mut4*-mutanten Zellklonen sind kolokalisiert mit Rab5 aber nicht mit Rab7. Die Verteilung von Rab7 in den mutanten Zellen ist verändert, es ist zytoplasmatisch verteilt und nicht mehr an Endosomen gebunden (D, F, H und L). Die mutanten Zellklone, gekennzeichnet durch die Abwesenheit des *lacZ*-Reporters (eine Antikörperfärbung gegen das Produkt von *armlacZ*, β -Galaktosidase, in A, C-H und I) wurden in den Flügelimaginalscheiben erzeugt. Gleichzeitig wurden in der gesamten Flügelimaginalscheibe die Fusionsproteine Rab5-CFP (C, E, G und K) und Rab7-YFP (D, F, H und L) unter der Kontrolle des *tubulin*-Promotors ubiquitär exprimiert. Die Flügelimaginalscheiben wurden mit dem Antikörper gegen die extrazelluläre Domäne des Notch-Rezeptors gefärbt (B-H und J).

Um die Verteilung von Recyclingmarkern Rab4 und Rab11 und deren Assoziation mit den vergrößerten Endosomen in *mut4*-mutanten Zellen zu beobachten, wurden *mut4*-mutante Zellklone in Flügelimaginalscheiben induziert in denen markierte Rab4- und Rab11-Fusionsproteine unter einem endogenen Promotor exprimiert werden: *tub*-Rab4-mCherry und HG-Rab11-GFP.

Hierbei war zu beobachten, dass die meisten vergrößerten Endosomen in *mut4*-mutanten Zellen mit Rab4 kolokalisiert sind (Abb. 2.6). Eine Quantifizierung der Rab4 Kolokalisation wurde ebenfalls durchgeführt und ist detailliert beschrieben im Abschnitt „Quantifizierung der Kolokalisation der Rab-Proteine mit Notch enthaltenden Endosomen“.

Im Gegensatz dazu sind die vergrößerten Notch-enthaltenden Endosomen in *mut4*-mutanten Zellen nicht mit Rab11 assoziiert. Ferner erscheint die Verteilung von Rab11 in den mutanten Bereichen wildtypisch (Abb.2.7-F und H). Zusammengefasst scheint der Rab11-vermittelte Recycling-Transportweg nicht von der *mut4*-Mutation betroffen zu sein.

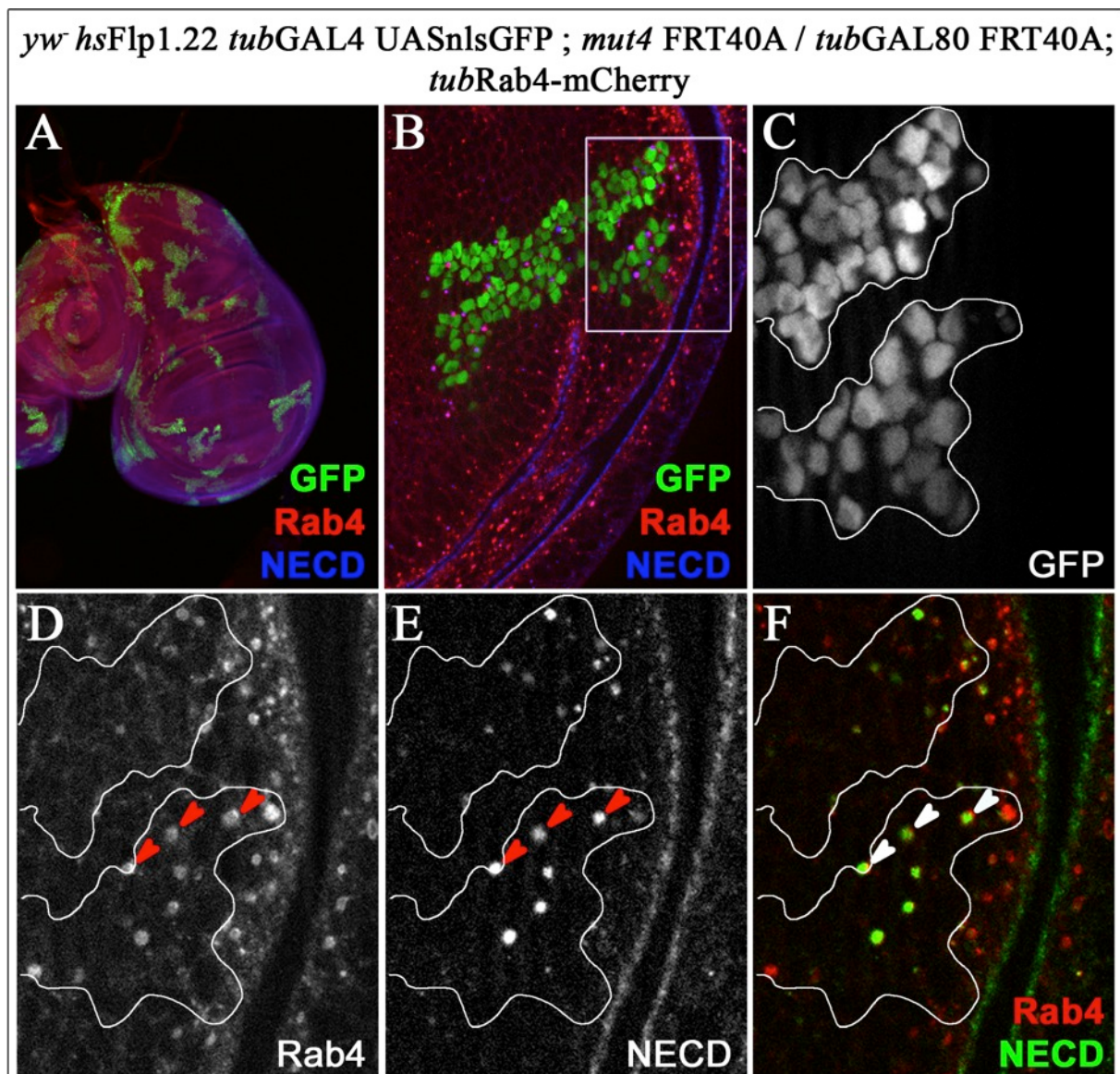


Abb.2.6: Die vergrößerten Notch-enthaltenden *mut4*-Endosomen sind mit dem Marker Rab4 kolokalisiert. Die *mut4*-mutanten Zellklone wurden mittels MARCM-Systems in den Flügelimaginalscheiben erzeugt, in denen Rab4-mCherry unter der Kontrolle des tubulin-Promotors exprimiert wird (A, B, D, und F). Die mutanten Zell-Klone sind durch die Anwesenheit von GFP (A,

B, C) gekennzeichnet. Die Flügelimaginalscheiben wurden mit dem Antikörper gegen die extrazelluläre Domäne des Notch-Rezeptors gefärbt (NECD in A, B, E und F). Die roten Pfeile in D und E weisen auf vesikelassoziierte Marker Rab4 und NECD. Die weißen Pfeile in F zeigen die Kolokalisation der beiden Marker.

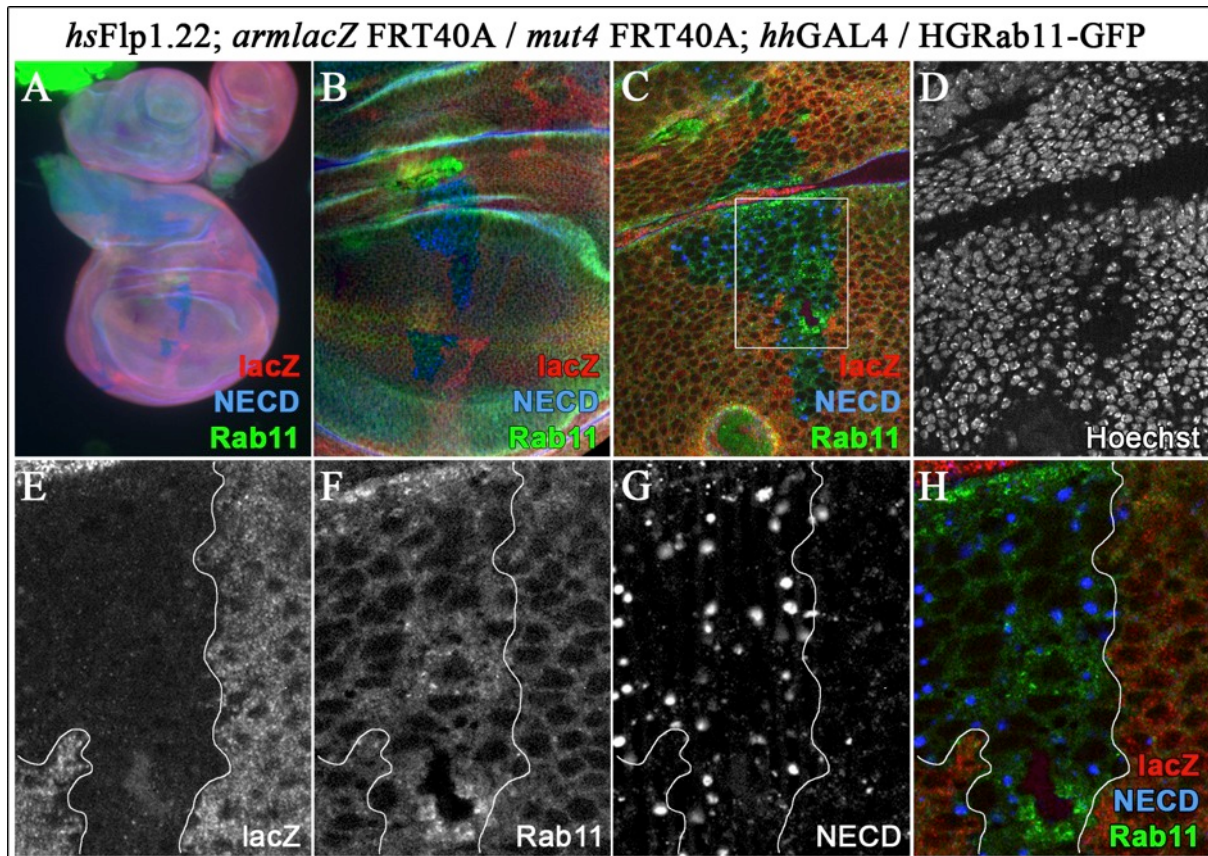


Abb.2.7: Die vergrößerten Endosomen in *mut4*-mutanten Zellen sind nicht mit dem Marker Rab11 assoziiert. Die Verteilung von Rab11 ist im mutanten Bereich verglichen mit dem wildtypischen Bereich unverändert. Die mutanten Zellklone sind durch die Abwesenheit des Reporters *armlacZ* (die Antikörperfärbung gegen das Produkt von *armlacZ*, β -Gal, in A, B, C, E und H) gekennzeichnet. Die Flügelimaginalscheiben mit ubiquitärer Rab11-Expression (A, B, C, F und H) wurden gegen NECD gefärbt (A, B, C, G und H), um die vergrößerten *mut4*-Vesikel zu markieren.

2.5. Quantifizierung der Kolokalisation der Rab-Proteine mit Notch enthaltenden Endosomen

Eine Quantifizierung der Kolokalisation der untersuchten Rab-Proteine (Rab4, Rab5 und Rab7) mit den Notch-enthaltenden Endosomen wurde in *mut4*-mutanten Klonen anhand fluorezenzmikroskopisch gewonnener Bilder durchgeführt. In *mut4*-mutanten Bereichen wurden die Notch-enthaltenden Endosomen, die mit den Rab-Markern assoziiert waren, gezählt und ihre Assoziation mit dem jeweiligen Marker wurde statistisch ausgewertet. Als Kontrolle wurden Notch-enthaltende Endosomen, die mit dem jeweils untersuchten Marker

kolokalisiert waren, in identisch großen, nahe liegenden wildtypischen Bereichen quantifiziert.

Zunächst wurde die Kolokalisation der Notch-enthaltenden Vesikel mit dem Marker für Recycling-Endosomen, Rab4 bestimmt. In wildtypischen Zellen waren die Endosomen, die den Notch-Rezeptor enthalten zu $77.24\% \pm 12.35$ (n=3 Klone) mit Rab4 assoziiert (Abb.2.8-J), während in *mut4*-mutanten Zellen die Assoziation mit Rab4 $91.54\% \pm 10.96$ betrug (n=3 Klone; Abb.2.8-J).

Bezüglich Rab5 wurden in wildtypischen Zellen $11.88\% \pm 4.99$ der Vesikel (Abb.2.8-J) mit Rab5 assoziiert beobachtet. Dabei konnte eine Rab7-Assoziation der Vesikel zu einem höheren Anteil von $71.12\% \pm 11.58$ (Abb.2.8-J) mit Notch-positiven Endosomen festgestellt werden.

Der Anteil von Rab5 assoziierten, vergrößerten, Notch-enthaltenden Endosomen in *mut4*-mutanten Zellklonen steigt auf $43.01\% \pm 16.27$ (n=3 Klone; Abb.2.8-J). Die Verteilung von Rab5 ist aber unverändert (Abb.2.5-K und Abb.2.8-F zeigt einen Vergleich zwischen wildtypischen und mutanten Bereichen; Abb.2.8-F einen der quantifizierten Klone). Da in den mutanten Zellen auch vergrößerte Endosomen ohne den Rab5-Marker existieren, besteht die Vermutung, dass Rab5 in *mut4*-mutanten Zellen zwar die Endosomen verlässt aber dass dieser Prozess verlangsamt verläuft.

Wie schon bei der phänotypischen Analyse oben angeführt, ist Rab7 vorwiegend zytoplasmatisch lokalisiert und dementsprechend war auch keine Assoziation von Rab7 mit vergrößerten Notch-enthaltenden Endosomen in *mut4*-mutanten Zellen festzustellen, (0%, n=3 Klone).

Die Ergebnisse der Quantifizierung entsprechen den ersten, oberflächlicheren Beobachtungen aus den immunhistologischen Färbungen. Rab4 und Rab5 sind mit den vergrößerten Endosomen kolokalisiert, und die Kolokalisation mit diesen beiden Markern nimmt in den mutanten Zellen zu. Rab7 dagegen ist nicht mit den vergrößerten Endosomen in den mutanten Zellen assoziiert. Die immunhistologische Analyse legt sogar nahe, dass Rab7 in *mut4*-mutanten Zellen nahezu keine vesikuläre Assoziation aufweist und weitestgehend nur noch zytoplasmatisch lokalisiert vorliegt.

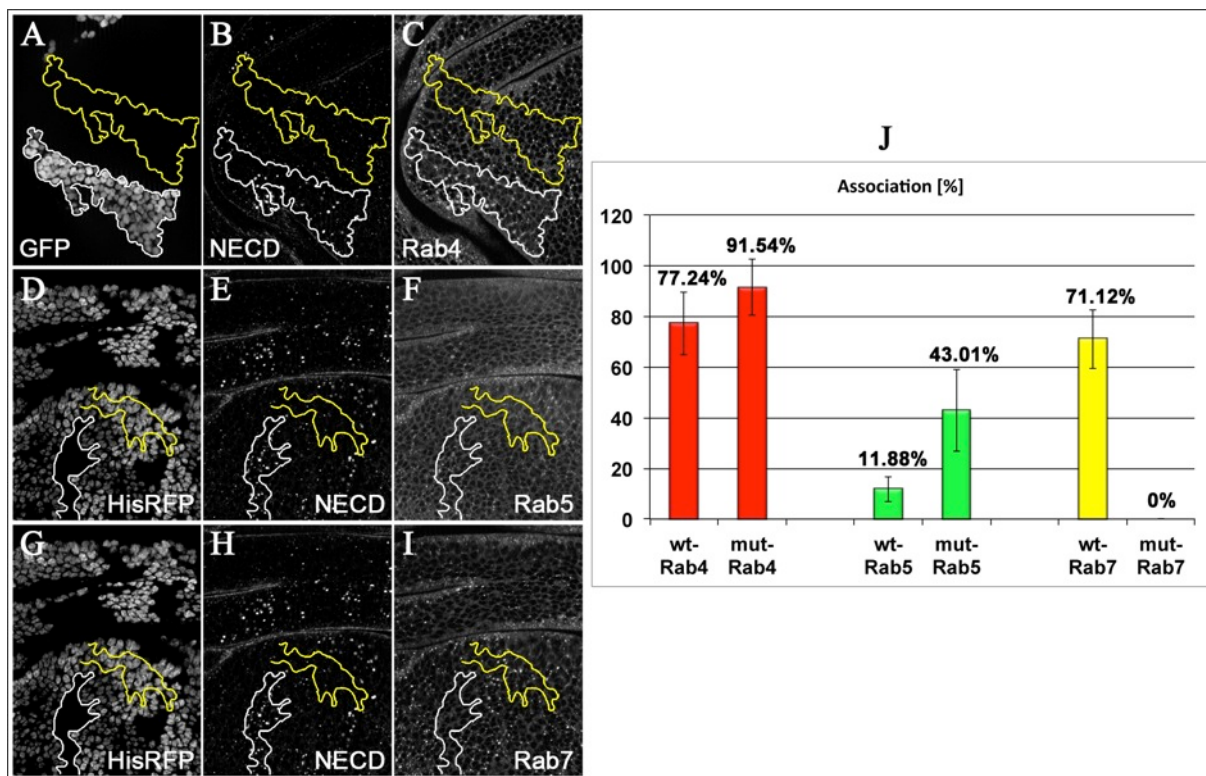


Abb.2.8: Quantifizierung der Lokalisation der Rab-Proteine mit Notch-enthaltenden Endosomen. Notch-enthaltende Endosomen, die mit den Markern Rab4 (A, B, C), Rab5 (D, E, F) und Rab7 (G, H, I) assoziiert sind, wurden in dem *mut4*-mutanten und in identisch großen, in der Nähe liegenden Bereichen gezählt. Die Kolokalisation mit den Markern wurde quantifiziert (J). Die Kolokalisation von Notch-enthaltenden Endosomen mit Rab4 ($p = 0.21$) und Rab5 ($p = 0.03$) steigt in den mutanten Zellen. Rab7 verliert seine Kolokalisation mit den Notch-enthaltenden Endosomen in den mutanten Zellen vollständig ($p = 0.0004$).

Für die weitere Charakterisierung der Natur der vergrößerten *mut4*-mutanten Endosomen, wurden weitere endosomale Marker verwendet. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen werden im folgenden Abschnitt gezeigt.

Vps34 ist ein Effektorprotein von Rab5, welches das Lipid-„Markenzeichen“ früher Endosomen (PI(3)P) produziert (Christoforidis *et al.*, 1999; Jovic *et al.*, 2010; Gillooly *et al.*, 2000). PI(3)P wird von FYVE-Domäne enthaltenden Proteinen als Bindesignal erkannt (Gillooly *et al.*, 2000; Kutateladze and Overduin, 2001). Die FYVE-Domäne bindet spezifisch und mit hoher Affinität an PI(3)P (Kutateladze und Overduin, 2001). Diese Tatsache wurde genutzt um ein Fusionskonstrukt aus zwei hintereinander liegenden Kopien der FYVE-Domäne aus dem Hrs-Protein fusioniert mit GFP und einer myc-Markierung, UAS-GFP-myc-2xFYVE, herzustellen, welches in Experimenten als eine Art Sensor für PI(3)P enthaltende Lipidmembranen dienen kann (Gillooly *et al.*, 2000; Wucherpfenning *et al.*, 2003). Mit Hilfe der UAS/GAL4-Technik wurde UAS-GFP-2xFYVE mit der Treiber-

Linie *hh*-GAL4 auf der posterioren Seite der Flügelimaginalscheiben exprimiert, die gleichzeitig *mut4*-mutante Zellklone trugen. Die Flügelimaginalscheiben wurden mit dem Antikörper gegen die extra- und intrazelluläre Domäne des Notch-Rezeptors gefärbt (Abb.2.9). FYVE-GFP war bei diesen Experimenten auf den Membranen der vergrößerten Endosomen, die sowohl die extra- als auch die intrazelluläre Domäne des Notch-Rezeptors enthalten zu beobachten (Abb.2.9). Dies deutet darauf hin, dass die Rab5-vermittelte Rekrutierung von Vps34 zu den Endosomen auch in den *mut4*-mutanten Zellen stattfindet, was wiederum für eine unbeeinträchtigte Funktion von Rab5 in diesen Zellen spricht. Damit Rab5-vermittelte Rekrutierung von Vps34 stattfindet und Vps34 an die Membran der Endosomen bindet, muss Rab5 aktiv sein (Christoforidis *et al*, 1999; Jovic *et al*, 2010). Das führt zur einer zweiten Schlussfolgerung, dass es sich bei Rab5 welches assoziiert mit den vergrößerten Endosomen in *mut4*-Zellen vorliegt um aktives, GTP-gebundenes Rab5 handelt.

Neben der Bindung des synthetischen Markers FYVE-GFP wurde ferner untersucht ob Hrs als ein natürliches Protein mit den vergrößerten Vesikeln assoziiert. Hrs gehört zum ESCRT-0 Komplex der ESCRT-Maschinerie und ist als Marker dem früheren endosomalen Kompartiment zuzurechnen.

Die Flügelimaginalscheiben, die *mut4*-mutante Zellklone trugen, wurden mit Antikörpern gegen NECD und Hrs gefärbt. Die vergrößerten Endosomen in *mut4*-mutanten Zellen konnten hierbei als mit Hrs kolokalisiert beobachtet werden (Abb.2.10).

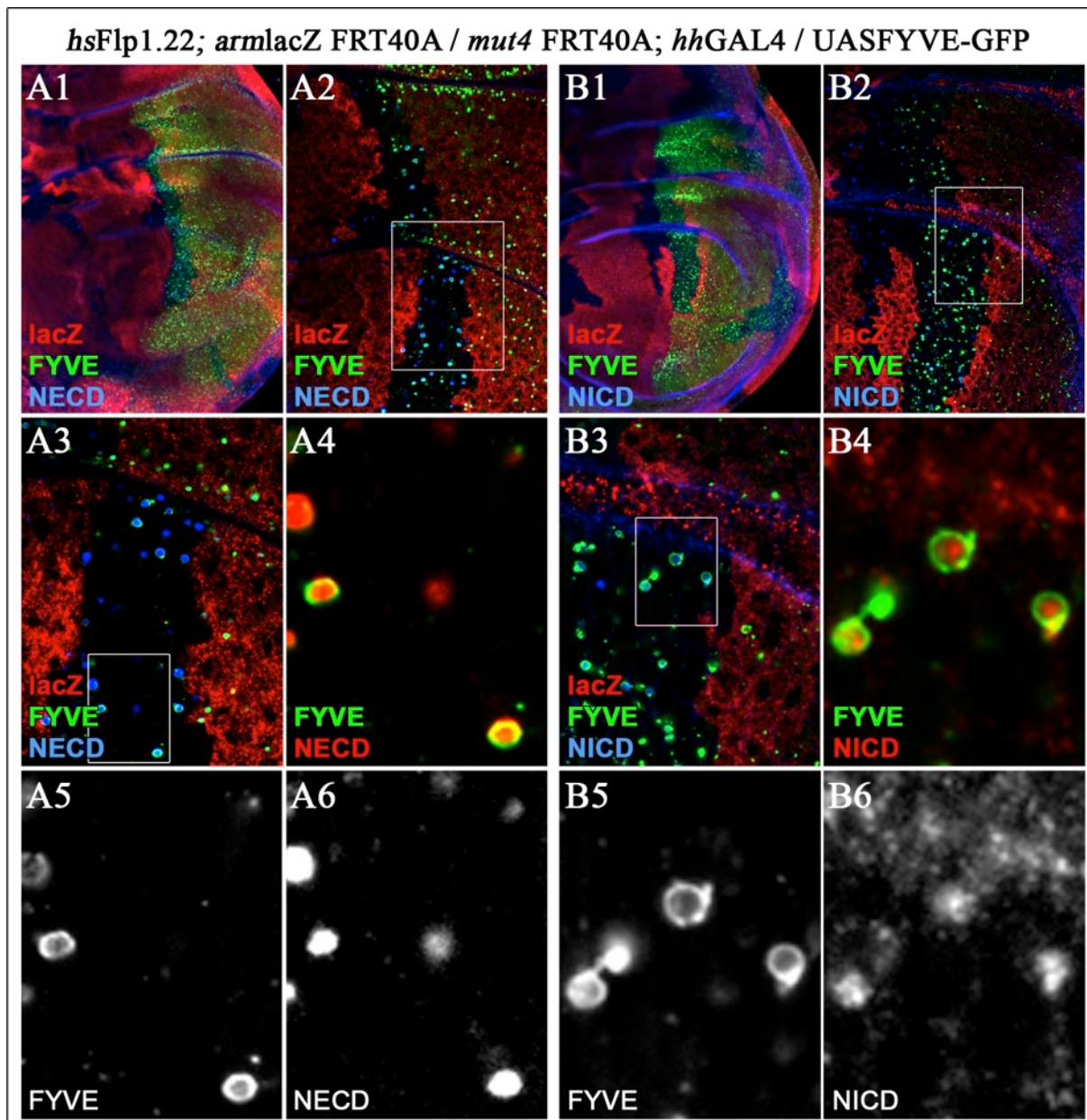


Abb.2.9: Die Membranen der vergrößerten Endosomen in *mut4*-mutanten Zellen enthalten PI(3)P. Die mutanten Zellklone, gekennzeichnet durch die Abwesenheit des Reporters *armlacZ* (eine Antikörperfärbung gegen das Produkt von β -Galaktosidase, in A1, A2, A3. B1, B2 und B3) wurden in den Flügelimaginalscheiben erzeugt, in denen das Marker-Konstrukt FYVE-GFP auf der posterioren Seite unter *hhGAL4*-Kontrolle exprimiert wird (A1, A2, B1, B2). Die Flügelimaginalscheiben wurden mit dem Antikörper gegen die extra- (NECD in A1-A4 und A6) und intrazelluläre (NICD in B1-B4 und B6) Domäne des Notch-Rezeptors gefärbt. FYVE-GFP befindet sich auf der Membran der vergrößerten Endosomen in *mut4*-mutanten Zellen, die sowohl die extra- als auch intrazelluläre Domäne des Notch-Rezeptors und somit den gesamten Rezeptor enthalten (A4, B4).

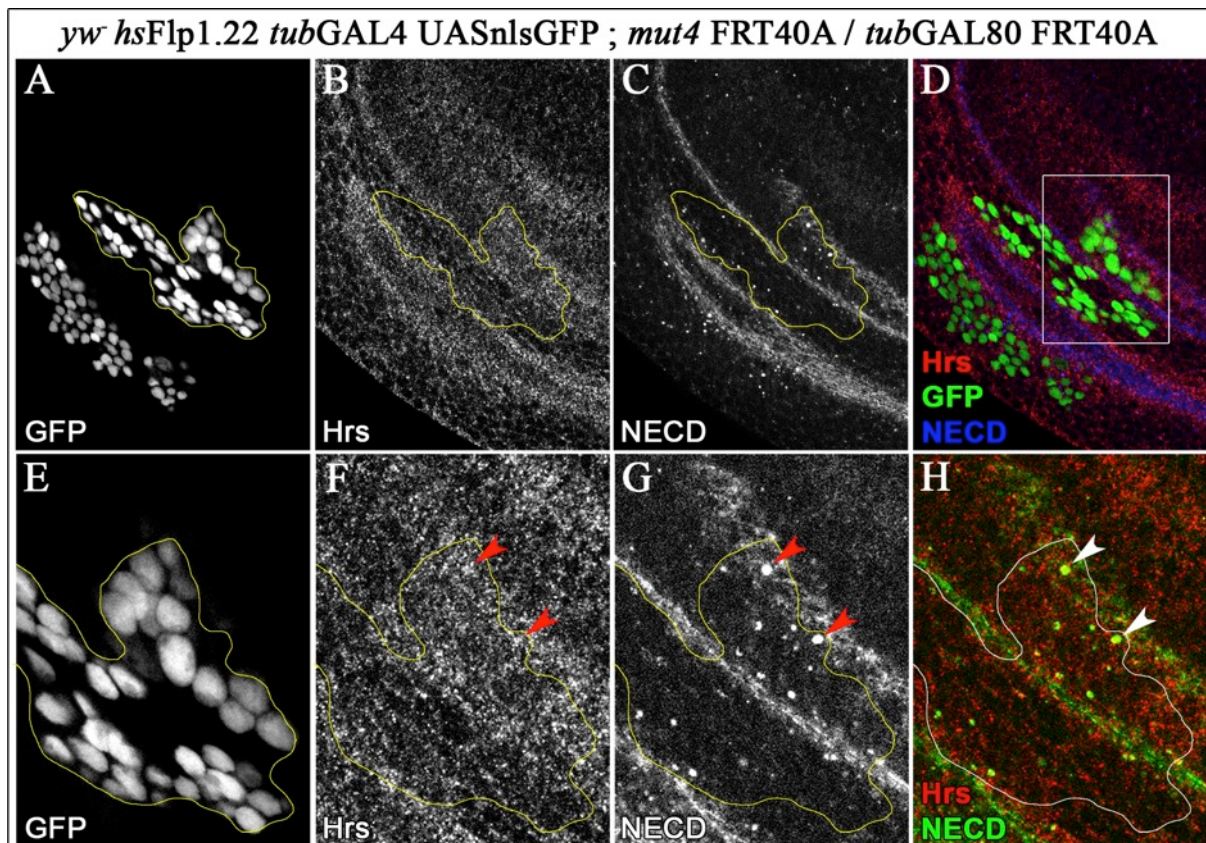


Abb.2.10: Die vergrößerten Endosomen in *mut4*-mutanten Zellen sind mit Hrs kolokalisiert. Mit Hilfe des MARCM-Systems wurden *mut4*-mutante Zellklone hergestellt, die durch die Anwesenheit des GFP-Markers (A, D, E) zu erkennen und in den Abbildungen durch den gelben Umriss markiert sind. Die Antikörperfärbung gegen die extrazelluläre Domäne des Notch-Rezeptors (NECD in C, D, G und H) und Hrs (in B, D, F und H) zeigt, dass die vergrößerten Endosomen in *mut4*-mutanten Zellen mit Hrs kolokalisiert sind (gelbe Überlagerung in H).

Die Bindung von FYVE-GFP (Abb.2.9), Hrs (Abb.2.10) und Rab5 (Abb.2.5) an die Membran der vergrößerten *mut4*-Endosomen, ist ein erster Hinweis darauf, dass die Lokalisierung des Lipides PI(3)-P wahrscheinlich ungestört ist, wodurch FYVE-Domänen besitzende Proteine wie der Rab5-Effektor und Hrs an diese rekrutiert werden können.

Dor (*deep orange*), ein Homolog von Vps18 aus der Hefe, ist eine Komponente des Vps-C-Komplexes, der in den aus der Hefe bekannten CORVET- und HOPS-Komplexen vorkommt (Nickerson *et al.*, 2009). Dor lokalisiert an späten Endosomen (Sevrioukov *et al.*, 1999) und wird deswegen auch als Marker für diese verwendet. Der Ausfall von Dor führt zu einer gestörten lysosomalen Degradation, so dass es funktionell wahrscheinlich für die Lieferung der Proteine zum Lysosom benötigt wird (Sriram *et al.*, 2003). Der HOPS-Komplex dient als eine Art Bindungsfaktor zwischen späten Endosomen und Lysosomen (Bröcker *et al.*, 2012; Balderhaar und Ungermann, 2013).

Das Transmembranprotein Spinster wird sowohl in Nerven als auch in Muskelzellen exprimiert und wird für das normale Wachstum der Prä- und Postsynapse benötigt. Spinster ist auf späten/lysosomalen Kompartimenten mit niedrigem pH-Wert lokalisiert (Sweeney und Davies, 2002). Spinster wird als Marker für die späten Endosomen verwendet.

Die Flügelimaginalscheiben, die *mut4*-mutante Zellklone enthalten, wurden mit Antikörpern gegen Dor (Abb.2.11) und Spinster (Abb.2.12) gefärbt. Die vergrößerten *mut4*-Endosomen sind mit diesen beiden spätendosomalen Markern assoziiert.

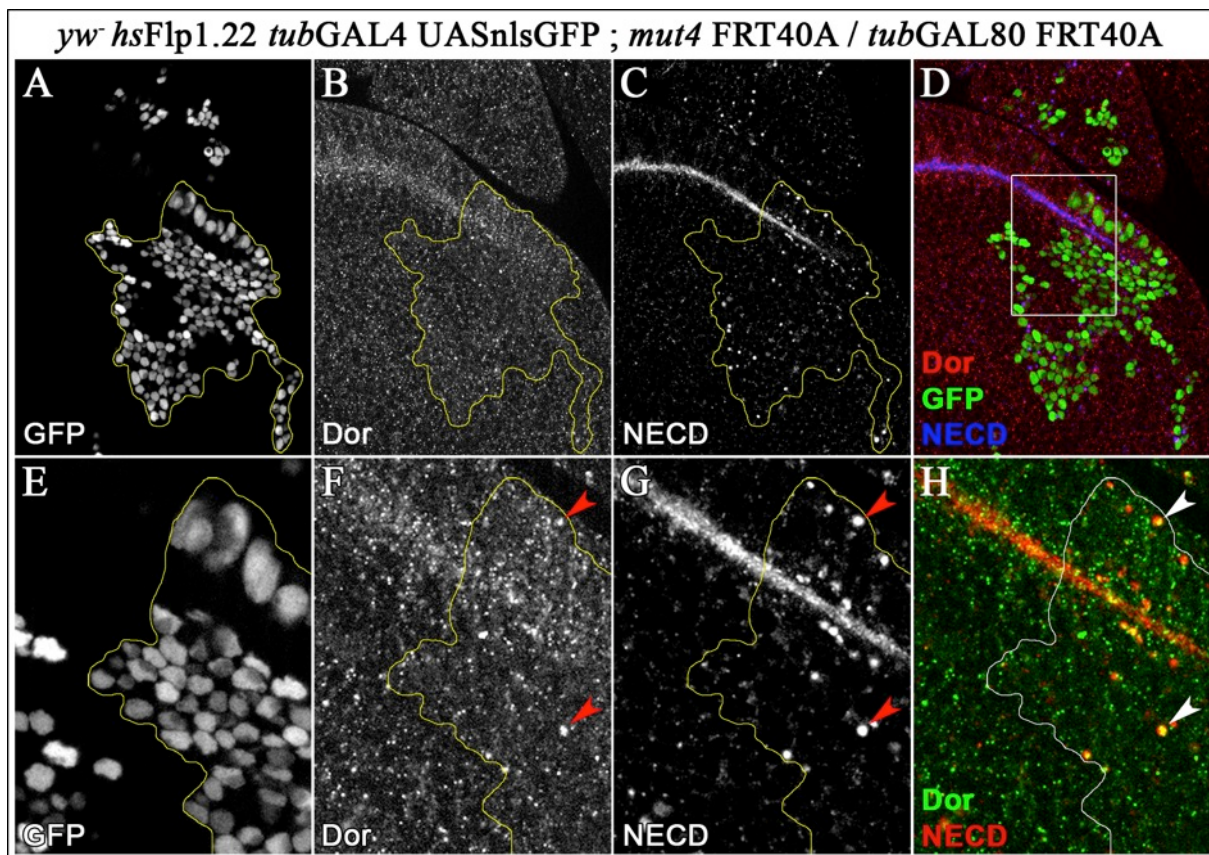


Abb.2.11: Die vergrößerten, Notch-enhaltenden Endosomen in *mut4*-mutanten Zellen sind mit Dor kolokalisiert (D, H). *mut4*-mutante Zellklone, erzeugt durch das MARCM-System, sind durch die Anwesenheit des GFP-Markers (A, D, E) bzw. durch den gelben Umriss gekennzeichnet. Die Imaginalscheiben wurden zur Kennzeichnung der Vesikel mit Antikörpern gegen die extrazelluläre Domäne des Notch-Rezeptors (C, D, G, H) und Dor (B, D, F, H) gefärbt.

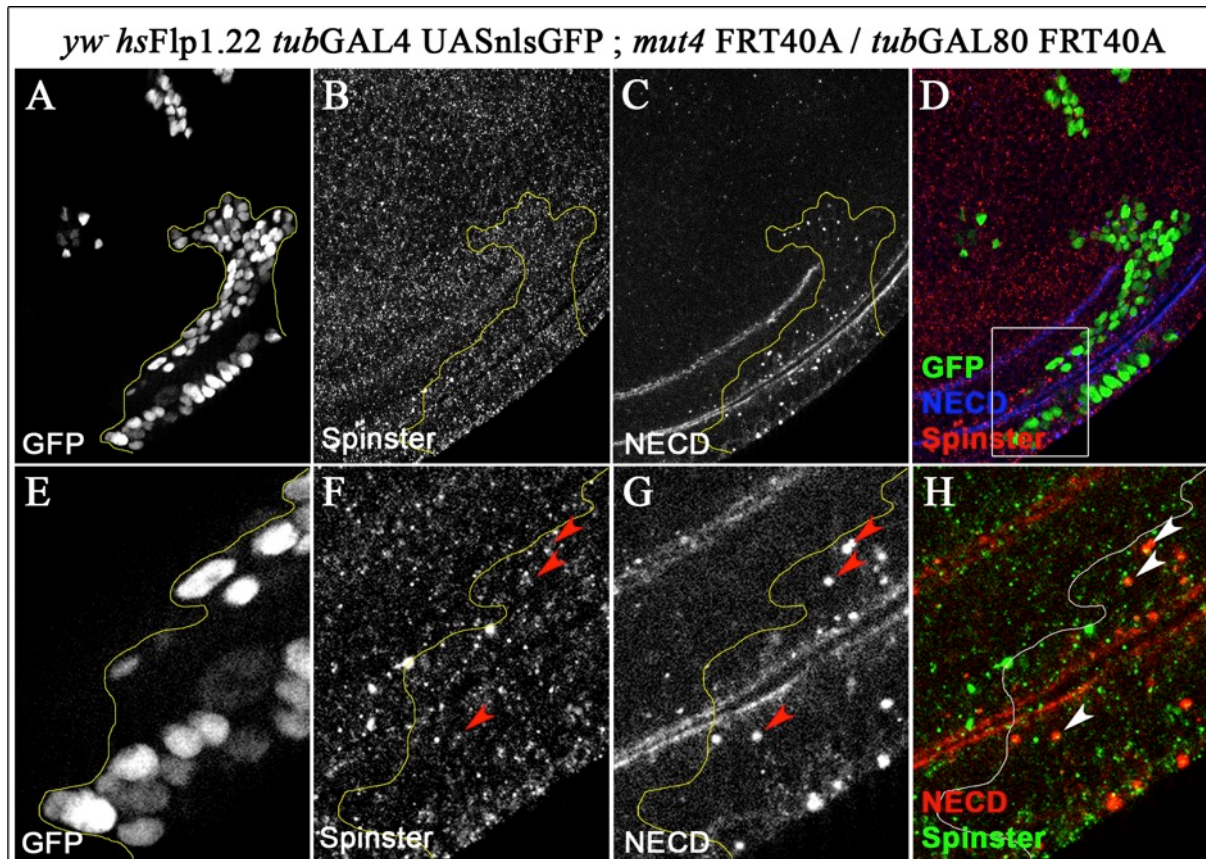


Abb.2.12: Die vergrößerten, Notch-enhaltenden Endosomen in *mut4*-mutanten Zellen sind mit Spinster kolokalisiert (D, H). *mut4*-mutante Zellklone, erzeugt durch das MARCM-System, sind durch die Anwesenheit des GFP-Markers (A, D, E) bzw. durch den gelben Umriss gekennzeichnet. Die Imaginalscheiben wurden mit Antikörpern gegen die extrazelluläre Domäne des Notch-Rezeptors (C, D, G, H) und Spinster (B, D, F, H) gefärbt.

Die Membran der reifen/späten Endosomen enthält das lysosomale Membranprotein LAMP-1 (*lysosome associated membrane proteins-1*; Huotari und Helenius, 2011), welches als Marker für späte Endosomen und Lysosomen verwendet werden kann. In Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein synthetisches Reporterkonstrukt, Lamp1-GFP, verwendet welches aus eGFP gefolgt von der Transmembrandomäne und dem zytoplasmatischen Abschnitt aus dem humanen Lamp1 besteht. Der zytoplasmatische Abschnitt des Lamp1 ist für die Lokalisation des Fusionsproteins an späte Endosomen/Lysosomen ausreichend (Rohrer *et al.*, 1996, Pulipparacharuvil *et al.*, 2005).

Zwei verschiedene Lamp-1-Konstrukte standen zur Verfügung. Lamp1-GFP wurde auf zwei Weisen in den Flügelimaginalscheiben exprimiert. Zum einen in niedriger Expressionsstärke indem das Fusionsprotein Lamp1-GFP ubiquitär unter der Kontrolle des *tubulin*-Promotors (*tub-lamp1*-GFP) exprimiert wurde (Abb.2.13). Zum anderen mit hoher Expressionsstärke wobei Lamp1-GFP unter der Kontrolle des UAS-Promotors (*UAS-lamp1*-GFP)

überexprimiert wurde (Abb.2.14). Die zwei unterschiedlichen Expressionsarten wurden gewählt, da aus früheren Versuchen der Arbeitsgruppe bekannt war und ebenfalls in der vorliegenden Arbeit beobachtet werden konnte, dass die Expression vieler Proteine die am endosomalen Transportweg beteiligt sind, wie z. B. Rab5 und Rab7, mittels des UAS/GAL4-Systems aufgrund der erzielten hohen Expressionsstärke zu nicht-physiologischen Überexpressionsphänotypen führen kann. Hierbei wurde beobachtet, dass, wie auch schon in einigen Veröffentlichungen berichtet, die Überexpression von Rab5 und Rab7 die Akkumulation vergrößerten Vesikel in den Expressionszellen zur Folge hat (Bucci *et al.*, 1992; Stenmark *et al.*, 1994; Wucherpfennig *et al.*, 2003). Durch die schwächere Expression mittels des *tubulin*-Promotors sollte kontrolliert werden, ob die Lokalisation von Lamp1-GFP und deren mögliche Änderung in *mut4*-mutanten Zellen auf den Genausfall zurückzuführen ist, oder einen unspezifischen Überexpressionseffekt darstellt. Aus demselben Grund sind einige der später hier beschriebenen Experimente, in denen markierte Rab-Proteine exprimiert wurden ebenfalls bevorzugt mittels des *tubulin*-Promotors durchgeführt worden.

Die vergrößerten Endosomen in den mutanten Zellen waren bei beiden benutzten Expressionswegen mit Lamp-1 assoziiert (Abb.2.13 und Abb.2.14). Die Bindung von Lamp-1 mit diesen Endosomen ist ein weiterer Hinweis darauf, dass diese reifen/späten Endosomen zuzurechnen sind.

In *Drosophila*-Zellen, wird das Fusionsprotein Lamp1-GFP vom Golgi-Apparat in späte Endosomen und Lysosomen transportiert wo GFP durch Hydrolase-Aktivität und sinkenden pH abgebaut wird (Demaurex, 2002; Rohrer *et al.*, 1996; Pulipparacharuvil *et al.*, 2005). Dadurch wird die zu beobachtende Leuchtintensität des Lamp1-GFP-Fusionsproteins in den Zellen gewissermaßen im Gleichgewicht gehalten. Durch die beiden Expressionswege mittels *tub-lamp1*-GFP bzw. UAS-*lamp1*-GFP werden, wie schon oben angeführt, unterschiedliche Mengen des Fusionsproteins in den Zellen bereitgestellt, wobei durch das UAS-System weit höhere Mengen produziert werden. Es ist aber möglich, dass die weitaus stärkere Leuchtintensität, die bei dem UAS-System zu beobachten war, dabei nicht nur auf die höhere Expressionsrate zurückzuführen ist, sondern dass die Akkumulation auch ein weiterer Hinweis auf einen Abbaudefekt in *mut4*-mutanten Zellen ist. Die höhere Expressionsrate „überfordert“ das defekte Abbausystem dann zusätzlich, was dazu führt, dass der Leuchtintensitätsunterschied zwischen dem mutanten und wildtypischen Gewebe bei dem UAS-System noch stärker ausfällt als bei der Benutzung des *tub*-Lamp1-GFP-Konstruktes.

Arl8, ein Protein aus der Familie der Arf-ähnlichen GTPasen, welches in *Drosophila* von der Transkriptionseinheit CG7891 kodiert wird, ist auf Lysosomen lokalisiert und wurde daher auch in Rahmen dieser Arbeit als ein lysosomaler Marker verwendet. Arl8 beeinflusst die Beweglichkeit der Lysosomen, wie in COS-Zellen mittels der Überexpression von Arl8 aus *Drosophila* gezeigt wurde. (Hofmann und Munro, 2006). Die Antikörperfärbung von Flügelimaginalscheiben mit Arl8 zeigt keine Kolo-kalisation zwischen den *mut4*-mutanten Endosomen und dem lysosomalen Marker Arl8 (Abb.2.15). Auch erscheint die Verteilung von Arl8 in mutanten Zellen verglichen zu wildtypischen Zellen unverändert (Abb.2.15).

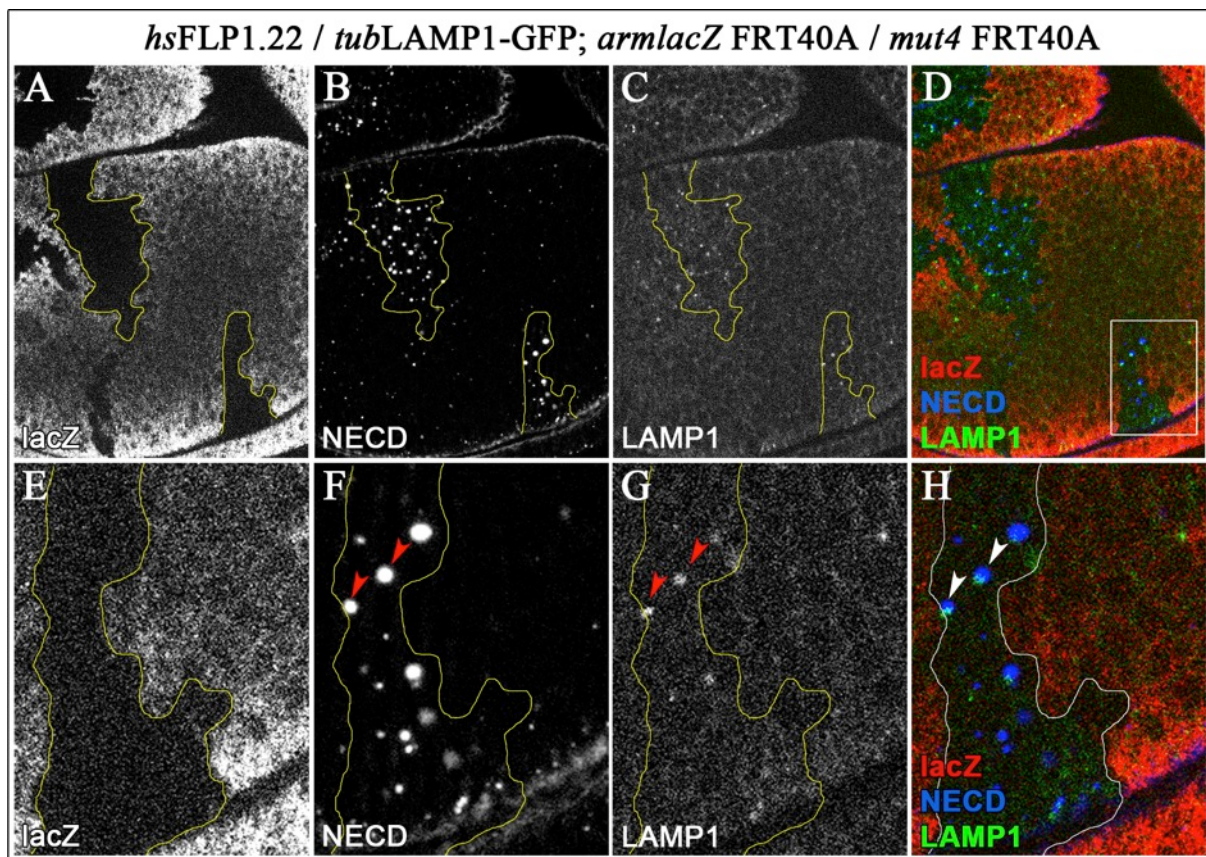


Abb.2.13: Die *mut4*-Endosomen sind mit LAMP-1 assoziiert. Die mutanten Zellklone, gekennzeichnet durch die Abwesenheit des lacZ-Reporters (eine Antikörperfärbung gegen das Produkt von *armlacZ*, β -Galaktosidase in A, D, E und H), wurden in den Flügelimaginalscheiben erzeugt, in denen das Fusionsprotein LAMP1-GFP unter der Kontrolle des *tubulin*-Promotors ubiquitär in der gesamten Flügelimaginalscheibe exprimiert wird (C, D, G, H). Die Imaginalscheiben wurden zur Kennzeichnung der *mut4*-Vesikel mit dem Antikörper gegen die extrazelluläre Domäne des Notch-Rezeptors gefärbt (B, D, F, H).

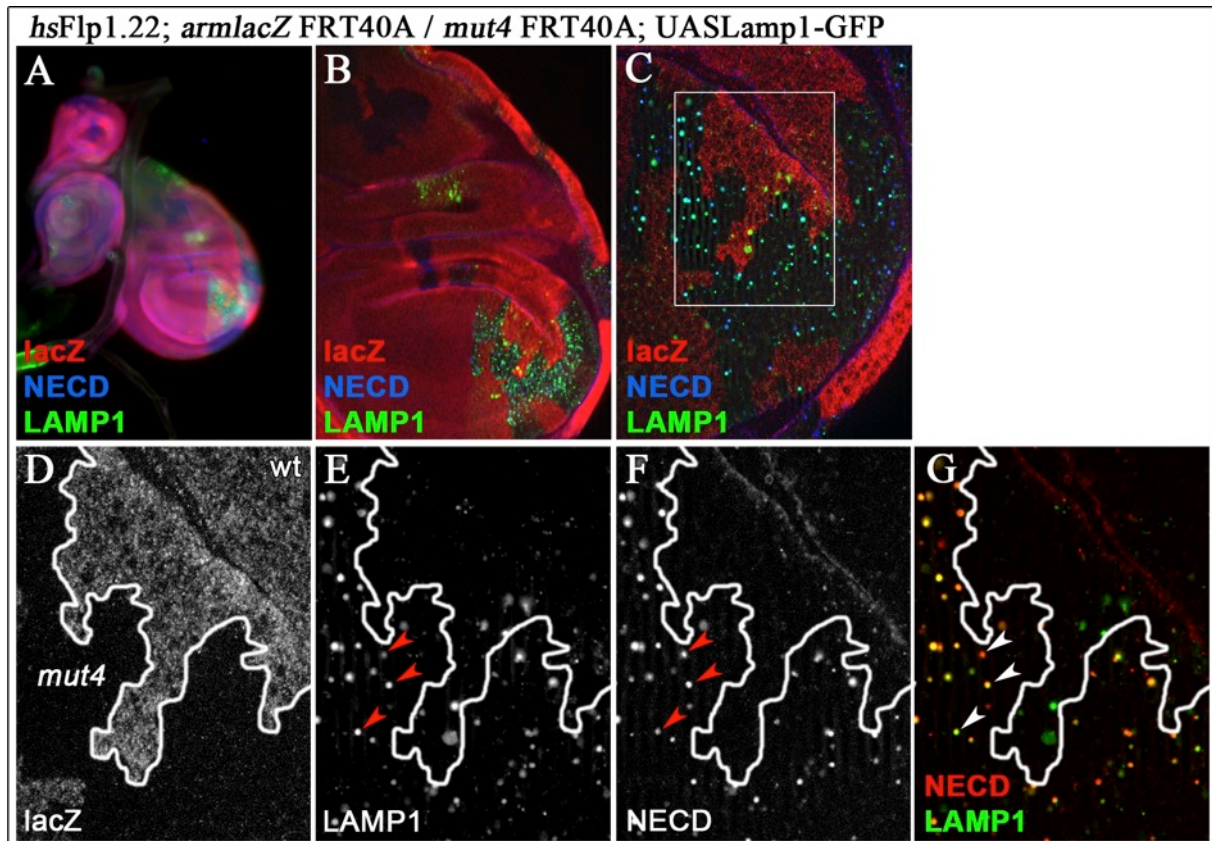


Abb.2.14: *mut4*-Endosomen kolokalisieren mit dem unter der Kontrolle des UAS-Promotors exprimierten **Lamp1-GFP**. Lamp1-GFP wurde in Flügelimaginalscheiben, die *mut4*-mutante Zellklone enthalten (gekennzeichnet durch die Abwesenheit des Reporterkonstruktes *armlacZ* in A-D), auf der posterioren Seite exprimiert (A, B, C, E, G). Die Flügelimaginalscheiben wurden zur Kennzeichnung der *mut4*-spezifischen Vesikel mit dem Antikörper gegen die extrazelluläre Domäne des Notch-Rezeptors (NECD in A, B, C, F, G) gefärbt.

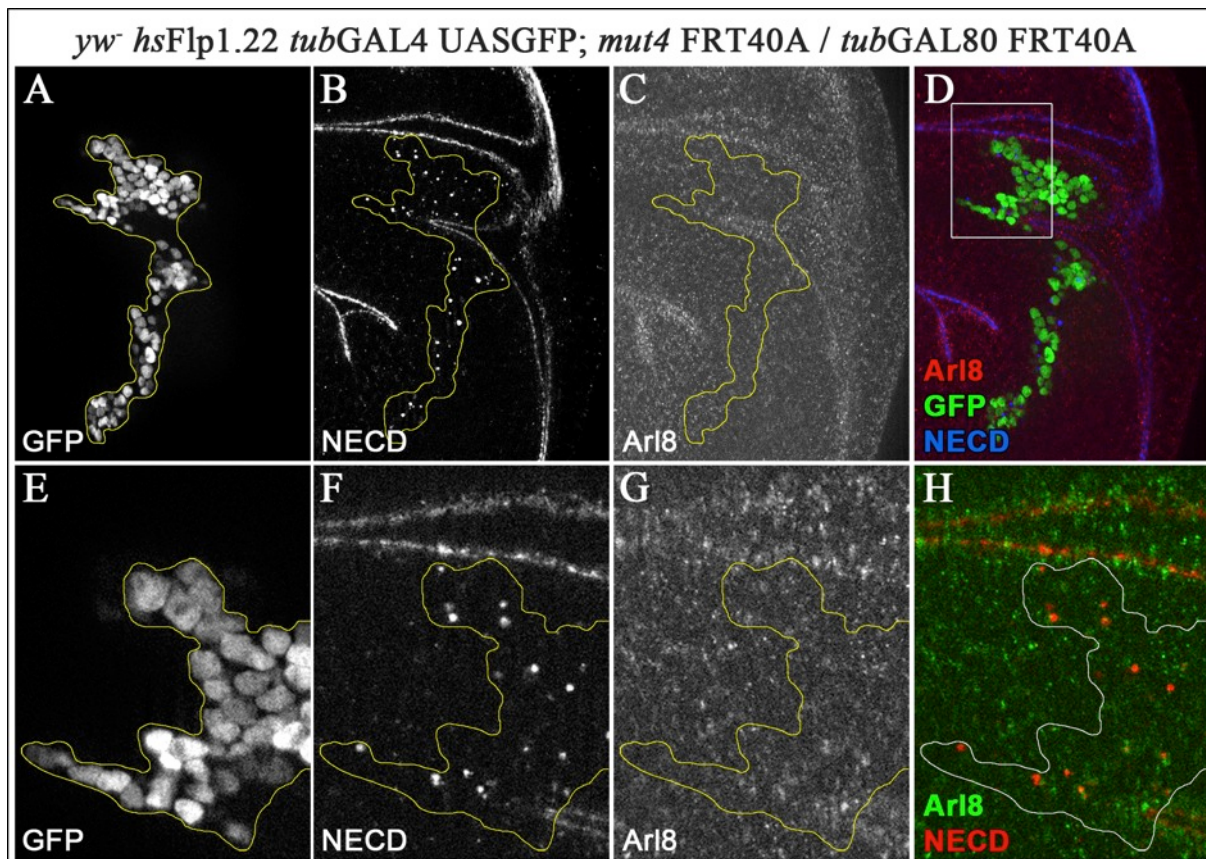


Abb.2.15: Die vergrößerten, Notch-enthaltenden Endosomen in *mut4*-mutanten Zellklonen zeigen keine Assoziation mit dem lysosomalen Marker Arl8. Die *mut4*-Mutation zeigt ebenfalls keinen Einfluss auf Arl8-Verteilung in mutanten verglichen mit wildtypischen Zellen. Die *mut4*-mutanten Zellklone, erzeugt durch das MARCM-System, sind durch die Anwesenheit des GFP-Markers (A, D, E), bzw. durch die gelben/weißen Umrisse gekennzeichnet. Die Flügelimaginalscheiben wurden mit den Antikörper gegen die extrazelluläre Domäne des Notch-Rezeptors (B, D, F, H) und Arl8 (C, D, G, H) gefärbt.

Die vergrößerten Endosomen in *mut4*-Mutanten Zellen sind mit Lamp-1, einem spätendosomalen/lysosomalen Marker kolokalisiert aber nicht mit den lysosomalen Marker Arl8 und die Verteilung beider Marker ist in den mutanten und wildtypischen Zellen unverändert. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die vergrößerten, Lamp-1-positiven *mut4*-Endosomen reife Endosomen und keine Lysosomen sind.

2.6. Saures Milieu der Endosomen in *mut4*-mutanten Zellklonen

Auf dem Weg zum Lysosom fällt der pH-Wert vermittelt durch die Funktion von ATPasen der Vakuolen (V-ATPasen; Forgac, 2007; Marshansky und Futai, 2008) ständig ab, von den schwach sauren frühen Endosomen (pH-Wert zwischen 6.8 und 5.9) bis zu späten Endosomen (pH-Wert zwischen 6.0 und 4.9) (Maxfield und Yamashiro, 1987). Der fallende pH-Wert ist hierbei charakteristisch für die Reifung der Endosomen. Das in den Lysosomen herrschende saure Milieu kann mittels Substanzen, die sich bevorzugt in solchen pH-Bereich ansammeln,

genutzt werden um spezifisch die Lysosomen anzufärben. Eine der hierzu genutzten Substanzen ist der sogenannte LysoTracker (Invitrogen, Carlsbad, USA). Zur Bestätigung der durch die Analyse endosomaler Marker gewonnenen Einschätzung der *mut4*-Vesikel als später/reifer Endosomen wurden Flügelimaginalscheiben mit *mut4*-mutanten Zellklonen mit dem LysoTracker gefärbt. Dabei zeigten die *mut4*-mutanten Zellklone im Vergleich zu den daneben liegenden wildtypischen Zellen eine größere Ansammlung des LysoTracker auf, was auf die Ansäuerung der dort vorhandenen, vergrößerten Endosomen hindeutet (Abb. 2.16).

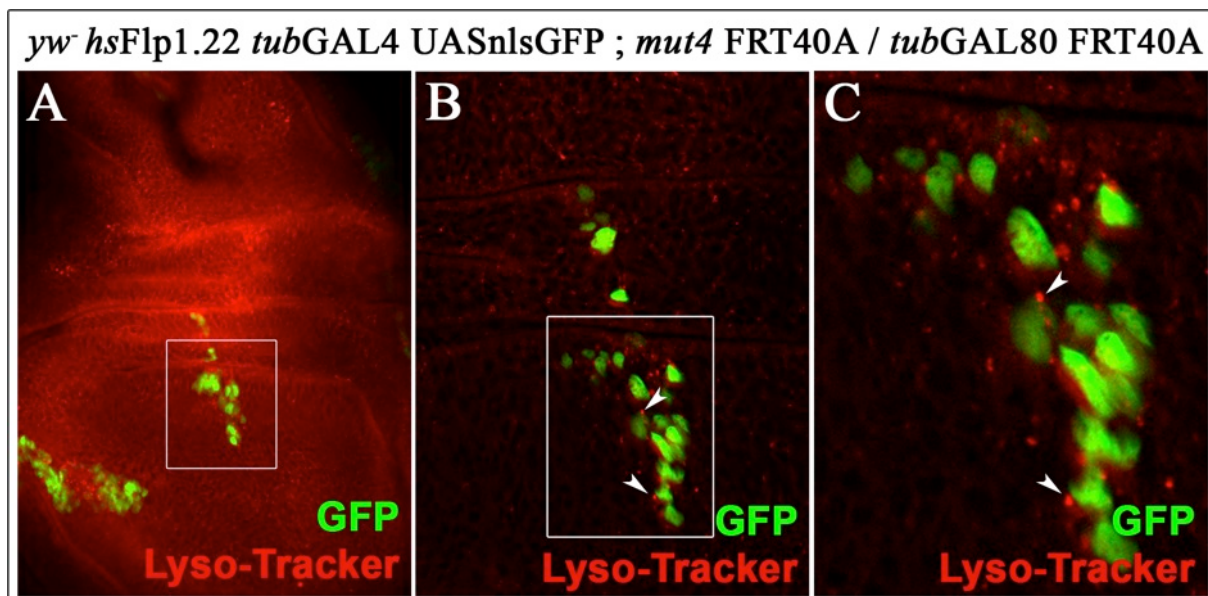


Abb.2.16: Die vergrößerten Endosomen in den *mut4*-mutanten Zellklonen haben sauren Charakter. Die Färbung mit LysoTracker, der für die Färbung von Kompartimenten mit saurem Milieu verwendet wird, wie er in Lysosomen herrscht, zeigt eine Ansammlung von diesem Farbstoff in den mutanten Zellen. Die *mut4*-mutanten Zellklone, erzeugt durch das MARCM-System, sind durch die Anwesenheit des GFP-Markers gekennzeichnet.

Zusammengefasst führt die *mut4*-Mutation zur Entstehung vergrößerter Endosomen, die verschiedene Transmembranproteine enthalten. Obwohl die *mut4*-Endosomen mit dem Recyclingmarker Rab4 assoziiert sind, spricht deren Assoziation mit den spätendosomalen Markern gegen einen Recyclingcharakter dieser Endosomen, und dafür, dass diese den reifen Endosomen zuzurechnen sind. Diese Einschätzung wird auch durch den sauren Charakter der Endosomen bestärkt.

Es scheint also der Austausch von Rab5 gegen Rab7 während der Endosomenreifung (Rink *et al.*, 2005) betroffen zu sein, da Rab5 häufiger an Endosomen assoziiert zu beobachten ist, während Rab7 nicht mit den *mut4*-charakteristischen Endosomen assoziiert ist. Dazu kommt die Veränderung der Rab7-Lokalisation durch diese Mutation. Rab7 ist zytoplasmatisch

verteilt, d.h. es zeigt überhaupt keine endosomale Assoziation in *mut4*-mutanten Bereichen mehr auf. Weil die Hauptfunktion von Rab7 die Vermittlung der Fusion später Endosomen mit Lysosomen ist (Vanlandingham und Ceresa, 2009), ist es aufgrund der in Rahmen dieser Arbeit beschriebenen Experimente anzunehmen, dass der beobachtete endosomale Effekt der *mut4*-Mutation die Folge eines Abbau-Defektes in den betroffenen Zellen ist.

Elektronenmikroskopische Analyse von *mut4*-mutanten Zellen

Durch Fluoreszenzaufnahmen kann nicht eindeutig festgestellt werden, ob die beobachteten *mut4*-Vesikel tatsächlich größer sind oder ob lediglich eine veränderte Inhaltsverteilung den Eindruck erweckt, dass die Vesikel größer sind. Ein solcher Eindruck könnte z. B. dadurch entstehen, dass die angefärbten Proteine über größere Bereiche eines Endosoms, bzw. längere Abschnitte der endosomalen Membran verteilt sind, anstatt an einer Stelle akkumuliert vorzuliegen. Um eine höhere Auflösung vom Inneren der Zelle zu erhalten und die Morphologie der vergrößerten Endosomen besser studieren zu können, wurden deswegen zusätzlich zu den Fluoreszenzaufnahmen elektronenmikroskopische Analysen durchgeführt. Da die Flügelimaginalscheiben aus einem einschichtigen Epithel aufgebaut sind, wurden nach deren Einbettung Querschnitte durch die Flügelimaginalscheiben durchgeführt, um die Verteilung von Endosomen über die gesamte Ausdehnung einer Zelle und auch die Morphologie der Endosomen beobachten zu können (Abb.2.17).

Der Vergleich von analogen Arealen in solchen Querschnitten *mut4*-mutanter und wildtypischer Flügelimaginalscheiben zeigte, dass in *mut4*-mutanten Flügelimaginalscheiben tatsächlich eine höhere Anzahl von MVBs vorhanden ist. Bei Auszählung von Arealen gleicher Größe konnten beispielsweise 30 MVBs in einer *mut4*-mutanten Flügelimaginalscheibe verglichen zu 18 in einer wildtypischen Flügelimaginalscheibe festgestellt werden (Abb.2.18-A, B). Dazu waren diese Vesikel in mutanten Flügelimaginalscheiben größer, und enthielten mehr intraluminal Vesikel (ILV) (Abb.2.18-C). Die Anwesenheit der ILV in MVBs deutet hierbei auf eine intakte Funktion der ESCRT-Maschinerie in *mut4*-mutanten Zellen hin.

Um die beobachtete Vergrößerung der MVBs in *mut4*-mutanten Flügelimaginalscheiben genauer zu quantifizieren, wurde eine statistische Analyse anhand zwei verschiedener experimenteller Ansätze durchgeführt. Der Aufbau und die Ergebnisse dieser Analyse sind im

Abschnitt „Quantitative Analyse des Vesikel-Phänotyps bei beeinträchtigter *Dmon1/Dccz1* Funktion“ detailliert beschrieben.

Das Vorkommen vergrößerter, transmembranproteinenthaltender Endosomen in den *mut4*-Zellen deutet auf eine allgemeine Störung des endosomalen Transports und damit einhergehend auf eine Störung des Proteinabbaus, wobei die Störung durch die Mutation an dem Übergang zwischen den späten Endosomen und dem Lysosom vorzuliegen scheint. Neben den MVBs sind daher auch die Lysosomen elektronenmikroskopisch analysiert worden, wobei allerdings die Morphologie der Lysosomen in den *mut4*-mutanten Zellen unverändert erschien (Pfeile in der Abb.2.19).

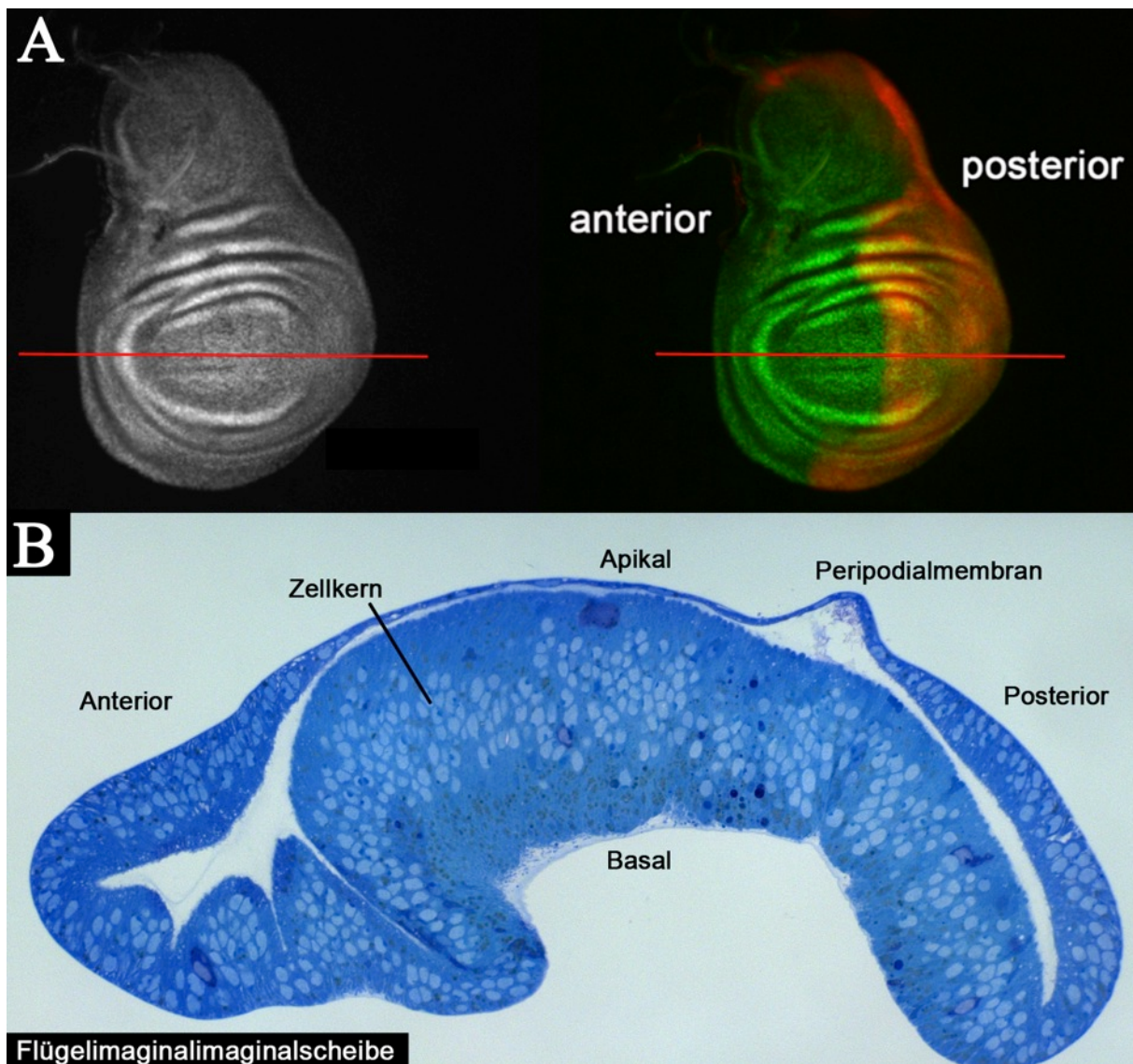


Abb.2.17: Übersichtsabbildungen einer Flügelimaginalscheibe in Fluoreszenzaufnahmen (A-in Aufsicht) und im Semidünnschnitt in Tolluidin-Blau (B-im Querschnitt). Die roten Linien in A zeigen die ungefähre Lage der elektronenmikroskopisch untersuchten Querschnitte.

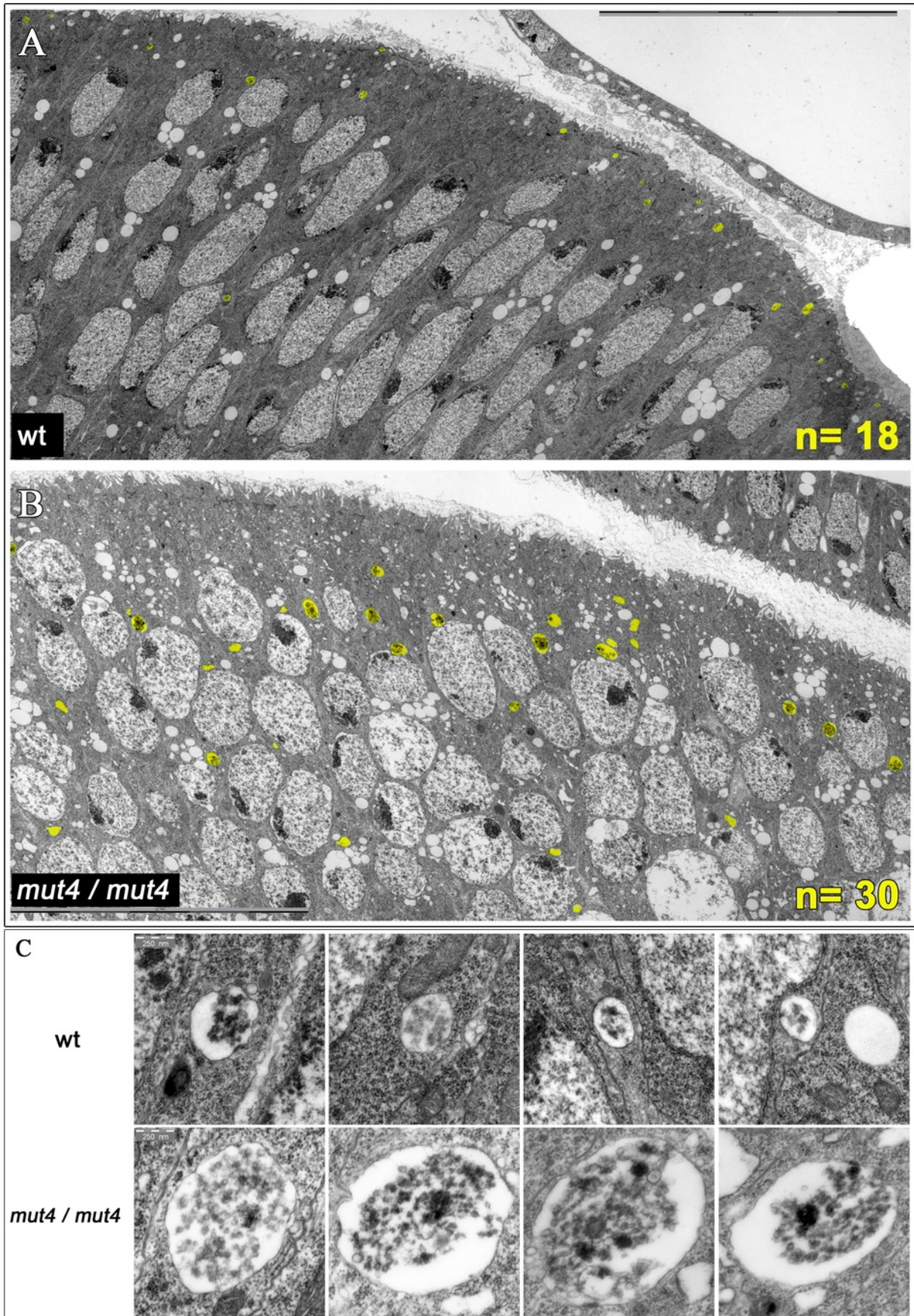


Abb.2.18: Die EM-Analyse zeigt eine erhöhte Anzahl von MVBs, die außerdem im Vergleich zum wt in *mut4*-mutanten Flügelimaginalscheiben vergrößert sind. Der Vergleich zwischen einem gleichgroßen Areal in *mut4*-mutanten (B) und wildtypischen (A) Flügelimaginalscheiben zeigt, dass in

den *mut4*-mutanten Flügelimaginalscheiben mehr MVBs vorkommen. Der Vergleich der einzelnen MVBs in den kleineren, untenstehenden Abbildungen (C) zeigt eine enorme Vergrößerung der Endosomen/MVBs in den *mut4*-mutanten Zellen. Die Größenbalken in A und B entsprechen 10µm und die in C 250 nm.

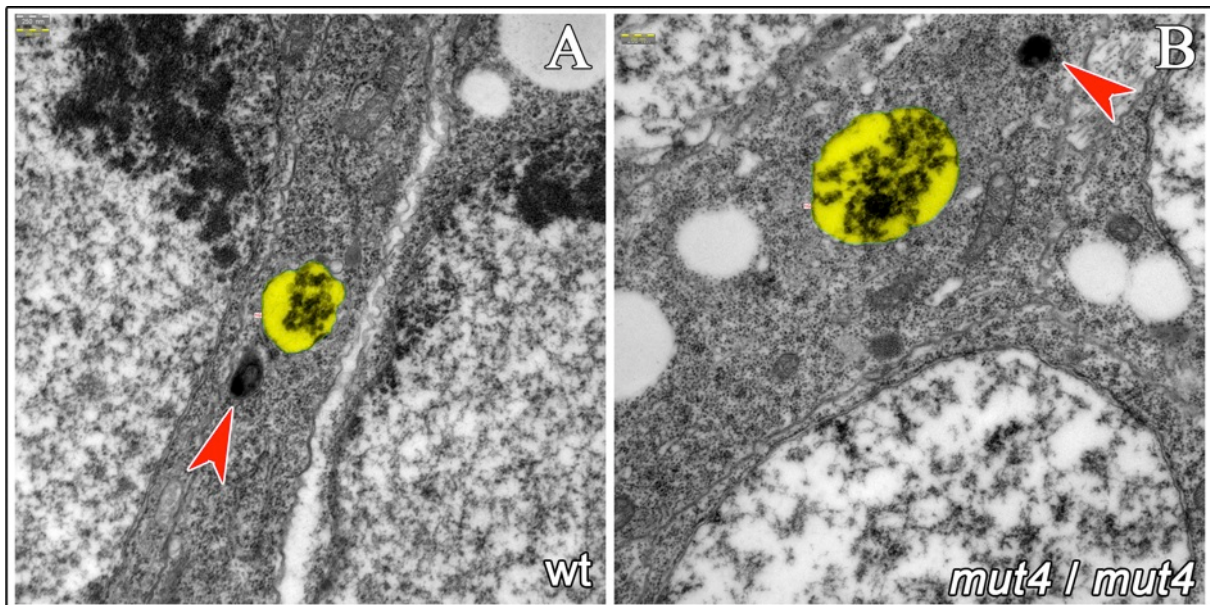


Abb.2.19: Die Morphologie von Lysosomen erscheint unverändert in *mut4*-mutanten Zellen. Die roten Pfeile zeigen auf die Lysosomen. MVBs sind gelb markiert.

Die Endosomen stellen bewegliche Strukturen dar, die nach der Internalisierung und im Laufe des Reifungsprozesses von der Zelloberfläche in Richtung des Zellkerns entlang von Mikrotubuli (MT) transportiert werden. In wildtypischen Zellen haben die frühen Endosomen eine periphere Verteilung während die späten Endosomen und Lysosomen sich im perinukleären Bereich, in der Nähe vom Zellkern befinden wo auch die Lysosomen zu finden sind (Abb.2.20-A) (Huotari und Helenius, 2011). In den *mut4*-mutanten Zellen der Flügelimaginalscheiben befinden sich die vergrößerten MVBs ebenfalls in der Nähe des Zellkerns in der perinukleären Region (Abb.2.20-B), die Mobilität der Endosomen und deren Transport entlang der Mikrotubuli scheint also durch die *mut4*-Mutation nicht beeinträchtigt zu sein.

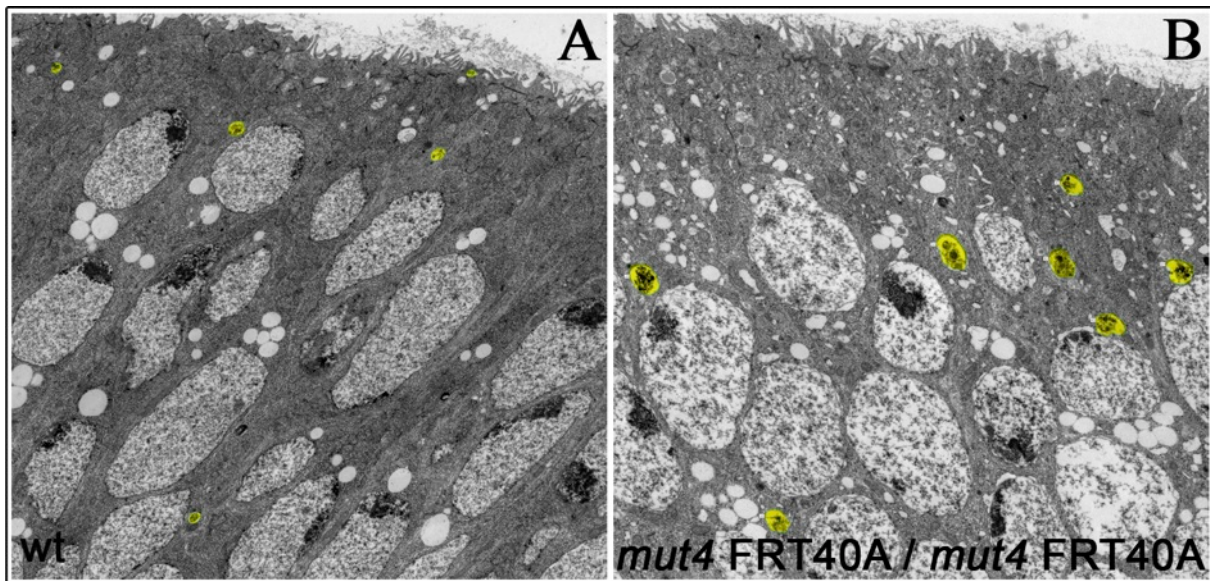


Abb.2.20: Die Beweglichkeit der Endosomen ist durch die *mut4*-Mutation nicht beeinträchtigt. Die vergrößerten MVBs in *mut4*-mutanten Zellen befinden sich in der Nähe des Zellkerns (B), wie dies auch in wildtypischen Zellen (A) zu beobachten ist.

2.7. Kartierung der *Mut4*-Mutation

Wie bereits erwähnt, wiesen vorhergehende Experimente darauf hin, dass sich die Mutation *mut4* auf dem linken Arm des zweiten Chromosoms (2L) von *Drosophila melanogaster* befindet. Um den chromosomalen Bereich, auf dem die Mutation liegt, genauer einzugrenzen, wurde eine Komplementationsanalyse durchgeführt indem der *mut4*-Stamm gegen sämtliche erhältlichen Defizienzen-Stämme des gesamten linken Arms des zweiten Chromosoms [Df(2L)] aus dem (sogenannten) Defizienzen-Kit der Stammsammlung Bloomington gekreuzt wurde. Die *mut4*-Mutation ist in Homozygose puppal semilethal. Bei dem Screen gegen die Defizienzen wurde zum einen nach Semilethalität in Transheterozygose, zum anderen mittels Antikörperfärbungen gegen die extrazelluläre Domäne des Notch-Rezeptors nach dem *mut4*-spezifischen Vesikel-Phänotyp gescreent, für den Fall, dass die Defizienz, die das *mut4*-Gen betrifft zu einem nur teilweisen Funktionsverlust des Gens führt, der in Transheterozygose mit dem *mut4*-Allel nicht letal ist.

In Rahmen des Screens wurden keine Defizienzen gefunden, die in Transheterozygose über *mut4* letal waren. Allerdings wurden drei Defizienzen Df(2L)Exel6010, Df(2L)Exel8012 und Df(2L)Exel9062 identifiziert, die gekreuzt gegen die *mut4*-mutanten Fliegen, im transheterozygoten Zustand den gleichen Phänotyp zeigten wie *mut4*-homozygote Mutanten, also vergrößerte Endosomen, die den Notch-Rezeptor beinhalten (Abb.2.21).

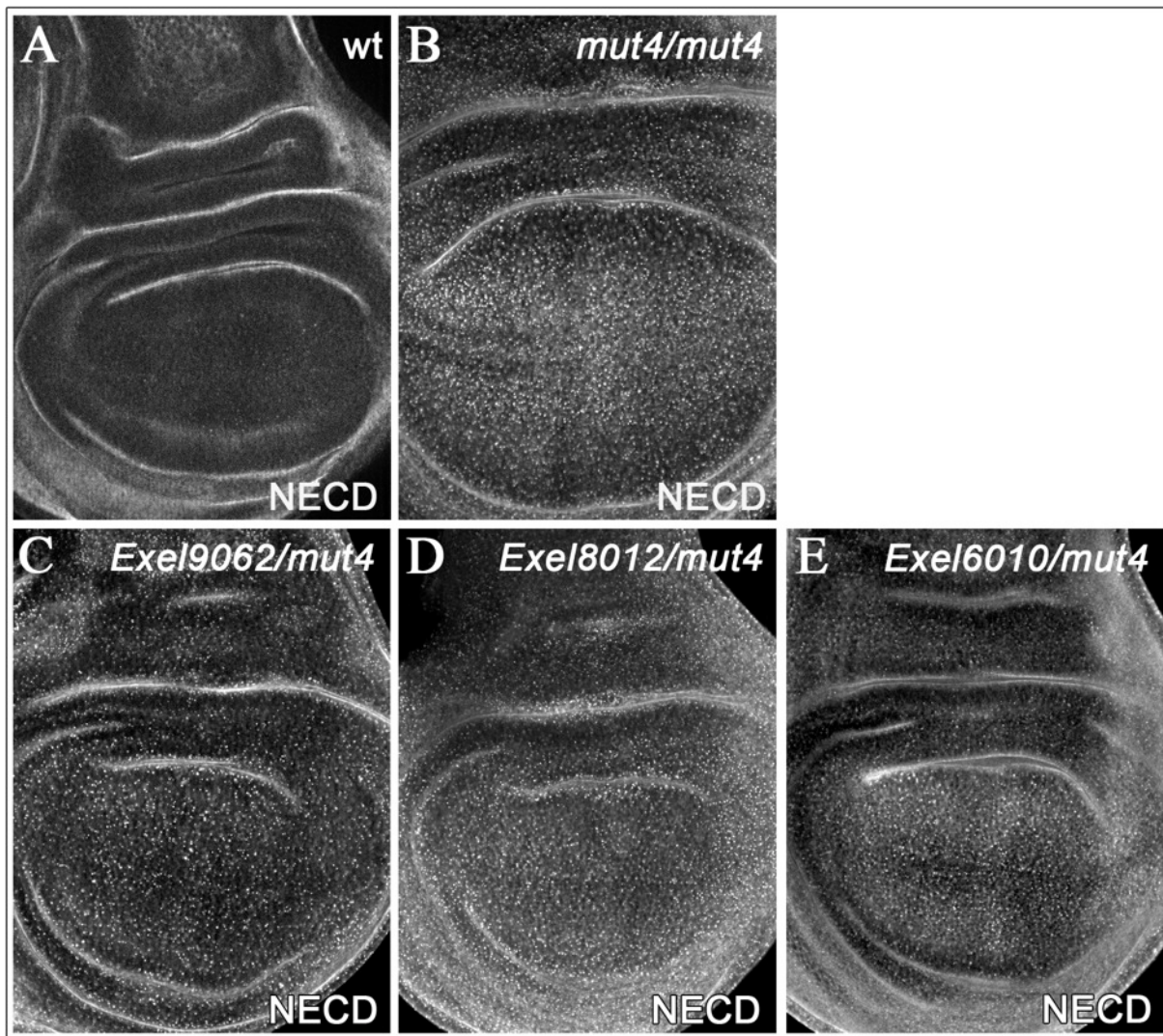


Abb.2.21: Drei Defizienzen-Stämme des linken Arms des zweiten Chromosoms zeigen in transheterozygotem Zustand über dem *mut4*-Allel (C, D, E) den gleichen Phänotyp wie *mut4*-homozygote Mutanten (B) im Bezug auf das Vorkommen Notch-enthaltender vergrößerter Endosomen. Flügelimaginalscheiben aus wt (A), *mut4*-Mutanten (B) und Defizienzen über *mut4* (Exel9062 in (C), Exel8012 in (D) und Exel6010 in (E)) sind mit dem Antikörper gegen die extrazelluläre Domäne des Notch-Rezeptors gefärbt.

Allen drei dieser Defizienzen, Df(2L)Exel6010 (25A7-25B1), Df(2L)Exel8012 (25B1-25B5) und Df(2L)Exel9062 (25B1-25B1), ist es gemeinsam, dass ihnen Teile oder die gesamte Bande 25B1 des 2L-Chromosomenarms fehlt, was auf diese Region als Locus des *mut4*-Gens hinweist (Abb.2.22).

Von den in diesem Bereich befindlichen Transkriptionseinheiten zeichnete sich die Transkriptionseinheit CG11926 als der vielversprechendste Kandidat des *mut4*-Lokus aus, da der Verlust der Funktion von *Sand-1*, des *Mon1*-Orthologen in *C. elegans*, einen ähnlichen Phänotyp wie *mut4* in *C. elegans* aufweist, nämlich das Vorkommen großer, vesikelförmiger Strukturen, eine Veränderung der Rab7-Lokalisation hin zu einer zytoplasmatischen

Verteilung und einem Verlust der Assoziation mit Endosomen (Poteryaev *et al.*, 2007). Ferner stellt die *sand-1* Mutation (*or552*) eine temperatursensitive, rezessive, embryonal und larval letale Mutation in *C. elegans* dar, die eine Akkumulation von großen, vesikelähnlichen Strukturen oder Granulat in Oocyten und embryonalen Zellen aufweist (Poteryaev und Spang, 2005; Poteryaev *et al.*, 2007).

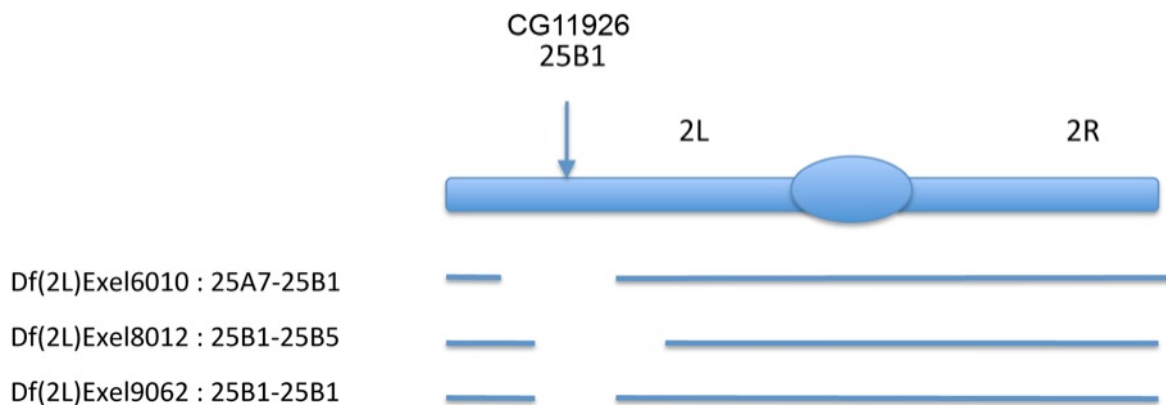


Abb.2.22: Für die Kartierung von *mut4* wurden die mutanten Fliegen gegen das Defizienzen-Kit für den linken Arm des zweiten Chromosoms von *Drosophila* (2L) gekreuzt. Dabei deckten die drei Defizienzen, die in Transheterozygose über *mut4* den *mut4*-spezifischen Vesikel-Phänotyp zeigten die Transkriptionseinheit des *Mon1*-Orthologen kodiert durch CG11926 auf.

Die Transkriptionseinheit CG11926 liegt zytologisch auf der Bande 25B1 (Abb.2.22), besteht aus drei Exons und kodiert für das Protein Mon1 mit 528 Aminosäureresten (Abb.2.24). Im Nachfolgenden wird CG11926 kodierend für den Mon1-Orthologen in *Drosophila* als *Dmon1* bezeichnet

Um festzustellen, ob die in *mut4*-mutanten Fliegen beobachteten Phänotypen tatsächlich auf eine Mutation in dem Gen *Dmon1* zurückzuführen sind und *mut4* somit ein Allel von *Dmon1* ist, wurden Rettungsexperimente, eine Sequenzierung der genomischen Region um CG11926 und ein Vergleich des *mut4*-Phänotypen mit dem von *Dmon1*-RNAi-Expression durchgeführt die nachfolgend beschrieben sind.

2.7.1. Die Expression von *Dmon1*-RNAi zeigt einen ähnlichen Phänotyp wie die *mut4*-Mutation

Zuerst wurde getestet, ob der Verlust der Funktion von *Dmon1* den gleichen Phänotyp wie die *mut4*-Mutation erzeugt. Die Expression von *Dmon1* wurde durch die Expression eines *Dmon1*-RNAi-Konstrukts mittels des UAS/GAL4-Systems durch die Treiberlinie *ptc*-GAL4 entlang der antero-posterioren Achse der Flügelimaginalscheibe herunterreguliert. Zusätzlich

wurde das Enzym Dicer-2 (Dcr2) koexprimiert, welches für die Funktion vieler RNAi-Konstrukte notwendig ist, bzw. deren Effekt häufig verstärkt (Liu *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2004; Siomi *et al.*, 2005).

Die Reduzierung der *Dmon1*-Expression mittels RNAi führt zur Entstehung der *mut4*-typischen vergrößerten Vesikel, die den Notch-Rezeptor enthalten (Abb.2.23-A, F, K, L, M). Diese Vesikel sind ferner mit Rab4 (Abb.2.23-K) und Rab5 (Abb.2.23-L) assoziiert. Gleichzeitig zeigt Rab7 keine Assoziation mit diesen vergrößerten Endosomen (Abb.2.23-M). Ähnlich wie bei der *mut4*-Mutation ist Rab7 im *Dmon1*-RNAi-Expressionsbereich hauptsächlich zytoplasmatisch lokalisiert (Abb.2.23-D, I, M). Der Phänotyp des Verlustes der Funktion von Dmon1 gleicht somit dem beobachteten Phänotyp der *mut4*-Mutation.

Für eine weitere Bestätigung dieser Ergebnisse wurden zusätzlich elektronenmikroskopische Analysen durchgeführt. Für diese Experimente wurde *Dmon1*-RNAi mittels *hh*-GAL4 in dem posterioren Kompartiment von Flügelimaginalscheiben exprimiert. Die MVBs auf der posterioren Seite der Flügelimaginalscheibe waren vergrößert, verglichen mit den MVBs auf der anterioren Seite (siehe Abschnitt „Quantitative Analyse des Vesikel-Phänotyps bei beeinträchtigter *Dmon1/Dccz1* Funktion“ und Abb. 2.39a dort). Dieser Phänotyp ähnelt dem beobachteten Phänotyp *mut4*-mutanter Flügelimaginalscheiben. Der Umfang und Oberfläche der Vesikel wurde hier ebenfalls bestimmt und wird in dem Abschnitt „Quantitative Analyse des Vesikel-Phänotyps bei beeinträchtigter *Dmon1/Dccz1* Funktion“ genauer beschrieben.

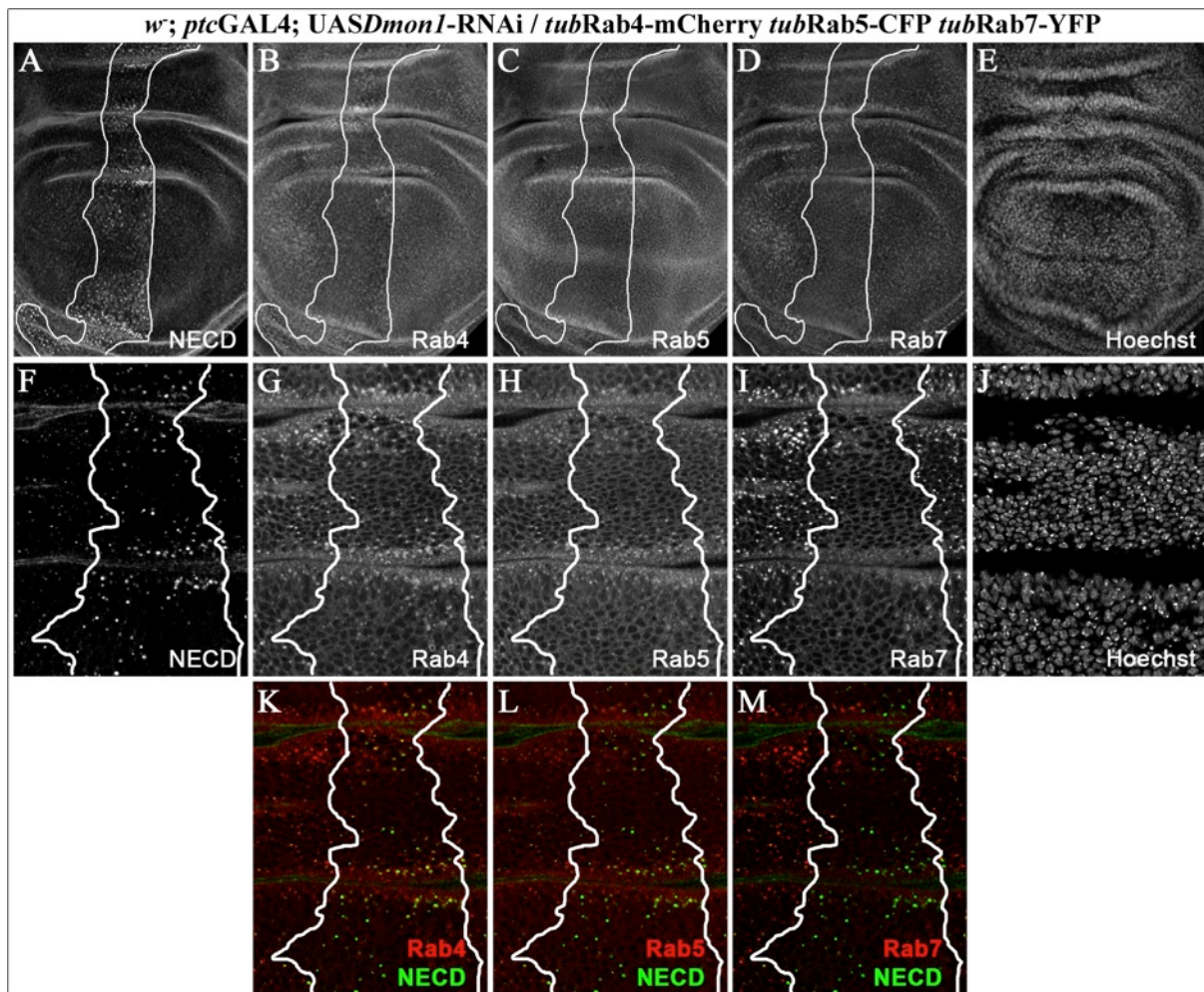


Abb.2.23: Expression von *Dmon1*-RNAi führt zu einem *mut4*-ähnlichen Phänotyp. Vergrößerte, Notch-enhaltene Endosomen (A, F, K, L und M), die mit Rab4-(B, G, L) und Rab5-kolokalisieren (C, H, L) sind innerhalb der *ptc*-Expressionsdomäne zu beobachten. Die Verteilung von Rab7 ist verändert. Es ist zytoplasmatisch und nicht mehr an Endosomen lokalisiert, weswegen auch die vergrößerten Endosomen nicht Rab7-assoziiert sind (D, I, M).

2.7.2. *mut4* und *CS084* sind Allele von *Dmon1*

Als nächstes wurde die Transkriptionseinheit CG11926 in *mut4*-mutanten Fliegen/Larven sequenziert. Hierzu wurden mit spezifischen Primern genomische DNA-Abschnitte aus der Transkriptionseinheit CG11926 amplifiziert und sequenziert. In *mut4*-mutanten Fliegen wurde hierbei in der CG11926 Transkriptionseinheit ein Basenaustausch festgestellt, eine C→T Punktmutation, die zu einem Stopcodon (Q(70)→STOP) im Bereich des ersten Exons führt. Von den 528 Aminosäureresten des wildtypischen Dmon1 werden dadurch in *mut4*-mutanten Fliegen voraussichtlich nur die ersten 69 Aminosäurereste translatiert (Abb.2.24).

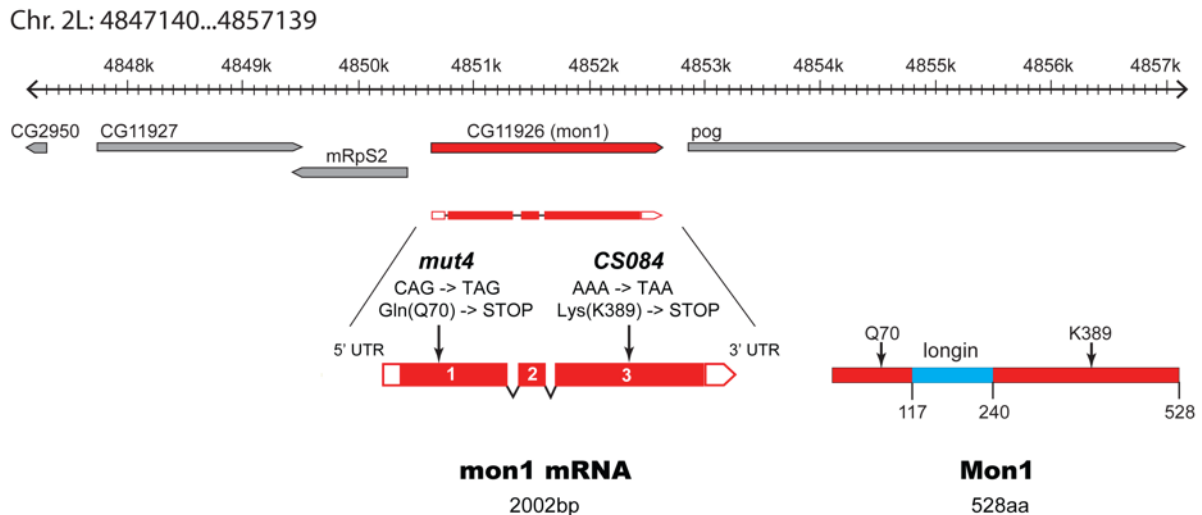


Abb.2.24: Die für *Dmon1* kodierende Transkriptionseinheit CG11926. *Dmon1*-mRNA besteht aus drei Exons. Das kodierte Protein weist strukturell die Longin-Domäne auf, welche für die Interaktion zwischen Mon1 und Ccz1 und Vps39 in der Hefe verantwortlich ist. Die *mut4*-Mutation verursacht einen frühzeitigen Translationsabbruch (STOP) in dem ersten Exon. Dadurch werden nur die ersten 69 Aminosäuren translatiert. Bei der Mutation im *CS084*-Allel handelt es sich um ein vorzeitiges Stopcodon in drittem Exon der mRNA.

Der Stamm *CS084* zeigt in Transheterozygose über *mut4* und über Df(2L)Exel9062 einen Vesikel-Phänotyp ähnlich der *mut4*-Homozygose auf (Abb.2.25). *CS084* ist in Homozygose semilethal, d.h. es können auch einige schlüpfende adulte Fliegen beobachtet werden. Bei *CS084/mut4* oder *CS084/Df(2L)Exel9062* Transheterozygoten ist ebenfalls Semilethalität zu beobachten. Aufgrund dieser Beobachtungen wurde angenommen, dass *CS084* und *mut4* Allele des gleichen Gens sind.

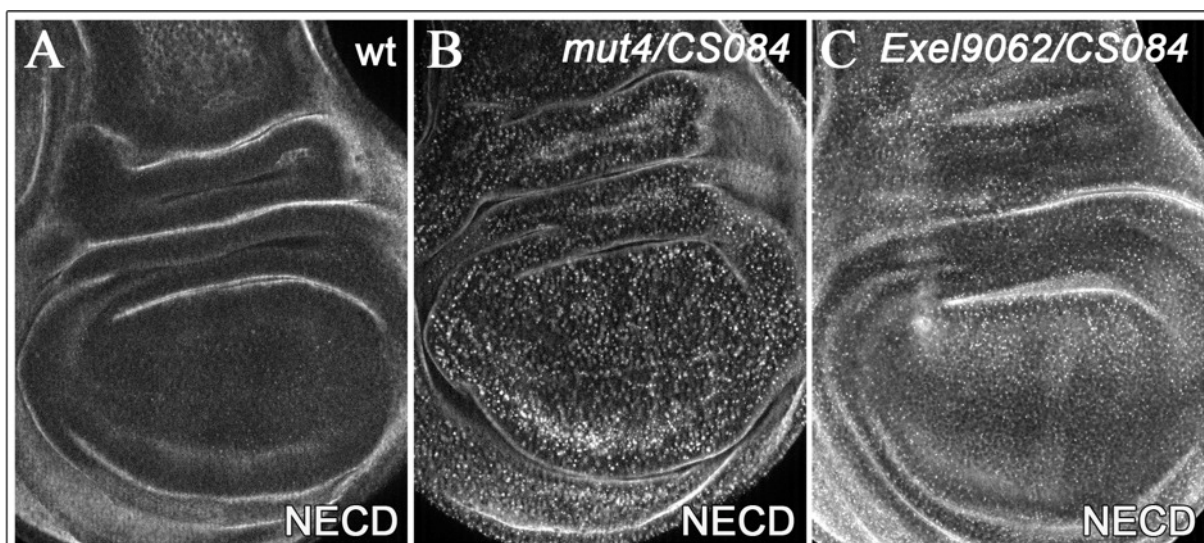


Abb.2.25: *CS084* ist ein Allel von *Dmon1*. *CS084* zeigt in Transheterozygose über *mut4* (B) oder über Df(2L)Exel9062 (C) eine starke Akkumulation von Notch-Rezeptor enthaltenden Vesikeln.

Auch dieses zweite *mut4*-Allel, *CS084*, wurde sequenziert. Bei diesem Allel wurde ebenfalls ein Basenaustausch festgestellt, eine A→T Transition in dritten Exon, was zu einem Stopcodon führt (K(389)→STOP). Somit wurde bestätigt, dass *mut4* und *CS084* Allele von *Dmon1* sind. Durch die festgestellte Mutation werden in *CS084*-mutanten Fliegen wahrscheinlich nur die ersten 388 Aminosäurereste statt der wildtypischen 528 Aminosäurereste translatiert (Abb.2.24). Diese 388 Aminosäurereste umfassen den Proteinbereich der in der Hefe identifizierten Longin-Domäne. Untersuchungen in der Hefe zeigen, dass diese Domäne für die Interaktion zwischen Mon1 und dessen Interaktionspartner Ccz1 und einer spezifischen Untereinheit des HOPS-Komplexes, Vps39, verantwortlich ist (Nordmann *et al.*, 2010). Die Tatsache, dass in *CS084* das vorzeitige Stopcodon später als in *mut4* vorkommt und damit das dort entstehende Proteinfragment wahrscheinlich noch die Longin-Domäne enthält könnte auch die niedrigere Letalitätsrate dieser Mutation verglichen mit der Letalität *mut4*-homozygoter Tiere erklären.

2.7.3. Rettung des *mut4*-Phänotyps mittels *Dmon1* (CG11926)-Expression

Als drittes Experiment für die Bestätigung, dass *Dmon1* das von der *mut4*-Mutation betroffene Gen ist wurde ein Rettungsexperiment durchgeführt. Hierfür wurde zunächst die in Rahmen dieser Arbeit synthetisch hergestellte kodierende *Dmon1*-Sequenz aus dem Vektor pUC57 (hergestellt bei GenSkript, Piscataway, NJ, USA) in den *pUASTattB* Vektor (Bischof, *et al.*, 2007) kloniert (*pUASTattB*-CG11926) und als Transgen gezielt auf den rechten Arm des dritten Chromosoms von *Drosophila* eingeführt. Die so erzeugte transgene Linie *attP-86Fb-UAS*-CG11926, von hier an als *UAS-Dmon1* bezeichnet, bietet die Möglichkeit, das Konstrukt mit verschiedenen Treiberlinien in verschiedenen Kompartimenten der Flügelimaginalscheiben/Fliegen anzuschalten. Durch Kreuzung mit dem *mut4*-Stamm ist hierbei auch ein Stamm erzeugt worden, der auf dem zweiten Chromosom die *mut4*-Mutation und auf dem dritten Chromosom das eingeführte UAS-Transgen trug.

Die CG11926-Transkriptionseinheit wurde auf der posterioren Seite der Flügelimaginalscheibe unverändert (*UAS-Dmon1*) und in einem parallelen Experiment C-terminal markiert mit dem HA-Epitop (*UAS-Dmon1*-HA) mit der Treiberlinie *hedgehog*-GAL4 (*hh*-GAL4) exprimiert. Somit konnten innerhalb einer Flügelimaginalscheibe anterior *mut4*-mutante Zellen und posterior die Transgen-exprimierenden, *mut4*-mutanten Zellen miteinander verglichen, und die gegebenenfalls im posterioren Bereich erzielte Rettung beobachtet werden.

Im *mut4*-mutanten Hintergrund führen sowohl die Expression von nicht-markiertem Dmon1 (Abb.2.26), wie auch die vom markierten Dmon1-HA (Abb.2.37) zu einer Größenreduktion der Notch-enhaltenden Vesikel, im Vergleich zum anterioren Bereich der Flügelimaginalscheiben, in denen die Transgene nicht exprimiert werden. Auch die Lokalisation von Rab7 zeigt im Dmon1-Expressionsbereich wieder eine wildtypische Verteilung, d.h. Rab7 ist auf der posterioren Seite wieder an Endosomen zu finden, wogegen in *mut4*-mutante Zellen auf der anterioren Seite, Rab7 nahezu ausschließlich zytoplasmatisch lokalisiert zu beobachten ist (Abb.2.26-C und Abb.2.27-C, G).

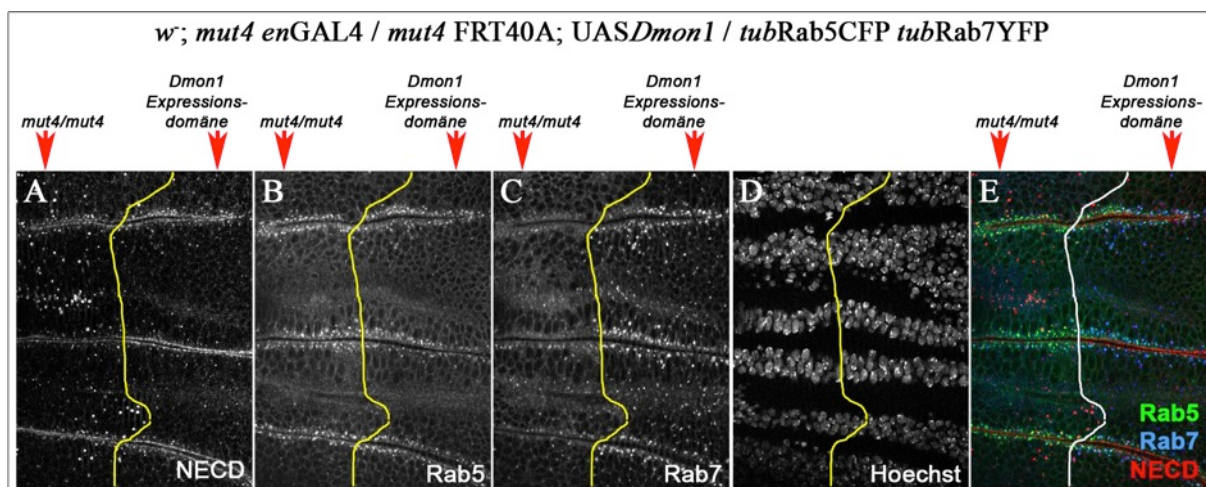


Abb.2.26: Die Expression von Dmon1 auf der posterioren Seite der Flügelimaginalscheibe *mut4*-mutanter Fliegen rettet den durch *mut4* verursachten Phänotyp. Die Notch-enhaltenden Endosomen weisen im Expressionsbereich des Dmon1-Transgens die wildtypische Größe auf (A, E). Die Rab7-Verteilung auf der posterioren Seite entspricht dem wildtypischen Muster (C, E).

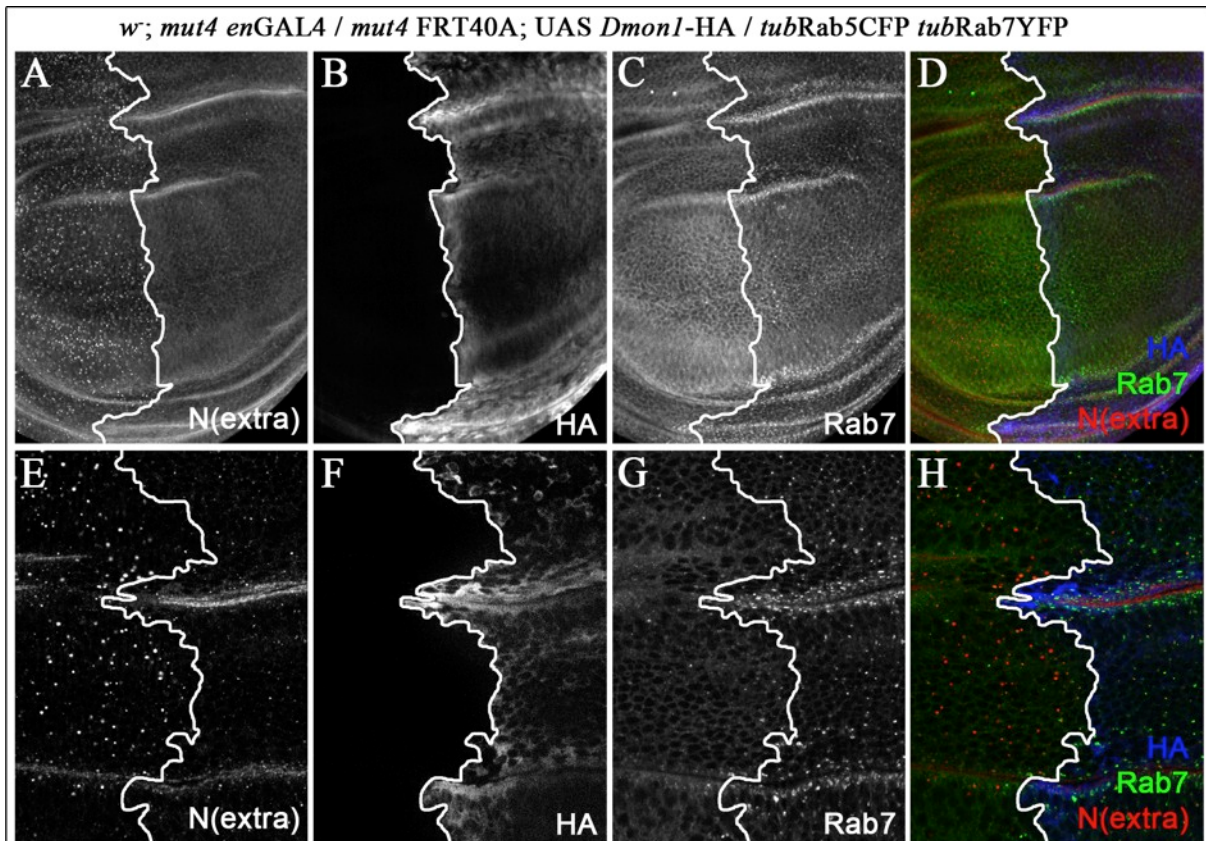


Abb.2.27: Die Expression von Dmon1-HA auf der posterioren Seite der Flügelimaginalscheibe *mut4*-mutanter Fliegen rettet den durch *mut4* verursachten Phänotyp. Dmon1-HA wird auf der posterioren Seite der Flügelimaginalscheibe exprimiert (B, D, F, H). Die Größe der Notch-enthaltenden Endosomen reduziert sich auf die wildtypische Größe (A, D, E, H). Die Rab7-Verteilung auf der posterioren Seite entspricht dem wildtypischen Muster (C, D, G, H).

Ubiquitäre Expression von Dmon1 mit *daughterless*-GAL4 (*da*-GAL4) (Abb.2.28) in *mut4*-mutanten Fliegen rettet ferner die Letalität.

Die Rettung des *mut4*-Phänotypen durch Dmon1-Expression stellt somit eine zusätzliche Bestätigung dar, dass das in *mut4*-mutanten Fliegen betroffene Gen *Dmon1* ist, welches von der Transkriptionseinheit CG11926 kodiert wird. Deswegen werden von hier an die *Dmon1* Allele *mut4* und *CS084* als *Dmon1^{mut4}* und *Dmon1^{CS084}* bezeichnet.

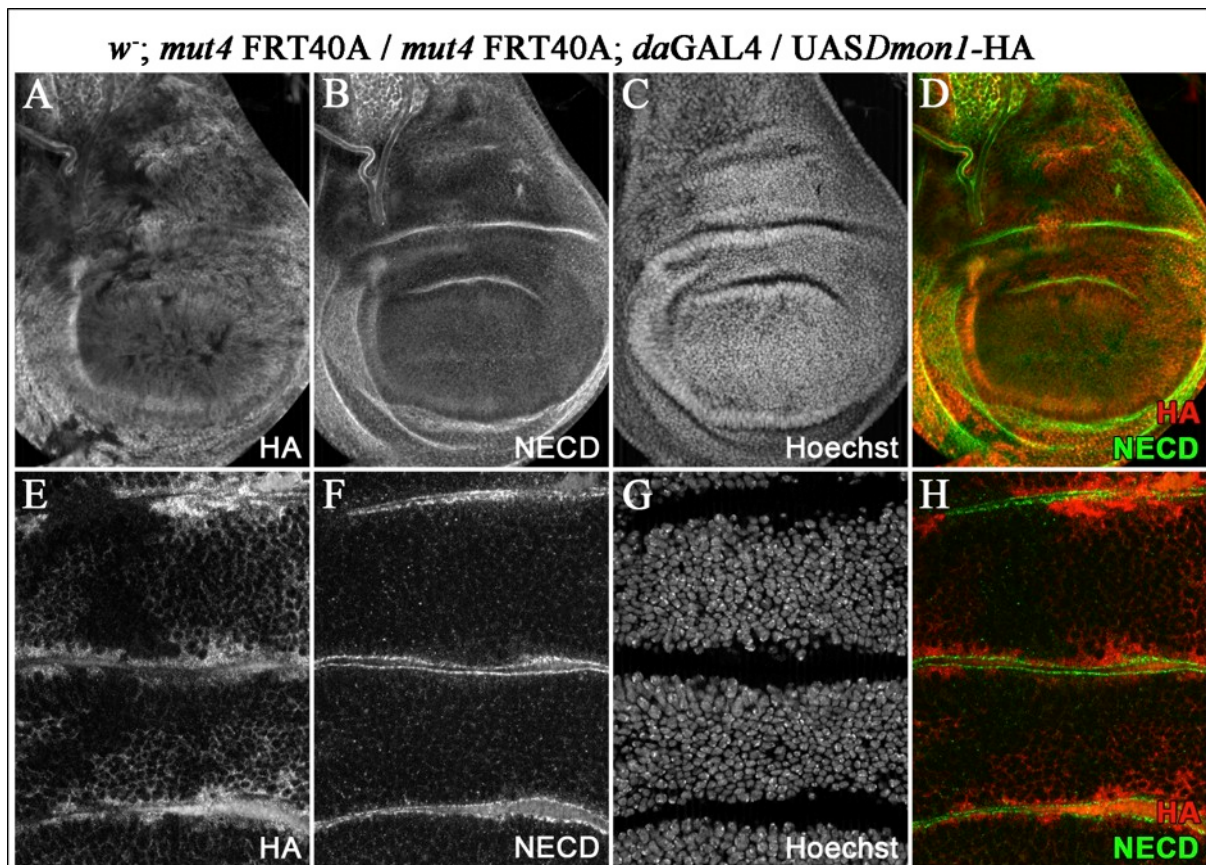


Abb.2.28: Expression von *Dmon1*-HA mittels *da*-GAL4 rettet den *mut4*-Vesikel-Phänotyp. Der Vesikel-Phänotyp verursacht durch die *mut4*-Mutation wird durch die ubiquitäre Expression von *Dmon1*-HA (A, D, E, H) mit der Treiber-Linie *da*-GAL4 in den *mut4*-mutanten Flügelimaginalscheiben gerettet. Eine Antikörperfärbung gegen die extrazelluläre Domäne des Notch-Rezeptors (N(extra) in B, D, F, H) zeigt wildtypische Endosomen. Die Zellkerne sind durch die Hoechst-Färbung sichtbar gemacht (C, G).

Sequenzvergleich von Mon1 in unterschiedlichen Organismen

Das *Dmon1*-Protein hat in *Drosophila* eine Länge von 528aa. Als strukturelles Merkmal bei den Mon1-Orthologen konnte bis jetzt nur eine sogenannte Longin-Domäne in Hefe identifiziert werden (Nordmann *et al.*, 2010). Neben Sand-1 in *C.elegans* sind Orthologe des *Drosophila*-Mon1 auch in anderen Organismen bekannt, wie z.B. Mon1p in der Hefe und zwei Orthologe von *Dmon1* in Säugetieren, Mon1a und Mon1b.

Um den Konservierungsgrad ausgewählter, orthologer Proteine zu bestimmen und die Ergebnisse mit ähnlichen Untersuchungen aus anderen Publikationen zu vergleichen wurden Alignements mit Mon1-homologen Sequenzen aus einigen Beispielorganismen durchgeführt (Abb.2.29). Auf dieser Grundlage wurde ebenfalls ein phylogenetischer Baum erstellt (Abb.2.30), um die Verwandtschaftsbeziehungen zwischen die Orthologen besser zu visualisieren.

		10	20	30	40	50	60	70	80																																																										
DM	1	-----	MEVEQTSV	-----	RSDTNSTCEYLD	AEQDPESP	NLYQEADPDQ	-----	AE	41																																																									
MON1A	1	-----	MHPGG	-----	GPSRAERLELGLGRERPAK	-----	AIPLHR	-----	RP	32																																																									
MON1B	1	-----	MEVGGDTA	-----	APAPGGAEDLED	TQFPSEEA	REGGCVHAVPP	-----	DP	41																																																									
SAND1	1	-----	MEVEVPGG	-----	SEAADTGSEASYKVSQ	VEIEDVEENLKN	-----	-----	-----	36																																																									
Mon1p	1	MN	LNESYLD	AEIPK	QGLKHSKSNF	EGEPII	-----	VATTSEPTTSVNL	DETFKKA	PIAMPICDDH	SVS	66																																																							
ARAB	1	-----	MATSDSRSSPSSSD	TEFADPNPSSD	ETNSERVQSQLES	MNLSQPSEVSD	SGSHTEFSGGDD	-----	-----	62																																																									
ORYZA	1	-----	MDMDPPTNNPSP	-----	PGPPSPPPPEKRL	ASLSLR	TSHPD	FEIHDDYD	-----	DD	48																																																								
ASHBYA	1	-----	MSTSGSRD	-----	SASTRESARET	-----	RAGPQALPLG	SVVLSLS	-----	SM	37																																																								
		90	100	110	120	130	140	150	160																																																										
DM	42	QQNHS	IISEL	RDLGLT	-----	MRDNSALS	PEP	SGQENKGLAAS	VE	SLALST	STS	89																																																							
MON1A	33	GGGG	RERCL	RCHVC	-----	VRR	-----	GPGR	EAVPSGR	-----	PRDILTLP	71																																																							
MON1B	42	EDGE	LEETG	SKDKDQ	P	-----	PSP	-----	SPFPQSEALS	STR	WSPAAPENS	85																																																							
SAND1	36	-----	ADVIF	FEHLEQLP	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	48																																																							
Mon1p	67	TSVNS	INTTSLASRRSP	-----	-----	LQTKKLQAKNNLLSAD	LAKSND	DDTTRALN	SPKKDF	GPYLDSE	ENDI	128																																																							
ARAB	63	NDDE	VASANGNEG	GVSN	GGLLREGVAGTSG	GGEVLLRAEN	PNVEMEAGEEP	PSPTSS	SGYDGER	GSSGGAT	STYKADDS	EDE	142																																																						
ORYZA	49	DDEG	YLTA	VS	R	GSIS	-----	TSAS	-----	AWKDDLEDAD	VAPSPSS	SGYAAER	GTST	108																																																					
ASHBYA	38	RSAS	PTHAPW	VAKP	-----	-----	TTSV	DLTNHFM	-----	EVAARGGEEER	SLAS	SPGE	-----	80																																																					
		170	180	190	200	210	220	230	240																																																										
DM	89	-----	AKTED	SIGG	GLEEEYDY	QHDSI	WOGQ	-----	KKHIFILS	EAGKPI	FSHGC	ED	KLATL	142																																																					
MON1A	71	-----	PWVRQ	RAVTC	TFCAS	WTP	-----	LRNR	-----	RAQRMAT	DMQ	-----	RKR	SSSE	CLDGT	114																																																			
MON1B	85	-----	TCS	PESSSG	CGGDP	SPDEE	-----	WRSQ	-----	RKHVFVLS	EAGKPI	YSRYG	SV	ALSA	-----	135																																																			
SAND1	48	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	FQVFILS	EF	GKPI	EVN	DRNE	GETV	SL	75																																																		
Mon1p	129	RSRL	AESI	YSMTS	IRGSEL	ORRP	PVVSNEIP	NVFKFSK	FNSNCKL	NESQ	TLCDKN	FFITS	AGKPI	YCMH	GKDE	QIMS	Y	207																																																	
ARAB	143	IREAN	VGDGTASQ	HEAAWLP	CKRHV	DEDDAST	SWRKR	-----	-----	KKHFFILS	NSGKPI	YSRYG	BEH	KL	AGF	-----	206																																																		
ORYZA	108	-----	PQD	DDDDW	PRDKKHL	HEDDT	ASWKR	-----	-----	KKHFFILS	NSGKPI	YSRYG	BEH	KL	AGF	-----	162																																																		
ASHBYA	80	-----	EMQYEL	AHSM	KAA	-----	PALPR	LLPSP	FR	AAGGRG	-----	ALPQ	-----	EK	FFVLT	AAGKPI	YSRYG	BEH	KL	AGF	142																																														
		250	260	270	280	290	300	310	320																																																										
DM	143	FGVIQ	-----	ALVS	FVQMGQDAIT	SI	IASG	-----	IKFA	FMQRSS	LLVAA	SRSN	MSVQ	LOLQ	LDVYN	NOILS	ILTY	SHM	213																																																
MON1A	115	LTPS	DGGS	ME	RAES	PTPGMA	QGMEDG	-----	YKVF	FVRRSP	LV	AVART	RQSA	QEL	LAQ	ELLYTY	YOILS	LLT	GAQL	187																																															
MON1B	136	MGVMT	-----	ALVS	FVQSGDAIR	AIYA	ED	-----	HKIV	FLQOG	PL	LVAM	SRT	QSSAA	QLR	GLL	LA	VHAQ	IVSTL	TRASV	206																																														
SAND1	76	VALIC	-----	AFVS	RCSQSG	DSLMT	MTS	QD	-----	NHIC	FLK	SPIL	FCV	VSKYP	-----	EOL	DQ	QLEV	FE	OTIC	SILSK	SOL	143																																												
Mon1p	208	TGLVN	-----	TVIS	YFQVNG	PESE	LKTIST	LTSG	-----	KRLT	FLDK	SPILL	MA	SER	GESS	SNELL	NQD	DFLY	SYLLS	SL	SER	Q	281																																												
ARAB	207	SATLQ	-----	AIIS	FVEN	GGDR	NVLK	ASN	-----	HQV	FLVK	SPIL	VL	CT	SCT	DET	YEL	RLQ	DL	LYG	OMILL	ILTKS	I	276																																											
ORYZA	163	SATLQ	-----	AIIS	FVEN	GGDH	IKFV	RAAK	-----	HQV	FLVK	SPIL	VL	CT	SCT	DET	YEL	RLQ	DL	LYG	OMILL	ILTKS	V	232																																											
ASHBYA	143	MGTAH	-----	TLN	YFEL	GGPR	ERL	RTITTYDA	HGVL	QRF	FLRK	KHV	LLAM	TTR	NEA	EAL	LOQ	QD	LLY	SYL	VSS	SL	LRQ	220																																											
		330	340	350	360	370	380	390	400																																																										
DM	214	TKIFE	-----	RRKN	FDLRL	LLSG	SERL	FYNLLAN	DSSSAK	VSN	NI	FTL	NS	IR	VE	PLPT	THRS	QITS	AI	QSN	C	-----	SKIK	N	287																																										
MON1A	188	SHIFQ	-----	QKQ	N	DLRL	LLSG	SERIT	DNLL	QL	-----	MARDP	-----	SFLM	GAA	RCPL	AA	AV	RD	TV	SAS	LQ	-----	ARAR	S	252																																									
MON1B	207	ARTEA	-----	HKQ	N	DLRL	LLAG	SERIT	DLRL	LS	-----	MEQDP	-----	GAIL	GAV	RCV	PLAR	PL	DAL	GALL	RR	-----	CTAP	G	272																																										
SAND1	144	ENVY	KKKG	GD	N	DLR	LLR	GTDR	LID	SSIS	-----	WRASP	-----	IN	LV	DSS	IS	AI	PN	PS	DRE	FL	ST	TMAS	CLG	-----	AAKLD	G	214																																						
Mon1p	282	LR	LF	S	-----	KREN	FDL	RNYL	ESTD	FENL	DEICS	-----	LICN	RM	FP	DL	LN	SL	QCLP	FNH	SSRL	KL	Q	NV	VLQ	QLE	RQD	TP	RG	356																																					
ARAB	277	DR	FE	-----	KNA	KFDM	TELL	GGTD	AV	FSS	LVHS	-----	FSWN	PA	TFLH	-----	AYT	CL	PL	PA	LR	QAT	TI	LO	-----	VCAS	G	341																																							
ORYZA	233	NRO	FE	-----	KNP	KFDM	TELL	GGTD	AV	FSS	LVHS	-----	FSWN	PA	TFLH	-----	AYT	CL	PL	PA	LR	QAT	TI	LO	-----	VCAS	G	341																																							
ASHBYA	221	SRL	FE	-----	ERAN	FDL	RS	IT	ESD	FNH	LD	QLCR	-----	AMCD	G	THL	GW	TL	GA	LC	IT	L	KH	S	V	R	Q	R	INS	IM	LRAT	-----	RG	LAV	G	291																															
		410	420	430	440	450	460	470	480																																																										
DM	288	LVFA	VL	IAN	-----	NKLI	AL	V	RMK	-----	KYSI	H	P	AD	L	R	L	I	F	N	L	V	E	G	S	E	S	F	K	S	S	-----	ENW	S	P	I	C	L	P	K	F	D	M	N	G	Y	L	H	A	V	S	Y	L	A	D	C	Q	360									
MON1A	253	LV	ES	IL	AR	-----	NQ	L	VAL	VRRK	-----	DQ	FL	H	P	I	D	L	L	E	N	L	I	S	S	S	S	S	S	S	S	-----	EAW	T	P	V	C	L	P	K	F	N	A	A	G	F	T	H	A	I	S	Y	L	E	H	D	T	325									
MON1B	273	LAL	SV	L	AVG	-----	GRL	IT	AAQ	ERN	VLAE	CR	L	P	AD	L	Q	L	L	D	WV	G	-----	APAF	AA	G	-----	EAW	T	P	V	C	L	P	R	F	N	D	G	E	F	Y	A	V	A	R	L	D	-----	AMP	347																
SAND1	215	ALF	S	I	M	I	AR	-----	ROI	AA	M	VREK	-----	KYMI	H	P	R	D	L	N	I	V	I	N	L	V	S	D	N	T	L	Q	D	S	-----	ONW	P	I	C	L	P	R	F	N	D	T	G	E	F	Y	A	I	S	Y	P	W	C	N	K	E	287						
Mon1p	357	LLY	G	L	I	A	P	Q	N	K	L	CC	V	I	R	P	R	-----	GHTL	H	T	D	L	L	L	E	Q	L	I	S	H	Q	F	Q	N	L	D	E	T	Q	E	L	W	P	I	C	P	K	F	N	S	S	G	F	L	Y	C	Y	K	F	L	P	N	D	T	H	432
ARAB	342	VLF	S	L	M	CR	-----	HK	V	V	S	L	AG	AO	-----	KASL	H	P	D	D	L	L	L	E	N	F	V	M	S	S	E	S	F	R	T	S	-----	ESF	S	P	I	C	L	P	R	Y	N	A	Q	A	F	L	H	A	V	V	F	F	E	D	D	T	Y	414			
ORYZA	298	VLF	S	L	M	CR	-----	HK	V	V	S	L	AG	AO	-----	KATL	H	P	D	D	L	L	L	E	N	F	V	M	S	S	E	S	F	R	T	S	-----	ESF	S	P	I	C	L	P	R	Y	N	A	Q	A	F	L	H	A	V	V	F	F	E	D	D	T	Y	370			
ASHBYA	292	LLY	G	M	I	V	A	P	D	H	L	V	S	V	R	P	K	-----	GHTL	H	T	D	L	L	L	E	N	F	V	M	S	S	E	S	F	R	T	S	-----	QEL	W	P	I	C	P	K	F	N	S	S	G	F	L	Y	C	Y	K	F	L	P	N	D	T	H	367		
		490	500	510	520	530	540	550	560																																																										
DM	361	ACL	-----	-----	LL	S	V	D	R	D	A	F	E	T	L	A	E	A	K	A	K	I	E	K	L	R	K	-----	SH	C	L	E	A	I	N	E	E	L	Q	P	-----	-----	403																								
MON1A	326	LCL	-----	-----	LL	V	S	T	D	R	E	D	F	E	A	V	S	D	C	R	R	R	E	Q	E	R	L	R	K	-----	RG	A	H	L	A	L	R	E	A	L	R	-----	-----	366																							
MON1B	348	VCL	-----	-----	LL	G	T	O	R	E	A	F	H	A	M	A	C	R	R	L	V	E	D	G	M	H	A	-----	L	G	A	M	R	A	L	G	E	A	S	F	S	N	A	-----	-----	392																					
SAND1	288	QDIP	-----	-----	V	C	I	V	L	L	S	V	K	R	D	F	D	G	L	K	E	V	R	Q	I	V	T	K	L	E	N	N	Q	K	F	F	V	N	F	A	Q	A	M	K	T	P	N	-----	-----	336																	
Mon1p	433	SNE	-----	-----	K	S	A	L	V	L	S	A	Q	R	D	A	F	S	L	K	S	F	S	D	E	L	I	I	K	L	E	E	-----	E	K	L	L	K	I	N	T	S	K	G	-----	-----	477																				
ARAB	415	VIL	-----	-----	L	T	R	S	-----	D	A	F	H	L	K	D	C	R	V	R	L	E	A	V	L	L	K	-----	S	N	I	L	S	V	V	Q	R	S	I	A	E	G	G	M	R	V	E	D	V	I	D	R	R	R	S	S	T	-----	473								
ORYZA	371	LIT	-----	-----	L	T	A	R	S	-----	D	A	F	Y	D	L	K	D	S	R	S	R	T	Q	N	V	L	L	K	-----	A	N	V	L	E	V	Q	R	S	L	R	E	S	A	L	R	I	E	D	L	P	A	D	P	S	S	Q	S	V	S	P	P	P	Q	432		
ASHBYA	368	SAS	N	E	T	T	L	E	G	N	M	H	I	K	P	T	L	I	L	S	P	K	S	S	F	Y	D	L	H	T	-----	C	A	S	E	L	D	L	N	A	V	-----	A	G	I	M	P	H	I	T	A	P	S	R	-----	423											

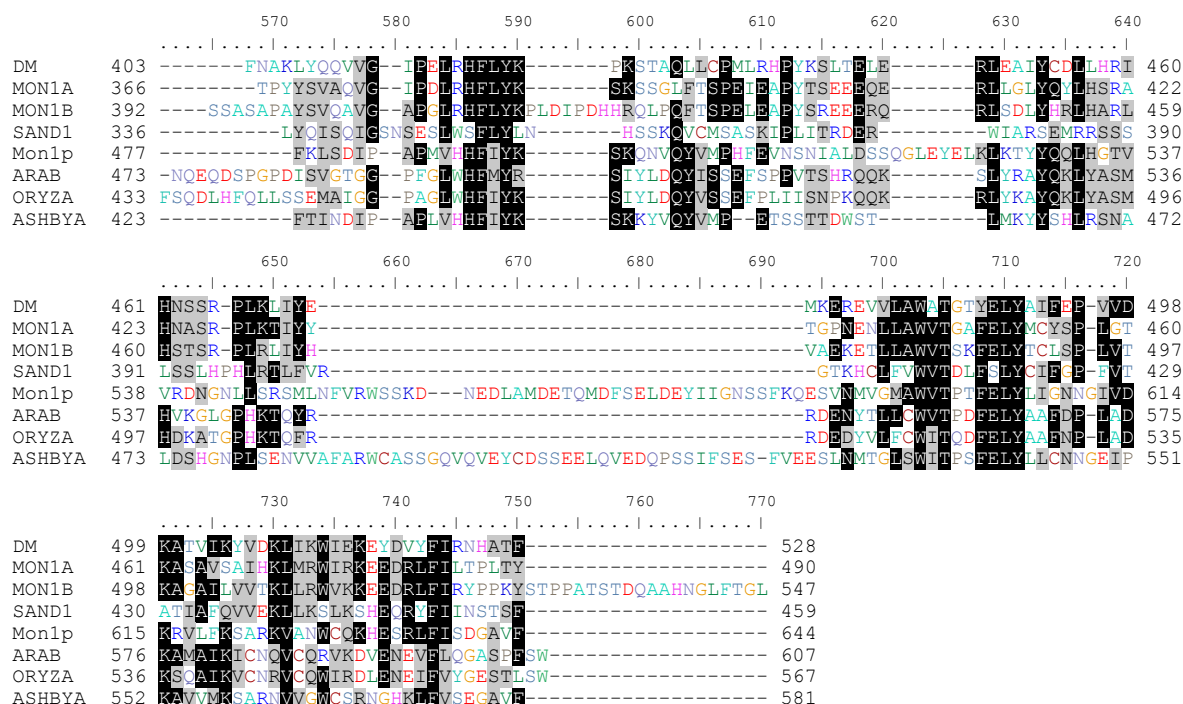


Abb.2.29: Sequenzvergleich von Mon1-Orthologen. Die Sequenzen wurden mit der Software MEGA verglichen. Bei einer Übereinstimmung (Consensus) von 50% und mehr wurden die jeweiligen Aminosäuren schwarz unterlegt, bei niedrigerem Übereinstimmungsgrad (keine Identität aber ähnliche Aminosäuren) sind die jeweiligen Aminosäuren in leichten Blau unterlegt. Der Sequenzvergleich zwischen Humanen (Mon1A und Mon1B), *C. elegans* (Sand1), *S. cerevisiae* (Mon1p), Schimmelpilz (*A. gossypii*-ASHBYA), Pflanzen (*A. thaliana*-ARAB; *O. sativa* -ORYZA) und *D. melanogaster* (DM) zeigt stark konservierte Bereiche auf.

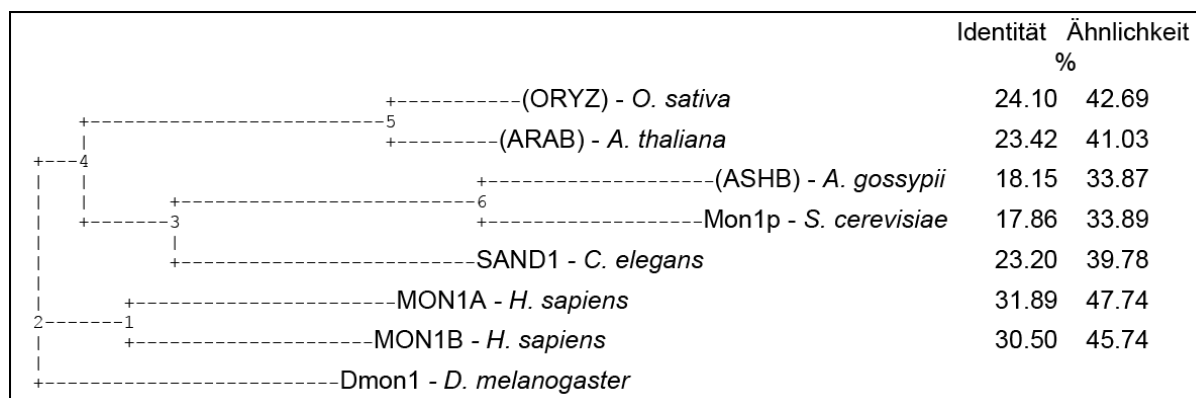


Abb.2.30: Phylogenetischer Baum ausgewählter Mon1-Orthologe. In Vertebraten sind zwei Orthologe, Mon1a und Mon1b, bekannt. Phylogenetischer Baum wurde erstellt mit der Funktion ProML Protein Maximum Likelihood in dem Programm Bioedit. Identität und Ähnlichkeit der Sequenzen wurden anhand des Alignments mit dem Internetdienst "Sequence Manipulation Site" (http://www.bioinformatics.org/sms2/ident_sim.html) erstellt.

2.8. Die Expression von Mon1p aus der Hefe kann den Ausfallphänotyp von *Dmon1* nicht retten

Der Sequenzvergleich zwischen den verschiedenen Organismen zeigt, dass Mon1 hoch konserviert ist. Um herauszufinden, ob auch die Funktion von Mon1 in den verschiedenen Organismen konserviert ist, wurde *mon1p* aus der Hefe in *Drosophila* eingeführt um festzustellen ob Mon1p den Ausfallphänotyp von *Dmon1* in *Drosophila* aufheben kann. Dafür wurde die kodierende Sequenz von *mon1p*, welche von der Arbeitsgruppe Christian Ungermann (Mirjana Nordmann) zur Verfügung gestellt wurde, mit HA markiert und in den *pUASTattB* Vektor kloniert. Anschließend wurde *pUASTattB-mon1p* als Transgen gezielt auf den gleichen Locus auf dem rechten Arm des dritten Chromosoms von *Drosophila* eingeführt worden, auf welchen vorher auch die *Dmon1* und *Dmon1*-HA-Konstrukte. Damit sollte gewährleistet werden, dass Mon1p in gleicher Stärke wie die rettenden *Dmon1*-Konstrukte exprimiert wird. Somit wurde die transgene Fliegenlinie *attP-86Fb-UAS-mon1p*-HA erzeugt. Durch Kreuzung mit dem *mut4*-Stamm ist hierbei auch ein Stamm erzeugt worden, der auf dem zweiten Chromosom die *mut4*-Mutation und auf dem dritten Chromosom das eingeführte UAS-Transgen trug.

Die Expression von Mon1p auf der posterioren Seite der *Dmon1^{mut4}*-mutanten Flügelimaginalscheiben zeigte allerdings keine Rettung des Vesikel-Phänotyps (Abb.2.31). Ferner erscheint die Expression von Mon1p-HA trotz gleicher Insertionsstellen der Transgene viel schwächer und hat keine klare Lokalisation in der Zelle verglichen mit *Dmon1*-HA (Abb.2.32).

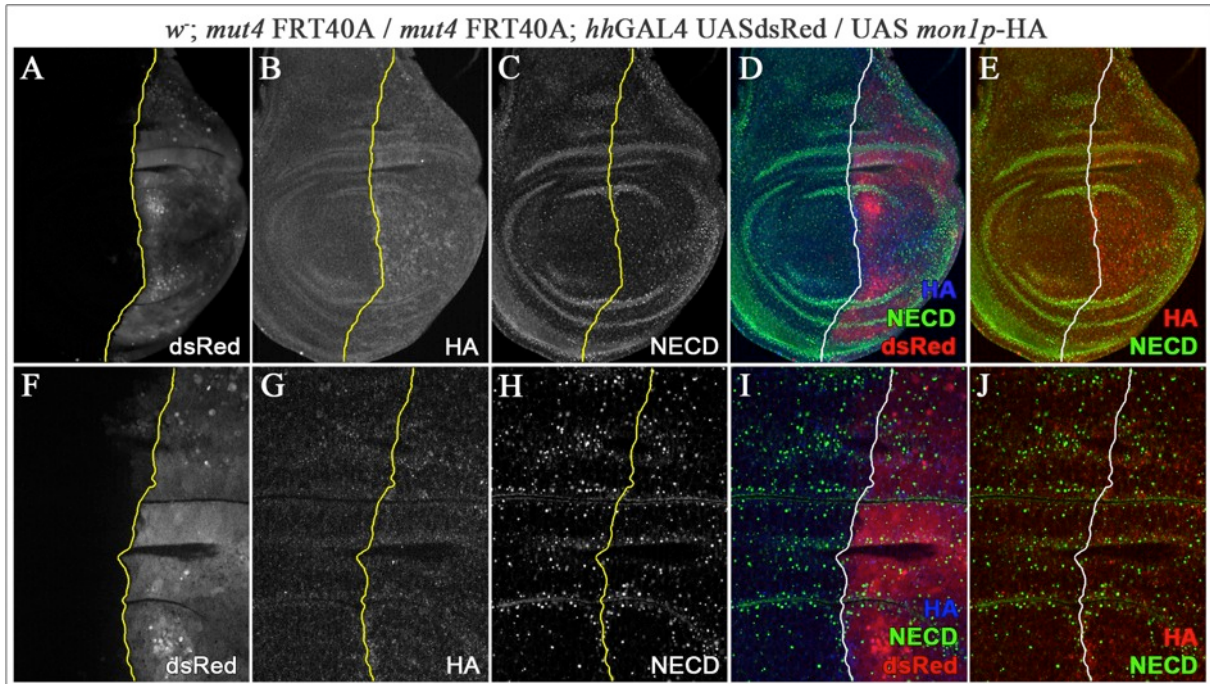


Abb.2.31: Die Expression von Mon1p rettet nicht den Ausfallphänotyp von *Dmon1*. Mon1p-HA (B, D, E, G, I, J) wurde auf der posterioren Seite der Flügelimaginalscheiben (markiert durch die Expression von dsRed in A, D, F, I) exprimiert. Der Ausfallphänotyp von *Dmon1*, vergrößerte Notch-enthaltende Endosomen, dargestellt durch eine NECD Antikörperfärbung (C, D, E, H, I, J) kann nicht gerettet werden.

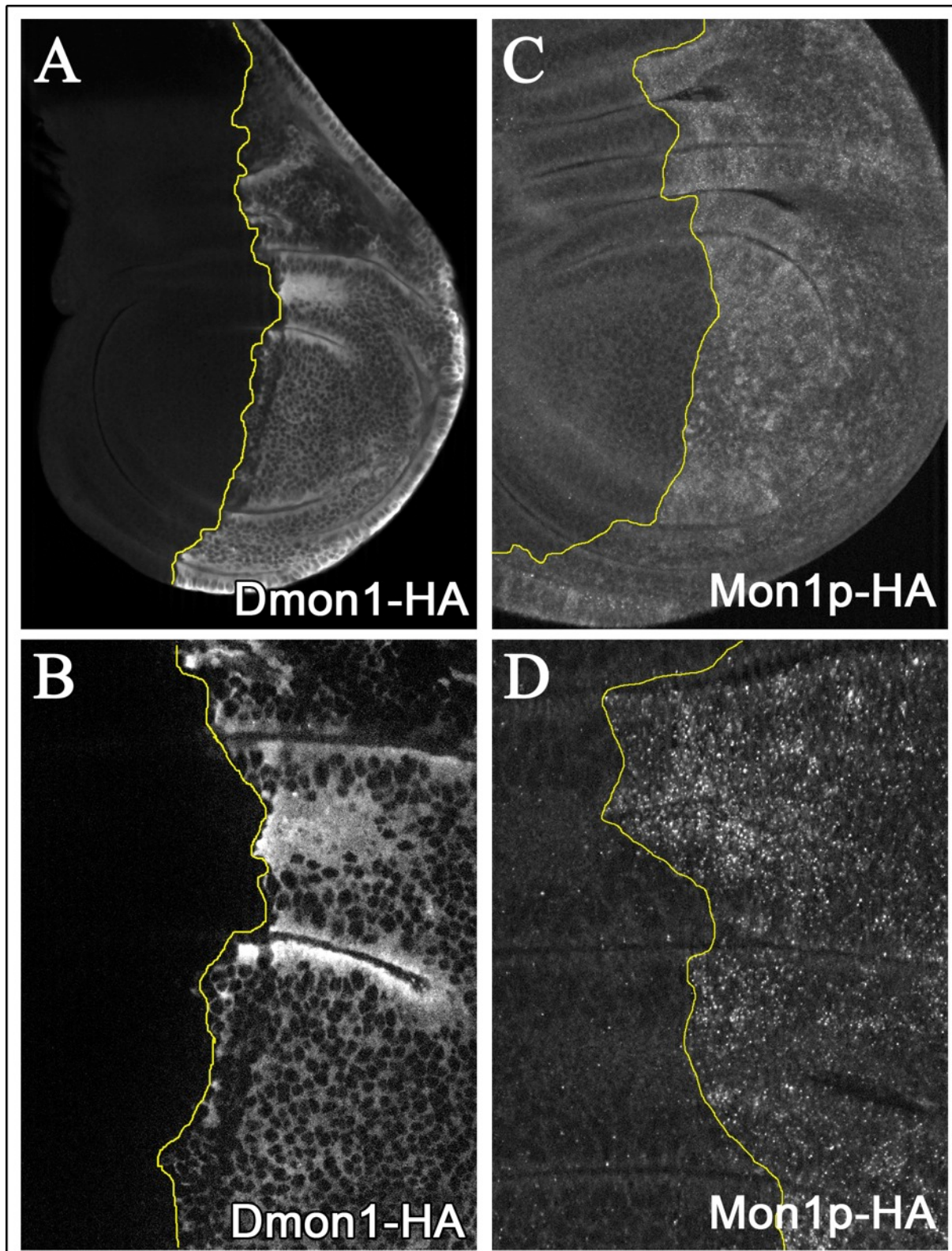


Abb.2.32: Mon1p zeigt keine ausgeprägte Expression in *Drosophila*. Bei Expression von Dmon1 ist deutlich die Expression und eine klare zytoplasmatische Lokalisation des Proteins zu beobachten (A, B). Im Gegensatz dazu zeigt Mon1p lediglich eine Expression knapp oberhalb des Hintergrundes (C, D).

2.9. Dmon1 scheint in *Drosophila melanogaster* mit Dccz1 zu interagieren

2.9.1. Expression von *Dccz1*-RNAi zeigt ähnlichen Phänotyp wie die *Dmon1*^{mut4}-Mutation

Aus Untersuchungen in der Hefe, *S. cerevisiae*, war bekannt, dass Mon1p zusammen mit dem Protein Ccz1p einen Komplex für die Erfüllung seiner Funktion bildet (Wang *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2003). Mon1p und Ccz1p interagieren dabei über deren Longin-Domänen (Nordmann *et al.*, 2010). Der Ausfall dieser beiden Proteine führt zur stark fragmentierten Vakuolen (Hefe-Äquivalent der Lysosomen), was auf die Fehlfunktion des Transports neu synthetisierter Proteine zu den Vakuolen zurückzuführen ist (Wang *et al.*, 2002).

Das Ccz1p-Homolog aus der Hefe wird in *Drosophila* von der Transkriptionseinheit CG14980 kodiert, welche auf dem linken Arm des dritten Chromosoms (3L) lokalisiert ist.

Um die Frage zu beantworten, ob Dccz1 und Dmon1 auch in *Drosophila* interagieren, wurde zuerst der Ausfall-Phänotyp von *Dccz1* in der Flügelimaginalscheibe von *Drosophila* untersucht. Hierfür wurde *Dccz1*-RNAi mittels des UAS/GAL4-Systems mit der Treiberlinie *ptc*-GAL4 entlang der antero-posterioren Achse in der Flügelimaginalscheibe exprimiert. Ähnlich wie bei dem Ausfall von *Dmon1* (in *Dmon1*^{mut4}-mutanten Zellklonen und *Dmon1*-RNAi-Expression in Abb.2.23) sind vergrößerte, Notch-enthaltende Vesikel in der *ptc*-Expressionsdomäne zu beobachten (Abb.2.33). Diese Vesikel sind mit Rab4 (Abb.2.33-H) und Rab5 assoziiert (Abb.2.33-D). Es konnte aber auch hier keine Assoziation mit Rab7 festgestellt werden (Abb.2.33-L). Zudem war die Lokalisation von Rab7 in dem Bereich der *Dccz1*-RNAi-Expression zytoplasmatisch und nicht mehr assoziiert mit Endosomen (Abb.2.33-K). Diese Beobachtungen ähneln sehr stark dem Phänotyp eines *Dmon1*-Ausfalls (*Dmon1*^{mut4}-mutante Zellklone und *Dmon1*-RNAi in Abb.2.23).

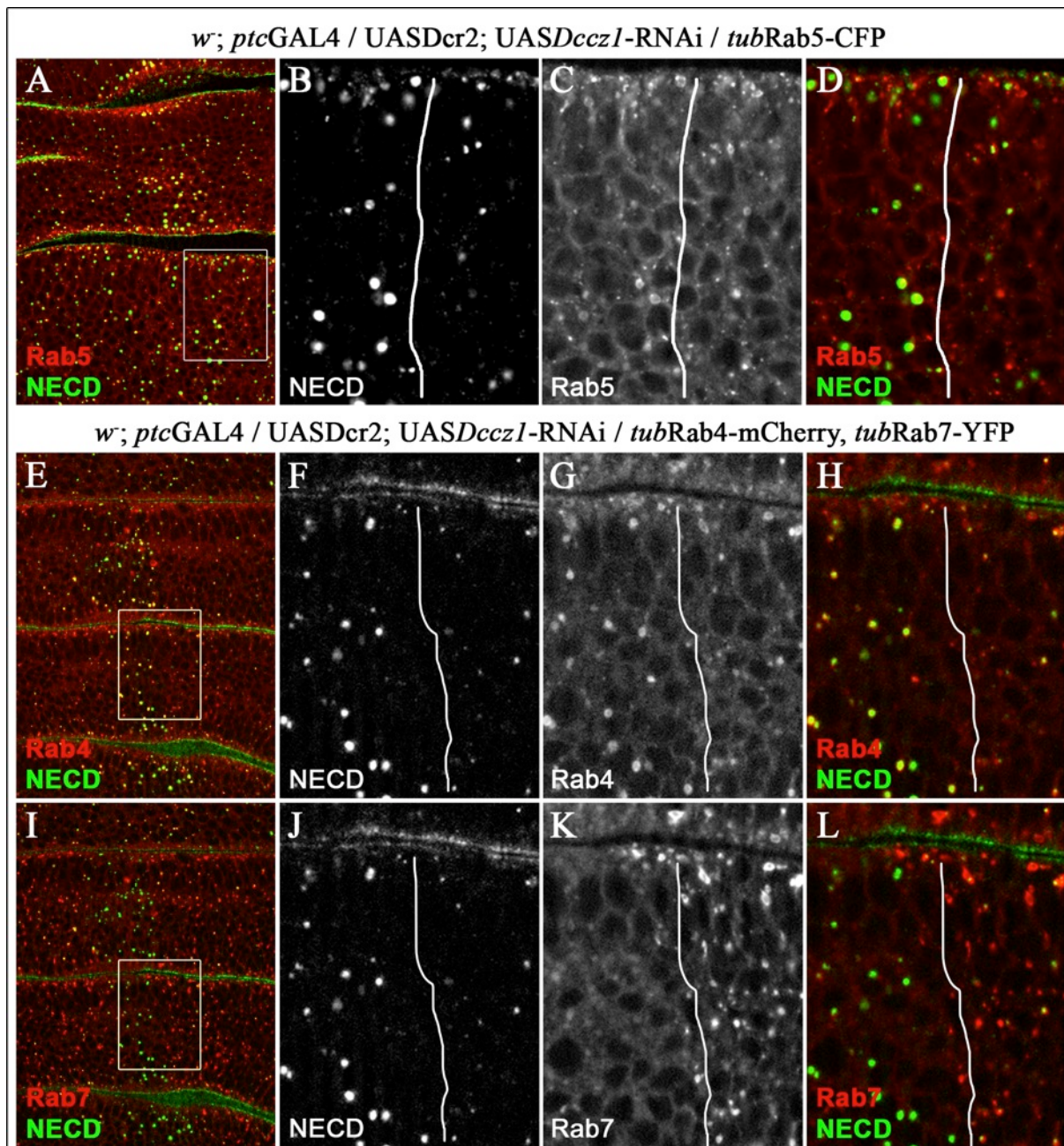


Abb.2.33: *Dccz1*-RNAi Expression zeigt den gleichen Phänotyp wie der Ausfall von *Dmon1*. Durch die Expression einer *Dccz1*-RNAi entlang des *ptc*-Streifens entstehen vergrößerte, Notch-enhaltende Vesikel (B, D, F, H, J, L) die kolokalisiert sind mit Rab5 und Rab4 (A, D, E, H) aber nicht mit Rab7 (I, L). Dazu ist die Lokalisation von Rab7 verändert, nämlich zytoplasmatisch statt assoziiert mit Endosomen (K). Die subzelluläre Verteilung von Rab5 und Rab4 ist im Gegensatz zu Rab7 unverändert (C, G).

Auch auf der elektronenmikroskopischen Ebene ähnelt der Phänotyp des *Dccz1*-Ausfalls dem von *Dmon1*. Die Aufnahmen von Flügelimaginalscheiben in denen *Dccz1*-RNAi mittels der Treiberlinie *hh*-GAL4 in dem posterioren Kompartiment exprimiert ist, zeigen ebenfalls im mutanten Bereich vergrößerte MVBs, die mit ILVs gefüllt sind (siehe Abschnitt „Quantitative Analyse des Vesikel-Phänotyps bei beeinträchtigter *Dmon1/Dccz1*“).

2.9.2. Expression von Dccz1-EOS rettet nicht den Ausfallphänotyp von *Dmon1*

Um weitere Hinweise bezüglich der Interaktion zwischen *Dmon1* und *Dccz1* in *Drosophila* zu gewinnen, wurde in Rahmen dieser Arbeit ein EOS-markiertes *Dccz1*-Konstrukt hergestellt. Die EOS-Markierung wurde hierbei am C-Terminus von *Dccz1* eingefügt. *Dccz1*-EOS wurde in *pUASTattB* kloniert und als Transgen gezielt einmal auf das zweite und einmal auf das dritte Chromosom von *Drosophila* eingeführt.

Ein weiterer Hinweis darauf, dass *Dmon1* und *Dccz1* zusammen in einem Komplex funktionieren, ist die misslungene Rettung des Ausfallphänotyps von *Dmon1* durch die Expression von *Dccz1* (Abb.2.34). *Dccz1* zeigt beim Ausfall den gleichen Phänotyp wie *Dmon1* ist aber nicht in der Lage ein Fehlen der *Dmon1*-Funktion auszugleichen. Das wurde gezeigt, indem die Expression von *Dmon1* durch *Dmon1*-RNAi auf der posterioren Seite der Flügelimaginalscheibe ausgeschaltet, bzw. runterreguliert wurde. Der hierdurch entstandene Vesikel-Phänotyp des *Dmon1*-Ausfalls konnte nicht durch die gleichzeitige Expression von markiertem *Dccz1*-EOS im gleichen Kompartiment gerettet werden. Auch umgekehrt konnte die Expression von *Dmon1*-HA nicht den mittels Expression von *Dccz1*-RNAi erzeugten Ausfall von *Dccz1* und den dadurch verursachten Vesikel-Phänotyp retten (Abb.2.35). Das könnte darauf hindeuten, dass diese beiden Proteine zusammen als ein Komplex arbeiten und somit die Anwesenheit beider Proteine notwendig ist, so dass das Fehlen von einem nicht durch Überexpression des anderen behoben werden kann.

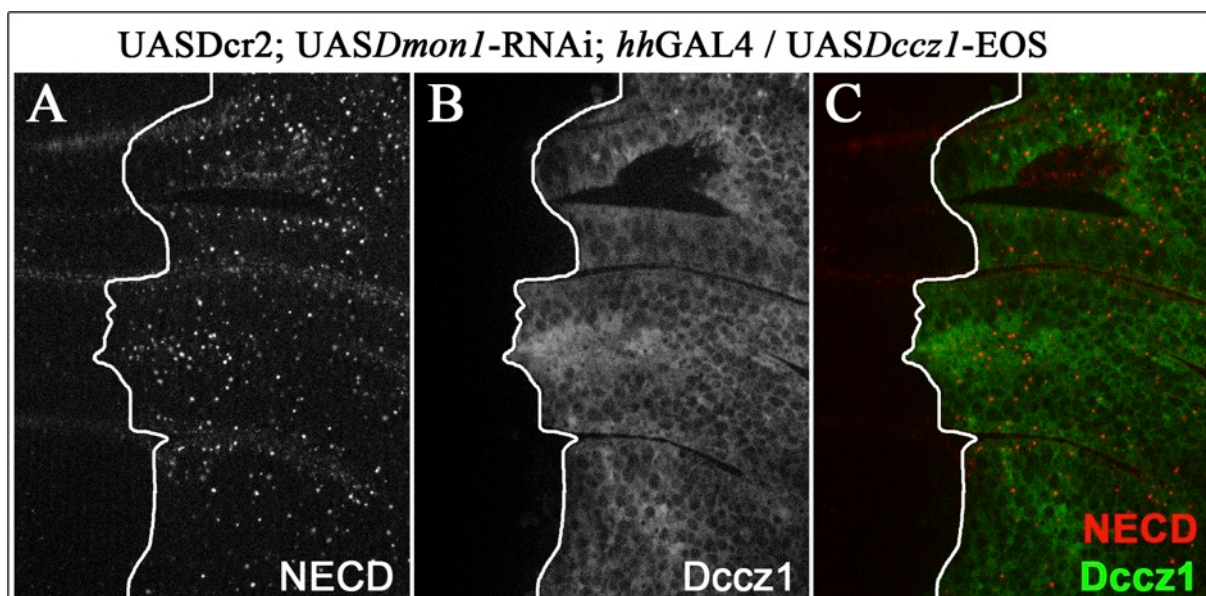


Abb.2.34: Überexpression von *Dccz1*-EOS rettet nicht den Ausfallphänotyp von *Dmon1*. Durch die Expression von *Dmon1*-RNAi auf der posterioren Seite der Flügelimaginalscheibe mittels *hhGAL4* entstehen vergrößerte, Notch-enthaltende Endosomen (A, C). Die Expression von *Dccz1*-EOS (B, C) kann diesen Vesikel-Phänotyp des *Dmon1*-Ausfalls nicht retten.

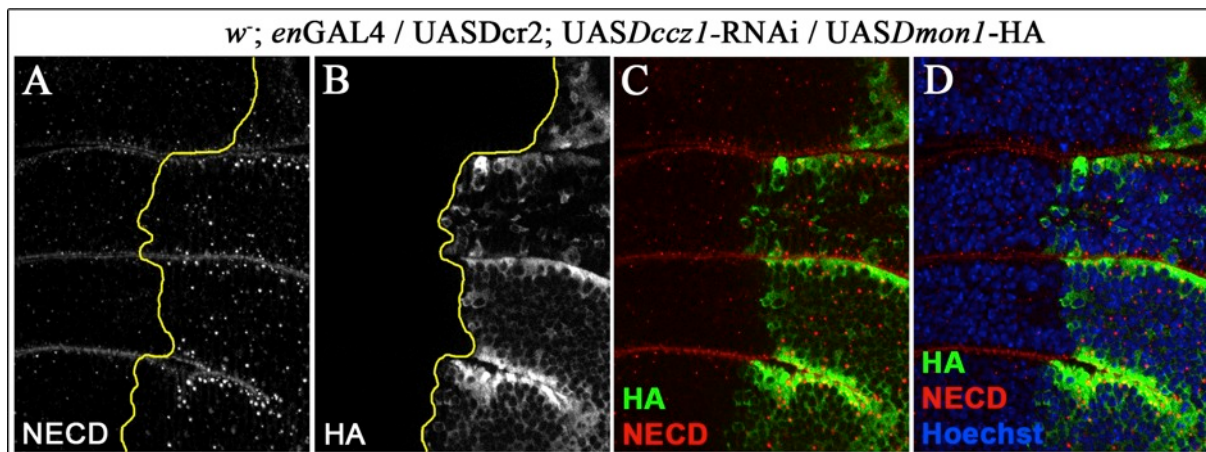


Abb.2.35: Überexpression von Dmon1-HA kann nicht den Ausfallphänotyp von *Dccz1* retten. Durch die Expression einer *Dccz1*-RNAi auf der posterioren Seite der Flügelimaginalscheibe mittels *hhGAL4* entstehen vergrößerte, Notch-enthaltende Endosomen (A, C). Die Expression von Dmon1-HA (B, C) kann diesen Vesikel-Phänotyp des *Dccz1*-Ausfalls nicht retten.

2.9.3. Die Koexpression von Dmon1 und Dccz1 führt zu Entstehung Notch-enthaltender Vesikel und einer Veränderung der Lokalisation von Rab5 und Rab7

Zur weiteren Bestätigung der Interaktion zwischen Dmon1 und Dccz1 wurde Dccz1 zusammen mit Dmon1 überexprimiert. Die Überexpression von Dmon1 alleine zeigte dabei keinen Einfluss auf die Verteilung der Notch-Vesikel, oder der Marker Rab5 und Rab7 (Abb.2.36). Auch die Überexpression von Dccz1 alleine beeinflusste nicht die Verteilung der Notch-Vesikel (Abb.2.37).

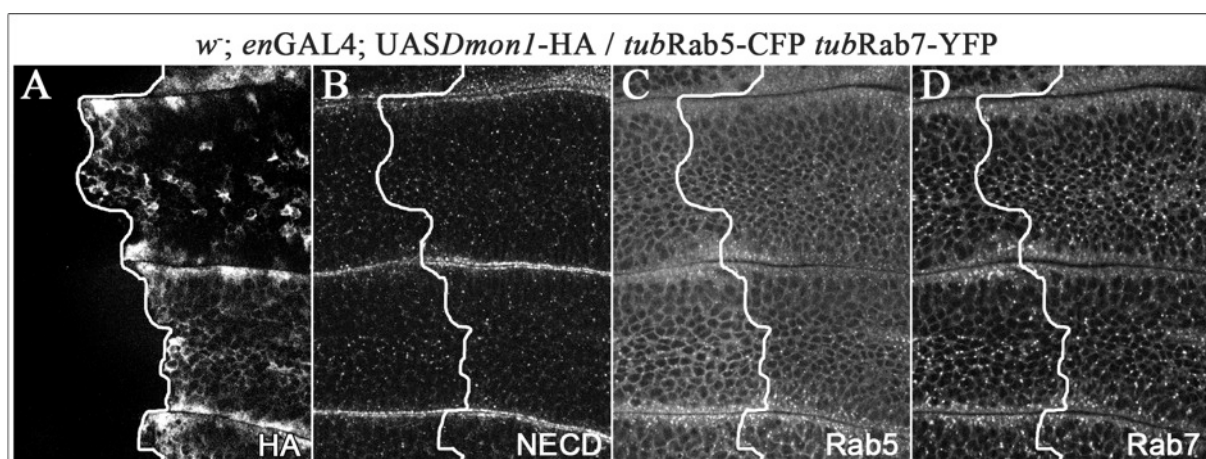


Abb.2.36: Überexpression von Dmon1 hat keinen Einfluss auf den endosomalen Transportweg. Die Überexpression von Dmon1-HA (A), auf der posterioren Seite der Flügelimaginalscheibe, hat keinen Einfluss auf die Verteilung von Notch (B), Rab5 (C) und Rab7 (D).

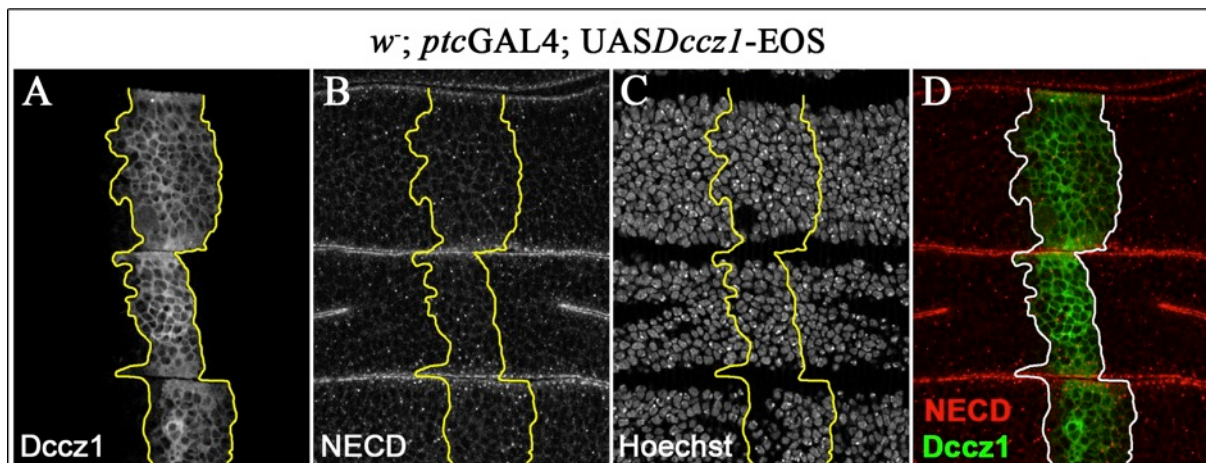


Abb.2.37: Überexpression von Dccz1 hat keinen Einfluss auf die Verteilung von Notch. Dccz1 wurde entlang der antero-posterioren Achse der Flügelimaginalscheibe (A, D) überexprimiert. Die Flügelimaginalscheiben wurden gegen die extrazelluläre Domäne des Notch-Rezeptors gefärbt (NECD; B, D). Zellkerne sind durch die Hoechst-Färbung (C) markiert.

Im Gegensatz zur Überexpression der jeweiligen Proteine alleine führt die gleichzeitige Überexpression beider Proteine durch *enGAL4* auf der posterioren Seite der Flügelimaginalscheibe zur Entstehung vergrößerter, Notch-enthaltender Vesikel (Abb.2.38-A-C). Eine quantitative Auswertung der Größenveränderung der Vesikel bei der Überexpression beider Proteine ist im nachfolgendem Kapitel präsentiert.

Auch die Verteilung von Rab5 und Rab7 veränderte sich durch die gleichzeitige Überexpression beider Proteine (Abb.2.38). Hierbei konnte eine Akkumulation von Rab5 auf der posterioren Seite an den Vesikeln beobachtet werden im Vergleich zu den wildtypischen Zellen auf der anterioren Seite (Abb.2.38-E, F), während Rab7 verstärkt apikal lokalisiert ist. Vergleichbare Rab7-Vesikel, die sich auf der anterioren Seite auch in der Mitte der Zelle befinden, sind auf der posterioren Seite selten oder gar nicht zu beobachten (Abb.2.38-H, I).

Die Tatsache, dass die Überexpression von Dmon1 oder Dccz1 alleine keinen Effekt aufweist, aber die Überexpression beider Proteine zur Vergrößerung der Notch-enthaltenden Vesikel und zu einer Veränderung der Lokalisation von Rab5 und Rab7 führt, ist ein weiterer Hinweis darauf, dass die beiden Proteine, Dmon1 und Dccz1, auch in *Drosophila* miteinander interagieren und hierdurch ihre Funktion erfüllen.

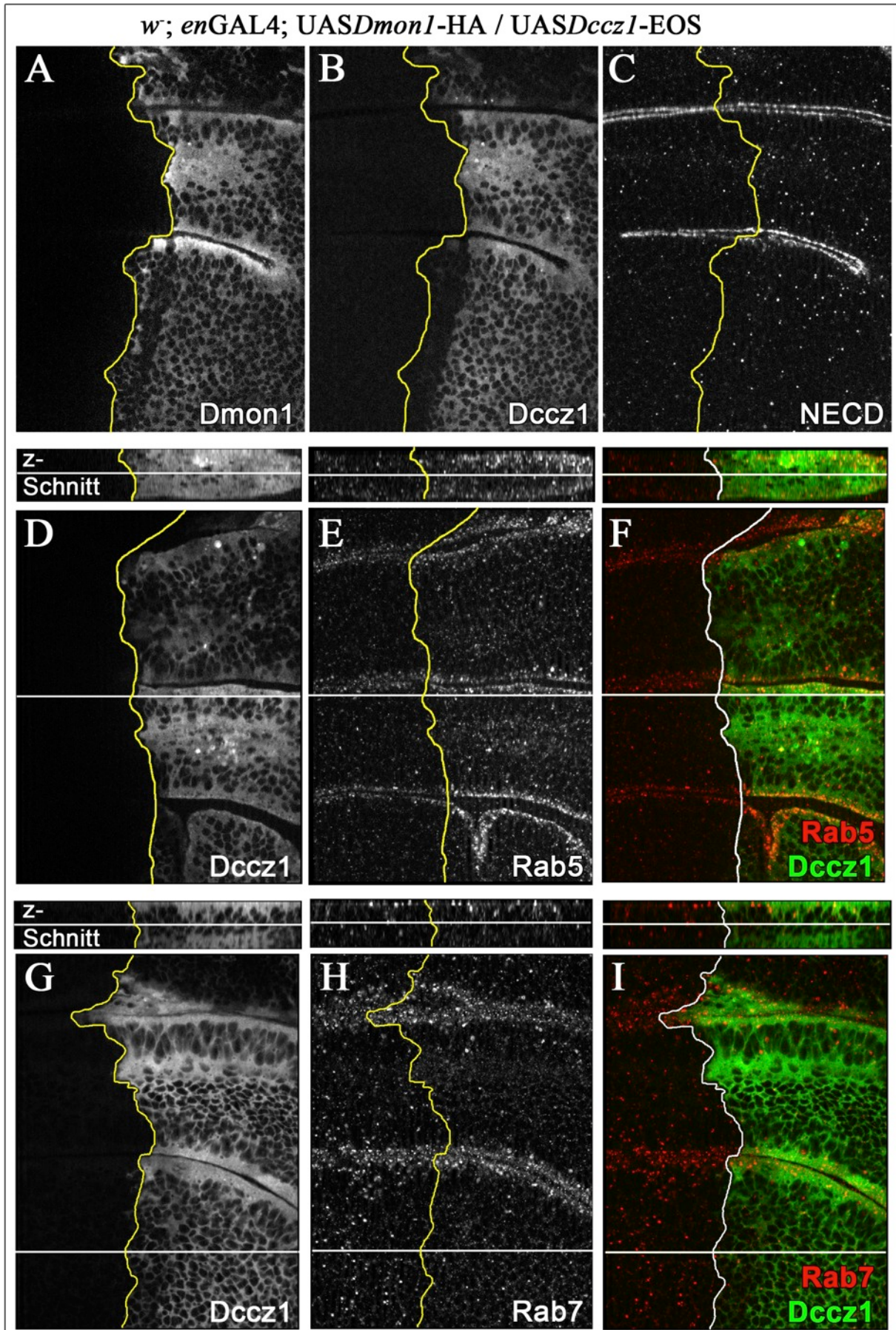


Abb.2.38: Gleichzeitige Überexpression von Dmon1 und Dccz1 beeinflusst den endosomalen Transportweg. Die Überexpression von Dmon1-HA und Dccz1-EOS (A, D, G) zusammen auf der posterioren Seite der Flügelimaginalscheibe führt zur Entstehung vergrößerter Notch-enhaltender

Vesikel (C). Dazu verändert sich die Lokalisation von Rab5 (E, F) und Rab7 (H, I). Dargestellt sind optische Schnitte der Flügelimaginalscheiben in Draufsicht (A-I). Über den Abb. D-I sind jeweils dazugehörige optische Querschnitte durch die Scheiben gezeigt. Die weißen Linien in den großen Draufsichten zeigen die Stellen an, an denen die Querschnitte erzeugt wurden. Ähnlich zeigen die weißen Linien in den Querschnitten die Z-Lage der Draufsichtsbilder in dem gesamten aufgenommenen Bilderstapel.

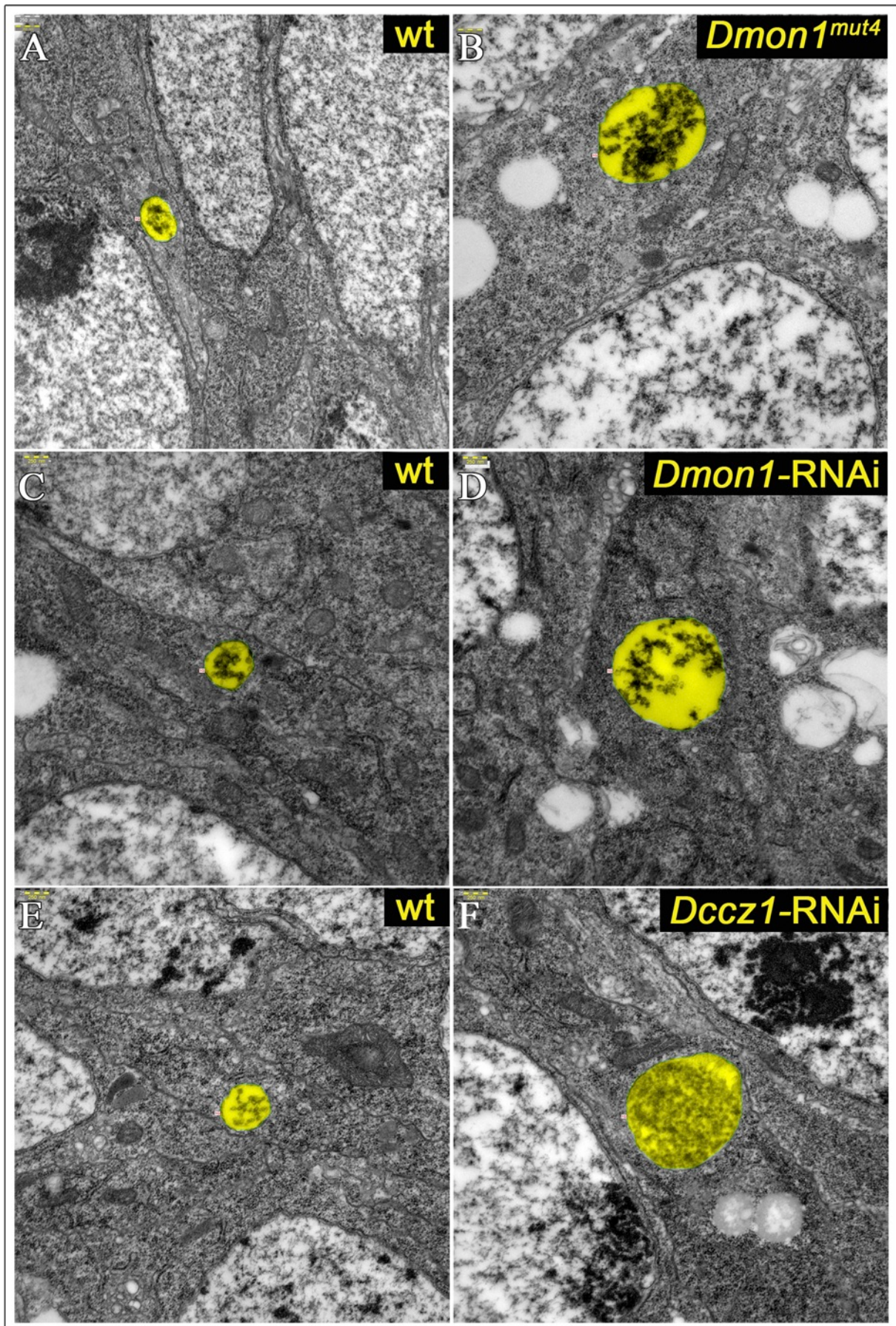
2.10. Quantitative Analyse des Vesikel-Phänotyps bei beeinträchtigter *Dmon1/Dccz1* Funktion

Der Ausfall von *Dmon1* oder von *Dccz1* führt zur Entstehung vergrößerter Notch-enthaltender Vesikel. Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen, dass es sich dabei um MVBs handelt, bei denen allem Anschein nach auch die ESCRT-abhängige ILV-Bildung stattfindet (Abb.2.18-C und Abb. 2.39a). Dabei sind die MVBs in den mutanten Zellen enorm vergrößert.

Um zu quantifizieren, wie stark diese Vergrößerung ist, wurde der Umfang und die Fläche der MVBs in *Dmon1^{mut4}*-mutanten und wildtypischen Flügelimaginalscheiben gemessen. Daneben wurden auch die Vesikelgrößen unter Expression von *Dmon1*-RNAi mittels UAS/GAL4-Systems untersucht. Dieses Experiment zeigt das gleiche Ergebnis, nämlich erhöhtes Vorhandensein von vergrößerten MVBs in der Expressionsdomäne des mittels *hhGAL4* exprimierten *Dmon1*-RNAi-Konstrukts, auf der posterioren Seite der Flügelimaginalscheibe (Abb.2.39a). Da eine RNAi-Expression häufig nicht zum vollständigen Ausschalten der Genfunktion führt war hierbei eventuell zu erwarten, dass die Quantifizierung eine etwas schwächere Größenzunahme aufzeigt, als in *Dmon1^{mut4}*-mutanten Zellen.

Das gleiche Experiment wurde auch für *Dccz1* durchgeführt. UAS-*Dccz1*-RNAi wurde auf der posterioren Seite der Flügelimaginalscheibe durch *hhGAL4* exprimiert. Wie schon oben beschrieben, konnten hierbei vergleichsweise zur anterioren Seite vergrößerte MVBs in dem Expressionsbereich der *Dccz1*-RNAi beobachtet werden (Abb.2.39a).

Bei der Quantifizierung wurden Umfang und Fläche der MVBs von *mut4*-mutanten, wildtypischen, *mon1*- und *ccz1*-RNAi exprimierenden Zellen analysiert, gemessen und statistisch ausgewertet (Abb.2.39a-G, H). Die Ergebnisse der Messungen sind in Abb.2.39a und in Tabelle 1a dargestellt.



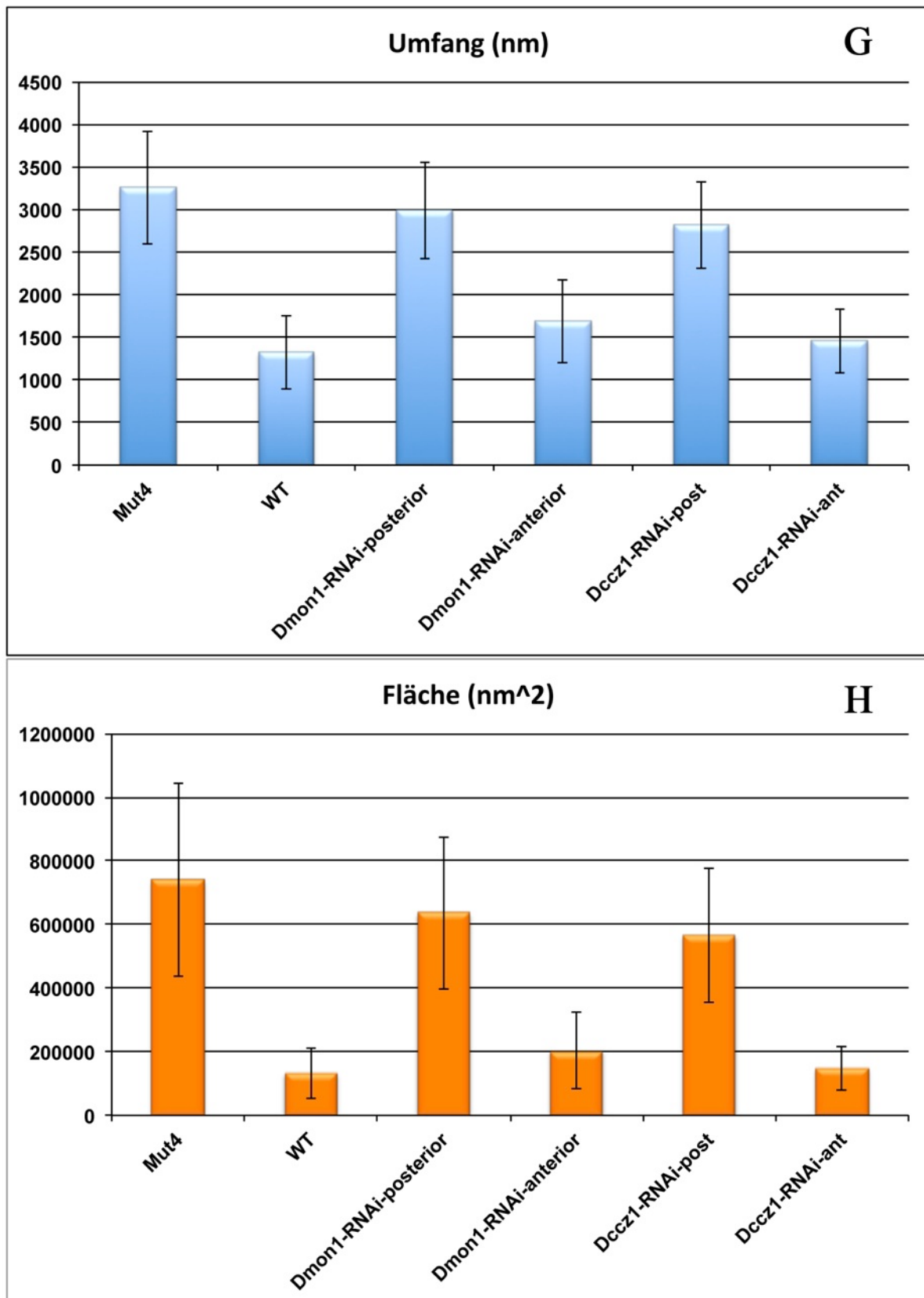


Abb.2.39a: Größenvergleich und statistische Auswertung des Umfangs und der Fläche der MVBs (A-F): im Vergleich zu wildtypischen Zellen (A, C, E) sind in den *Dmon1^{mut4}*-mutanten (B) bzw. in *Dmon1*-RNAi (D) oder *Dccz1*-RNAi (F) exprimierenden Zellen vergrößerte MVBs zu beobachten. Der Umfang (G) und die Fläche (H) der MVBs wurden gemessen und statistisch ausgewertet. Alle beobachteten Größenunterschiede sind statistisch signifikant mit $p < 0,001$.

Zellen	Umfang [nm]	StAbw.	Fläche [nm ²]	StAbw	Anzahl n
<i>Dmon1</i> ^{mut4}	3261	664	739300	303724	33
wt	1321	427	132318	78633	32
<i>Dmon1</i> -RNAi posteriorer Bereich	2991	567	635488	238150	26
<i>Dmon1</i> -RNAi anteriorer Bereich	1685	483	203197	119084	22
<i>Dccz1</i> -RNAi posteriorer Bereich	2822	511	566066	212216	32
<i>Dccz1</i> -RNAi anteriorer Bereich	1461	378	147725	68282	30

Tabelle 1a: Ergebnisse der Quantifizierung bezüglich Größenzunahme der Vesikel in *Dmon1*^{mut4}-mutanten Zellen, sowie bei Expression von *Dmon1/Dccz1*-RNAi. Die anterioren Bereiche stellen jeweils die wt-Kontrolle dar, weil dort keine RNAi-Expression stattfand (*hh*GAL4-Treiberlinie). Alle beobachteten Größenunterschiede sind statistisch signifikant mit $p < 0,001$.

In *Dmon1*^{mut4}-mutanten Zellen konnte bei der Quantifizierung eine **2.5-fache** Vergrößerung des Umfangs und eine **5.6-fache** Vergrößerung der Fläche der MVBs festgestellt werden.

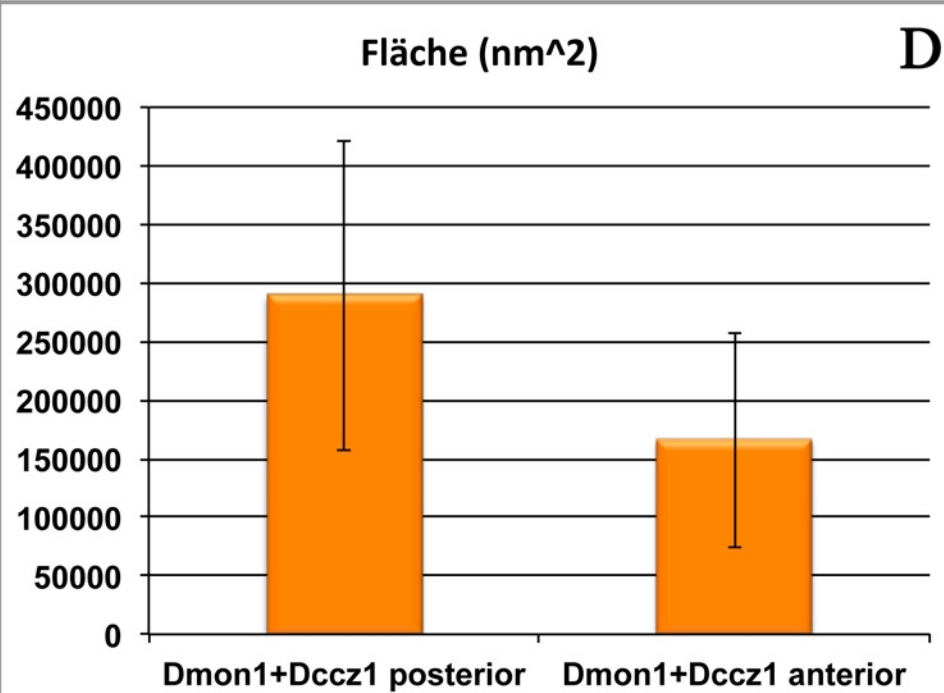
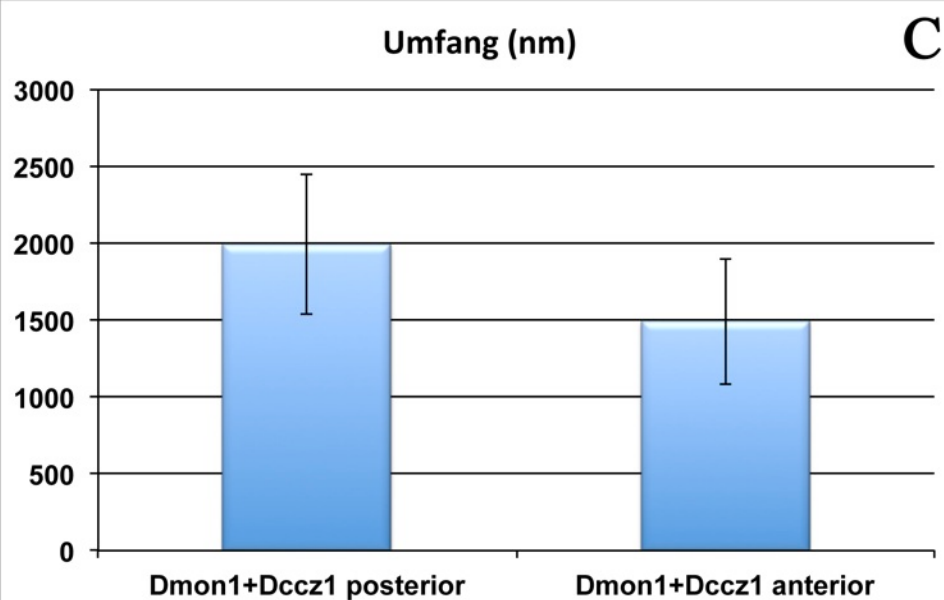
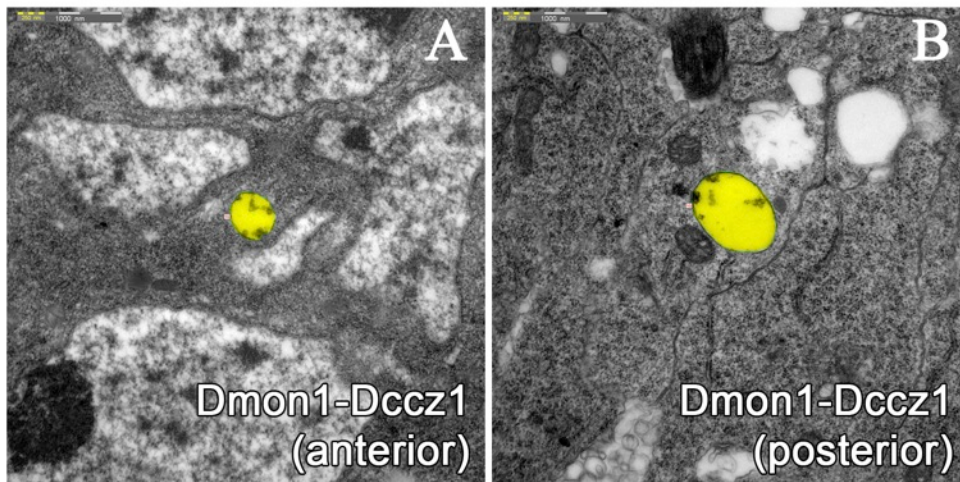
In *Dmon1*-RNAi exprimierenden Zellen wurde eine etwas schwächere **1.8-fache** Vergrößerung des Umfangs und eine **3.1-fache** Vergrößerung der Fläche der MVBs beobachtet.

Bei *Dccz1*-RNAi exprimierenden Zellen wurde eine **1.9-fache** Vergrößerung des Umfangs und eine **3.8-fache** Vergrößerung der Fläche der MVBs beobachtet.

Wie schon oben beschrieben führte die gemeinsame Überexpression von beiden Interaktionspartnern Dmon1-Dccz1 auf der posterioren Seite der Flügelimaginalscheibe zu vergrößerten Vesikeln. Der Umfang und die Fläche dieser Vesikel wurde ebenfalls vermessen und ausgewertet. In Dmon1-Dccz1 überexprimierenden Zellen konnte bei der Quantifizierung eine **1.3-fache** Vergrößerung des Umfangs und eine **1.7-fache** Vergrößerung der Fläche der MVBs festgestellt werden.

Abb.2.39b: Vergleich und statistische Auswertung des Umfangs und der Fläche der MVBs bei Dmon1-Dccz1-Koexpression. Die MVBs in den Dmon1-Dccz1-exprimierenden Zellen auf der posterioren Seite der Flügelimaginalscheibe (B), erscheinen größer im Vergleich zu den MVBs in den wildtypischen Zellen auf der anterioren Seite (A). Die statistische Auswertung des Umfangs (C) und der Fläche (D) von MVBs bestätigt diese Beobachtung. Alle beobachteten Größenunterschiede sind statistisch signifikant mit $p < 0,001$.

w⁻; enGAL4; UASDmon1-HA / UASDccz1-EOS



Zellen	Umfang [nm]	StAbw.	Fläche [nm ²]	StAbw	Anzahl n
Dmon1-Dccz1 Überexpression posteriorer Bereich	1989	454	289100	131869	31
Dmon1-Dccz1 Überexpression anteriorer Bereich	1493	409	165847	91577	31

Tabelle 1b: Ergebnisse der Quantifizierung bezüglich Größenzunahme der Vesikel bei Koexpression von Dmon1/Dccz1. Die anterioren Bereiche stellen jeweils die wt-Kontrolle dar, weil dort keine Koexpression stattfand (*enGAL4*-Treiberlinie). Alle beobachteten Größenunterschiede sind statistisch signifikant mit $p < 0,001$.

2.11. Subzelluläre Lokalisation von Dmon1 und Dccz1

Die Kenntnis über die subzelluläre Lokalisation von Dmon1 oder Dccz1 wäre für ein besseres Verständnis der Funktion der beiden Proteine von Interesse und wurde deswegen als nächstes untersucht.

Wie der in Rahmen dieser Arbeit beobachtete Ausfallphänotyp von *Dmon1* und *Dccz1* zeigte, sind beide Proteine erforderlich für die Rekrutierung und Bindung von Rab7 an die Membran von Endosomen. Hieraus stellte sich die Frage, ob diese Funktion auch einen Einfluss auf die Lokalisation beider Proteine hat und diese beispielsweise assoziiert mit Endosomen zu beobachten sind.

Eine Färbung gegen das HA-Epitop von *Dmon1*-HA zeigt, dass Dmon1 im gesamten Zytoplasma ohne offensichtliche Assoziation mit Endosomen verteilt ist. EOS markiertes Dccz1 zeigt ebenfalls eine zytoplasmatische Verteilung. Eine Doppelfärbung von Dmon1-HA und Dccz1-EOS lässt keine spezifischen Aussagen zu und weist nur ziemlich generell auf eine Kolokalisation beider Proteine in Zytoplasma hin (Abb.2.40).

Die beobachtete zytoplasmatische Lokalisation stimmt mit den Berichten zur Lokalisation des Mon1-Orthologs SAND-1 in den meisten Zellen von *C. elegans* (Poteryaev *et al.*, 2007). Allerdings zeigen Mon1p und Ccz1p eine membrangebundene Lokalisation in *S. cerevisiae* und befanden sich als punktförmige Strukturen auf der Membran der Vakuole. *In vitro* Vakuolen-Fusionsversuche zeigten jedoch ferner, dass sie während der homotypischen Fusion zwischen den Vakuolen freigesetzt werden (Wang *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2003). Das bedeutet, dass Mon1p als Vertreter der Mon1-Familie zumindest in der Hefe eine dynamische Lokalisation

aufweist und zeitweise an Endosomen, zeitweise wie in *C. elegans* und in *Drosophila* (Beobachtungen aus dieser Arbeit) zytoplasmatisch lokalisiert ist.

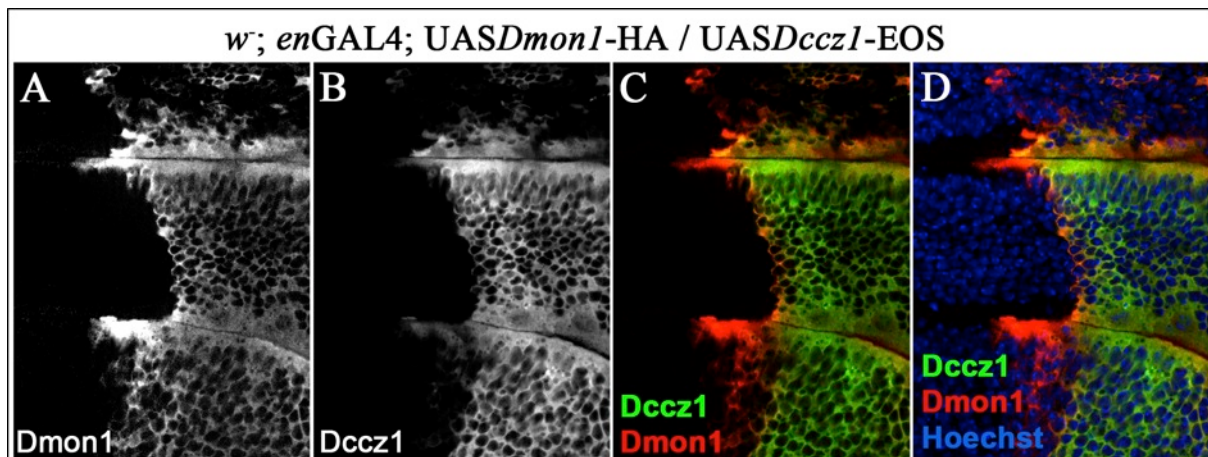


Abb.2.40: Dmon1 und Dccz1 sind zytoplasmatisch lokalisiert. Auf der posterioren Seite der Flügelimaginalscheibe wurden Dmon1-HA (A, C, D) und Dccz1-EOS (B, C, D) exprimiert. Durch eine Hoechst-Färbung werden die Zellkerne sichtbar (D), wodurch die zytoplasmatische Verteilung von Dmon1 und Dccz1 deutlicher sichtbar wird.

Wie schon oben erwähnt sind Dmon1 und Dccz1 erforderlich für die Rekrutierung und Bindung von Rab7 an die Membran von Endosomen. Auf dem Hintergrund der Ergebnisse aus der Hefe könnte es also sein, dass die Proteine ebenfalls eine dynamische Lokalisation aufweisen und für die Erfüllung ihrer Funktion trotz der beobachteten zytoplasmatischen Lokalisation, dennoch zeitweise an Membranen assoziieren. Diese Bindung könnte aber von sehr kurzer Dauer sein und auch einen nur vergleichsweise kleinen Anteil der in der Zelle vorhandenen Proteine umfassen, wodurch diese endosomale Lokalisation nur schwer zu detektieren wäre.

Um dieser Möglichkeit nachzugehen, dass Dmon1-Dccz1 zumindest zeitweise an endosomale Membranen binden, wurde der endosomale Transportweg mit dem Ziel manipuliert, eine Verlängerung dieser möglichen membranständigen Assoziation zu erreichen. Unter diesen Bedingungen wurden die Zellen daraufhin auf eine veränderten Lokalisation von Dmon1 und Dccz1 untersucht.

Als eine Möglichkeit zur Manipulation wurde angenommen, dass der Komplex der beiden Proteine erst auf der endosomalen Membran gebildet wird und vielleicht zunächst nur eines der Proteine an die Membran eines Endosoms bindet.

Von dieser Annahme ausgehend, wurde die Dmon1-Lokalisation in den Zellen des posterioren Kompartiments von Flügelimaginalscheiben, in denen *Dccz1*-RNAi mittels *enGAL4* exprimiert wurde, untersucht. HA-markiertes Dmon1 wurde dabei ebenfalls in den gleichen Zellen exprimiert. Die Expression von *Dccz1*-RNAi verursachte, wie erwartet, die Entstehung vergrößerter, Notch-enthaltender Endosomen. Allerdings hatte dies auf die Lokalisation von Dmon1 anscheinend keinen Einfluss, da Dmon1 auch weiterhin zytoplasmatisch zu beobachten war (Abb. 2.41).

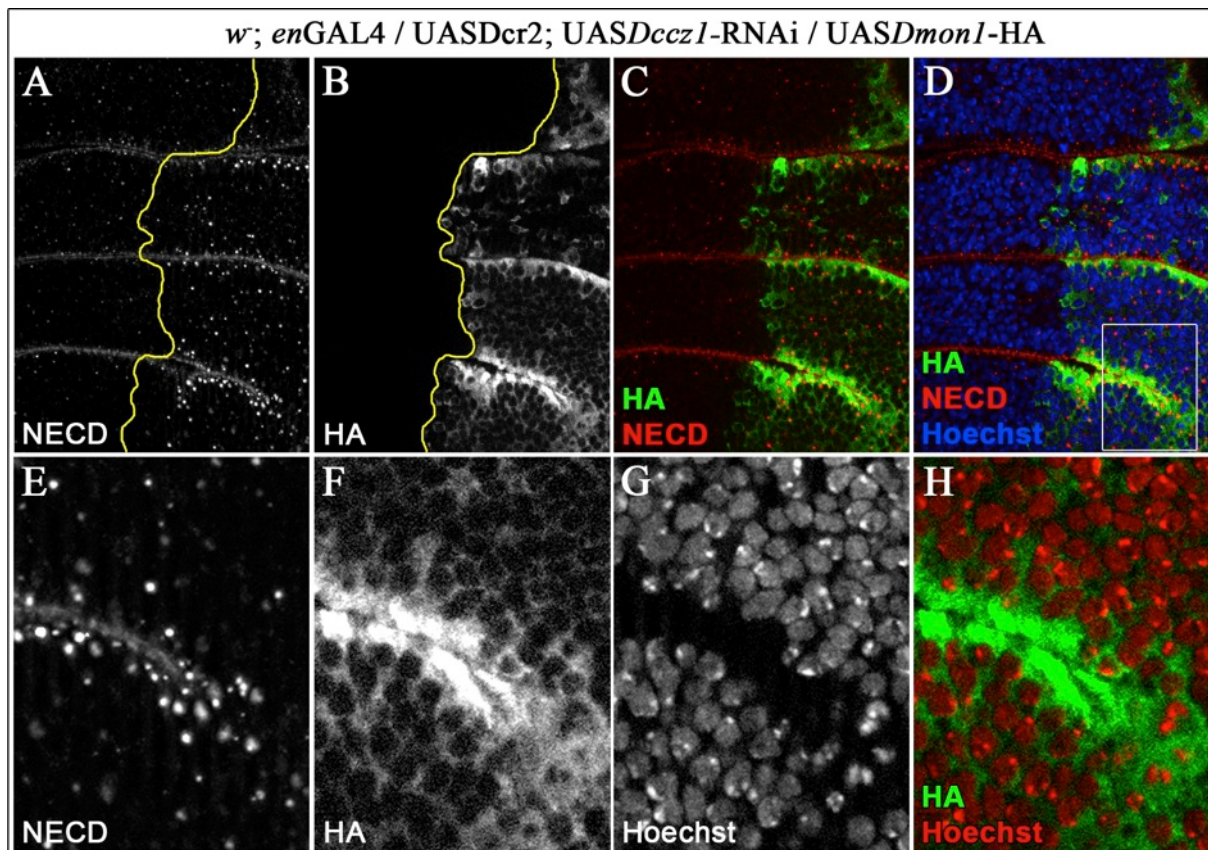


Abb.2.41: Beim Ausfall von *Dccz1* ist Dmon1 weiterhin zytoplasmatisch lokalisiert. Die Lokalisation von Dmon1-HA (B, C, D, F, H) wurde in den posterioren Zellen, in denen *Dccz1*-RNAi exprimiert wird beobachtet. Der Ausfall von *Dccz1* verursacht vergrößerte, Notch-enthaltende Vesikel (NECD in A, C, D, E). Die Zellkerne sind durch die Hoechst-Färbung sichtbar (D, G, H).

Das gleiche Experiment wurde für die Bestimmung der Lokalisation von *Dccz1* durchgeführt. Die Lokalisation von EOS-markiertem *Dccz1* in posterioren Zellen, in denen *Dmon1*-RNAi exprimiert wird, verbleibt allerdings ähnlich wie die Dmon1-HA-Lokalisation ebenfalls zytoplasmatisch (Abb.2.34).

Das Ausschalten wahlweise von *Dmon1* oder *Dccz1* hat also zu keiner feststellbaren Änderung der Lokalisation des jeweils anderen Proteins geführt und ermöglicht deswegen

auch keine weiteren Aussagen über die Möglichkeit, ob beide oder eines der beiden zumindest zeitweise vesikulär lokalisiert ist.

Als ein weiterer möglicher experimenteller Manipulationsansatz sind die hier beschriebenen Beobachtungen genutzt worden bezüglich der Lokalisation der Rab-Proteine bei *Dmon1*-Ausfall. Wie die hier gezeigten Ergebnisse zeigen, ist die Funktion von *Dmon1* für den Prozess der Rekrutierung von Rab7 an endosomale Membranen und die damit im Rahmen der Rab-Konversion einhergehende Entfernung von Rab5 notwendig. Es wäre daher denkbar, dass die Überexpression bzw. das Ausschalten dieser Rab-Proteine die Lokalisation von *Dmon1* verändert.

Bei einer erhöhten Rab5-Menge könnte gegebenenfalls mehr *Dmon1* an die endosomalen Membranen rekrutiert werden, wodurch eine *Dmon1*-Assoziation mit der Membran detektiert werden könnte.

Dafür wurde als nächstes Rab5-GFP mittels *ptcGAL4* entlang der antero-posterioren Achse exprimiert. Die Überexpression von Rab5 verursachte vergrößerte, Notch-enhaltende Vesikel, die Verteilung von *Dmon1* (*Dmon1*-HA) aber blieb bei diesem Experiment weiterhin zytoplasmatisch (Abb.2.42).

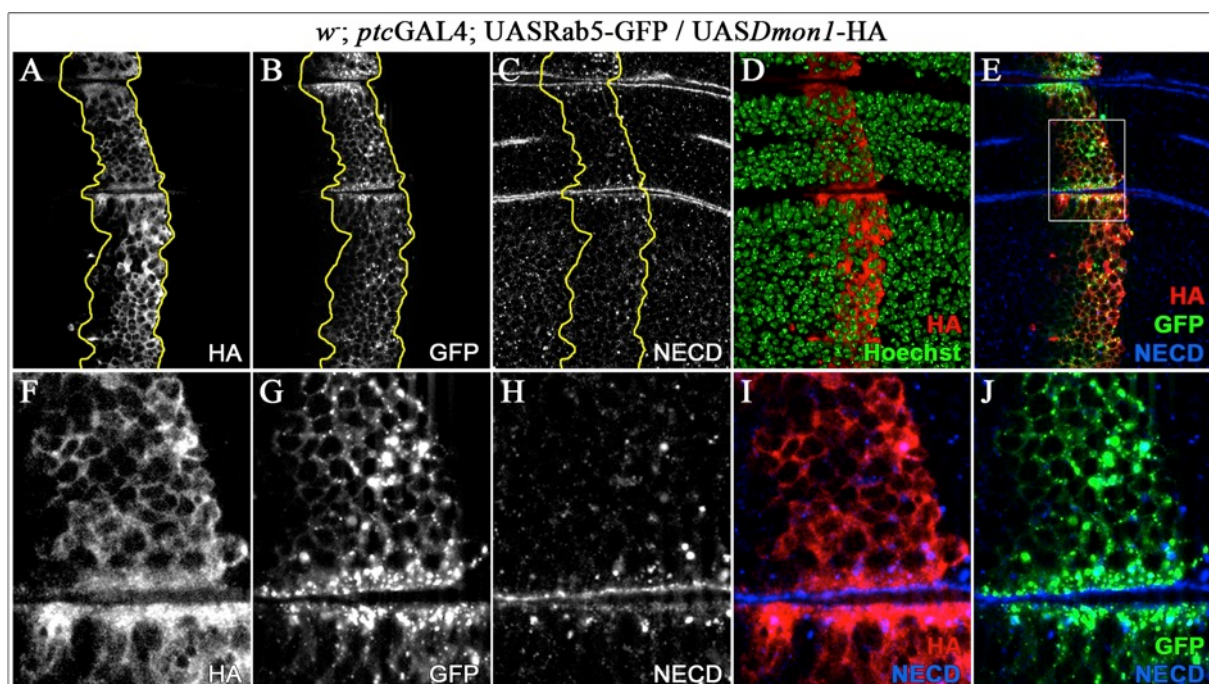


Abb.2.42: Überexpression von Rab5 verändert nicht die zytoplasmatische Lokalisation von *Dmon1*. Die Überexpression von Rab5 (Rab5-GFP entlang der antero-posterioren Achse in B, E, G, J) führt zur Entstehung vergrößerter, Notch-enhaltender Endosomen (C, E, H, I, J). Die Lokalisation

von Dmon1-HA (A, D, E, F, I, J) verbleibt dabei zytoplasmatisch. Zellkerne sind durch die Hoechst-Färbung sichtbar gemacht (D).

In *C. elegans* wurde gezeigt, dass SAND-1 gleichzeitig mit Rab7 die Membran erreicht (Poteryaev *et al.*, 2010). SAND1/Mon1-Ccz1 rekrutiert Rab7 an die Membran und wird dort gleichzeitig mit Rab7 für kurze Zeit lokalisiert. Diese kurzfristige, gleichzeitige Membranassoziation könnte also eine weitere Manipulationsmöglichkeit bieten, da bei einem Ausfall oder reduzierter Menge von Rab7 zu erwarten wäre, dass Dmon1 vermehrt an der Vesikelmembran verbleibt, von der es dann erst nach der Assoziation mit Rab7 freigesetzt werden würde. Um diese Annahme zu untersuchen wurde die Lokalisation von Dmon1 beim Ausfall von Rab7 untersucht. Dafür wurde *rab7*-RNAi auf der posterioren Seite von Flügelimaginalscheiben mittels *enGAL4* exprimiert. Allerdings war die Lokalisation von Dmon1 auch in den *rab7*-RNAi exprimierenden Zellen unverändert zytoplasmatisch festzustellen (Abb. 2.43).

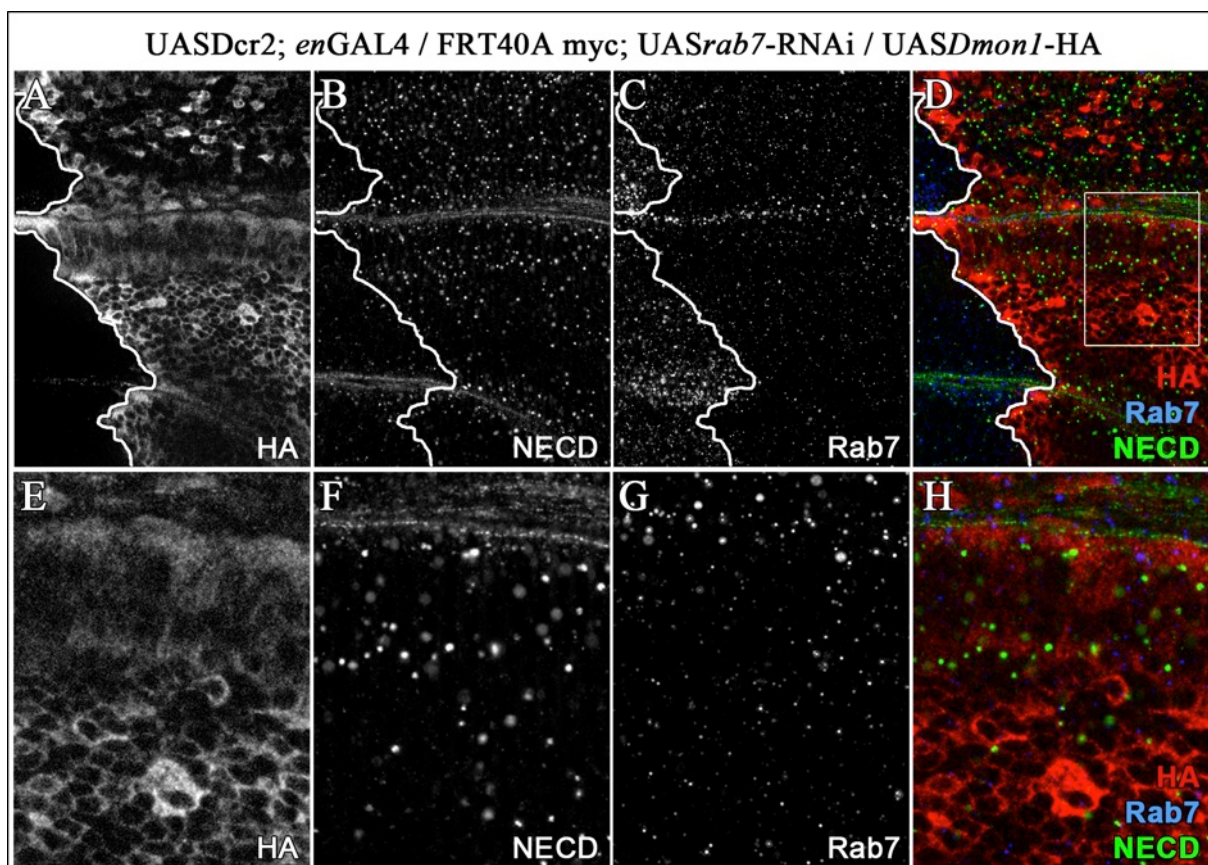


Abb.2.43: Expression von *rab7*-RNAi verändert nicht die zytoplasmatische Lokalisation von Dmon1. Die Überexpression von *rab7*-RNAi auf der posterioren Seite der Flügelimaginalscheibe führt zur Entstehung vergrößerter Notch-enthaltender Endosomen (B, D, F, H). Die Lokalisation von Dmon1-HA (A, D, E, H) verbleibt dabei zytoplasmatisch. Eine Antikörperfärbung gegen Rab7 (C, D, G, H) weist durch niedrigere Level von Rab7 im Expressionsbereich auf die Funktionalität der benutzten *rab7*-RNAi-Linie.

2.12. Dmon1 und Dccz1 haben keinen Einfluss auf die Lokalisation von Rabex-5

Poteryaev *et al.* (2010) zeigten, dass SAND-1 mit den Helix-Bündeln von Rabex-5 interagiert. Zudem beschrieben sie, dass die Funktion von SAND-1 nicht in der Unterbrechung der katalytischen Aktivität von Rabex-5 sondern vermutlich in der Entfernung von Rabex-5 von den Endosomen besteht, da Rabex-5 in Abwesenheit von SAND-1 auf den frühen Endosomen gefangen verbleibt. *In vivo* Experimente mit Mon1a und Mon1b, den zwei Säugetier- Homologen von SAND-1, weisen ebenfalls auf eine solche Funktion hin (Poteryaev *et al.*, 2010). Hierbei konnte beobachtet werden, dass die Überexpression von Mon1a/b die Entfernung von Rabex-5 von frühen Endosomen verursacht. Zusammengefasst legen diese Ergebnisse nahe, dass SAND-1/Mon1 die Rabex-5-Funktion dadurch reguliert, dass sie dessen Dissoziation von den Endosomen steuern, wodurch die positive Rückkopplungsschleife von Rab5 unterbrochen und Rab5 inaktiviert wird. Dies führt zur Bindung von Rab7 und anschließender Rab-Konversion.

Um zu untersuchen, ob die Dmon1-Funktion bezüglich der Regulierung der Rabex-5-Dissoziation von den Endosomen auch in *Drosophila* konserviert ist, wurde die Verteilung von Rabex-5 in *Dmon1^{mut4}*-mutanten Zellklonen untersucht. EOS-markiertes Rabex-5, generiert im Rahmen dieser Arbeit, wurde ubiquitär in der Flügelimaginalscheibe mittels des *tubulin*-Promotors exprimiert. Hierbei war zu beobachten (Abb.2.44), dass die Verteilung von Rabex-5 in den *Dmon1^{mut4}*-mutanten Zellklonen, verglichen mit den wildtypischen Zellen, unverändert ist.

Zur weiteren Bestätigung dieser Beobachtung wurde *Dmon1*-RNAi mittels *hh*-GAL4 auf der posterioren Seite von Flügelimaginalscheiben exprimiert, die gleichzeitig Rabex-5 ubiquitär exprimierten. Hierbei konnte ebenfalls keine Veränderung der Verteilung von Rabex-5 auf der posterioren, mutanten Seite, verglichen mit der anterioren wildtypischen Seite, beobachtet werden (Abb.2.45). Rabex-5 befand sich in allen Arealen hauptsächlich auf den Endosomen an der apikalen Seite der Zelle.

Das gleiche Experiment wurde analog bei *Dccz1*-RNAi-Expression durchgeführt. In den Flügelimaginalscheiben, in denen auf der posterioren Seite die Expression von *Dccz1* durch die Expression von *Dccz1*-RNAi mittels *hh*-GAL4 herunterreguliert wurde, wurde ähnlich

wie in den Flügelimaginalscheiben mit *Dmon1*-RNAi-Expression keine Veränderung der Rabex-5-Verteilung, verglichen mit dem wildtypischen Bereich auf den anterioren Seite, beobachtet (Abb.2.46).

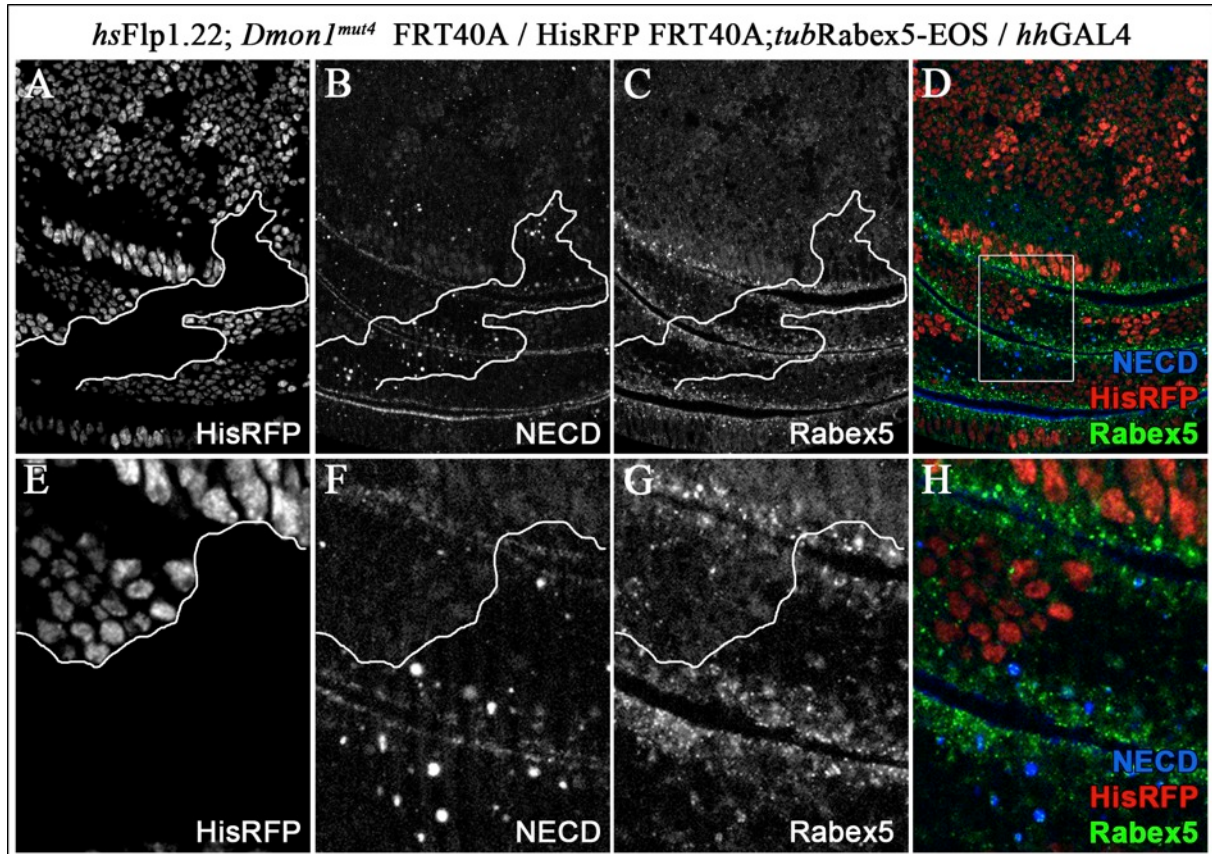


Abb.2.44: Die Rabex-5-Verteilung ist in *Dmon1^{mut4}*-mutanten Zellklonen wildtypisch. *Dmon1^{mut4}*-mutante Zellklone wurden in Flügelimaginalscheiben generiert in denen Rabex-5 unter der Kontrolle des *tub*-Promotors exprimiert wurde (*tubRabex-5* in C, D, G und H). Die Flügelimaginalscheiben wurden mit dem Antikörper gegen die extrazelluläre Domäne des Notch-Rezeptors gefärbt (B, D, F und H). Die mutanten Zellklone sind durch die Abwesenheit von His-RFP markiert (A, D, E, H).

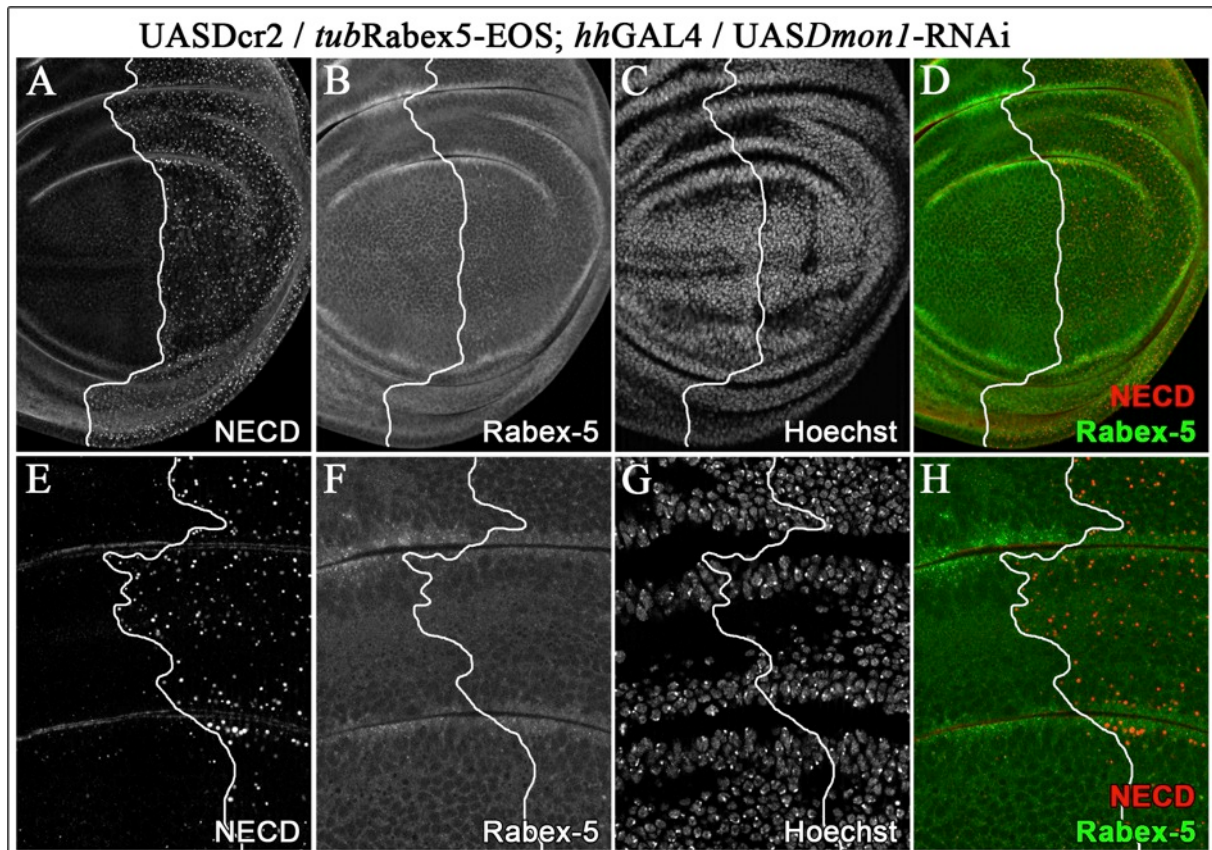


Abb.2.45: Die Expression von *Dmon1*-RNAi hat keinen Einfluss auf die Verteilung von Rabex-5. In Flügelimaginalscheiben die *tubRabex5* exprimieren (B, D, F und H), wurde gleichzeitig auf der posterioren Seite *Dmon1*-RNAi exprimiert. Diese Expression von *Dmon1*-RNAi führt zur Entstehung der vergrößerten Notch-enthaltenden Endosomen die durch den Antikörper gegen die extrazelluläre Domäne des Notch-Rezeptors markiert sind (A, D, E und H). Es ist keine Veränderung der Rabex-5-Lokalisation in der *Dmon1*-RNAi-Expressionsdomäne zu beobachten. Die Zellkerne wurden durch eine Hoechst-Färbung sichtbar gemacht (C und G).

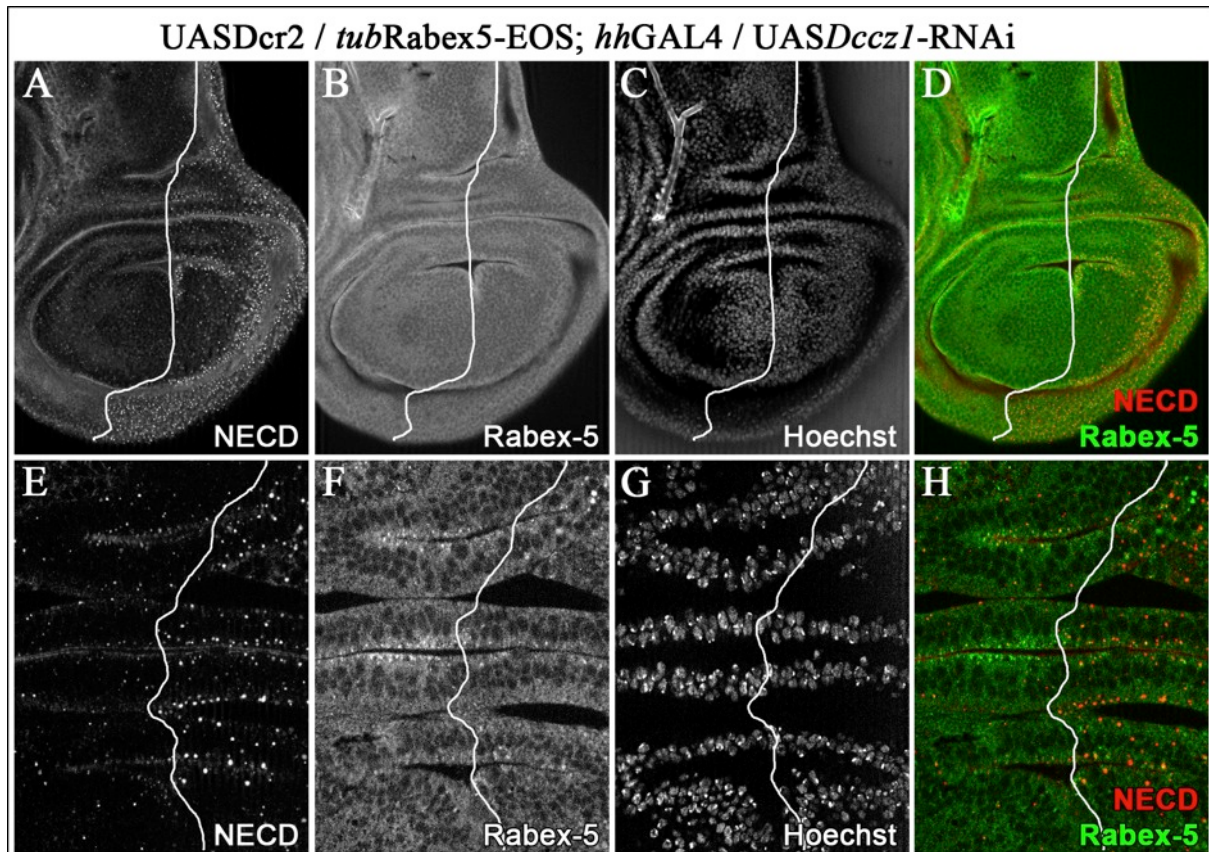


Abb.2.46: Die Expression von *Dccz1*-RNAi hat keinen Einfluss auf die Rabex-5-Verteilung. In Flügelimaginalscheiben, die Rabex-5 unter der Kontrolle des *tubulin*-Promotors exprimieren (B, D, F und H), wurde gleichzeitig auf der posterioren Seite *Dccz1*-RNAi exprimiert. Diese Expression von *Dccz1*-RNAi führt zur Entstehung vergrößerter Notch-enthaltender Endosomen, die durch den Antikörper gegen die extrazelluläre Domäne des Notch-Rezeptors markiert sind (A, D, E und H). Die Zellkerne wurden durch eine Hoechst-Färbung sichtbar gemacht (C und G).

Zum Schluss wurde der Einfluss der Überexpression von Dmon1 auf die Lokalisation von Rabex-5 untersucht. Dafür wurde *Dmon1*-HA mittels *en*GAL4 auf der posterioren Seite von Flügelimaginalscheiben exprimiert, in denen Rabex-5 ubiquitär exprimiert wurde. Hierbei hatte die Überexpression von Dmon1 ebenfalls keinen Einfluss auf die Lokalisation von Rabex-5 (Abb. 2.47).

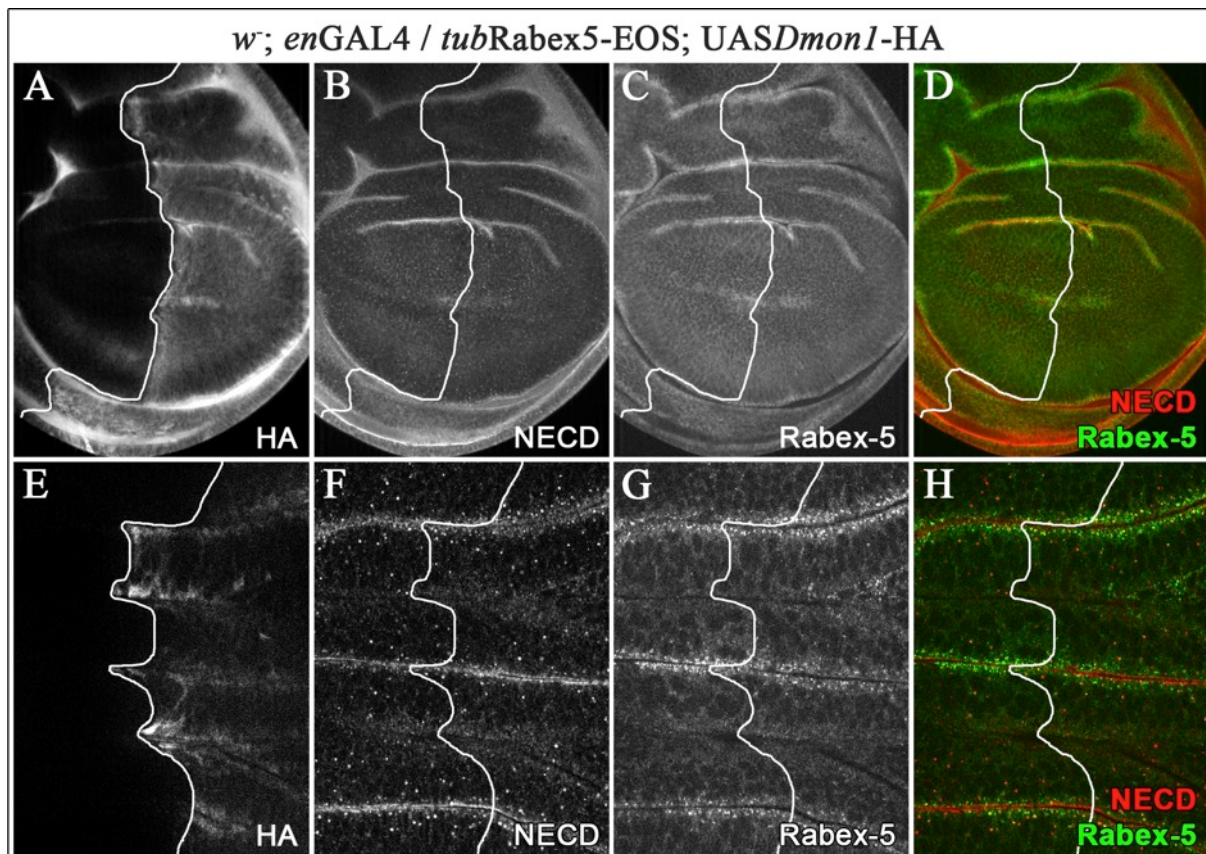


Abb.2.47: Expression von Dmon1 hat keinen Einfluss auf die Verteilung von Rabex-5. In Flügelimaginalscheiben die ubiquitär Rabex-5 exprimieren (C, D, G und H), wurde gleichzeitig auf der posterioren Seite Dmon1-HA überexprimiert (A, D, E und H). Die Überexpression von Dmon1 hat keinen Einfluss weder auf die Verteilung von Rabex-5 noch auf die von Notch in Endosomen, welche durch den Antikörper gegen die extrazelluläre Domäne des Rezeptors markiert sind (B, D, F und H).

Zusammengefasst konnte kein Einfluss weder durch den Ausfall von *Dmon1* oder *Dccz1* noch durch die Überexpression von Dmon1 auf die Lokalisation von Rabex-5 festgestellt werden. Dies deutet darauf hin, dass abweichend von den Beobachtungen bezüglich der SAND-1-Funktion in *C. elegans* und bezüglich Mon1 in Säugetierzellkultur die Dissoziation von Rabex-5 von den Endosomen in *Drosophila* weder von Dmon1 noch von Dccz1 reguliert wird.

Die vergrößerten Endosomen in *Dmon1^{mut4}*-mutanten Zellen (Abb.2.44) sind zum Teil mit Rabex-5 kolokalisiert. Da Rabex-5 der GEF von Rab5 ist und dafür sorgt, dass GTP an Rab5 bindet, kann daraus geschlossen, dass Rab5, welches mit den vergrößerten Endosomen in *Dmon1^{mut4}*-mutanten Zellen assoziiert ist, wahrscheinlich ein aktiviertes, GTP-gebundenes Rab5 ist. Das ist eine zusätzliche Bestätigung zu Beobachtungen von Rab5-vermittelten Rekrutierung von Vps34, die ebenfalls auf den aktivierten Zustand von Rab5 deuteten.

2.13. Mon1 und Autophagie

Der endosomale Transportweg wird nicht nur für den Transport endozytierten Materials wie Transmembranproteinen benutzt, auch Autophagosomen und Phagosomen werden dem endosomalen Transportweg zugeführt, um deren Inhalt zum Abbau ins Lysosom bringen zu lassen (Pryor und Luzio, 2009). In *C. elegans* wurde gezeigt, dass der SAND-1-Ccz1 Komplex am Reifungsprozess von Phagosomen beteiligt ist (Kinchen und Ravichandran, 2010). Mon1-Ccz1 ist in der Hefe für die Funktion multipler Transportwege erforderlich, wie von Cvt (*cytoplasm to vacuole targeting pathway*), Autophagie und Pexophagie (Wang *et al.*, 2002). Es konnte auch die Involvierung von Rab7 bei den autophagosomalen Transportweg gezeigt werden (Gorski *et al.*, 2003; Gutierrez *et al.*, 2004).

In dieser Arbeit wurde deswegen ebenfalls untersucht, ob Dmon1 an dem autophagosomalen Transportweg beteiligt ist, bzw. ob die Dmon1-abhängige Rekrutierung von Rab7 für den Abbau von Autophagosomen erforderlich ist. Dafür wurde untersucht, ob unter den vergrößerten Endosomen in *Dmon1^{mut4}*-mutanten Zellen eventuell auch Autophagosomen sind, die aufgrund einer Fehlfunktion von *Dmon1* nicht mit dem Lysosom fusionieren können. Hierzu wurden *Dmon1^{mut4}*-mutante Zellklone in den Flügelimaginalscheiben induziert, in denen der autophagosomale Marker Atg8-GFP (Rusten *et al.*, 2007) mittels der Treiberlinie *hhGAL4* exprimiert wurde.

Hierbei konnte beobachtet werden, dass die *Dmon1^{mut4}*-Endosomen nicht mit Atg8-GFP kolokalisiert sind (Abb.2.48). In elektronenmikroskopischen Aufnahmen konnten auch keine Autophagosomen-ähnliche Strukturen beobachtet werden (doppelt-membranumgebene Vesikel). Ferner war die Verteilung von Atg8 in den *Dmon1^{mut4}*-mutanten Zellen wildtypisch (Abb.2.48-C, G, K). Zusammengefasst scheint Autophagie in *Drosophila* nicht durch den Ausfall von *Dmon1* betroffen zu sein. Das beobachtete Ergebnis könnte aber auch darauf hindeuten, dass der Rab7-vermittelte oder überhaupt der Transport der Autophagosomen zu Lysosomen in *Drosophila* durch andere Faktoren reguliert wird, als es in Hefe der Fall ist.

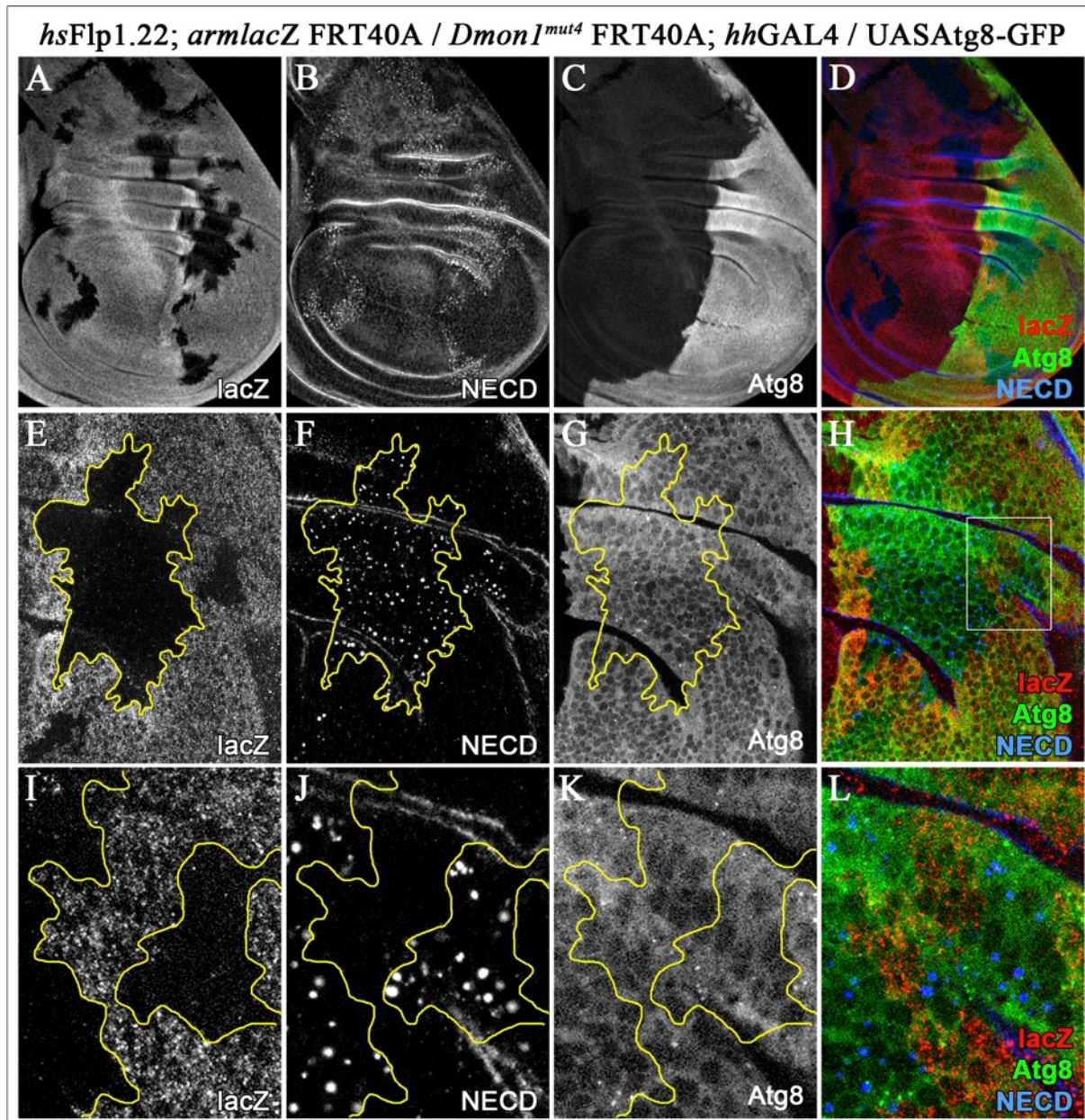


Abb.2.48: Autophagie scheint von der *Dmon1^{mut4}*-Mutation nicht betroffen zu sein. UAS-Atg8-GFP wurde in Flügelimaginalscheiben auf der posterioren Seite exprimiert (C, D, G, H, K, L). *Dmon1^{mut4}*-mutante Zellklone in denselben Flügelimaginalscheiben sind durch die Abwesenheit des Reporterkonstruktes *armlacZ* gekennzeichnet (eine Antikörperfärbung gegen das Produkt von β Galaktosidase, in A, D, E, H, I, L). Die Flügelimaginalscheiben wurden zur Kennzeichnung der *Dmon1^{mut4}*-spezifischen Vesikel mit dem Antikörper gegen die extrazelluläre Domäne des Notch-Rezeptors (NECD in B, D, F, H, J, L) gefärbt. Die *Dmon1^{mut4}*-Endosomen zeigen keine Kolo-kalisation mit Autophagiemarker Atg8 (D, H, L). Die Verteilung von Atg8 ist in *Dmon1^{mut4}*-mutanten Zellen nicht verändert.

2.14. Der Phänotyp von *Dmon1^{mut4}* wird bedingt durch eine Fehlfunktion von Rab7

Um festzustellen, ob der beobachtete Vesikel-Phänotyp in *Dmon1^{mut4}*- oder in *Dccz1*-mutanten Zellen durch eine fehlerhafte Funktion von Rab7 zustande kommt, wurde untersucht ob eine Blockade der Rab7-Funktion den gleichen oder einen ähnlichen Phänotyp verursacht. Hierzu wurde die Expression von Rab7 mittels *rab7*-RNAi herunterreguliert.

Zu diesem Zweck wurde *rab7*-RNAi mittels *hedehog*-GAL4 (*hh*GAL4) auf der posterioren Seite der Flügelimaginalscheibe exprimiert. Auf der posterioren Seite waren dabei verglichen mit der anterioren Seite vergrößerte, Notch-enthaltende Vesikel zu beobachten (Abb.2.49-B, C, D, G). In einem weiteren Experiment wurden diese Flügelimaginalscheiben mit dem Farbstoff LysoTracker gefärbt. Auch hier war auf der posterioren Seite der Flügelimaginalscheibe ähnlich wie in *Dmon1^{mut4}*-mutanten Zellen eine Ansammlung von LysoTracker zu sehen, welche auf den sauren Charakter dieser Vesikel hindeutet (Abb.2.49-E, F).

Mittels einer Rab7-Antikörperfärbung konnte gezeigt werden, dass die *rab7*-RNAi funktionell sehr effektiv ist, da Rab7 mit dem Antikörper gegen Rab7 in mutanten Zellen nicht mehr detektiert werden konnte (Abb.2.49-H).

In elektronenmikroskopischen Aufnahmen waren vergrößerte MVBs mit darin gebildeten ILV auf der posterioren Seite der Flügelimaginalscheiben zu beobachten (Abb.2.50-A, B). Die statistische Analyse der Messungen von Umfang und Oberfläche der MVBs zeigte eine Vergrößerung um das **1,6**-Fache in deren Umfang und um das **2,5**-Fache in deren Fläche (Abb.2.50-C, D und Tabelle 2).

Die Ähnlichkeit des Phänotyps der *rab7*-RNAi-Expression mit dem Phänotyp bei fehlender *Dmon1^{mut4}*- und *Dccz1*-Funktion und die veränderte Lokalisation von Rab7 in *Dmon1^{mut4}*-mutanten Zellen sind allerdings ein weiterer Hinweis darauf, dass der Dmon1-Dccz1 Komplex im endosomalen Transportweg eine Funktion unmittelbar vor (*upstream*) Rab7 haben, wobei der Phänotyp, der bei dem Ausfall der *Dmon1^{mut4}*- und *Dccz1*-Funktion zu beobachten war, zumindest zum Teil durch eine Blockade der Funktion von Rab7 verursacht wird.

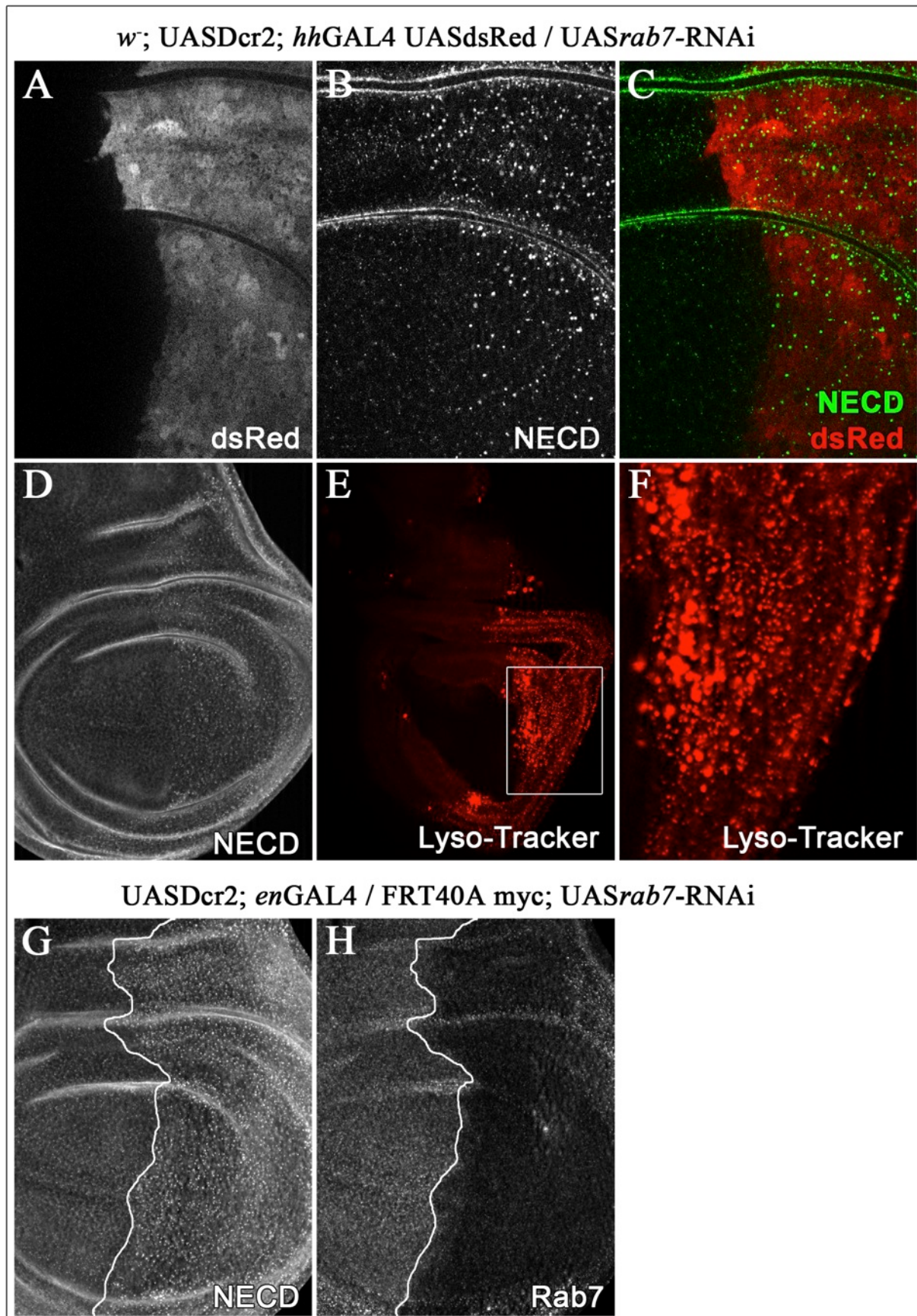


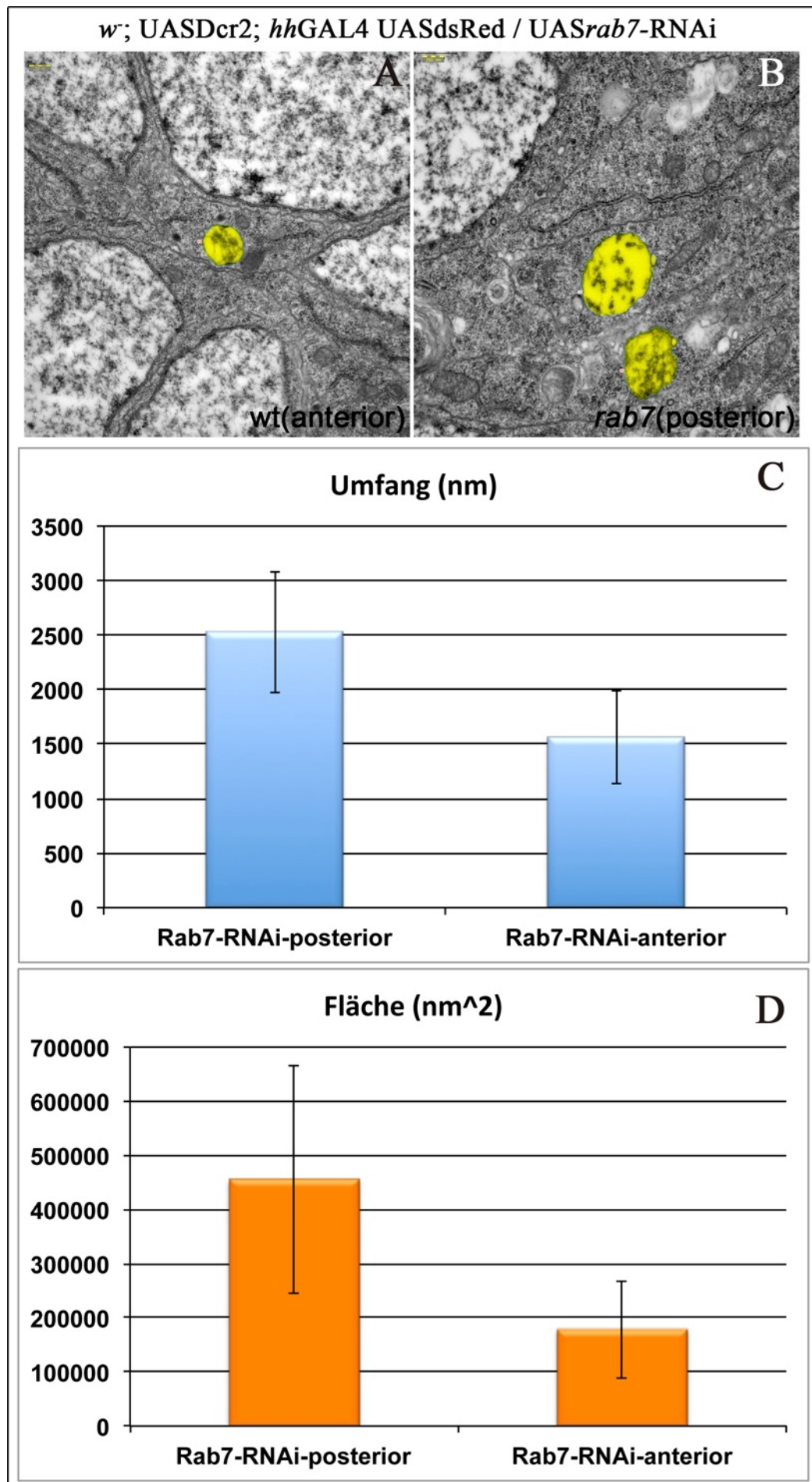
Abb.2.49: Der Ausfall von Rab7 zeigt einen ähnlichen Phänotyp wie der *Dmon1*- und *Dccz1*-Ausfalls. Nachweis des effizienten Ausschaltens von Rab7 mittels *rab7*-RNAi durch eine Antikörperfärbung gegen Rab7 (H). *Rab7*-RNAi-Expression führt zur Entstehung vergrößerter Notch-enthaltender Vesikel (B, C, D, G). Eine Färbung mit dem LysoTracker zeigt, dass die vergrößerten Vesikel sauren Charakter haben (E, F). Abb. A und C zeigt die Expressionsdomäne von *hhGAL4*

anhand des UAS-dsRed-Markers, in der die Funktion von Rab7 durch *rab7*-RNAi herunterreguliert ist. Alle beobachteten Größenunterschiede sind statistisch signifikant mit $p < 0,001$.

Zellen	Umfang [nm]	StAbw.	Fläche [nm ²]	StAbw	Anzahl n
<i>rab7</i> -RNAi posteriorer Bereich	2522	552	454568	209438	34
<i>rab7</i> -RNAi anteriorer Bereich	1566	428	178284	89777	31

Tabelle 2: Ergebnisse der Quantifizierung bezüglich Größenzunahme der Vesikel in *rab7*-RNAi exprimierenden Zellen. Der anteriore Bereich stellt das Gebiet der wt-Kontrolle dar, ohne RNAi-Expression (*hh*GAL4-Treiberlinie). Alle beobachteten Größenunterschiede sind statistisch signifikant mit $p < 0,001$.

Abb.2.50: Vergleich und statistische Auswertung des Umfangs und die Fläche der MVBs bei *rab7*-RNAi-Expression. Die MVBs in den *rab7*-RNAi-exprimierenden Zellen auf der posterioren Seite der Flügelimaginalscheibe (B), erscheinen größer im Vergleich zu den MVBs in den wildtypischen Zellen (A). Die statistischen Auswertungen des Umfangs (C) und der Fläche (D) von MVBs bestätigt diese Beobachtung. Alle beobachteten Größenunterschiede sind statistisch signifikant mit $p < 0,001$.



2.15. Die Signalübertragung durch Signaltransduktionswege ist nicht durch die *DmonI^{mut4}*-Mutation betroffen

Verschiedene Signaltransduktionswege, wie der Notch-, EGF-, TGF- β - und Wnt-Signalweg werden durch die Endozytose und den endosomalen Transportweg reguliert (Fischer *et al.*, 2006). Dabei führen Störungen des endosomalen Transportweges, wie z.B. durch einen funktionellen Ausfall von Mitgliedern des endosomalen Transportwegs, zu Störungen in der Signalübertragung, was zu gravierenden Folgen für den betroffenen Organismus, wie z. B. zu Entstehung von Tumoren führen kann (Vaccari und Bilder, 2009).

In Anbetracht der Akkumulation von Transmembranproteinen in vergrößerten Vesikeln und der Hinweise darauf, dass das durch die *DmonI^{mut4}*-Mutation betroffene Gen in den endosomalen Transportweg involviert ist, wurde geprüft, ob neben dem Transport der Signalrezeptoren auch die Signalübertragung durch die jeweiligen Signalwege durch die *DmonI^{mut4}*-Mutation betroffen ist.

Die Aktivität der untersuchten Signaltransduktionswege (Notch, EGF, Wnt/Wg und TGF- β /dpp) wurde durch die Analyse der Expression von deren Zielgenen, bzw. anhand der Aktivität von signalwegspezifischen Reportergenkonstrukten verfolgt. Hierbei wurden zur Beobachtung der Aktivität des Notch-Signalweges das Reporterkonstrukt Gbe+Su(H)-GFP (Furriols und Bray, 2001; de Navascués *et al.*, 2012) und das Zielgen *wingless* (Diaz-Benjumea und Cohen, 1995; Klein und Martinez Arias, 1998) verwendet. Die Aktivität des EGF-Signalwegs wurde durch das Expressionsmuster des Reporterkonstrukts *argos-lacZ* (Schweitzer *et al.*, 1995; Golembo *et al.*, 1996), die des Wnt-Signalweg durch *Dfz3-lacZ* (Sato *et al.*, 1999) und die des Dpp-Signalwegs durch *dad-lacZ* (Tsuneizumi *et al.*, 1997) und *omb-lacZ* (Sun *et al.*, 1995) verfolgt.

Das Expressionsmuster des Gbe+Su(H)-GFP Reporterkonstrukts scheint in den *DmonI^{mut4}*-mutanten Flügelimaginalscheiben (Abb.2.51-B, D), verglichen mit den wildtypischen (Abb.2.51-F, H) Flügelimaginalscheiben unverändert zu sein. Das Notch-Zielgen *wg* zeigt ebenfalls die wildtypische, auf zwei Zellstreifen entlang der dorso-ventralen Achse beschränkte Expression (Abb.2.51: mutante Flügelimaginalscheiben in A und D; wt in E und H). Zusätzlich wird Wg in mutanten Flügelimaginalscheiben auch in vergrößerten Endosomen einige Zelldurchmesser weiter von der Expressionsquelle entfernt detektiert, als dies im wildtypischen Gewebe der Fall ist (Abb. 2.51- J-mutant und I-wt), was wie schon

angeführt (siehe auch Abb. 2.3. B) eher auf einen endosomalen Defekt der signalempfangenden Zelle, als auf eine ektopische Expression von Wg zurückzuführen ist.

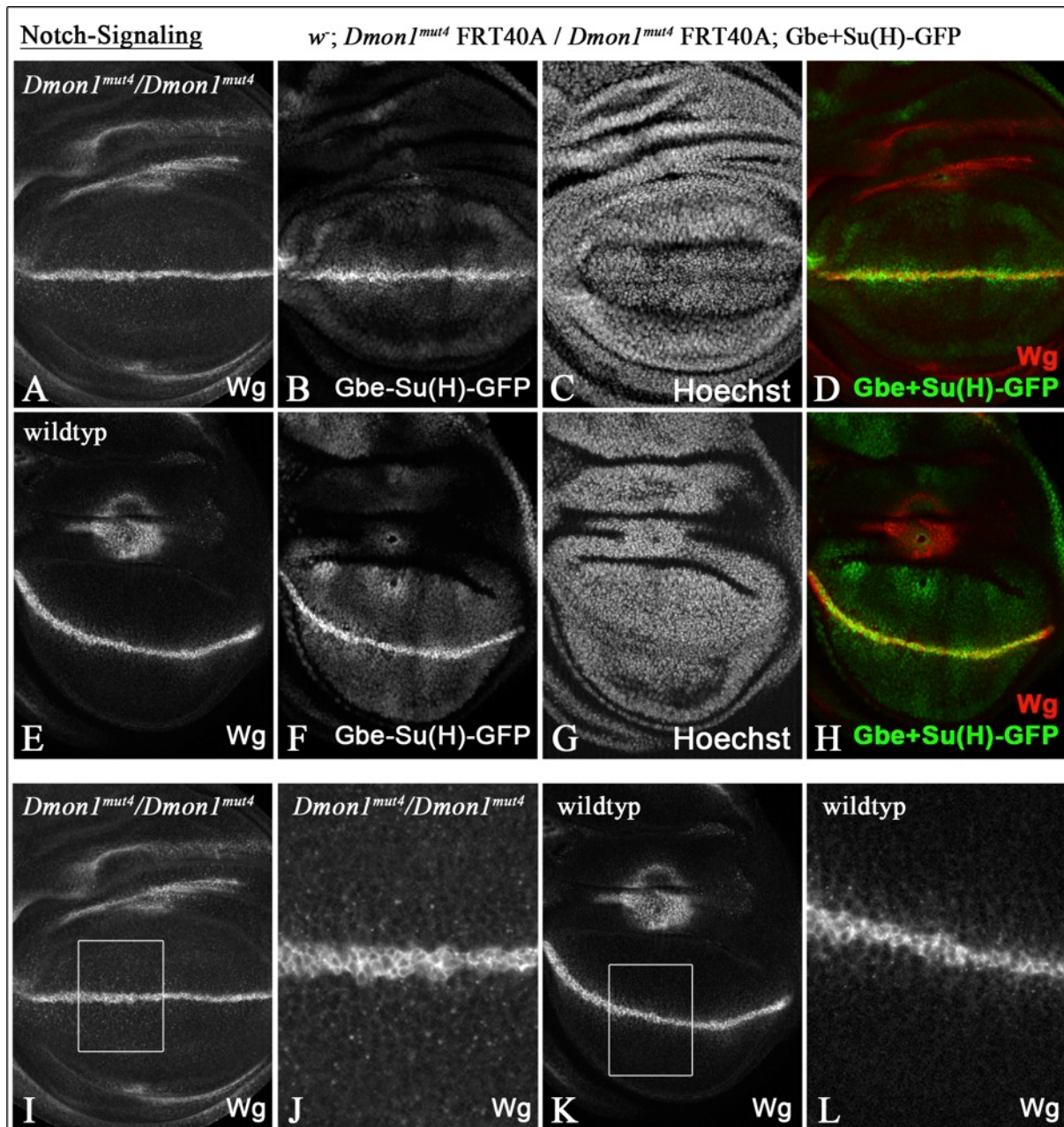


Abb.2.51: Die *Dmon1^{mut4}*-Mutation führt nicht zur einer ektopischen Aktivierung des Notch-Signalweges. Als Marker für die Aktivität des Notch-Signalweges wurde die Expression des Notch-Zielgens *wg* (A, D, E, H, I, J, K, L) und des Reportergenkonstrukts *Gbe+Su(H)-GFP* (B, D, F, H) verfolgt. Die Expressionsmuster von *Wg* und *Gbe+Su(H)-GFP* sind in den *Dmon1^{mut4}*-mutanten verglichen mit wildtypischen Flügelimaginalscheiben unverändert. Vergrößerte *Wg*-enthaltende Endosomen sind im Gegensatz zu den wildtypischen Flügelimaginalscheiben auch einige Zelldurchmesser entfernt von der Expressionsquelle zu sehen (Vergleich zwischen J und L). Zellkerne werden durch die Hoechst-Färbung markiert (C, G).

Auch die Aktivitäten der anderen Signalwege, gezeigt anhand der signalwegspezifischen Reportergenkonstrukten *argos-lacZ* bei EGF- (Abb.2.52: A1-A6), *Dfz3-lacZ* bei Wnt- (Abb.2.52: B1-B6), *dad-* und *omb-lacZ* bei dem Dpp-Signalweg (Abb.2.52: C1-D6) erscheint in den *Dmon1^{mut4}*-

mutanten Flügelimaginalscheiben verglichen mit den wildtypischen Flügelimaginalscheiben unverändert. Die *Dmon1^{mut4}*-Identität der untersuchten Flügelimaginalscheiben wird hier durch eine Antikörperfärbung gegen die extrazelluläre Domäne des Notch-Rezeptors anhand der *Dmon1^{mut4}*-typischen Akkumulation des Notch-Rezeptors gezeigt.

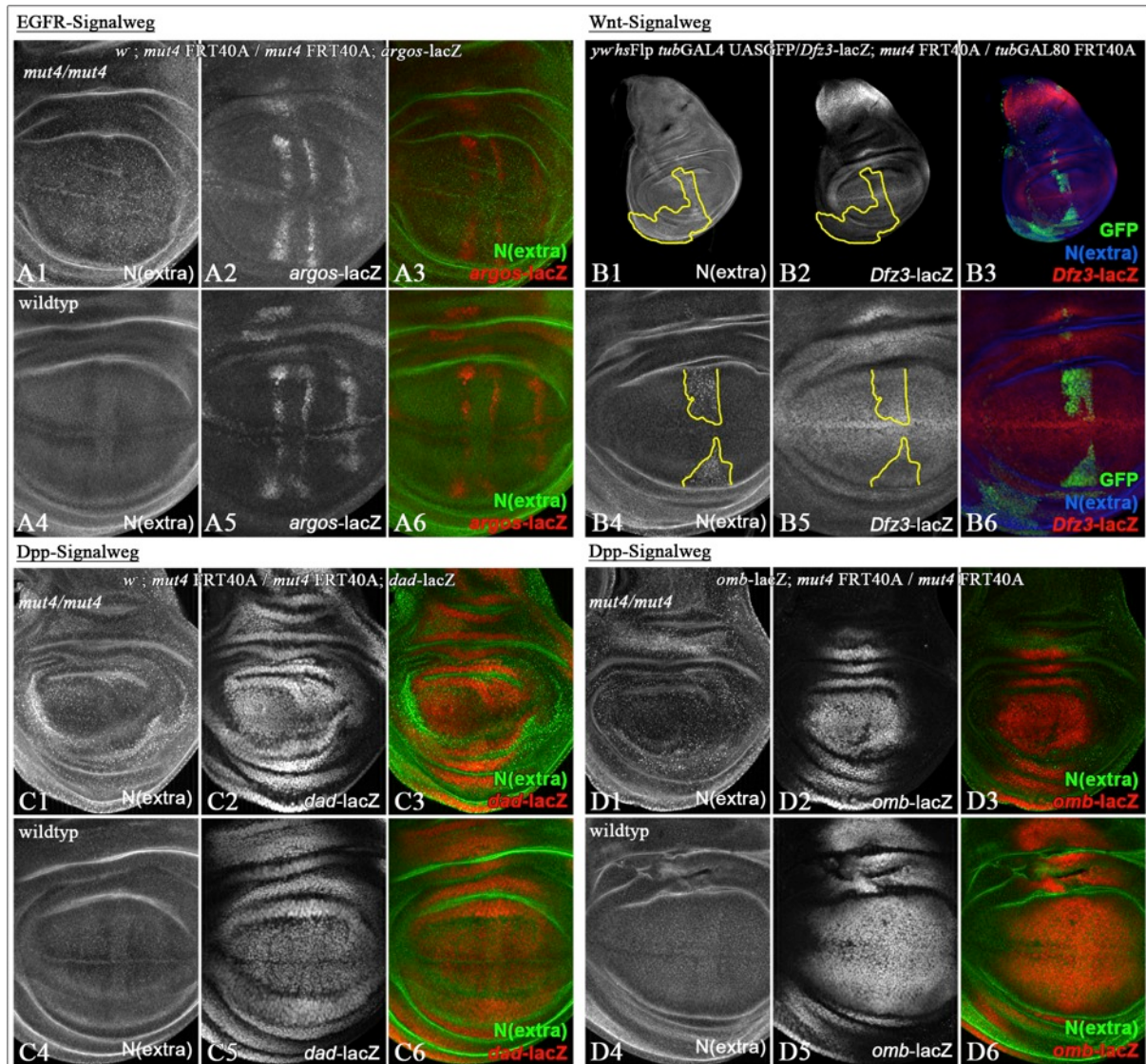


Abb.2.52: Die *Dmon1^{mut4}*-Mutation führt nicht zur ektopischen Aktivierung des EGF-, Wnt/Wg-, oder Dpp-Signalweges. Die Aktivität des EGF-Signalweges wurde mittels des Reporterkonstruktes *argos-lacZ* (A1-A3: *Dmon1^{mut4}*-mutante Flügelimaginalscheibe; A4-A6: wt-Flügelimaginalscheibe) verfolgt. Die Aktivität des Wnt-Signalweges wurde durch das Reporterkonstrukt *Dfz3-lacZ* mittels klonaler Analyse untersucht. Die mutanten Zellen sind durch die Anwesenheit des Marker-Konstrukts nls-GFP gekennzeichnet (B1-B6). Die Aktivität des Dpp-Signalweges wurde mittels der Reportergerkonstrukte *dad-lacZ* (C1-C3: *Dmon1^{mut4}*-mutante Flügelimaginalscheibe; C4-C6: wt-Flügelimaginalscheibe) und *omb-lacZ* (D1-D3: *Dmon1^{mut4}*-mutante Flügelimaginalscheibe; D4-D6: wt-Flügelimaginalscheibe) beobachtet.

Zusammengefasst konnte gezeigt werden, dass der Ausfall von *Dmon1* trotz der massiven Akkumulation der Liganden und Rezeptoren, keinen Einfluss auf die Signalübertragung der verschiedenen Signalwege hat.

3. DISKUSSION

Nach der Endozytose und der Internalisierung von Transmembranproteinen und anderen Substraten von der Plasmamembran fusionieren die endozytierten Vesikel miteinander wodurch frühe/sortierende Endosomen entstehen. Von hier können die jeweiligen Frachten verschiedene Wege einschlagen. Einige Proteine werden wieder zurück an die Zellmembran recycelt, wohingegen frühe Endosomen, deren Inhalt für den Abbau bestimmt ist, zu späten Endosomen reifen und zum Lysosom transportiert werden. Der Gesamtablauf der Prozesse des endosomalen Transportweges ist allerdings an vielen Stellen noch nicht aufgeklärt und verlangt nach weiteren Untersuchungen um genauer bzw. überhaupt verstanden zu werden.

In dieser Arbeit wurden die ersten Charakterisierungsschritte bezüglich einer bislang noch relativ unbekannten Komponente des endosomalen Transportweges, *Dmon1*, und dessen Interaktionspartners *Dccz1* in *Drosophila melanogaster* durchgeführt. Die Charakterisierungen wurden anhand eines null-Allels, *Dmon1^{mut4}*, durchgeführt, das im Rahmen dieser Arbeit charakterisiert worden ist. *Dmon1* liegt auf dem linken Arm des zweiten Chromosoms und enthält als einziges bis jetzt identifiziertes Strukturmerkmal eine sogenannte Longin-Domäne, welche in der Hefe für die Interaktion mit Ccz1p und Vps39p verantwortlich ist (Nordmann *et al*, 2010). Das Allel *Dmon1^{mut4}* trägt eine Punktmutation in der Transkriptionseinheit CG11926, die ein frühzeitiges Stopcodon nach 69 von insgesamt 528 Aminosäureresten noch vor der Longin-Domäne erzeugt.

Die Expression der Transkriptionseinheit CG11926, kodierend für *Dmon1*, rettet den Ausfallphänotyp der *mut4*-Mutation. Diese Rettung lieferte eine weitere Bestätigung, dass der Phänotyp von *mut4*-Mutanten tatsächlich durch den *Dmon1*-Genausfall verursacht ist.

3.1. Ausfall von *Dmon1* führt zur Entstehung vergrößerter Endosomen

Der Ausfall von *Dmon1* in *Dmon1^{mut4}*-mutanten Zellen führt zur Entstehung vergrößerter Vesikel deren Vergrößerung zuerst fluorezenzmikroskopisch festgestellt und anschließend elektronenmikroskopisch bestätigt wurde. Der Inhalt dieser Vesikel ist vielfältig, sie enthalten Transmembranproteine wie den Notch-Rezeptor, Patched, Delta, Serrate und Wingless als einen Vertreter sekretierter Proteine.

Ein Hinweis darauf, dass es sich bei *Dmon1^{mut4}*-Vesikeln um Endosomen handelt, ist die Akkumulation von Wg in mutanten Zellen. Das sekretierte Protein Wingless wird in

Flügelimaginalscheiben in zwei Zellstreifen entlang der dorso-ventralen Achse exprimiert, sekretiert (Gonzales *et al.*, 1991; Strigini und Cohen, 1999), von benachbarten Zellen durch Endozytose aufgenommen und dort mittels endosomalen Transportweg ins Lysosom gebracht und abgebaut (Strigini und Cohen, 2000; Marois *et al.*, 2006). In *Dmon1^{mut4}*-Zellklonen konnte Wingless sogar mehrere Zelldurchmesser von der Expressionsquelle entfernt in Vesikeln detektiert werden. Dies ist ein Hinweis darauf, dass diese Vesikel Endosomen sind und dass die Mutation zu einem Abbau-Defekt führt, der zu einer weiteren Ausbreitung von Wg von den exprimierenden Zellen an der dorso-ventralen Grenze der Flügelimaginalscheibe führt, als dies im wildtypischen Gewebe der Fall ist.

In dieser Arbeit durchgeführte *uptake*-Experimente weisen zusätzlich darauf hin, dass es sich bei den vergrößerten Vesikeln um Endosomen handelt. Ferner konnte durch die *uptake*-Experimente gezeigt werden, dass die Endozytose an sich, das heißt die Aufnahme und die Internalisierung von Proteinen und anderen Substraten von der Plasmamembran, in den mutanten Zellen nicht gestört ist.

Die Akkumulation verschiedener Proteine in den vergrößerten Endosomen der *Dmon1*-defekten Zellen deutet auch darauf hin, dass es sich bei *Dmon1* um einen generellen Faktor im endosomalen Transport handelt, welcher nicht spezifisch den Transport von nur einem bestimmten Protein reguliert.

3.2. *Dmon1^{mut4}*-Endosomen kolokalisieren mit spätendosomalen Markern

Als nächstes wurde untersucht, welches Stadium der Endozytose von der *Dmon1^{mut4}*-Mutation betroffen ist und von welcher Natur die vergrößerten Endosomen sind. Hierzu wurde die Assoziation der vergrößerten Endosomen mit verschiedenen endosomalen Markern untersucht.

Die vergrößerten *Dmon1^{mut4}*-Endosomen sind mit Rab4 assoziiert aber nicht mit Rab11. Auch ist die Verteilung von Rab11 in den mutanten Zellen verglichen mit den wildtypischen Zellen unverändert. Daraus kann geschlossen werden, dass es sich bei den *Dmon1^{mut4}*-Endosomen nicht um Rab11-vermittelte Recycling-Endosomen handelt und dass der Rab11-vermittelte Recycling-Transportweg nicht durch die *Dmon1^{mut4}*-Mutation betroffen ist.

Es bleibt aber die Frage bestehen, wie die Assoziation mit Rab4, die hier bei 92% der *Dmon1^{mut4}*-Endosomen beobachtet wurde, zu deuten ist. Rab4 vermittelt das Recycling direkt

von den frühen Endosomen, es wird auch teilweise gleichzeitig mit Rab5 auf frühen wildtypischen Endosomen beobachtet (Stenmark, 2009). Es wird allerdings davon ausgegangen, dass nur ein Teil der Rab4-positiven Vesikel in wildtypischen Zellen den Recycling-Endosomen zuzurechnen ist, während der größere Teil zusammen mit Rab5 frühe/sortierende Endosomen markiert (Maxfield und McGraw, 2004). Eine mögliche allgemeine Funktion von Rab4 besteht darin, die Motilität der frühen Endosomen sicherzustellen (Bananis *et al.*, 2003).

Rab5, als Marker früher Endosomen, kolokalisiert ebenfalls mit den vergrößerten *DmonI^{mut4}*-Endosomen. Weil Rabex-5, der GEF von Rab5, auch mit den vergrößerten Endosomen kolokalisiert, handelt es sich dabei wahrscheinlich um aktives, GTP-gebundenes Rab5. Die vergrößerten *DmonI^{mut4}*-Endosomen sind zu 92% mit Rab4 und zu 43% mit Rab5 kolokalisiert, was dafür spricht, dass viele der *DmonI^{mut4}*-Endosomen gleichzeitig positiv für beide Marker sind, und dass diese somit frühen/sortierenden Endosomen zuzurechnen sind. Die Endosomen, die nur mit Rab4 assoziiert sind, sind ebenfalls eher den frühen/sortierenden als den Recycling Endosomen zuzurechnen. Diese Einstufung kann zum einen so getroffen werden weil, wie schon oben dargelegt, nur ein Teil der Rab4-tragenden Endosomen dem Recycling zuzurechnen ist. Zum anderen wurde bei Experimenten, in denen Rab4 überexprimiert wurde beobachtet, dass die dabei vermehrt entstehenden Rab4-positiven Recycling-Endosomen dadurch gekennzeichnet waren, dass die Vesikel nicht angesäuert waren (van der Sluijs *et al.*, 1992). Wie weiter unten in Detail noch dargelegt wird, weisen die *DmonI^{mut4}*-spezifischen Endosomen allerdings ein saures Milieu auf, was gegen einen Recycling-Charakter dieser Vesikel spricht. Zusammengefasst ist davon auszugehen, dass die *DmonI^{mut4}*-spezifischen Endosomen nicht dem Recycling-Transportweg zuzurechnen sind.

Wie in dieser Arbeit beobachtet wurde, bindet auch FYVE-GFP an die Membranen der vergrößerten *DmonI^{mut4}*-Endosomen. Da die FYVE-Domäne spezifisch an Membranen, die das Lipid PI(3)P enthalten bindet (Gillooly *et al.*, 2000; Kutateladze und Overduin, 2001), ist hieraus zu schließen, dass die Membranen der vergrößerten Endosomen dieses Lipid enthalten. PI(3)P wird durch den Rab5-Effektor Vps34 produziert (Schu *et al.*, 1993; Linassier *et al.*, 1997). Zur Rekrutierung von Vps34 ist die Bindung vom aktivierten Rab5 an die endosomale Membran notwendig (Christoforidis *et al.*, 1999; Murray *et al.*, 2002). Weil PI(3)P sich an der Membran der vergrößerten Endosomen nachweisen lässt, ist von einer ungestörten, Rab5-vermittelten Rekrutierung von Vps34 in *DmonI^{mut4}*-Zellen auszugehen.

Das bestätigt die oben gemachte Aussage, dass Rab5 in seiner aktiven Form an den *Dmon1^{mut4}*-Vesikeln gebunden ist.

Durch PI(3)P auf der Membran der Endosomen können Proteine die eine FYVE-Domäne besitzen, wie Hrs und der erwähnte Rab5-Effektor EEA1 an die Membran der Endosomen rekrutiert werden. Folgergemäß wurde auch die Bindung von Hrs, einer Komponente des ESCRT-0-Komplexes, an die Membranen der vergrößerten Endosomen beobachtet. Üblicherweise ist dies der erste Schritt zur Rekrutierung weiterer ESCRT-Proteine deren Bindung und Funktion zur Bildung von intraluminalen Vesikeln (ILV) der *Multivesicular bodies* (MVBs) führt (Raiborg und Stenmark, 2009; Henne *et al.*, 2011). Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen, welche vergrößerte Endosomen mit ausgebildeten ILV zeigen, bestätigen, dass diese Prozesse in *Dmon1^{mut4}*-mutanten Zellen stattfinden. Das bedeutet, dass die ESCRT-Maschinerie und die Bildung von ILV nicht durch die *Dmon1^{mut4}*-Mutation betroffen sind und dass dieser Prozess in *Dmon1^{mut4}*-mutanten Zellen offenbar ungestört ablaufen kann.

Ferner sind die vergrößerten *Dmon1^{mut4}*-Endosomen auch mit den Markern des spätendosomalen Kompartiments Spinster und Deep orange (Dor) kolokalisiert. Es wurde aber keine Kolokalisation mit dem spätendosomalen Marker Rab7 beobachtet. Dabei ist die zelluläre Lokalisation von Rab7 verändert. Im Gegensatz zu einer wildtypischen Lokalisierung an reifen/späten Endosomen liegt in *Dmon1^{mut4}* mutanten Zellen Rab7 nur zytoplasmatisch vor. Mit anderen Worten scheint die Rekrutierung von Rab7 an die Endosomen gestört zu sein. Die Färbung mit dem LysoTracker zeigt, dass das Milieu innerhalb der *Dmon1^{mut4}*-Endosomen sauer ist. Außerdem sind die *Dmon1^{mut4}*-Endosomen auch mit dem spätendosomalen/lysosomalen Marker Lamp-1 kolokalisiert aber nicht mit dem lysosomalen Marker Arl8. Auch die Verteilung von Arl8 an sich ist unverändert. Wie elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen, sind Lysosomen vorhanden und weisen eine wildtypische Morphologie auf. Die Lysosomen an sich sind also durch die *Dmon1^{mut4}*-Mutation nicht betroffen.

Zusammengefasst weisen die *Dmon1^{mut4}*-Endosomen sowohl Marker der frühen/sortierenden wie der reifen Endosomen auf. Aufgrund der beobachteten Bildung intraluminaler Vesikel und dem sauren Innenmedium dieser Endosomen sind diese jedoch eher den reifen Endosomen zuzurechnen. Weil ferner Rab7 nicht an die *Dmon1^{mut4}*-Endosomen rekrutiert

wird, sind die beobachteten Phänotypen in *Dmon1^{mut4}*-mutanten Zellen wahrscheinlich auf eine Blockade der Rab7-Funktion bei der Fusion dieser reifen Endosomen mit dem Lysosom zurückzuführen. Der Ausfall von Rab7 führt zu einem dem *Dmon1^{mut4}*-ähnlichen Phänotyp, nämlich ebenfalls zur Entstehung von vergrößerten und dabei sauren MVBs. Dieser Phänotyp ist ein weiterer Hinweis darauf, dass dieser Übergang in *Dmon1^{mut4}*-mutanten Zellen gestört ist.

Ferner stellt das Vorhandensein von Lysosomen mit normaler Morphologie in *Dmon1^{mut4}*-mutanten Zellen eine Bestätigung des in den Säugetierzellen vorgeschlagenen Modells dar, dass die endosomale Fracht den Lysosomen durch Fusion mit den Endosomen zugeführt wird. Diese also zwei voneinander getrennte Strukturen darstellen und nicht dass die Lysosomen lediglich durch Reifung der Endosomen entstehen (Pryor und Luzio, 2009; Luzio *et al.*, 2007).

3.3. Die Fusion mit dem Lysosom aber nicht die Reifung von Endosomen ist Rab7-abhängig

Im Lichte der hier gewonnenen Daten scheint eine der Hauptfunktionen von *Dmon1* die Rekrutierung von Rab7 an die Endosomen zu sein, was die Voraussetzung für den Übergang der endosomalen Fracht in die Lysosomen ist. Die vergrößerten Endosomen in *Dmon1^{mut4}*-mutanten Zellen in Flügelimaginalscheiben von *Drosophila* zeigen alle Anzeichen reifender Endosomen auf. Die vergrößerten Endosomen sind sauer und elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen, dass darin ILV vorhanden sind. Auch sind Marker später/reifer Endosomen mit diesen Endosomen kolokalisiert.

Allem Anschein nach fehlt nur die Fusion mit dem Lysosom, was vermutlich auf eine Fehlfunktion von Rab7 zurückzuführen ist. Dabei ist in *Dmon1^{mut4}*-mutanten Zellen nicht die Expression von Rab7 sondern seine Lokalisation durch die Mutation betroffen. Die Fehllokalisation von Rab7 scheint somit für seine Fehlfunktion verantwortlich zu sein. Das deutet darauf hin, dass Rab7 für die Erfüllung seiner Funktion, die Fusion der reifen/späten Endosomen mit dem Lysosom, an die diesbezüglichen Zielmembranen gebunden sein muss. Allerdings ist Rab7 obwohl es die Fusion von reifen/späten Endosomen mit dem Lysosom einleitet, anscheinend nicht für die Reifung der Endosomen erforderlich, da die in dieser Arbeit untersuchten Aspekte der endosomalen Reifung in *Dmon1^{mut4}*-mutanten Zellen ohne die Funktion von Rab7 stattfinden.

3.4. Die Rab-Konversion scheint betroffen zu sein in *Dmon1^{mut4}* Zellen

Während der Reifung von Endosomen verändert sich die Zusammensetzung der Proteine auf deren Membranen, wobei charakteristischerweise Rab5 gegen Rab7 ausgetauscht wird (Rink *et al.*, 2005). Die hier durchgeführte statistische Analyse zeigt, dass Rab5 in den *Dmon1^{mut4}*-mutanten Zellen zu einem erhöhten Anteil mit Endosomen assoziiert ist, Rab7 dagegen keine feststellbare Assoziation mit Endosomen aufweist.

Während der normalen endosomalen Reifung wurde beobachtet, dass die Membran mancher wildtypischer Endosomen gleichzeitig Rab5 und auch Rab7 enthält (Rink *et al.*, 2005). In *Dmon1^{mut4}*-mutanten Zellen steigt der Anteil Rab5-assoziierter Endosomen, Rab7 aber ist gar nicht mehr an vesikulären Strukturen zu beobachten. Allerdings sind in mutanten Zellen auch Endosomen zu beobachten, die kein Rab5 mehr aufweisen. Die Anwesenheit des Markers FYVE-GFP auf der Membran der Endosomen deutet darauf hin, dass die Rab5 vermittelte Rekrutierung von Vps34 stattfindet. Das heißt, dass Rab5 in seiner aktiven Form an die Endosomen assoziiert gewesen sein muss. Auch Rab5-freie Endosomen müssen auf Grund der Anwesenheit von FYVE-GFP zu einem vorherigen Zeitpunkt mit Rab5 assoziiert gewesen sein. Vermutlich akkumuliert also durch die *Dmon1^{mut4}*-Mutation Rab5 nicht an den Endosomen, sondern verbleibt nur länger an diesen, während Rab7 nicht dorthin rekrutiert wird. Das deutet auf eine Störung im Prozess der Rab-Konversion durch die *Dmon1^{mut4}*-Mutation hin. Die gleiche Beobachtung wurde auch für das Mon1-Homolog Sand-1 in *C. elegans* gemacht (Poteryaev *et al.*, 2010; Kinchen und Ravichandran, 2010), was auf eine konservierte diesbezügliche Funktion von Mon1 hindeutet. Der verlängerte Aufenthalt von Rab5 auf der Membran der Endosomen, welcher seinerseits zur vermehrten Rab5-abhängigen homotypischen Fusion führt (Bucci *et al.*, 1992; Gorvel *et al.*, 1991), stellt wahrscheinlich die Erklärung für die Vergrößerung der Endosomen in *Dmon1^{mut4}*-mutanten Zellen dar.

In *Dmon1^{mut4}*-mutanten Zellen ist die Anzahl der Rab4-assozierten Endosomen, ähnlich wie bei Rab5, erhöht. Es sind aber auch Rab4-freie Endosomen zu beobachten, was möglicherweise auch hier auf einen verlängerten Aufenthalt von Rab4 auf der Membran der Endosomen hinweist. Wenn die beiden Marker in *Dmon1^{mut4}*-mutanten Zellen länger an den Endosomen gebunden blieben, während Rab7 gar nicht an die Endosomen rekrutiert wird, könnte *Dmon1* für die Entfernung von sowohl Rab4 als auch Rab5 zuständig sein. Angesichts dessen, dass die Funktion von Rab4 neben der Beteiligung an Recyclingvorgängen noch nicht

vollständig aufgeklärt ist und, wie oben beschrieben, Rab4 auch eine mögliche Funktion bezüglich der Motilität der Vesikel hat, ist es vorstellbar, dass während der Rab-Konversion neben Rab5 auch weitere Proteine wie Rab4 von den Endosomen gelöst werden. Der erhöhte Rab4 und Rab5-Anteil an den Endosomen wäre dann als Folge der gestörten Rab-Konversion zu sehen.

Rab-GTPasen wurden im Endomembransystem funktionell der Anbindung von Membranen zugeordnet (Zerial und McBride, 2001). Hierbei ist das Vorhandensein der RAB-Proteine für eine Erkennung der zu fusionierenden Membranen und die nachfolgende SNARE-vermittelte Fusion notwendig.

Diese Theorie, dass die Rab-Proteine vorwiegend für eine Erkennung der Membranen, die miteinander fusionieren sollen zuständig sind, konnte in dieser Arbeit zum Teil bestätigt werden. Die verlängerte Bindungszeit von Rab5 und Rab4 bedingt durch die Fehlfunktion von *Dmon1* hat keinen feststellbaren Einfluss auf der Reifung der Endosomen, außer dass die Endosomen sich wegen der Rab5-abhängigen, homotypischen Fusion vergrößern. Auch die *Dmon1^{mut4}*-bedingte Fehlfunktion von Rab7 hat keinen feststellbaren Einfluss auf die Reifung der Endosomen, nur die Fusion mit Lysosomen scheint dadurch betroffen zu sein.

3.5. Mon1 ist in verschiedenen Organismen konserviert

Ein Datenbankvergleich wie auch bereits vorhandene Untersuchungen zu Mon1 zeigen, dass Mon1 in vielen Organismen angefangen mit der Hefe vorkommt. Die Hefe und Invertebraten weisen nur je ein Homolog von Mon1 auf, während es in Vertebraten zwei Homologe von Mon1 gibt, Mon1a und Mon1b. Der Aminosäuresequenzvergleich in den verschiedenen Organismen zeigt, dass Mon1 von der Hefe bis zu den Vertebraten hochkonserviert ist.

Neben der Sequenzkonservierung galt es in dieser Arbeit festzustellen, ob gegebenenfalls auch die Funktion von Mon1 in den Organismen konserviert ist.

In Hefe und *C. elegans* wurde die Involvierung von Mon1p/SAND-1 im endosomalen Transportweg und bei der Rekrutierung von Rab7 gezeigt (Wang *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2003; Poteryaev *et al.* 2007; Poteryaev *et al.*, 2010; Nordmann *et al.* 2010; Kinchen und Ravichandran, 2010). In dieser Arbeit konnte Mon1 auch in *Drosophila* eine regulierende Rolle im endosomalen Transportweg und bei der Rekrutierung von Rab7 an die Endosomen

zugeordnet werden. In Vertebraten scheinen die beiden Homologen unterschiedliche Funktionen zu haben. Während Mon1A anscheinend keine direkte Verbindung zum endosomalen Transportweg hat und eher bei der Exozytose beteiligt ist (Wang *et al.*, 2007), wurde MON1B in Assoziation mit Lysosomen festgestellt (Schröder *et al.*, 2007), was auf eine mögliche Diversifizierung der Funktion hindeutet, wobei Mon1B weiterhin die auch in niederen Organismen konservierte Funktion haben könnte (Pryor und Luzio, 2009; Spang, 2009). Hierfür spricht auch die in dieser Arbeit bestätigte Tatsache, dass die Mon1B-Sequenz eine höhere Ähnlichkeit und Konservierung mit den Mon1-Sequenzen der niederen Organismen zeigt.

Die bereits erforschten Kenntnisse über die Funktion von Mon1p/SAND-1 aus Hefe und *C. elegans* dienten in dieser Arbeit als Ausgangspunkt zur Bestimmung der Funktion von Mon1 in *Drosophila*. Zu einem um rauszufinden wie konserviert die Funktion von Mon1 in den verschiedenen Organismen ist, zum anderen um die Funktion von Mon1 in *Drosophila* zu charakterisieren.

3.5.1. Eine Interaktion zwischen Dmon1 und Dccz1 scheint auch in *Drosophila* zu bestehen

Aus der Hefe ist bekannt, dass Mon1p mit Ccz1p einen Komplex bildet und dass beide Proteine zusammen am letzten Schritt des Frachttransportes zu der Vakuole (dem Hefe-Äquivalenten des Lysosoms) involviert sind (Wang *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2003). In *C. elegans* wurde gezeigt, dass SAND-1, das Ortholog von Dmon1, zusammen mit Ccz1 an der Verarbeitung von Phagosomen beteiligt ist (Kinchen und Ravichandran, 2010).

Die Untersuchungen in dieser Arbeit zeigten auf genetischer Basis, dass die Interaktion mit Dccz1 auch in *Drosophila* besteht. *Drosophila Ccz1, Dccz1*, liegt auf linken Arm des dritten Chromosoms (3L) und hat die Transkriptionseinheit CG14980. Der Ausfall von *Dccz1* zeigt einen ähnlichen Phänotyp wie der *Dmon1*-Ausfall, führt nämlich zur Entstehung vergrößerter Endosomen, die mit Rab4 und Rab5 kolokalisieren. Dazu wurde auch die veränderte Lokalisation von Rab7, zytoplasmatisch und nicht mehr gebunden an die Endosomen, beobachtet.

Dass die Überexpression von Dmon1 oder Dccz1 alleine keinen Einfluss auf den endosomalen Transportweg hat, aber die Überexpression von beiden zusammen eine

Vergrößerung von Endosomen und die Veränderung der Lokalisation von Rab5 und Rab7 zur Folge hat, ist ebenfalls ein Hinweis darauf, dass beide Proteine in *Drosophila* einen Komplex bilden und dass diese Komplex-Bildung für ihre Funktionalität notwendig ist.

Zusammengefasst scheint also die Interaktion zwischen den beiden Proteinen Dmon1 und Dccz1 auch in *Drosophila* zu bestehen. Ein Komplex aus diesen beiden Proteinen wird dabei wahrscheinlich für die Rekrutierung von Rab7 an die Endosomen und die anschließende Fusion mit dem Lysosom benötigt.

3.5.2. Der Ausfall oder die Überexpression von Dmon1 hat keinen Einfluss auf die Verteilung von Rabex5

Poteryaev *et al.* (2010) haben die Funktion von SAND-1 als eine Art Schalter bei der Umwandlung von frühen zu späten Endosomen dargestellt (Abb.1.7). Dieser soll Rab5 entfernen und Rab7 an die Membranen rekrutieren. Weil keine direkte Interaktion von SAND-1 mit Rab5 aufzuzeigen war, wurden von den Autoren auch mögliche Interaktionen mit GEFs von Rab5 untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass SAND-1 mit Rabex-5 interagiert. Bindung vom aktivierten Rab5 an die Membran führt dazu, dass mehr Rab5-Effektoren und anschließend mehr aktiviertes Rab5 an die Membran rekrutiert werden. Dadurch entsteht eine positive Rückkopplungsschleife, die durch SAND-1 unterbrochen werden kann. SAND-1 reguliert die Funktion von Rabex-5 durch seine Entfernung von der Membran der Endosomen. In *sand-1*-mutanten Zellen akkumuliert Rabex-5 auf der Membran der Endosomen. Bei Überexpression von Mon1a und Mon1b in HeLa-Zellen dagegen wird Rabex-5 von der Membran freigegeben und lokalisiert im Zytoplasma (Poteryaev *et al.*, 2010).

In dieser Arbeit wurde daher untersucht, ob zwischen Dmon1 und Rabex-5 in *Drosophila* ebenfalls eine Interaktion festzustellen ist.

Zunächst wurde die Verteilung von Rabex-5 in mutanten Zellen untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Verteilung von Rabex-5 in den *Dmon1^{mut4}*-mutanten Zellen verglichen zu den daneben liegenden wildtypischen Zellen unverändert apikal war. Es wurden auch *Dmon1*-RNAi exprimierende Zellen und wildtypische Zellen in denselben Flügelimaginalscheiben miteinander verglichen. Sowohl bei diesem Experiment wie auch bei Expression von *Dccz1*-RNAi, gerichtet gegen den Dmon1-Interaktionspartner, war die Lokalisation von Rabex-5 unverändert wildtypisch. Zuletzt wurde auch Dmon1

überexprimiert. Auch hier wiesen Dmon1-überexprimierende Zellen verglichen mit den daneben liegenden wildtypischen Zellen eine unveränderte Verteilung von Rabex-5 auf.

Zusammenfassend hat sowohl der Ausfall als auch die Überexpression von Dmon1 keine Wirkung auf die Lokalisation von Rabex-5 in den Zellen der Flügelimaginalscheiben von *Drosophila*. Entgegen den Ergebnissen in *C. elegans* und Hefe konnte also keine Interaktion zwischen den beiden Proteinen in *Drosophila* festgestellt werden.

3.5.3. Der Ausfall von *Dmon1* beeinträchtigt nicht die Motilität der Endosomen

Endosomen sind mobile Strukturen und bewegen sich in der Zelle von der Plasmamembran zur perinukleären Region entlang von Mikrotubuli hin und her (Huotari und Helenius, 2011). Frühe Endosomen befinden sich in der Nähe der Plasmamembran und wandern während des Reifungsprozesses weiter Richtung Zellkern (Huotari und Helenius, 2011). Reife/späte Endosomen befinden sich tiefer in der Zelle in Zellkernnähe. Mittels EM-Aufnahmen konnte beobachtet werden, dass die vergrößerten Endosomen in *Dmon1^{mut4}*-mutanten Zellen sich in der perinukleären Region der Zelle, in der Nähe vom Zellkern befinden. Das weist auf eine unbeeinträchtigte Motilität der Endosomen in den mutanten Zellen hin.

Den Beobachtungen von Cantalupo *et al.* (2001) und Jordens *et al.* (2001) nach ist der Rab7-Effektor RILP (*Rab7-interacting lysosomal protein*) welcher spezifisch mit GTP-gebundenem Rab7 interagiert, für den Transport zum Lysosom notwendig. Cantalupo *et al.* und Jordens *et al.* interpretierten ihre Ergebnisse derart, dass RILP an der Bindung von Rab7-gebundenen Strukturen an Motorkomplexe und/oder an das Zytoskelett beteiligt ist und die Dynein-vermittelte Bewegung der Endosomen zum Lysosom koordiniert. Es stellt sich die Frage, wie die intakte Motilität von Endosomen in *Dmon1^{mut4}*-mutanten Zellen bis in der perinukleären Region angesichts dieser Befunde stattfinden kann. Dies könnte dadurch zu erklären sein, wenn andere Mechanismen neben RILP und Rab7 für die Motilität der Endosomen alternativ zuständig sein könnten, oder wenn die Befunde von Cantalupo *et al.* und Jordens *et al.* nur für einen Teilabschnitt des endosomalen Transportes zutreffend wären. Ein Hinweis darauf, dass Rab7 zusammen mit RILP nur für einen Teilabschnitt des Transportes verantwortlich sind ist darin zu sehen, dass beide normalerweise nur in Assoziation mit reifen/späten Endosomen und Lysosomen zu beobachten sind (Cantalupo *et al.*, 2001).

Alternative Mechanismen, bzw. Mechanismen, die für den Transport in den vorhergehenden Teilabschnitten verantwortlich sind könnten Rab5- und/oder Rab4-abhängig sein. Rab5 spielt anscheinend neben seinen Funktionen bei Membranfusionen auch eine Rolle bei der Motilität der frühen Endosomen in Richtung der perinukleären Region der Zelle (Nielsen *et al.*, 1999; Huotari und Helenius, 2011). Wie auch schon weiter oben beschrieben, hat auch Rab4 eine mögliche Funktion bei der endosomalen Motilität (Bananis *et al.*, 2003). Es ist daher möglich, dass RILP erst nach der Rab-Konversion seine Funktion bezüglich des Transports zum Lysosom ausübt. Das bedeutet, dass der Transport der Endosomen in *Dmon1^{mut4}*-mutanten Zellen vermutlich bis in den perinukleären Raum ungestört ist. Erst der letzte Schritt, der Transport bis in der Nähe des Lysosoms und die anschließende Fusion mit dem Lysosom, ist demnach in *Dmon1^{mut4}*-mutanten Zellen gestört. Hierfür ist vermutlich die fehlende Rekrutierung von Rab7 verantwortlich. Angesichts der momentan vorhandenen Daten muss vorerst offen bleiben, welche mögliche Rab7-Funktion hierbei gestört ist, die Beteiligung von Rab7 an der Fusion mit dem Lysosom, eine Funktion bei der Bewegung der Endosomen zusammen mit RILP bis zum Lysosom, oder vielleicht auch beide.

Von einer anderen Arbeitsgruppe wurde berichtet, dass RILP in HeLa-Zellen mit Vps22, einer Komponente des ESCRT-II-Komplexes, interagiert und an der Bildung von ILV involviert ist (Progida *et al.*, 2007). Das Vorhandensein von ILV in vergrößerten *Dmon1^{mut4}*-Endosomen steht also im möglichen Widerspruch zu dieser vermuteten Funktion von RILP. Dieser vermutete Widerspruch ergibt sich daraus, dass in den hier beschriebenen Experimenten kein Einfluss des *Dmon1*-Ausfalls auf die Bildung von ILV beobachtet werden konnte. Daraus folgt, dass RILP, falls es auch in *Drosophila* mit GTP-gebundenem Rab7 interagiert, entweder nicht an der Bildung von ILV der Endosomen beteiligt ist, oder RILP seine Funktion in diesem Punkt unabhängig von Rab7 ausübt.

3.5.4. *Dmon1^{mut4}*-Endosomen zeigen keine Kollokalisierung mit autophagosomalen Markern

Mon1p aus der Hefe ist neben anderen Prozessen auch an der Autophagie beteiligt. Mehrere Untersuchungen konnten zeigen, dass Rab7 wahrscheinlich eine wesentliche Rolle in der Autophagie spielt, indem es für den letzten Schritt, die Fusion der Autophagosomen mit dem Lysosom notwendig ist (Gutierrez *et al.*, 2004; Jäger *et al.*, 2004). Aufgrund der in *Dmon1^{mut4}*-mutanten Zellen beobachteten zytoplasmatischen Fehllokalisation von Rab7 wurde daher erwartet, dass auch die Autophagie negativ beeinflusst wird, einige der vergrößerten Vesikel Autophagosomen sind und die entsprechenden Marker tragen.

Im Gegensatz zu dieser Erwartung zeigten Färbungen mit dem autophagosomalen Marker Atg8 in *Drosophila* eine wildtypische Verteilung in *Dmon1^{mut4}*-mutanten Zellen und auch die vergrößerten Endosomen zeigten keine Kollokalisierung mit dem Marker.

Ein Grund dafür könnten die untersuchten Gewebe sein. Der Prozess der Autophagie findet eventuell in der Flügelimaginalscheibe nicht im hohen Maße statt zumindest konnten innerhalb dieser Arbeit bei EM-Aufnahmen kaum Autophagosomen auch in wildtypischen Flügelimaginalscheiben festgestellt werden. Fettgewebe stellt möglicherweise ein geeigneteres Gewebe für diese Untersuchungen dar (Zirin und Perrimon, 2010; Rusten *et al.*, 2004; Scott *et al.*, 2004).

Ein weiterer Grund besteht außerdem vielleicht in der höheren Komplexität von *Drosophila* verglichen zur Hefe. Möglicherweise gibt es in *Drosophila* alternative Mechanismen, die das Prozessieren der Autophagosomen auch bei fehlender Rab7-Funktion vorantreiben oder Rab7 wird in *Drosophila* anders als in der Hefe, durch andere, Mon1-unabhängige Mechanismen an die Membran der Autophagosomen rekrutiert.

3.5.5. Der Ausfall von *Dmon1* und *Dccz1* hat anders als in der Hefe keinen Einfluss auf die Morphologie der Lysosomen

Zu den Lysosomen werden nicht nur die zum Abbau bestimmten Frachten transportiert sondern auch lysosomale Proteine wie Hydrolasen die in Golgi-Apparat synthetisiert werden. Manche Proteine werden direkt vom Golgi-Apparat zu den Lysosomen transportiert, während andere zuerst zur Plasmamembran gebracht und durch Endozytose aufgenommen werden (Pryor und Luzio, 2009). Die Hydrolasen und die lysosomalen Proteine sind für die Aufrechterhaltung von Lysosomen von Bedeutung. Es konnte in Zellkulturexperimenten gezeigt werden, dass Rab7 eine entscheidende Rolle bei der Biogenese und Aufrechterhaltung von Lysosomen spielt (Bucci *et al.*, 2000). In der Hefe wurden Mon1 und Ccz1 der Klasse B der Vps-Proteine zugeordnet, deren Ausfall eine fragmentierte Vakuole (äquivalent zu den Lysosomen) als Phänotyp zur Folge hat (Kucharczyk *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2002).

Im Rahmen dieser Arbeit erstellte elektronenmikroskopische Aufnahmen der Flügelimaginalscheiben bei Ausfall von *Dmon1*, *Dccz1* und *rab7* zeigen allerdings keine Veränderung in der Morphologie der Lysosomen. *Drosophila* ist verglichen zur Hefe

komplexer und es ist möglich, dass andere Mechanismen und Proteine in *Drosophila* für den Transport lysosomaler Proteine zuständig sind.

Zusammengefasst ist Mon1/SAND-1 in Hefe, *C. elegans* und *Drosophila* an dem endosomalen Transport beteiligt. Die auffälligste Ähnlichkeit die in den Untersuchungen über *mon1/sand-1* in der Hefe und *C. elegans* mit denen hier beschriebenen in *Drosophila* gefunden wurde, ist die Regulierung der Funktion und der Lokalisation von Rab7. In allen untersuchten Organismen führt der Ausfall von *mon1* zur Fehllokalisation von Rab7. Ebenso wurde Ccz1 als Interaktionspartner von Mon1/SAND-1 in Hefe, *C. elegans* und *Drosophila* festgestellt und die Interaktion beider Proteine als wesentlich für ihre Funktion erkannt.

Wie oben beschrieben, konnten allerdings in *Drosophila* auch Unterschiede bezüglich der Funktion von Mon1 im Vergleich zu den Beobachtungen in anderen Organismen festgestellt werden, die darauf deuten, dass zumindest einige Funktionen nicht sehr stark konserviert sind. Zum Beispiel ist die Lokalisation von Rabex-5 in *Dmon1^{mut4}*-mutanten Zellen in *Drosophila* unverändert im Gegensatz zu den *sand-1 (or552)*-mutanten Zellen in *C. elegans*, auch konnte im Gegensatz zur Hefe kein Einfluss auf Autophagie festgestellt werden.

Ferner konnte die Expression von Mon1p aus der Hefe nicht den Ausfallphänotyp von *Dmon1* in *Drosophila* retten, wogegen Sand-1 aus *C. elegans* teilweise den Ausfallphänotyp von Mon1p in der Hefe retten kann (Potereyva *et al.*, 2005). Allerdings könnte das Fehlen einer Rettung des *Dmon1*-Ausfalls durch Mon1p aus der Hefe neben einer veränderten Funktion von *Dmon1* auch andere Gründe haben. Wie schon erwähnt, ist es aus Untersuchungen in der Hefe bekannt, dass Mon1p zur Erfüllung seiner Funktion einen Komplex mit Ccz1p bildet und dass es ferner zumindest mit Vps39p einen weiteren Interaktionspartner gibt (Wang *et al.*, 2002 und 2003; Nordmann *et al.*, 2010). Es könnte sein, dass Mon1p aus der Hefe möglicherweise nicht mit diesen oder weiteren Interaktionspartnern aus *Drosophila* interagieren kann. Der festgestellte Unterschied in der Funktion könnte also sequenzbedingt auf eine fehlende Interaktion mit den Interaktionspartnern zurückzuführen sein. Zum anderen erscheint verglichen mit *Dmon1*-HA die Expression von Mon1p-HA viel schwächer und hat keine klare Lokalisation in der Zelle (Abb.2.35), was darauf hindeutet, dass Mon1p-HA in *Drosophila* möglicherweise nicht in ausreichender Höhe exprimiert wurde um den *Dmon1* Ausfallphänotyp zu retten.

In Anbetracht des hohen Konservierungsgrades der Mon1-Sequenz zwischen den unterschiedlichen Organismen war eigentlich davon auszugehen, dass die Funktionen ebenfalls stark konserviert sind. Die in dieser Arbeit beobachteten Unterschiede könnten daher entweder auf organismenspezifische Mechanismen zurückzuführen sein oder darauf, dass die Funktion von Mon1 nicht in dem Ausmaß konserviert ist wie es die Konservierung der Sequenz nahelegt.

3.6. Der *Dmon1*-Ausfall hat keinen Einfluss auf die Aktivität verschiedener Signalwege

Der endosomale Transportweg kontrolliert unter anderem verschiedene Signaltransduktionswege (Sorkin und von Zastrow, 2002, 2009; Fischer *et al.*, 2006). Ein Ausfall von Genen, die in den endosomalen Transportweg involviert sind führt zum Teil zur Überproliferation als Folge der Überaktivierung verschiedener Signalwege (Vaccari und Bilder, 2009). Es wurde gezeigt, dass hierbei der Ausfall der Komponenten der ESCRT-Maschinerie zur ektopischen Überaktivierung der Signaltransduktionswege führt, zum Beispiel des Notch oder des RTK-Signalweges, was vermutlich auf eine Fehlfunktion des Verpackens der aktiven Rezeptoren in die ILV der MVBs zurückzuführen ist (Jekely und Rorth, 2003; Moberg *et al.*, 2005; Thompson *et al.*, 2005; Vaccari und Bilder, 2005). Hierbei wurde für RTK-Rezeptoren auch gezeigt, dass diese nach der Internalisierung weiterhin in den Endosomen aktiv sind und erst nach Einbau in ILV inaktiv werden (Sorkin und Zastrow, 2009).

In dieser Arbeit wurden die Aktivitäten des Notch-, RTK-, Wnt- und Dpp-Signalweges mittels geeigneter Aktivitätsmarker (Gbe+Su(H)-GFP, *argos-lacZ*, *Dfz-3-lacZ*, *omb-* und *dad-lacZ*) in *Dmon1^{mut4}* mutanten Zellen untersucht. Dabei wurde keine Veränderung im Expressionsmuster dieser Marker beobachtet.

Der *Dmon1^{mut4}* verursachte Defekt im endosomalen Transportweg scheint also an einem Schritt zu entstehen, in welchem es zu keinen Veränderungen in der Aktivität dieser Signalwege kommt, obwohl ihre Komponenten, wie Rezeptoren oder Liganden in den *Dmon1^{mut4}*-Endosomen akkumulieren. Hierfür könnte die beobachtete Ausbildung von ILV in den *Dmon1^{mut4}*-MVBs verantwortlich sein, die diese Signalwegkomponenten dem Zellinneren entziehen und somit deren Aktivität im Zytosol oder Zellkern ausschließen.

Die vorliegende Arbeit stellt natürlich erst den Anfang der Dmon1-Charakterisierung dar. Viele Fragen wären noch aufzuklären, wie z. B. die molekulare Funktionsweise des Dmon1-Dccz1 Komplexes. Es ist zum Beispiel unklar wie die beiden Proteine die Rekrutierung von Rab7 an die Membranen der Endosomen regulieren. Nordmann *et al.* (2010) in der Hefe und Gerondopoulos *et al.*, 2012 in Säugetier-Zelllinien haben diesem Komplex die GEF-Aktivität von Rab7 zugewiesen (Nordmann *et al.*, 2010; Gerondopoulos *et al.*, 2012). Ob diese Funktion auch Dmon1-Dccz1 in *Drosophila* zuzuschreiben wäre, oder ob sie eine andere Funktion bei der Rekrutierung von Rab7 an die Membranen der Endosomen und höchstwahrscheinlich auch an die der Lysosomen spielen ist eine der offenen Fragen, die beantwortet werden sollten.

Eine weitere Frage stellt die Funktion von Dmon1-Dccz1 bei der Deaktivierung und Entfernung von Rab5 von der Membran der Endosomen. Poteryaev *et al.* (2010) konnten keine Interaktion zwischen SAND-1 und Rab5 feststellen. Dagegen haben Kinchen und Ravichandran (2010) gezeigt, dass Mon1 an Rab5-GTP bindet. Ob die Entfernung von Rab5 von der Membran der Endosomen direkt durch Dmon1-Dccz1 kontrolliert wird, oder ob die Entfernung von Rab5 von der Membran ein indirekter Effekt vermittelt durch den Dmon1-Dccz1 Komplex ist, wäre daher zum besseren Verständnis der Funktion dieses Komplexes notwendig. Hierdurch könnte auch ein besserer Einblick in den Mechanismus der Rab-Konversion gewonnen werden, hierbei sowohl in Bezug auf die verlängerte Verbleibdauer von Rab4 an den Endosomen wie auf die fehlende Rab7-Rekrutierung an diese.

Da die Funktion der Proteine in der Zelle in Koordination mit anderen Proteinen steht, wäre die Identifizierung weiterer Interaktionspartner die nächste offene Frage. Die Proteine der Klasse B der Vps-Proteine wären hierzu die geeigneten Kandidaten, da sie einen ähnlichen Ausfallphänotyp wie Mon1p und Ccz1p in Hefe zeigen (Raymond *et al.*, 1992).

Ferner sollten die beobachteten Unterschiede zwischen der Funktion von Dmon1 in *Drosophila* und in anderen Organismen durch Beobachtungen an anderen Geweben verifiziert werden. Es ist möglich, dass Dmon1-Dccz1 seine Funktion als ein Faktor der Rekrutierung von Rab7 in allen Geweben und Organismen auf unterschiedliche Art und Weise erfüllt.

wildtyp

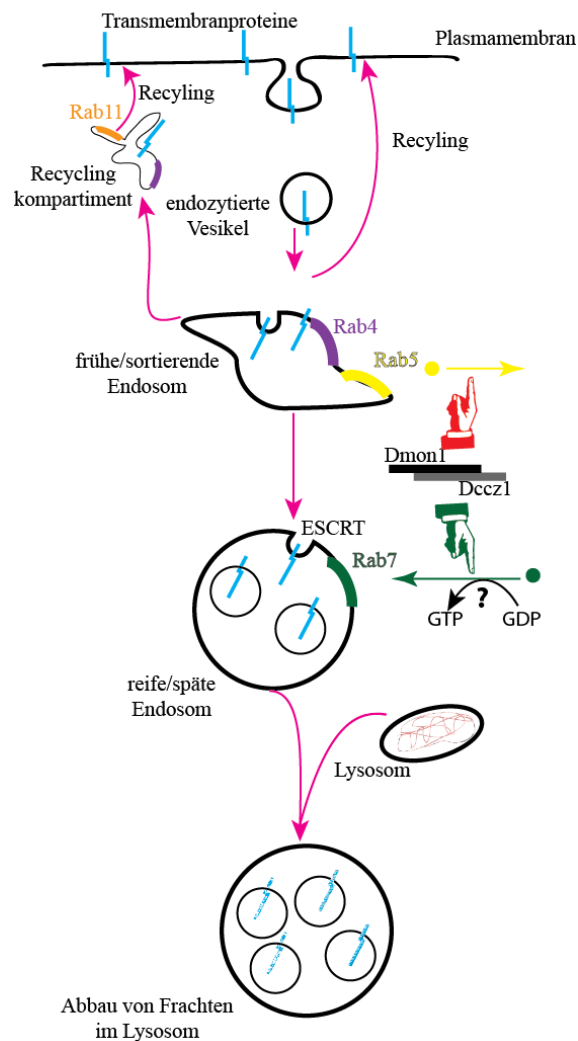
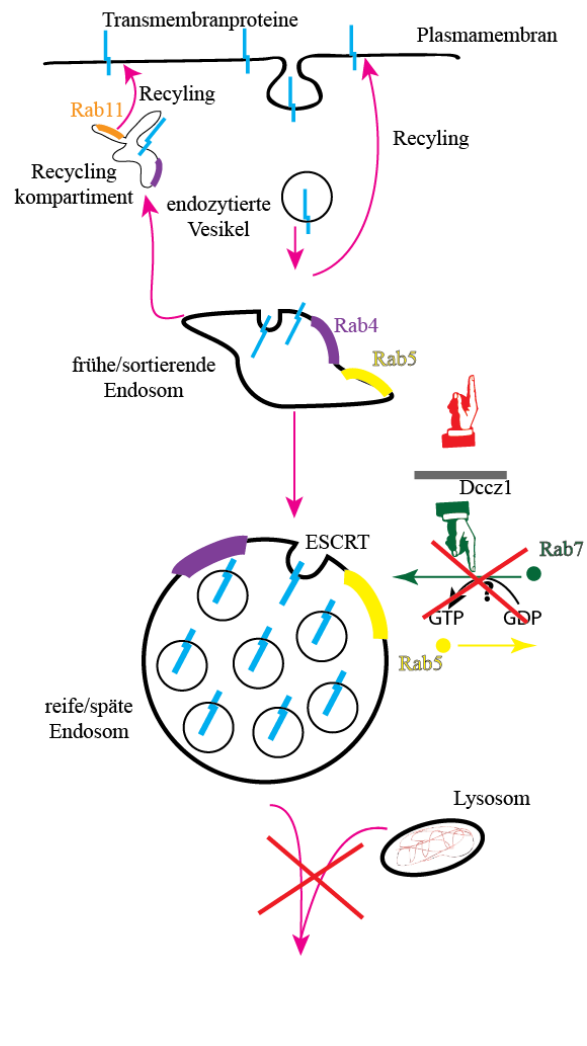
*Dmon1^{mut4}*

Abb.3.1: Schematische Darstellung der Funktion von Dmon1-Dccz1 in *Drosophila*. In den wildtypischen Zellen fusionieren die endozytierten Vesikel nach der Endozytose miteinander. Dabei entstehen frühe/sortierende Endosomen. Frachten die recycelt werden sollen, werden von da entweder direkt mittels Rab4, oder zuerst in das Recycling-Kompartiment und von dort aus mittels Rab11 an die Plasmamembran gebracht. Die Frachten, die abgebaut werden sollen, werden Mittels der ESCRT-Maschinerie in ILV der Endosomen eingepackt, damit ein vollständiger Abbau ermöglicht wird. Während der Reifung der Endosomen wird Rab5 gegen Rab7 ausgetauscht. Rab7 vermittelt die Fusion der reifen Endosomen mit dem Lysosom. Nach der Fusion mit dem Lysosom werden die Frachten dort abgebaut. In den *Dmon1^{mut4}*-mutanten Zellen wird Rab7 nicht an die Endosomen rekrutiert. Dabei bleibt Rab5 länger an die Endosomen gebunden, was vermutlich die Vergrößerung der Endosomen zur Folge hat. Durch eine Fehllokalisation von Rab7 in den *Dmon1*-mutanten Zellen kann die Fusion der reifen Endosomen mit dem Lysosom nicht stattfinden.

4. MATERIAL UND METHODEN

4.1. Material

4.1.1. Geräte und Arbeitsmaterialien

Geldokumentation:	BioRad
Gelelektrophorese:	Peqlab
Mikroskopie:	Zeiss AxioImager Z1 mit Apotom und AxioCamMRm, STEMI 1000, Olympus BH2 (für Injektionen)
Elektronenmikroskopie:	EM 902 (Zeiss)
Zentrifugen:	Beckmann
Zentrifugationszubehör:	SS-34 Rotor (Beckmann)
Tischzentrifugen:	Eppendorf
Mikrowellengerät:	Sharp
NanoDrop 2000/2000C:	PeQLab Spectrophotometer
PCR-Maschinen/Thermocycler:	Biometra Professional Thermocycler, MJ Research PTC-200
Mikropipettenziehgerät:	Sutter Instruments Co. Model P-97

Software: Adobe Photoshop (CS5), Omiga 2.0 (Oxford Molecular Ltd.), Vector NTi 7.0-Mac, Axiovision Rel. 4.6-4.8 (Windows PC, Zeiss), Excel 2010 für Mac

4.1.2. Enzyme

Für molekularbiologische Arbeiten wurden Enzyme von NEB, Roche und Fermentas verwendet.

4.1.3. Feinchemikalien und Reaktions-Kits

Expand High Fidelity Plus PCR-Kit	Roche
Hoechst 33258	Sigma Aldrich
Normales Ziegenserum (NGS)	Dianova
Vectashield Mounting Medium	Vector
Nucleobond PC100 Midiprep-Kit	Macherey und Nagel
PCR-Produkte und Gelbandenextraktion und Purification Kit	EZNA Gel-Extraction Kit (Omega bio-tek)
DNA-Ladepuffer	6x MassRuler™ DNA Loading Dye, Fermentas
DNA-Größenstandard:	1kb Hyperladder I, Bioline
	MassRuler™ DNA Ladder Mix, Fermentas

4.1.4. Bakterienstämme

E.coli DH5 α : F⁻ ϕ 80*lacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*)U169 *recA1 endA1 hsdR17* (r_k^- k_- , m_k^+ k_+) *phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ^-* (Invitrogen).

LB-Medium: 10g Bactotrypton, 5g Hefeextrakt, 10g NaCl mit H₂O auf 1L Endvolumen auffüllen, und den pH vor des Erreichens des Endvolumen mit NaOH auf 7,2 einstellen

LB-Platten: LB-Medium mit 1,5% Agar

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

Ampicillin	100 µg/ml
Kanamycin	25µg/ml
Chloramphenicol	20µg/ml

4.1.5. Lösungen:

TAE(1x) : 40 mM Tris Acetat (pH 8,0), 1 mM EDTA

RNaseA Stammlösung: 5 µg/µl in 10mM Tris pH 7,5
0,15M NaCl

4.1.6. Antikörper

Primäre Antikörper

Antikörper gegen	Hergestellt in (Herkunft)	Verdünnung	Quelle/Klonbezeichnung)
β-Galaktosidase	Kaninchen	1:500 (präabsorbiert)	Cappel
N(extra) NECD	Maus	1:100	DSHB Iowa C458.2H
N(intra) NICD	Maus	1:100	DSHB Iowa C17.9C6
Wg	Maus	1:50	DSHB Iowa 4D4
Delta (DI)	Maus	1:500	DSHB Iowa C594.9B
Serrate (Ser)	Kaninchen	1:50	A. Bachmann
Rab5	Kaninchen	1:100	M. Gonzalez-Gaitan
Rab7	Kaninchen	1:3000	Tanaka und Nakamura, 2008
HA	Ratte	1:250	Roche
Hrs-FL	Meerschweinchen	1:500	Lloyd <i>et al.</i> , 2002
Spinster	Meerschweinchen	1:500	Sweeney <i>et al.</i> , 2002
Dor		1:500	H. Krämer
Arl8	Kaninchen	1:100	Hofmann und Munro, 2006
Ptc	Maus	1:100	DSHB Iowa Apa 1

Sekundäre Antikörper

Gekoppelt mit	Hergestellt in (Herkunft)	Verdünnung	Quelle
Maus Alexa-568	Ziege	1:500	Invitrogen
Kaninchen Alexa-568	Ziege	1:500	Invitrogen
Ratte Alexa-568	Ziege	1:500	Invitrogen*

Maus Alexa-647	Ziege	1:500	Invitrogen
Kaninchen Alexa-647	Ziege	1:500	Invitrogen
Ratte Alexa-647	Ziege	1:500	Invitrogen*
Maus Alexa-488	Ziege	1:500	Invitrogen
Kaninchen Alexa-488	Ziege	1:500	Invitrogen
Ratte Alexa-488	Ziege	1:500	Invitrogen*

* Um Kreuzreaktionen auszuschließen, wurden diese Antikörper gegen Maus präabsorbiert.

4.1.7. Verwendete Fliegenstämme

Genotyp	Herkunft
w^- ; <i>Dmon1</i> ^{mut4} / <i>CyO</i> ^{wg-lacZ} ; TM6b / MKRS	Stammsammlung Prof. Thomas Klein
w^- ; <i>Dmon1</i> ^{mut4} / SM6a-TM6b	Stammsammlung Prof. Thomas Klein
<i>Dmon1</i> ^{CS084} / <i>CyO</i>	Mark Fortini
w^- ; If / <i>CyO</i> ^{wg-lacZ} ; TM6b / MKRS	Stammsammlung Prof. Thomas Klein
<i>daGAL4</i>	Wodarz <i>et al.</i> , 1995
<i>enGAL4</i>	Bloomington
<i>ptcGAL2</i>	Speicher <i>et al.</i> , 1994
<i>hhGAL4</i>	Tanimoto <i>et al.</i> , 2000
w^- ; UASDcr2; <i>hhGAL4</i> UASdsRed/SM6a-TM6b	Stammsammlung Prof. Thomas Klein
UASDcr2	Lee <i>et al.</i> , 2004
UASFYVE-GFP	Gillooly <i>et al.</i> , 2000
UASRab5-GFP	Wucherpennig <i>et al.</i> , 2003
UASRab7-GFP	Entchev <i>et al.</i> , 2000
Gbe-Su(H)-lacZ	Furriols und Bray, 2001
Gbe-Su(H)-GFP	de Nevascues <i>et al.</i> , 2012
<i>tub</i> Lamp1-GFP	Helmut Krämer
UAS Lamp1-GFP	Pulipparacharuvi <i>et al.</i> , 2005
w^- ; If / SM6a TM6b	Stammsammlung Prof. Thomas Klein
Df(2L)Exel6010	Bloomington
Df(2L)Exel8012	Bloomington
Df(2L)Exel9062	Bloomington
Deficiency Kit (2L) (ca. 100 Fliegenstämme)	Bloomington
<i>mon1</i> -RNAi (II-Chromosom)	VDRC 103378
<i>mon1</i> -RNAi (III-Chromosom)	VDRC 38600; VDRC 38601
<i>ccz1</i> -RNAi (III-Chromosom)	VDRC 18479
Rab7-RNAi (III-Chromosom)	VDRC 40337
<i>dad-lacZ</i>	Stammsammlung Prof. Thomas Klein
<i>aarg-lacZ</i>	Stammsammlung Prof. Thomas Klein
<i>Omb-lacZ</i>	Stammsammlung Prof. Thomas Klein
<i>Dfz3-lacZ</i>	Stammsammlung Prof. Thomas Klein
yw M{eGFP.vas.int.Dm}ZH2A; M{RFP.attP}2H-68E (attP 68E Chr. 3L; Integrase auf dem X Chromosom inseriert)	Bischof <i>et al.</i> , 2007
yw M{eGFP.vas.int.Dm}ZH2A; M{RFP.attP}2H-86Fb (attP 68E Chr. 3R; Integrase auf dem X Chromosom inseriert)	Bischof <i>et al.</i> , 2007

yw M{eGFP.vas.int.Dm}ZH2A; M{RFP.attP}2H-22A (attP 22A Chromosom 2L; Integrase auf dem X Chromosom inseriert)	Bischof <i>et al.</i> , 2007
tubRab5CFP tubRab7YFP	Marios <i>et al.</i> , 2006
hsFLP1.22; <i>arm-lacZ</i> FRT40A / CyO ^{wg-lacZ} ; tubRab5-CFP tubRab7-YFP / TM6b	Stammsammlung Prof. Thomas Klein
hsFLP1.22; His2AVD-RFP / CyO ^{wg-lacZ} ; tubRab5-CFP tubRab7-YFP / TM6b	Stammsammlung Prof. Thomas Klein
hsFLP1.22; If / SM6a TM6b	Stammsammlung Prof. Thomas Klein
hsFlp1.22; <i>arm-lacZ</i> FRT40A/CyO ^{wg-lacZ} ; hhGAL4 / TM6b	Stammsammlung Prof. Thomas Klein
hsFlp1.22; <i>arm-lacZ</i> FRT40A/CyO ^{wg-lacZ} ; hhGAL4 UASDsRed / TM6b	Stammsammlung Prof. Thomas Klein
hsFLP1.22; His2AVD-RFP / CyO ^{wg-lacZ} ; TM6b / MKRS	Stammsammlung Prof. Thomas Klein
yw ⁺ hsFLP1.22 tubGal4 UASnls-GFP/FM7; FRT40A Gal80 / CyO ^{wg-lacZ} (MARCM)	Stammsammlung Prof. Thomas Klein
hsFlp1.22; <i>ubi-GFP</i> FRT40A/CyO ^{wg-lacZ} ; TM6b / MKRS	Stammsammlung Prof. Thomas Klein

4.1.8. In dieser Arbeit hergestellte Fliegenstämme

w ⁻ ; If / CyO ^{wg-lacZ} ; UAS <i>mon1-attP-86Fb</i> / TM6b
w ⁻ ; <i>mut4</i> FRT40A / CyO ^{wg-lacZ} ; UAS <i>mon1-attP-86Fb</i> / TM6b
w ⁻ ; <i>mut4</i> FRT40A; UAS <i>mon1-attP-86Fb</i> / SM6a-TM6b
w ⁻ ; If / CyO ^{wg-lacZ} ; UAS <i>mon1-HA-attP-86Fb</i> / TM6b
w ⁻ ; <i>mut4</i> FRT40A/ CyO ^{wg-lacZ} ; UAS <i>mon1-HA attP-86Fb</i> / TM6b
w ⁻ ; <i>mut4</i> FRT40A; UAS <i>mon1-HA attP-86Fb</i> / SM6a-TM6b
w ⁻ ; If / CyO ^{wg-lacZ} ; UAS <i>ccz1-EOS-attP-86Fb</i> / TM6b
w ⁻ ; UAS <i>ccz1-EOS-attP-22A</i> / CyO ^{wg-lacZ} ; TM6b / MKRS
w ⁻ ; <i>tubRabex5-EOS</i> / CyO ^{wg-lacZ} ; TM6b / MKRS
w ⁻ ; If / CyO ^{wg-lacZ} ; <i>tubRab4-mCherry-attP-86Fb</i> / TM6b
w ⁻ ; If / CyO ^{wg-lacZ} ; UASMon1p-HA- <i>attP-86Fb</i> / TM6b
w ⁻ ; <i>mut4</i> FRT40A/ CyO ^{wg-lacZ} ; UASMon1p-HA- <i>attP-86Fb</i> / TM6b
w ⁻ ; <i>mut4</i> FRT40A; UASMon1p-HA- <i>attP-86Fb</i> / SM6a-TM6b

4.2. Methoden

4.2.1. Chemische Transformation der Bakterien

Chemisch kompetente Bakterienzellen werden auf Eis aufgetaut. Je nach Transformationseffizienz wird eine DNA-Menge von 0,5 - 2 µg zu der Zellsuspension gegeben. Die Zellen werden 15 bis 30 Min. auf Eis und direkt danach für 1 Min. bei 37°C inkubiert (Hitzeschock/Wasserbad). Die Bakterien werden nach dem Hitzeschock für 2 Min. auf Eis inkubiert, danach werden 900 µl LB-Medium hinzugegeben. Nach 60 Min.

Inkubation auf einem Schüttler bei 37°C, die erforderlich für die Regeneration der Bakterien und Expression des Resistenzfaktors ist, werden die Bakterien für 2 Min. bei 4500 rpm in einer Tischzentrifuge runterzentrifugiert. Der Überstand wird abgegossen und das Pellet wird im Rest des Mediums resuspendiert. Um einzelne Transformanten zu erhalten werden die Bakterien auf einer LB-Platte, die das entsprechende Selektions-Antibiotikum enthält, ausgestrichen. Die Platte wird über Nacht bei 37°C inkubiert und gewachsene Bakterienkolonien für nachfolgende Mini/Midi-DNA-Präparationen gepickt.

4.2.2. DNA-Minipräparation nach TENS-Protokoll

1,5 ml der über Nacht bei 37°C inkubierten Bakterienkultur (2-3 ml gesamt) werden in ein Eppendorf-Gefäß eingeführt und für 2 Min. bei 4500 rpm runterzentrifugiert. Der Überstand wird bis auf etwa 50-100µl abgegossen. Das Pellet, welches die Bakterien enthält wird in diesen 50-100µl resuspendiert. 300µl der TENS-Lösung werden hinzugefügt und durch Vortexen (sehr stark geschüttelt) gemischt bis die Lösung zähflüssig wird (falls dieser Schritt länger als 10 Min. dauert, sollten die bereits bzw. die noch nicht gevortexten Lösungen auf Eis gehalten werden, damit eine Kontamination mit bakterieller (chromosomaler) DNA vermieden wird). Als nächstes werden 150 µl Natriumacetat hinzugefügt und gut gemischt (kurzes Vortexen). Zelltrümmer und bakterielle (chromosomale) DNA werden durch Zentrifugation (5Min. bei 13000 rpm) abgetrennt und der Überstand in ein neues Gefäß überführt. Es wird 900µl kalter (-20°C) 100%-Ethanol dazugegeben, die Flüssigkeiten kurz gemischt und für 5-10 Min. bei -20°C kaltgestellt. In dem Schritt findet die DNA-Fällung statt. Das Pellet (gefällte DNA) wird mit 70% Ethanol gewaschen und anschließend für 5Min. bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet nach Trocknung in 40-50µl TE+RNase A resuspendiert (50ng/µl RNase A).

TENS-Lösung: TE: 10mM Tris-Cl, 1mM EDTA pH 8.0
0,1 M NaOH
0,5% SDS

Natriumacetat: 408 g NaOAC*3H₂O in 800 ml H₂O, bis 1L mit H₂O auffüllen, pH wird mit 3M Essigsäure auf 5.2 eingestellt

4.2.3. DNA-Midipräparation

Für eine Midi-Präparation wurden Übernachtskulturen in Erlenmeyerkolben mit 100ml LB-Medium mit jeweils einigen Mikrolitern aus der Übernachtskultur einer Mini-Präparation angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Dem LB-Medium wurde das entsprechende

Antibiotikum zugesetzt, für welches der jeweilige Vektor die Resistenz vermittelte. Es wurde das Nucleobond PC100 Midiprep Kit von Macherey und Nagel nach Protokoll des Herstellers verwendet. Die gewonnene DNA wurde am Ende in 100 µl 10mM Tris-HCl (pH 8.5) alternativ in H₂O aufgenommen.

4.2.4. DNA Restriktionsverdau

Zur Überprüfung des Restriktionsmusters von Plasmiden oder zur Klonierung wurden Plasmide Restriktionsverdau mit entsprechenden Endonukleasen unterzogen. Dabei wurde nach Herstellerangaben die entsprechende Menge an 10x Reaktionspuffer, gegebenenfalls je nach verwendeter Enzymkombination mit BSA, 1-5 µg gereinigter DNA, je 10-20 U an Enzym und einer entsprechenden Menge an H₂O dest. (20 µl bei einem analytischer Restriktionsverdau, 70-100 µl bei präparativem Restriktionsverdau) vermischt und bei 37°C inkubiert.

Inkubationsdauer: Testverdau für 1h, präparativer Restriktionsverdau 3h.

Bei einem Testverdau wurden die Reaktionen auf einem 0,8-1%-em Agarosegel aufgetragen und einer Gelelektrophorese unterzogen. Im Falle einer Klonierung wurden die entsprechenden Banden aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA-Fragmente extrahiert.

4.2.5. Gewinnung genomischer DNA aus Fliegen/Larven

Die genomische DNA aus Fliegen und Larven wird wie folgt gewonnen:

- Etwa 30 Fliegen/Larven werden in einem 1,5 ml Eppendorf-Gefäß gesammelt und für kurze Zeit (1Min.) auf -20°C gestellt, damit sie in die Unbeweglichkeit betäubt werden.
- 200 µl Extraktionspuffer werden hinzugefügt, und die Fliegen/Larven werden mit einem Stößel homogenisiert.
- Es werden nochmal 200 µl hinzugefügt und die Fliegen/Larven weiter zerrieben für insgesamt max. etwa 5 Min., bis nur Kutikulae zu sehen sind.
- Das Gefäß wird bei 65°C für 30 Min. inkubiert.
- 800 µl LiCl/KAc-Lösung werden hinzugefügt und für mind. 10 Min. auf Eis inkubiert.
- Die Mischung wird für 15 Min. bei 13000 rpm bei RT (Raumtemperatur) zentrifugiert.
- 1ml des Überstandes wird in ein neues Gefäß überführt.
- 600 µl Isopropanol werden hinzugefügt, kurz gemischt und für 15 Min. bei 13000 rpm und RT zentrifugiert.

- Den Überstand wird abgeschüttet.
- Das Pellet wird mit 700 µl 70%-en Ethanol (EtOH) gewaschen, und für 5 Min. bei RT und 13000 rpm zentrifugiert.
- Den Überstand wird abgeschüttet, Überstandsreste vorsichtig mit Pipette abgesaugt.
- Das Pellet wird im Heizblock bei 37°C für etwa 20 bis 30 Min. getrocknet.
- 150 µl TE wird auf das Pellet gegeben, 10 Min. auf 65°C inkubiert und dann bei 4°C über Nacht resuspendiert.

Am nächsten Tag wird die Qualität der DNA auf einem 0,7% Agarose-Gel bei niedriger Laufgeschwindigkeit (40Volt bei 10cm Gellänge) getestet. Erwünscht ist eine hochmolekulare Bande über 10kb.

Aufbewahrung der DNA erfolgt bei 4°C, bei niedrigeren Temperaturen könnte es zur Fragmentierung der DNA-Stränge durch sich bildende Eiskristalle kommen.

Extraktionspuffer: 100mM TrisHCl pH 9.0, 100mM EDTA, 1% SDS

LiCl/KAc-Lösung: 1 Teil 5M Kaliumacetat auf 2,5 Teile 6M LiCl Stammlösung

4.2.6. Sequenzierung der *Dmon1*-Allele

Zuerst wurde die genomische DNA aus Larven des jeweiligen Stammes gewonnen und DNA-Abschnitte, die sequenziert werden sollten, mittels PCR amplifiziert (Expand HF-PCR Kit von Roche). Die PCR-Produkte wurden anschließend auf einem Gel aufgetrennt, die Gelbanden wurden ausgeschnitten und nach der Aufreinigung sequenziert. Die verwendeten Primer zur Amplifikation und Sequenzierung der Abschnitte genomischer DNA sind unten aufgelistet. Zur Kontrolle wurden ebenfalls die gleichen genomischen DNA-Abschnitte aus wildtypischen Fliegen sequenziert (w^- und w^+).

Bei den Primern zur Amplifikation von genomischen Abschnitten ist nach dem Primerpaar die jeweilige erwartete Produktlänge angegeben. Der Name, der jeweils einem Primerpaar voransteht bezeichnet den zugehörigen amplifizierten Abschnitt, z. B. **Mon1-2** ist das Primerpaar 2 zur Lage der Abschnitte (siehe Abb.4.1). Die Sequenzierungsprimer wurden benutzt um die erhaltenen genomischen Abschnitte vollständig sequenzieren zu können, da verlässliche Daten für jeweils ca. 400-700 bp ab dem Sequenzierungsprimer erhalten werden konnten.

Mon1-2 (2776 bp)

1-2a: 5'-CGCCACAACATAGACCACC-3'

1-2b: 5'-TTACCAGTGCCTGAATGACACC-3'

Mon1-4 (2124 bp)

1-4a: 5'-AGATAACAGTGCCCTCAGTCC-3'

1-4b: 5'-TAGCACCACGCAATTTTCC-3'

Mon1-6 (1812 bp)

1-6a: 5'-AAGATCACGGAGAAGCTACG-3'

1-6b: 5'-AGCCATGAAAAGTCCAAGG-3'

Mon1-8 (3037 bp)

1-8a: 5'-CCAGATCGAAGATCAGATGACC-3'

1-8b: 5'-CTAGCACCACGCAATTTTCC-3'

Sequenzierungsprimer

Seq1: 5'-ACACCCCACCACAGATTAC-3'

Seq2: 5'-CGCAAACTAAGTAATAGCC-3'

Seq3: 5'-ACACCCTTTATTTACCTTC-3'

Seq4: 5'-CGGAAAACACACCATAAG-3'

Seq5: 5'-CCAATCTTCTCGCTACAC-3'

Seq6: 5'-ACGGACAGCAGGAGCAAAC-3'

Seq7: 5'-CTAGCACCACGCAATTTTC-3'

Seq8: 5'-TACGAAACGGGGAATGCAC-3'

Seq9: 5'-CACAATGCCCTAGCGAAG-3'

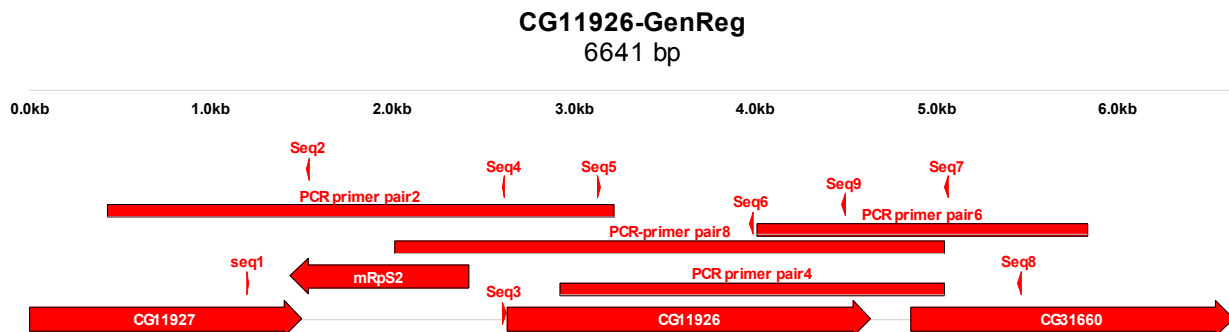


Abb.4.1: Lage der amplifizierten genomischen Produkte (PCR primer pair 2, 4, 6 oder 8) auf dem genomischen Abschnitt, dass die Dmon1 kodierende CG11926-Transkriptionseinheit trägt. Zusätzlich sind die Sequenzierungsprimer eingetragen, die Pfeilrichtung zeigt deren Orientierung an.

4.2.7. DNA-Konzentrationsbestimmung

Zur Bestimmung der Konzentration von Plasmid-DNA wurden die Extinktion der Lösungen bei 260 nm mit Hilfe des NanoDrops photometrisch bestimmt. Hierzu wurde 1µl DNA-Lösung auf der NanoDrop-Messfläche pipettiert und die Messung gestartet. Für doppelsträngige DNA (dsDNA) entspricht eine Extinktion von 1 bei 260nm einer Konzentration von 50µg/ml. Die Messung bei 280nm diente der Bestimmung der Reinheit, weil bei 280nm das Absorptionsmaximum der meisten Proteine liegt. Der Quotient der beiden

Extinktionen sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Niedrigere Werte weisen auf eine Verunreinigung mit Proteinen hin.

4.2.8. 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 nach Angaben des Herstellers verwendet. Die aufgenommenen Fragmente wurden vor weiteren Klonierungsschritten in dem Vektor mittels T7 und Sp6-Primer von beiden Seiten der Insertionsstelle her ansequenziert und je nach Bedarf mit zusätzlichen Primern vollständig sequenziert, die innerhalb des jeweiligen PCR-Produktes banden.

T7: 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'

SP6: 5'-GATTAGGTGACACTATAG-3'

4.2.9. DNA-Sequenzierung

Sequenzierungen von DNA-Konstrukten oder PCR-Produkten wurden von der Firma Seqlab aus Göttingen durchgeführt. Hierfür wurden nach Empfehlung des Dienstleisters 600 bis 700ng der zu sequenzierenden DNA und 2µl einer 10 mM Lösung des jeweiligen Sequenzierungsprimers (20 pmol) in destilliertem Wasser in einem Gesamtvolumen von 7 µl in ein 0,2-ml Reaktionsgefäß mit flachem Deckel gelöst und anschließend an Seqlab verschickt.

4.2.10. SOEing-PCR

Die Hybridkonstrukte dieser Arbeit wurden mittels *SOEing-PCR* (*splicing by overlap extention*) hergestellt. Dafür werden zunächst zwei DNA-Fragmente mit Erkennungssequenzen als überlappenden Überhängen auf einer Seite und gewünschten Erkennungssequenz für Restriktionsenzyme auf der anderen Seite mittels PCR hergestellt. Die DNA-Fragmente werden in einem zweiten PCR-Schritt zusammengefügt. Hierbei dienen homologe Sequenzen dafür, dass die beiden Fragmente miteinander verbunden werden und danach das Gesamtprodukt amplifiziert wird (Abb.4.2).

SOEing ist eine Methode zur Herstellung von rekombinierten DNA-Molekülen ohne Nutzung von Restriktionsendonukleasen oder Ligasen. Die zu verbindenden Fragmente von den Genen, welche rekombiniert werden sollten, werden zunächst in getrennten PCRs hergestellt. Die Primer hierzu sind so gewählt, dass die Enden der Produkte der ersten PCR-Reaktion komplementäre Sequenzen enthalten. Wenn diese PCR-Produkte in der nachfolgenden,

zweiten PCR-Reaktion vermischt werden, dienen die überlappenden Sequenzen an deren 3'-Ende als Primer um das Ausgangsprodukt für das rekombinierte Hybridkonstrukt. PCR-Bedingungen wurden nach Angaben des Herstellers Roche (Expand HF Plus PCR Kit von Roche) gewählt.

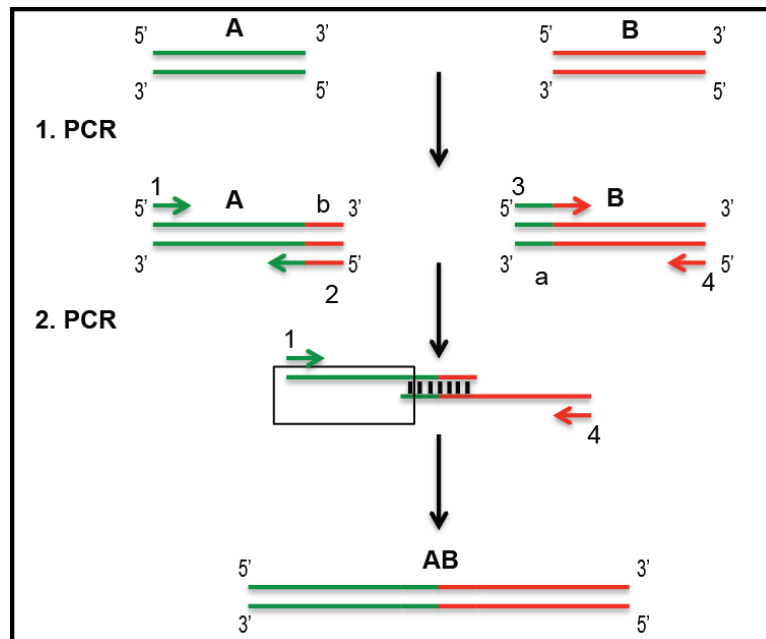


Abb.4.2: Schematische Darstellung zum SOEing (*splicing by overlap extension*). Zuerst werden zwei DNA-Fragmente mittels PCR hergestellt und amplifiziert. Die beiden Fragmente enthalten jeweils ein Teil des anderen Fragmentes. Die überlappenden Überhänge funktionieren als Primer für die nächste PCR-Runde. Die beiden homologen Bereiche erkennen sich und binden sich aneinander. Um das Produkt weiter zu amplifizieren, werden in der 2. PCR Primer 1 und 4 verwendet. An Primern 1 und 2 können optional überstehende Enden mit Erkennungssequenzen von Restriktionsenzymen angefügt werden für die spätere Subklonierung des Produktes.

4.2.11. Hergestellte DNA/Hybrid-Konstrukte und verwendete Primer

Die *Dmon1*-kodierende Sequenz wurde synthetisch hergestellt bei GenSkript, Piscataway, NJ, USA und aus dem Vektor pUC57 über die vektorinternen Schnittstellen EcoRI und EcoRV in den *pUASTattB* Vektor (Bischof, *et al.*, 2007) kloniert. Um den Einbau in den pUAST-Vektor zu ermöglichen wurden vor die kodierende Sequenz eine NotI und eine KpnI, sowie eine NotI hinter dem Stopcodon angebracht (rote Markierung in nachfolgender Sequenz). Die kodierende Sequenz für die Synthese wurde entnommen aus dem Datenbankeintrag NM_135024.2 bei der GenBank, wobei ein Stopcodon, das sich in der Sequenz befand entfernt wurde. Synthetisiert wurde die folgende Sequenz:

GCGGCCGCTACTTAGGTACCATGGAAGTAGAGCAGACGTCAGTCAGGTCGGACACGAACTCCACCTGC
GAGTACCTAGACGCAGAGGGCGATCCGGAGTCCCCAAATCTCTATCAAGAGGCCGATCCCGACCAGGA
GGCCGAGCAACAAAACCATAGTATTATCTCTGAGCTAAGAGATGGCCTGGGCACCATGCGAGATAACA
GTGCCCTCAGTCCGGAGCCGGGGCAGGAGAACAAGGGAAGTGGCTGCCTCTGTGGAGTCTCTGGCATTG
AGCACCTCGACCAGCGCCAAAACAGAGGACTCCATTGGCGGGGACTGGAGGAGGAATACGATTACCA
GCACGACAGTCTGTGGCAGGGCCAAAAGAAACACATCTTCATACTAAGCGAGGCGGGAAAGCCAATCT
TCTCGCTACACGGCAATGAGGATAAACTGGCCACGCTTTTCGGTGTTCATTACAGGCACTGGTAAGCTTC
GTCCAAATGGGCCAGGATGCTATTACCTCCATTTCATGCGGGCGGCATTAAGTTCGCTTTTCATGCAACG
CAGCTCGCTCATCCTGGTGGCTGCCAGCAGGAGCAACATGAGTGTGCAGCAGCTGCAGCTTCAACTGG
GGGATGTCTACAATCAAATATTGTCCATTCTGACGTATTCACACATGACGAAAATCTTTGAGAGGCGC
AAGAAGTTTGATCTGAGGAGACTGCTCTCCGGCAGCGAACGATTGTTCTACAATCTGTTGGCGAACGA
CAGTAGTAGTGCCAAGGTGTCCAACAACATCTTCACATTTTTTGACCAACTCAATTCGCGTCTTCCCAT
TGCCCAACAACGATACGATCGCAAATCACCAGCGCCATTACAGAGCAACTGCTCCAAGATCAAGAACCTG
GTGTTTGCCGTGCTAATTGCCAATAACAACTGATAGCATTGGTGCATGAAGAAGTACTCCATCCA
TCCGGCTGATTTGCGTCTGATCTTCAACCTGGTAGAGTGTCCGAGTCCCTTCAAGAGCTCCGAGAACT
GGTCACCAATTTGCCTGCCCAAGTTCGACATGAATGGGTATCTGCATGCGCATGTCTCGTACCTGGCG
GATGATTGCCAGGCCTGTTTGCTCCTGCTGTCCGTGGACAGAGATGCCTTTTTCACGCTGGCAGAGGC
CAAGGCAAAGATCACGGAGAAGCTACGCAAAAGCCACTGCTTGAAGCCATCAACGAGGAGCTGCAGC
AGCCGTTCAATGCGAAACTCTACCAACAGGTTGTGGGAATCCCCGAGCTGCGGCACTTTCTTTACAAG
CCCAAGAGCACAGCTCAACTGCTGTGTCCCATGCTCAGGCATCCGTACAAATCTCTGACGGAGCTGGA
GCGCCTGGAGGCCATCTACTGCGACTTGCTGCATCGCATCCACAACAGTAGTCGCCCCGCTGAAGCTTA
TCTACGAGATGAAGGAGCGCGAGGTGGTCTTGGCCTGGGCAACCGGAACCTACGAACTGTACGCCATA
TTCGAGCCGTTGTGGACAAAGCCACTGTGATCAAGTACGTGGACAAGCTGATCAAGTGGATCGAGAA
GGAGTACGACGTGTACTTTATACGAAACCATGCCACATTCTAAAGCGGCCG

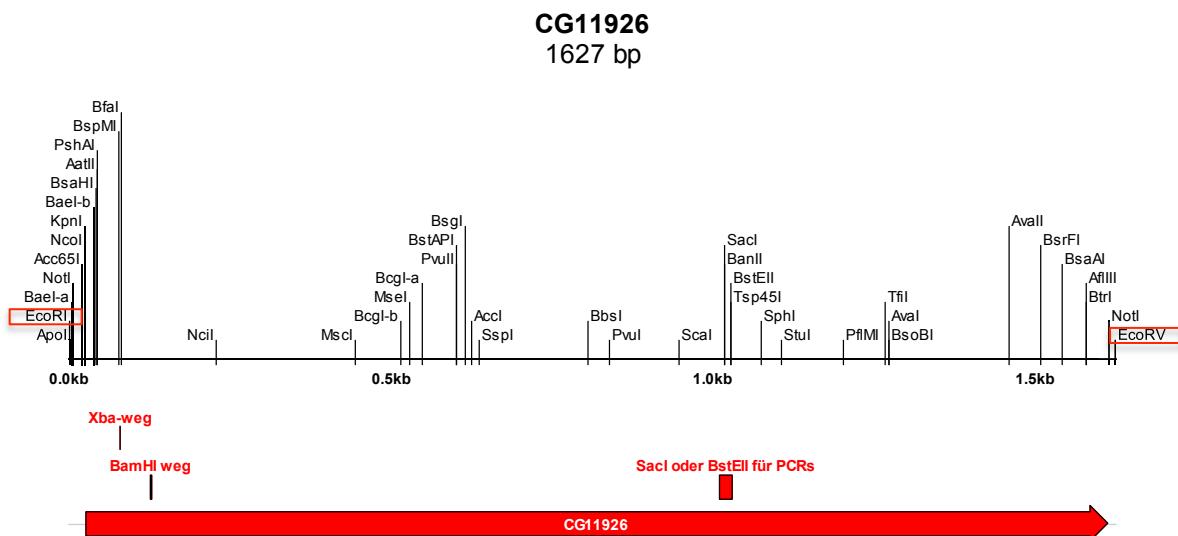


Abb.4.3: Synthetisch hergestelltes Dmon1 mit den pUC57-internen EcoRI und EcoRV-Schnittstellen, zwischen welche die Sequenz von GenSkript kloniert wurde und die zum Subklonieren des Konstrukts benutzt wurden.

Dmon1-HA (1660 bp)

MHA-1: 5'-GAATTCGCGGCCGCTACTTAGGTACCATGGAAGTAGAGCAGACG
TCAGTCAGGTCGGAC-3'

MHA-2: 5'-GATATCGCGGCCGCTTAAGCGTAATCTGGCACATCGTATGGGTAG
GCGCCGAATGTGGCATGGTTTCGTATAAAGTACAC-3'

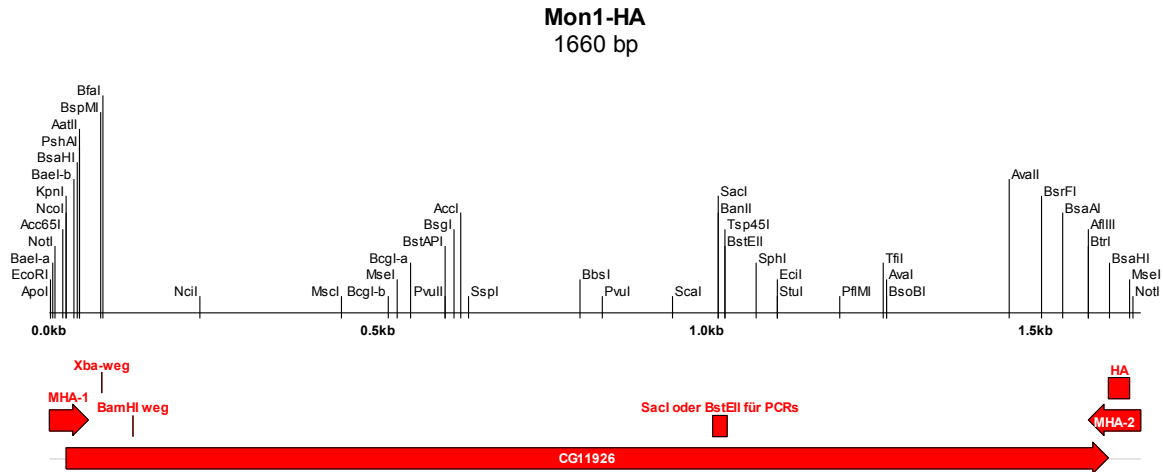


Abb.4.4: Primer zur Herstellung von Dmon1-HA.

mCherry-Rab4

Rab4 (~700bp)

R4C1: 5'-GGCATGGACGAGCTGTACAAGGCTGCGGCATCGGAAACATACGATTA
CCTGTTCAAGTTCCTGATAATTGGCAG-3'

R4C2: 5'-AGAGCGGCCGCTTAAACGCGACAGGTGCAATCCGGCTTATTGATGCT
GCGCTGTCGTGTCTGTAAGTTACGG-3'

mCherry (~700bp)

R4C3: 5'-CTTGGTACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGGATAACATGGCCATCATC
AAGGA-3'

R4C4: 5'-GGAAGTTGAACAGGTAATCGTATGTTTCCGATGCCGCAGCCTTGTACA
GCTCGTCCATGCC-3'

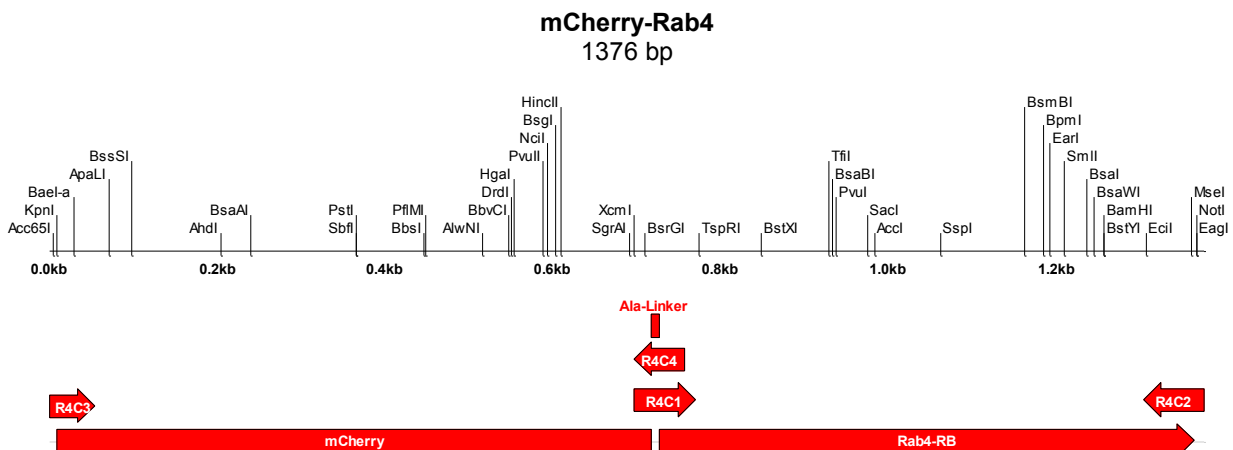


Abb.4.5: Primer zur Herstellung von mCherry-Rab4.

EOS- Rabex-5

EOS (708 bp)

ER5-1: 5'-CGCTCGGGTACCATGAGTGCGATTAAGCCAGACATGAAGATCAAC
CTCCGTATGGAAGGCAACG-3'

ER5-2: 5'-CGCCGTTGAGCCTCCGCCTCGTCTGGCATTGTCAGGCAATCCAGAATG
AGCAACAGC-3'

Rabex-5 (2124 bp)

ER5-3: 5'-CAATGCCAGACGAGGCGGAGGCTCAACGGCGGGCGCGACCTCCGTC
TTTGCGGCTGGG-3'

ER5-4: 5'-TACAGTGCGGCCGCTTATTTGGGAGCATCCGCGCCGTCCTGTCCCAG
AGAACTAAAGTCTCCCG-3'

Sequenzierungsprimer für das EOS-Rabex5-Konstrukt:

ER5-S1: 5'-CCTGCTGCTCCACTTTTC-3'

ER5-S2: 5'-CAGTCCCTATTTCACTACC-3'

ER5-S3: 5'-TCTACTCGTTCCGTCACC-3'

ER5-S4: 5'-TACGGAACCCCCCAAAC-3'

ER5-S5: 5'-CTGCCCATCAAAACACCC-3'

ER5-S6: 5'-CCTCTCCAATCTTTAACTACAC-3'

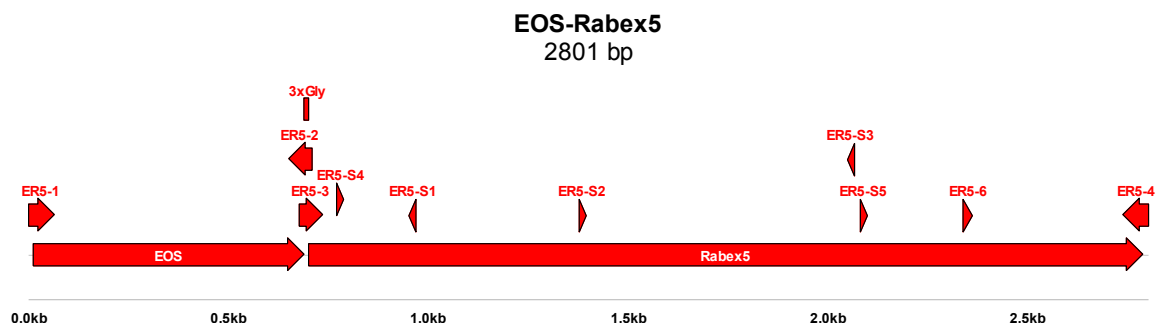


Abb.4.6: Primer zur Herstellung (ER5-1-4) und Sequenzierung (ER5-S1-6) von EOS-Rabex-5.

Mon1p-HA (1994 bp)

Mon1p-HA1: 5'-CCATTAGCGGCCGCATGAATCTCAATGAAAGCTACCTAGATGCT
GAGATACCGAAGGGTCAATTGAAGC-3'

Mon1p-HA2: 5'-CCATGTCTCGAGTTAAGCGTAATCTGGCACATCGTATGGGTAGG
CGCCAAACACGGCCCCATCACTTATAAATAGTCTCGACTCGTGTTTTTGACACC-3'

Sequenzierungsprimer für das Mon1p-HA-Konstrukt:

Smy1: 5'-CCAAATAAGGACCGAAATC-3'

Smy2: 5'-AATGACATCAGGAGTCGC-3'

Smy3: 5'-TTAGCGATATACCAGCAC-3'

Smy4: 5'-TAGCCCCTGTGAAGAATC-3'

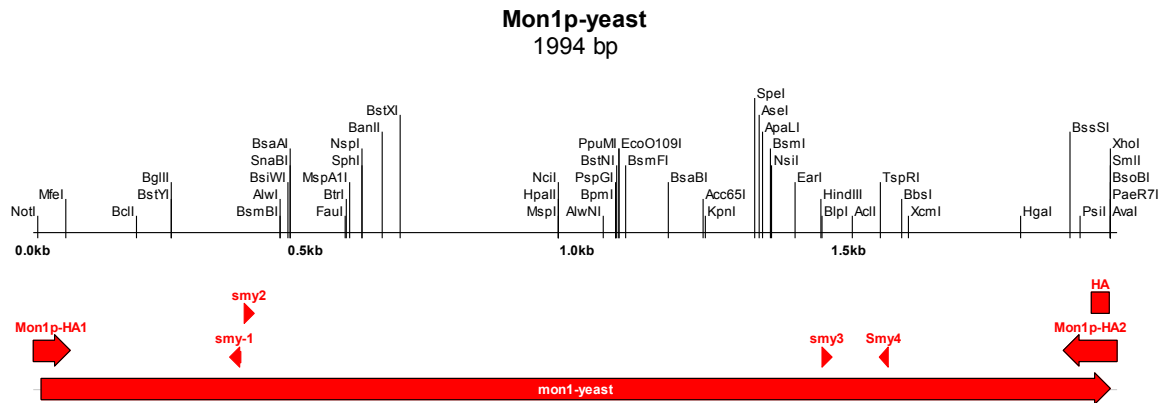


Abb.4.7: Primer zur Herstellung und Sequenzierung von Mon1p-HA.

Dccz1-EOS

Dccz1 (1502 bp)

CZE1: 5'- GCGGCCGCGGTACCATGGCTAAATTATTGCAACGCGTAGAAATT
ACGTTACGCAGC-3'

CZE2: 5'-CTTCATGTCTGGCTTAATCGCACTGCCTCCGCCTTTGTCAAAAAA
TACATCATCTGTGAGCTCTTGC-3'

EOS (724 bp)

CZE3: 5'-CAGATGATGTATTTTTTGACAAAGGCGGAGGCAGTGCGATTAAGC
CAGACATGAAGATCAACC-3'

CZE4: 5'-GATATCGCGGCCGCTTATCGTCTGGCATTGTCAGGCAATCCAGAATG
AGCAACAGCATG-3'

Sequenzierungsprimer für das Dccz1-EOS-Konstrukt:

CZS1: 5'-AACCACACAACCTCTTCTACC-3'

CZS2: 5'-TCTGACGACTTCTTACGAATCC-3'

CZS3: 5'-AACCCTACTACTTGCTCATC-3'

CZS4: 5'-GCTTCACAATCCAATAGTC-3'

EOSS: 5'-TAGAAAGTGTCCCCTTCC-3'

Die oben hergestellten Konstrukte wurden in den pUAS-*attP*-Vektor oder in den *tub*-P-*attP*-Vektor kloniert.

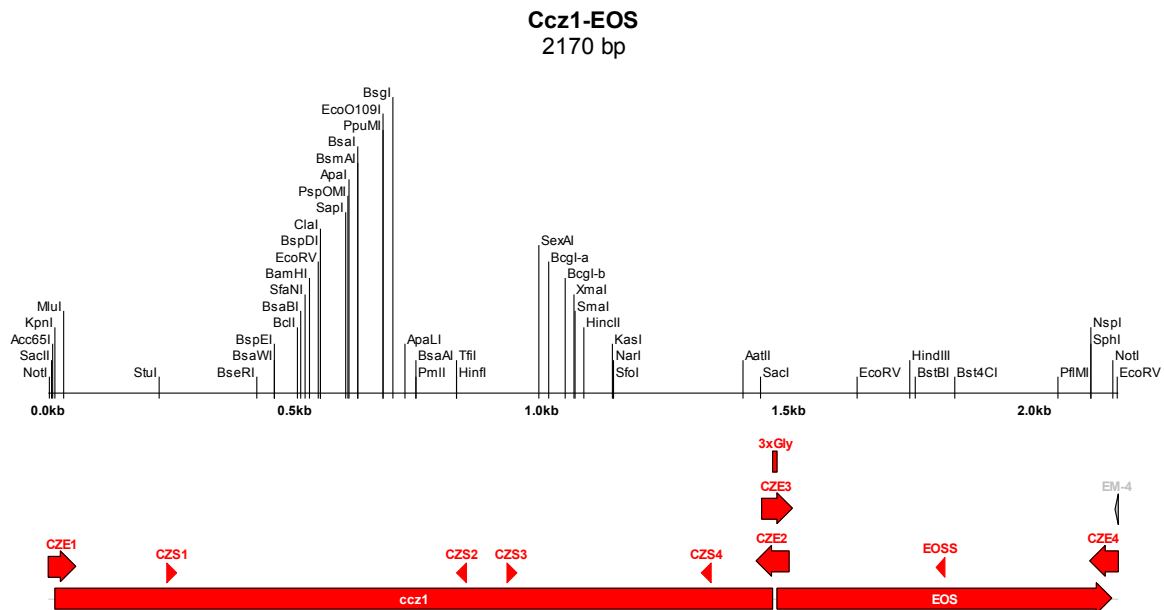


Abb.4.8: Primer zur Herstellung und Sequenzierung von Dccz1-EOS.

4.3. Allgemeine *Drosophila*-Methoden

Balancerchromosomen sowie verwendete dominante und rezessive Marker werden in Lindsley und Zimm (1992) beschrieben. Standardmethoden sind ferner in Roberts D. B. (1986), Ashburner M. (1989) und in Dahmann C. (2008) beschrieben. Allgemeine Informationen um *Drosophila*, wie zu Genen, Fliegenstämmen, Methoden usw. sind auf der Internetseite <http://flybase.org> auffindbar.

4.3.1. Haltung von *Drosophila*-Stämmen

Die *Drosophila*-Fliegenstämme werden in zylindrischen Plastikfutterröhrchen, die mit Schaumstoffstopfen verschlossen werden gehalten. Die Stämme werden je nach geplanter Verwendung bei unterschiedlicher Temperatur gehalten. Die Stämme die langfristig aufbewahrt werden sollen, werden bei 18°C oder bei RT, Kreuzungsexperimente bei 25°C, im Falle die Kreuzungen von RNAi-Linien mit dem UAS/GAL4-System teilweise bei 29°C gehalten um maximale RNAi-Expression zu erreichen. Für Kreuzungen werden jungfräuliche Weibchen (wurden nach Schlüpfen von Männchen unter 22 Stunden bei 18°C, bzw. unter 8 Stunden bei RT getrennt) mit den erwünschten Männchen zusammengesetzt.

Zur Gewinnung großer Eiablagen von Embryonen z.B. für die DNA-Injektion zur Herstellung transgener Fliegen werden die Fliegen in einem zylindrischen Käfig gehalten, deren obere Öffnung mit Netz bespannt ist und die untere Öffnung mit einer Apfelsaft-Agarplatte mit etwas Bäckerhefe in der Mitte verschlossen. Nach Auswechseln der Agarplatte werden die

Eier gesammelt. Für die Injektion wird die Apfelsaft-Agarplatte alle 30 Minuten gewechselt um Embryonen zu erhalten, bei denen noch nicht die Zellularisierung eingeleitet wurde.

Fliegenfutter:

240 g Agar wird in 10L Wasser für 2,5 Stunden gekocht.

2,4 kg Maismehl, 430 g Trockenhefe, 300 g Sojamehl, 2,4 kg Malzextrakt und 630 g Zuckerrübensirup werden in 15 L Wasser zugegeben und die Mischung wird für 4,5 Stunden gekocht.

Nach dem Abkühlen auf 60°C wird 190 ml Propionsäure hinzugegeben, Futter wird in Futterröhrchen bis zum einen Drittel der Röhrchenhöhe gegossen.

4.3.2. Herstellung von transgenen Fliegen

Transgene Fliegen wurden im Allgemeinen so hergestellt wie in Bachmann und Knust (2008) bzw. in Kapitel 4 *"The Use of P-Element Transposons to Generate Transgenic Flies"* von denselben Autoren in Dahmann (2008) beschrieben. Als Vektor für die Konstrukte wurde zumeist der pUAST-Vektor benutzt. Die Injektionen wurden in w^- -Fliegen durchgeführt, die danach geschlüpften Fliegen gegen den "Multibalancerstamm" $w^-; If/Cy^{wg-lacZ}; MKRS/TM6b$ Stamm gekreuzt, um das Insertionschromosom zu identifizieren. Transgene Tiere wurden anschließend über den w^+ Phänotyp der Nachkommen dieser Kreuzung identifiziert, der durch das auf dem Vektor befindliche *white(+)*-Gen vermittelt wurde. Kartierung der Insertionschromosomen erfolgte über eine wiederholte Kreuzung der rotäugigen Tiere gegen den Multibalancerstamm.

pattB-Transgene wurden ähnlich hergestellt (Bischof *et al.*, 2007), allerdings enthielt der Injektionsmix keinen Hilfsvektor ($\Delta 2$ -3TransposaseVektor) und es wurden keine Eizellen von w^- Fliegen, sondern von den jeweiligen *attP*-Stämmen benutzt bei denen die Integrase auf dem X Chromosom inseriert ist.

Integrationsereignisse an der Stelle *attP-86Fb* führen zu einer leicht erkennbaren roten (orange-rot kurz nach dem Schlüpfen) Augenfarbe, an der Stelle *attP-68E* und *attP-22A* ist die Augenfarbe leicht orange und bei frisch geschlüpften Tieren schwieriger zu erkennen.

4.3.3. Präparation und Antikörperfärbung von Flügelimaginalscheiben

Für die Präparation der Flügelimaginalscheiben werden die Larven des dritten larvalen Stadiums in einem Blockschälchen mit PBS eingeführt. Die Larven werden in der Mitte durchtrennt und die vordere Hälfte der Larve wird umgestülpt. Um die Flügelimaginalscheiben freizupräparieren werden Fettkörper, Darm und Mundhaken entfernt. Die freipräparierten Scheiben werden in einem Siebchen in einer Kammervertiefung einer Multiwellplatte gesammelt.

Die Antikörperfärbung an den Scheiben wird nach dem folgenden Protokoll bei RT unter ständigem Schwenken durchgeführt.

- Fixierung 30 Min. in 4% Paraformaldehyd
- Waschen 3 x 10 Min. in 0,3% PBT
- Blocken 30 Min. in 5% NGS in 0,3% PBT (oder über Nacht bei 4°C)
- Primärer AK 90 Min. (AK: Antikörper in 5% NGS in 0,3% PBT)
- Waschen 3 x 15 Min. in 0,3% PBT
- Sekundärer AK 60 Min. (AK: Antikörper in 5% NGS in 0,3% PBT)
- Waschen 1 x 10 Min. in 0,3% PBT
- DNA-Färbung 4 Min. in Hoechst
(Hoechstfarbstoff bis-benzimid 1:10000 in H₂O)
- Waschen 2 x 10 Min. in 0,3% PBT
- Einlagerung in PBS

Die Flügelimaginalscheiben werden in Vectashield auf einem Objektträger vom Rest der Larve freipräpariert und mit einem Deckgläschen abgedeckt. Nach dem Fotografieren können die aufgezogenen Scheiben bis zu 6 Monaten bei 4°C eingelagert werden.

PBS:

137 mM NaCl
2,7 mM KCl
8 mM Na₂HPO₄
1,7 mM KH₂PO₄
pH von 7.4 wird mit HCl eingestellt

PBT:

0,3% Tween 20 + 1x PBS

4% Paraformaldehyd:

4 g Paraformaldehyd wird in 80 ml dest. H₂O für ca. 1 Stunde auf der Heizplatte unter dem Abzug gerührt, danach werden 3 Tropfen NaOH hinzugefügt und auf Eis gekühlt. 10 ml 10x PBS wird hinzugefügt und auf 100 ml mit des. H₂O aufgefüllt. pH wird auf 7.2 eingestellt.

Aliquote werden bei -20°C eingefroren.

4.3.4. Fixierung und Präparation der Flügelimaginalscheiben für Elektronenmikroskopie

Fixierung von Imaginalscheiben für elektronenmikroskopische Aufnahmen wurde wie unten aufgelistet durchgeführt:

- Präparieren der Larven in 100 mM kaltem Phosphatpuffer (PO₄), pH 7.3 (alternative PBS)
- Fixierung 1h bei RT in 2,5% Glutaraldehyd in einem Eppi (475µl PO₄+25µl Glutaraldehyd, EM-Reinigungsgrad)
- Waschen 3x 5 Min. im PO₄-Puffer
- Fixierung 1h in 2% Osmium auf Eis im Dunkeln (300 µl 4% Osmium+300µl PO₄)
- Waschen 5x 5 Min. in eiskaltem dest. H₂O
- Inkubation 30 Min. in 2% Uranylacetat in H₂O bei RT und im Dunkeln
- Waschen 5x 5 Min. mit eiskaltem H₂O
- Entwässerung 50%, 70%, 90%, 96% Ethanol je 5 Min. auf Eis
100% 2x 10 Min. bei RT
Aceton 2x 10 Min. bei RT
- Einlagerung in Aceton:Araldit (1:1) ÜN bei 4°C

Am nächsten Tag werden die Flügelimaginalscheiben in einem 3-er Blockschälchen unter dem Abzug überführt damit Aceton abdampft. Nach 1,5h werden die Imaginalscheiben in frischem Araldit überführt und für 3h darin belassen. Als nächstes werden sie in eine Einbettungsform mit frischem Araldit überführt und für 24-48 Stunden bei 65°C zum Polymerisieren gelassen. Anschließend werden sie getrimmt, semidünne- und Ultradünnschnitte davon hergestellt.

4.3.5. Uptake-Experiment

Die Flügelimaginalscheiben werden in kaltem PBS präpariert und die freipräparierten Scheiben in PBS auf Eis gesammelt.

Der *Uptake*-Versuch wurde mit Dextran, das mit einem Fluoreszenzfarbstoff (TexasRed) konjugiert ist (Dextran TexasRed von *Molecular Probes*) und dem Antikörper gegen die extrazelluläre Domäne des Notch-Rezeptors durchgeführt (Versuchsdurchführung nach Entchev *et al.*, 2000; Le Borgne und Schweisguth, 2003).

Der Verlauf der Versuch war wie folgt (Abb.4.9):

- Präparation und Lagerung der Larven in eiskaltem PBS und die Übertragung in Multilochplatten auf Eis
- Wechsel des Mediums gegen neues PBS
- Inkubation mit dem 1. Antikörper: 1h bei 4°C (pulse) → NECD-Antikörper 1:100 in PBS (um eine spezifische Aufnahme der Antikörper zu gewährleisten und eine unspezifische zu verhindern wurde die Antikörperinkubationsphase bei 4°C durchgeführt, um die Endozytose in dieser Zeit zu blockieren)
- 1x schnelles waschen mit PBS (4°C)
- 2x 2 Min. waschen mit PBS (4°C)
- Zugabe von Dextran TexasRed (5mM) → verdünnt in PBS auf 0,5mM
- Inkubation bei 25°C über 45 Min. oder 90 Min. (pulse)
- Waschen 1x schnell und 2x 1 Min. in eiskaltem PBS bei 4°C
- 5 Min. Inkubation bei 25°C in PBS (chase)
- Fixieren 30 Min. in PFA
- 3x 10 Min. waschen in PBT
- Blocken in NGS für 30 Min.
- Inkubation mit 2. Antikörper
- Waschen 10 Min.
- Hoechst 4 Min.
- 2x Waschen jeweils 10 Min. mit PBT
- In PBS aufnehmen

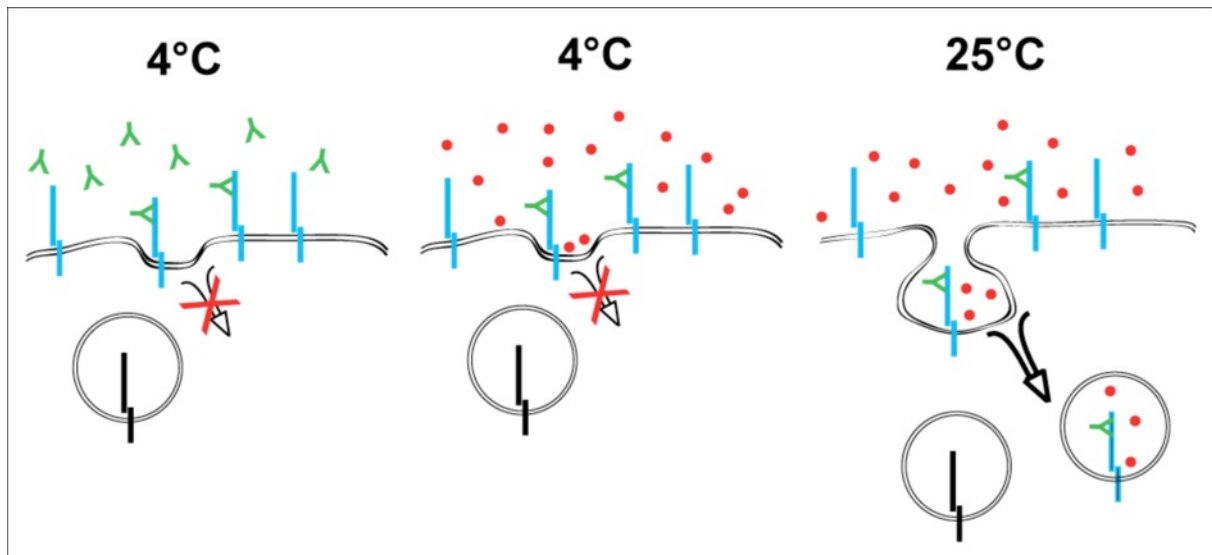


Abb.4.9: Durchführung des Uptake-Experiments. Zuerst werden die Flügelimaginalscheiben bei 4°C für 1h inkubiert, damit die Endozytose und hierbei auch die unspezifische Aufnahme von Antikörpern aus dem Medium verhindert werden. Danach werden die Flügelimaginalscheiben gewaschen und dabei die nicht gebundenen Antikörper entfernt. Dextran TexasRed wird zu den Flügelimaginalscheiben gegeben und sie werden bei 25°C inkubiert. Somit wird die Endozytose wieder in Gang gesetzt.

4.4. LysoTracker Färbung

Die Larven werden in S2-Medium präpariert. Die Flügelimaginalscheiben werden in S2-Medium mit LysoTracker (1 μ M; *LysoTracker*[®] and *LysoSensor*TM Probes von der Firma Invitrogen) für 10 Min. inkubiert. Danach werden die Flügelimaginalscheiben mit S2-Medium 3 mal für jeweils eine Minute gewaschen. Zum Schluss werden sie in Vectashield aufgezogen und unmittelbar am Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

4.4.1. UAS/GAL4-System

Siehe unten bei Beschreibung der RNAi-Technik.

4.4.2. Herstellung der Klone (Flp/FRT System)

Zellklone wurden erzeugt mit dem Flp/FRT-System (Xu und Rubin, 1993) wobei die Induktion im ersten Larvenstadium stattfand (24-48 Stunden nach der Eiablage) durch einen Hitzeschock bei 37°C für 70 Min.

4.4.3. Erzeugung der MARCM-Klone

Durch diese Methode ist es möglich eine klonale Analyse von letalen Mutationen durchzuführen und in den Klonen zu gleicher Zeit UAS-Konstrukte zu exprimieren. Diese Methode bietet zusätzlich die Möglichkeit, mutantes und wildtypisches Gewebe gleichzeitig nebeneinander zu betrachten und zu vergleichen. Die Methode kombiniert das UAS/GAL4-Expressionssystem mit dem Flp/FRT-Rekombinationssystem, wobei hier als weitere Komponente noch das GAL80-Protein hinzutritt, das als Repressor an das GAL4-Protein bindet und die Aktivierung des UAS-Promotors verhindert. Wird das GAL80-Protein unter der Kontrolle eines ubiquitären Promotors transkribiert, so ist das UAS/GAL4-System zunächst in allen Zellen des Tieres inaktiv. Hier kann nun das Flp/FRT-Rekombinationssystem eingesetzt werden. Befindet sich das GAL80 auf einem Chromosom mit einer FRT-Insertion, so kann man dieses mit einem weiteren Chromosom mit einer FRT-Insertion kombinieren, auf welchem auch die zu analysierende Mutation liegt. Befindet sich nun sowohl GAL80 und die zu untersuchende Mutation *in trans* auf homologen Chromosomen, so löst die Flp (Flippase) die Rekombination zwischen den FRT-Insertionen aus. Dadurch entstehen Zellen, die für die betreffende Mutation homozygot sind. Gleichzeitig verlieren diese Zellen GAL80, so dass in ihnen das UAS/GAL4-System aktiv wird. In den hier beschriebenen Experimenten wurde das UAS/GAL4-System zur Aktivierung der UAS-

GFP-Insertion benutzt, wodurch die GAL4-exprimierenden Zellen, die homozygot für *mut4*-mutation sind, positiv markiert wurden (Lee *et al.*, 2000).

Die Expression der Flippase und Induktion der Klone erfolgt durch einen Hitzeschock im zweiten Larvenstadium (48 Stunden nach der Eiablage) für 70 Min. bei 37°C in einem Wasserbad. Präparation und immunhistologische Färbung der Imaginalscheiben erfolgten in drittes Larvenstadium, etwa 48-72 Stunden später.

4.4.4. RNA-Interferenz (RNAi)

Die RNAi-Methode wird in mehreren Organismen verwendet, um die Genfunktion anhand des Phänotyps bei Genausfall, bzw. bei einer unterdrückten Genfunktion (*Knock down*) zu untersuchen. Dabei wird die doppelsträngige RNA mit der komplementären Sequenz zum gewünschten Gen in ein Plasmid kloniert und dann in die Zelle oder einen Organismus eingeführt. Es wird hier vom “*knock-down*”, also einer Runterregulierung gesprochen, da die RNAi-Methode häufig nicht ganz die Expression eines Gens aufheben kann, wie das bei einem *knock-out* der Fall wäre (Voorhoeve und Agami, 2003). Das Faszinierende an dieser Technik ist, dass ganz gezielt die Produktion von einem einzelnen Protein abgeschaltet werden kann- man muss nur die spezifische genetische Sequenz des auszuschaltenden Gens kennen.

In *Drosophila* wird die Technik häufig in Verbindung mit dem UAS/GAL4 (Brand und Perrimon, 1993) Transkriptionsregulationssystem kombiniert. Die gewünschte RNAi-Sequenz wird dabei unter die Kontrolle des UAS-Promotors gesetzt und durch Expression und Bindung des GAL4-Transkriptionsfaktors an die UAS transkribiert (Abb.4.10). Damit kann die RNAi-Expression ganz spezifisch nur in bestimmten Geweben oder zu bestimmten Entwicklungszeitpunkten der Fliege induziert werden, da sowohl die UAS-Sequenz wie der GAL4-Transkriptionsfaktor aus der Hefe stammen und für sich keine Effekte in der Fliege auslösen (Brand und Perrimon, 1993).

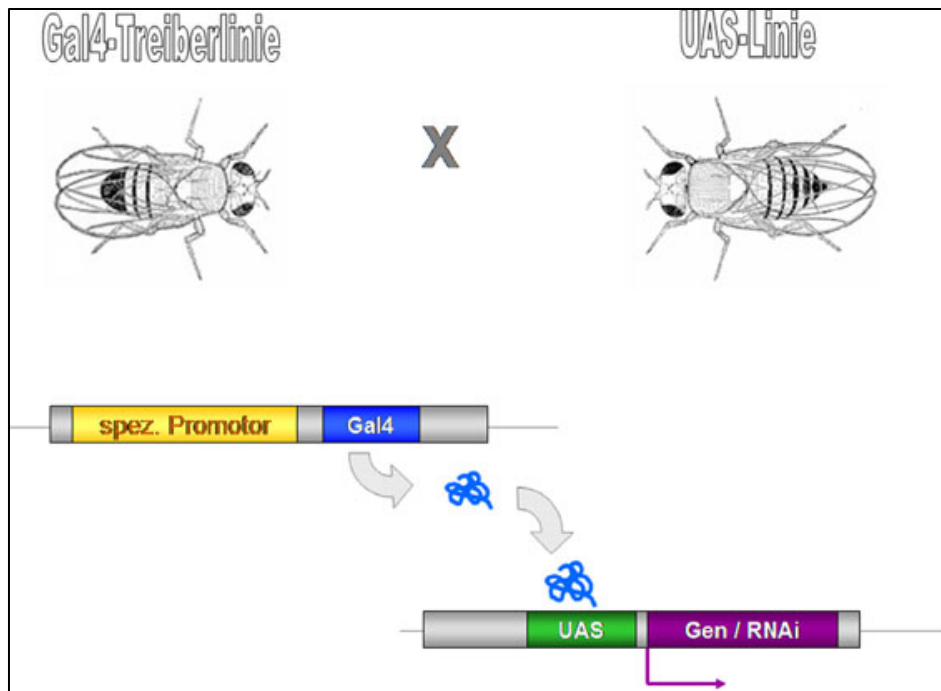


Abb.4.10: Gezielte Gen-/RNAi-Expression in *Drosophila*. Fliegen mit einem gewebespezifischen Promotor für das Protein GAL4 werden mit der UAS-Linie, die das Zielgen trägt (UAS-Gen *X*) gekreuzt. In den Nachkommen Fliegen, die sowohl das GAL4-Protein als auch das UAS-Konstrukt erhalten, wird das Zielgen in gleichen Gebieten wie der Transkriptionsaktivator GAL4 exprimiert. UAS- *Upstream Activating Sequence*.

Quelle: www.mpibpc.gwdg.de/inform/MpiNews/cientif/jahrg10/4.04/fig3.html

4.5. Proteinsequenz-Alignments und Phylogenie

Proteinsequenzen-Alignments wurden erstellt im Programm MEGA (Version 5; Tamura *et al.*, 2011) mit dem ClustalW-Algorithmus. Die ClustalW-Einstellungen für das Alignment wurden bei Programm-Standardwerten belassen (paarweises Alignment: Gap Opening Penalty=10, Gap Extension Penalty 0.1; Multiple Alignment: Gap Opening Penalty=10, Gap Extension Penalty 0.2; Protein Weight Matrix=Gonnet, Residue-specific Penalties=ON, Hydrophilic Penalties=ON, Gao Separation Distance=4, End Gap Separation=OFF, Use Negative Matrix=OFF, Delay Divergent Cutoff=30%). Die Alignments wurden anschließend im Programm Bioedit (Version 7.1.11; Hall, 1999) für die graphische Ausgabe bearbeitet. Bei einer Übereinstimmung (Consensus) von 50% und mehr wurden die jeweiligen Aminosäuren schwarz unterlegt, bei niedrigerem Übereinstimmungsgrad (keine Identität aber ähnliche Aminosäuren) sind die jeweiligen Aminosäuren in leichten Blau unterlegt. Sonstige Einstellungen wurden bei den Standardwerten belassen.

Für die Alignments wurden Proteinsequenzen mit folgenden Genbankzugriffsnummern benutzt: Dmon1 (CG11926) aus *D. melanogaster*: NP_608868.1 (DM; 528aa); humanes

MON1A: NP_001135973.1 (MON1A; 490aa); humanes MON1B: AAH24277.1 (MON1B; 547aa); Mon1p aus *S. cerevisiae*: NP_011391.2 (Mon1p; 644aa); SAND-1 aus *C. elegans*: NP_500791.2 (SAND1; 459aa); SAND-family protein aus *Arabidopsis thaliana*: NP_029426.1 (ARAB; 607aa); Os01g0976000 Protein aus *Oryza sativa*: NP_001045563.2 (ORYZA; 567aa) und AAR175Cp Protein aus *Ashbya gossypii*: NP_982718.2(ASBYA; 581aa).

Der Graph zur Phylogenie der Mon1-Orthologen wurde mit dem Programm Bioedit (Version 7.1.11; Hall, 1999), mit der Funktion ProML Protein Maximum Likelihood program (version 3.6a2.1) basierend auf dem Jones-Taylor-Thornton *model of amino acid change* mit den Standardeinstellungen vorgenommen.

Ähnlichkeit und Identität der Proteinsequenzen der Mon1-Orthologen wurden berechnet mit Hilfe des Internetdienstes "*Sequence Manipulation Site*" (http://www.bioinformatics.org/sms2/ident_sim.html, Stothard P., 2000), in das von MEGA erstellte Alignment eingegeben wurde und zur Berechnung die Standardvorgaben des Dienstes benutzt wurden. Bei den Standardvorgaben wurden die Aminosäuren in den folgenden Gruppen als jeweils ähnliche Aminosäuren angenommen: GAVLI, FYW, CM, ST, KRH, DENQ, P.

5. ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit wurde die Mutation *mut*⁴ in *Drosophila melanogaster* als ein Allel des Gens *Dmon1* identifiziert und die Funktion von *Dmon1* in der Fliege charakterisiert. *Dmon1* wird von der Transkriptionseinheit CG11926 kodiert, welche auf dem linken Arm des zweiten Chromosoms in der Region 25B1 liegt. Das Gen ist in verschiedenen Organismen von Schimmelpilzen über Pflanzen bis zu den Vertebraten konserviert, wobei während die meisten Organismen nur ein Ortholog von Mon1/SAND-1 enthalten, zwei Orthologe, Mon1a und Mon1b, in Vertebraten zu finden sind. *Dmon1* ist in den endosomalen Transportweg involviert. Der Ausfall von *Dmon1* führt zur Entstehung vergrößerter Endosomen, die verschiedene Frachten wie sekretierte und Transmembranproteine enthalten. Mittels EM-Aufnahmen konnte die fluorezenzmikroskopisch festgestellte Vergrößerung der Endosomen bestätigt und quantifiziert werden. Ferner konnte in den EM-Aufnahmen beobachtet werden, dass bei den vergrößerten Endosomen die ILV vollständig ausgebildet werden und dass in den Zellen Lysosomen vorhanden sind. Die vergrößerten Endosomen sind sowohl mit den Markern der frühen/sortierenden Endosomen wie mit denen von reifen/späten Endosomen assoziiert. In *Dmon1*-mutanten Zellen verbleibt Rab5 länger an den Endosomen. Dabei ist die Rekrutierung von Rab7 an die Endosomen in den *Dmon1*-mutanten Zellen gestört. Die hier vorgestellten Ergebnisse deuten darauf hin, dass der beobachtete Phänotyp in *Dmon1*-mutanten Zellen auf eine Blockade der Rab7-Funktion zurückzuführen ist, die eine Fusion der reifen Endosomen mit dem Lysosom verhindert. Zur weiteren Charakterisierung von *Dmon1* sind markierte und nicht-markierte Konstrukte von *Dmon1* und seinen vermutlichen Interaktionspartnern hergestellt und die Effekte ihrer Expression in Zellen von Flügelimaginalscheiben untersucht worden. Hierbei konnte unter anderem eine Interaktion von *Dmon1* mit *Dccz1*, die bei deren Orthologen beobachtet werden konnte auch in *Drosophila* bestätigt werden. Neben den Ähnlichkeiten, wie der Funktion bei Rekrutierung von Rab7 und der Interaktion mit *Dccz1* wurden auch einige Unterschiede zu den Beobachtungen in anderen Organismen festgestellt. Zum einen konnte keine Veränderung der Rabex-5-Verteilung in *Dmon1*-mutanten Zellen beobachtet werden, zum anderen scheinen die Lysosomen intakt zu sein, im Gegensatz zu fragmentierten Vakuole (Lysosom-Äquivalent) in der Hefe. Trotz der weitgehenden Sequenzähnlichkeit der Mon1-Orthologen, scheint es also dennoch Unterschiede in deren Funktionsmechanismus zu geben. Interessanterweise sind trotz der endosomalen Akkumulation der verschiedenen Proteine in den *Dmon1*-mutanten Zellen die Signaltransduktionswege der jeweiligen Proteine nicht dadurch betroffen.

6. SUMMARY

In this thesis the *mut*⁴-mutation was identified in *Drosophila melanogaster* as an allele of the gene *Dmon1* and the function of *Dmon1* was characterized in the fly. *Dmon1* is encoded by the CG11926 transcription unit, which is located on the left arm of the second chromosome in the region 25B1. The gene is conserved in different organisms such as molds and plants up to vertebrates. However, while invertebrates and the other organisms only contain one orthologue of Mon1/SAND-1, two orthologues, Mon1a and Mon1b, are found in vertebrates. *Dmon1* is involved in endosomal transport. Loss of function of *Dmon1* leads to the emergence of enlarged endosomes containing various cargoes such as secreted and transmembrane proteins. By means of electron micrographs, the enlargement of the endosomes observed beforehand by immunofluorescence was confirmed and quantified. Furthermore, it could be observed in the electron micrographs that the enlarged endosomes contain ILVs and that lysosomes are present in the cells. The enlarged endosomes are associated with both the markers of early/sorting as with those of mature/late endosomes. In *Dmon1*-mutant cells Rab5 persists longer on the endosomes. The recruitment of Rab7 to the endosomes however, is blocked or at least heavily disturbed in the *Dmon1*-mutant cells. The results presented here suggest that the observed phenotype in *Dmon1*-mutant cells is due to a blockade of Rab7 function that prevents a fusion of mature endosomes with the lysosome. For further characterization of *Dmon1* labeled and non-labeled constructs *Dmon1* and its putative interaction partners have been prepared and studied in cells of wing imaginal discs for the effects of their expression. Here, among other things, an interaction of *Dmon1* with *Dccz1* that could be observed by others in respect of their orthologues could be also confirmed in *Drosophila*. Besides the similarities, such as the function in recruitment of Rab7 and interaction with *Dccz1* also some differences to the other organisms have been observed. Firstly, no change in the distribution of Rabex-5 could be observed in *Dmon1*-mutant cells, on the other hand lysosomes appear to be intact in contrast to the observation of fragmented vacuoles (lysosome equivalent) in yeast. Despite the high degree of sequence similarity of Mon1 orthologues, there appear to be organism specific differences in their mechanism of function thus. Interestingly, notwithstanding the endosomal accumulation of various proteins in the *Dmon1*-mutant cells the signal transduction pathways of the respective proteins appear not to be affected thereby.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- Ashburner M. (1989) *Drosophila: A laboratory Handbook*. Cold Spring Harbor, New York
- Babst M., Katzmann D. J., Estepa-Sabal E. J., Meerloo T., Emr S. D. (2002). Escrt-III: an endosome-associated heterooligomeric protein complex required for mvb sorting. *Dev Cell* **3**, 271–282.
- Babst M., Wendland B., Estepa E. J., Emr S. D. (1998) The Vps4p AAA ATPase regulates membrane association of a Vps protein complex required for normal endosome function. *EMBO J.* **17**, 2982–2993.
- Bachmann A., Knust E. (2008) The use of P-element transposons to generate transgenic flies. *Methods Mol Biol.* **420**, 61-77.
- Bajorek M., Schubert H. L., McCullough J., Langelier C., Eckert D. M., Stubblefield W. M., Uter N. T., Myszkowski D. G., Hill C. P., Sundquist W. I. (2009) Structural basis for ESCRT-III protein autoinhibition. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16**, 754–762.
- Balderhaar H. J., Ungermann C. (2013) CORVET and HOPS tethering complexes - coordinators of endosome and lysosome fusion. *J Cell Sci.* **126**, 1307-1316.
- Banani E., Murray J. W., Stockert R. J., Satir P., Wolkoff A. W. (2003) Regulation of early endocytic vesicle motility and fission in a reconstituted system. *Journal of Cell Science* **116**, 2749-2761.
- Barr F., Lambright D. G. (2010) Rab GEFs and GAPs. *Curr Opin Cell Biol.* **22**, 461-470.
- Bischof J., Maeda R. K., Hediger M., Karch F., Basler K. (2007) An optimized transgenesis system for *Drosophila* using germ-line-specific phiC31 integrases. *PNAS.* **104**(9), 3312-3317.
- Blair S. S., Brower D. L., Thomas J. B., Zavortink M. (1994) The role of *apterous* in the control of dorsoventral compartmentalization and PS integrin gene expression in the developing wing of *Drosophila*. *Development* **120**, 1805-1815.
- Bohdanowicz M., Grinstein S. (2010) Vesicular traffic: a Rab SANDwich. *Curr Biol.* **20**(7), R311-314.
- Bonifacino J. S., Glick B. S. (2004), The mechanisms of vesicle budding and fusion. *Cell* **116**, 153-166.
- Bray S. J. (2006) Notch Signalling: a simple pathway becomes complex. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **7**, 678-689.
- Brand A. H., Perrimon N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* **118**, 401-415.
- Bryant P. J. (1975) Pattern formation in the imaginal wing disc of *Drosophila melanogaster*: fate map, regeneration and duplication. *J Exp Zool* **193**, 49-77.

- Bröcker C., Engelbrecht-Vandré S., Ungermann C. (2010) Multisubunit tethering complexes and their role in membrane fusion. *Curr. Biol.* **20**, R943–R952.
- Bröcker C., Kuhleeb A., Gatsogiannis C., kleine Balderhaar H. J., Hönscher C., Engelbrecht-Vandré S., Ungermann C., Raunser S. (2012) Molecular architecture of the multisubunit homotypic fusion and vacuole protein sorting (HOPS) tethering complex. *PNAS*. **109**(6), 1991-1996.
- Bucci C., Parton R. G., Mather I. H., Stunnenberg H., Simons K., Hoflack B., Zerial M. (1992) The small GTPase Rab5 functions as a regulatory factor in the early endocytic pathway. *Cell* **70**, 715-728.
- Bucci C., Thomsen P., Nicoziani P., McCarthy J., van Deurs B. (2000) Rab7: a key to lysosome biogenesis. *Mol Biol Cell* **11**, 467–480.
- Cabrera M., Ungermann C. (2010). Guiding endosomal maturation. *Cell*. **141**(3), 404-406.
- Cantalupo G., Alifano P., Roberti V., Bruni C. B., Bucci C. (2001) Rab-interacting lysosomal protein (RILP): the Rab7 effector required for transport to lysosomes. *EMBO J.* **20**, 683-693.
- Chen Y., Struhl G. (1998) In vivo evidence that Patched and Smoothed constitute distinct binding and transducing components of a Hedgehog receptor complex. *Development* **125**(24), 4943-4948.
- Christoforidis S., Miaczynska M., Ashman K., Wilm M., Zhao L., Yip S. C., Waterfield M. D., Backer J. M., Zerial M. (1999) Phosphatidylinositol 3-OH kinases are Rab5 effectors. *Nat Cell Biol.* **1**, 249–252.
- Couso J. P. , Knust E., Martinez Arias A. (1995) Serrate and wingless cooperate to induce vestigial gene expression and wing formation in Drosophila. *Curr Biol.* **5**, 1437-1448.
- Daro E., van der Sluijs P., Galli T., Mellman I. (1996) Rab4 and cellubrevin define different early endosome populations on the pathway of transferrin receptor recycling. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **93**, 9559-9564.
- Dahmann C. (2008) Drosophila: Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology). Humana Press, Totowa, N.J.
- Delprato A., Merithew E., Lambright D. G. (2004) Structure, Exchange Determinants, and Family-Wide Rab Specificity of the Tandem Helical Bundle and Vps9 Domains of Rabex-5. *Cell* **118**, 607-617.
- de Celis J. F. and Bray S. (1997) Feed-back mechanisms affecting Notch activation at the dorsoventral boundary in the Drosophila wing. *Development* **124**, 3241-3251.
- Demaurex N. (2002) pH Homeostasis of Cellular Organelles. *News Physiol Sci.* **17**, 1-5
- de Navascués J, Perdigoto CN, Bian Y, Schneider M. H., Bardin A. J., Martínez-Arias A., Simons B. D. (2012) *Drosophila* midgut homeostasis involves neutral competition between symmetrically dividing intestinal stem cells. *EMBO J.* **31**, 2473-2485.

- Diaz-Benjumea F. J., Cohen S. M. (1993) Interaction between dorsal and ventral cells in the imaginal disc directs wing development in *Drosophila*. *Cell* **75**, 741-752.
- Diaz-Benjumea F. J., Cohen S. M. (1995) Serrate signals through Notch to establish a Wingless-dependent organizer at the dorsal/ventral compartment boundary of the *Drosophila* wing. *Development*. **121**, 4215-4225.
- Doherty G. J., McMahon H. (2009) Mechanisms of endocytosis. *Annu Rev Biochem* **78**, 857-902.
- Entchev E. V., Schwabedissen A., Gonzalez-Gaitan M. (2000) Gradient formation of the TGF-beta homolog Dpp. *Cell* **103**, 981-991.
- Epp N., Rethmeier R., Krämer L., Ungermann C. (2011) Membrane dynamics and fusion at late endosomes and vacuoles-Rab regulation, multisubunit tethering complexes and SNAREs. *European Journal of Cell Biology*. **90**, 779-785.
- Fischer J. A., Eun S.H., Doolan B. T. (2006) Endocytosis, Endosome Trafficking and the Regulation of *Drosophila* Development. *Annu Rev Cell Dev Biol*. **22**, 181-206.
- Forgac M. (2007) Vacuolar ATPases: rotary proton pumps in physiology and pathophysiology. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 917-929.
- Furriols M., Bray S. (2001) A model Notch response element detects Suppressor of Hairless-dependent molecular switch. *Current Biology*. **11**, 60-64.
- García-Bellido A. (1975) Genetic control of wing disc development in *Drosophila*. *Ciba Found Symp*. **0**(29), 161-182.
- Gerondopoulos A., Langemeyer L., Liang J. R., Linford A., Barr F. A. (2012). BLOC-3 mutated in Hermansky-Pudlak syndrome is a Rab32/38 guanine nucleotide exchange factor. *Curr Biol*. **22**, 2135-2139.
- Gruenberg J., Stenmark H. (2004). The biogenesis of multivesicular endosomes. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **5**(4), 317-323.
- Gill D. J., Teo H., Sun J., Perisic O., Veprintsev D. B., Emr S. D., Williams R. L (2007). Structural insight into the ESCRT-I/-II link and its role in MVB trafficking. *EMBO J*. **26**, 600-612.
- Gillooly D. J., Morrow I. C., Lindsay M., Gould R., Bryant N. J., Gaullier J. M., Parton R. G., Stenmark H. (2000) Localization of phosphatidylinositol 3-phosphate in yeast and mammalian cells. *EMBO J*. **19**, 4577-4588.
- Golembo M., Schweitzer R., Freeman M., Shilo B. Z. (1996) Argos transcription is induced by the *Drosophila* EGF receptor pathway to form an inhibitory feedback loop. *Development*. **122**, 223-230.
- González F., Swales L., Bejsovec A., Skaer H., Martinez Arias A. (1991) Secretion and movement of wingless protein in the epidermis of the *Drosophila* embryo. *Mech Dev*. **35**, 43-54.

- Gorski S. M., Chittaranjan S., Pleasance E. D., Freeman J. D., Anderson C. L., Varhol R. J., Coughlin S. M., Zuyderduyn S. D., Jones S. J., Marra M. A. (2003) A SAGE approach to discovery of genes involved in autophagic cell death. *Curr. Biol.* **13**, 358-363.
- Gorvel J. P., Chavrier P., Zerial M., Gruenberg J. (1991) Rab5 controls early endosome fusion in vitro. *Cell* **64**, 915-925.
- Gutierrez M. G., Munafó D. B., Berón W., Colombo M. I. (2004) Rab7 is required for the normal progression of the autophagic pathway in mammalian cells. *J. Cell Sci.* **117**, 2687-2697.
- Hall T. A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* **41**, 95-98.
- Heitzler P., Bourouis M., Ruel L., Carteret C., Simpson P. (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**, 161-171.
- Henne W. M., Buchkovich N. J., Emr S. (2011) The ESCRT Pathway. *Developmental Cell* **21**, 77-91.
- Hickey C. M., Wickner W. (2010) HOPS initiates vacuole docking by tethering membranes before trans-SNARE complex assembly. *Mol Biol Cell.* **21**, 2297-2305.
- Hierro A., Sun J., Rusnak A. S., Kim J., Prag G., Emr S. D., Hurley J. H. (2004) Structure of the ESCRT-II endosomal trafficking complex. *Nature* **431**, 221-225.
- Ho S. N., Hunt H. D., Horton R. M., Pullen J. K., Pease L. R. (1989) Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* **77**, 51-59.
- Hofmann I., Munro S. (2006) An N-terminally acetylated Arf-like GTPase is localised to lysosomes and effects there motility. *J. Cell Sci.* **119**, 1494-1503.
- Horiuchi H., Lippé R., McBride H. M., Rubino M., Woodman P., Stenmark H., Rybin V., Wilm M., Ashman K., Mann M., Zerial M. (1997) A novel Rab5 GDP/GTP exchange factor complexed to Rabaptin-5 links nucleotide exchange to effector recruitment and function. *Cell* **90**, 1149-1159.
- Horton R. M., Cai Z. L., Ho S. N., Pease L. R., (1990) Gene splicing by overlap extension: tailer-made genes using the polymerase chain reaction. *Biotechniques.* **8**, 528-535.
- Horton R. M., Hunt H. D., Ho S. N., Pullen J. K., Pease L. R. (1989) Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension. *Gene.* **77**, 61-68.
- Huotari J., Helenius A. (2011) Endosome maturation. *EMBO J.* **30**, 3481-500.
- Jahn R., Scheller R. H. (2006), SNAREs-engines for membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **7**, 631-643.

- Jäger S., Bucci C., Tanida I., Ueno T., Kominami E., Saftig P., Eskelinen E. L. (2004) Role for Rab7 in maturation of late autophagic vacuoles. *J Cell Sci.* **117**, 4837-4848.
- Jékely G., Rørth P. (2003) Hrs mediates downregulation of multiple signalling receptors in *Drosophila*. *EMBO Rep.* **4**(12), 1163-1168.
- Jordens I., Fernandez-Borja M., Marsman M., Dusseljee S., Janssen L., Calafat J., Janssen H., Wubbolts R., Neefjes J. (2001) The Rab7 effector protein RILP controls lysosomal transport by inducing the recruitment of dynein-dynactin motors. *Curr Biol.* **11**(21), 1680-1685.
- Jovic M., Sharma M., Rahajeng J., Caplan S. (2010) The early endosome: a busy sorting station for proteins at the crossroads. *Histol Histopathol* **25**, 99–112.
- Kinchen J. M., Ravichandran K. S. (2010) Identification of two evolutionarily conserved genes regulating processing of engulfed apoptotic cells. *Nature.* **464**, 778-782.
- Klein T. (2001) Wing disc development in the fly: the early stages. *Curr Opin Genet Dev.* **11**(4), 470-475.
- Klein T., Martinez Arias A. (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**, 196-212.
- Kucharczyk R., Kierzek A. M., Slonimski P. P., Rytka J. (2001) The Ccz1 protein interacts with Ypt7 GTPase during fusion of multiple transport intermediates with the vacuole in *S. cerevisiae*. *J Cell Sci.* **114**(Pt 17), 3137-3145.
- Kutateladze T., Overduin M. (2001) Structural Mechanism of Endosome Docking by the FYVE Domain. *Science.* **291**, 1793-1796.
- Le Borgne R., Bardin A., Schweisguth F. (2005) The roles of receptor and ligand endocytosis in regulation Notch signaling. *Developmen.* **132**, 1751-1762.
- Le Borgne R., Schweisguth F. (2003) Unequal segregation of Neuralized biases Notch activation during asymmetric cell division. *Dev Cell.* **5**, 139-148.
- Lee T., Winter C., Marticke S. S., Lee A., Luo L. (2000). Essential roles of *Drosophila* RhoA in the regulation of neuroblast proliferation and dendritic but not axonal morphogenesis. *Neuron* **25**, 307-316.
- Lee Y. S., Nakahara K., Pham J. W., Kim K., He Z., Sontheimer E. J., Carthew R. W. (2004) Distinct roles for *Drosophila* Dicer-1 and Dicer-2 in the siRNA/miRNA silencing pathways. *Cell.* **117**, 69-81.
- Lee S., Yien C. T., Mattera R., Smith W. J., Kostelansky M. S., Weissman A. M., Bonifacino J. S., Hurley J. H. (2006) Structural basis for ubiquitin recognition and autoubiquitination by Rabex-5. *Nat Struct Mol Biol.* **13**, 264-271.
- Linassier C., MacDougall L. K., Domin J., Waterfield M.D. (1997) Molecular cloning and biochemical characterization of a *Drosophila* phosphatidylinositol-specific phosphoinositide 3-kinase. *Biochem. J.* **321**, 849–856.

- Lindsley D. L., Zimm G. G. (1992). *The Genome of Drosophila melanogaster*. Academic Press, New York
- Lippe R., Miaczynska M., Rybin V., Runge A., Zerial M. (2001) Functional synergy between Rab5 effector Rabaptin-5 and exchange factor Rabex-5 when physically associated in a complex. *Mol Biol Cell* **12**, 2219–2228.
- Liu Q., Rand T. A., Kalidas S., Du F., Kim H. E., Smith D. P., Wang X. (2003) R2D2, a bridge between the initiation and effector Steps of the *Drosophila* RNAi pathway. *Science*. **301**, 1921-1925.
- Lloyd T. E., Atkinson R., Wu M. N., Zhou Y., Pennetta G., Bellen H. J. (2002) Hrs regulates endosome membrane invagination and tyrosine kinase receptor signaling in *Drosophila*. *Cell* **108**(2), 261-269.
- Luhtala N., Odorizzi G. (2004) Bro1 coordinates deubiquitination in the multivesicular body pathway by recruiting Doa4 to endosomes. *J. Cell Biol.* **166**, 717–729.
- Luzio J. P., Pryor P. R., Bright N. A. (2007) Lysosomes: fusion and function. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **8**, 622-632.
- Mao Y., Nickitenko A., Duan X., Lloyd T. E., Wu M. N., Bellen H., and Quiococho F. A. (2000) Crystal structure of the VHS and FYVE tandem domains of Hrs, a protein involved in membrane trafficking and signal transduction. *Cell* **100**, 447–456.
- Marois E., Mahmoud A., Eaton S. (2006) The endocytic pathway and formation of the Wingless morphogen gradient. *Development*. **133**, 307-317.
- Marshansky V., Futai M. (2008) The V-type H⁺-ATPase in vesicular trafficking: targeting, regulation and function. *Curr Opin Cell Biol* **20**, 415–426.
- Mattera R., Bonifacino J. S. (2008) Ubiquitin binding and conjugation regulate the recruitment of Rabex-5 to early endosomes. *EMBO J.* **27**, 2484–2494.
- Mattera R., Yien C. T., Weissman A. M., Bonifacino, J. S. (2006) The Rab5 Guanine Nucleotide Exchange Factor Rabex-5 binds Ubiquitin (Ub) and functions as a Ub Ligase through an atypical Ub-interacting Motif and a Zinc Finger Domain. *J Biol Chem.* **281**, 6874-6883.
- Maxfield F. R., McGraw T. E. (2004) Endocytic Recycling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **5**, 121-132.
- Maxfield F. R., Yamashiro D. J. (1987) Endosome acidification and the pathways of receptor-mediated endocytosis. *Adv Exp Med Biol.* **225**, 189-198.
- McCullough J., Row P. E., Lorenzo O., Doherty M., Beynon R., Clague M. J., Urbe' S. (2006). Activation of the endosome-associated ubiquitin isopeptidase AMSH by STAM, a component of the multivesicular body-sorting machinery. *Curr. Biol.* **16**, 160–165.
- Méresse S., Gorvel J. P., Chavrier P. (1995) The Rab7 GTPase resides on a vesicular compartment connected to lysosomes. *J. Cell Sci.* **108**, 3349-3358.

- Moberg K. H., Schelble S., Burdick S. K., Hariharan I. K. (2005). Mutations in erupted, the *Drosophila* ortholog of mammalian tumor susceptibility gene 101, elicit non-cell-autonomous overgrowth. *Dev. Cell* **9**, 699–710.
- Murray J. T., Panaretou C., Stenmark H., Miaczynska M., Backer J. M. (2002) Role of Rab5 in the recruitment of hVps34/p150 to the early endosome. *Traffic*. **3** (6), 416-427.
- Nickerson D. P., Brett L. C., Merz A. J. (2009) Vps-C complexes: gatekeepers of endolysosomal traffic. *Current Opinion in Cell Biology*. **21**, 543-551.
- Nielsen E., Severin F., Backer J. M., Hyman A. A., Zerial M. (1999) Rab5 regulates motility of early endosomes on microtubules. *Nature Cell Biology* **1**, 376 – 382.
- Nordmann M., Cabrera M., Perz A., Bröcker C., Ostrowicz C. W., Engelbrecht-Vandre S., Ungermann C. (2010) The Mon1-Ccz1 complex is the GEF of the late endosomal Rab7 homolog Ypt7. *Current Biology* **20**, 1654-1659.
- Novick P., Zerial M. (1997) The diversity of Rab proteins in vesicle transport. *Curr Opin Cell Biol.* **9**, 496-504.
- Odorizzi G., Katzmann D. J., Babst M., Audhya A., Emr S. D. (2003) Bro1 is an endosome-associated protein that functions in the MVB pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Sci.* **116**, 1893–1903.
- Peralta E. R., Martin B. C., Edinger A. L. (2010) Differential effects of TBC1D15 and mammalian Vps39 on Rab7 activation state, lysosomal morphology, and growth factor dependence. *J Biol Chem.* **285**, 16814–16821.
- Pfeffer S. R. (1994). RabGTPases: master regulators of membrane trafficking. *Curr Opin Cell Biol.* **6**, 522-526.
- Pfeffer S., Aivazian D. (2004) Targeting Rab GTPases to distinct membrane compartments. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **5**, 886-896.
- Poteryaev D., Spang A. (2005) A role of SAND-family proteins in endocytosis. *Biochem Soc Trans* **33**, 606-608.
- Poteryaev D., Fare H., Bowerman B., Spang A. (2007) *Caenorhabditis elegans* SAND-1 is essential for RAB-7 function in endosomal traffic. *EMBO J* **26**, 301-312.
- Poteryaev D., Datta S., Ackema K., Zerial M., Spang A. (2010) Identification of the switch in early-to-late endosome transition. *Cell*. **141**, 497-508.
- Progida C., Malerød L., Stuffers S., Brech A., Bucci C., Stenmark H. (2007) RILP is required for the proper morphology and function of late endosomes. *J Cell Sci.* **120**(Pt 21), 3729-3737.
- Pryor P. R., Luzio J. P. (2009) Delivery of endocytosed membrane proteins to the lysosome. *Biochim Biophys Acta.* **1793**, 615-24.
- Pulipparacharuvil S., Ali Akbar M., Ray S., Sevrioukov E. A., Haberman A. S., Rohrer J.,

- Krämer H. (2005) *Drosophila* Vps16A is required for trafficking to lysosomes and biogenesis of pigment granules. *J. Cell Sci.* **118**, 3663-3673.
- Raiborg C., Bremnes B., Mehlum A., Gillooly D. J., D'Arrigo A., Stang E., Stenmark H. (2001). FYVE and coiled-coil domains determine the specific localisation of Hrs to early endosomes. *J. Cell Sci.* **114**, 2255–2263.
- Raiborg C., Wesche J., Malerød L., Stenmark H. (2006) Flat clathrin coats on endosomes mediate degradative protein sorting by scaffolding Hrs in dynamic microdomains. *J. Cell Sci.* **119**, 2414–2424.
- Raiborg C., Stenmark H. (2009) The ESCRT machinery in endosomal sorting of ubiquitylated membrane proteins. *Nature*. **458**(7237), 445-452.
- Raymond C. K., Howald-Stevenson I., Carol A. Vater C. A., Stevens T. H. (1992). Morphological Classification of the Yeast Vacuolar Protein Sorting Mutants: Evidence for a Prevacuolar Compartment in Class E vps Mutants. *Molecular Biology of the Cell* **3**, 1389-1402.
- Rink J., Ghigo E., Kalaidzidis Y., Zerial M. (2005) Rab conversion as a mechanism of progression from early to late endosomes. *Cell*. **122**, 735-749.
- Robbins D. J., Nybakken K. E., Kobayashi R., Sisson J. C., Bishop J. M., Théron P. P. (1997) Hedgehog elicits signal transduction by means of a large complex containing the kinesin-related protein costal2. *Cell* **90**(2), 225-234.
- Roberts D. B. (1986). *Drosophila – a practical approach*. IRL, Oxford, UK)
- Rohrer J., Schweizer A., Russell D., Kornfeld S. (1996) The targeting of Lamp1 to lysosomes is dependent on the spacing of its cytoplasmic tail tyrosine sorting motif relative to the membrane. *J. Cell Biol.* **132**, 565-576.
- Rusten T. E., Lindmo K., Juhász G., Sass M., Seglen P. O., Brech A., Stenmark H. (2004) Programmed autophagy in the *Drosophila* fat body is induced by ecdysone through regulation of the PI3K pathway. *Dev Cell*. **7**(2), 179-192.
- Rusten T. E., Vaccari T., Lindmo K., Rodahl L. M., Nezis I. P., Sem-Jacobsen C., Wendler F., Vincent J. P., Brech A., Bilder D., Stenmark H. (2007) ESCRTs and Fab1 regulate distinct steps of autophagy. *Curr Biol*. **17**(20), 1817-1825.
- Saksena S., Wahlman J., Teis D., Johnson A. E., Emr S. D. (2009) Functional reconstitution of ESCRT-III assembly and disassembly. *Cell* **136**, 97–109.
- Sato A., Kojima T., Ui-Tei K., Miyata Y., Saigo K. (1999) Dfrizzled-3, a new *Drosophila* Wnt receptor, acting as an attenuator of Wingless signaling in *wingless* hypomorphic mutants. *Development*. **126**, 4421-4430.
- Schröder B., Wrocklage C., Pan C., Jäger R., Kösters B., Schäfer H., Elsässer H. P., Mann M., Hasilik A. (2007) Integral and associated lysosomal membrane proteins. *Traffic*. **8**, 1676-1686.

- Schu P. V., Takegawa K., Fry M. J., Stack J. H., Waterfield M. D., Emr S. D. (1993) Phosphatidylinositol 3-kinase encoded by yeast VPS34 gene essential for protein sorting. *Science*. **260**, 88-91.
- Schweitzer R., Howes R., Smith R., Shilo B. Z., Freeman M. (1995) Inhibition of Drosophila EGF receptor activation by the secreted protein Argos. *Nature*. **376**, 699–702.
- Scott R. C., Schuldiner O., Neufeld T. P. (2004) Role and regulation of starvation-induced autophagy in the Drosophila fat body. *Dev Cell*. **7**(2), 167-178.
- Sevrioukov E. A., He J. P., Moghrabi N., Sunio A., Kramer H. (1999) A role for the deep orange and carnation eye color genes in lysosomal delivery in Drosophila. *Mol Cell* **4**, 479–486.
- Shingleton A. W. (2010) The regulation of organ size in Drosophila: physiology, plasticity, patterning and physical force. *Organogenesis*. **6**(2), 76-87.
- Siomi M. C., Tsukumo H., Ishizuka A., Nagami T., Siomi H. (2005) A potential link between transgene silencing and poly (A) tails. *RNA* **11**, 1004-1011.
- Slagsvold T., Aasland R., Hirano S., Bache K. G., Raiborg C., Trambaiolo D., Wakatsuki S., Stenmark H. (2005) Eap45 in mammalian ESCRT-II binds ubiquitin via a phosphoinositide-interacting GLUE domain. *J. Biol. Chem.* **280**, 19600–19606.
- Soldati T., Schliwa M. (2006) Powering membrane traffic in endocytosis and recycling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **7**, 897-908.
- Somsel R. J., Wandinger-Ness A. (2000) Rab GTPases coordinate endocytosis. *J Cell Sci.* **2**, 183-192.
- Sorkin A., von Zastrow M. (2002) Signal transduction and endocytosis: close encounters of many kinds. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **3**, 600-614.
- Sorkin A., von Zastrow M. (2009) Endocytosis and signaling: intertwining molecular networks. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **10**, 609-622.
- Sönnichsen B., De R. S., Nielsen E., Rietdorf J., Zerial M. (2000) Distinct membrane domains on endosomes in the recycling pathway visualized by multicolor imaging of Rab4, Rab5, and Rab11. *J. Cell Biol.* **149**, 901–914.
- Spang A. (2009) On the fate of early endosomes. *Biol Chem.* **390**, 753-759.
- Speicher S. A., Thomas U., Hinz U., Knust E. (1994) The Serrate locus of Drosophila and its role in morphogenesis of the wing imaginal discs: control of cell proliferation. *Development*. **120**(3), 535-44.
- Sriram V., Krishnan K. S., Mayor S. (2003) „deep-orange and carnation define distinct stages in late endosomal biogenesis in Drosophila melanogaster.“ *The Journal of Cell Biology* **161**, 593-607.
- Stenmark H. (2009) Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nat Rev Mol Cell Biol.*

10, 513-525.

Stenmark H., Parton R. G., Steele-Mortimer O., Lutcke A., Gruenberg J., Zerial, M. (1994) Inhibition of rab5 GTPase activity stimulates membrane fusion in endocytosis. *EMBO J.* **13**, 1287-1296.

Stothard P. (2000) The Sequence Manipulation Suite: JavaScript programs for analyzing and formatting protein and DNA sequences. *Biotechniques* **28** (6), 1102-1104.

Strigini M., Cohen S. M. (1999) Formation of morphogen gradients in the Drosophila wing. *Semin Cell Dev Biol.* **10** (3), 335-344.

Strigini M., Cohen S. M. (2000) Wingless gradient formation in the Drosophila wing. *Current Biology* **10**, 293-300.

Sun Y. H., Tsai C. J., Green M. M., Chao J. L., Yu C. T., Jaw T. J., Yeh J. Y., Bolshakov, V. N. (1995) White as a reporter gene to detect transcriptional silencers specifying position-specific gene expression during Drosophila melanogaster eye development. *Genetics* **141**, 1075-1086.

Sweeney S. T., Davis G. W. (2002) Unrestricted Synaptic Growth in *spinster*- a Late Endosomal Protein Implicated in TGF- β -Mediated Synaptic Growth Regulation. *Neuron* **36**, 403-416.

Tabata T., Eaton S., Kornberg T. B. (1992) The Drosophila hedgehog gene is expressed specifically in posterior compartment cells and is a target of engrailed regulation. *Genes Dev.* **6** (12B), 2635-2645.

Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Method. *Molecular Biology and Evolution.* **28**, 2731-2739.

Tanimoto H., Itoh S., ten Dijke P., Tabata T. (2000). Hedgehog creates a gradient of DPP activity in Drosophila wing imaginal discs. *Mol Cell* **5**, 59-71.

Teo H., Perisic O., González B., Williams R. L. (2004) ESCRT-II, an endosome- associated complex required for protein sorting: crystal structure and interactions with ESCRT-III and membranes. *Dev Cell* **7**, 559–569.

Teo H., Gill D. J., Sun J., Perisic O., Veprintsev D. B., Vallis Y., Emr S. D., Williams R. L. (2006) ESCRT-I core and ESCRT-II GLUE domain structures reveal role for GLUE in linking to ESCRT-I and membranes. *Cell* **125**, 99–111.

Thompson B. J., Mathieu J., Sung H. H., Loeser E., Rorth P., Cohen S. M. (2005). Tumor suppressor properties of the ESCRT-II complex component Vps25 in Drosophila. *Dev. Cell* **9**, 711–720.

Tsuneizumi K., Nakayama T., Kamoshida Y., Kornberg T. B., Christian J. L., Tabata T. (1997) Daughters against dpp modulates dpp organizing activity in Drosophila wing development. *Nature.* **389**, 627–631.

- Ullrich O., Reinsch S., Urbe S., Zerial M., Parton, R. G. (1996) Rab11 regulates recycling through the pericentriolar recycling endosome. *J. Cell Biol.* **135**, 913-924.
- Ungermann C., Langosch D. (2005), Functions of SNAREs in intracellular membrane fusion and lipid bilayer mixing, *J Cell Sci* **118**, 3819-3828.
- Vaccari T., Bilder D. (2005). The Drosophila tumor suppressor vps25 prevents nonautonomous overproliferation by regulating notch trafficking. *Dev. Cell* **9**, 687–698.
- Vaccari T., Bilder D. (2009) At the crossroads of polarity, proliferation and apoptosis: The use of Drosophila to unravel the multifaceted role of endocytosis in tumor suppression. *Molecular Oncology*. **3**, 354–365.
- van der Sluijs P., Hull M. , Webster P., Mâle P., Goud B., Mellman I. (1992) The small GTP-binding protein rab4 controls an early sorting event on the endocytic pathway. *Cell* **70**, 729-740.
- Vanlandingham P. A., Ceresa B., P. (2009) Rab7 regulates late endocytic trafficking downstream of multivesicular body biogenesis and cargo sequestration. *J Biol Chem.* **284**, 12110-12124.
- Voorhoeve P. M., Agami R. (2003) Knockdown stands up. *Trends Biotechnol* **21** (1), 2-4.
- Wang C. W., Stromhaug P. E., Shima J., Klionsky D. J. (2002) The Ccz1-Mon1 protein complex is required for the late step of multiple vacuole delivery pathways. *J Biol Chem.* **277**, 47917-47927.
- Wang C. W., Stromhaug P. E., Kauffman E. J., Weisman L. S., Klionsky D. J. (2003) Yeast homotypic vacuole fusion requires the Ccz1-Mon1 complex during the tethering/docking stage. *J Cell Biol.* **163**, 973-985.
- Wang F., Paradkar P. N., Custodio A. O., McVey Ward D., Fleming M. D., Campagna D., Roberts K. A., Boyartchuk V., Dietrich W. F., Kaplan J., Andrews N. C. (2007) Genetic variation in Mon1a affects protein trafficking and modifies macrophage iron loading in mice. *Nat Genet.* **39**, 1025-1032.
- Williams R. L., Urbe S. (2007) The emerging shape of the ESCRT machinery. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 355-368.
- Wodarz A., Hinz U., Engelbert M., Knust E. (1995). Expression of crumbs confers apical character on plasma membrane domains of ectodermal epithelia of Drosophila. *Cell* **82** (1), 67-76.
- Wollert T., Wunder C., Lippincott-Schwartz J., Hurley J. H. (2009) Membrane scission by the ESCRT-III complex. *Nature* **458**, 172–177.
- Wollert T., Hurley J. H. (2010) Molecular mechanism of multivesicular body biogenesis by ESCRT complexes. *Nature* **464**, 864-869.
- Wucherpennig T., Wilsch-Brauninger M., Gonzalez-Gaitan M. (2003) Role of Drosophila

Rab5 during endosomal trafficking at the synapse and evoked neurotransmitter release. *J Cell Biology* **161**, 609-624.

Wurmser A. E., Sato T. K., Emr S. D. (2000) New component of the vacuolar class C-Vps complex couples nucleotide exchange on the Ypt7 GTPase to SNARE-dependent docking and fusion. *J Cell Biol.* **151**, 551–562.

Xu T., Rubin G. M. (1993) Analysis of genetic mosaics in developing and adult *Drosophila* tissues. *Development* **117** (4), 1223-1237.

Yan H., Jahanshahi M., Horvath E. A., Liu H. Y., Pfleger C. M. (2010) Rabex-5 Ubiquitin Ligase Activity Restricts Ras Signaling to Establish Pathway Homeostasis in *Drosophila*. *Current Biology* **20**, 1378-1382.

Zecca M., Basler K. , Struhl G. (1995) Sequential organizing activities of engrailed, hedgehog and decapentaplegic in the *Drosophila* wing. *Development* **121** (8), 2265-2278.

Zerial M., McBride H. (2001) Rab proteins as membrane organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **2**, 107-117.

Zirin J., Perrimon N. (2010) *Drosophila* as a model system to study autophagy. *Semin Immunopathol.* **32** (4), 363-372

8. DANKSAGUNG

Ich bedanke mich bei Herren Prof. Dr. Thomas Klein für die Vergabe dieses spannenden Themas, wodurch mir ein kleiner Blick in die unendliche Welt der Wissenschaft ermöglicht wurde. Ich bedanke mich auch für seine stetig vorhandene Unterstützung während dieser Zeit und hilfreiche Diskussionen.

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. Hermann Aberle für die Begutachtung dieser Arbeit.

Insbesondere bedanke ich bei unserem kompetenten, hilfsbereiten und herausragend netten TA-Team: Sylvia, Gisela, Ferdi und auch bei Hannelore und Evelyn für Ihre Hilfe bei dieser Arbeit und Ihr menschliches Wesen.

Ich bedanke mich bei den Mitgliedern unseres Labors: Monika, Christina (Zühlke), Brigitte, Naddell, Katherina, Soya, Lena, Christine, Sven, Björn, Mehmet, Andre Bachmann und Elke für die schöne Atmosphäre.

Bei Tobi bedanke ich mich von der Tanke bis zur Uni und noch viel weiter und für all die schönen Gespräche über Wissenschaft und Kultur.

Insbesondere bedanke ich bei Nadja nicht nur für ihr sehr hilfreiches Korrekturlesen, denn auf sie ist auch ansonsten immer Verlass.

Ich bedanke mich bei den Mitgliedern der Rüdiger Simon Arbeitsgruppe, insbesondere bei Karine und Rene. Bei Marc bedanke ich mich für die immer wieder aufbauenden Wörter, Bier-Abende und zahlreiche Eis und Kaffees.

Bei Robert bedanke ich von ganzem Herzen für all die inspirierenden Worte und Momente. Ich Danke Dir.

Ich bedanke mich vor allem bei meinen Eltern, denn ohne Ihre Liebe und Unterstützung wäre nicht nur diese Arbeit nicht möglich.

Meinen Geschwistern danke ich für so viel Liebe und Halt.

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 Herrn Prof. Dr. Thomas Klein betreut worden.

Düsseldorf, Juni 2013 Jahan Forough Yousefian

Teilpublikationen:

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht unter dem Titel:

Yousefian J., Troost T., Grawe F., Sasamura T., Fortini M., Klein T. (2013) Dmon1 controls recruitment of Rab7 to maturing endosomes in *Drosophila*. *J Cell Sci.* **126**(Pt 7), 1583-1594.

