

**Analyse der liganden-unabhängigen Aktivierung des  
Notch Rezeptors in *lgd* Mutanten  
und der liganden-abhängigen  
Aktivierung des Notch Rezeptors während der  
Flügelentwicklung in *Drosophila***

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

vorgelegt von

**Tobias Felix Troost**  
aus Köln

Düsseldorf, April 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:  
Korreferent:

Tag der mündlichen Prüfung:

In my younger and more vulnerable years my father gave me some advice that I've been turning over in my mind ever since. "Whenever you feel like criticizing any one," he told me, "just remember that all the people in this world haven't had the advantages that you've had."

F. Scott Fitzgerald, *The Great Gatsby*

Ein Bild sagt mehr als 1000 Worte [...] was hunderttausend Worte nicht zu sagen vermögen, lehrt die Anschauung, die direkt an das Gefühlszentrum greift, die die Vermittlung von Gehirnarbeit als fast nebensächlich übergeht, die unausradierbar sagt, wie es gewesen ist.

Kurt Tucholsky

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1. Der Notch-Signalweg .....	1
1.1.1. Modifikationen des Notch Rezeptors vor der Aktivierung .....	2
1.1.2. Aktivierung des Notch Rezeptors .....	2
1.1.3 Regulation des Notch-Signalwegs durch Endozytose.....	4
1.2 Regulation des endosomalen Transports.....	5
1.2.1 Regulation der endosomalen Reifung und die Bildung später, reifer Endosomen.....	7
1.2.2 Die ESCRT Komplexe und ihre Funktion in der MVB Biogenese .....	8
1.3 Das Tumorsuppressorgen <i>Lethal (2) giant discs</i> .....	13
1.3.1 Struktur der Lgd Proteinfamilie.....	14
1.3.2 Defekte im endosomalen Tansport von Proteinen und die Aktivierung des N-Signalwegs in <i>lgd</i> mutanten Zellen .....	15
1.4 Die Rolle des Notch-Signalwegs während der Flügelentwicklung in <i>D.m.</i> ....	19
1.5 Ziele der Arbeit .....	24
<b>2. Ergebnisse</b> .....	<b>25</b>
2.1. Charakterisierung des endosomalen Phänotyps in <i>lgd</i> Zellen .....	25
2.1.1 Akkumulation des Notch Rezeptors in reifen Rab7 positiven Endosomen.....	25
2.1.2 Ultrastrukturelle Analyse der MVBs in <i>lgd</i> Zellen .....	31
2.1.3 Untersuchung des gestörten Proteintransports/-abbaus in <i>lgd</i> mutanten Zellen.....	34
2.1.3.1 Verzögerter Proteinabbau in <i>lgd</i> mutanten Zellen .....	35
2.1.3.2 Verzögerter Abbau von Notch unterdrückt die ektopische Aktivierung in <i>lgd</i> Zellen .....	39
2.2 Struktur-Funktionsanalyse von Lgd .....	41
2.2.1 Funktionalität der Lgd-Konstrukte .....	42
2.2.2 Funktion der DM14 Domänen.....	45
2.2.1. Modifikation des endosomalen <i>lgd</i> Phänotyps durch <i>lgd</i> ΔDM14-HA.....	49
2.2.3 Funktion der C2 Domäne.....	52
2.2.4. Subzelluläre Lokalisierung von Lgd im Zytoplasma .....	55
2.2.5 Die Funktion der <i>lgd</i> ΔC2- Konstrukte wird durch schwache Expression beeinträchtigt .....	60
2.3 Untersuchung der Interaktion zwischen Lgd und Shrub .....	62
2.3.1 Untersuchung von <i>lgd</i> , <i>shrub/lgd</i> mutanten Zellen .....	64
2.3.1.1 Unterdrückung der ektopischen Aktivierung des Notch-Signalwegs in <i>lgd</i> , <i>shrub/lgd</i> mutanten Zellen .....	65
2.3.1.2 Verstärkte Proteinakkumulation und gestörter Abbau in <i>lgd,shrub/lgd</i> Zellen .....	68

2.3.2 Analyse der Aktivierung des Notch-Signalwegs in <i>lgd<sup>d7</sup>,shrub<sup>4-1</sup> / lgd<sup>d7</sup></i> Mutanten .....	73
2.3.3 Funktionale Analyse der Lgd-Konstrukte im <i>lgd / lgd,shrub</i> mutanten Hintergrund.....	75
2.3.4 Interaktion mit Shrub und Lokalisierung von Lgd bei Verlust der VPS4 Funktion .....	79
2.4 Verlust der ESCRT-0/III Funktion unterdrückt die ektopische Aktivierung von Notch.....	81
2.5 Untersuchung der ektopischen Aktivierung des Notch-Signalwegs in <i>lgd</i> mutanten Zellen ..	86
2.5.1 Die ektopische Aktivierung von Notch in <i>lgd</i> Zellen ist unabhängig von <i>kuz</i> .....	86
2.5.2. Der S1 Schnitt erscheint notwendig für die Aktivierung von Notch in <i>lgd</i> Zellen .....	88
2.5.3 Die Aktivität der V-ATPase wird für die Aktivierung von Notch in <i>lgd</i> Zellen benötigt.....	90
2.5.4 Die Aktivierung von Notch in <i>lgd</i> Zellen benötigt die Fusion mit dem Lysosom.....	93
2.6 Untersuchung der Interaktion von Fng, Dl und Ser während der Flügelentwicklung.....	96
2.6.1 Asymmetrische Expression von Notchzielgenen an einer ektopischen Fringegrenze (FG) .	96
2.6.2 Voraussetzung der Notch Aktivität an der ektopischen FG .....	100
2.6.3 Die Funktion von Dl und Ser an der ektopischen FG.....	101
2.6.4 Delta ist in allen Zellen der Flügelanlage exprimiert .....	107
2.6.5 Aktivierung des Notch-Signalwegs an der D/V Grenze .....	109
2.6.6 Fng wird für das Ser Signal benötigt.....	116
<b>3. Diskussion .....</b>	<b>117</b>
3.1 Struktur-/ Funktionsanalyse von Lgd.....	117
3.2 Lgd, die ESCRT Maschinerie und die Aktivierung von Notch.....	120
3.3 Die Aktivierung von Notch in <i>lgd</i> Zellen .....	122
3.4 Aktivierung des Notch Rezeptors in unterschiedlichen endosomalen Kompartimenten .....	126
3.5 Interaktionen von Fng, Ser und Dl während der Flügelentwicklung an einer FG .....	128
3.6 Interaktionen an einer Grenze von Fng exprimierenden und nicht-exprimierenden Zellen	132
<b>4. Zusammenfassung / Summary.....</b>	<b>135</b>
<b>5. Material und Methoden .....</b>	<b>138</b>
5.1 Geräte und Arbeitsmaterialien.....	138
5.2 Chemikalien, Enzyme und Kits.....	139
5.3 Lösungen .....	139
5.4 Medien und Agarplatten .....	140
5.5 Verwendete Antikörper.....	141
5.6 Bakterien und Plasmide.....	142
5.7. DNA-Methoden .....	142
5.7.1 Plasmid-Minipräparation nach dem TENS Protokoll .....	142
5.7.2 Plasmid-Midipräparation.....	142
5.7.3 DNA-Restriktionsverdau .....	143

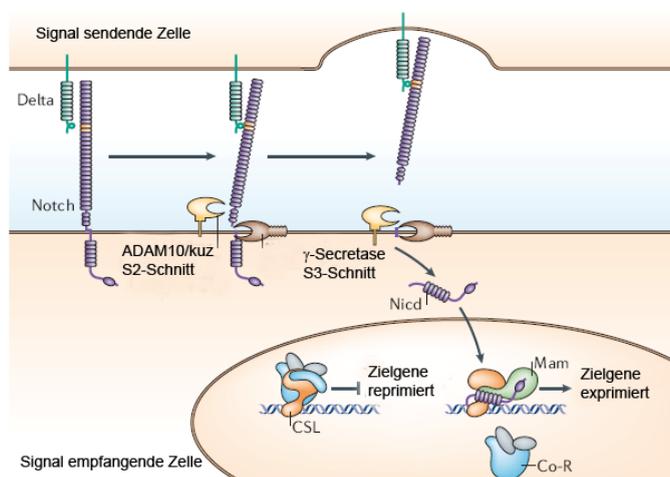
5.7.4 Ligation .....	143
5.7.5 Transformation chemisch kompetenter Zellen .....	143
5.7.6 Extraktion von DNA aus einem Agarosegel .....	144
5.7.7 DNA Sequenzierung.....	144
5.8 Herstellung der Lgd-Konstrukte .....	146
5.9 Drosophila Methoden .....	149
5.9.1 Medien, Agarplatten und Lösungen .....	149
5.9.2 Fliegenhaltung .....	149
5.9.3. Präparation von Flügelimaginalscheiben .....	149
5.9.3.1 Dokumentation der Imaginalscheiben und Mikroskopie.....	151
5.9.4 Herstellung transgener Fliegen durch P-Element vermittelte Insertion .....	151
5.9.5. Herstellung transgener Fliegen durch gerichtete Insertion mittels attP/attB .....	152
5.9.6 Das UAS/GAL4 System Expressionssystem .....	153
5.9.7. Klonale Analyse mit dem Flp/FRT System .....	155
5.9.8 RNAi .....	157
5.9.9. Fliegenstämme .....	157
<b>6. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>163</b>
<b>7. Anhang.....</b>	<b>Fehler! Textmarke nicht definiert.</b>
<b>8. Danksagung.....</b>	<b>196</b>
<b>9. Erklärung.....</b>	<b>198</b>

# 1. Einleitung

Vielzellige Organismen durchlaufen komplexe Entwicklungsprozesse für deren geordneten Ablauf die Zellkommunikation unentbehrlich ist. Im gesamten Tierreich kontrollieren nur wenige hochkonservierte Signalwege die Differenzierung von unzähligen Zelltypen. Zu den sieben hoch konservierten Signalwegen zählen der Wnt-, Hedgehog, PI3K/Akt, Ras/MAPK (RTK), JAK/STAT, TGF- $\beta$  und der Notch-Signalweg, der in dieser Arbeit eine zentrale Position einnimmt. Die Erforschung der Signalwege und deren Regulation sind im Hinblick auf die Entwicklungsvorgänge und assoziierten Krankheiten von großem Interesse.

## 1.1. Der Notch-Signalweg

Der Notch-Signalweg ist in allen Metazoen für die geordnete Embryogenese wichtig und reguliert das Zellschicksal, die Musterbildung und die Proliferation (Artavanis-Tsakonas, Rand et al. 1999, Bray 2006)). Fehlfunktionen bei der Signaltransduktion führen während der Entwicklung zu Missbildungen oder auch Krankheiten wie z.B. Krebs (Koch und Radtke 2010). Die Signalweiterleitung wird bei diesem Kurzstrecken-Signalweg über direkten Kontakt benachbarter Zellen durch Interaktion von Transmembranproteinen vermittelt. Die Transmembranproteine, der Rezeptor Notch (N) in der signal-empfangenden Zelle und die Liganden Delta (DI) oder Serrate (Ser) in der signal-sendenden Zelle, sind die Kernkomponenten des Signalwegs an der Zellmembran in *Drosophila melanogaster* (*D.m.*). In einer einfachen Betrachtungsweise stellt der Notch Rezeptor einen membrangebundenen Transkriptionsfaktor dar, der nach der Interaktion mit dem Liganden einer benachbarten Zelle durch proteolytische Schnitte aktiviert wird, woraufhin die intrazelluläre Domäne (aktivierte Form des Rezeptors, NICD) im Zellkern Zielgene aktiviert (siehe Abb. 1-1).



**Abb. 1-1: Einfache Darstellung des Notch-Signalwegs.** Nach der Interaktion mit dem Liganden Delta (oder Serrate) der signal-sendenden Zelle wird der Rezeptor Notch in der signal-empfangenden Zelle proteolytisch gespalten. Nach der Translokation in den Zellkern aktiviert NICD mit Kofaktoren die Expression der Zielgene. (übernommen und modifiziert aus (Bray 2006).)

### **1.1.1. Modifikationen des Notch Rezeptors vor der Aktivierung**

Der Notch Rezeptor (und die Liganden) sind Glykoproteine und die Glykosylierung von Notch beeinflusst die Liganden-Bindungseigenschaften des Rezeptors (Sakamoto, Ohara et al. 2002). Die extra-zelluläre Domäne des Notch Rezeptors weist viele EGF-artige Wiederholungen (epidermal growth factor (EGF)-like repeats) auf, die modifiziert werden können, bevor der Rezeptor an die Plasmamembran gebracht wird (Übersicht in (Haines und Irvine 2003)). Die O-fucosyltransferase *Ofut1* fügt Fucose an Serin- oder Threoninreste an, die innerhalb einer Konsensussequenz ( $C^2-X_{4-5}-T/S-C^3$ ) liegen (Haines und Irvine 2003). Die durch O-fucose modifizierten Stellen in der extrazellulären Domäne des Notch Rezeptors können durch N-Glykane weiter modifiziert werden. Dies wird durch die  $\beta$ 1,3-N-acetylglucosaminyltransferase Fringe (Fng) (Bruckner, Perez et al. 2000, Ju, Jeong et al. 2000) im Golgi Apparat vermittelt und fördert die Bindung von Notch an Delta und hemmt die Interaktion mit Serrate (Fleming, Gu et al. 1997, Panin, Papayannopoulos et al. 1997, Lei, Xu et al. 2003)).

Eine weitere posttranslationale Modifikation des Notch Rezeptors ist der S1-Schnitt durch Proteasen der Furin Familie im *trans*-Golgi (Logeat, Bessia et al. 1998). Der extrazelluläre Teil des Notch Rezeptors (NECD) und die in der Membran verankerte intrazelluläre Domäne (NTM) werden wieder zusammengeführt und interagieren in einer  $Ca^{2+}$  abhängigen Weise (Rand, Grimm et al. 2000). In Säugern wird diese Prozessierung für die Signalweiterleitung benötigt (Logeat, Bessia et al. 1998), scheint aber in *Drosophila* vernachlässigbar zu sein (Kidd und Lieber 2002).

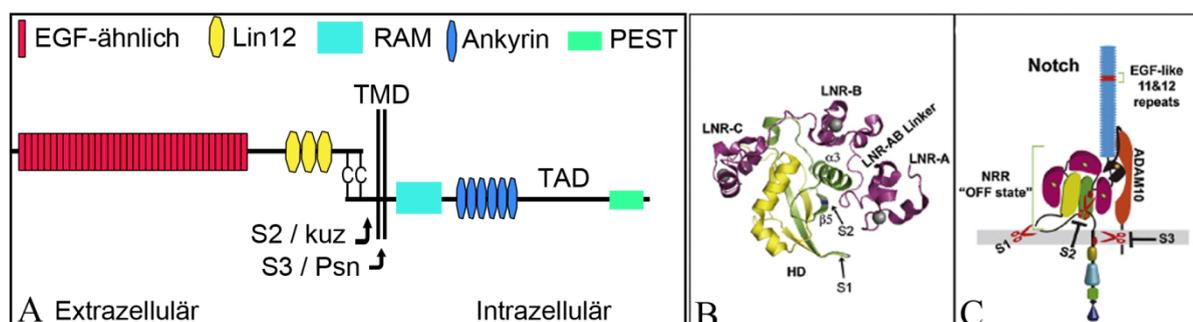
### **1.1.2. Aktivierung des Notch Rezeptors**

Für die Aktivierung des Signalwegs werden weitere Kernkomponenten benötigt. Nach der Interaktion mit dem Ligand wird der Rezeptor durch zwei konsekutive proteolytische Schnitte (S2- und S3-Schnitt) aktiviert (siehe Abb. 1-3). Die proteolytische Abspaltung der extrazellulären Domäne von Transmembranproteinen wird allgemein als „Ectodomain Shedding“ (engl. „shedding“, abstoßen/abstreifen) bezeichnet. Der erste proteolytische Schnitt nach der Interaktion mit den Liganden ist die Prozessierung des Rezeptors durch die Metalloprotease ADAM10/Kuzbanian (S2-Schnitt, ADAM: ) (Mumm, Schroeter et al. 2000). Die Hetero-Dimerisierungsdomäne (HD) und die 3 Lin-12 Notch Wiederholungen (LNR), zusammen auch als „negative regulatory region“ (NRR) bezeichnet, sorgen dafür, dass die S2 Schnittstelle geschützt ist und eine liganden-unabhängige Aktivierung verhindert wird

(Greenwald und Seydoux 1990, Sanchez-Irizarry, Carpenter et al. 2004, Gordon, Vardar-Ulu et al. 2007) siehe Abb. 1-2). Das Ectodomain Shedding des Rezeptors wird in *Drosophila* durch *kuzbanian* (*kuz*) vermittelt und der *kuz* Verlust führt zum zellautonomen Verlust der Aktivität des Notch-Signalwegs (Rooke, Pan et al. 1996, Sotillos, Roch et al. 1997, Klein 2002, Lieber, Kidd et al. 2002)).

Das in der Membran verankerte Fragment des Rezeptors, NEXT (Notch extracellular truncation), stellt wiederum ein Substrat für den  $\gamma$ -Sekretase Komplex dar. Der durch diesen Komplex vermittelte S3-Schnitt innerhalb der Transmembrandomäne setzt die intrazelluläre Domäne des Rezeptors frei (Lecourtois und Schweisguth 1998, De Strooper, Annaert et al. 1999, Struhl und Greenwald 1999, Ye, Lukinova et al. 1999)). Die katalytische Untereinheit des  $\gamma$ -Sekretase Komplexes in *Drosophila* ist Presenilin (*Psn*) (Übersicht in (Fortini 2002)).

Nach der Freisetzung durch die regulierte intramembran Proteolyse (RIP) transloziert die intrazelluläre Domäne des Notch Rezeptors (NICD) anschließend in den Zellkern (Kidd, Lieber et al. 1998, Struhl und Adachi 1998, Struhl und Greenwald 1999)). NICD bildet dort zusammen mit Proteinen der CSL Familie (CBF-1/RBP-J- $\kappa$  in Vertebraten, Su(H) in *Drosophila melanogaster*, Lag-1 in *C. elegans*) und Mastermind (*Mam*) einen ternären Komplex bildet, der die gewebespezifische Expression von Zielgenen bewirkt (Furriols und Bray 2000). In Abwesenheit von NICD ist Suppressor of Hairless (*Su(H)*) Teil eines Repressorkomplexes, der die Expression der Zielgene unterdrückt (Morel und Schweisguth 2000, Furriols und Bray 2001)). Ein wichtiger Faktor in diesem Komplex ist *Hairless* (*H*), welcher die Korepressoren Groucho und CtBP (CtBP: C-terminal binding protein) mit *Su(H)* verbindet (Barolo, Stone et al. 2002). In Konsequenz führt der Verlust von *H* oder *Su(H)* zu einer schwachen De-Repression verschiedener Zielgene ohne eine Aktivierung des Notch-Signalwegs vorauszusetzen (Furriols und Bray 2000, Koelzer und Klein 2003, Koelzer und Klein 2006)).



**Abb. 1-2: Illustration der Domänenstruktur von Notch und der strukturellen Grundlagen der Autoinhibition.** (A) Die Domänenstruktur des Notch Rezeptors in *Drosophila*. (B-C) Strukturelle Grundlagen für die

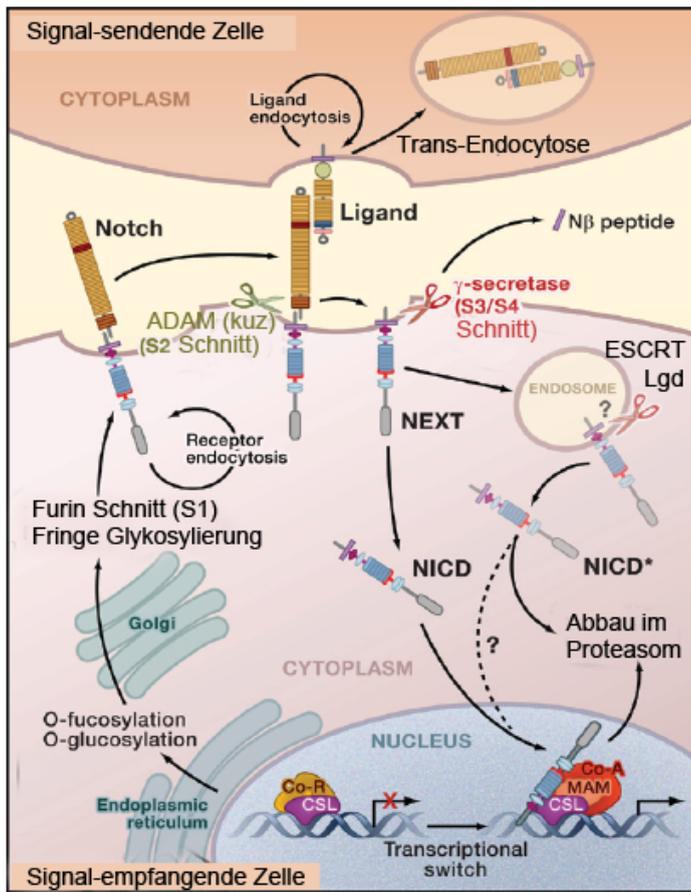
Autoinhibition des Notch Rezeptors. (B) Ribbon Diagramm der NRR von Notch1 (ein Säugerortholog). LNR Module (magenta) und die HD (grün). Die S2 Stelle wird durch die LNR Module geschützt und verhindert den Schnitt durch ADAM10 (Kuz Homolog). (C) ADAM10 interagiert mit Notch, aber die NRR hält den „Off state“ in Abwesenheit der Liganden aufrecht. Die S1 Schnittstelle befindet sich in einer unstrukturierten Schleife (Loop). (A, nach Fiuza und Martinez-Arias 2007, B-C übernommen aus (Musse, Meloty-Kapella et al. 2012))

### 1.1.3 Regulation des Notch-Signalwegs durch Endozytose

Da es sich sowohl beim Notch Rezeptor als auch bei den Liganden um Transmembranproteine handelt, spielt die Endozytose und der anschließende endosomale Transport eine entscheidende Rolle bei der Regulation des Signalwegs (Yamamoto, Charng et al. 2010).

Erste Hinweise darauf, dass die Endozytose eine wichtige Regulationsebene im Notch-Signalweg darstellt lieferte die Untersuchung von *shibire (shi)* in *Drosophila*. Die Aktivität von *shi*, dem *Drosophila* Homolog der Dynamin GTPase (Chen, Obar et al. 1991), die bei der Abschnürung von endozytischen Vesikeln involviert ist, wird sowohl in der signal-sendenden als auch in der signal-empfangenden Zelle für die Signaltransduktion benötigt (Seugnet, Simpson et al. 1997, Windler und Bilder 2010). In der signal-sendenden Zelle reguliert die Endozytose die Internalisierung des Liganden. Bei der Aktivierung wird die extrazelluläre Domäne des Rezeptors zusammen mit dem Liganden in die signal-sendende Zelle durch Endozytose internalisiert (Parks, Klueg et al. 2000). Dieser Vorgang wird als Transendozytose bezeichnet. Die Endozytose der Liganden setzt die Aktivität der E3 Ubiquitin Ligasen Mindbomb1 (Mib1) und Neuralized (Neur) voraus (Le Borgne, Remaud et al. 2005). Die Regulation der Aktivierung von Notch durch Endozytose wird aber auch in der signal-empfangenden Zelle benötigt. Die Aktivität von NICD wird im Gegensatz zu „full-length“ Notch bei Ausfall von *shi* nicht beeinflusst (Seugnet, Simpson et al. 1997). Eine Hypothese ist, dass die Endozytose den Transfer des Produkts des S2-Schnitt, NEXT, in ein intrazelluläres Kompartiment vermittelt, in dem die  $\gamma$ -Sekretase Aktivität bereitgestellt wird (Schweisguth 2004). An die Endozytose schließen sich die endosomalen Transportvorgänge an, welche durch Sortierung ein Recycling oder den konstitutiven Abbau des Rezeptors vermitteln können und im folgenden Abschnitt erläutert werden. Jüngste Studien zeigen, dass an der Regulation des endosomalen Transports des Notch Rezeptors in *D.m.* die ESCRT Komplexe und Lgd beteiligt sind und deren Funktionsverlust zu einer liganden-unabhängigen Aktivierung des Signalwegs führt (Moberg, Schelble et al. 2005, Thompson, Mathieu et al. 2005, Vaccari und Bilder 2005, Childress, Acar et al. 2006, Gallagher und Knoblich 2006,

Jaekel und Klein 2006)). Die Funktion dieser Komponenten wird in den darauf folgenden Abschnitten beschrieben.



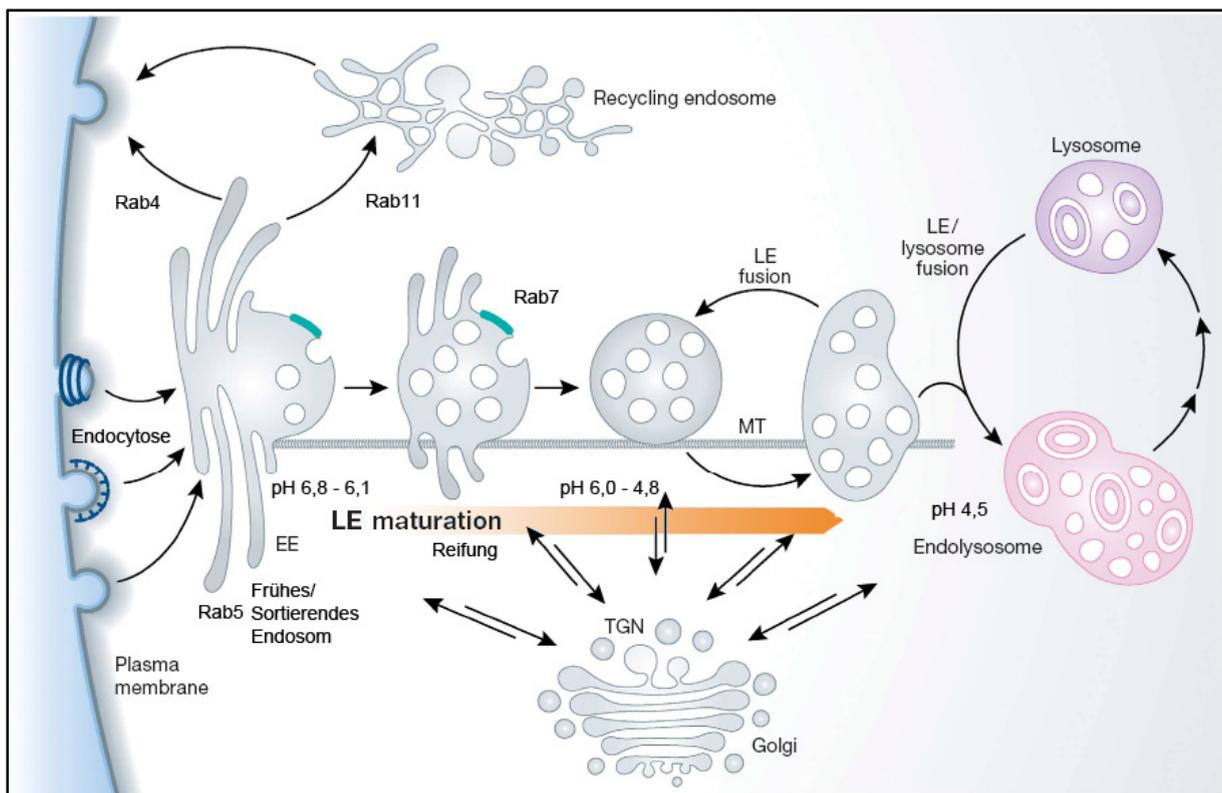
**Abb.1-3 Regulation des Notch-Signalwegs.** Während des Transports zur Plasmamembran wird der Notch Rezeptor im ER und im Golgi posttranslational modifiziert. Die Interaktion mit dem Liganden einer benachbarten Zelle löst Konformationsänderungen des Rezeptors aus, welche die Prozessierung (S2-Schnitt) durch ADAM10/Kuz ermöglichen. Darauf folgt die weitere Prozessierung (S3-Schnitt) durch den  $\gamma$ -Sekretase Komplex und die anschließende Translokation von NICD in den Zellkern. Durch die Assoziation mit CSL und weiteren Kofaktoren wird die Expression der Zielgene induziert. Der Notch Rezeptor wird konstitutiv endozytiert und abgebaut. Der S3-Schnitt könnte auch in einem bestimmten endosomalen Kompartiment erfolgen. Die ESCRT-Komplexe und Lgd sind an der Regulation des endosomalen Transports des Notch Rezeptors beteiligt. (modifiziert aus (Kopan und Ilagan 2009))

## 1.2 Regulation des endosomalen Transports

Die Endozytose vermittelt zahlreiche zelltyp-spezifische homöostatische Prozesse, welche z.B. die Nährstoffaufnahme, die Signaltransduktion oder auch die Verteidigung gegen Pathogene betreffen. Als Endozytose wird allgemein die Internalisierung der Plasmamembran in endozytischen Vesikeln bezeichnet, die durch unterschiedliche Maschinerien vermittelt werden kann. (Übersicht in (Soldati und Schliwa 2006)). Die Endozytose und der endosomale Transport beeinflussen die Aktivität wichtiger Signaltransduktionswege, unter anderem den Notch-Signalweg (Di Fiore und De Camilli 2001), Seto, Bellen et al. (2002), (Polo und Di Fiore 2006, Sorkin und von Zastrow 2009, Dobrowolski und De Robertis 2012)).

An die Endozytose schließen sich endosomale Transportvorgänge an, die über den Rückfluss zur Plasmamembran („Recycling“) oder den Abbau („Degradation“) der endosomalen Fracht im Lysosom entscheiden. Der Ablauf des endosomalen Transports ist schematisch in Abb. 1-

4 dargestellt. Frühe endozytische Vesikel (early endocytic vesicle, EEV) fusionieren vermittelt durch die GTPase Rab5 ( ) mit sich selbst (homotypische Fusion) oder fusionieren mit dem bereits so gebildeten frühen Endosomen (early endosom, EE), die auch als sortierendes endosomales Kompartiment bezeichnet werden (Huotari und Helenius 2011). Ausgehend vom frühen sortierenden endosomalen Kompartiment können verschiedene endosomale Routen eingeschlagen werden, die durch weitere charakteristische Rab GTPasen vermittelt werden. Rab11 und Rab4 markieren die Endosomen, die den langsamen bzw. schnellen Rücktransport von Rezeptoren zur Plasmamembran („Recycling“) bewerkstelligen (Übersicht in (Maxfield und McGraw 2004)). Die nicht recycelte endosomale Fracht verbleibt im reifenden Endosom. Die späten bzw. reifen Endosomen, die durch die charakteristische GTPase Rab7 markiert sind, fusionieren mit dem Lysosom, was den Abbau des Endosoms mitsamt der endosomalen Fracht zur Folge hat (Huotari und Helenius 2011).



**Abb. 1-4. Überblick über den endo-lysosomalen Transportweg.** Nach der Endozytose gelangt die endosomale Fracht ins frühe oder sortierende Endosom (EE). Während der endosomalen Reifung kommt es zum Austausch von Rab5 und Rab7. Weiterhin wird während der endosomalen Reifung ein Sinken des pH Werts im Lumen festgestellt. Nach der Fusion mit dem Lysosom wird die Fracht dort abgebaut (siehe auch Abschnitt 1.4). (modifiziert aus Houtari und Helenius 2011)

Das Eintreten von Transmembranproteinen in den endosomalen Transportweg durch Endozytose wird durch Ubiquitinierung reguliert (Übersicht in (Clague, Liu et al. 2012)).

Ubiquitin ist ein Polypeptid, das aus 76 Aminosäuren besteht und über eine enzymatische Kaskade (E1, E2 und E3) auf Aminosäurereste, hauptsächlich Lysine, übertragen wird ((Clague, Liu et al. 2012)). In Ubiquitin selbst bieten 7 Lysinreste die Möglichkeit zur Erstellung von Polyubiquitinketten unterschiedlicher Topologie zusätzlich zur linearen Verknüpfung. Die Ubiquitinierung von Zielsubstraten kann den Proteinabbau über das Proteasom, das Lysosom und das Autophagosom vermitteln (Clague, Liu et al. 2012). Die Monoubiquitinierung, das Anhängen eines einzelnen Ubiquitinrests, reicht aus um die Internalisierung und die anschließende Sortierung zu vermitteln (Reggiori und Pelham 2001, Polo, Sigismund et al. 2002).

### **1.2.1 Regulation der endosomalen Reifung und die Bildung später, reifer Endosomen**

Rab5 und Rab7 sind die wichtigsten Marker für die Identität der Endosomen und entscheidende Regulatoren des endosomalen Transports (Huotari und Helenius 2011(Huotari und Helenius 2011)). Bei der endosomalen Reifung ist ein „Rab Switch“, die Konversion von Rab5 zu Rab7, beteiligt (Rink, Ghigo et al. 2005, Vonderheit und Helenius 2005, Poteryaev, Datta et al. 2010)). Der Entstehung später Endosomen geht die Bildung einer Rab7 Domäne voraus (Rink, Ghigo et al. 2005, Vonderheit und Helenius 2005). Die Ersetzung von Rab5 durch Rab7 ist bei der Bildung später Endosomen und für den Transport zum Lysosom entscheidend (Huotari und Helenius 2011).

In der Hefe vermitteln die Klasse C Vps (Vacuolar protein sorting) Komplexe CORVET (Class C ore vacuole/endosome tethering) und HOPS (Homotypic Fusion and Vacuole Protein Sorting) die Fusionsprozesse früher Vps21p/Rab5 bzw. später Ypt7p/Rab7 Endosomen (Nickerson et al. 2009). Der HOPS Komplex besteht aus den vier auch in CORVET auftretenden Kern-Untereinheiten (Vps11, Vps16, Vps18 und Vps33) und zwei spezifischen Untereinheiten Vps39 und Vps41 (Übersicht in (Brocker, Engelbrecht-Vandre et al. 2010)). Weitere Rab7 Effektoren regulieren die Positionierung später Endosomen über Mikrotubuli vermittelten Transport (Übersicht in (Zhang, Chen et al. 2009, Wang, Ming et al. 2011)).

Während der Reifung sinkt der pH im Lumen der Endosomen und die Azidifizierung ist ein wichtiger Bestandteil des endosomalen Reifungsprozess ((Maxfield und Yamashiro 1987, Huotari und Helenius 2011), siehe Abb. 1-5). Die Vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase (V-ATPase) ist ein großer Proteinkomplex und bildet aus dem membran-assoziierten V0 Komplex, der als Transmembranpore für die Protonen dient und dem löslichen V1 Komplex, der ATP bindet

und hydrolysiert, eine Protonenpumpe, die den luminalen pH von Zellorganellen reguliert (Übersicht in (Forgac 2007, Marshansky und Futai 2008)). Die Absenkung des pHs sorgt nicht nur für die geeigneten Umgebungsbedingungen, welche die hydrolytischen Reaktionen im Lysosom fördern, sondern auch für den koordinierten Membranfluss, die Sortierung und die Weiterleitung endosomaler Fracht (Huotari und Helenius 2011).

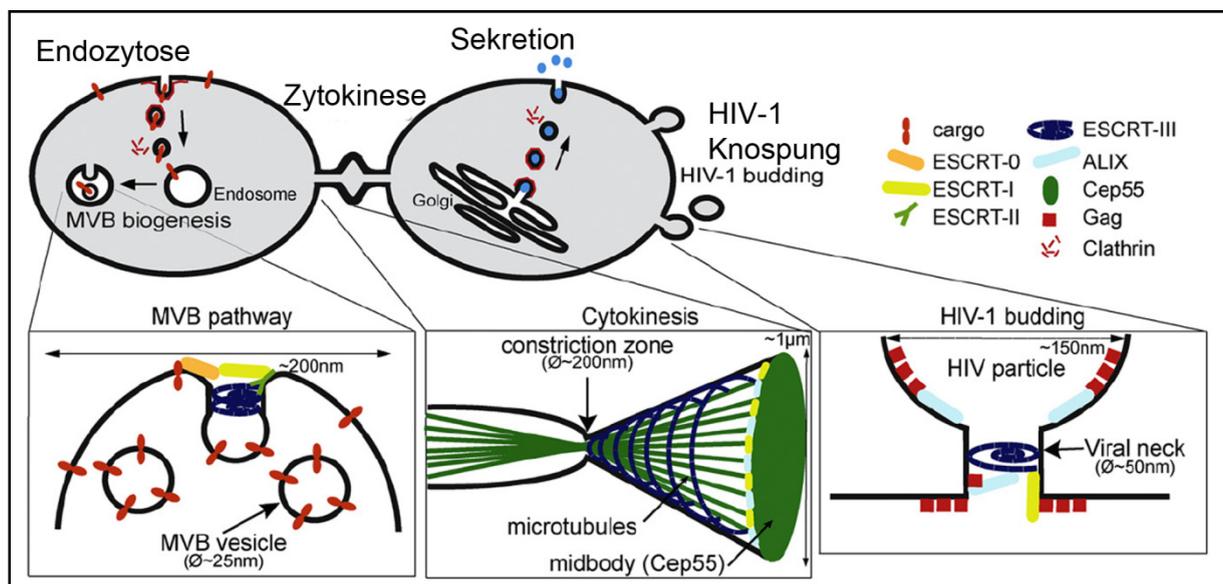
Einer der wichtigsten Prozesse bei der Biogenese später Endosomen ist die Bildung von intraluminalen Vesikeln (ILV) (Odorizzi, Babst et al. 1998). Die Bildung fängt schon in frühen Endosomen (Raiborg, Bache et al. 2002) und während der Reifung steigt die Anzahl der ILVs weiter. Daher werden reife Endosomen auch MVBs (Multivesicular bodies) genannt. Die Bildung der ILV geschieht durch die Internalisierung der limitierenden Membran des Endosoms und wird aus verschiedenen Gründen benötigt. Die Verpackung von signalisierenden Rezeptoren in ILV unterbindet den Kontakt mit dem Zytosol, wodurch zytosolische Interaktionen, die an der Signalweiterleitung beteiligt sind, verhindert werden. Außerdem werden Lipide und Membranproteine in ILV nach der Fusion mit dem Lysosom zugänglich für die Hydrolasen. Die limitierende Membran (LM) der reifen Endosomen wird durch spezielle Membranglykoproteine (z.B. Lamps (Lysosomal associated membrane proteins) vor dem Abbau geschützt (Huotari und Helenius 2011). Bei der Sortierung der abzubauenden Fracht und der MVB Biogenese durch Bildung von ILV sind die ESCRT Komplexe von entscheidender Bedeutung (Katzmann, Babst et al. 2001, Babst, Katzmann, Estepa-Sabal et al. 2002, Babst, Katzmann, Snyder et al. 2002) und deren Wirkungsweise wird im folgenden Abschnitt erläutert.

### **1.2.2 Die ESCRT Komplexe und ihre Funktion in der MVB Biogenese**

Der "Endosomal Sorting Complex required for Transport" kurz ESCRT besteht aus sequentiell arbeitenden Proteinkomplexen, und wird für die Biogenese der MVBs benötigt und vermittelt die Sortierung der endosomalen Fracht in ILV (siehe Abb. 1-5/1-6, Übersichten in (Raiborg und Stenmark 2009, Saksena und Emr 2009, Henne, Buchkovich et al. 2011, Hurley und Stenmark 2011)). Außerdem haben ESCRT Komplexe in Metazoen weitere Funktionen bei der Zytokinese und der Freisetzung von Virus-Partikeln ((Carlton und Martin-Serrano 2007, Henne, Buchkovich et al. 2011, Hurley und Stenmark 2011), siehe Abb. 1-5).

Die ESCRT Maschinerie ist in die vier Proteinkomplexe ESCRT-0 bis ESCRT-III unterteilt. Einen fünften Komplex stellt der Vps4 Komplex dar (siehe Abb.1-6). Diese fünf Proteinkomplexe

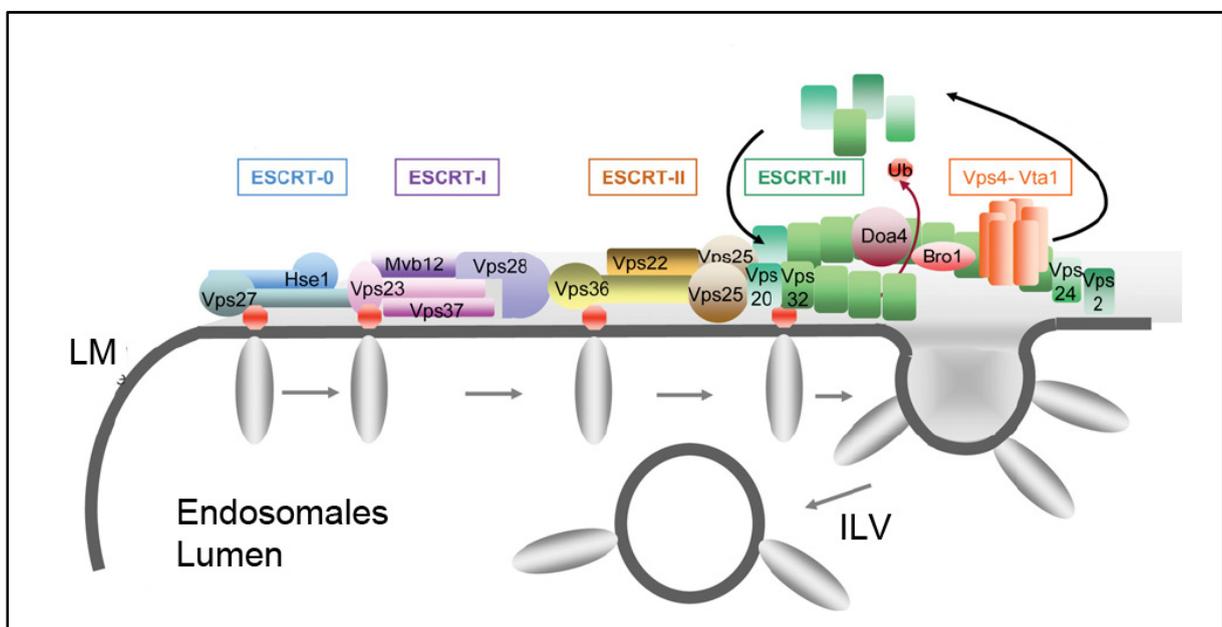
werden sequentiell an die endosomale Membran rekrutiert und generieren ILV durch Knospung der limitierenden Membran in Richtung des Lumens des sich bildenden MVBs. Die Komplexe vermitteln die nötigen Schritte von der Erkennung und der Interaktion mit ubiquitinierten Membranproteinen und die Rekrutierung der nachfolgenden Komplexe bis zur Deformation und Abschnürung der Membran bis letztlich die Dissoziation der Komplexe von der endosomalen Membran die ESCRT vermittelte Bildung eines ILVs abschließt (Übersichten in (Henne, Buchkovich et al. 2011, Hurley und Stenmark 2011)). Dieser Prozess wiederholt sich bis die ubiquitinierte Fracht von der LM durch ILV entfernt wurde.



**Abb. 1-5. Überblick über die ESCRT vermittelten Prozesse.** Neben dem MVB Weg, der die Bildung von ILV vermittelt, zeigen die ESCRT Komplex einen Einfluss auf andere Membranabschnürungsvorgänge, wie bei der Zytokinese oder auch bei der Freisetzung von HIV Partikeln (modifiziert aus Teis 2012).

Der ESCRT-0 Komplex besteht aus den Vps27/Hrs (**he**patocyte growth factor-regulated tyrosine kinase **substrate**) und Hse1/STAM (Signal-transducing adaptor molecule) und bindet über das Ubiquitin interagierende Motiv (UIM, ubiquitin interacting motif) und die VHS (Vps27/Hrs und Hse1/STAM) Domäne Ubiquitin (Ren und Hurley 2010) und stellt die erste Interaktion von ESCRT mit der endosomalen Fracht dar. Neben den strukturellen Ähnlichkeiten der Untereinheiten weist Hrs eine FYVE (Fab1, YotB, Vac1p, and EEA1) Zinkfinger Domäne auf, die an PI3P bindet und die Lokalisation an endosomale Membranen vermittelt (Raiborg, Bremnes et al. 2001). Der ESCRT-0 Komplex erkennt und bindet ubiquitinierte Membranproteine und stellt den ersten Sortierungs- und Konzentrierungsschritt der Fracht bei der Generierung der MVBs dar (Prag, Watson et al. 2007).

Der nächste Schritt ist die Rekrutierung des ESCRT-I Komplex, der in Metazooen und der Hefe von ESCRT-0 abhängig ist (Bache, Raiborg et al. 2003, Katzmann, Stefan et al. 2003, Lu, Hope et al. 2003). Der ESCRT-I Komplex ist ein Heteromer, der ursprünglich als Komplex aus Vps23/Tsg101 (Tumor susceptibility gene 101), Vps28, und Vps37 identifiziert wurde, und an ubiquitinierte Membranproteine und den ESCRT-0 Komplex bindet (Katzmann, Babst et al. 2001). Der Komplex interagiert über Vps23/Tsg101 mit dem ESCRT 0 Komplex und Vps28 bindet Vps36 und vermittelt dadurch die Interaktion mit dem ESCRT-II Komplex (Katzmann, Stefan et al. 2003, Kostelansky, Sun et al. 2006). ESCRT-II ist ein Hetero-tetramerer Proteinkomplex und besteht aus Vps36 und Vps22 und zwei Vps25 Untereinheiten (Slagsvold, Aasland et al. 2005).



**Abb. 1-6 Schematische Darstellung der ESCRT Komplexe und ihrer Funktion bei der ILV Bildung.** Die frühen ESCRT 0-II Komplexe binden und konzentrieren die ubiquitinierte Fracht. Der nachfolgend an der limitierenden Membran (LM) gebildete ESCRT-III Komplex führt zusammen mit dem Vps4-Vta1 Komplex die Abschnürung des ILV in das endosomale Lumen herbei. Das an die Fracht gebundene Ubiquitin wird durch DUBs vor der Abschnürung entfernt und recycelt. Der ESCRT-III Komplex wird durch den Vps4-Komplex aufgelöst und die Untereinheiten stehen für eine neue Runde der ILV Bildung bereit. (modifiziert aus (Michelet, Djeddi et al. 2010))

Die drei frühen ESCRT Komplexe (0-II) interagieren mit der ubiquitinierten Fracht und führen kooperativ zur Sortierung der ubiquitinierten Membranproteine während der MVB Bildung (Henne, Buchkovich et al. 2011). Die Internalisierung der Fracht wird durch die Rekrutierung von ESCRT-III initiiert und vermittelt. Der ESCRT-III Komplex besteht aus vier Kernuntereinheiten, Vps20/CHMP6 (CHMP, charged multivesicular body protein), Snf7 (Sucose non-fermenting) /CHMP4(A/B/C)/*shrub*, Vps24/CHMP3 und Vps2/CHMP2(A/B) und

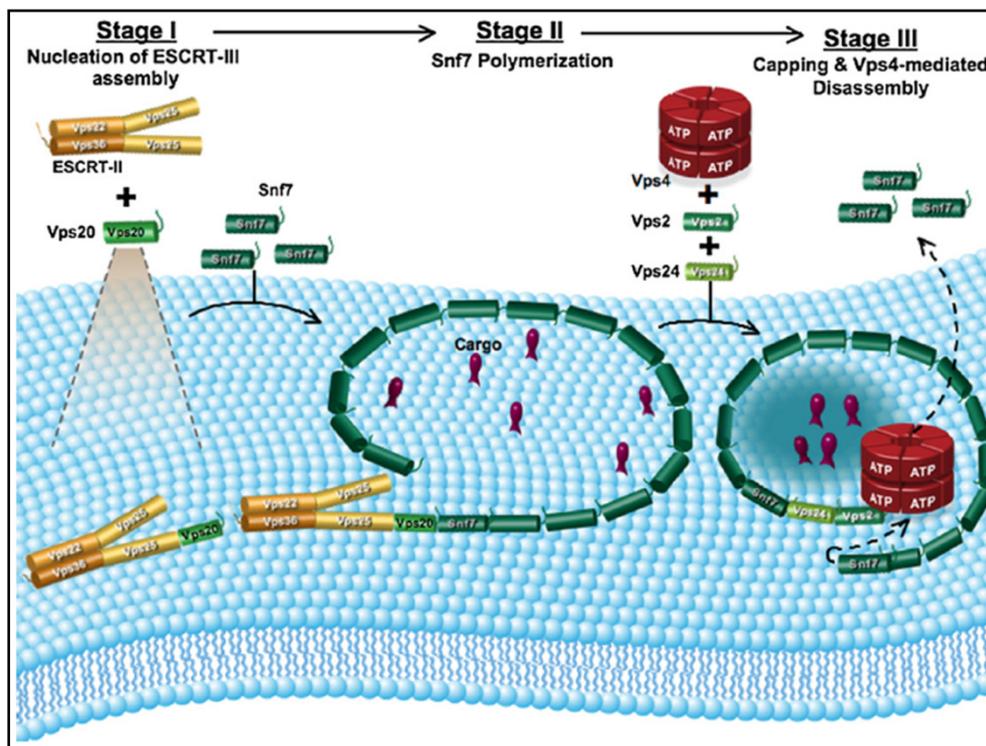
drei akzessorischen Komponenten Did2/CHMP1(A,B), Vps60/CHMP5 und Ist1 (Babst, Katzmann, Estepa-Sabal et al. 2002, Nickerson, West et al. 2006, Dimaano, Jones et al. 2008, Rue, Mattei et al. 2008). Im Gegensatz zu den ESCRT Komplexen 0-II, die als stabile Proteinkomplexe im Zytoplasma vorliegen, kommt es nur vorübergehend zur Bildung des ESCRT-III Komplexes an der Membran der Endosomen.

Die Kernuntereinheiten sind relativ klein (221-241 AS) und haben ähnliche biochemische Eigenschaften (Muziol, Pineda-Molina et al. 2006, Bajorek, Schubert et al. 2009, Xiao, Chen et al. 2009). Die amino-terminale Region besteht aus zwei  $\alpha$ -Helices ( $\alpha_1, \alpha_2$ ), die eine Haarnadelstruktur formen und wichtig für die Membranbindung und die Homo- oder Heterodimerisierung sind. Im Zytoplasma falten sich die negativ geladenen C-Terminalen Regionen ( $\alpha_5$  und  $\alpha_6$ ) auf die Haarnadelstruktur zurück. Dieser autoinhibitorische Mechanismus fördert die Stabilität der inaktiven Monomere (Zamborlini, Usami et al. 2006, Shim, Kimpler et al. 2007). Die Carboxy-terminale Region beherbergt auch die MIMs (MIT (microtubule-interacting and transport) interacting motifs (MIMs)) für die Interaktion mit der AAA-ATPase (ATPases Associated with diverse cellular Activities) Vps4 (Scott, Chung et al. 2005, Obita, Saksena et al. 2007, Stuchell-Brereton, Skalicky et al. 2007)). Trotz ihrer strukturellen Ähnlichkeit üben die ESCRT-III Untereinheiten spezifische Funktionen aus.

Die Aktivierung der ESCRT-III Moleküle benötigt eine Reihe von Konformationsänderungen, die zur Aufhebung der Autoinhibition, stabilen Membranbindung und der Interaktion mit anderen ESCRT Molekülen sowie Exposition der MIM Domäne führen (Teo, Perisic et al. 2004, Im, Wollert et al. 2009, Teis, Saksena et al. 2010). Die aktivierten ESCRT-III Untereinheiten bilden durch Homo-Oligomerisierung helikale Filamente an der endosomalen Membran.

Der geordnete Zusammenbau der Snf7 Untereinheiten zu einem aktiven Filament beginnt damit, dass ESCRT-II und Vps20 die Homooligomerisierung von Snf7 bewirken (Teis, Saksena et al. 2008). Die Homooligomerisierung wird durch die Bindung von Vps24 an den letzten Snf7 Protomer gestoppt. Vps24 rekrutiert Vps2, wodurch der Aufbau des ESCRT-III Filaments abgeschlossen wird (Babst, Katzmann, Estepa-Sabal et al. 2002, Babst, Katzmann, Snyder et al. 2002, Teis, Saksena et al. 2008).

Der zuletzt rekrutierte ESCRT Komplex besteht aus der Typ I AAA-ATPase Vps4 und dem Kofaktor Vta1 (VPS20-associated 1 homolog) (Babst, Sato et al. 1997). Im Zytoplasma liegt Vps4 in inaktiver Form vor (Mono/Dimer) (Babst, Wendland et al. 1998). Die Zusammensetzung des dodecameren Komplexes erfolgt an ESCRT-III Filamenten (Shestakova, Hanono et al. 2010). Vps4 beinhaltet eine N-terminale MIT Domäne die an die C-terminale MIM domäne von Vps2 bindet (Nickerson, West et al. 2006). Vps4 könnte als Mechanoenzym, die Energie aus der ATP Hydrolyse in mechanische Arbeit umsetzen und zur Auflösung der ESCRT-III Filamentstruktur verwenden (Henne, Buchkovich et al. 2011). Darüber hinaus könnte der Vps4 Komplex auch eine Rolle bei der Abschnürung der Membran spielen, die mit der Vps4 abhängige Auflösung der ESCRT-III Struktur einhergeht (Saksena, Wahlman et al. 2009). Der genaue Mechanismus und ob VPS4 für die Abschnürung benötigt wird, sind noch nicht vollständig aufgeklärt.



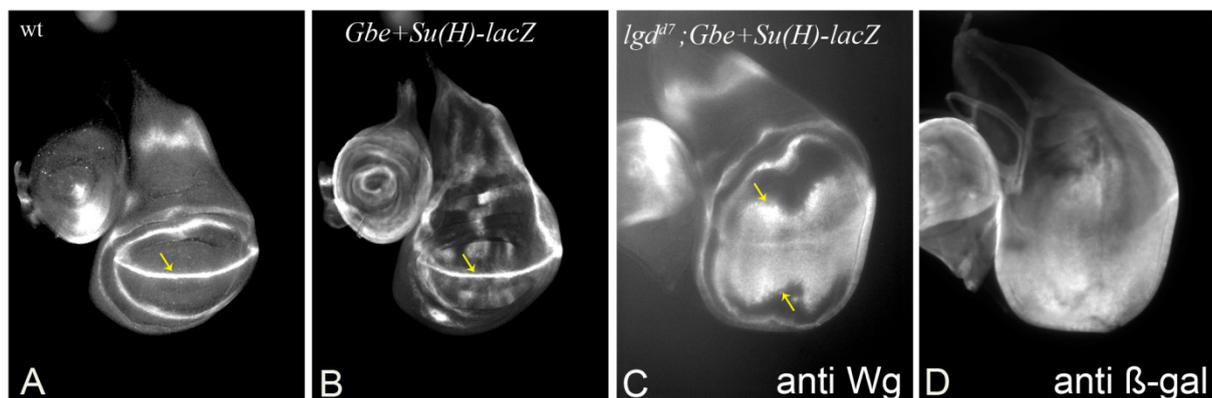
**Abb. 1-7. Speklatives Modell für die Funktion der ESCRT Komplexe bei der ILV Bildung.** Die ESCRT-III Assemblierung wird durch Bindung von Vps20 an Vps25 auf der Membranoberfläche initiiert. In der zweiten Phase (Stage II) bindet Snf7 an den Membran gebundenen Vps25-Vps20 Komplex. Dies bewirkt die Bildung eines membrangebundenen Snf7 Oligomers. Der Snf7 Oligomer umschließt die Fracht in einer Sortierungsdomäne und induziert die Deformation der Membran. Vps24 bindet den Snf7 Oligomer und die Interaktion zwischen Vps2 und Vps4 leitet die Disassemblierung des ESCRT-III Komplex ein und die ESCRT-III Komponenten werden in die geschlossen Form überführt. (übernommen aus (Saksena, Wahlman et al. 2009))

In *Drosophila* führt der Funktionsverlust der ESCRT-I-III Komplexe zur Deregulierung der Signalwege und im Falle von Notch zur liganden-unabhängigen und ektopischen Aktivierung des Signalwegs (Moberg, Schelble et al. 2005, Thompson, Mathieu et al. 2005, Vaccari und

Bilder 2005, Vaccari, Rusten et al. 2009). Diese Störung wird auch bei Genfunktionsverlust von *Igd* beobachtet und wird im folgenden Abschnitt behandelt.

### 1.3 Das Tumorsuppressorgen *Lethal (2) giant discs*

Das Gen *Lethal (2) giant disc (l(2)gd*, im Folgenden *Igd*) befindet sich in *Drosophila* auf dem zweiten Chromosom und wurde 1971 als Tumorsuppressorgen in *D.m.* identifiziert. Die erste Charakterisierung zeigte, dass der Genfunktionsverlust zu einer verlängerten larvalen Lebensphase, puppaler Letalität, und zu einer Überproliferation der Imaginalscheiben führt (Bryant und Schubiger 1971). Weitere Untersuchungen zeigten eine ektopische Expression von Wingless (Wg) und Decapentaplegic (Dpp) (Buratovich und Bryant 1995, Buratovich und Bryant 1997). Ursächlich für die Überproliferation der Imaginalscheiben und die ektopische Expression von Wg ist die ektopische Aktivierung des Notch-Signalwegs, wodurch *Igd* als ein negativer Regulator des Notch-Signalwegs in *Drosophila* identifiziert wurde (Klein 2003). Wg ist an der dorso-ventralen (D/V) Grenze ein Zielgen des Notch-Signalwegs (siehe Abschnitt 1.4). Weitere Studien, welche die verantwortliche Transkriptionseinheit identifizierten, zeigten, dass der Funktionsverlust von *Igd* zu Störungen im endosomalen Transport und Proteinabbau führt, und die Aktivierung des Notch-Signalwegs außerdem unabhängig von den Liganden auftritt (Childress, Acar et al. 2006, Gallagher und Knoblich 2006, Jaekel und Klein 2006).



**Abb. 1-8 Der Funktionsverlust von *Igd* führt zur ektopischen Aktivierung des Notch-Signalwegs.** (A,B) Expression der Notch Zielgene *wg* (A) und des Notch-Aktivitätsreporters *Gbe+Su(H)-lacZ* (Furriols und Bray 2001) (B) in einer wildtypischen Flügelimaginalscheibe im späten dritten Larvenstadium (L3). Die Expression an der D/V Grenze (Pfeile in A,B) ist auf einen schmalen Streifen beschränkt. (C,D) Expression der Zielgene in einer *Igd<sup>d7</sup>* homozygot mutanten Flügelimaginalscheibe. Die Wg Expression ist nicht mehr auf einen schmalen Streifen beschränkt sondern verbreitert (C, Pfeile). Die Expression des Notchaktivitäts-Reporters *Gbe+Su(H)-lacZ* ist ubiquitär und die starke Aktivität ist nicht mehr auf die D/V Grenze beschränkt (vgl. B,D).

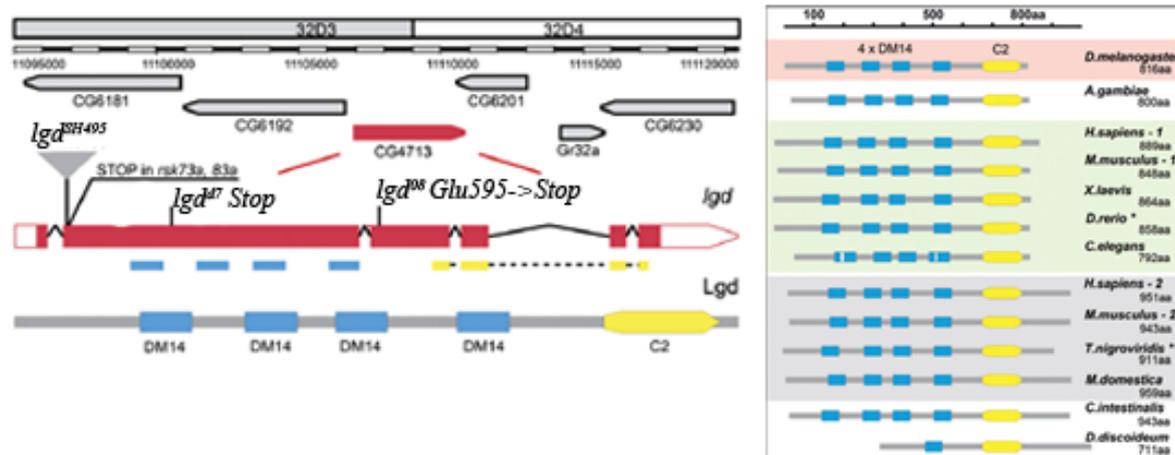
### 1.3.1 Struktur der Lgd Proteinfamilie

Lgd ist ein Mitglied einer kaum charakterisierten Proteinfamilie mit Vertretern in allen Metazoen bis hin zum Menschen (Jaekel und Klein 2006). Lgd ist in *D.m.* der einzige Vertreter, wohingegen in den Wirbeltieren zwei Orthologe auftreten. In nahezu allen Vertretern treten vier DM14 Wiederholungen auf. Die Namensgebung der DM14 Domänen geht auf einem *in silico* Screen zurück, in dem wiederholende Sequenzen innerhalb von Proteinen in *D.m.* gesucht wurden (Ponting, Mott et al. 2001). Die Funktion dieser Wiederholungssequenzen ist unbekannt, jedoch ist die typische Anordnung dieser Domänen so wie eine C-terminale C2 Domäne in der Lgd-Proteinfamilie konserviert (siehe Abb. 1-8).

Die C2 Domäne (Protein kinase C conserved region 2) wurde erstmals für die Proteinkinase C (Pkc) beschrieben und mittlerweile wurden zahlreiche Proteine mit C2 Domänen gefunden. Die klassische C2 Domäne vermittelt eine  $Ca^{2+}$  abhängige Bindung an Membranen (Nalefski und Falke 1996). Jedoch fehlen in der Lgd C2 Domäne, die für die Bindung charakteristischen Aminosäurereste (Aspartate) (Jaekel und Klein 2006). Dieser Domäne wurden auch weitere Eigenschaften in anderen Proteinen zugewiesen, beispielsweise gibt es Hinweise auf Protein-Protein Interaktion vermittelt durch die Bindung von Phosphotyrosinen (Benes, Wu et al. 2005). Mittels Phospholipid-Bindungsassays wurde für die C2-Domäne von Lgd gezeigt, dass sie die Bindung an Membranen über bestimmte Phospholipide vermittelt (Gallagher und Knoblich 2006). Mikroskopische Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation von Lgd zeigten eine zytoplasmatische Lokalisation des Proteins (Childress, Acar et al. 2006, Gallagher und Knoblich 2006, Jaekel und Klein 2006).

Im Genom der Säugetiere finden sich zwei Orthologe, Lgd1 und Lgd2 (Childress, Acar et al. 2006, Jaekel und Klein 2006). Die Funktionen, die diesen Orthologen zugeschrieben werden, sind vielfältig und basieren größtenteils auf Zellkultur-Studien. Lgd2 (Synonyme CC2D1A, Aki, TAPE, Freud-1) fungiert als Gerüstprotein im EGF-Rezeptor Signalweg (Nakamura, Naito et al. 2008), als Aktivator des NF-kB Signalwegs (Zhao, Li et al. 2010) und scheint die Spaltung der Centrosomen während der Mitose zu regulieren (Nakamura, Arai et al. 2009). Darüber hinaus wurden beide Orthologe als transkriptionelle Repressoren des 5-HT<sub>1A</sub> (Serotonin) Rezeptors beschrieben (Ou, Lemonde et al. 2003, Hadjighassem, Austin et al. 2009)).

Die Funktion von *lgd* scheint in den Mausorthologen konserviert zu sein, da deren ektopische Expression in Rettungsexperimenten in *Drosophila* zu einer Unterdrückung des *lgd* Phänotyps führen (Jaekel und Klein 2006).



**Abb. 1-9. Organisation des Genlokus CG4713/*lgd* und die konservierte Domänenstruktur der Lgd Proteinfamilie.** Lokalisation der Transkriptionseinheit und Struktur des Genlokus und des kodierten Lgd Proteins mit den DM14 Wiederholungssequenzen und der C2 Domäne. Mutante Allele sind angezeigt. *lga*<sup>SH495</sup> ist eine P-Element Insertion, *lgd*<sup>M7</sup> kodiert für stark verkürztes Protein aufgrund eines vorzeitigen Stopcodon (2bp Deletion, Frameshift) und das von *lgd*<sup>08</sup> (Gallagher und Knoblich 2006) kodierte Protein endet nach der letzten DM14 Domäne (übernommen und modifiziert aus (Jaekel und Klein 2006)).

### 1.3.2 Defekte im endosomalen Transport von Proteinen und die Aktivierung des N-Signalwegs in *lgd* mutanten Zellen

In *Drosophila* beeinflusst Lgd den konstitutiven endosomalen Transport des Notch Rezeptors und der Funktionsverlust führt zur liganden-unabhängigen, ektopischen Aktivierung des Notch-Signalwegs (Childress, Acar et al. 2006, Gallagher und Knoblich 2006, Jaekel und Klein 2006). Die Beeinträchtigung der *lgd* Funktion, durch den Funktionsverlust oder die Überexpression von *lgd*, führen zur ektopischen Aktivierung und Akkumulation des Notch Rezeptors (Childress, Acar et al. 2006, Gallagher und Knoblich 2006, Jaekel und Klein 2006). Die Akkumulation zeigt sich in fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen anhand von auffälligen Vesikeln. Diese Vesikel wurden mit Hilfe verschiedener endosomaler Marker und durch Uptake-Experimente als Endosomen (Childress, Acar et al. 2006, Gallagher und Knoblich 2006, Jaekel und Klein 2006). In den *lgd* mutanten Zellen (im Folgenden auch als *lgd* Zellen bezeichnet) erscheinen die Endosomen, welche den Notch Rezeptor enthalten vergrößert (Childress, Acar et al. 2006, Gallagher und Knoblich 2006, Jaekel und Klein 2006).

Bei der genaueren Klassifizierung der betroffenen Endosomen in *lgd* Zellen gab es abweichende Ergebnisse.

Die Untersuchung von Jaekel und Klein (2006) zeigte, dass bei *Lgd* Überexpression das frühe Endosom (Rab5) betroffen war. In *lgd* mutanten Zellen konnte keine eindeutig bevorzugte Assoziation mit Rab5 oder Rab7 festgestellt werden. Die Überexpression der UAS-GFP-Rab5 oder –Rab7 Fusionsproteine führt in *lgd* Zellen zur Unterdrückung der ektopischen Aktivierung des Notch Signalwegs (Jaekel und Klein 2006). Die Überexpression des Notch Rezeptors verstärkte die endosomale Proteinakkumulation in *lgd* Zellen und führte zu einer reduzierten Assoziation mit Rab7. Andere spät-endosomale Marker (Spinster (Spin) und Deep Orange (Dor)) waren mit den Ansammlungen des Rezeptors immer noch assoziiert (Jaekel und Klein 2006). Daraus wurde die Schlussfolgerung gezogen, dass die endosomale Akkumulation des Notch Rezeptors in einem späten endosomalen Kompartiment nach dem Rab7 abhängigen Reifungsschritt stattfindet (Jaekel und Klein 2006).

In der Studie von Gallagher und Knoblich (2006) wurde gezeigt, dass Rab5 und Hrs in *lgd* mutanten Zellen akkumulieren. Für GFP-Rab7 (späte, reife Endosomen) und GFP-Rab11 (Recycling Endosomen) zeigten sich keine Auffälligkeiten (Gallagher und Knoblich 2006). In dieser Studie wurde eine spezielle Situation, nämlich die asymmetrische Zellteilung von Sensory Organ Precursors (SOPs) untersucht. Die Inhibition des Notch-Signalwegs führt zu symmetrischen Zellteilungen während der Bildung der externen sensorischen Organe, was zur Bildung von vier Neuronen auf Kosten der anderen Zelltypen führt (Hartenstein und Posakony 1990). Im Gegensatz dazu führt die Überaktivierung von Notch zur Bildung von vier Sockelzellen.

Die unterschiedlichen Ergebnisse der Studien könnte auf die Untersuchung unterschiedlicher Zelltypen und *lgd* Allele zurückgeführt werden (Gallagher und Knoblich 2006, Jaekel und Klein 2006). Das verwendete *lgd*<sup>08</sup> Allel kodiert für ein verkürztes Protein ohne C2 Domäne und wurde als ein stark hypomorphes Allel klassifiziert (Gallagher und Knoblich 2006). Die Untersuchung von Gallagher und Knoblich (2006) und Childress et al. (2006) zeigten, dass Hrs in *lgd* mutanten Zellen akkumuliert und mit dem Notch Rezeptor kolokalisiert. Diese beiden Studien deuteten eher daraufhin, dass Notch in frühen Endosomen akkumuliert (Childress, Acar et al. 2006, Gallagher und Knoblich 2006).

Eine mit Hilfe des UAS/GAL4 Systems (Brand und Perrimon 1993) durchgeführte Struktur-Funktionsanalyse konnte keine klare Rückschlüsse auf die Funktion der Domänen in Lgd bringen (Troost, 2007). Lgd Allele, die Proteine ohne C2 Domäne produzieren, wurden als stark-hypomorphe Allele charakterisiert (Childress, Acar et al. 2006, Gallagher und Knoblich 2006). Die Überexpression einer Variante ohne die C2 Domäne (Lgd $\Delta$ C2) führte jedoch zu einer Unterdrückung der ektopischen Aktivierung des Notch-Signalwegs und auch ein Deletionskonstrukt ohne DM14 Domänen unterdrückt die ektopische Aktivierung (Jaekel 2006, Troost 2007.). Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass die *lgd* Funktion durch Überexpression des Proteins beeinträchtigt wird und zu ähnlichen Phänotypen wie der Funktionsverlust führt (Gallagher und Knoblich 2006, Jaekel und Klein 2006). Dominant-negative Effekte bei Überexpression sind hierbei wahrscheinlich auf die Störung der Stöchiometrie von Proteinkomplexen zurückzuführen (Herskowitz 1987).

Der Prozess, der in *lgd* Zellen zur ektopischen Aktivierung des Notch Rezeptors führt, konnte bisher nicht genau aufgeklärt werden. Notch ist ein Zelloberflächenrezeptor und befindet sich erwartungsgemäß an der Plasmamembran, aber es können substantielle Mengen des zum Abbau markierten Rezeptors in endosomalen Kompartimenten nachgewiesen werden (Kooh, Fehon et al. 1993, Wilkin, Carbery et al. 2004, Bray 2006). Störungen beim endosomalen Transport führen zur Akkumulation des Notch Rezeptors in Endosomen (Jekely und Rorth 2003, Wilkin, Carbery et al. 2004). Einige Mutationen in Komponenten des endosomalen Transportwegs in *D.m.* (*Hrs*, Syntaxin I und  $\beta$ -arrestin) führen zur Anhäufung des Rezeptors in Endosomen ohne die Aktivität des Notch-Signalwegs zu beeinflussen (Jekely und Rorth 2003, Lu und Bilder 2005, Mukherjee, Veraksa et al. 2005). Mutationen in anderen endosomalen Komponenten führen sowohl zur Akkumulation von Notch als auch zur Überaktivierung des Signalwegs wie die ESCRT Komponenten Vps25 und Tsg101 (Moberg, Schelble et al. 2005, Thompson, Mathieu et al. 2005, Vaccari und Bilder 2005).

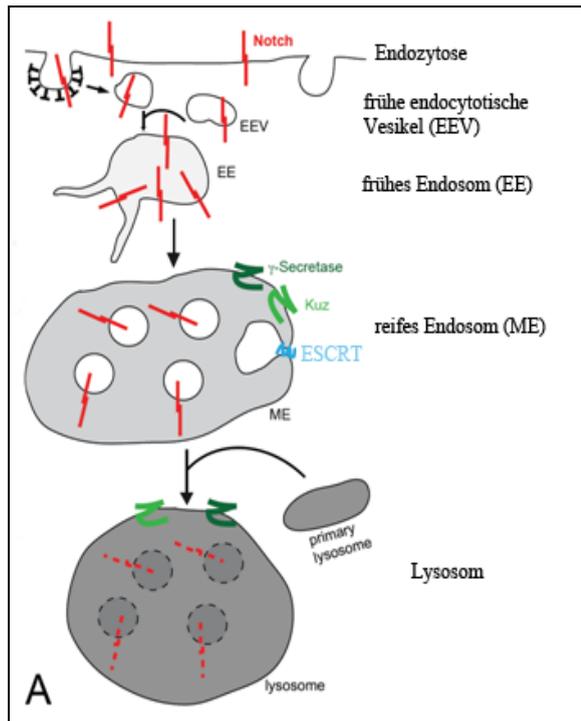
Die bisherigen Untersuchungen deuten daraufhin, dass die Funktion von *lgd* nach der Funktion von *hrs* benötigt wird, da der gleichzeitige Verlust von *hrs* in *lgd* Zellen die ektopische Aktivierung des Notch-Signalwegs verhindert. (Childress, Acar et al. 2006, Gallagher und Knoblich 2006, Jaekel und Klein 2006). Aufgrund dieser genetischen Interaktion mit *hrs*, lässt sich die Möglichkeit eines Einflusses von *lgd* auf den ESCRT vermittelten Prozess in Betracht ziehen. Es bestehen einige Ähnlichkeiten zwischen den

Phänotypen von *lgd* und den ESCRT Mutanten. Der Verlust verschiedener ESCRT Komplex I-III Untereinheiten führt zur Aktivierung des Notch-Signalwegs und zur Überproliferation der Imaginalscheibenzellen (Moberg, Schelble et al. 2005, Thompson, Mathieu et al. 2005, Vaccari und Bilder 2005). Der Verlust von *hrs* (ESCRT-0) führt im Unterschied zu den ESCRT-I-III Mutanten zu keiner ektopische Aktivierung des Notch-Signalwegs (Jekely und Rorth 2003, Jaekel und Klein 2006)). Der Einfluss der anderen ESCRT-0 Untereinheit, STAM, auf den Notch-Signalweg wurde bisher noch nicht untersucht.

Allerdings zeichnen sich auch Unterschiede in den Phänotypen beim Funktionsverlust von ESCRT I-III und *lgd* ab. Für den Verlust der ESCRT I-III Funktion werden Phänotypen beschrieben die bei *lgd* Mutanten nicht auftreten. Bei Verlust der ESCRT I-III Funktion zeigt sich der Verlust der epithelialen Integrität, vermehrter Zelltod und die nicht-zellautonome Proliferation, also die Proliferation wildtypischer Nachbarzellen (Moberg, Schelble et al. 2005, Thompson, Mathieu et al. 2005, Vaccari und Bilder 2005, Herz, Chen et al. 2006). Bei *lgd* Funktionsverlust tritt kein Verlust der epithelialen Integrität auf und die Überproliferation ist zellautonom (Jaekel und Klein 2006). Folglich zeigen sich zwar ähnliche, aber nicht identische Phänotypen beim Vergleich von Verlust der ESCRT Funktion und der *lgd* Funktion.

Vorherige Untersuchungen zeigten, dass die ektopische Aktivierung des Notch-Signalwegs in *lgd* Zellen abhängig vom aktivierenden S3-Schnitt durch den  $\gamma$ -Sekretase Komplex ist (Klein 2003, Jaekel und Klein 2006). Für den S3 Schnitt des Rezeptors wird die Interaktion mit den Liganden und der dadurch vermittelte S2 Schnitt durch Kuz vorausgesetzt. Es ist nicht bekannt, ob der Schnitt durch Kuz in *lgd* Zellen für die liganden-unabhängige Aktivierung des Rezeptors benötigt wird.

Der der zum Abbau führende endosomale Transportweg des Notch Rezeptors ist in einem Modell zusammengefasst (s. Abb. 1-10).



**Abb.1-10 Modell für den Abbau des Notch Rezeptors im Wildtyp.** (A) Der Notch Rezeptor wird endozytiert und gelangt über frühe endocytotische Vesikel („early endocytic vesicle“, EEV) zum frühen Endosom („early endosome“, EE). Nicht recycelte Fracht verbleibt im reifendem Endosom („maturing endosome“, ME) und wird in intraluminalen Vesikeln (ILV) verpackt. Die Verpackung führt dazu, dass die intrazelluläre Domäne des Notch Rezeptors nicht mehr dem Zytosol zugewandt ist. Durch die Fusion mit dem Lysosom wird das reife Endosom mitsamt der Fracht in den ILV verdaut. Der Mechanismus und der Ort der ektopischen Aktivierung des Notch Rezeptors ist nicht bekannt. (verändert übernommen aus (Schneider, Troost et al. 2012))

#### 1.4 Die Rolle des Notch-Signalwegs während der Flügelentwicklung in *Drosophila m.*

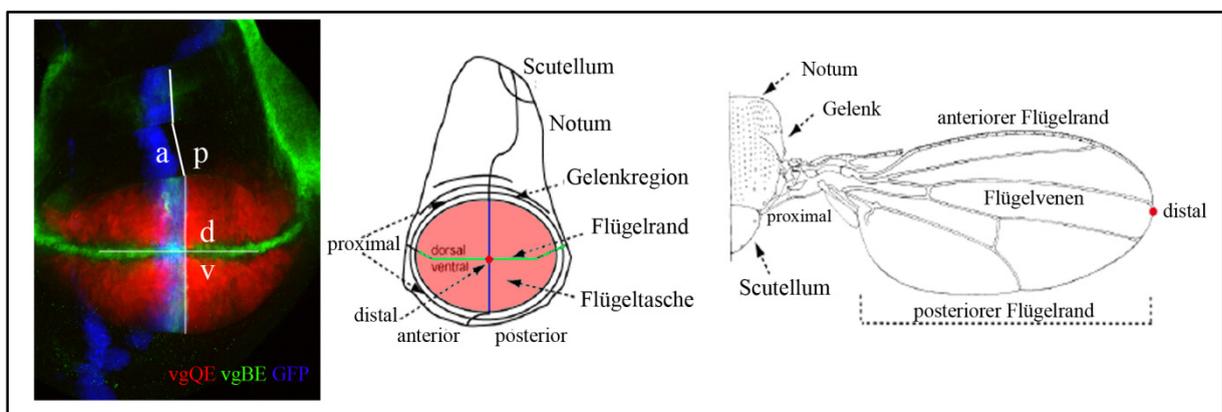
Die größten Teile der Epidermis des Imagos von *Drosophila melanogaster* (*D.m.*), einschließlich des Flügels, entwickelt sich aus undifferenzierte einschichtige Epithelien, den Imaginalscheiben. Diese bilden sich aus einer Gruppe von Vorläuferzellen des Ektoderms während der Embryogenese (Bate und Martinez-Arias 1991). Die Imaginalscheiben tragen nicht zur Bildung der larvalen Epidermis bei sondern proliferieren während der larvalen Phasen. Während der Entwicklung laufen Musterbildungsprozesse ab, welche die anterior-posteriore (A/P) und die dorso-ventrale (D/V) Achse des späteren Flügels durch Kompartimentgrenzen definieren (siehe Abb. 1-3).

Als Kompartimente werden Gruppen von Zellen bezeichnet, die eine funktionale Einheit bilden und sie wurden erstmals durch klonale Analyse beschrieben (Garcia-Bellido, Ripoll et al. 1973, Lawrence 1973). Die klonale Analyse ist in *D.m.* eine etablierte Methode mit deren Hilfe sich zahlreicher wichtiger biologischer Fragestellungen, z.B. zur Zell-Abstammungslinie, der Determination des Zellschicksals, der Autonomie von Genfunktionen und zur Musterbildung gewidmet wurde (Ashburner 1989). Mittels genetischer Markierung einzelner Zellen während der frühen Entwicklung konnte gezeigt werden, dass die Nachkommen

dieser Zelle (der Klon) in adulten Strukturen bis zu einer Grenzlinie (der Kompartimentgrenze) vorstoßen und häufig an dieser entlang wachsen, aber nie diese Grenze überschreiten (Garcia-Bellido, Ripoll et al. 1973). Die A/P Kompartimentierung des Flügels findet während der frühen Entwicklung im Embryo statt und die D/V Kompartimentierung während der larvalen Entwicklung.

Während der Flügelentwicklung vermittelt der Notch-Signalweg die Zell-Zell Interaktionen an der dorso/ventralen (D/V) Kompartimentgrenze, die zur Aktivierung und Aufrechterhaltung der Expression verschiedener essentieller Gene führt. Insbesondere sind *wingless (wg)* und *vestigial (vg)* für die Etablierung, das Wachstum und die Musterbildung des Flügelprimordiums essentiell (Übersicht (Klein 2001)). Die *vg* Expression wird von zwei intronischen Enhancer Elementen *vgBE* (boundary enhancer) und *vgQE* (quadrant enhancer) gesteuert, wobei die Expression des *vgBE* an der D/V Grenze von der Aktivität des Notch-Signalwegs abhängig ist und die Expression von *Wg* und *Vg* für das Wachstum des Flügeltgewebes vorausgesetzt wird (Go, Eastman et al. 1998, Klein und Arias 1999).

Diese Interaktionen führen schließlich zur Expression in Zellen auf beiden Seiten der D/V Grenze (deCelis, GarciaBellido et al. 1996, deCelis und Bray 1997, Panin, Papayannopoulos et al. 1997). Die symmetrische Expression an der Grenze resultiert aus den gegensätzlich gerichteten Signalen der Liganden *Dl* und *Ser* und wird durch zwei Schleifen reguliert, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten aktiv sind und von den unterschiedlichen Expressionsmustern der Notch Liganden während des dritten Larvenstadiums abhängen (Doherty, Feger et al. 1996, deCelis und Bray 1997, Micchelli, Rulifson et al. 1997, Panin, Papayannopoulos et al. 1997).



**Abb. 1-11. Kompartimente in der Flügelimaginalscheibe.** Fluoreszenz-mikroskopische Aufnahme und schematische Betrachtung der Flügelimaginalscheibe. Das Flügelfeld wird durch die Expressionsmuster des *vgQE* (rot) und des *vgBE* (grün) gezeigt. Die a/p Kompartimentgrenze wird durch die Expression von *patched*

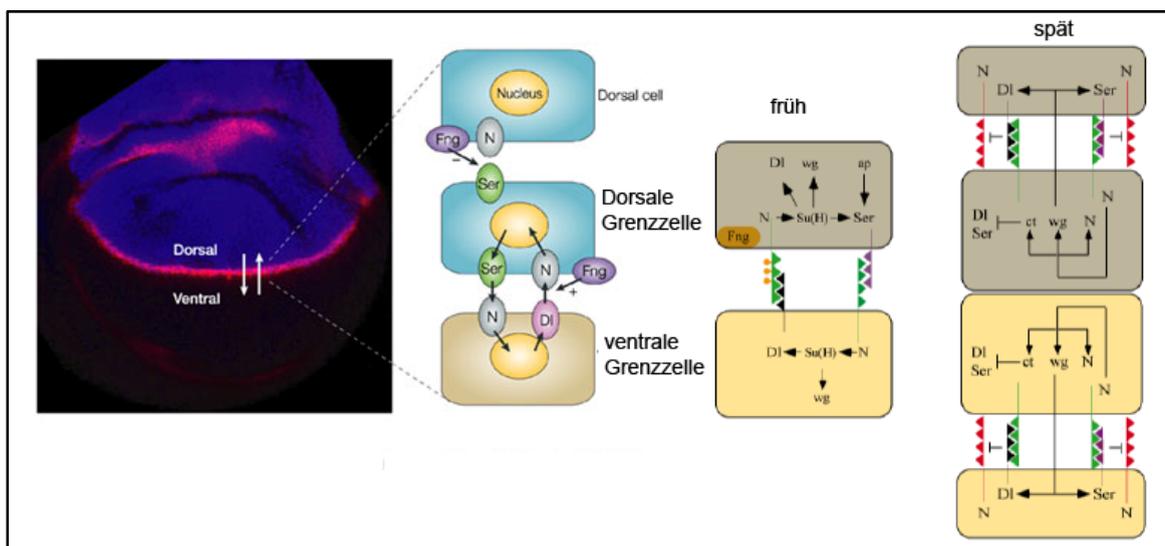
(*ptc*) GAL4 UASGFP in einem schmalen Streifen auf der anterioren Seite (in blau), und die D/V Grenze durch den *vgBE* (in grün) dargestellt. (Genotyp in A: *vgQE-RFP; ptcGAL4 UASGFP; vgBE-lacZ /SM6-TM6B*). Schematische Darstellung der Flügelimaginalscheibe und des Flügels. (übernommen und modifiziert aus Jaekel 2006, Imaginalscheibe modifiziert aus Bryant 1975 ,Flügel aus Heitzler et al. 1996)

In frühen Phasen wird Ser in den dorsalen Grenzzellen (dGz) exprimiert (Couso, Knust et al. 1995, DiazBenjumea und Cohen 1995) und die Expression von Dl scheint ventral in den Grenzzellen stärker zu sein (Doherty, Feger et al. 1996, deCelis und Bray 1997). Dieses frühe Expressionsmuster mit starker Expression der Liganden an der Grenze scheint durch die Aktivität des Notch-Signalwegs aufrechterhalten zu werden.

Diese Kenntnisnahme basiert darauf, dass die ektopische Aktivierung des Signalwegs zur ektopischen Expression der Liganden führt (Doherty, Feger et al. 1996, Panin, Papayannopoulos et al. 1997, Klein und Arias 1998b). Während dieser Phase scheint die Expression von Ser beschränkt auf die dorsale Seite zu sein und die Expression von Dl wird stärker auf der ventralen Seite der Flügelanlage beobachtet. Die Expression der Liganden wird durch die Aktivität des Notch-Signalwegs durch die anfängliche Schleife (Dl/Ser loop) auf beiden Seiten aufrechterhalten (Panin, Papayannopoulos et al. 1997). Aus der unterschiedlichen Expression der Liganden folgt, dass die Aktivierung von Notch auf die D/V Grenze beschränkt bleibt und sich nicht in die Flügeltasche ausbreitet ((Panin, Papayannopoulos et al. 1997). Die gegensätzlich gerichteten Signale der Liganden setzen die Aktivität der Glykosyltransferase Fringe (Fng) voraus (Irvine und Wieschaus 1994, Kim, Magee et al. 1997, Klein und Arias 1998b)). Fng modifiziert einige EGF Module in der extrazellulären Domäne des Notch Rezeptors (Moloney, Panin et al. 2000, Munro und Freeman 2000)). Diese Modifikationen regulieren während der anfänglichen Phase die Interaktion des Notch Rezeptors mit den Liganden in der Weise, dass sie die Signale von Dl fördern und die Signale von Ser unterdrücken (Panin, Papayannopoulos et al. 1997). Die Expression von Fng und Ser wird durch das Selektorgen des dorsalen Zellschicksal Apterous (*ap*) während der frühen Flügelentwicklung kontrolliert (Irvine und Wieschaus 1994, Couso, Knust et al. 1995, DiazBenjumea und Cohen 1995). Daher treffen an der D/V Grenze Ser und Fng exprimierende dorsale Grenzzellen auf Ser und Fng nicht exprimierende ventrale Zellen treffen. Da Fng in den Ser exprimierenden Zellen den Notch Rezeptor modifiziert, kann Ser nur zu den ventralen Grenzzellen (vGz) signalisieren, die den unmodifizierten Notch Rezeptor aufweisen. Im Gegensatz dazu signalisiert Dl vornehmlich zu den dorsalen Grenzzellen (dGz), wo modifiziertes Notch vorliegt.

Diese Signalpolarisierung führt zur symmetrischen Aktivierung des Notch-Signalwegs in dGz und vGz (Irvine 1999, Blair 2000). Daher reguliert die Grenze der Fng exprimierenden und nicht exprimierenden Zellen die Aktivität des Notch-Signalwegs an der D/V Grenze. Das Delta Expressionsmuster ist in dieser frühen Phase schwierig zu bestimmen und es ist nicht bekannt, ob die mittels Antikörperfärbungen gegen Dl zu beobachtende schwache Färbung während des frühen dritten Larvenstadium spezifisch ist.

Nach der Etablierung der Wg Expressionsdomäne wird ein zweite regulatorische Schleife induziert, welche die Aktivität des Notch-Signalwegs in den Grenzzellen aufrechterhält (deCelis und Bray 1997, Micchelli, Rulifson et al. 1997). Nach der Wg Expression in früheren Phasen zeigt sich im mittleren dritten Larvenstadium mit dem Auftreten der Expression von *cut* an der D/V Grenze auch eine Veränderung des Expressionsmusters der Liganden (Micchelli, Rulifson et al. 1997). Die Expression der Liganden wird nun durch Wg kontrolliert (Dl/Ser/Wg loop). Wg wird von den Grenzzellen sekretiert und diffundiert in die angrenzenden dorsalen und ventralen Zellen der Flügeltasche, wo die Expression der Liganden in schmalen dorsalen und ventralen Streifen entlang der Wg Domäne induziert wird (deCelis und Bray 1997, Micchelli, Rulifson et al. 1997). Dl und Ser signalisieren wahrscheinlich zu den Grenzzellen zurück und halten die Expression von Wg aufrecht (deCelis und Bray 1997, Micchelli, Rulifson et al. 1997). In dieser späten Phase ändert sich das Expressionsmuster von Fng (Irvine und Wieschaus 1994) und eine Beteiligung an der zweiten regulatorischen Schleife ist nicht bekannt.



**Abb.1-12: Modelle für die Regulation des Notch-Signalwegs an der D/V Grenze.** Links: (modifiziert aus Haines und Irvine 2003) Rechts: (modifiziert aus De Celis und Bray 1997) Die Modelle beschreiben die Interaktionen

an der D/V Grenze, die zur Polarisierung der Signale und zur symmetrischen Expression der Zielgene in den Grenzzellen führt. Weitere Erläuterungen im Text Abschnitt 1.4.

Die gegenwärtigen Modelle deuten daraufhin, dass die Aktivität von Notch an der D/V Grenze bzw. der Fringegrenze während der gesamten Flügelentwicklung symmetrisch ist (Irvine und Rauskolb 2001). Allerdings wurde diese Annahme bisher nicht genauer untersucht. Einige Beobachtungen deuteten aber auf eine anfängliche Asymmetrie hin (Micchelli, Rulifson et al. 1997). Darüber hinaus wird die Aktivität des Notch-Signalwegs für die Etablierung und Aufrechterhaltung der D/V Grenze benötigt. Dies hat zur Konsequenz, dass der Verlust der Aktivität des Signalwegs in Grenzzellen den Verlust der Kompartimentgrenze zur Folge hat (Micchelli und Blair 1999, Rauskolb, Correla et al. 1999). Normalerweise überschreiten Klone nicht die etablierten Kompartimentgrenzen. Da jedoch der Notch-Signalweg an der Aufrechterhaltung der D/V Grenze beteiligt ist, hat der Verlust der Aktivität des Notch-Signalwegs den Verlust dieser Grenze zur Folge (de Celis und Garcia-Bellido 1994). Dies führt dazu, dass die eindeutige Bestimmung der Herkunft der Klone z.B. bei einer klonalen Analyse der Liganden, erschwert wird. Für die Klärung der räumlichen Voraussetzungen der Komponenten des Notch-Signalwegs ist dies aber unbedingt nötig.

Möglicherweise sind die teilweise unterschiedlichen Ergebnisse der Studien der verschiedenen Gruppen darauf zurückzuführen (Couso, Knust et al. 1995, deCelis, GarciaBellido et al. 1996, Doherty, Feger et al. 1996, Micchelli, Rulifson et al. 1997). Couso et al. (1995) und de Celis et al. (1996) berichten, dass Ser in den dGz benötigt wird, was darauf schließen liess, dass Ser das Signal von den dGz zu den vGz ist (Couso, Knust et al. 1995, deCelis, GarciaBellido et al. 1996). Micchelli et al. (1997) berichteten, dass sowohl Dl als auch Ser Klone gelegentlich, aber nicht verlässlich, den Verlust der Zielgenexpression nach sich zogen (Micchelli, Rulifson et al. 1997). De Celis et al. (1996) und Doherty et al. (1996) berichten, dass Delta Klone, die dorsale und ventrale Zellen beinhalten, stärkere Kerben im Flügel verursachen. Klone die nur auf der ventralen Seite liegen führen nur schwächere Kerben im Flügel herbei und Klone auf der dorsale Seite zeigten keinen Effekt (deCelis, GarciaBellido et al. 1996, Doherty, Feger et al. 1996).

Der Zeitpunkt, an dem es während der Entwicklung zum Gewebeverlust kommt, ist unbekannt. Die Unterschiede könnten durch die Tatsache erklärt werden, dass in Miccheli et al. (1997) Imaginalscheiben und in den anderen Studien der Flügel untersucht wurden. Außerdem hat die bisherige klonale Analyse nicht die zweite regulatorische Schleife

(DI/Ser/Wg loop) in Betracht gezogen. Die Voraussetzungen für die Liganden könnten in den jeweiligen regulatorischen Schleifen unterschiedlich sein.

### 1.5 Ziele der Arbeit

Im ersten Projekt wurde die Funktion von *lethal(2) giant discs* (*lgd*) untersucht. In *Drosophila* ist Lgd an der Regulation des endosomalen Transports des Notch Rezeptors beteiligt und verhindert dessen liganden-unabhängige Aktivierung (Jaekel und Klein 2006). Die genaue Funktion des Proteins und der Mechanismus der Aktivierung des Signalwegs bei Funktionsverlust sind nicht bekannt. Zur weiteren Charakterisierung der Funktion von Lgd und der Regulation des Notch-Signalwegs sollten folgende ineinander übergreifende Fragestellungen untersucht werden:

1. Welche Funktion haben die Domänen von Lgd?
2. In welcher Weise ist Lgd am endosomalen Transport beteiligt und in welcher Beziehung steht Lgd zu ESCRT?
3. Welche Voraussetzungen sind für die ektopische Aktivierung des Notch-Signalwegs in *lgd* mutanten Zellen erforderlich?

Im zweiten Projekt sollte die Regulation der Aktivität des Notch-Signalwegs während der Flügelentwicklung in *Drosophila* untersucht werden. Die Expression von Wg wird durch die Interaktionen zwischen dorsalen und ventralen Grenzzellen über den Notch-Signalweg vermittelt, und das gegenseitige Signalisieren der Notch Liganden Serrate (Ser) und Delta (DI) von der dorsalen bzw. ventralen Seite führt zu einer symmetrischen Expressionsdomäne entlang der dorso-ventralen (D/V) Grenze (deCelis und Bray 1997, Micchelli, Rulifson et al. 1997, Panin, Papayannopoulos et al. 1997). Das gerichtete Signal der Liganden setzt die Modifikation des Notch Rezeptors in dorsalen Zellen durch die Glykosyltransferase Fringe (Fng) und die ausschließliche Expression der Liganden Ser und DI in dorsalen bzw. ventralen Zellen voraus. Um die Voraussetzungen zu bestimmen, die zur Aktivierung des Notch-Signalwegs an der Fringe Grenze (FG) führen, sollten die Funktionen von Fng, Ser und DI an einer ektopischen FG und anschließend mit Hilfe der gewonnenen Erkenntnisse die Aktivierung des Notch-Signalwegs an der D/V Grenze untersucht werden.

## 2. Ergebnisse

### 2.1. Charakterisierung des endosomalen Phänotyps in *Igd* Zellen

Durch fluoreszenzmikroskopische Analysen sollten mit Hilfe weiterer endosomaler Marker die endosomalen Kompartimente, in denen der Notch Rezeptor bei *Igd* Funktionsverlust akkumuliert, genauer bestimmt werden. Da lichtmikroskopische Untersuchungen in ihrer Auflösung begrenzt sind, wurde eine vergleichende Analyse der Morphologie der Endosomen von *Igd* mutanten und wildtypischen Zellen auch auf ultrastruktureller Ebene mittels Transmissionselektronenmikroskopie durchgeführt.

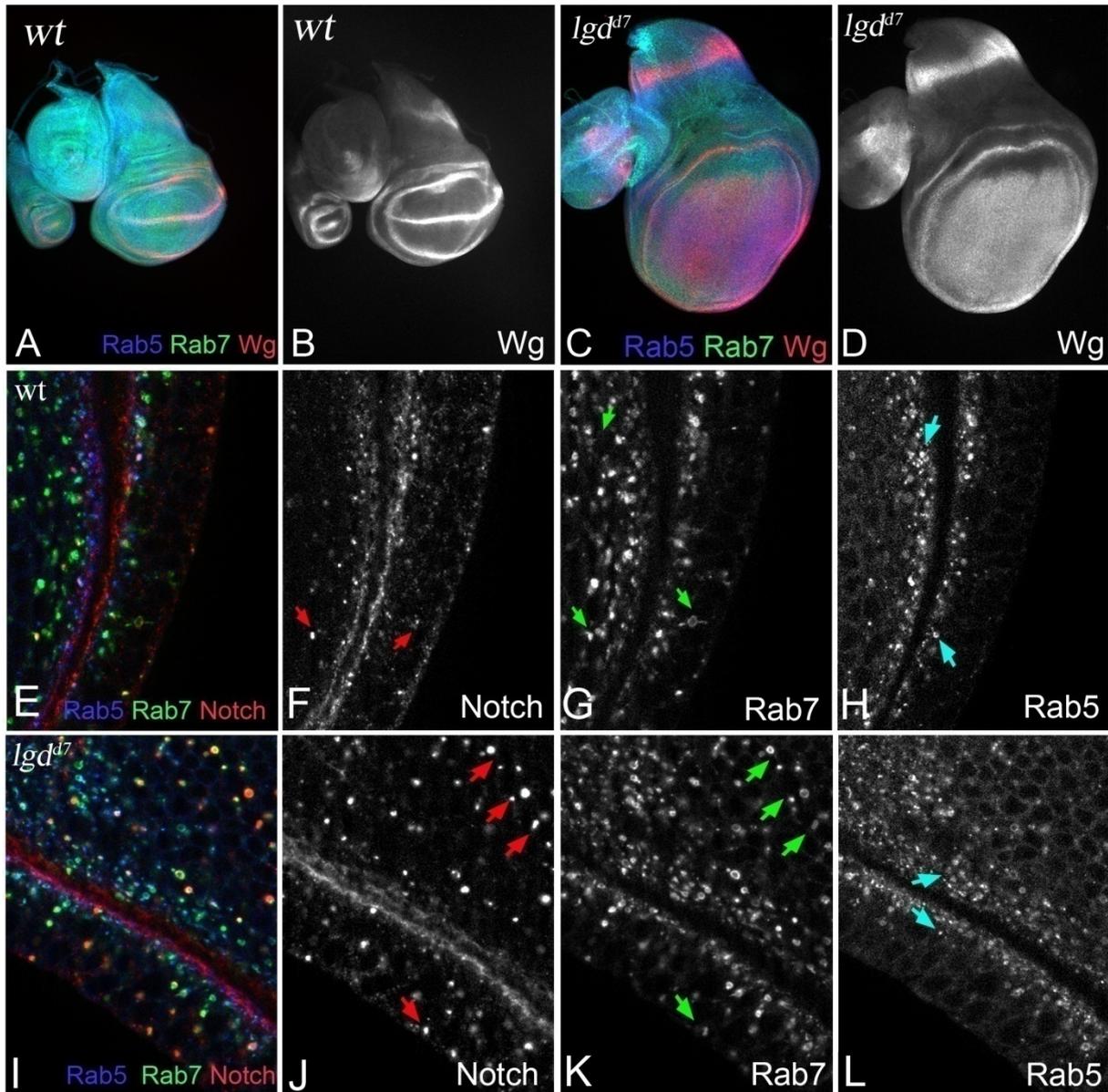
#### 2.1.1 Akkumulation des Notch Rezeptors in reifen Rab7 positiven Endosomen

Die bisherigen Charakterisierungen des endosomalen Phänotyps von *Igd* Zellen liessen keine eindeutige Identifizierung des betroffenen endosomalen Kompartiments zu. Zur genauen Bestimmung des endosomalen Kompartiments in dem die Akkumulation des Notch Rezeptors in vergrößerten Vesikeln auftritt wurde überprüft mit welchen endosomalen Markern die vergrößerten Vesikel assoziiert sind. Als genetische Marker wurden nun Rab5-CFP für das frühe Endosom und Rab7-YFP für das späte Endosom eingesetzt (Marois, Mahmoud et al. 2006). Diese Marker stehen unter Kontrolle des *tubulin- $\alpha$*  (*tuba*) Promotors, der die Expression in allen oder fast allen Zellen vermittelt (O'Donnell, Chen et al. 1994, Struhl und Greenwald 1999).

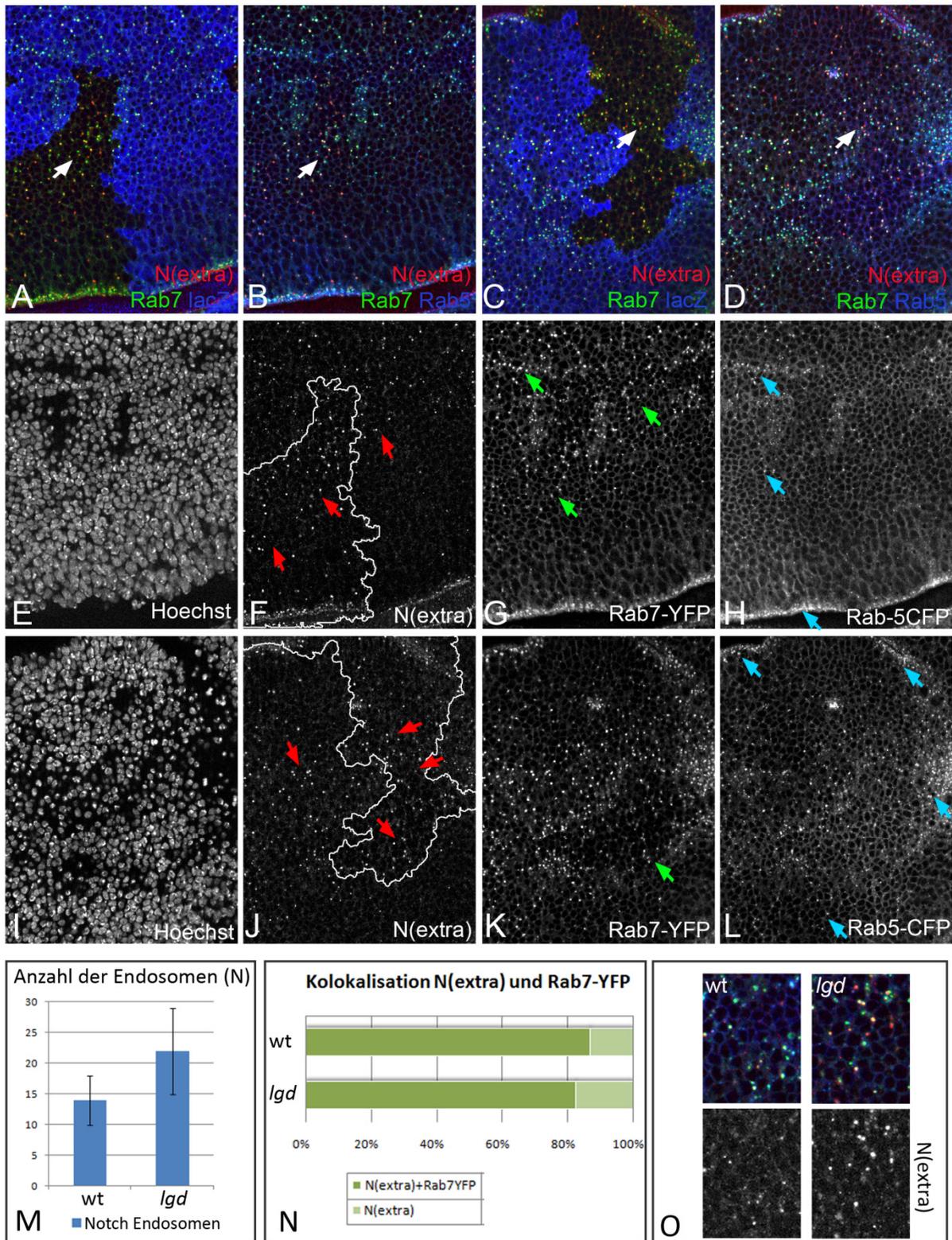
Die ubiquitäre, gemäßigte Überexpression beider Marker beeinflusst weder die Aktivierung des Notch Rezeptors im Wildtyp noch führt sie zur Unterdrückung der ektopischen Aktivierung in *Igd* Mutanten wie die Expression von *Wg* zeigt (siehe Abb. 2-1 A-D). Die Untersuchung dieser beiden Marker im Vergleich mit der Antikörperfärbung gegen den Notch Rezeptor bestätigt, dass die vesikulären Akkumulationen des Rezeptors im endosomalen System zu finden sind (siehe Abb. 2-1 E-H). In optischen Schnitten nahe der apikalen Seite der Zellen kolokalisieren Rab5-CFP und Rab7-YFP in endosomalen Strukturen. Nahe der Zelloberfläche sind die Endosomen Rab5 positiv. Abseits der Peripherie der Zellen zeigt Rab5 eine diffuse zytoplasmatische Färbung und eine Assoziation mit endosomalen Strukturen ist nicht ersichtlich (siehe Abb. 2-1 Pfeile in E-H). Weiter im Zellinneren sind vor allem Rab7 positive, reife Endosomen. Diese zeigen keine oder eine stark verringerte Rab5 Assoziation (siehe auch Anhang Abb. 7-1). Diese Verteilung lässt sich durch das Rab5/Rab7 Switch Modell der Reifung der Endosomen erklären. Rab5 wird sukzessiv durch Rab7 ersetzt

und die Endosomen bewegen sich während der Reifung von der Peripherie zum Zentrum und werden letztlich durch die Fusion mit Lysosomen abgebaut (Bucci, Thomsen et al. 2000, Rink, Ghigo et al. 2005, Marois, Mahmoud et al. 2006, Poteryaev, Datta et al. 2010). Die Untersuchung null-mutanter *Igd<sup>d7</sup>* Scheiben zeigt, dass die Akkumulationen des Notch Rezeptors in großen Vesikeln mit reifen Rab7 positiven Endosomen im Zellinneren assoziiert sind (siehe Abb. 2-1 M-P). Die Kollokalisierung des Notch Rezeptors mit beiden Markern in Endosomen nahe der apikalen Plasmamembran erschien unverändert. Von der Plasmamembran weiter entfernte Endosomen sind nicht mehr mit Rab5 assoziiert und ausschließlich für den spät endosomalen Marker Rab7 positiv. In *Igd* Zellen akkumuliert der Notch Rezeptors in reifen, Rab7 positiven Endosomen, deren Anzahl und Größe gegenüber dem Wildtyp erhöht erscheint.

Um den Vergleich von *Igd* und benachbarten Wildtypzellen zu ermöglichen, wurde eine klonale Analyse mit Hilfe des FLP/FRT Systems durchgeführt (Xu und Rubin 1993). In *Igd<sup>d7</sup>* Klonen bestätigte sich die Kollokalisierung von Akkumulationen des Rezeptors mit späten Rab7 positiven Endosomen (siehe Abb. 2-2 A-L). Die Quantifizierung der Endosomen in mutanten und benachbarten wildtypischen Bereichen zeigt, dass in *Igd* Zellen die Anzahl der reifen Endosomen, die Notch enthalten erhöht ist (siehe 2-2 M). Da der Notch Rezeptor auch in Wildtypzellen mit dem spät endosomalen Marker Rab7 assoziiert ist, deutet dies daraufhin, dass sich in *Igd* Zellen mehr Notch in späten Endosomen ansammelt. Notch kollokalisiert in wildtypischen und *Igd* Zellen mit Rab7 (87% der punktuellen Anhäufungen im Wt bzw. 83% in *Igd* siehe Abb. 2-2 N). Die Assoziation mit Rab5 tritt wie im Wildtyp nur an der Peripherie verstärkt auf und erschien unverändert und wurde nicht quantifiziert. Die endosomalen Marker zeigen keine offensichtliche Veränderung in der Verteilung. Daher erscheint eher der Transport des Notch Rezeptors (der Fracht) beeinträchtigt. Dies zeigt, dass Notch in *Igd* Zellen den endosomalen Transportweg durchläuft, aber in späten Endosomen akkumuliert. Dies lässt weiterhin vermuten, dass die Störung nach dem Rab5/Rab7 Switch auftritt und ein allgemeiner Defekt im degradativen Transport und Proteinabbau vorliegt.



**Abb. 2-1: Lokalisierung des Notch Rezeptors im endosomalen Transportweg in wildtypischen und *lgd* mutanten Zellen.** (A-D) Notch-Signalweg im Wildtyp (A,B) und *lgd* mutanter Flügelscheibe (C,D). Die Expression der Marker Rab5-CFP und Rab7-YFP hat keinen Einfluss auf die Expression von Wg. Im Wildtyp zeigt sich ein schmaler Streifen an der D/V Grenze (Wg in B), während die Expressionsdomäne in *lgd* mutanten Scheiben verbreitert ist (D). (E-H) Im Wildtyp kolokalisiert Notch nahe der apikalen Membran (durch Notch markiert) mit beiden endosomalen Markern in Endosomen. Im Zellinneren ist Rab5 im Zytoplasma lokalisiert und zeigt kaum Assoziation mit Endosomen. Die Endosomen sind hier mit Rab7 assoziiert. (I-L) In optischen Schnitten direkt unterhalb der apikalen Membran finden sich zahlreiche Endosomen, die den Notch Rezeptor enthalten und mit beiden Markern kolokalisieren. Es zeigt sich keine Kolokalisierung mit der Färbung der Plasmamembran (roter Pfeil in J-L). (M-P) In *lgd* Zellen zeigt sich die auffällige Kolokalisierung der endosomalen Akkumulation des Notch Rezeptors mit dem spät endosomalen Marker Rab7-YFP (Pfeile in N,O). Rab5-CFP findet sich auch hier hauptsächlich an peripheren Endosomen (Pfeile in P). (Genotyp in A,B, E-H: *w*;+/CyO<sup>wg-lacZ</sup>; *tubRab5-CFP*, *tubRab7-YFP* / + , Genotyp in C,D, I-J: *w*; *lgd<sup>d7</sup> FRT40A* / *lgd<sup>d7</sup> FRT40A*; *tubRab5-CFP tubRab7-YFP* / *Gbe+Su(H)-lacZ*).

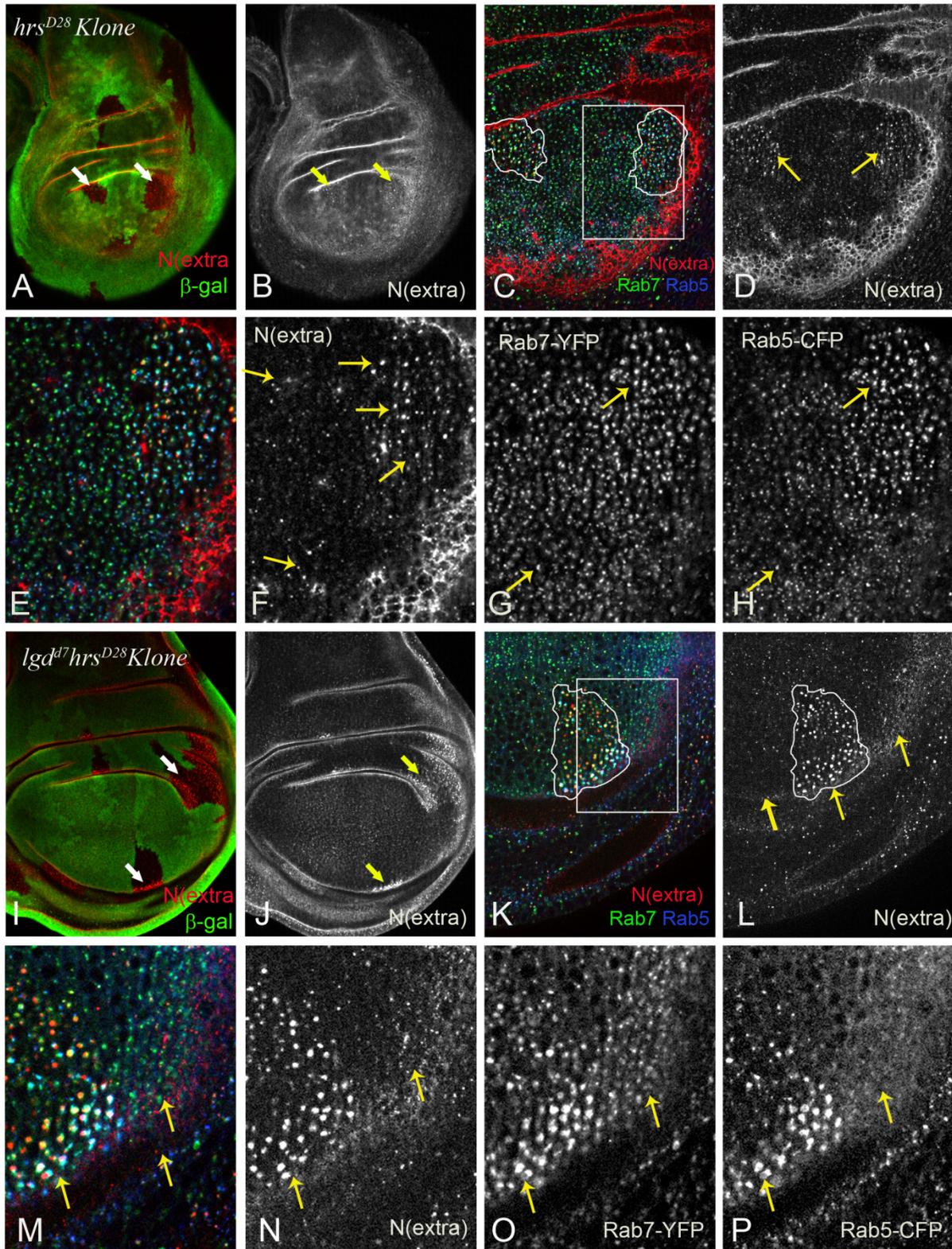


**Abb. 2-2: Klonale Analyse von *Igd<sup>d7</sup>* und Akkumulation von Notch in reifen Rab7-Endosomen.** (A-L) *Igd<sup>d7</sup>* Klone in der Flügelimaginalscheibe sind durch den Verlust von *lacZ* markiert (blau in A, C). In *Igd<sup>d7</sup>* mutanten Klone zeigt sich die Ansammlung des Notch Rezeptors in Rab7 positiven Endosomen im Vergleich zu benachbarten wildtypischen Zellen. Die Zellkerne wurden mit Hoechst 33258 gefärbt (E, I). Die mutanten Bereiche sind weiß umrandet (F, J). (M-O) Quantifizierung der Endosomen. Die *Igd* mutanten Zellen enthalten mehr Notch positive Endosomen als der Wildtyp (Mittelwerte aus 10 mutanten und wildtypischen Bereichen gleicher Größe (Bsp. in O), t-test:  $p < 0,000001$ ). Die Anzahl der Endosomen variiert in den ausgewerteten Ausschnitten je nach optischer Schnittebene. Innerhalb der Zellen ist Notch meistens mit Rab7 positiven

Endosomen assoziiert (N). Vier Imaginalscheiben mit Klonen wurden ausgewertet. (Genotyp: *hsFlp; arm-lacZ FRT40A / Igd<sup>d7</sup> FRT40A; tubRab5-CFP, tubRab7-YFP / MKRS*).

Vorherige Studien vermuteten, dass der Notch Rezeptor in *Igd* mutanten Zellen im späten Verlauf des endosomalen Transports akkumuliert und aktiviert werden könnte (Jaekel und Klein 2006), wobei die anderen Studien die Akkumulation in frühen Endosomen postulierten (Childress, Acar et al. 2006, Gallagher und Knoblich 2006). In *Igd hrs* doppelmutanten Zellen wird die ektopische Aktivierung des Notch-Signalwegs unterdrückt (Childress, Acar et al. 2006, Gallagher und Knoblich 2006, Jaekel und Klein 2006). In *hrs* mutanten Zellen zeigen sich vergrößerte Endosomen und es kommt zur Akkumulation des Notch Rezeptors und anderen ubiquitinierten Proteinen im endosomalen Kompartiment (Lloyd, Atkinson et al. 2002, Jekely und Rorth 2003), aber es wurde kein Einfluss auf den Notch-Signalweg beobachtet (Jekely und Rorth 2003, Lu und Bilder 2005, Jaekel und Klein 2006). Der zusätzliche Verlust von *hrs* in *Igd* Zellen stört den endosomalen Transport im frühen Verlauf und verhindert so die Akkumulation von Notch in späten Endosomen und unterdrückt dadurch die ektopische Aktivierung (Jaekel und Klein 2006).

Daher stellte sich die Frage, ob die Akkumulation des Notch Rezeptors bei gleichzeitigem Verlust von *Igd* und *hrs* in unterschiedlichen Kompartimenten stattfindet. Um dies klären wurden *hrs* und *Igd hrs* doppelmutante Klone erzeugt. Der Notch Rezeptor akkumuliert in *hrs* mutanten Zellen nur an der Peripherie bzw. der apikalen Seite in Endosomen und es sind kaum Endosomen im Inneren der Zellen zu beobachten. In *hrs* Klonen akkumuliert der Notch Rezeptor in Endosomen nahe der Plasmamembran, die mit beiden Rab Proteinen assoziiert sind (siehe Abb. 2-3 A-H). Auch die Unterdrückung der *hrs* Funktion mittels RNAi zeigt, dass der Notch Rezeptor bei Funktionsverlust von *hrs* in Endosomen an der Peripherie akkumuliert (siehe Anhang Abb. 7-2). In den *Igd hrs* doppelmutanten Zellen sind Anhäufungen des Notch Rezeptors nahe der apikalen Plasmamembran ebenso mit beiden endosomalen Markern assoziiert (s. Abb. 2-3 I-P). Sie erscheinen vergrößert und sind bereits auf niedrigeren Vergrößerungen ersichtlich (siehe Abb. 2-3 I,J Pfeile). Im Vergleich zu *hrs* mutanten Zellen akkumulieren die endosomalen Marker in den *Igd hrs* doppelmutanten Zellen stärker an den vergrößerten Endosomen (siehe Abb. 2-3 G,H und O,P).



**Abbildung 2-3: Lokalisierung von Notch in *hrs<sup>D28</sup>* und *lgd<sup>d7</sup> hrs<sup>D28</sup>* Klonen. (A-P) Imaginalscheiben mit *hrs* (A-H) bzw. *lgd hrs* (I-P). Die mutanten Bereiche sind durch den Verlust von  $\beta$ -Galaktosidase (*lacZ*) markiert (A, I) und wurden umrandet (C, K). Die endosomalen Marker, Rab7-YFP und Rab5-CFP, und die Färbung gegen den Notch Rezeptor zeigen eine deutliche Kolo­kalisierung (Vergrößerte Bereiche in C in E-F und K in M-P). Die Ansammlungen des Notch Rezeptors befinden sich in beiden Fällen nahe der Zelloberfläche. Darüber hinaus erscheinen die Endosomen in *lgd hrs* mutanten Zellen größer und die Akkumulation der endosomalen Marker ist deutlicher ersicht­lich (Vgl. E-H und M-P). (Genotyp: *hsFlp; arm-lacZ FRT40A / hrs<sup>D28</sup> FRT40A* oder *lgd<sup>d7</sup> hrs<sup>D28</sup> FRT40A; tubRab5-CFP, tubRab7-YFP / MKRS*).**

Zusammengefasst zeigen die Experimente, dass Notch in wildtypischen und *lgd* mutanten Zellen an der Peripherie mit Rab5 (und Rab7) und weiter im Zellinneren nur noch mit Rab7 kolokalisiert, also den endosomalen Transportweg durchläuft. In *lgd* mutanten Zellen akkumuliert Notch vermehrt in späten/reifen Rab7 positiven Endosomen.

Die weitere klonale Analyse zeigt darüber hinaus, dass in *hrs* mutanten und *lgd hrs* doppelmutanten Zellen Rab5-CFP und Rab7-YFP an der Peripherie der Zellen akkumulieren und dort mit dem Notch Rezeptor kolokalisieren. Daraus lässt sich auf einen frühen endosomalen Reifungsdefekt rückschließen. Zu beachten ist, dass es in *hrs* und *lgd hrs* mutanten Zellen nicht zur ektopischen Aktivierung des Rezeptors kommt (Childress, Acar et al. 2006, Jaekel und Klein 2006). Hinsichtlich des Proteinabbaus scheint aber eine synergistische Beziehung zwischen *lgd* und *hrs* zu bestehen, da in der Doppelmutante die Akkumulation des Notch Rezeptors verstärkt wird. Außerdem deutet sich eine Beziehung zwischen dem Reifungsgrad der endosomalen Kompartimente in denen der Notch Rezeptor akkumuliert und der Voraussetzung für die Aktivierung des Notch Rezeptor in *lgd* mutanten Zellen an.

### **2.1.2 Ultrastrukturelle Analyse zeigt vergrößerte MVBs in *lgd* Zellen**

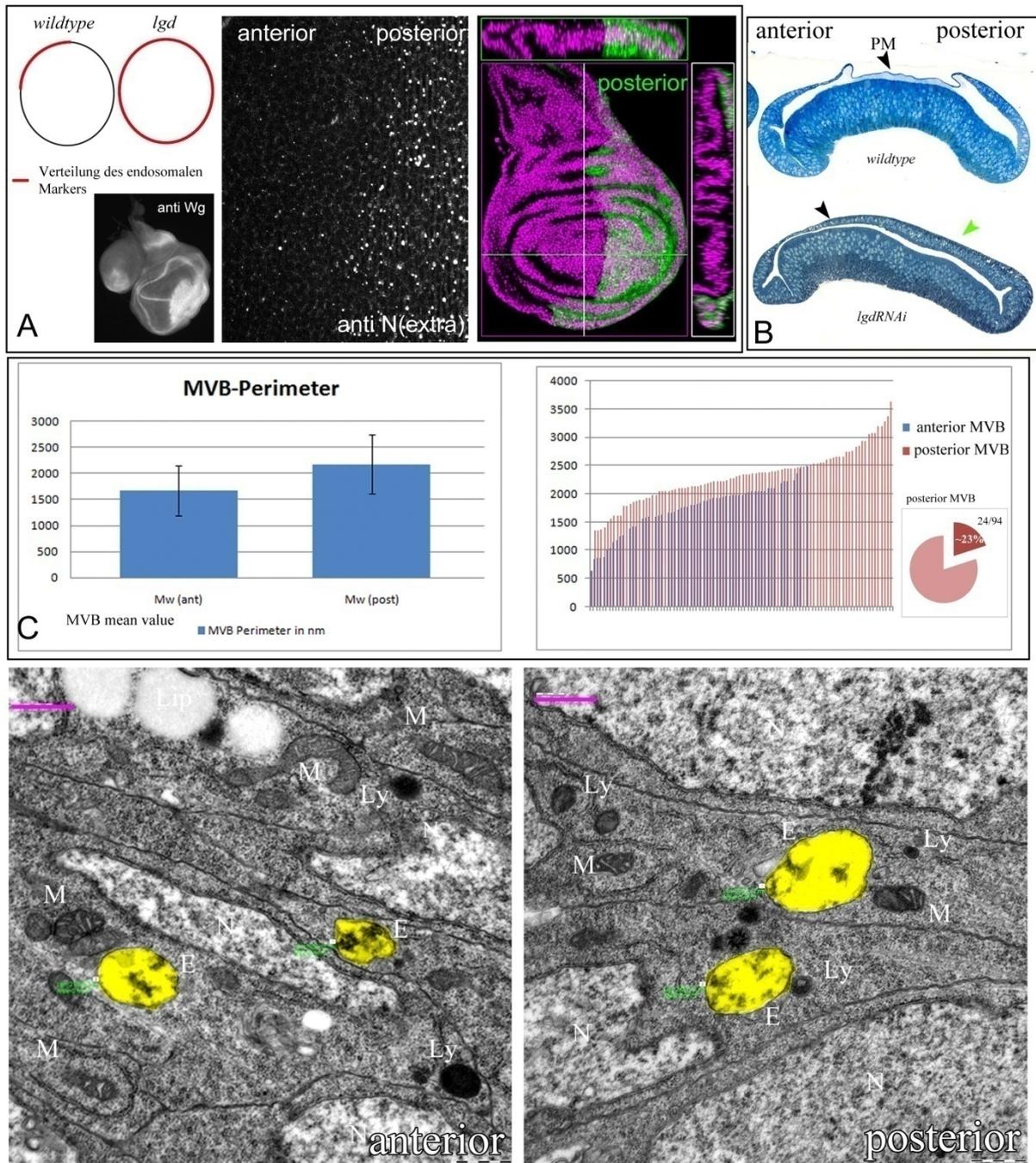
Bisherige Analysen mittels Fluoreszenzmikroskopie deuteten daraufhin, dass die Endosomen in *lgd* mutanten Zellen vergrößert sind. Dieser Eindruck könnte jedoch auch dadurch entstehen, dass lediglich eine unterschiedliche Verteilung der beobachteten endosomalen Marker auf der limitierenden Membran vorliegt (siehe Abb. 2-4 A). Daher wurde in Zusammenarbeit mit Ferdi Grawe der endosomale *lgd* Phänotyp auf ultrastruktureller Ebene mittels Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM) untersucht.

Hierzu wurden *lgd* mutante Bereiche und wildtypische Bereiche innerhalb derselben Imaginalscheibe verglichen, damit die gleichen Fixierungs- und Kontrastierungsbedingungen vorliegen. Um die eindeutige Identifizierung der *lgd* mutanten Bereiche zu ermöglichen, wurde ein RNAi Konstrukt, *UASlgd-RNAi*, mit Hilfe von *hhGAL4* exprimiert und dadurch nur in den Zellen der posterioren Hälfte die Funktion von Lgd unterdrückt. Ein starker *lgd* Funktionsverlust mittels RNAi wird durch die Koexpression von UAS-Dcr2 und die Heterozygose von *lgd<sup>d7</sup>* erreicht werden (Dietzl, Chen et al. 2007), (Yousefian 2007)). Die gewählten Bedingungen führen zu einer starken *lgd* Funktionsverlustsituation. Dies zeigt sich anhand der ektopischen Expression des Zielgens Wg und der Akkumulation des Notch

Rezeptors im posterioren Kompartiment (siehe Abb. 2-4 A). In Querschnitten der Flügelimaginalscheibe kann das posteriore Kompartiment anhand der Morphologie identifiziert werden (siehe Abb. 2-4 A, B). Die Identifikation des RNAi Bereiches wurde weiterhin durch den *lgd* Phänotyp erleichtert. Abhängig von der Schnittebene kann ein „Abflachen“ des Gewebes im posterioren Bereich beobachtet werden und darüber hinaus erscheinen die sonst flachen Zellen der Peripodialmembran (PM) ein eher kolumnares/cuboidales Schicksal anzunehmen (siehe Abb. 2-4 Pfeile in B).

Bei der Untersuchung der Zellen auf ultra-struktureller Ebene konnten MVBs gefunden werden, deren Größe auf der wildtypischen und der mutanten Seite der Schnitte bestimmt wurde. Der durchschnittliche Umfang der MVBs ist in den mutanten Zellen gegenüber dem Wildtyp vergrößert (siehe Abb. 2-4 C). Darüber hinaus zeigt sich eine Fraktion vergrößerter Endosomen im *lgd* RNAi Bereich, die nicht im wildtypischen Bereich gefunden wurde (siehe Abb. 2-4 C). Weiterhin wurden mehr MVBs im mutanten Bereich gefunden (siehe Abb. 2-4 C). Von der Vergrößerung abgesehen kann keine offensichtliche morphologische Veränderung der Endosomen festgestellt werden, da ILV gebildet werden.

In *lgd* mutanten Zellen treten Endosomen normaler Größe auf, aber etwa ein Viertel der Endosomen ist über das normale Maß hinaus vergrößert (23%, der Endosomen, siehe Abb. 2-4 C). Die Lysosomen in *lgd* Zellen erscheinen eher normal. Daher liegt keine offensichtliche Störung bei der Biogenese der Lysosomen in *lgd* Zellen vor. Die Tatsache, dass die Endosomen vergrößert sind, könnte auf eine verzögerte Fusion mit dem Lysosom zurückgeführt werden und zeigt, dass der endosomale Reifungsprozess in *lgd* Zellen gestört ist (siehe Abb. 2-4). Die Vergrößerung der späten Endosomen wäre zu erwarten, wenn eine Störung bei der Fusion mit dem Lysosom vorläge. Im Falle vermehrter homotypischer Fusion später Endosomen und einer verzögerten Fusion mit dem Lysosom würden die Endosomen größer. Dies legt nahe, dass eine solche Störung in *lgd* mutanten Zellen vorliegt. Die nicht offensichtlich veränderte Morphologie der Endosomen lässt auf die generelle Aktivität bzw. Funktion des ESCRT Komplexes in *lgd* mutanten Zellen rückschließen. Eine geringe Reduktion der ILV Bildung kann hierbei aber nicht ausgeschlossen werden.

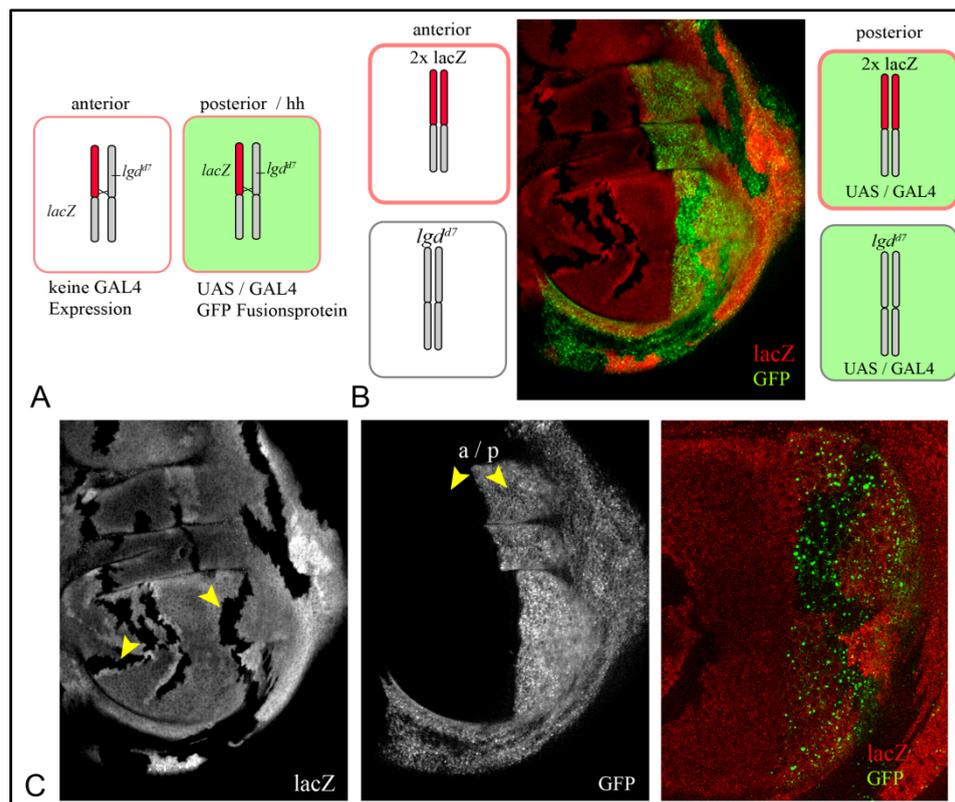


**Abb. 2-4 TEM Analyse der MVBs in wildtypischen und *Igd* mutanten Zellen.** In A: Schema der Verteilung des Markers an der limitierenden Membran des Endosoms. Die Fluoreszenzaufnahmen zeigen den durch RNAi vermittelten *Igd* Funktionsverlust auf der posterioren Seite. Es zeigt sich die Aktivierung des Signalwegs (anti Wg) sowie die Akkumulation des Notch Rezeptors (anti N(extra)). In B: optische Schnitte einer wildtypischen Flügelimaginalscheibe (Magenta: Hoechst-33258 Färbung, grün: hhGAL4 UAS-T48-GFP) und TuloidinBlau gefärbten Schnitte der für die TEM eingebetteten Scheiben. Der posteriore Bereich der Peripodialmembran (PM) wird in kolumnare Zellen transformiert (grüner Pfeil). In C: Im anterioren und posterioren Teil wurden die MVB ausgemessen. Der durchschnittliche Umfang und auch die Anzahl der MVBs sind im mutanten posterioren Bereich erhöht. Die TEM-Bilder zeigen repräsentative Beispiele der anterioren/wildtypischen und posterioren/mutanten (gelb hervorgehobenen) MVBs bei 20.000x Vergrößerung. Maßstabsbalken in magenta (500nm), E=Endosom/MVB, Ly=Lysosom, M=Mitochondrium, Lip=Lipidtröpfchen; N=Nukleus)

(Genotyp: *UASDcr2; Igd<sup>d7</sup> / +; hhGAL4 / UAS Igd-RNAi 1+3*, Expression bei 29°C).

### 2.1.3 Untersuchung des gestörten Proteintransports/-abbaus in *lgd* mutanten Zellen

In *lgd* mutanten Zellen sammelt sich der Notch Rezeptor und auch andere Signalmoleküle wie Smoothed, Patched und Wg in Endosomen an (Childress, Acar et al. 2006, Gallagher und Knoblich 2006, Jaekel und Klein 2006). Diesem Hinweis auf eine allgemeine Fehlfunktion beim degradativen endosomalen Proteintransport in *lgd* Zellen wurde genauer nachgegangen. Hierzu wurden *lgd* mutante Zellen und wildtypische Zellen innerhalb desselben Gewebes verglichen. Dies wurde durch eine Kombination aus GAL4 vermittelter Überexpression und klonaler Analyse mittels des FLP/FRT Systems erreicht (Brand und Perrimon 1993, Xu und Rubin 1993), siehe Abb. 2-5). In den Mosaikgeweben kann der Proteinabbau in *lgd<sup>d7</sup>* und wildtypischen posterioren Zellen im selben Gewebe verglichen werden und die Auswirkungen der Überexpression können im anterioren Kompartiment kontrolliert werden (siehe Abb. 2-5).



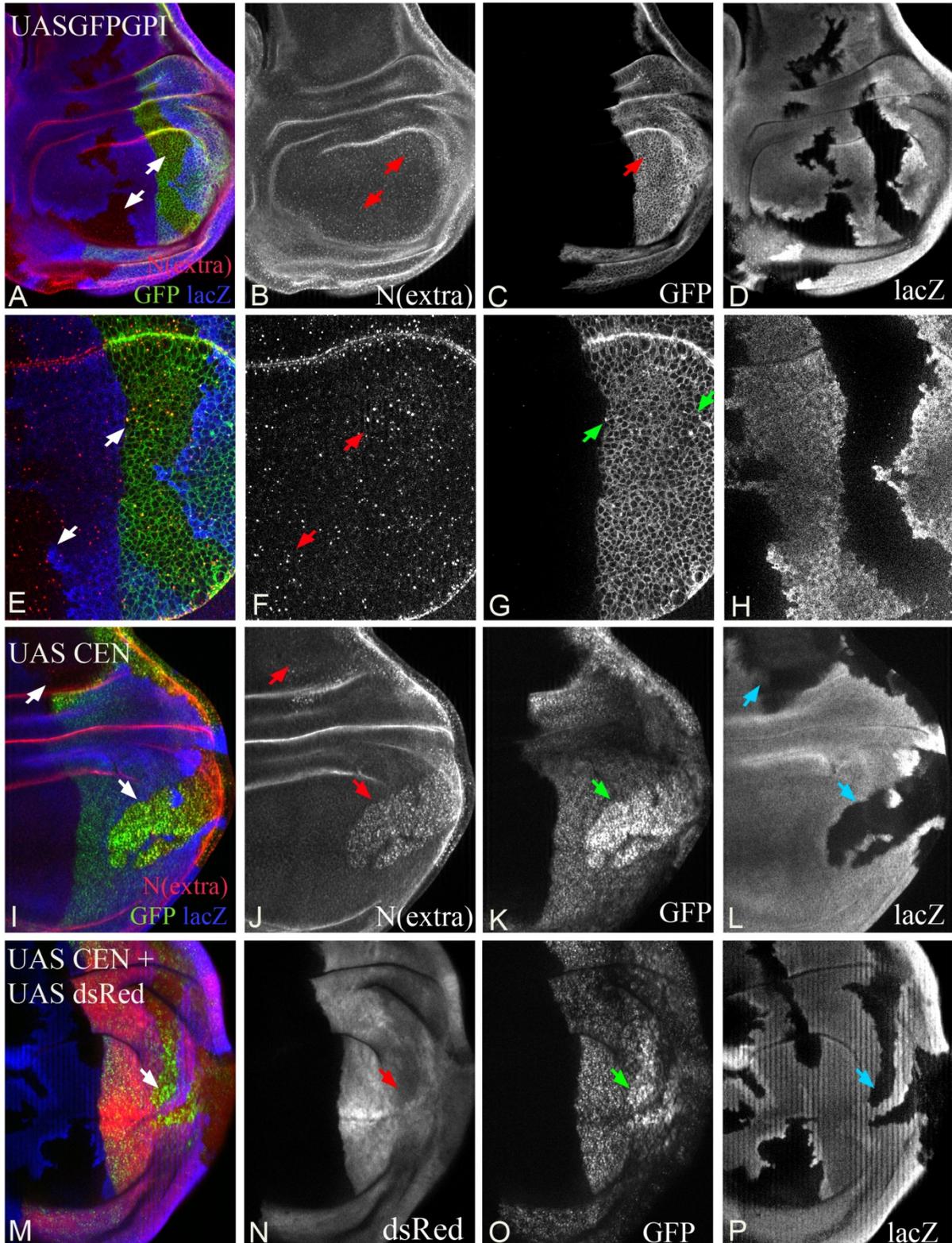
**Abb. 2-5: Analyse der Überexpression von Membranproteinen in *lgd* mutanten Zellen. (A)** In posterioren Zellen wird durch hhGAL4 die Expression der untersuchten Fusionsproteine kontrolliert. Anteriore Zellen dienen als Kontrolle. **(B)** Nach Induktion der Klone können die Auswirkungen der Transgenexpression im mutanten sowie im wildtypischen Gewebe untersucht werden und untereinander und mit den anterioren Kontrollklonen ohne Transgenexpression verglichen werden. **(C)** Mutante Klone werden durch den Verlust des Markers (hier in rot) gekennzeichnet. Die Expression von *hh* ist auf das posteriore Kompartiment beschränkt und Zellklone respektieren die A/P Grenze. (B,C wt Klone, Genotyp: *hsFlp; arm-lacZ FRT40A / + FRT40A; hhGAL4 UAST48GFP / +*)

### 2.1.3.1 Verzögerter Abbau von Proteinen der Plasmamembran in *lgd* mutanten Zellen

In ersten Kontrollexperimenten wurde GFP<sub>GPI</sub> (glycophosphatidyl-inositol verankerter GFP, (Greco, Hannus et al. 2001)) im posterioren Kompartiment exprimiert. GPI-Anker vermitteln die Insertion in die äußere Lipidschicht der Plasmamembran und die Überexpression von UAS-GFP<sub>GPI</sub> führt nicht zur Unterdrückung des *lgd* Phänotyps (Jaekel und Klein 2006). In den *lgd* mutanten Zellen, markiert durch die Abwesenheit der lacZ Färbung, zeigt sich die Akkumulation des Notch Rezeptors, jedoch zeigt die Verteilung von GFP<sub>GPI</sub> verglichen mit dem wildtypischen Gewebe keine Veränderung (siehe Abb. 2-6 A-H). In anterioren und posterioren *lgd* Klonen zeigen sich keine Unterschiede bezüglich der Akkumulation des Notch Rezeptors. Dies zeigt, dass die Überexpression von GFP<sub>GPI</sub> keine Auswirkung auf die endosomale Akkumulation des Notch Rezeptors hat.

Es wurde gezeigt, dass die Überexpression des „full length“ Notch Rezeptors sowohl die ektopische Aktivierung des Signalwegs als auch die endosomale Akkumulation in *lgd* Zellen verstärkt (Jaekel und Klein 2006). Zunächst wurde das Fusionsprotein UAS-CEN (CD8-EGFP-N<sub>intra</sub>) exprimiert. Es besteht aus der intrazellulären Domäne des Notch Rezeptors fusioniert mit eGFP, der CD8-Transmembrandomäne und einem Teil der extrazellulären Domäne des CD8 Rezeptors (CD8-Epitop) und führt bei Überexpression nicht zur Aktivierung des Signalwegs. Dieses Konstrukt gleicht dem endogenen Notch Rezeptor bezüglich intrazellulär (d.h. in NICD) vorhandenen Internalisierungssignale (Sanders, Munoz-Descalzo et al. 2009). In *lgd* mutanten Zellklonen akkumuliert CEN verglichen mit den posterioren wildtypischen Zellen. Außerdem zeigt sich die deutliche Auswirkung auf die Akkumulation des endogenen Notch Rezeptors. Dies kann anhand der Antikörperfärbungen gegen die extrazelluläre Domäne des Rezeptors gezeigt werden, die im Falle des ektopisch exprimierten CEN nicht vorhanden ist (siehe Abb. 2-6 I-L). Die *lgd<sup>d7</sup>* Klone im anterioren Kompartiment zeigen eine schwächere Akkumulation des endogenen Notch Rezeptors verglichen mit den *lgd<sup>d7</sup>* Klonen im posterioren Kompartiment (siehe Abb. 2-6 Pfeile in I-L).

Um einen Einfluss auf die Aktivität des *hh* Promotors, der die GAL4 Expression in den Experimenten kontrolliert auszuschließen wurde zusätzlich UASdsRED exprimiert. Es zeigt sich aber keine Veränderung, so dass eine gesteigerte Aktivität des *hh*-Promotors ausgeschlossen werden kann (siehe Abb. 2-6 M-P).

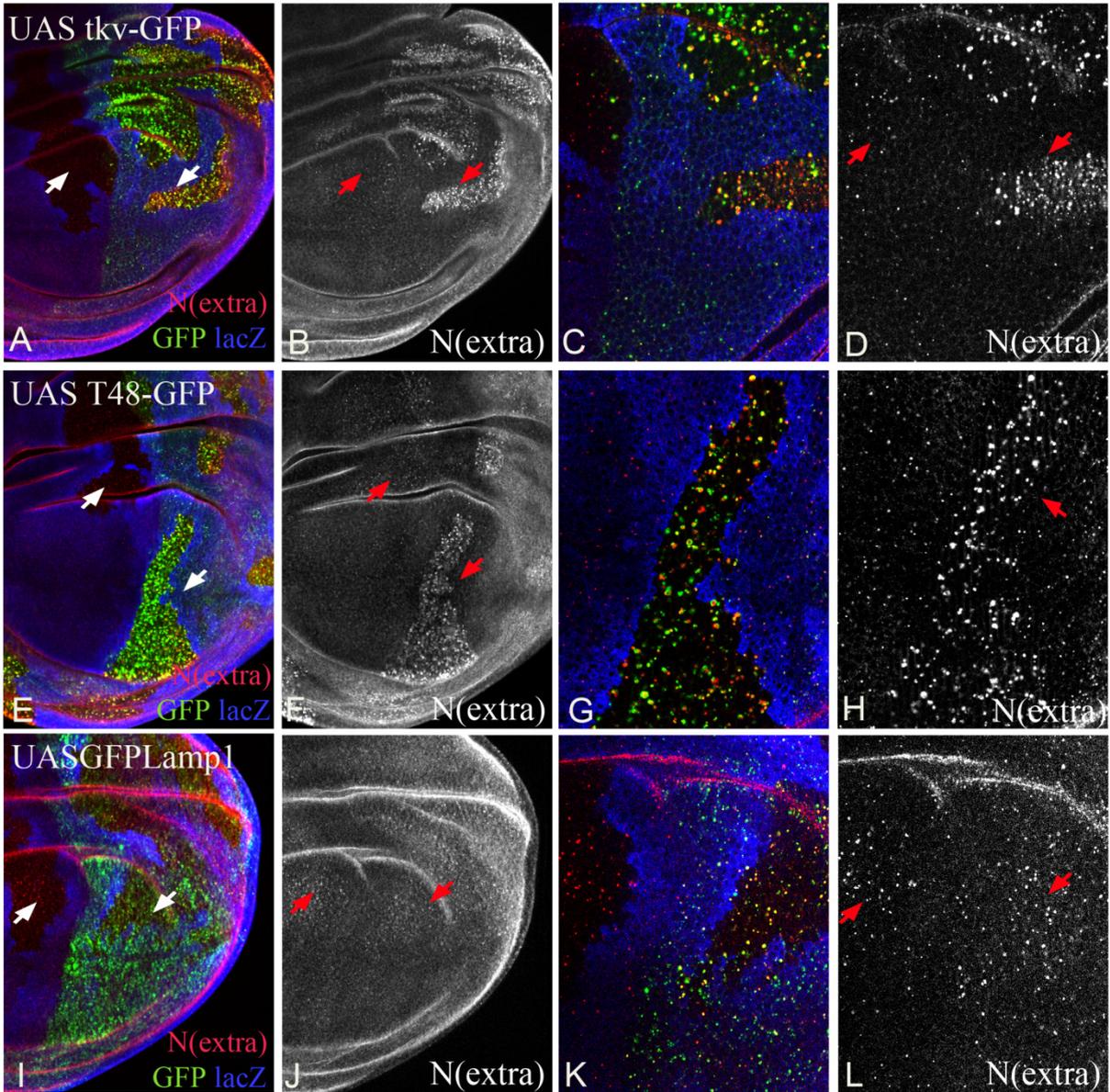


**Abb. 2-6 Überexpression von GFPGPI und CEN in Mosaik-Flügelimaginalscheiben.** (A-P) Die Überexpression der GFP-Fusionsproteine (in grün) mittels *hhGAL4* ist auf das posteriore Kompartiment beschränkt und die *Igd* mutanten Klone sind durch den Verlust von *lacZ* (blau) markiert. Es zeigt sich keine Akkumulation von GFPGPI in mutanten Bereichen und auch keine verstärkte Akkumulation des Notch Rezeptors (in rot) im Vergleich zu anterioren Klonen (A-H). Im Bereich der UAS-CEN Expression im posterioren Kompartiment zeigt sich in *Igd* mutanten Klonen die verstärkte Akkumulation des Fusionsproteins sowie des endogenen Notch Rezeptors. Sowohl das Fusionsprotein als auch der Notch Rezeptor akkumulieren in Vesikeln (I-L). Die Expression von UASdsRed wird in *Igd* mutanten Bereichen nicht verstärkt (M-P). (Genotyp: *hsFlp; arm-lacZ FRT40A / Igd<sup>d7</sup>FRT40A; hhGAL4(UASdsRed in M-P) / UAS GFPGPI oder UAS CEN*)

Danach wurde die Überexpression weiterer Signalmoleküle, Rezeptoren und Marker untersucht. Da CEN die selben Internalisierungssignale wie die intrazelluläre Domäne des Notch Rezeptors aufweist, wurden andere Transmembranproteine untersucht. Dies sollte zeigen, ob ein allgemeiner Defekt beim Abbau vorliegt. Zum Einen wurde mit Tkv-GFP, einer der TGF- $\beta$ /Dpp Rezeptoren überexprimiert (Nellen, Burke et al. 1996, Bokel, Schwabedissen et al. 2006). Auch hier zeigt sich sowohl die Akkumulation des überexprimierten Tkv-Rezeptors als auch des endogenen Notch Rezeptors in *lgd* mutanten Zellen (siehe Abb. 2-7 A-D). Bei Überexpression von T48-GFP, einem Transmembranprotein, das in Vesikeln und an der apikalen Plasmamembran lokalisiert ist (Kolsch, Seher et al. 2007), wurden die gleichen Beobachtungen gemacht (siehe Abb. 2-7 E-H).

Als weitere Kontrolle wurde der spät-endosomal/lysosomale Marker UASGFP-Lamp1 überexprimiert. GFP-Lamp1 ist ein Fusionsprotein aus der zytoplasmatischen lysosomalen Zielsequenz, der Transmembrandomäne aus humanem Lamp1 (Lysosomal associated Membran Protein 1) und GFP (Pulipparacharuvil, Akbar et al. 2005). Die Überexpression dieses Fusionsproteins verstärkt die Akkumulation des Notch Rezeptors in posterioren *lgd* Zellen nicht (siehe Abb. 2-7 I-L). GFP-Lamp1 markiert die Endosomen, die den Notch Rezeptor enthalten und bestätigt die Akkumulation des Rezeptors im endo-lysosomalen System. Es zeigt sich aber keine offensichtliche Akkumulation von GFP-Lamp1 gegenüber dem Wildtyp. Dies deutet daraufhin, dass nur die endozytierten Proteine der Plasmamembran betroffen sind, da Lamp Proteine hauptsächlich direkt vom Golgi zum späten Endosom gelangen (Rohrer, Schweizer et al. 1996).

Dies lässt darauf schließen, dass in *lgd* mutanten Zellen allgemein der Abbau von Transmembranproteinen der Plasmamembran gestört ist. Die erhöhte Anforderungen an das endosomale Transportsystem durch die Überexpression beeinträchtigt den Abbau des endogenen Notch Rezeptors in *lgd* mutanten Zellen. Dies zeigt, dass der endogene Notch Rezeptor und die überexprimierten Rezeptoren in Konkurrenz um einen zellulären Prozess stehen, der in den *lgd* Zellen nur begrenzt zur Verfügung steht.



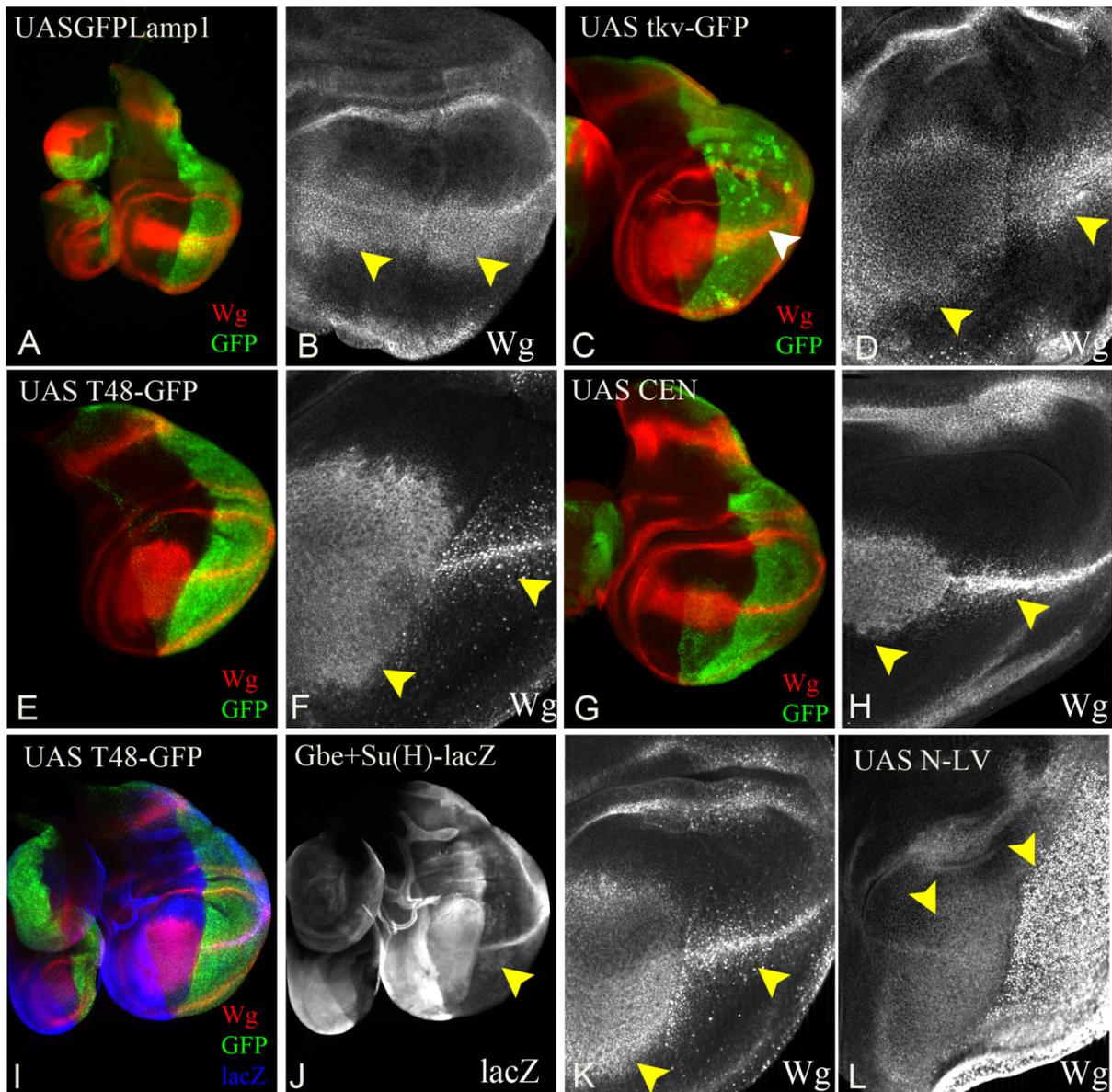
**Abb. 2-7 Überexpression von weiteren GFP-Fusionsproteinen in Mosaikscheiben. (A-P)** Die Überexpression des GFP Fusionsprotein (in grün) ist auf das posteriore Kompartiment beschränkt und die *Igd* mutanten Klone sind durch den Verlust von lacZ (in blau) markiert. Die Expression von hhGAL4 ist in *Igd* Klonen nicht beeinflusst (A-D, Genotyp: *hsFlp; arm-lacZ FRT40A / Igd<sup>d7</sup>FRT40A; hhGAL4 UASdsRed/UAS-CEN*). In *Igd* mutanten Klonen im posterioren Kompartiment akkumulieren Tkv-GFP (E-H) und T48-GFP (I-L) und führen wiederum zur verstärkten Akkumulation des Notch Rezeptors (in rot) in posterioren *Igd* Klonen. Die Expression des endosomalen Markers GFP-Lamp1 zeigt keinen Effekt in *Igd* Klonen. Die GFP-Lamp1 positiven Endosomen koloalisieren mit dem Notch Rezeptor, aber die Expression des Markers führt nicht zu einer verstärkten Akkumulation des Rezeptors. (Genotyp: *hsFlp; arm-lacZ FRT40A / Igd<sup>d7</sup>FRT40A; hhGAL4 / UAS tkv-GFP ,UAS T48-GFP oder UAS GFPLamp1*)

### **2.1.3.2 Verzögerter Abbau von Notch unterdrückt die ektopische Aktivierung in *lgd* Zellen**

Die Auswirkungen der Überexpression der Proteine auf die ektopische Aktivierung des Notch-Signalwegs wurde in *lgd<sup>d7</sup>* mutanten Imaginalscheiben untersucht. Die Wg Expression in *lgd* mutanten Imaginalscheiben zeigt eine reduzierte Ausbreitung an der D/V Grenze im posterioren Expressionsbereich (siehe Abb. 2-8 C-H). Die reduzierte Ausbreitung ist im Falle von Tkv-GFP weniger deutlich als bei CEN und T48GFP. Die verstärkte Akkumulation von Wg in Endosomen ist hier noch abseits der D/V Grenze zu beobachten (siehe Abb. 2-8 H,K). Die Auswirkung der Akkumulation von tkv-GFP in *lgd* Zellen auf den dpp-Signalweg wurde nicht untersucht. Die Überexpression von UAS-CEN, UAStkv-GFP oder UAST48-GFP führt nicht nur zur verstärkten Akkumulation des Notch Rezeptors sondern auch zu einer Unterdrückung der ektopischen Aktivierung des Notch-Signalwegs.

Für T-48GFP wurde auch die Expression von GbeSu(H)-lacZ untersucht. Es zeigt sich die Unterdrückung der starken ektopischen Notch-Aktivierung (siehe Abb. 2-8 I-K). Die starke Expression ist im posterioren Kompartiment auf die D/V Grenze beschränkt ist und der Notchreporter zeigt nur eine leichte ektopische Aktivierung, die verglichen mit der anterioren Seite deutlich schwächer ist (siehe Abb. 2-8 J Pfeil). Die Expression von Wg ist nur auf der anterioren Seite verbreitert, auf der posterioren Seite zeigen sich aber wiederum die Akkumulation von Wg abseits der D/V Grenze (siehe Abb. 2-8 K). Dies ist vermutlich auf die auftreten Defekte im Proteinabbau zurückzuführen. Die Überexpression des vollständigen Rezeptors führt zu einer deutlichen Verstärkung der Aktivität des Notch-Signalwegs in *lgd* Zellen ((Jaekel und Klein 2006), siehe Abb. 2-8 L)

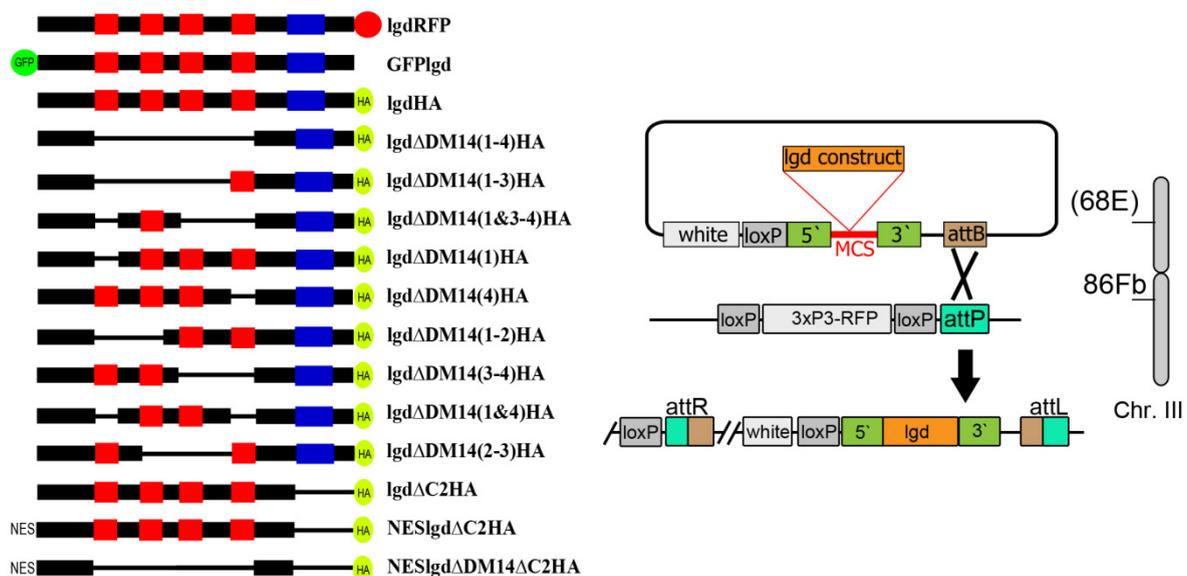
Insgesamt zeigen die Untersuchungen, dass in *lgd* mutanten Zellen der Abbau von Proteinen der Plasmamembran gestört ist, da überexprimierte Proteine in den mutanten Zellen stärker akkumulieren. Darüber hinaus führt die Überexpression zur Akkumulation des endogenen Notch Rezeptors (und auch Wg). Die verstärkte Akkumulation führt zur Unterdrückung der ektopischen Aktivierung. In den *lgd* Zellen ist ein Prozess mit begrenzter Kapazität für die Aktivierung des Rezeptors verantwortlich, der beim Abbau des Rezeptors involviert zu sein scheint.



**Abb. 2-8 Auswirkungen der Überexpression der GFP-Fusionsprotein auf den Notch-Signalweg in *Igd<sup>d7</sup>* mutanten Imaginalscheiben.** Die Überexpression von GFPLamp1 (in grün) unterdrückt nicht die ektopische Expression von Wg im posterioren Kompartiment (A,B). Bei der Überexpression von UASTkv-GFP zeigt sich noch eine Ausbreitung von Wg an der D/V Grenze, die aber verglichen mit dem anterioren Kompartiment reduziert ist (C,D). Die Unterdrückung der ektopischen Expression von Wg durch CEN oder T48GFP ist hingegen deutlicher (E,F bzw. G,H). Die Überexpression von T48-GFP zeigt eine deutliche Unterdrückung der ektopischen Aktivierung des Notch-Signalwegs anhand der Expression von Wg (K) und Gbe+Su(H)-lacZ (J,L). Im anterioren Kompartiment ist die Expression des Reporters *lacZ* ubiquitär, im posterioren Kompartiment ist die ektopische Expression deutlich reduziert. (Genotyp A-H: *w; Igd<sup>d7</sup> FRT40A / Igd<sup>d7</sup> FRT40A; hhGAL4 / UAS GFP-Protein*, oder UAS N-LV Genotyp I-L: *w; Igd<sup>d7</sup> FRT40A / Igd<sup>d7</sup> FRT40A; hhGAL4 UAST48GFP / Gbe+Su(H)-lacZ*)

## 2.2 Struktur-Funktionsanalyse von Lgd

Eine vorherige Struktur-Funktionsanalyse mit Hilfe des UAS/GAL4 Systems führte teilweise zu widersprüchlichen Ergebnissen (Troost 2007). Dies war auf die Auswirkungen der Überexpression zurückzuführen. Daher wurde eine neue Strategie entwickelt, die es zum Einen erlaubt die Lgd-Konstrukte auf endogenem Niveau zu exprimieren, und zum Anderen die Konstrukte am selben Insertionsort im Genom zu analysieren (siehe Abb. 2-9). Ein Rettungskonstrukt, das die gesamte Transkriptionseinheit von *lgd* sowie ca. 550 bp genomischer Region als regulatorische Bereiche enthielt, konnte den *lgd* mutanten Phänotyp vollständig retten (Childress, Acar et al. 2006). Daher wurde angenommen, dass diese Bereiche (im Folgenden *lgdP*) für die Expressionskontrolle auf einem endogenen Niveau ausreichen würden. Für die Transgenese wurde das attB/attP System verwendet, welches die gerichtete Integration der Transgene ermöglicht. Dadurch sollten die lokalen Positionseffekte neutralisiert werden und eine identische Expressionsstärke der Konstrukte erreicht werden (Bischof, Maeda et al. 2007).



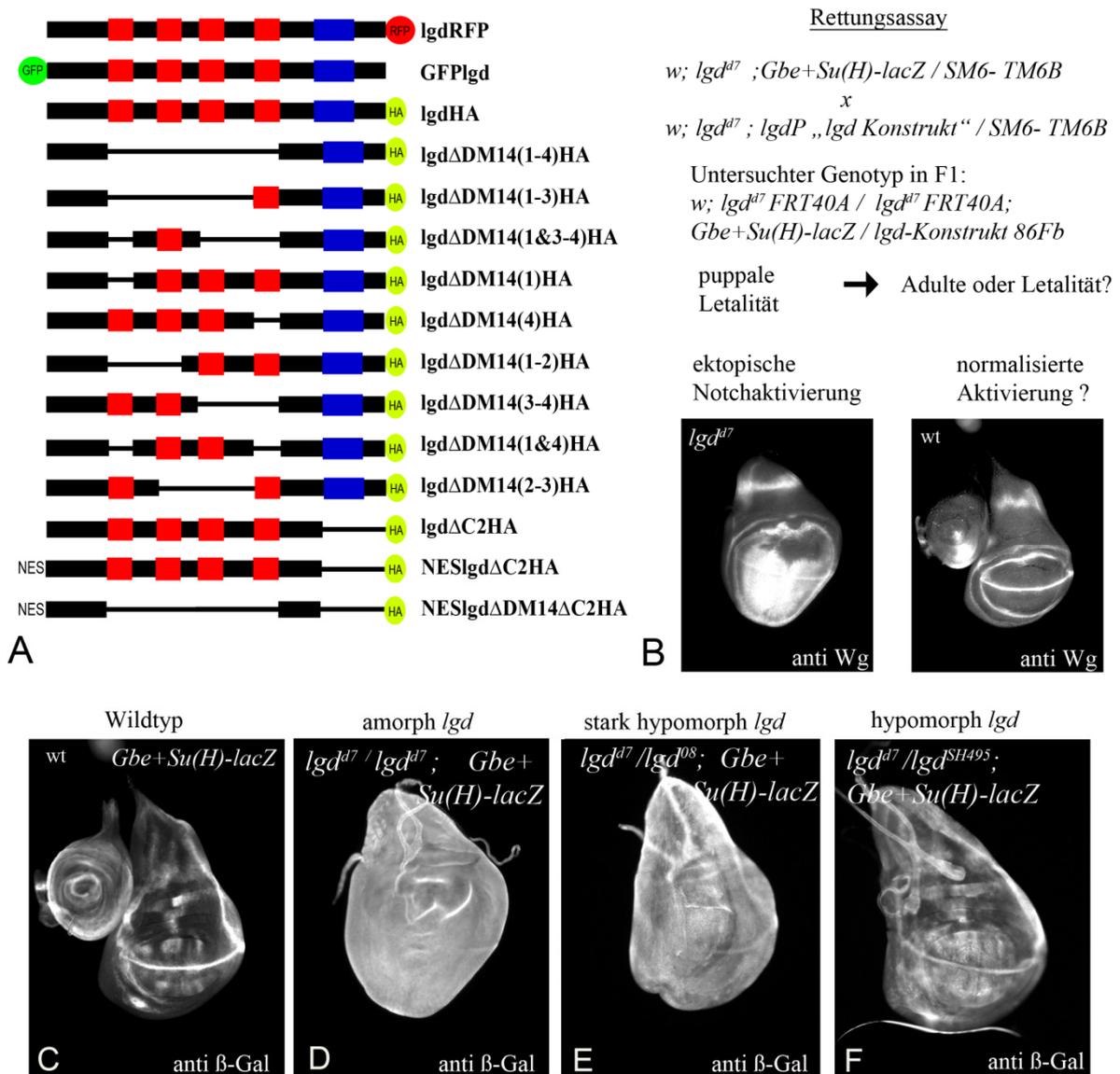
**Abb. 2-9 Übersicht über die Konstrukte und schematische Darstellung der Insertion in „landing sites“.** Links: Schematische Darstellung der untersuchten Lgd-Konstrukte. Rechts: Schematische Darstellung des Rettungsvektors und der gerichteten Integration in die „landing sites“ auf dem Chromosom III attP86Fb (3R rechter Arm) und attP68E (3L linker Arm). 5' bzw. 3' bezeichnen die verwendeten genomischen DNA Sequenzen (548 bp bzw. 553 bp), welche die CG4713/*lgd* Transkriptionseinheit flankieren (verändert nach Bischof et al. 2007).

### 2.2.1 Funktionalität der Lgd-Konstrukte

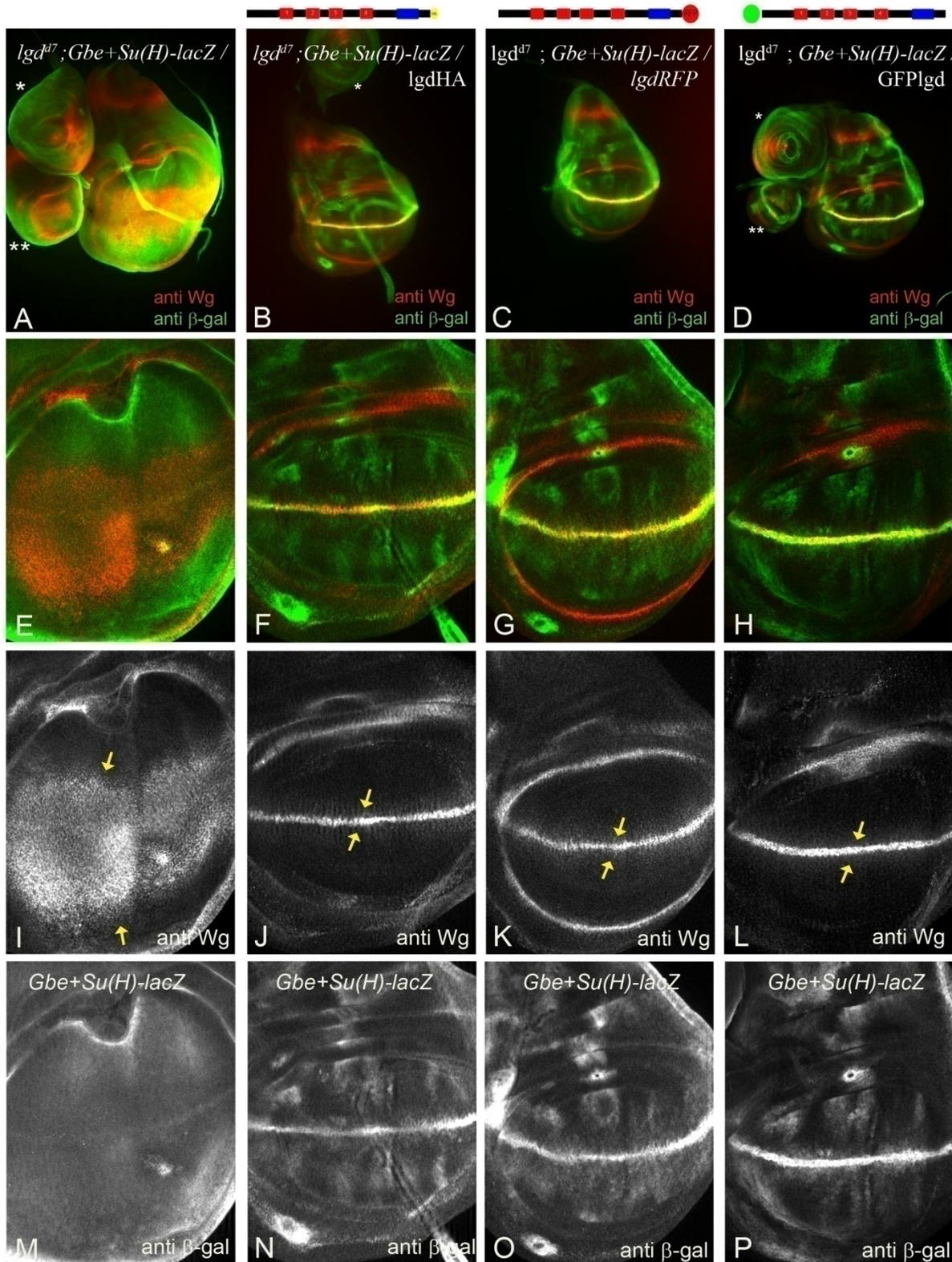
Um die Funktionalität der endogen exprimierten Lgd Transgene zu überprüfen, wurden Rettungsexperimente mit dem amorphen Allel *Igd<sup>d7</sup>* durchgeführt. Es wurde die ektoische Aktivierung des Notch-Signalwegs in Flügelimaginalscheiben des dritten Larvenstadiums anhand der Expression der Zielgene überprüft. Als Zielgene wurden Wg und die Aktivität des Reportergens *Gbe+Su(H)-lacZ* untersucht. Das Reportergenkonstrukt enthält vier Bindestellen für Su(H). Su(H) unterdrückt die ubiquitäre Expression durch das *grainy head binding element* (Gbe) solange NICD nicht an Su(H) bindet (Furriols und Bray 2001). Die starke Aktivität an der D/V Grenze überlappt mit der Expression von Wg, darüber hinaus zeigt der Reporter die gesamte Aktivität des Signalwegs auch abseits der D/V Grenze (Furriols und Bray 2001). Bei der abgeschwächten ektoischen Aktivierung in einer *Igd* hypomorphen Situation (*Igd<sup>SH495</sup>/Igd<sup>d7</sup>*, *Igd-hypomorph/Igd-amorph*) zeigt sich kaum die ektoische Expression von Wg, aber die ektoische Aktivierung von *Gbe+Su(H)* (siehe Abb. 2-10 C-F, (Jaekel und Klein 2006)). Die Expression von Wg benötigt die starke Aktivität des Notch-Signalwegs (Neumann und Cohen 1996, deCelis und Bray 1997, Micchelli, Rulifson et al. 1997, Djiane, Krejci et al. 2013).

Eine *IgdP-Igd* Transgenkopie (HA, RFP oder GFP markiert) führt zu einer vollständigen Rettung des *Igd* mutanten Phänotyps. Die Flügelimaginalscheiben weisen eine wildtypische Morphologie auf und die Überproliferation des Gewebes sowie die ektoische Aktivierung des Notch-Signalwegs wird verhindert (Abb. 2-11 B-D). Wg, als natürliches Zielgen des Notch-Signalwegs, ist an der D/V Grenze auf einen schmalen Streifen beschränkt und auch die Expression von *Gbe+Su(H)* zeigt sich wie im Wildtyp (siehe Abb. 2-11). Es konnten *Igd<sup>d7</sup>* homozygote Stämme mit den Transgenen etablieren werden, d.h. dass die adulten Tiere lebensfähig und fertil sind (Genotyp: *w; Igd<sup>d7</sup> FRT40A; IgdP Igd-HA (oder Igd-RFP, GFP-Igd)*). Bei den geretteten Fliegen treten lediglich einige Borstenduplikationen und ein leichter rauher Augenphänotyp auf. In Transheterozygose zu anderen mutanten *Igd* Allelen deren letale Auswirkung vollständig gerettet wurden, z.B. einem weiteren Nullallel *Igd<sup>rsk73</sup>* (Jaekel und Klein 2006), *Igd<sup>SH495</sup>* oder *Igd<sup>d7</sup>* (ohne FRT40A) tritt dies nicht auf (s. Anhang Abb. 7-3).

Die Rettung mit den vollständigen Lgd Varianten zeigt die Funktionalität des Assays und lieferte die Basis für die weitere Analyse der Deletionskonstrukte.



**Abbildung 2-10: Test der Funktionalität der Lgd-Konstrukte.** (A) Schematische Darstellung der untersuchten Lgd-Deletionskonstrukte (DM14 Wiederholungen in rot, C2 Domäne in blau, HA Epitop in gelb, NES=Nukleares Export Signal). (B) Rettungsassay. Die Transgene sollten im *lgd<sup>d7</sup>* homozygot Mutanten bezüglich ihrer Rettungseigenschaften untersucht werden. Neben der vollständigen Rettung der Letalität wurde die ektopische Aktivierung des Notch-Signalwegs in Flügelimaginalscheiben untersucht. Fluoreszenzaufnahmen in B zeigen die ektopische Aktivierung in einer *lgd<sup>d7</sup>* Flügelscheibe anhand der Ausbreitung von Wg an der D/V Grenze (links) im Vergleich zur wildtypischen Expression (rechts). (C-F) Expression des Reporters *Gbe+Su(H)-lacZ* im Wildtyp (C) und bei Kombinationen von verschiedenen *lgd* Allelen (D-F). Das Nullallel *lgd<sup>d7</sup>* in Homozygose zeigt die ubiquitäre Expression des Reporters (D). Starke Hypomorphe *lgd<sup>d7</sup>/lgd<sup>08</sup>* zeigen nur eine leichte Abschwächung (E). Beim (schwachen) hypomorphen *lgd* Phänotyp ist die ektopische Aktivierung zu schwach für die Expression von Wg. Die *Gbe+Su(H)* Expression ist nicht uniform wie bei Amorphen oder starken Hypomorphen, aber verglichen mit dem Wildtyp zeigt sich noch die ektopische Expression, insbesondere im Flügel (Vgl. C-F).



**Abbildung 2-11: Rettung des *lgd<sup>d7</sup>* Phänotyps durch die Expression von markierten Lgd-Konstrukten.** (A-H): Antikörperfärbungen an Flügelimaginalscheiben von *lgd<sup>d7</sup>* homozygoten Larven gegen das Protein Wingless (in rot) und gegen  $\beta$ -Galaktosidase (in grün) zur Detektion der Aktivität des Notch-Signalwegs. Die Vergrößerungen E-H zeigen die Notch Aktivität in der Flügeltasche. Zum Vergleich dient in der ersten Spalte eine *lgd<sup>d7</sup>* mutante Scheibe ohne Rettungskonstrukt. Die markierten „full length“ Proteine, schematisch skizziert oberhalb der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen, werden unter endogener Kontrolle exprimiert und führen zu einer Wiederherstellung des wildtypischen Expressionsmuster von Gbe+Su(H)-lacZ und Wg (vgl. Abb. 2-9). \* bzw. \*\*

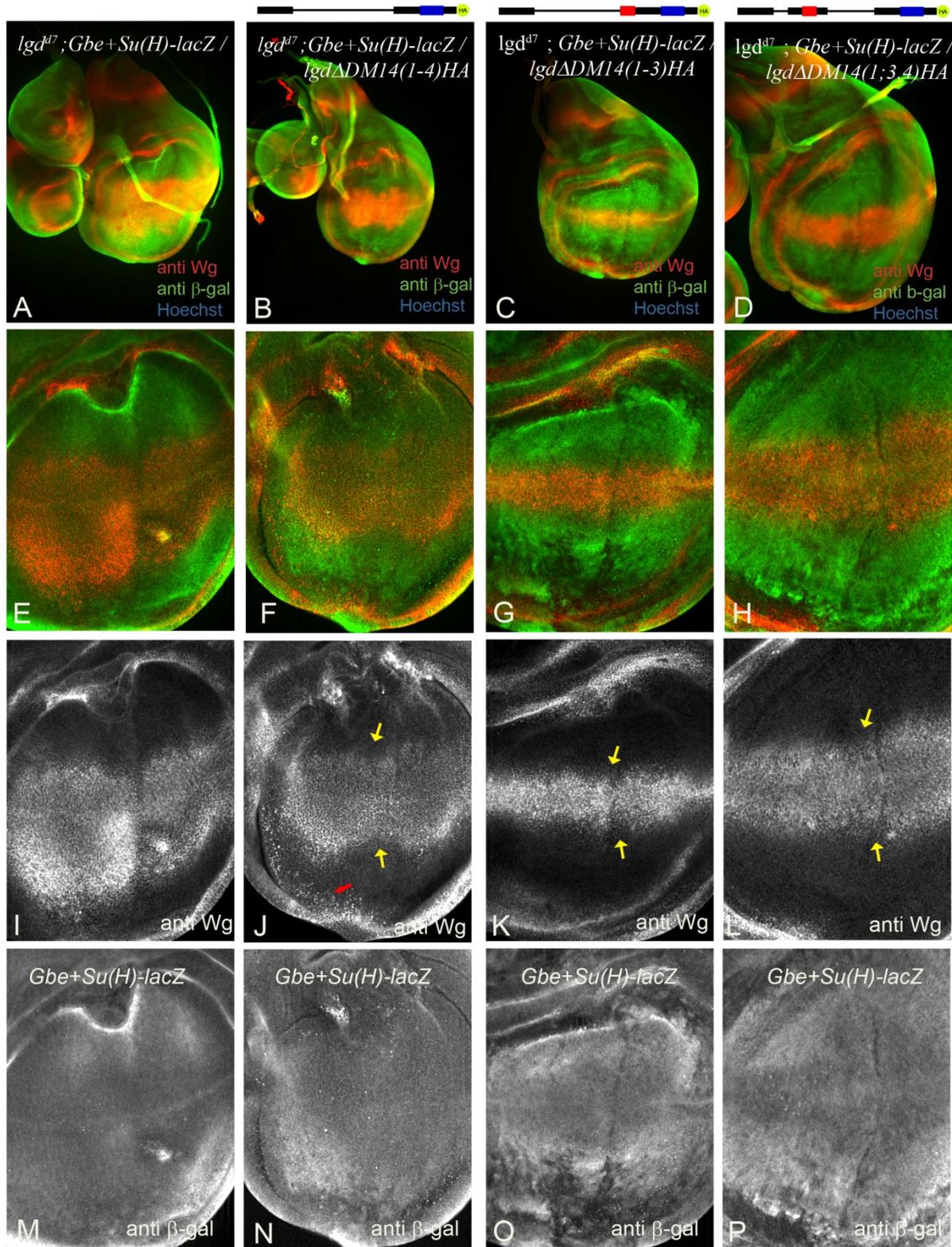
deutet auf Bein- bzw. Halterenimaginalscheiben. Genotyp: *w; Igd<sup>d7</sup>FRT40A / Igd<sup>d7</sup>FRT40A; Gbe+Su(H)-lacZ / att86Fb IgdP Igd*-Konstrukt.

### 2.2.2 Funktion der DM14 Domänen

Als nächstes wurden die Deletionskonstrukte untersucht, welche die uncharakterisierten DM14 Domänen betrafen. Es zeigt sich, dass Deletionskonstrukte, bei denen drei DM14 oder alle DM14 Domänen deletiert wurden, den *Igd<sup>d7</sup>* Phänotyp nicht retten können, da *Wg* und *Gbe+Su(H)* noch ektopisch exprimiert sind (siehe Abb. 2-12-L, N-P). Die Ausbreitung der Expressionsdomäne von *Wg* an der D/V Grenze erscheint bei einer verbleibenden DM14 Domäne etwas reduzierter, als dies bei *Igd<sup>d7</sup>* beobachtet wird (siehe Abb. 2-12 Pfeile). Jedoch ist das Ausmaß der *Wg*-Ausbreitung in *Igd* mutanten Scheiben variabel ((Klein 2003), sowie eigene Beobachtungen). Darüber hinaus erschien die Akkumulation von *Wg* durch die Anwesenheit des Konstrukts leicht verstärkt (Abb. 2-12, roter Pfeil in Abb. 2-12 J). Verstärkte Proteinakkumulation u.a. von *Wg* und dem Notch Rezeptor tritt bekannterweise in *Igd<sup>d7</sup>* mutanten Zellen auf (Jaekel und Klein 2006), jedoch scheint durch *LgdΔDM14-HA* dieser Effekt verstärkt zu werden.

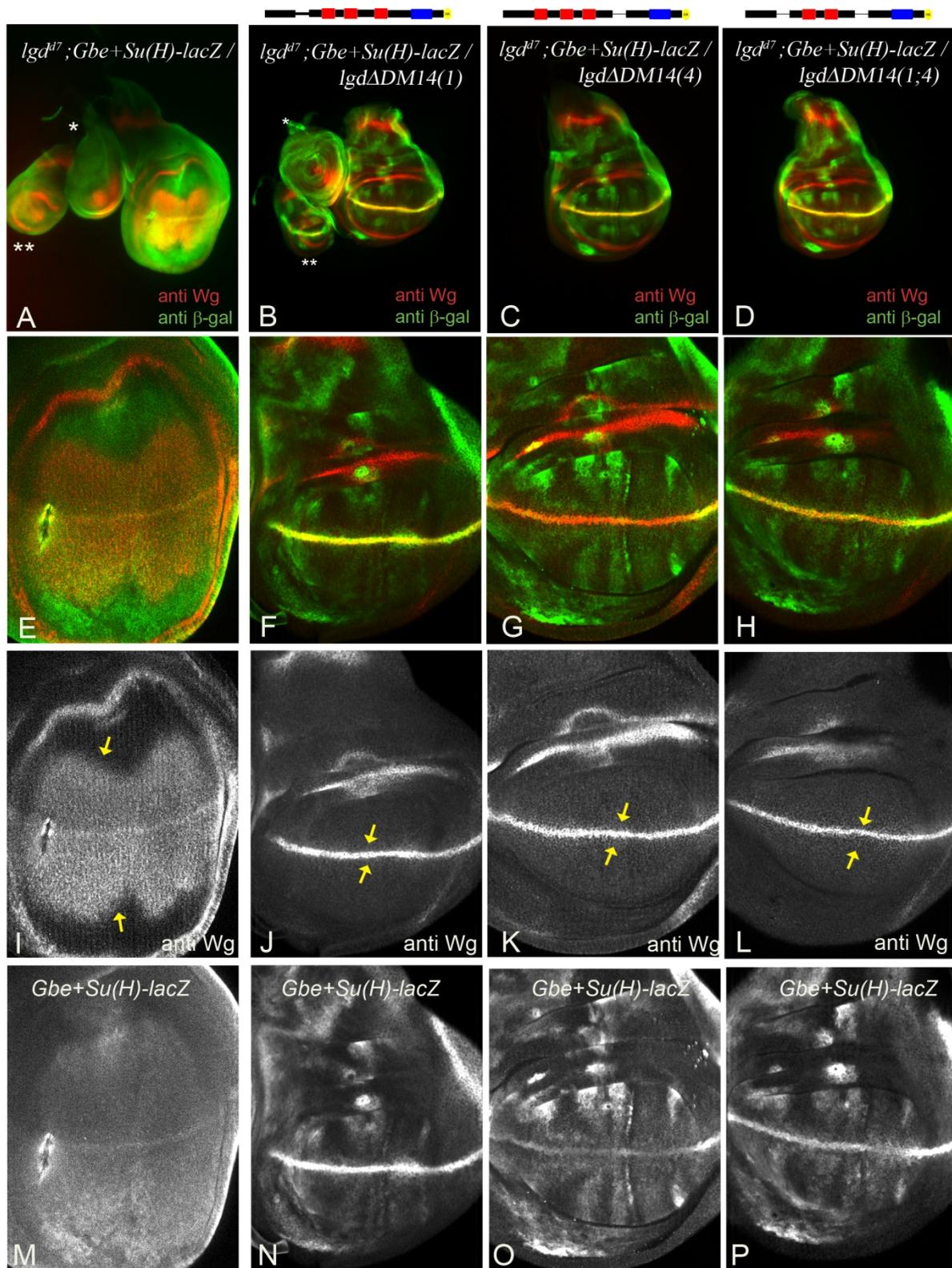
Bei zwei Kopien der DM14 Konstrukte mit weniger als zwei DM14 Domäne im Genom (Transgene in Homozygose) wurde im *Igd<sup>d7</sup>* Hintergrund (Genotyp: *w; Igd<sup>d7</sup>FRT40A / Igd<sup>d7</sup>FRT40A; IgdPIgdΔDM14-HA 86Fb/IgdPIgdΔDM14-HA 86Fb*) eine verfrühte Letalität beobachtet, die aber nicht im wildtypischen oder heterozygoten Hintergrund (z.B. *w; Igd<sup>d7</sup>FRT40A/CyO; IgdP IgdΔDM14/ IgdP IgdΔDM14*) auftrat. Die *Igd<sup>d7</sup>* Larven erreichen nur sehr selten das späte dritte Larvenstadium bei doppelter Menge dieser Transgene (siehe Tabelle 2-1 am Ende des Abschnitts).

Um zu testen, ob alle DM14 Wiederholungen benötigt werden wurden die DM14 Domänen weiter eingegrenzt. Die Deletionskonstrukte mit einer fehlenden Domäne, *LgdΔDM14(1)* bzw. *LgdΔDM14(4)* retten den *Igd<sup>d7</sup>* Phänotyp vollständig, ebenso deren Kombination *LgdDM14(1;4)*, Dies verdeutlichen die wildtypischen Expressionsmuster von *Wingless* und *Gbe+Su(H)-lacZ* (siehe Abb. 2-13). Auch die anderen Deletionskonstrukte mit zwei verbleibenden Domänen, *ΔDM14(1-2)*, *ΔDM14(3-4)* und *ΔDM14(2-3)* retten den *Igd<sup>d7</sup>* Phänotyp vollständig (siehe Abb. 2-14).



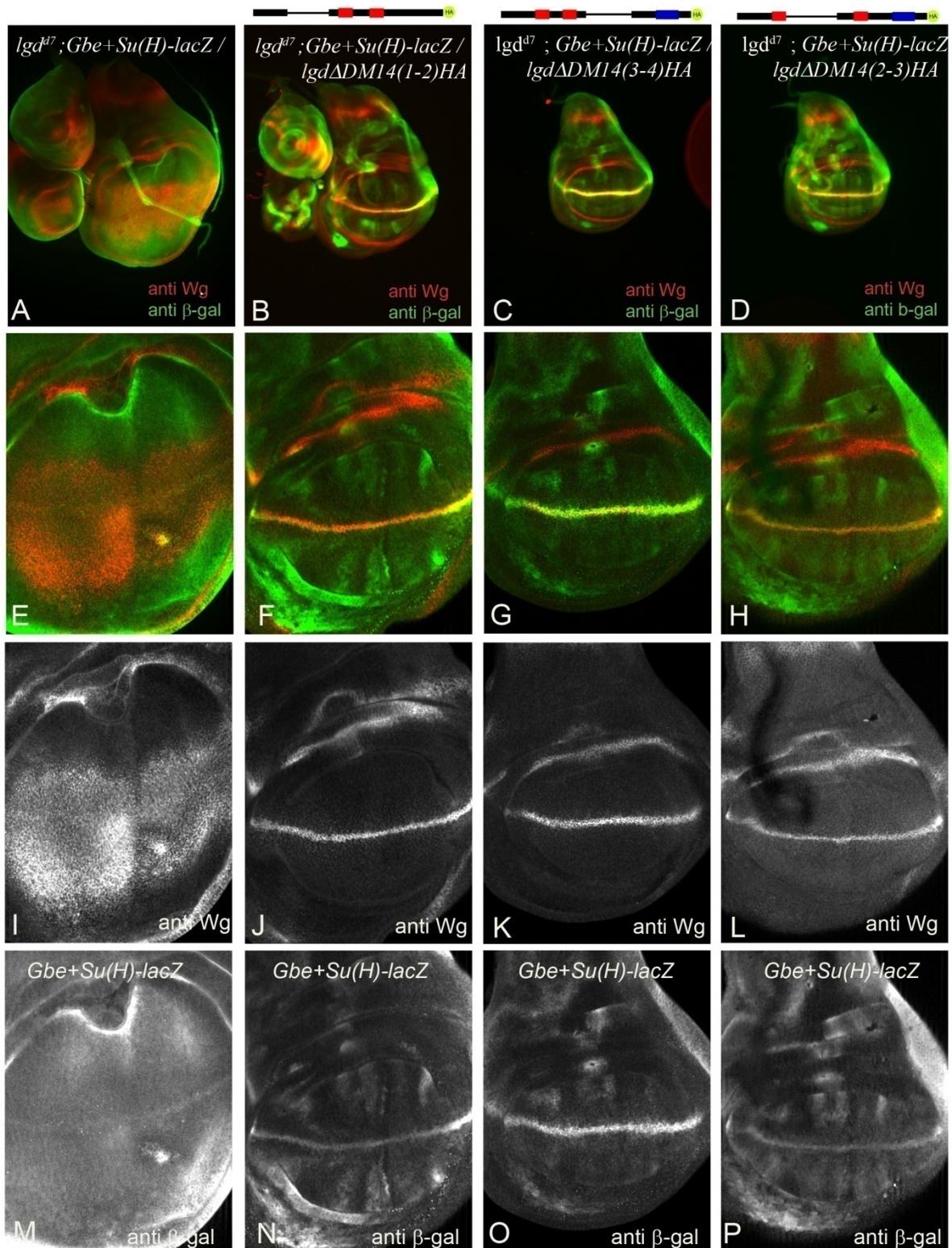
**Abb. 2-12  $\Delta$ DM14-Deletionskonstrukte mit weniger als zwei DM14 Domänen können den  $Igd^{d7}$  Phänotyp nicht retten:** Abbildung analog zu Abb. 2-10. Erste Spalte  $Igd$  mutanter Phänotyp. In der zweiten Spalte die Deletion des gesamten Bereiches, der die DM14 Domänen beinhaltet.  $Igd\Delta DM14$  kann den  $Igd$  Phänotyp nicht retten. Die  $Wg$  Expression an der D/V Grenze ist verbreitert (J, gelbe Pfeile) und der Notch Aktivitätsmarker wird ubiquitär exprimiert (N).  $Wg$  scheint in endosomalen Strukturen zu akkumulieren (roter Pfeil in J). Die dritte und vierte Spalte zeigen die Konstrukte  $Igd\Delta DM14(1-3)$  und  $Igd\Delta DM14(1;3-4)$  mit je einer verbleibenden DM14 Wiederholungssequenz. Die Verbreiterung von  $Wg$  und auch die, in den  $Igd^{d7}$  mutanten Scheiben auftretenden morphologischen Veränderungen scheinen leicht unterdrückt zu werden (K, L). Die ubiquitäre

Expression des Reporters ist kaum verändert (O, P). Genotyp: *w; Igd<sup>d7</sup>FRT40A / Igd<sup>d7</sup>FRT40A; Gbe+Su(H)-lacZ / att86Fb Igd* Igd-Konstrukt.



**Abbildung 2-13**  $\Delta$ DM14-Deletionskonstrukte mit mindestens zwei DM14 Domänen retten den *Igd<sup>d7</sup>* Phänotyp (analog zu Abb. 2-10) Die Konstrukte mit der Deletion der ersten oder der vierten DM14 Domäne oder mit der kombinierten Deletion beider Domänen retten den *Igd<sup>d7</sup>* Phänotyp. Die Expression des Zielgene *Wg* (J-L,

verdeutlicht durch Pfeile) und Gbe+Su(H) (N-P) sind normalisiert . \* und \*\* kennzeichnen die Bein- bzw. Halterenimaginalscheiben.



**Abbildung 2-14:  $\Delta$ DM14-Deletionskonstrukte mit mindestens zwei DM14 Domänen retten den  $Igd^{d7}$  Phänotyp** (Abb. analog zu Abb. 2-10) Die Konstrukte, denen zwei DM14 Motive fehlen, können den  $Igd^{d7}$  Phänotyp retten (B-D, F-H). Wg ist wie im Wildtyp auf einen schmalen Streifen an der D/V Grenze begrenzt (J-L) und die Gbe+Su(H) Expression wird normalisiert (N-P). Genotyp:  $w; Igd^{d7}FRT40A / Igd^{d7}FRT40A; Gbe+Su(H)-lacZ / att86Fb IgdP$  Igd-Konstrukt.

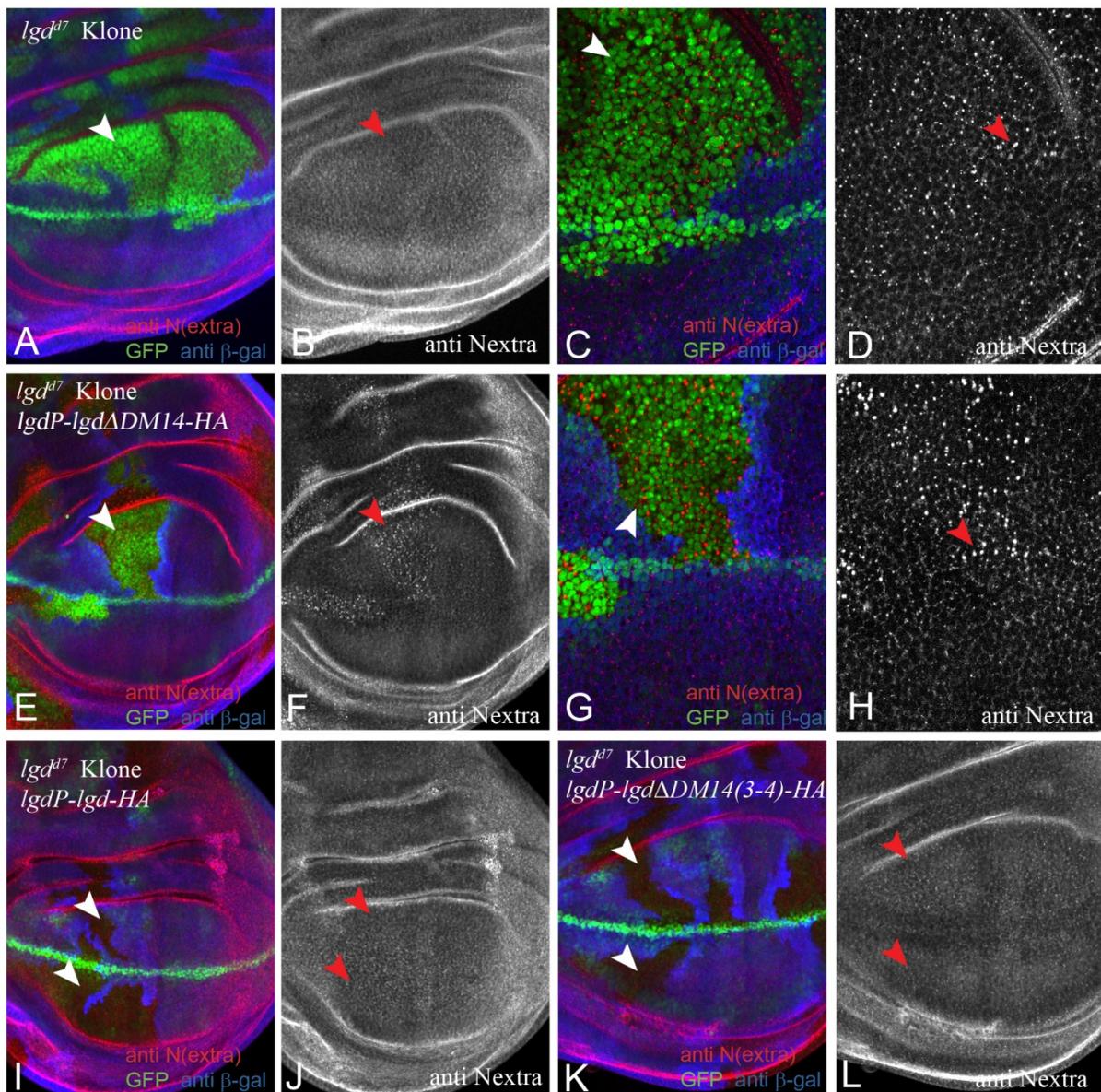
Die Analyse der Konstrukte zeigt, dass die DM14 Domänen benötigt werden, aber zwei DM14 Domänen für die *lgd* Funktion ausreichen. Die anscheinende Beliebigkeit bei der Kombination der DM14 Motive lässt darauf schließen, dass die DM14 Domänen redundant wirken.

### **2.2.1. Modifikation des endosomalen *lgd* Phänotyps durch *lgd*ΔDM14-HA**

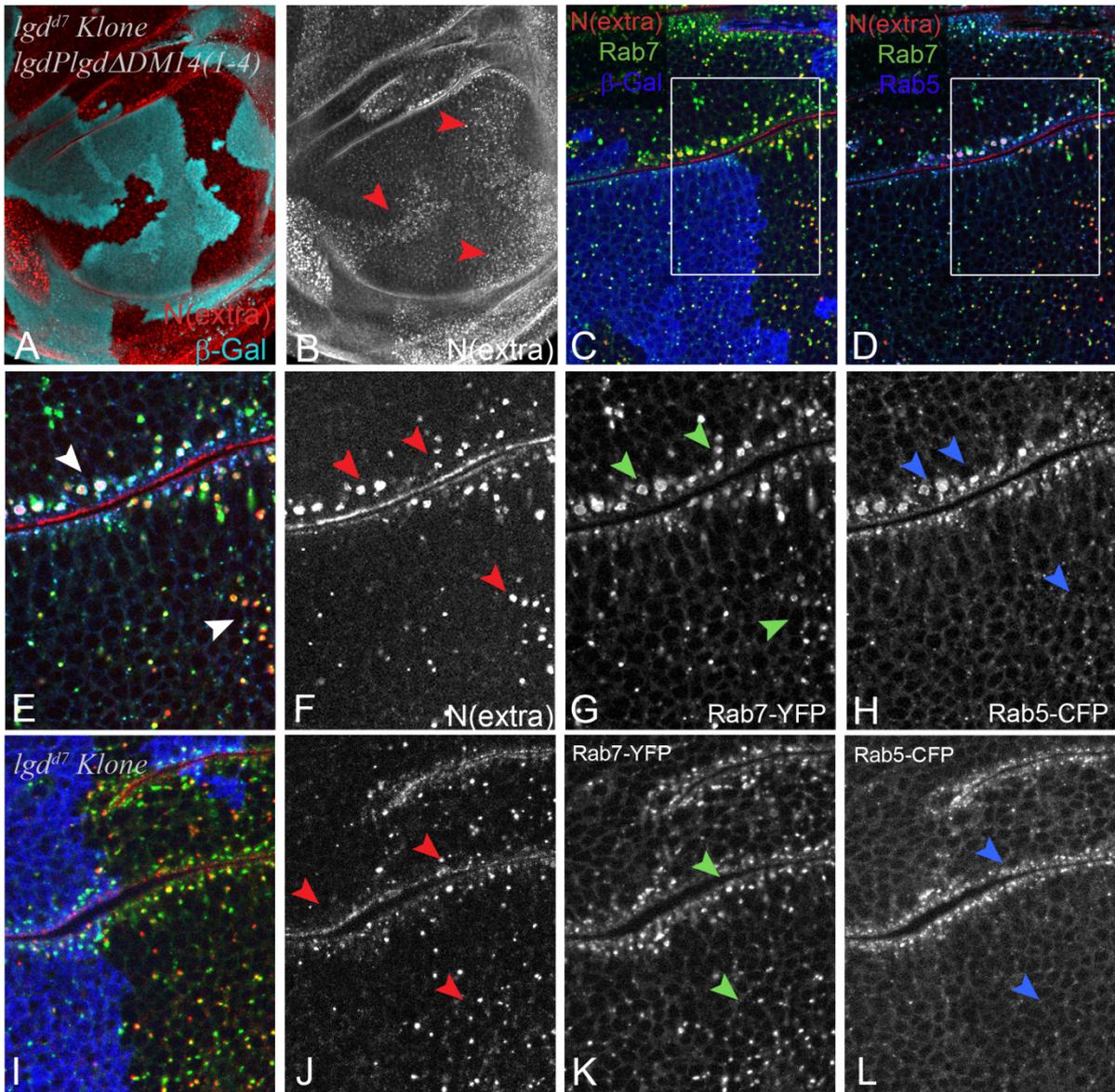
Bei der Untersuchung zur Funktionalität des Konstrukts *Lgd*ΔDM14HA im *lgd* mutanten Hintergrund deutete die Lokalisierung von Wg auf eine Verstärkung der endosomalen Proteinakkumulation hin. Für einen besseren Vergleich wurden *lgd*<sup>d7</sup> mutante Klone in Anwesenheit des *Lgd*ΔDM14HA Konstrukts erzeugt und mit *lgd*<sup>d7</sup> Kontrollklonen ohne das Konstrukt sowie mit funktionalen *Lgd*-Konstrukten verglichen. Die Proteinakkumulation wurde durch die Verteilung des Notch Rezeptors analysiert, der in der gesamten Imaginalscheibe exprimiert wird. Die *lgd*<sup>d7</sup> Klone, die in Anwesenheit des ΔDM14-Konstrukts erzeugt wurden, zeigen eine auffälligere Akkumulation des Notch Rezeptors als die Kontrollklone ohne dieses Konstrukt (siehe Abb. 2-15 vgl. B/D mit F/H ). Die Aktivierung von Notch wurde durch die Expression von Gbe+Su(H)-GFP (de Navascues, Perdigoto et al. 2012) bestimmt und zeigt in beiden Fällen eine ektopische Expression, ähnlich stark wie die Aktivität an der D/V Grenze. Die Kontrollen mit vollständigem *Lgd* und ein Beispiel eines rettenden *Lgd*-Deletionskonstrukts zeigen erwartungsgemäß weder die ektopische Aktivierung des Notch-Signalwegs noch die Akkumulation des Rezeptors in *lgd*<sup>d7</sup> Klonen (siehe Abb. 2-15 I-L).

Zur weiteren Charakterisierung des modifizierten endosomalen Phänotyps wurde die Lokalisierung des Notch Rezeptors im endosomalen System mit Hilfe der endosomalen Marker Rab5-CFP und Rab7-YFP genauer untersucht. Auch hier zeigt sich in den mutanten Bereichen eine sehr starke Akkumulation des Notch Rezeptors, die auch bei niedriger Vergrößerung schon deutlich wird. Der Notch Rezeptor akkumuliert nahe der Plasmamembran in stark vergrößerten endosomalen Kompartimenten, die Rab5 und Rab7 positiv sind. Darüber hinaus finden sich weiter im Zellinneren aber auch ausschließlich Rab7 positive Endosomen, ähnlich derer die auch bei *lgd* Kontrollklonen auftreten (siehe Abb. 2-16 Pfeilspitzen). Die endosomalen Kompartimente sind in *lgd* mutanten Zellen mit einer Kopie *Lgd*ΔDM14 stark vergrößert, während kein Einfluss in wildtypischen Zellen sichtbar wird. Im Gegensatz zur Modifikation des Phänotyps durch *hrs* wird der endosomale

Reifungsprozess nicht in der Art verändert, dass die Aktivierung von Notch in *Igd* mutanten Zellen durch *Lgd* $\Delta$ DM14 beeinträchtigt wird (Abb. 2-16 E).



**Abb. 2-15: Modifikation des endosomalen *Igd* Phänotyps durch *Lgd* $\Delta$ DM14-HA.** (A-L) Antikörperfärbungen an Flügelimaginalscheiben mit *Igd*<sup>d7</sup> mutanten Klonen, die durch Verlust des Markers lacZ (blau) markiert sind. Die ektopische Aktivierung des Notch-Signalwegs wird anhand der Reporterexpression von Gbe+Su(H)-GFP (grün) und die Verteilung des Notch Rezeptors anhand der Färbung gegen N(extra) (rot und Einzelkanal) gezeigt. Die erste Reihe zeigt die ektopische Aktivierung und die Akkumulation des Notch Rezeptors in *Igd*<sup>d7</sup> Kontrollklonen (A-D). In Anwesenheit einer *IgdP-Igd* $\Delta$ DM14-HA Insertion wird die Akkumulation von Notch in *Igd*<sup>d7</sup> Klone verstärkt und die ektopische Aktivierung ist unbeeinflusst. (E-H). Die Kontrollklone mit funktionalen *Lgd*-Konstrukten zeigen wie erwartet weder ektopische Aktivierung des GFP-Reporters noch verstärkte Akkumulation des Notch Rezeptors (I-J und K-L). Die Pfeile zeigen auf die mutanten Klone. Genotyp: *hsFlp; arm-lacZ FRT40A/Igd*<sup>d7</sup>*FRT40A; Gbe+Su(H)-GFP/+* oder *IgdP-Igd*-Konstrukte 86Fb



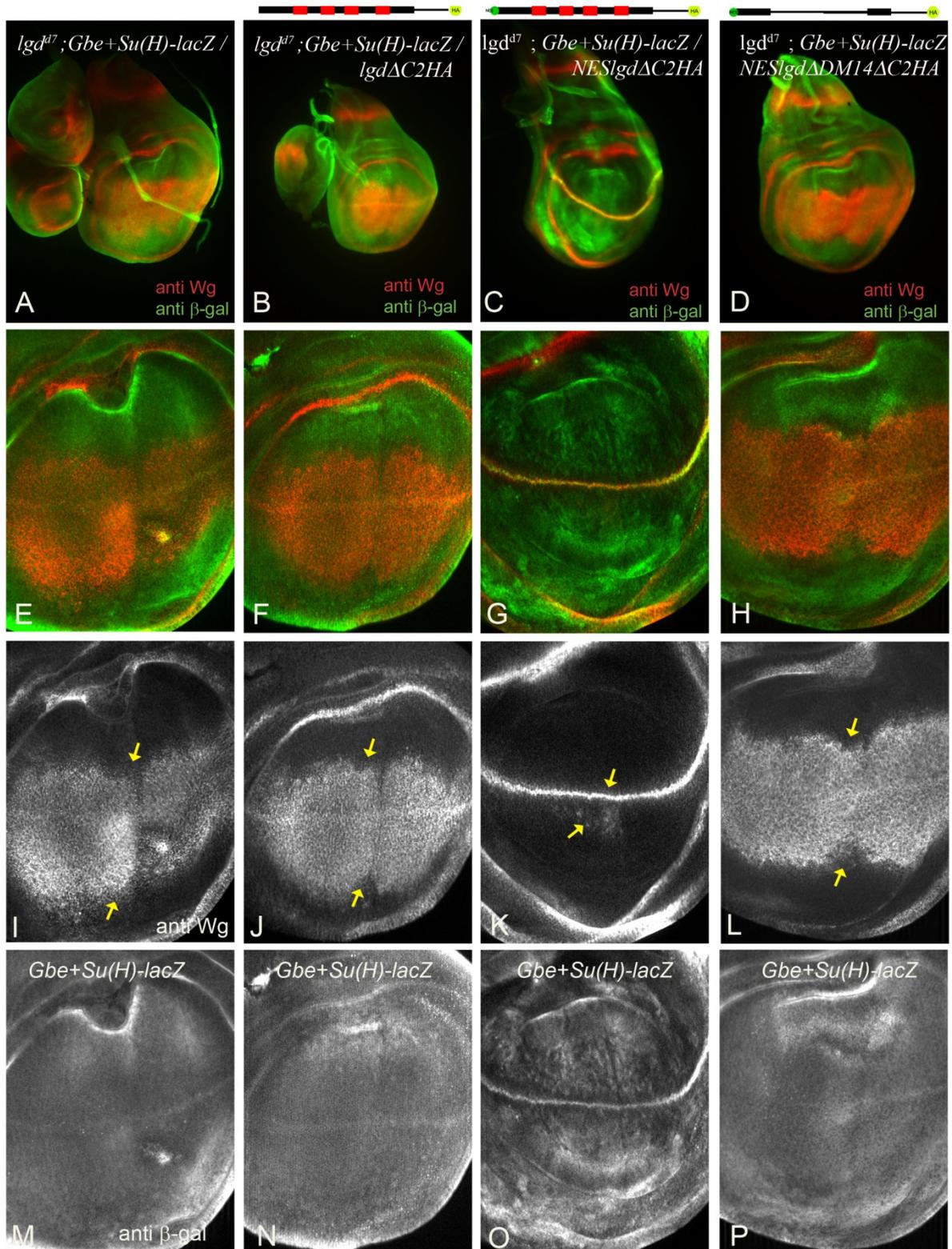
**Abb. 2-16: Charakterisierung der Endosomen bei Modifikation des *lgd* Phänotyps durch *LgdΔDM14*.** (A-H) Das Konstrukt verstärkt den endosomalen Phänotyp in *lgd<sup>d7</sup>* Klonen (markiert durch den Verlust von *lacZ*). Der Notch Rezeptor akkumuliert in deutlich vergrößerten Endosomen nahe der Plasmamembran und kolokalisiert dort mit den Markern Rab5 und Rab7. Es tritt aber auch Kolokalisation mit Rab7 positiven Endosomen im Zellinneren auf. (Pfeilspitzen E-H). In wildtypischen Zellen zeigen sich keinerlei Auswirkungen durch *LgdΔDM14*. (I-L) In *lgd<sup>d7</sup>* Klonen sind die endosomalen Phänotypen schwächer und die endosomalen Marker Rab5 und Rab7 zeigen kaum eine Vergrößerung der Endosomen an. (Genotyp in A-H: *hsFLp; arm-lacZ FRT40A/lgd<sup>d7</sup>FRT40A; tubRab5-CFP tubRab7-YFP / lgdPlgdΔDM14HA 86Fb*. Genotyp in I-L: *hsFLp; arm-lacZ FRT40A/lgd<sup>d7</sup>FRT40A; tubRab5-CFP tubRab7-YFP / MKRS*)

### 2.2.3 Funktion der C2 Domäne

In vorangegangenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass bei Überexpression von UAS-Lgd $\Delta$ C2HA das Protein im Zellkern akkumuliert ((Jaekel 2006), Troost 2007). Durch Anfügen einer NES (Nuclear Export Signal) am N-Terminus von Lgd $\Delta$ C2HA konnte die Ansammlung im Zellkern unterbunden werden (Troost 2007, siehe auch folgender Abschnitt Abb. 2-19). Jedoch zeigten beide Konstrukte eine ähnliche Funktionalität bei Überexpression und führten zu einer Suppression der ektopischen Aktivierung des Notch-Signalwegs (gemessen an der Unterdrückung der ektopischen Wg Expression) im *lgd* Hintergrund (Troost 2007, siehe Anhang Abb. 7-5). Ferner führte die Überexpression dieser Konstrukte im wildtypischen Hintergrund zu einer ektopischen Aktivierung des Signalwegs, die aber schwächer war als bei „full-length“ Lgd (Troost 2007).

Unter den endogenen Expressionsbedingungen (*lgdP*) sind deutlichere Unterschiede in der Funktionalität der Konstrukte sichtbar. Die Deletion des C-terminalen Endes mit der C2 Domäne (Lgd $\Delta$ C2HA) führt zu einem scheinbar funktionslosen Protein. Es wurde weder eine Rettung noch eine Modifikation des *lgd* Phänotyps durch dieses Konstrukt offensichtlich. Die Expression der Notch Zielgene zeigt keine offensichtlichen Unterschiede zu *lgd*<sup>d7</sup> mutanten Scheiben (siehe Abb. 2-17 vgl. I, M, und J, N).

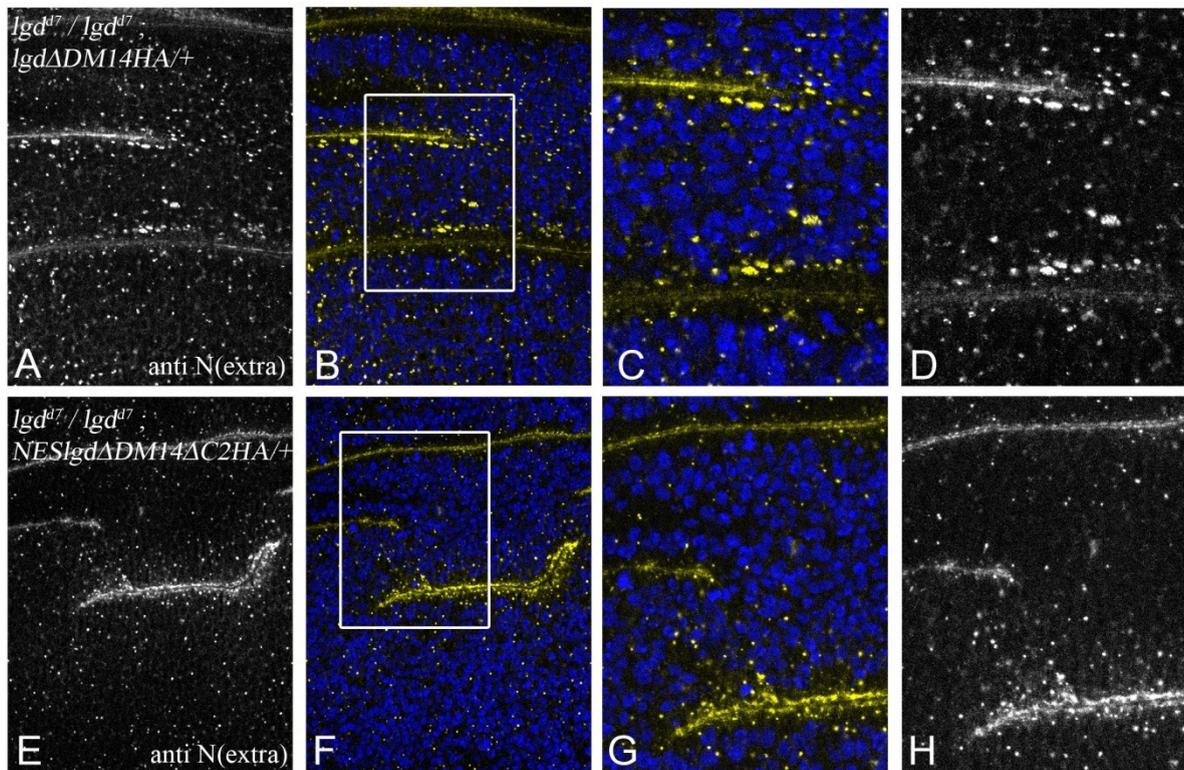
Im Gegensatz zu Lgd $\Delta$ C2HA führt das gleiche Konstrukt mit der NES zu einer deutlichen Reduktion der ektopischen Aktivierung des Notch-Signalwegs. Der sensitivere Notch-Reporter *Gbe+Su(H)-lacZ* zeigt noch eine ektopische Aktivierung (siehe Abb. 2-17 K). Die Stärke der Aktivierung scheint jedoch nicht auszureichen, um das Zielgen *wg* anzuschalten (siehe Abb. 2-17 O). Die ektopische *Gbe+Su(H)* Expression ohne die Ausbreitung von Wg an der D/V Grenze tritt auch in der *lgd* hypomorphen Situation auf ((Jaekel und Klein 2006), *lgd*<sup>SH495</sup>/*lgd*<sup>d7</sup> Abb. 2-10 F). Es zeigt sich aber noch die starke Überproliferation des Gewebes, besonders im Flügelfeld, wo die ektopische Aktivierung von Notch durch die *Gbe+Su(H)* Expression sichtbar wird (siehe Abb. 2-17). Dies deutet auf eine Restfunktion und abgeschwächte Funktionalität des Konstrukts hin.



**Abbildung 2-17 Unterdrückung des *Igd<sup>d7</sup>* Phänotyps durch *LgdΔC2* Konstrukte.** Abb. analog zu Abb. 2-10. Die C-terminalen Deletionen, sind schematisch skizziert oberhalb der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen. *LgdΔC2HA* kann den *Igd* Phänotyp nicht retten oder unterdrücken (zweite Spalte). Die Addition einer NES an dieses Konstrukt (dritte Spalte), führt zur deutlichen Reduktion der ektopischen Aktivierung. Dies zeigt sich anhand der reduzierten Ausbreitung der Wg Expression (K,Pfeile vgl. mit I,J,L), wobei die Expression des Reporters abseits der D/V Grenze weiterhin die ektopische Aktivierung zeigt. Die Überproliferation des Gewebes ist immer noch offensichtlich. Die weitere Entfernung der DM14 Domänen unterbindet die Funktionalität (letzte Spalte). Genotyp: *w; Igd<sup>d7</sup>FRT40A / Igd<sup>d7</sup>FRT40A; Gbe+Su(H)-lacZ / att86Fb IgdP Igd-Konstrukt*.

Es erschien wahrscheinlich, dass der funktionale Teil in dem Lgd-Konstrukt Lgd $\Delta$ DM14HA der noch verbleibende C-Terminus mit der C2 Domäne war und den negativen Einfluss auf den endosomalen Transport vermitteln könnte. Da der Verlust der C2 Domäne zu einer Lokalisierung im Kern führt und das NES $\Delta$ C2-Konstrukt funktionaler ist, wurde das Konstrukt *lgd*PNESlgd $\Delta$ DM14 $\Delta$ C2 generiert, um diese Fehllokalisierung zu vermeiden.

Im *lgd*<sup>d7</sup> mutanten Hintergrund zeigt NESlgd $\Delta$ DM14 $\Delta$ C2 keine Anzeichen für eine Funktionalität oder negative Effekte im *lgd* Hintergrund und führt zu keiner Vergrößerung der Endosomen wie im Falle von Lgd $\Delta$ DM14 (siehe Abb. 2-17 letzte Spalte und Abb. 2-18). Daher erscheint die C2-Domäne für die Verstärkung der Proteinakkumulation verantwortlich zu sein.



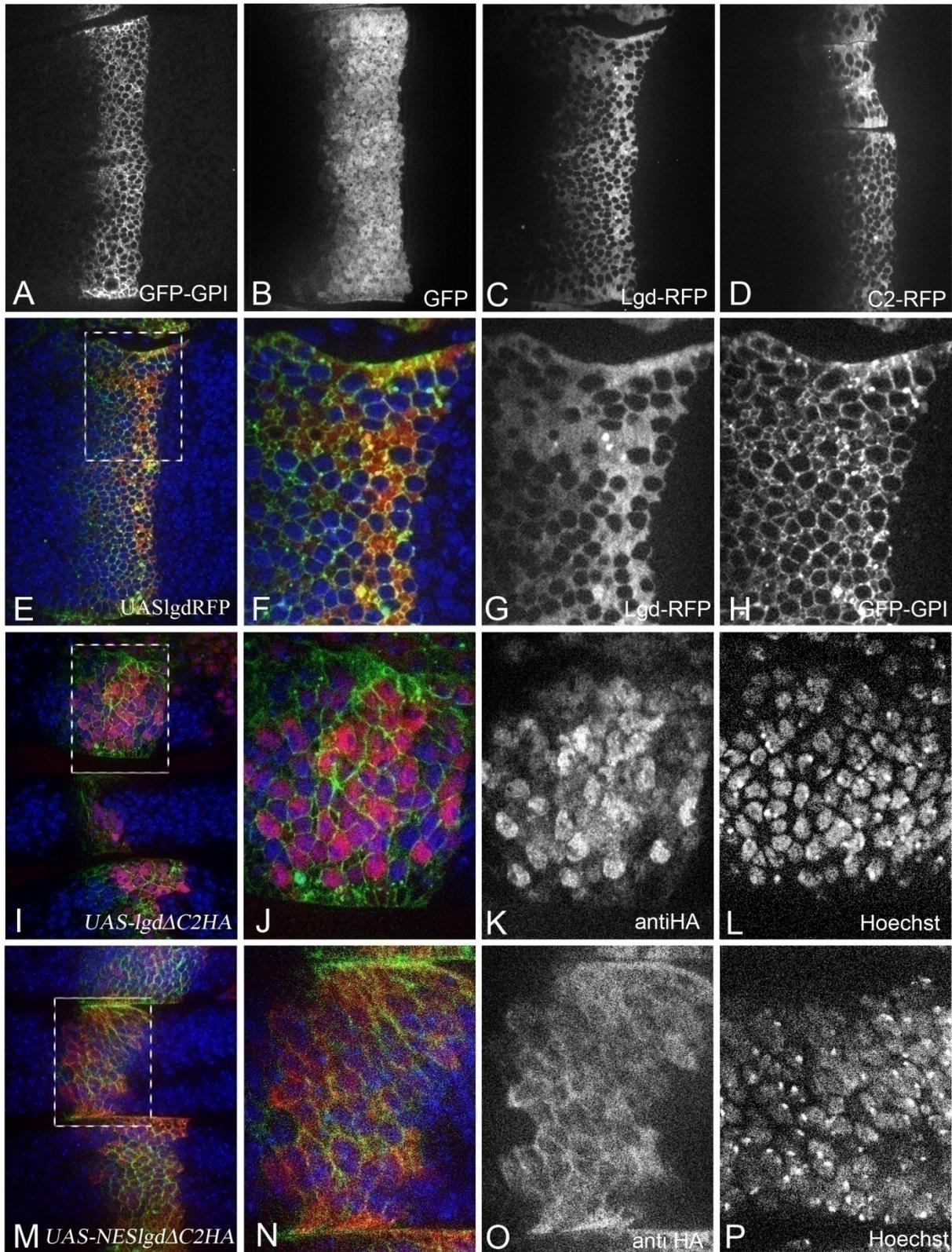
**Abb. 2-18: Die C2 Domäne im Lgd $\Delta$ DM14-Konstrukt führt zur Modifikation des endosomalen Phänotyps. (A-D)** In *lgd* mutanten Zellen mit dem Lgd $\Delta$ DM14 Konstrukt zeigen sich deutlich vergrößerte endosomale Akkumulationen des Notch Rezeptors. **(E-H)** Das Konstrukt dem darüber hinaus die C2 Domäne fehlt, zeigt keine Verstärkung des endosomalen *lgd* Phänotyps. Die Zellkerne wurden durch Hoechst-33258 markiert (blau), Antikörperfärbung gegen die extrazelluläre Domäne des Notch Rezeptors (anti N(extra)), in gelb oder als Einzelkanal).

#### 2.2.4. Lgd ist ein zytoplasmatisches Protein

Bisherige Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation des endogenen Lgd Proteins sowie überexprimiertem Lgd zeigten die Lokalisierung im Zytoplasma (Childress, Acar et al. 2006, Gallagher und Knoblich 2006, Jaekel und Klein 2006). Bei Überexpression von Lgd-RFP zeigt sich eine zytoplasmatische Lokalisierung und keine offensichtliche Lokalisation an Membranen, Vesikeln oder im Zellkern ((Troost 2007), siehe Abb. 2-19 C, E-H). Für die C2 Domäne von Lgd konnte gezeigt werden, dass sie die Bindung an Phospholipide *in vitro* vermittelt (Gallagher und Knoblich 2006). Daher wurde Lgd $\Delta$ 1-664-RFP generiert, ein Fusionsprotein aus der C2 Domäne fusioniert mit RFP, um die Membranassoziation *in vivo* zu untersuchen. Das Fusionsprotein zeigt die gleiche zytoplasmatische Lokalisation wie Lgd-RFP (s. Abb. 2-19 D) und eine deutliche Assoziation mit Membranstrukturen wurde bei der Untersuchung *in vivo* nicht beobachtet.

Die verschiedenen HA-markierten DM14-Deletionskonstrukten zeigen bei Überexpression keine offensichtlich veränderte Lokalisation ((Jaekel 2006), Troost 2007, Anhang Abb. 7-6). Die Deletion des C-Terminus mit der C2 Domäne (UAS lgd $\Delta$ C2HA) führt aber zur Akkumulation des Proteins im Zellkern (siehe Abb. 2-19 I-L). Die zytoplasmatische Lokalisierung dieses Proteins konnte durch Anfügen einer Nuklear-Export-Signalsequenz (NES, UAS NES-lgd $\Delta$ C2HA) wiederhergestellt werden (siehe Abb. 2-19 M-P). Dies legt nahe, dass die veränderte Lokalisation über die beobachteten Unterschiede bei der Funktionalität der beiden Varianten entscheidet.

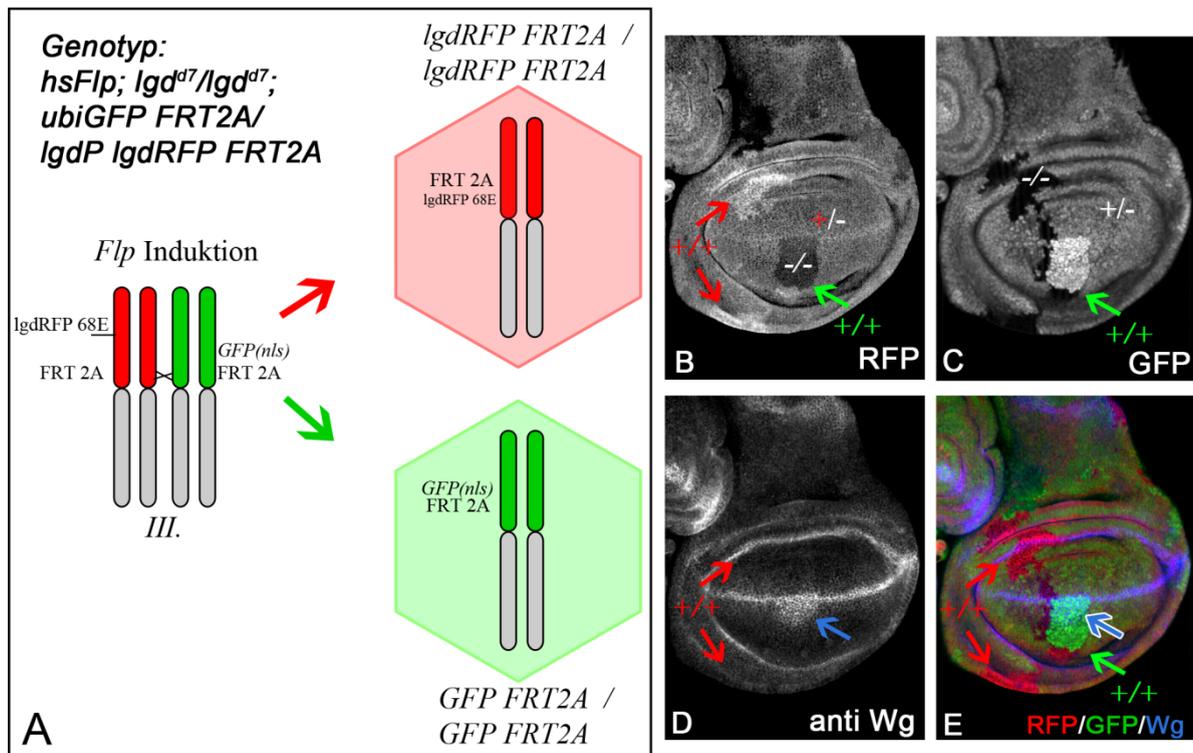
Der eindeutige Nachweis der Expression und die Bestimmung der Lokalisierung der *lgdP*-Konstrukte durch Fluoreszenzmikroskopie wurden durch die niedrigen Expressionslevel beeinträchtigt. Zur Durchführung der Lokalisierungsuntersuchungen mit geeigneten Kontrollen innerhalb des selben Gewebes, wurden *lgdP*-Lgd-Konstrukte mit dem FRT2A Chromosom rekombiniert. Durch die FLP/FRT vermittelte Rekombination (Xu und Rubin 1993) wurden dann Mosaikgewebe generiert, die Zellklone mit einer, zwei oder keiner Kopie des Konstrukts enthalten. Als weitere Kontrolle wurde GFP mit einer Kernlokalisierungssequenz, FRT2A NLS-GFP (NLS, nuclear localisation sequence) verwendet. Der Vergleich mit der GFP Expression erlaubt die eindeutige Unterscheidung der Bereiche (siehe Abb. 2-20).



**Abbildung 2-19: Lokalisierung von Lgd und Lgd-Deletionskonstrukten bei Überexpression.** (A-B) Lokalisierung von membran-verankertem UAS-GFP-GPI (in A) und UAS-GFP im Kern und Zytoplasma (B). (C-D) Lokalisierung von Lgd. Lgd-RFP und die Fusion der Lgd-C2 Domäne mit RFP zeigen die gleiche Lokalisierung im Zytoplasma (Lgd-RFP in C und Lgd $\Delta$ 1-664-RFP in D). (E-P) Lgd-Konstrukte (in rot) im Vergleich zur Membranfärbung (GFP-GPI in grün) und zur Kernfärbung (Hoechst in blau). Die Umrahmung markiert den zusätzlich vergrößerten Bereich. Lgd-RFP zeigt keine Lokalisierung im Kern oder Membranassoziation (E-H). Die subzelluläre Lokalisierung von Lgd $\Delta$ C2 zeigt die Anreicherung im Zellkern (I-L) wobei Export aus dem Kern im Falle von NESlgd $\Delta$ C2 wieder zur vermehrten Lokalisierung im Zytoplasma führt (M-P). Die Expression erfolgte mit Hilfe

von ptcGAL4. (teilweise übernommen aus (Troost, 2007), siehe Anhang Abb.7-6 für die zytoplasmatische Lokalisierung weiterer Konstrukte).

Um zunächst auch die Funktionalität des Lgd-Konstrukts zu bestätigen, wurden *lgd* mutante Zellen durch den Verlust von *lgdP lgdRFP* in *lgd<sup>d7</sup>* Homozygoten generiert und es zeigen sich die erwarteten *lgd* Funktionsverlustphänotypen (siehe Abb. 2-20 B-E).



**Abb. 2-20: Klonale Analyse zur Bestimmung der Lokalisierung und Bestätigung der Funktionalität des endogen exprimiertem Lgds. (A)** Schematische Darstellung der Flp vermittelten Rekombination, die zur unterschiedlichen Transgendosis führt. Zellen die den Marker GFP verlieren, weisen zwei Kopien des Transgens auf. **(B-E)** Die Klone mit zwei GFP Kopien verlieren die Expression von Lgd-RFP. Homozygote Bereiche (=zwei Kopien eines Transgens) sind durch +/+ markiert, heterozygote Bereiche mit +/- (= jeweils eine Kopie) und die jeweiligen Bereich ohne Expression mit -/- sowie Pfeilen markiert. Der Verlust des Transgens im *lgd* Hintergrund führt zur ektopischen Expression von Wg an der D/V Grenze. Genotyp: *hsFlp; lgd<sup>d7</sup> /lgd<sup>d7</sup> FRT40A; FRT2A GFP / FRT2A lgd-RFP att68E*.

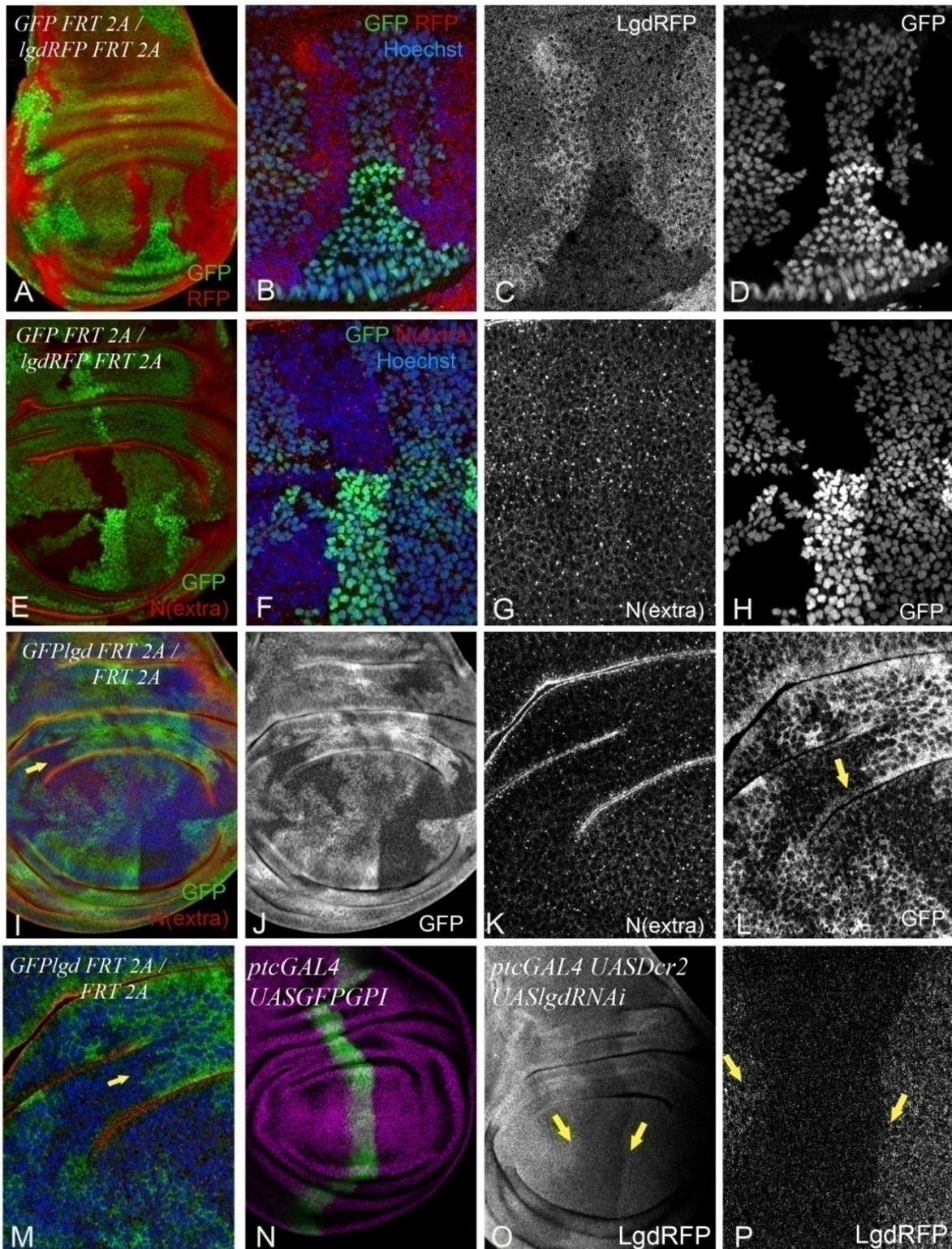
Lgd-RFP kann im Zytoplasma lokalisiert werden, die Bereiche mit zweifacher GFP Expression (= kein Lgd-Transgen) zeigen nur eine schwache Hintergrundfärbung (s. Abb. 2-20, 2-21 A-D). Eine ähnliche Lokalisierung und schwache Expression zeigt auch GFP-Lgd. Die Klone wurden hierbei nur durch die schwache GFP-Expression markiert (Abb. 2-21 I-M). Die Autofluoreszenz des Gewebes oder auch ein Fortbestehen (*perdurance*, (Garcia-Bellido und Merriam 1971)) des Proteins erschweren die eindeutige Identifikation der klonalen Bereich bei starker Vergrößerung (siehe Abb. 2-21 L).

Im Gegensatz zur Überexpression zeigen weder Lgd-RFP noch GFP-Lgd unter Kontrolle von *lgdP* im wildtypischen Hintergrund einen Einfluss auf den endosomalen Transport des Notch Rezeptors auch nicht in den Bereich mit zwei Kopien des jeweiligen Transgens (siehe Abb. 2-21 E-H, I-L).

Verglichen mit den untersuchten Antikörperfärbungen (z.B. Notch, Wg oder lacZ/ $\beta$ -Gal) oder überexprimierten Fusionsproteinen ist die Fluoreszenz der (*lgdP*-) Lgd-Konstrukte sehr schwach und durch das Okular kaum wahrnehmbar, aber noch detektierbar. Beim Antikörper Nachweis (von Wg, Notch oder lacZ) mit sekundären Antikörpern, deren Spektrum mit RFP (Alexa 568 bei Lgd-RFP) überlappt, zeigen sich anhand der Fluoreszenz keinerlei Anzeichen für die Expression des Transgens. Die Proteinmengen sind so gering, dass die schwachen Signale der Fusionsproteine von den stärkeren im Frequenzbereich überlappenden Fluoreszenzsignalen der Antikörperfärbungen überdeckt werden und nicht mehr sichtbar sind (siehe Abb. 2-21 G).

Als weitere Kontrolle wurde auch mittels Expression von UASlgd-RNAi die Expression von Lgd unterdrückt. Die ektopische Expression mit Hilfe von *ptcGAL4* verläuft durch die Mitte der Flügelimaginalscheibe auf der anterioren Seite entlang der A/P Grenze, gezeigt durch die Expression von UASGFP (siehe Abb. 2-21 I). Wird in dieser Weise in Anwesenheit einer Kopie *lgdP-lgdRFP* ein UASlgd-RNAi Konstrukt mittels *ptcGAL4* angeschaltet, zeigt sich der Expressionsbereich durch die abgeschwächte Fluoreszenz (siehe Abb. 2-21 J, K).

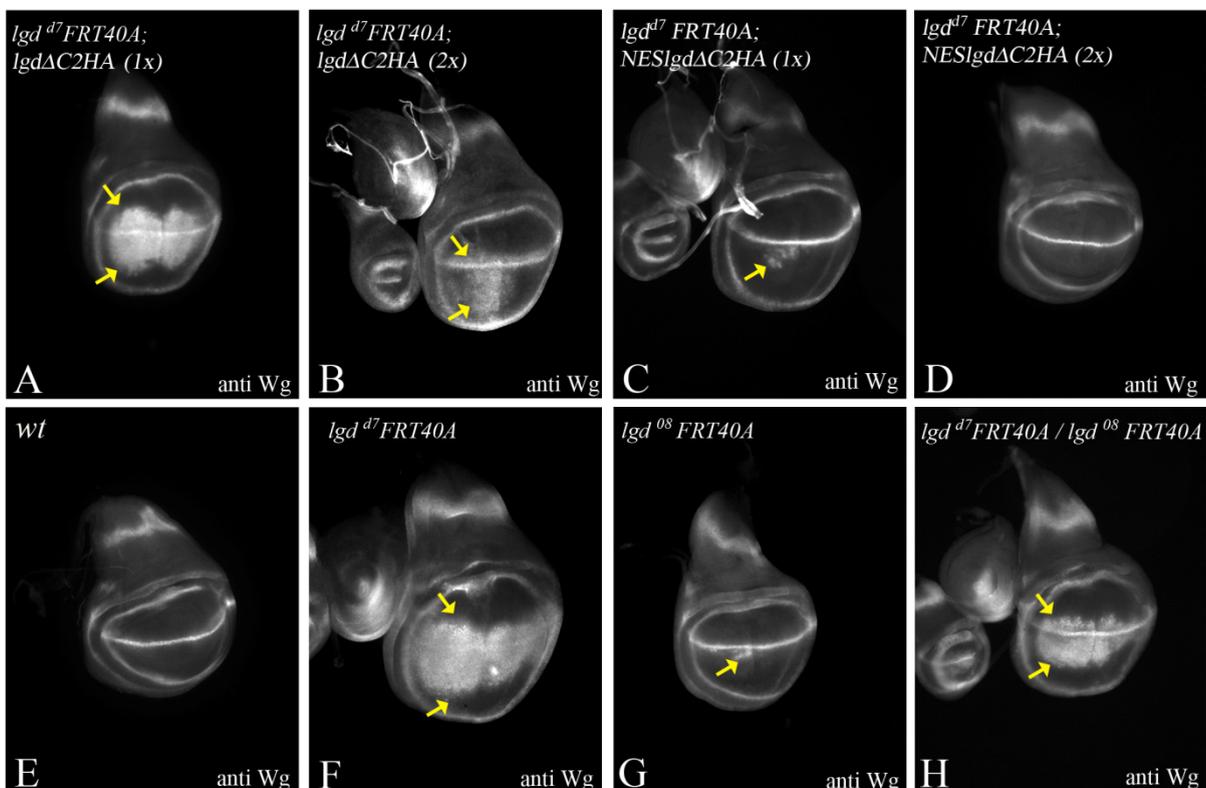
Insgesamt zeigt die Untersuchung der vollständigen Lgd-Konstrukte eine schwache Expression, im Vergleich zu den Überexpressionsbedingungen,. Die zytoplasmatische Lokalisierung von Lgd kann aber bestätigt werden. Die negativen Aspekte der Lgd-Überexpression, die zu Funktionsverlust-Phänotypen und Störung des endosomalen Transports führen, treten bei Verwendung des endogenen Promotors *lgdP* nicht auf.



**Abbildung 2-21 Lokalisierung von Lgd-RFP und GFP-Lgd bei Expression durch *IgdP*.** (A-H) Flügelscheiben mit Lgd-RFP Klonen. Die Klone, die doppelte Mengen Lgd-RFP exprimieren (C) sind durch den Verlust der GFP Expression markiert (D). Die Verteilung von Notch (rot in E-F, Einzelkanal in G) in Mosaik-Scheiben, die hier nur indirekt durch GFP-Verlust (grün E-F, H) markiert wurden (vgl. mit A-D). (L-P) zeigt eine Scheibe mit unterschiedlichen Mengen an GFP-Lgd (grün in L und N, Einzelkanäle in (M-P)). Die Verteilung des Notch Rezeptors ist unverändert (rot in (L-N), O). (I-M) Flügelscheibe mit GFP-Lgd Klonen. Die Klone sind durch die GFP Expression markiert (J). Die Verteilung von Notch ist unverändert (K). Restsignale im GFP-Kanal sind noch sichtbar (Pfeil in L,M). (N-P) Die *ptcGAL4* Expressionsdomäne, dargestellt durch UASGFP in einer Wildtypescheibe (N, Hoechst in magenta, GFP in grün). Die Koexpression von UASLgd-RNAi und UASDcr2 mittels *ptcGAL4* führt zum Verlust des Lgd-RFP Fusionsproteins in der *ptc* Expressionsdomäne (O-P). (29°C).

### 2.2.5 Die Funktion der LgdΔC2- Konstrukte wird durch schwache Expression beeinträchtigt

Die Lokalisation von LgdΔC2HA und NES-LgdΔC2HA (bei Überexpression) legt nahe, dass die veränderte Lokalisation über die unterschiedliche Funktionalität entscheidet. Unter endogenen Expressionsbedingungen konnten diese Konstrukte aber kaum nachgewiesen werden (siehe Anhang Abb. 7-8). Wegen der schwachen Expression der beiden C-terminalen Deletionskonstrukte wurde die Funktion bei verdoppelter Dosis (=zwei Kopien im Genom) untersucht. Hierbei zeigt sich eine deutlichere Abschwächung des *lgd* Phänotyps anhand der reduzierten Ausbreitung von Wg (siehe Abb. 2-22 A-D). Zwei Kopien *lgdPlgdΔC2HA* (in Homozygose) führen zu einem abgeschwächten aber immer noch stark-hypomorphen *lgd* Phänotyp, mit reduzierter Ausbreitung von Wg (siehe Abbildung 2-22 A, B). Im Falle des NES-Konstrukts in Homozygose sind die Scheiben annähernd wildtypisch und es kann keine ektopische Aktivierung von Wg festgestellt werden (siehe Abb. 2-22 C,D). Zur Überprüfung der beobachteten Restfunktion wurde die *lgd<sup>08</sup>* Mutante untersucht. Dieses Allel kodiert ein C-terminal verkürztes Protein ohne C2 Domäne (Gallagher und Knoblich 2006). In *lgd<sup>08</sup>* Homozygose zeigt sich eine schwache ektopische Expression von Wg, die in *lgd<sup>d7</sup>/lgd<sup>08</sup>* deutlich stärker ist, aber schwächer als bei der Nullmutante *lgd<sup>d7</sup>* (siehe Abb. 2-22 E-H).



**Abb. 2-22. Dosisabhängigkeit der C-terminalen *lgd*-Deletionskonstrukte.** (A-D) Konzentrationsabhängigkeit von LgdΔC2-Konstrukten. Eine Kopie *lgdPlgdΔC2HA* im Genom zeigt keine Rettung des *lgd<sup>d7</sup>* Phänotyps (A). Bei zwei Kopien wird die ektopische Expression von Wg unterdrückt (B). Eine Kopie *lgdPNESlgdΔC2HA* unterdrückt

die ektopische Expression von Wg bereits deutlich (C). Zwei Kopien dieses Konstrukts führen dazu, dass die Expression von Wg kaum vom Wildtyp zu unterscheiden ist (D). **(E-H)** Expression von Wg im Wildtyp (E) und in *lgd<sup>d7</sup>* Nullmutanten (F). Die ektopische Aktivierung von Wg ist in *lgd<sup>d8</sup>* homozygot mutanten Scheiben schwach ausgeprägt (G), und in der transheterozygoten Situation *lgd<sup>d7</sup>/lgd<sup>d8</sup>* stärker (H).

Insgesamt zeigt die Struktur-Funktionsanalyse, dass die DM14 Domänen für die Funktion von *lgd* benötigt werden, aber redundant wirken. Die Deletionskonstrukte mit zwei oder mehr DM14 Wiederholungen sind in der Lage den *lgd* Phänotyp vollständig zu retten. Die C2 Domäne dient der Lokalisierung des Proteins im Zytoplasma und fördert die Stabilität des Proteins (Troost, Jaeckel et al. 2012). Die Ergebnisse der Analyse sind in Tabelle 2.1 zusammengefasst.

**Tabelle 2.1: Eigenschaften der *lgdP* Lgd-Deletionskonstrukte.** Die aufgelisteten Lgd-Konstrukte wurden alle im Insertionsort att86Fb integriert. Die mit \* gekennzeichneten Konstrukte wurden außerdem in att68E integriert und mit FRT2A rekombiniert.

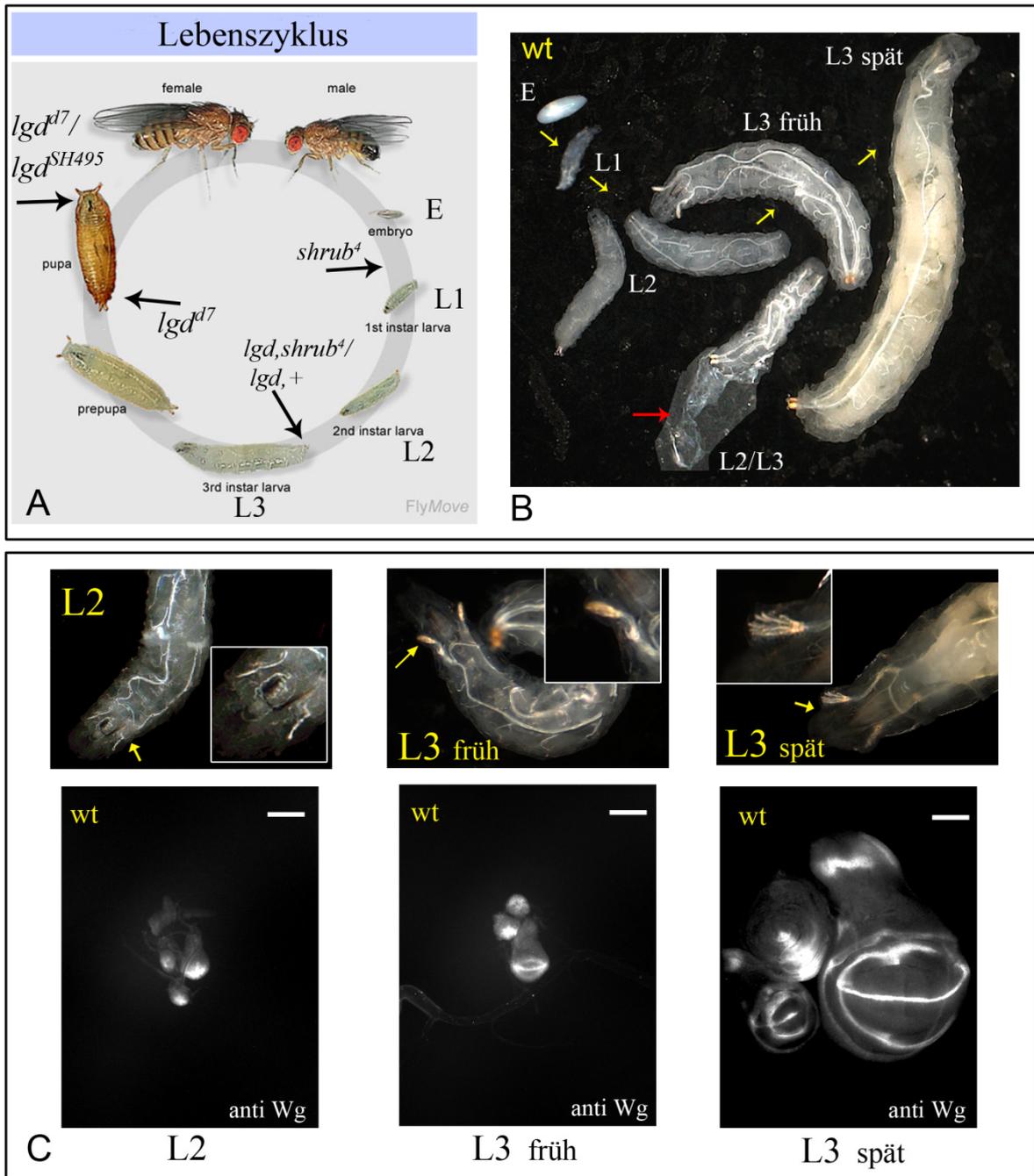
Lgd Konstrukte in att86Fb	Notch-Signalweg in <i>lgd<sup>d7</sup></i>	Endosomaler Phänotyp in <i>lgd<sup>d7</sup></i>	Lokalisierung	Adulte bzw. Letalität
Lgd-HA Lgd-RFP* Lgd-GFP*	Normalisiert /Wildtyp	keine Auffälligkeiten (k. A.)	Zytoplasma	Lebend, fertil
Lgd-ΔDM14(1), ΔDM14(4), ΔDM14(1;4), ΔDM14(1-2), ΔDM14(2-3), ΔDM14(3-4)	normalisiert/Wildtyp	k. A.	nicht untersucht (n.u.)	Lebend, fertil
ΔDM14(1-4)*, ΔDM14(1-3), ΔDM14(1;3-4)	ektopische Aktivierung, keine Rettung,	Verstärkung LgdΔDM14(1-4) (antimorpher, nicht dominanter Phänotyp)	Zytoplasma, n.u.	früh puppal letal
NES-ΔDM14(1-4)ΔC2	ektopische Aktivierung, keine Rettung	Keine Rettung	n.u.	früh puppal letal
ΔC2*	ektopische Aktivierung, Keine Rettung (eine Kopie)	Keine Rettung	zu schwache Expression	früh puppal letal
NES-ΔC2*	ektopische Aktivierung, Partielle Rettung / <i>lgd</i> hypomorph	k.A.	zu schwache Expression	Vereinzelt Pharats (escapers)

### 2.3 Untersuchung der Interaktion zwischen Lgd und der ESCRT-III Untereinheit Shrub

Mit Hilfe eines Modifier-Screens wurde die genetische Interaktion mit *shrub*, dem Drosophila Homolog der ESCRT III Untereinheit Snf7/Chmp4 gefunden (Böcke 2007, Jäckel 2010). Dieser Screen basierte auf der Überexpression von UAS-Lgd mittels C5-GAL4 und es wurde der modifizierende Einfluss von Defizienzen untersucht (Böcke 2007, Jäckel 2010, Troost, Jaeckel et al. 2012). Auch biochemisch konnte eine Interaktion zwischen Lgd und Shrub mittels Coimmunopräzipitation (CoIP) gezeigt werden (Jäckel 2010, Troost, Jaeckel et al. 2012). Für die Interaktion werden die DM14 Domäne benötigt (Jäckel 2010, Troost, Jaeckel et al. 2012). Die direkte Interaktion der Proteine konnte durch Pull-down Experimente gezeigt werden (Ohlenhard 2011, Troost, Jaeckel et al. 2012).

Die genetische Interaktion konnte durch die Rekombination des Funktionsverlustallels *shrub*<sup>4</sup> (Sweeney, Brenman et al. 2006) mit dem hypomorphen Allel *lgd*<sup>SH495</sup> (Jäckel 2010) und mit dem amorphen Allel *lgd*<sup>d7</sup> (Ohlenhard 2011) näher untersucht werden. Die jeweiligen Allele sowie die Rekombinanten sind in Heterozygose lebensfähig und zeigen keine phänotypischen Auffälligkeiten. Im *lgd* mutanten Hintergrund führt die *shrub*<sup>4</sup> Heterozygose aber zu einer verfrühten Letalität (Jäckel 2010, Ohlenhard 2011, Troost, Jaeckel et al. 2012, siehe Abb. 2-23 A).

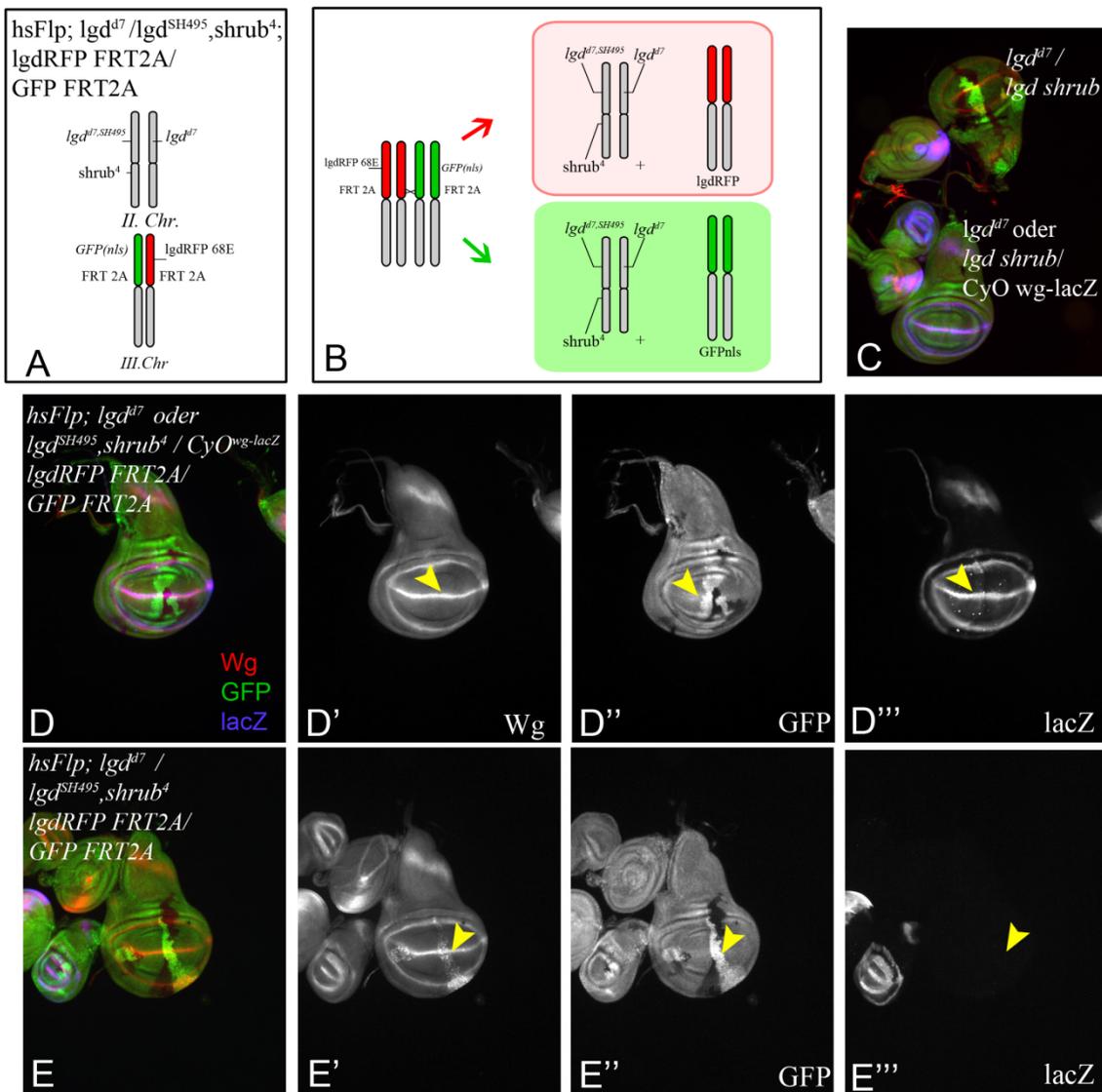
In der Kombination *lgd*<sup>d7</sup> / *lgd*<sup>SH495</sup>, *shrub*<sup>4</sup> sowie *lgd*<sup>d7</sup> / *lgd*<sup>d7</sup>, *shrub*<sup>4</sup> (*lgd* hypo- bzw. amorph) sterben die Tiere im zweiten oder Anfang des frühen dritten Larvenstadiums ((Jäckel 2010), siehe Abb. 2-23 A). Die Mutation *shrub*<sup>4</sup> ist in Homozygose embryonal letal, das hypomorphe Allel *lgd*<sup>SH495</sup>, eine P-Element Insertion in *lgd* (Oh, Kingsley et al. 2003), spät pupal letal mit differenzierten aber nur selten für kurze Zeit lebendigen adulten Tieren (Jäckel und Klein 2006). Das amorphe Allel in *lgd*<sup>d7</sup> ist in Homozygose früh pupal letal (Klein 2003, Jaekel und Klein 2006). Die transheterozygote Situation *lgd*<sup>SH495</sup> / *lgd*<sup>d7</sup> ist ebenfalls spät pupal letal (Jaekel und Klein 2006). Die verfrühte Letalität durch *shrub*<sup>4</sup> zeigt die starke genetische Interaktion, gestaltete aber eine nähere Untersuchung schwierig. Zu diesem Zeitpunkt der Entwicklung sind die Larven und ihre Imaginalscheiben noch sehr klein (siehe Abb. 2-23 C). Die Proliferation des Gewebes findet hauptsächlich im dritten Larvenstadium statt, nachdem die Wg Expression im Flügel Feld an der D/V Grenze durch den Notch-Signalweg ab dem frühen L3 Stadium kontrolliert wird (s. Abb. 2-23 Übersicht in (Klein 2001)).



**Abb. 2-23: Verfrühte Letalität in *lgd* / *lgd, shrub* und larvale Stadien und die Flügelentwicklung.** Lebenszyklus von *Drosophila*. (E=Embryo, L Larvales Stadium 1-3), schwarze Pfeile geben die Letalität des jeweiligen Genotyps an (A, verändert nach Flymove,). Größenvergleich der Larven im Stadium L1, L2 und L3 (B). Der rote Pfeil deutet auf eine sich häutende Larve (L2-L3), die abgestülpte und durchsichtige Kutikula wird nur durch starke Kontrast und Helligkeitserhöhung im Bildbereich deutlich. Die Entwicklung der anterioren Spirakeln (durch gelbe Pfeile markiert) erlaubt die Identifikation des larvalen Stadiums L2 bis L3 spät. Darunter Wg Antikörperfärbungen an Imaginalscheiben mit Beispielen der jeweiligen Stadien (C). Im zweiten Larvenstadium (L2) ist die nicht vom Notch-Signalweg abhängige Wg Expression auf den ventralen Teil der Flügelimaginalscheibe beschränkt. Am Anfang des dritten Larvenstadiums (L3 früh) zeigt sich die Wg Expression an der D/V Grenze Beginn und in der ringförmigen Domäne (Maßstabsbalken=100µm).

### 2.3.1 Untersuchung von *lgd*, *shrub*/*lgd* mutanten Zellen

Zur Umgehung der frühzeitigen Letalität von *lgd,shrub/lgd* wurde versucht mutante Klone dieses Genotyps zu generieren, um die Auswirkungen auf die Aktivierung des Notch-Signalwegs und den endosomalen Transports des Rezeptors zu untersuchen. Hierbei wurde ausgenutzt, dass eine Kopie *lgdP-lgdRFP* auch den sensitivierten *lgd*, *shrub/ lgd* mutanten genetischen Hintergrund retten kann (siehe Abb. 2-24 und Abschn. 2.3.3). Durch mitotische Rekombination kann die Rettung durch den Verlust des *Lgd*-Transgens wieder aufgehoben werden, wodurch auch *lgd*, *shrub/ lgd* mutante Klone generiert werden konnten. Aufgrund der schwachen Expression von *Lgd*-RFP war die Signalintensität bei starker Vergrößerung zu gering. Daher wurden die Klone anhand der zweifachen GFP Expression (= Verlust von *lgdP* *lgd-RFP*) identifiziert (siehe Abb. 2-24).



**Abb. 2-24 Generierung von *lgd,shrub/lgd* mutanten Klonen:** Schematische Darstellung der Untersuchung der Reduktion von *shrub* in *lgd* mutanten Klonen (A). Das *Lgd*-RFP Konstrukt rettet den mutanten Phänotyp und der

Verlust des Transgens durch die Flp/FRT vermittelte mitotische Rekombination führt zu Zellen des erwünschten Genotyps *Igd, shrub/Igd,+*, die durch die zweifache GFP Expression markiert sind (A,B). **(C-E)** Die Antikörperfärbung gegen Wg (rot) zeigt die Akkumulation in *Igd, shrub/Igd,+* Zellen (GFP+/GFP+). Dieser Phänotyp tritt nur in den Klonen und auch nur im Genotyp *Igd,shrub/Igd* auf, wie durch die Abwesenheit der lacZ Färbung gezeigt wird (CyO<sup>wg-lacZ</sup> Balancer) Genotyp: *hsFlp; Igd<sup>SH495</sup>, shrub<sup>4</sup>* oder *CyO<sup>wg-lacZ</sup>/Igd<sup>d7</sup>* oder *CyO<sup>wg-lacZ</sup>; ubiGFP FRT2A / IgdP/Igd-RFP att68E FRT2A*. Alternativ wurde der SM6-TM6B Compound-Balancer mit dem Tb Marker zur Identifizierung des Genotyps verwendet.

### **2.3.1.1 Unterdrückung der ektopischen Aktivierung des Notch-Signalwegs in *Igd, shrub/Igd* mutanten Zellen**

Da der Funktionsverlust von *shrub* und auch von *Igd* zur ektopischen Aktivierung des Notch-Signalwegs führt, wurde die Aktivität in den *Igd/Igd,shrub* mutanten Zellen untersucht. Es konnten mutante Klone auf diese Art und Weise generiert werden und in diesen Klonen zeigen sich starke Akkumulationen von Wg (siehe Abb. 2-24 und Abb. 2-25 A-D). Die Ausbreitung von Wg an der D/V Grenze kann als Aktivierung des Notch-Signalwegs gedeutet werden. Jedoch zeigen sich hier vor allem punktuelle Akkumulationen von Wg in den mutanten Zellen und keine Färbung der Plasmamembran wie es in den wildtypischen Zellen an der D/V Grenze zu beobachten ist (siehe Abb. 2-25 D). Es scheint, als sei eher die Lokalisierung von Wg in den *Igd, shrub/Igd* Zellen verändert. Dies könnte auch auf einen endosomalen Abbaudedefekt zurückzuführen sein, da Wg im Lysosom abgebaut wird (Piddini, Marshall et al. 2005).

Mit Hilfe weiterer Zielgene, deren Lokalisation nicht betroffen sein sollte, wurde diese Annahme überprüft. Hierzu wurden der kernlokalisierte transkriptionelle Repressor Cut (*ct*) (Jack und DeLotto 1995) und der *Gbe+Su(H)-lacZ* Reporter untersucht. Trotz des Auftretens von Wg weitab der D/V Grenze werden weder *Gbe+Su(H)-lacZ* noch Cut ektopisch exprimiert (siehe Abb. 2-25). Dies zeigt, dass keine ektopische Aktivierung des Notch-Signalwegs auftritt. In Kontrollklonen (*Igd<sup>SH495</sup>/Igd<sup>d7</sup>*) zeigt sich weder auffällige Proteinakkumulation von Notch noch die ektopische Expression der Zielgene an der D/V Grenze (siehe Anhang Abb. 7-10). Dies lässt sich auf die hypomorphe *Igd* Situation zurückzuführen, die nur zu einer schwachen Aktivierung des Notch-Signalwegs führt ((Jaekel und Klein 2006), eigene Beobachtungen). Um zu überprüfen, ob die Heterozygose von *shrub<sup>4</sup>* die ektopische Aktivierung in Zellen unterdrücken kann, wurden die Versuche in Homozygose des amorphen Allels *Igd<sup>d7</sup>* wiederholt, da in *Igd<sup>d7</sup>* mutanten Klonen eine starke Aktivierung des Signalwegs auftritt (Klein 2003, Jaekel und Klein 2006). Die Klone im *Igd<sup>d7</sup> / Igd<sup>d7</sup>* mutanten

Hintergrund zeigen die erwartete Ausbreitung der Expression der Zielgene *Wg* und *GbeSu(H)-lacZ* und eine relativ milde Akkumulation von Notch (siehe Abb. 2-26 A-H).

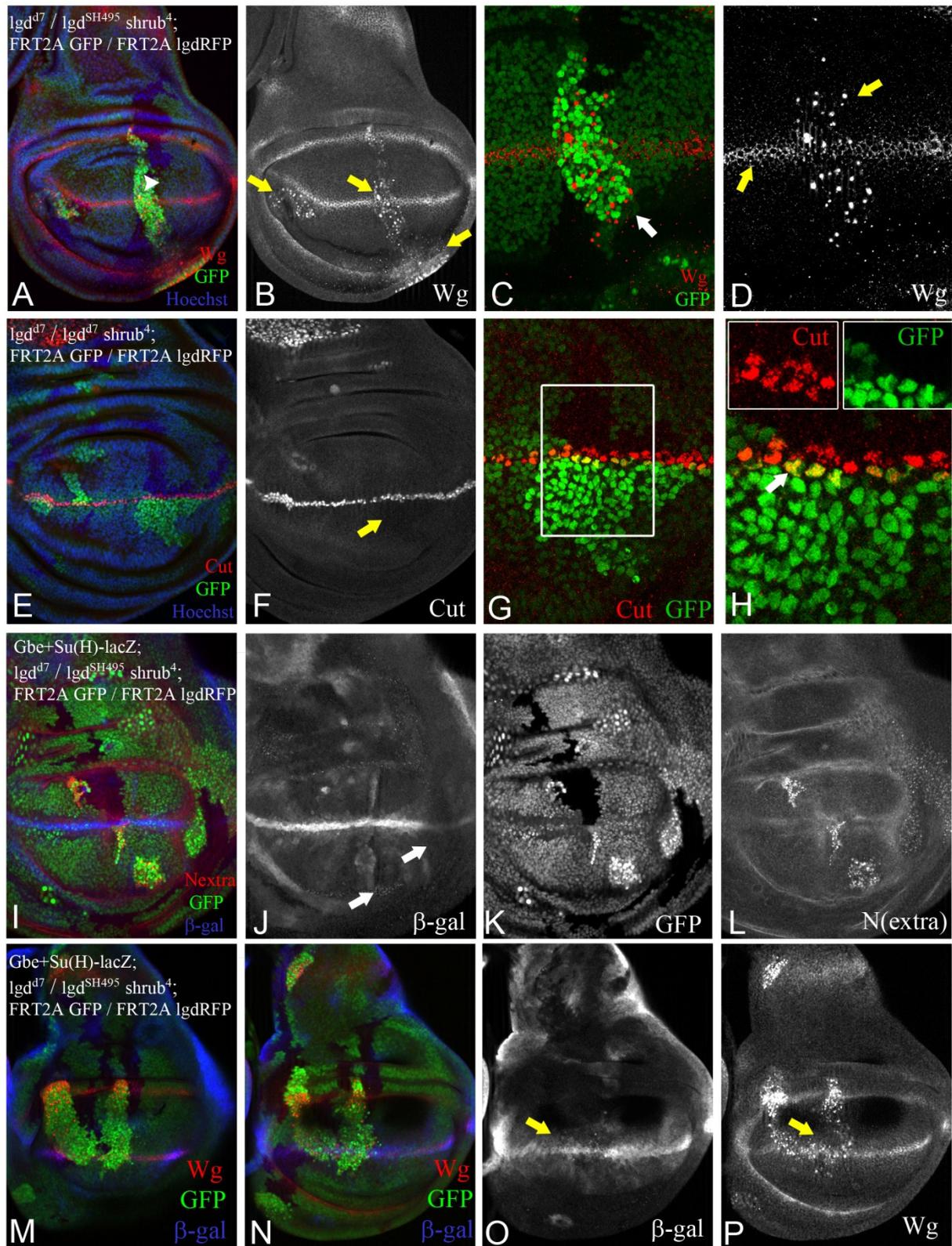
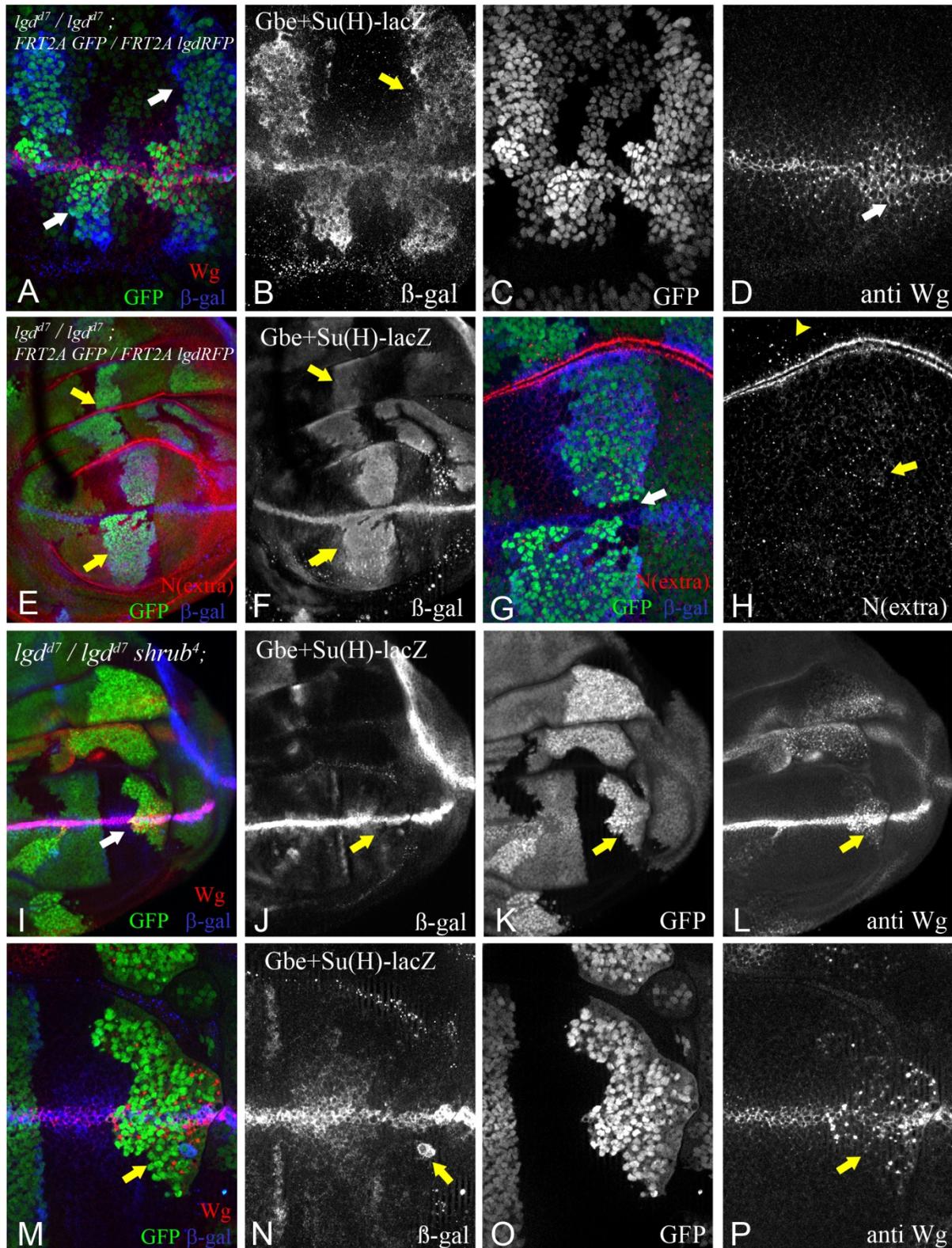


Abb. 2-25: Unterdrückung der ektopischen Aktivierung des Notch-Signalwegs in *lgd<sup>SH495</sup>,shrub<sup>4</sup>/lgd<sup>d7</sup>*, + Zellen. (A-P) Die mutanten Zellen sind durch zwei Kopien GFP (in grün) markiert. *Wg* akkumuliert in den mutanten Klonen (A,B, gelbe Pfeile). Die unterschiedliche Lokalisierung von *Wg* wird durch Pfeile verdeutlicht (C,D). Das Zielgen *Cut* wird nicht ektopisch exprimiert (E-H, weiße Box in G vergrößert in H). In den mutanten

Klonen zeigt sich keine veränderte Expression von Gbe+Su(H) (I-L). Die sichtbare Abschwächung ist auf die Fokusebene zurückzuführen (Pfeil in J). Die Akkumulation des Notch Rezeptors ist aber deutlich (L). Auch Wg Akkumulation tritt ohne eine sichtbare ektopische Aktivierung von Gbe+Su(H) auf (M-P).



**Abb. 2-26: Ektopische Aktivierung des Notch-Signalwegs in *lgd<sup>d7</sup>/lgd<sup>d7</sup>* und Unterdrückung der ektopischen Aktivierung in *lgd<sup>d7</sup>/lgd<sup>d7</sup>, shrub<sup>4</sup>* Zellen. (A-H) In den *lgd<sup>d7</sup>/lgd<sup>d7</sup>* mutanten Bereichen zeigen die Notch Zielgene Gbe+Su(H)-lacZ und Wg die ektopische Aktivierung des Notch-Signalwegs. Die Akkumulation des Notch Rezeptors lässt sich innerhalb der Klone beobachten, ist jedoch verglichen mit der *shrub<sup>4</sup>* Heterozygose deutlich schwächer ausgeprägt (Pfeil in H). (I-P) In *lgd<sup>d7</sup>, shrub<sup>4</sup> / lgd<sup>d7</sup>* Zellen zeigt sich keine ektopische**

Expression von Gbe+Su(H)-lacZ (I-L, vgl. I mit F). Die ektopische Aktivierung von Gbe+Su(H) wird unterdrückt, aber Wg akkumuliert in den mutanten Zellen (M-P, Pfeile in M-P deuten auf den mutanten Bereich. Mutante Zellen werden durch zwei Kopien GFP (grün) markiert.

Die mutanten *Igd<sup>d7</sup>*, *shrub<sup>4</sup> / Igd<sup>d7</sup>* Zellen zeigen wiederum die Akkumulation von Wg, aber keine ektopische Expression von *Gbe+Su(H)* (siehe Abb. 2-26 I-P). RNAi-Experimente bestätigen, dass die Akkumulation von Wg, bei Unterdrückung der *Igd* Funktion mittels RNAi und Reduktion von *shrub*, nicht auf die gesteigerte Transkription von Wg zurückzuführen ist (siehe Anhang Abb. 7-11). Insgesamt zeigen die Untersuchungen, dass die ektopische Aktivierung des Notch Signalweg durch die reduzierte Aktivität von *shrub* in *Igd* Zellen unterdrückt wird.

### **2.3.1.2 Verstärkte Proteinakkumulation und gestörter Abbau in *Igd,shrub/Igd* Zellen**

Die endosomale Akkumulation des Notch Rezeptors (und auch Wg) zeigt sich in *Igd,shrub/Igd* Zellen verstärkt, wohingegen die ektopische Aktivierung von Notch in den Zellen unterdrückt wurde. Um die Herkunft der Vesikel, bzw. das endosomale Kompartiment in dem die verstärkte Akkumulation des Notch Rezeptors in *Igd,shrub/Igd* Zellen auftritt zu identifizieren, wurden verschiedene endosomale Marker überprüft. Es zeigt sich, dass zwei endosomale Proteine, das ESCRT-0 Protein Hrs (Lloyd, Atkinson et al. 2002) und das lysosomale Protein Spinster (Sweeney und Davis 2002) an den Endosomen zusammen mit Notch akkumulieren (siehe Abb. 2-27 A-H, I-P). Die Endosomen sind gegenüber den wildtypischen Kontrollbereichen stark vergrößert und ihr Auftreten auf die mutanten Bereiche beschränkt. Sowohl das Auftreten als auch die Stärke des endosomalen Phänotyps in *Igd* mutanten Zellen wird durch die *shrub<sup>4</sup>* Heterozygose deutlich verstärkt. In *Igd<sup>d7</sup>* mutanten Kontroll-Klonen sind die endosomalen Phänotypen, d.h. die Akkumulation von Notch, schwächer und im Gegensatz zur ektopischen Aktivierung des Notch-Signalwegs nicht so deutlich ausgeprägt (siehe Abb. 2-26 E-H).

Der spät-endosomale Marker Rab7, der in *Igd* mutanten Zellen häufig die Endosomen mit dem Notch Rezeptor markiert (siehe Abschnitt 2.1 und Anhang Abb. 7-12), zeigt jedoch in *Igd<sup>SH495</sup>*, *shrub<sup>4</sup>/Igd<sup>d7</sup>* Zellen eine deutlich reduzierte Assoziation mit den vergrößerten Vesikeln (siehe Abb. 2-28). Der Marker für die Recycling Endosomen Rab11 zeigt weder eine Assoziation mit den Notch Endosomen noch eine auffällige Akkumulation des Markers in den *Igd / Igd, shrub* mutanten Zellklonen (siehe Abb. 2-24 H-L). Daher scheint das Rab11-Recyclingkompartiment nicht betroffen zu sein. Die Proteinakkumulation betrifft nicht nur

den Notch Rezeptor und Wg sondern auch DI akkumuliert in den mutanten Zellen (siehe Abb. 2-28 M-P). Dies deutet auf einen generellen Defekt im endosomalen Transportweg hin wie dies auch für *Igd* mutanten Zellen gezeigt wurde ((Childress, Acar et al. 2006, Gallagher und Knoblich 2006, Jaekel und Klein 2006), eigene Beobachtungen).

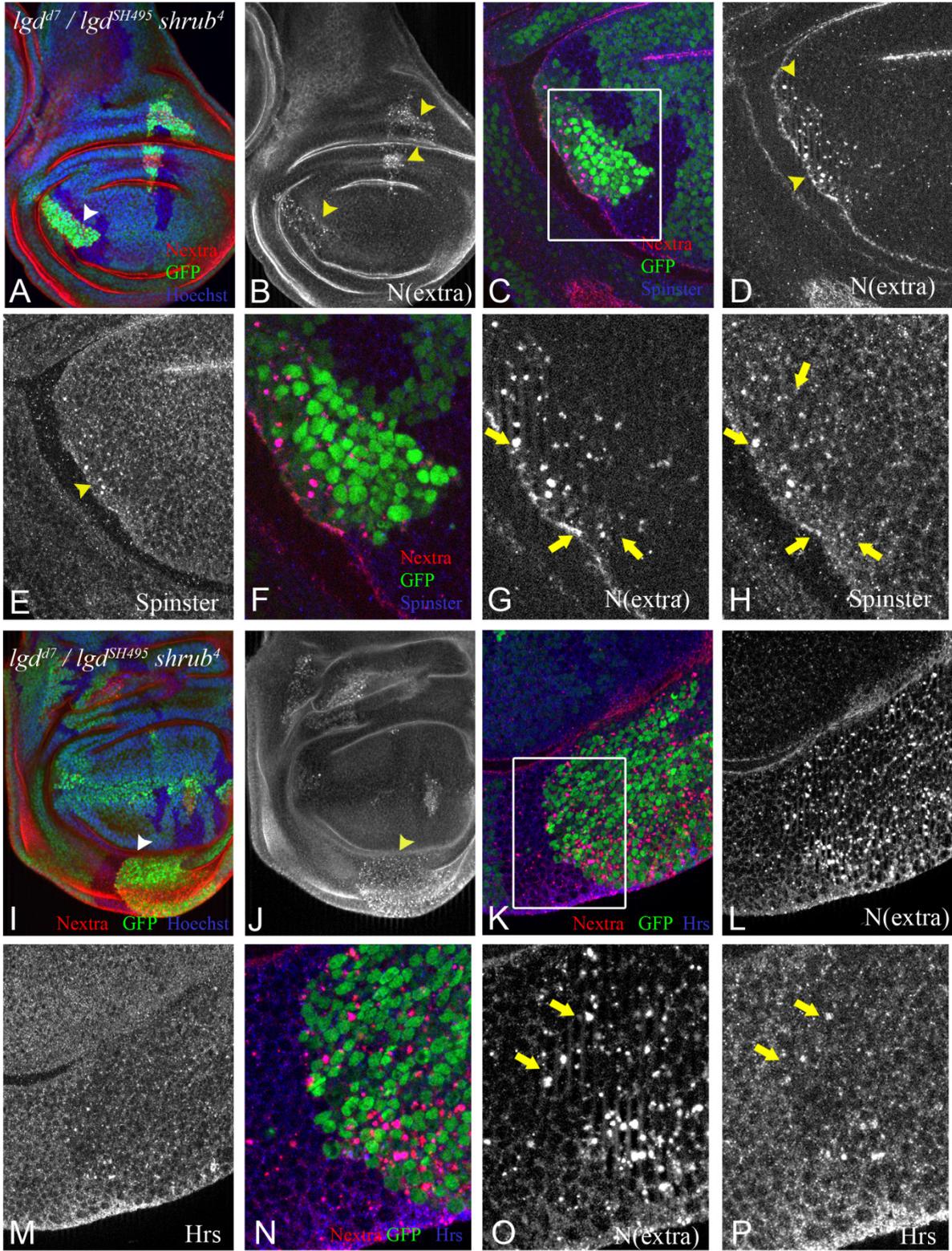


Abb. 2-27: Verstärkte Akkumulation des Notch Rezeptors in Spinster und Hrs positiven reifenden Endosomen

in *Igd<sup>SH495</sup>,shrub<sup>4</sup>/Igd<sup>d7</sup>, +* Zellen. (A-P) Die mutanten Zellen sind durch die Präsenz von zwei Kopien GFP (grün) gekennzeichnet. Notch (in den Mehrkanalbildern in rot) akkumuliert in diesen Zellen in Spinster (A-H, in blau) und Hrs (I-P, in blau) positiven endosomalen Kompartimenten. Die Akkumulation ist auf die mutanten Bereich beschränkt. Die weißen Rahmen in den Detailaufnahmen in C und K sind noch einmal in G bzw. N vergrößert dargestellt. Gelbe Pfeile deuten auf die Kolokalisation der Marker in vergrößerten Endosomen. (Genotyp: *hsFlp; Igd<sup>SH495</sup>,shrub<sup>4</sup>/Igd<sup>d7</sup>; IgdP Igd-RFP 68E FRT2A / ubi GFPnls FRT2A*)

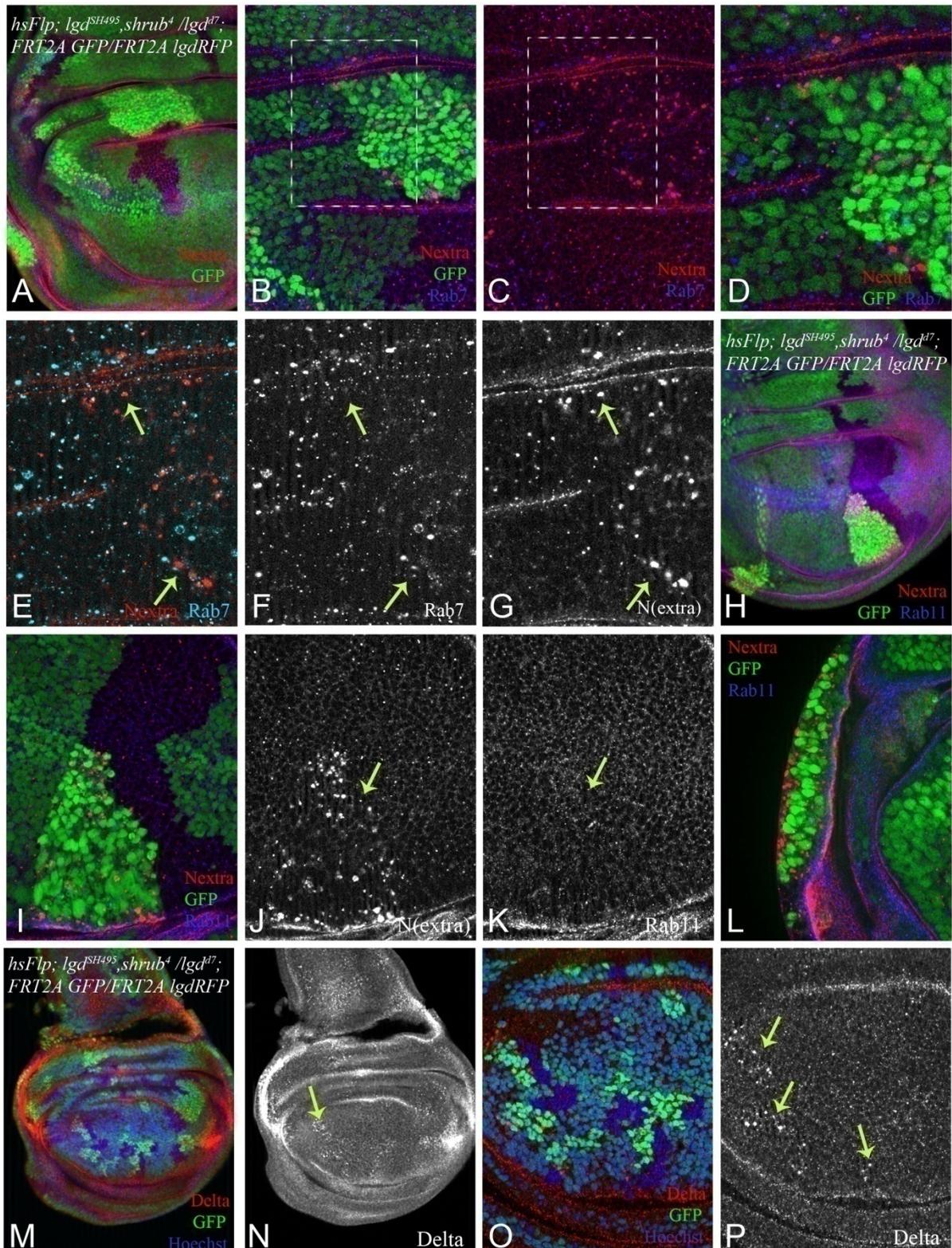


Abb. 2-28: Der Notch Rezeptor akkumuliert in *Igd<sup>SH495</sup>,shrub<sup>4</sup>/Igd<sup>d7</sup>, +* Zellen nicht in Rab7 positiven späten

**Endosomen oder Rab11 Recycling-Endosomen. (A-P)** Die mutanten Zellen durch die Präsenz von zwei Kopien GFP (grün) gekennzeichnet. Antikörperfärbung gegen Notch (A-L, in Mehrkanalbildern in rot Einzelkanäle in G und J) und gegen Rab7 (Abbauweg) (blau/türkis, Einzelkanal in F) und Rab11 (Recyclingweg). Die Assoziation von Notch mit dem Marker Rab7 ist reduziert im mutanten Bereich (Pfeile, A-G). Die Antikörperfärbung gegen Rab11 zeigt keine Assoziation mit Notch (H-L, Pfeile J, K). Der Ligand des Notch Rezeptors, Delta, akkumuliert ebenfalls in den mutanten Zellen (M-P, Pfeile in N,P).

Die Phänotypen der *Igd<sup>d7</sup>/Igd<sup>d7</sup>,shrub* mutanten Zellen sind verglichen mit *Igd<sup>SH495</sup>shrub<sup>4</sup>/Igd<sup>d7</sup>* sehr ähnlich, eventuell leicht verstärkt. Der Notch Rezeptor akkumulierte in Hrs positiven Endosomen und auch die vermehrte Lokalisierung von Hrs in endosomalen Strukturen wird in mutanten Zellen deutlich (siehe Abb. 2-29), und die reduzierte Assoziation mit Rab7 wurde ebenso beobachtet (siehe Abb. 2-29). Die Untersuchungen mit den endosomalen Markern wurden in *Igd*-RNAi Experimenten ohne die Koexpression von UAS-Dcr2 wiederholt, da die Koexpression von UAS-Dcr2 zu kaum auswertbaren Imaginalscheiben mit stark reduziertem Wachstum führte. Es konnte bestätigt werden, dass die Notch Vesikel in den mutanten Zellen auch häufig mit Hrs kolokalisieren (siehe Anhang Abb. 7-13 A-H). Die Akkumulation von Hrs bei *Igd* Funktionsverlust (*Igd*-RNAi und Dcr2 Koexpression) und intakter Funktion von *shrub* wurde kaum beobachtet (siehe Anhang Abb. 7-13 I-L). Auch die Kolokalisation mit Rab7 wird bei Reduktion von *shrub* deutlich reduziert (siehe Abb. 2-29). Die Kolokalisierung von Notch mit Rab5 in den vergrößerten Endosomen und eine leichte Akkumulation von Rab5 ist deutlich (siehe Abb. 2-29). Im mutanten Bereich zeigt Rab5 eine Assoziation mit den vergrößerten Endosomen, jedoch betrifft dies nicht alle großen Vesikel, die den Notch Rezeptor beinhalten (siehe Abb. 2-29 M,N). Die gesteigerte Assoziation mit Rab5 sowie die reduzierte Assoziation mit Rab7 deuten auf einen Defekt während der endosomalen Reifung und die Akkumulation von ESCRT-0 (Hrs) zusammen mit der endosomalen Fracht (der Notch Rezeptor) könnte auf eine gestörte ILV Bildung hindeuten.

Zusammengefasst zeigt sich, dass bei der Reduktion der Aktivität von *shrub* die Akkumulationen des Notch Rezeptors in Endosomen *Igd* mutanter Zellen verstärkt. An diesen Endosomen akkumulieren auch die endosomalen Proteine Hrs und Spinster. Neben dem Notch Rezeptor akkumulieren auch weitere (Fracht-) Proteine wie Wg und Delta in den mutanten Zellen. Dies ist auch bei *Igd* mutanten Zellen der Fall (Jaekel und Klein 2006). Die verstärkte Assoziation sowohl mit dem ESCRT-0 Protein Hrs als auch mit dem spät endo-lysosomalen Marker Spinster und außerdem die reduzierte Assoziation mit dem spät

endosomalen Marker Rab7 deuten auf einen endosomalen Reifungs- und/oder Transportdefekt hin. Dies zeigt, dass sich in *lgd*, *shrub* /*lgd* Zellen die Eigenschaften der Endosomen in denen Notch akkumuliert von *lgd* mutanten Zellen unterscheiden.

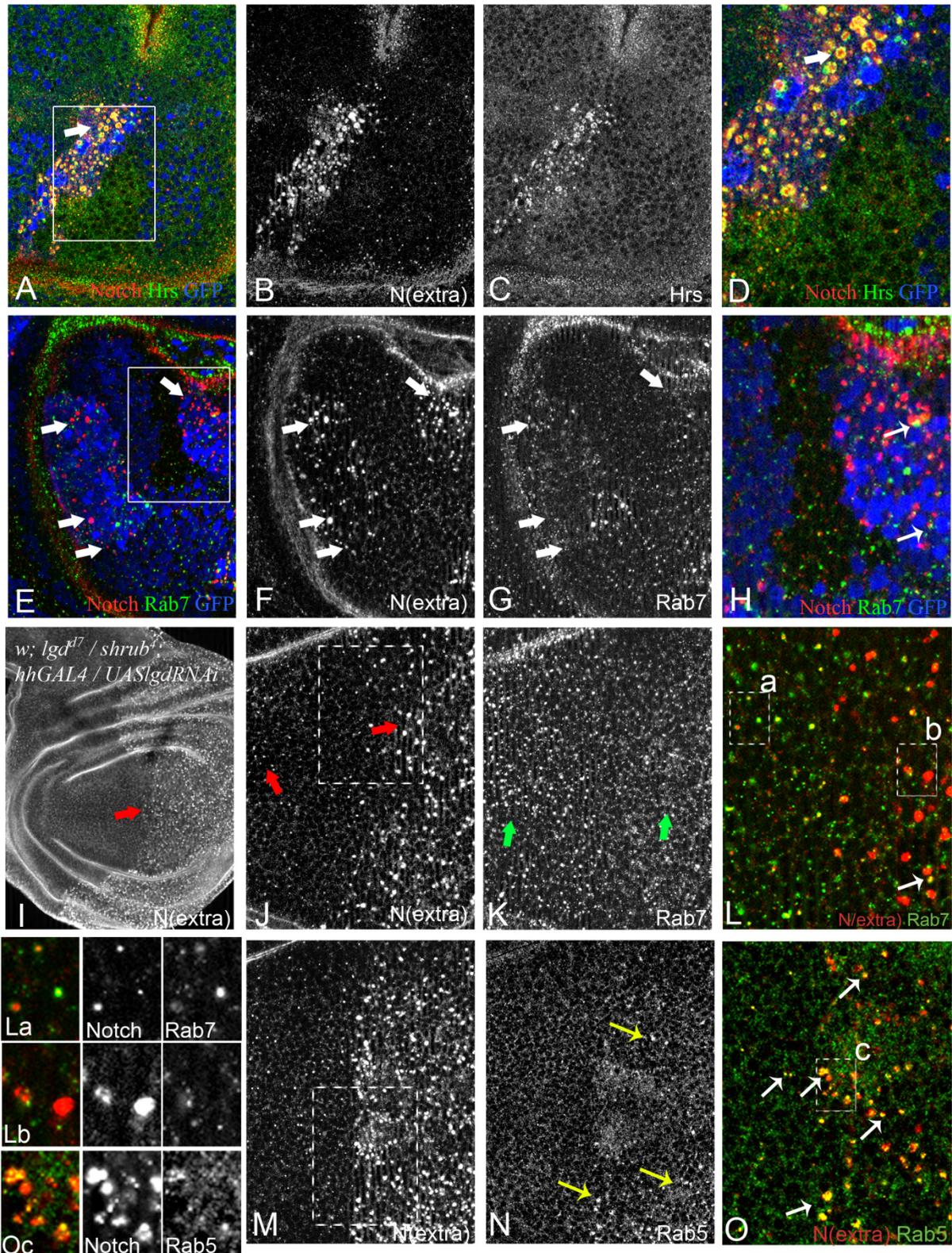


Abb. 2-29: Bestätigung der endosomalen Phänotypen in *lgd<sup>d7</sup>,shrub<sup>4</sup>/lgd<sup>d7</sup>, +* Zellen und durch RNAi. (A-H) Die *lgd<sup>d7</sup>,shrub<sup>4</sup>/lgd<sup>d7</sup>, +* Zellen sind durch zwei Kopien GFP (hier in blau) markiert. Antikörperfärbung gegen

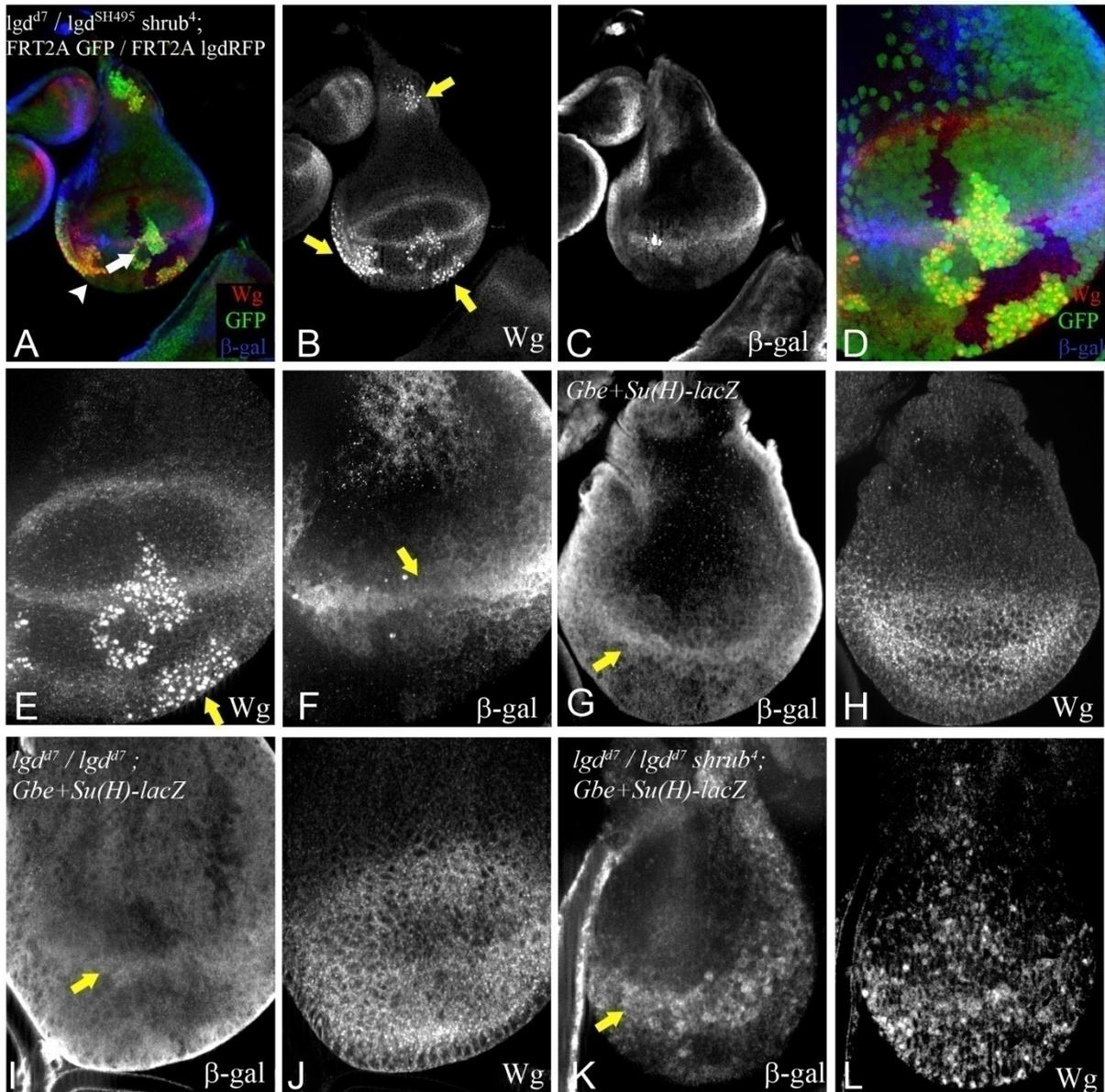
Notch(rot) und Hrs (grün) (A-C, Ausschnitt in A vergrößert in D, Pfeil) zeigt die deutliche Akkumulation im mutanten Bereich. Die anti-Hrs Färbung zeigt eine deutliche Kolokalisierung mit Notch in den stark vergrößerten Endosomen. Rab7 (in grün) ist wie in *Igd<sup>SH495</sup>,shrub<sup>4</sup> / Igd<sup>d7</sup>* Zellen kaum mit den Notchvesikeln assoziiert (E-H). **(I-O)** Ähnliche Ergebnisse wurden durch Lgd-RNAi Expression (in *Igd<sup>d7</sup>,shrub<sup>4</sup>* Heterozygose) im posterioren Kompartiment erzielt (siehe auch Anhang). Die Assoziation von Notch mit Rab7 ist wiederum reduziert (I-L, vergrößert La,Lb). Einige der großen Notch gefüllten Endosomen zeigen die Assoziation mit Rab5. (Genotyp A-H: *hsFlp; Igd<sup>d7</sup> / Igd<sup>d7</sup>,shrub<sup>4</sup>; FRT2A ubiGFP/FRT2A IgdPIgdRFP*). (Genotyp I-O: *w; Igd<sup>d7</sup> FRT40A/shrub<sup>4</sup> FRTG13; hhGAL4 / UAS Igd-RNAi (1+3)*, Expression bei 29°C)

### 2.3.2 Analyse der Aktivierung des Notch-Signalwegs in *Igd<sup>d7</sup>,shrub<sup>4-1</sup> / Igd<sup>d7</sup>* Mutanten

Um die Aktivierung und Lokalisierung von Notch in den *Igd<sup>d7</sup>,shrub<sup>4-1</sup> / Igd<sup>d7</sup>* Zellen weiter zu klären wurden die Imaginalscheiben mutanter Larven untersucht. Diese Larven erreichen die frühesten Phasen des dritten Larvenstadiums, sind aber kleiner als wildtypische Larven (Jäckel 2010).

Große Klone (*Igd<sup>SH495</sup>,shrub<sup>4</sup> / Igd<sup>d7</sup>*) aus der vorigen klonalen Analyse zeigen im frühen bis mittleren dritten Larvenstadium keine ektopische Gbe+Su(H) Aktivierung aber die deutliche Akkumulation von Wg (siehe Abb. 2-30 A-F). Die Gbe+Su(H) Expression in wildtypischen Imaginalscheiben zeigt die Aktivität an der D/V Grenze und darüber hinaus auch einige Aktivität im restlichen Flügelfeld (siehe Abb. 2-30 G,H). In *Igd<sup>d7</sup>* mutanten Scheiben kann bereits in frühen Entwicklungsstadien eine ektopische Gbe+Su(H)-lacZ Aktivierung in der gesamten Flügelscheibe festgestellt werden und es zeigt sich auch eine Verbreiterung und Akkumulation von Wg (siehe Abb. 2-30 I-J). Für die Wg Expression sind hier die Rückschlüsse auf die Aktivität des Notch-Signalwegs nur beschränkt möglich. Die kurzen Distanzen zwischen der ringförmigen Wg Domäne und der beginnenden Expression an der D/V Grenze in frühen Stadien machen eine genaue Lokalisierung der Wg exprimierenden Zellen schwierig, da Wg sekretiert wird (Zecca, Basler et al. 1996, Neumann und Cohen 1997, Strigini und Cohen 2000). Die Defekte im Proteinabbau in *Igd* mutanten Zellen steigern darüber hinaus die Akkumulation von Wg, wodurch die Analyse weiterhin erschwert wurde. In den frühen *Igd<sup>d7</sup>shrub<sup>4</sup> / Igd<sup>d7</sup>* mutanten Scheiben zeigt sich keine ektopische Aktivierung des Notch-Signalwegs. Die Gbe+Su(H)-lacZ Expression zeigt sich ähnlich wie im Wildtyp, aber der Streifen an der D/V Grenze erscheint etwas verbreitert (siehe Abb. 2-30 K,L). Die epitheliale Integrität dieser mutanten Scheiben ist stark beeinträchtigt. Viele Zellkerne sind fragmentiert, so dass Zelltod zumindest teilweise die beobachtete Verbreiterung zur Folge hat. Abseits der vermeintlich durch die Gbe-Su(H) Expression markierten D/V Grenze (gelbe

Pfeile in Abb. 2-30) zeigt sich keine ektopische Expression, wie sie in *Igd* homozygot mutanten Scheiben deutlich wird. Ein Expressionsmuster für Wg ist durch die deutlich verstärkte Akkumulation und offensichtlich veränderte Lokalisierung des Proteins kaum zu definieren. Insofern erscheint eine genaue Lokalisierung der Wg exprimierenden Zellen nicht möglich.



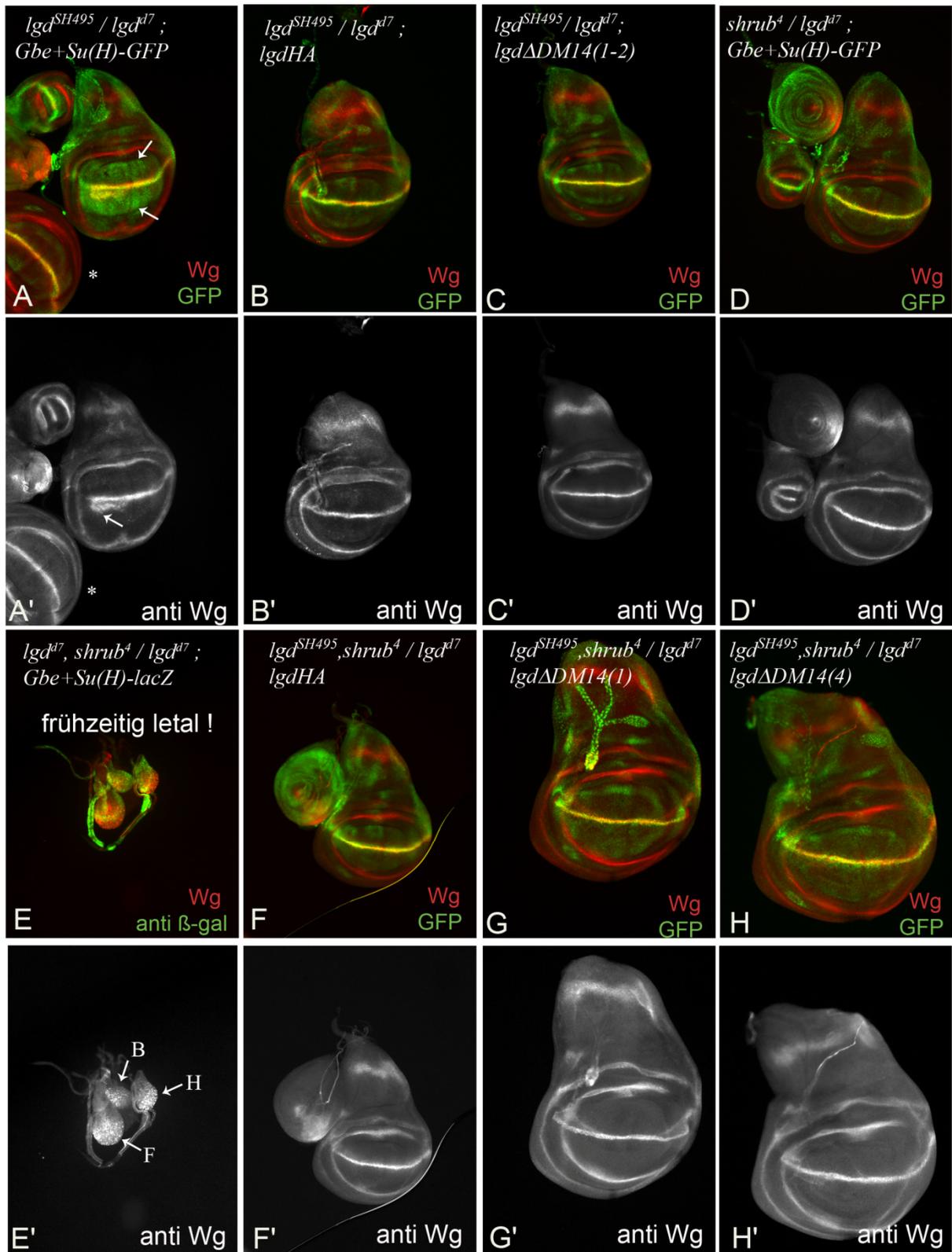
**Abb. 2-30: Aktivierung des Notch-Signalwegs in *Igd<sup>d7</sup>/Igd<sup>d7</sup>, shrub* Imaginalscheiben in frühen Phasen der Flügelentwicklung.** (A-F) Flügelimaginalscheibe des frühen bis mittleren dritten Larvenstadiums mit *Igd<sup>SH495</sup>, shrub<sup>4</sup>/Igd<sup>d7</sup>* mutanten Zellen markiert durch zwei Kopien GFP. Es zeigt sich die starke Akkumulation von Wg (anti Wg in A-B,D-E) aber keine offensichtliche ektopische Aktivität des N-Signalwegs anhand der Reporterexpression von Gbe+SuH((anti b-gal in A,C-D,F). (G-L) Die Gbe+Su(H)- und die Wg Expression am Anfang des frühen dritten Larvenstadiums, Wildtyp (G-H). In frühen *Igd<sup>d7</sup>/Igd<sup>d7</sup>* Scheiben zeigt sich die ektopische Aktivierung anhand der ubiquitären Reporterexpression in (I-J). Die Wg Expression an der D/V Grenze wird erst ab diesem Entwicklungspunkt abhängig von der Aktivität des Notch-Signalwegs. Die Reporterexpression in Imaginalscheiben von *Igd<sup>d7</sup>/Igd<sup>d7</sup>, shrub* mutanten Larven zeigt keine ektopische Expression sondern eher ein wiltypische Muster (K, vgl. mit I und G). Die Verteilung von Wg (L) zeigt eine

enorme Akkumulation von Wg verstärkt im gesamten unteren Bereich der Scheibe (späteres Flügelfeld), und zum Teil auch im oberen Bereich (Notum). Die in wildtypischen und *Igd* mutanten Scheiben erkennbare ringförmige Domäne sowie die Expression von Wg an der vermeintlichen D/V Grenze sind in diesen mutanten Scheiben aufgrund der endosomalen Akkumulationen sowie Zelltod kaum zu erkennen.

### 2.3.3 Funktionale Analyse der Lgd-Konstrukte im *Igd* / *Igd,shrub* mutanten Hintergrund

Im Rahmen der Bachelorarbeit von Sabrina Haenlein und der Diplomarbeit von Nadja Ohlenhard wurden die Lgdkonstrukte im sensitivierten genetischen Hintergrund *Igd<sup>SH495</sup>,shrub<sup>4</sup>/Igd<sup>d7</sup>* und *Igd<sup>d7</sup>,shrub<sup>4</sup>/Igd<sup>d7</sup>* (Ohlenhard 2011) bei reduzierter Funktion von *shrub* untersucht. Beide Untersuchungen führten zu sehr ähnlichen Ergebnissen bezüglich der Funktionalität der Konstrukte, unabhängig von der allelischen *Igd* Komposition. Die Resultate für *Igd<sup>SH495</sup>,shrub<sup>4</sup>/Igd<sup>d7</sup>* werden in Abb. 2-31 und Abb. 2-32 zusammengefasst. Für die Notchaktivität wurde die Expression von Gbe+Su(H)GFP und Wg in Flügelimaginalscheiben analysiert. Die *Igd<sup>SH495</sup>/Igd<sup>d7</sup>* hypomorphen Mutanten können genauso, wie bereits für *Igd<sup>d7</sup>* amorphe Mutanten gezeigt wurde, durch LgdP-Lgd-Konstrukte mit mindestens zwei DM14 Domänen gerettet werden (siehe Abb. 2-31 A-D). Die zusätzliche Reduktion von *shrub* in der *Igd<sup>d7</sup>* homozygoten oder *Igd<sup>d7</sup>/Igd<sup>SH495</sup>* transheterozygoten Situation kann durch „full length“ Lgd (siehe Abb 2-31 E,F) gerettet werden. Die Rettung ist vollständig und führt zu phänotypisch unauffälligen, *shrub<sup>4</sup>* heterozygoten adulten Tieren.

Da die DM14-Domänen die Interaktion mit Shrub vermitteln (Jäckel 2010) wurden die Deletionskonstrukte im sensitivierten genetischen Hintergrund untersucht. Unter diesen Bedingungen verändert sich die beobachtete Funktionsfähigkeit der Lgd Varianten gegenüber dem *Igd<sup>d7</sup>* Hintergrund. Die Konstrukte mit Einzeldelationen der ersten oder der vierten DM14 Domäne retten den Phänotyp zwar noch vollständig (siehe Abb. 2-31 G,H), aber Konstrukte mit nur zwei DM14 Domänen zeigen eine gesteigerte Aktivierung von Notch im sensibilisierten genetischen Hintergrund. Obwohl die Konstrukte mit zwei DM14 Domänen in der Lage sind den Ausfall von *Igd* (*Igd<sup>SH495</sup>/Igd<sup>d7</sup>* oder *Igd<sup>d7</sup>/Igd<sup>d7</sup>*) vollständig kompensieren, können sie diese Funktionalität bei der Reduktion von *shrub* nicht aufrechterhalten (siehe Abb. 2-32 A-D). Der Verlust der ersten beiden Domänen zeigt am deutlichsten eine Expansion der Expressionsdomäne von Wg an der D/V Grenze, ähnlich einem starken hypomorphen *Igd* Phänotyp (siehe Abb. 2-32 A).



**Abb. 2-31: Funktionalität der Lgd-Deletionskonstrukte in  $lgd^{\Delta 7} / lgd^{SH495} shrub^4$  Mutanten.** (A-M) Expression von Wg (Antikörperfärbung in rot) und Gbe+Su(H)GFP (grün) in  $lgd^{SH495} shrub^4 / lgd^{\Delta 7}$  Flügelimaginalscheiben mit LgdP-Lgd-Konstrukten. Die Expression des Reporters Gbe+Su(H)-GFP (in grün) in Imaginalscheiben ist in der hypomorphen allelischen Kombination  $lgd^{SH495} / lgd^{\Delta 7}$  (\* vgl. mit  $lgd^{SH495} / CyO^{wg-lacZ}$ ) erhöht. Die ektopische Expression von Wg (in rot) ist vorhanden aber schwächer ausgeprägt als in  $lgd^{\Delta 7}$ . (A). Vollständige Lgd-Transgene (Lgd-HA als Beispiel in B) und Deletionskonstrukte mit zwei oder mehr DM14 Domänen retten den  $lgd^{SH495} / lgd^{\Delta 7}$  Phänotyp (Bsp. in C). In  $shrub4 / lgd^{\Delta 7}$  Flügelimaginalscheiben ist die Expression von Wg und

Gbe+Su(H)-GFP wildtypisch (D). Die  $lgd^{SH495}, shrub^4 / lgd^{d7}$  mutanten Larven erreichen nicht das späte L3 Stadium (E). Vollständige Lgd-Konstrukte und die Deletionskonstrukte mit drei DM14 Domäne retten  $lgd, shrub^4 / lgd^{d7}$  vollständig. Die Expression von Wg und Gbe+Su(H) ist wildtypisch (F-H).

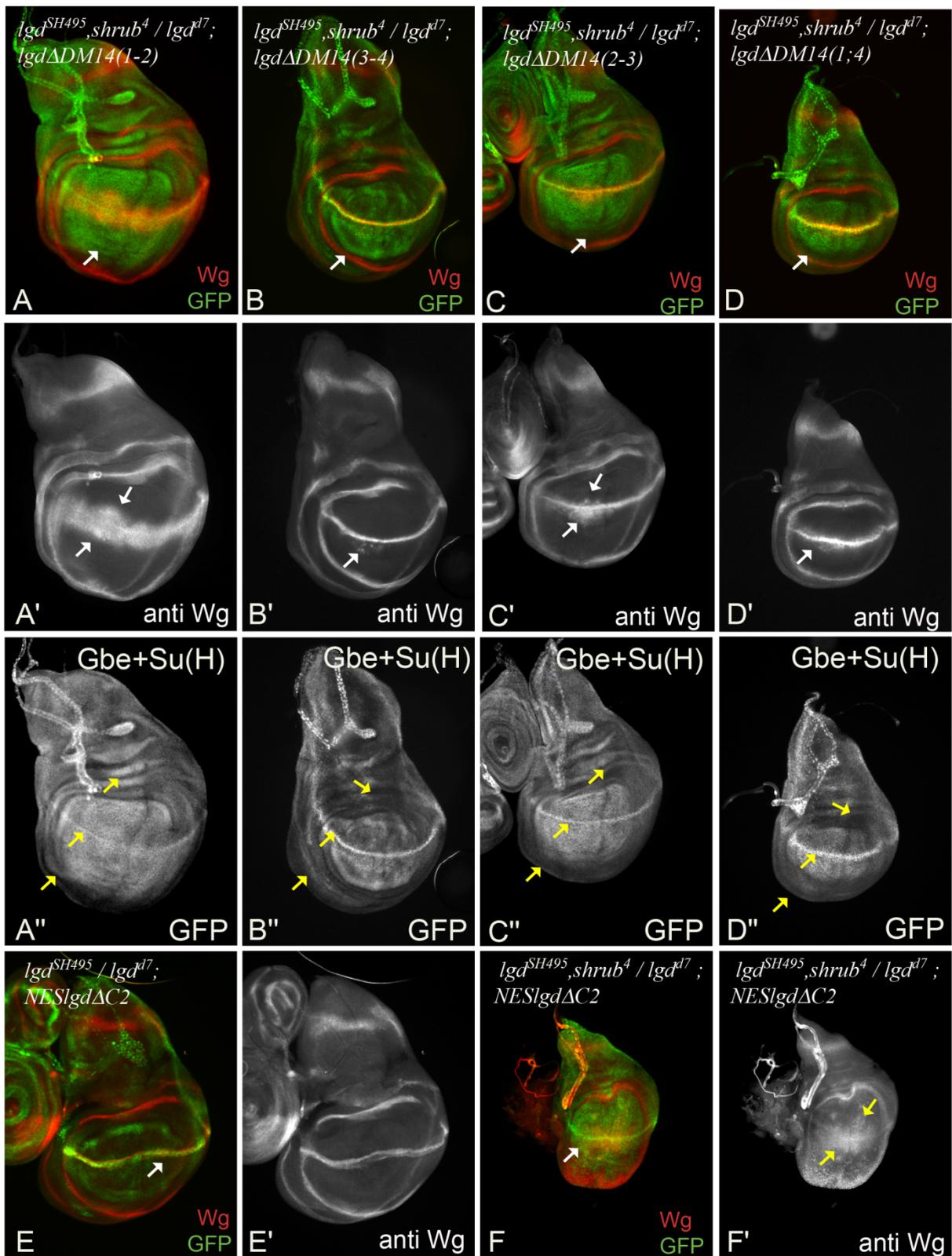


Abb. 2-32: Funktionalität der Lgd-Deletionskonstrukte in  $lgd^{d7} / lgd^{SH495} shrub^4$  Mutanten. (A-F) Expression von Wg (Antikörperfärbung in rot) und Gbe+Su(H)GFP (grün) in  $lgd^{SH495} shrub^4 / lgd^{d7}$  Flügelimaginalscheiben mit LgdP-Lgd-Konstrukten. Bei Konstrukten deren Anzahl DM14-Domänen auf zwei reduziert ist, zeigt sich,

wobei die ektopische Aktivierung von Notch bei Lgd $\Delta$ DM14(1-2) am stärksten ist (Vgl. A-D, Pfeile deuten auf die ektopische Expression von Wg in A-D' und Gbe+Su(H)GFP in A-D''). NESLgd $\Delta$ C2 führt zur Rettung des Lgd<sup>SH495</sup>/Lgd<sup>d7</sup> Phänotyps (E) und zu einer partiellen Rettung der verfrühten Letalität in Lgd<sup>SH495</sup>, shrub<sup>4</sup> / Lgd<sup>d7</sup> Mutanten. Die Imaginalscheiben sind deutlich kleiner als bei den verschiedenen  $\Delta$ DM14-Konstrukten, zeigen aber eine ektopische Aktivierung des Notch-Signalwegs (F). (Abb. teilweise übernommen von S.Haenlein)

Weiterhin wurden auch die  $\Delta$ C2-Konstrukte untersucht. Das im Lgd<sup>d7</sup> Hintergrund funktionalere Konstrukt, NES-Lgd $\Delta$ C2HA, kann den Lgd<sup>SH495</sup>/Lgd<sup>d7</sup> Phänotyp bis zum adulten Stadium retten (siehe Abb. 2-32 E), und auch die verfrühte larvale Letalität im sensitivierten Hintergrund teilweise retten. Die Funktionalität ist aber stark unterdrückt. In den Scheiben ist eine starke Aktivierung des Notch-Signalwegs offensichtlich (siehe Abb. 2-32 F) aber nicht nur die Scheiben sondern auch die Larven zeigen ein reduziertes Wachstum, erreichen aber ein späteres Stadium und überleben länger als ohne ein Konstrukt (siehe Abb. 2-32 E). Das Lgd $\Delta$ C2-Konstrukt ohne die NES und Konstrukte mit weniger als zwei DM14 Domänen können die verfrühte Letalität im sensitivierten Hintergrund nicht retten.

**Tabelle 2.2 Funktionalität der LgdP-Lgd-Konstrukte im Lgd, shrub / Lgd Hintergrund.** Es wurden nur Konstrukte untersucht, welche die frühzeitige Letalität unterdrücken konnten.

LgdP Lgd-Konstrukte in att86Fb	Notch-Signalweg in Lgd <sup>d7</sup> od. SH495, shrub <sup>4</sup> / Lgd <sup>d7</sup>	Letalität / Adulte in Lgd <sup>d7</sup> od. SH495, shrub <sup>4</sup> / Lgd <sup>d7</sup>
-	Ektopische Aktivierung unterdrückt (s. 2.3.3)	L2 bis früheste L3 Stadien
Lgd-HA Lgd-RFP Lgd-GFP	Normalisiert /wildtyp	wildtyp
Lgd- $\Delta$ DM14(1), $\Delta$ DM14(4),	normalisiert/wildtyp	wildtyp
$\Delta$ DM14(1-2), $\Delta$ DM14(2-3), $\Delta$ DM14(1;4), $\Delta$ DM14(3-4)	Ektopische Aktivierung, am stärksten in $\Delta$ DM14(1-2)	bis Pharat adults, DM14(1-2) früh puppal letal
NES- $\Delta$ C2	Ektopische Aktivierung	Früh puppal letal, unterdrücktes Wachstum
andere Konstrukte	nicht untersucht	frühe Letalität L2/L3

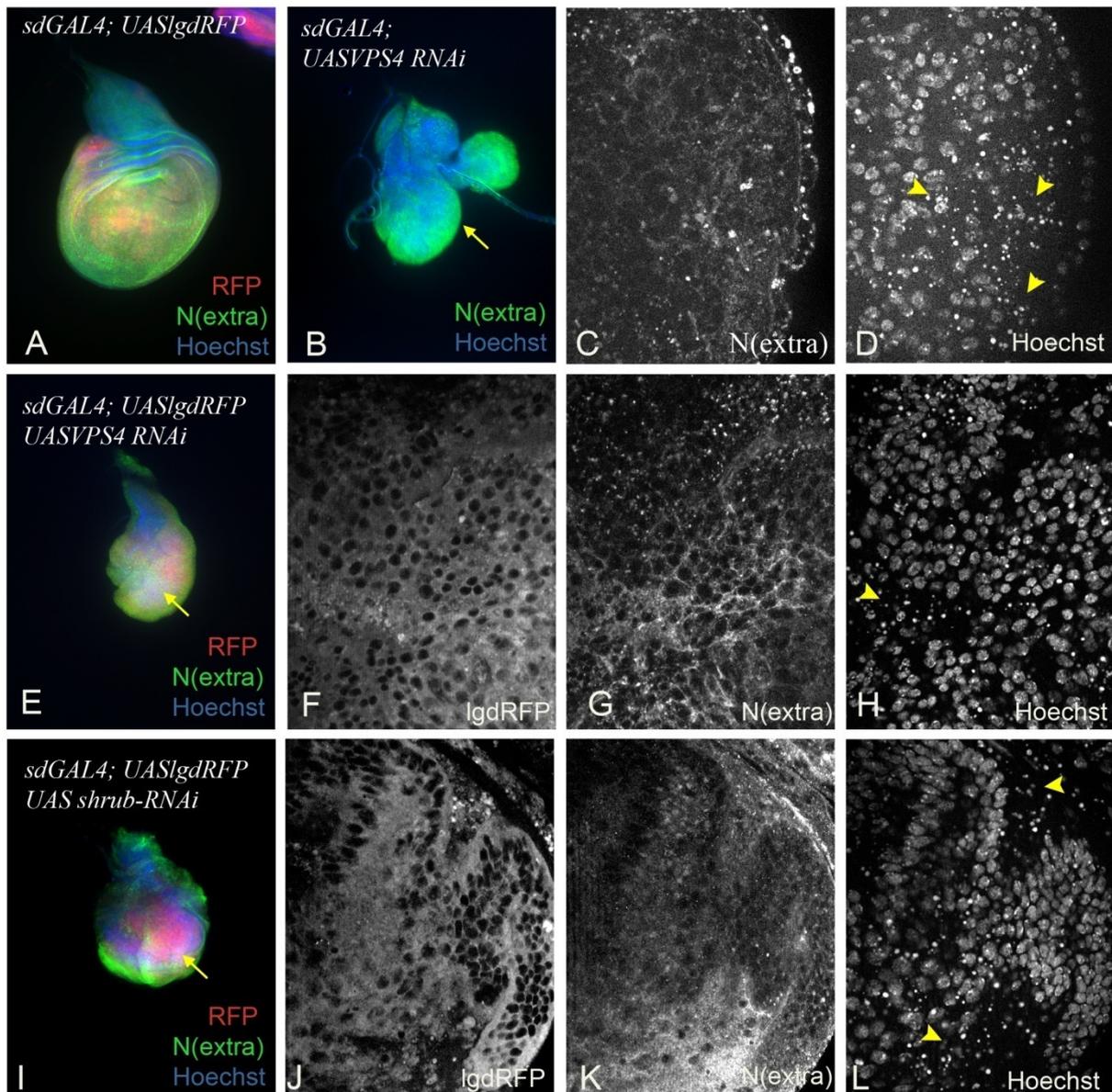
Insgesamt legt dies nahe, dass die zweite oder die erste und zweite Domäne bei der Regulation von Shrub am effektivsten ist, und dass die Redundanz der DM14 Domänen für die Regulation bei reduzierter Aktivität von Shrub entscheidend ist. Die vier DM14 Domänen sind in den beiden Konstrukten vorhanden und werden für die physische Interaktion

zwischen Shrub und Lgd benötigt (Jäckel 2010, Ohlenhard 2011, Troost, Jaeckel et al. 2012). Die gesteigerte Funktionalität von NES-Lgd $\Delta$ C2HA gegenüber Lgd $\Delta$ C2HA in der *shrub* heterozygoten Situation lässt vermuten, dass die Interaktion zwischen Lgd und Shrub im Zytoplasma stattfindet.

#### **2.3.4 Interaktion mit Shrub und Lokalisierung von Lgd bei Verlust der VPS4 Funktion**

Die Interaktion zwischen der ESCRT III Untereinheit *shrub* und *lgd* deutet auf die Beteiligung von Lgd an der ESCRT vermittelten ILV Bildung hin. Sollte Lgd bei der Vermittlung der Funktion von *shrub* eine aktive Rolle spielen, könnte diese Interaktion an der endosomalen Membran vermuten werden. Die bisherigen Untersuchungen zeigten aber, dass Lgd ein zytoplasmatisch lokalisiertes Protein und nicht offensichtlich mit Endosomen assoziiertes ist. Um die Interaktion von Lgd und Shrub näher zu charakterisieren wurde der Funktionsverlust des „fünften“ ESCRT Komplexes, VPS4 untersucht. Die ESCRT III-Untereinheiten befinden sich als Monomere in der inaktiven geschlossenen Form im Zytoplasma (Babst 2005). Deren Bindung an die limitierende Membran der Endosomen wird erst offensichtlich, wenn die Disassemblierung des ESCRT-Komplex durch die AAA-ATPase VPS4 nicht erfolgt. Dies führt dann dazu, dass die Untereinheiten am Endosom verbleiben (Babst 2005).

Da eine entsprechende Lokalisierung von Lgd möglicherweise nur unter diesen Bedingungen sichtbar wird, wurde der Funktionsverlust von VPS4 untersucht. Der Verlust der VPS4 Funktion durch RNAi führt zu ähnlichen Phänotypen wie der ESCRT Funktionsverlust (Rodahl, Haglund et al. 2009). Neben der Akkumulation des Notch Rezeptors in den Zellen ist Zelltod und eine gestörte Morphologie des Gewebes offensichtlich ((Rodahl, Haglund et al. 2009), siehe Abb. 2-33 B-C). Die Bestimmung der subzellulären Lokalisierung von LgdP-Lgd-RFP war aufgrund des schwachen Signals nicht möglich. Mittels Überexpression zeigt sich die Lokalisierung von UASlgdRFP bei VPS4 Funktionsverlust immer noch zytoplasmatisch und nicht offensichtlich mit endosomalen Strukturen assoziiert (siehe Abb. 2-33). Die durch die Überexpression von LgdRFP ausgelöste Gewebeproliferation ist in beiden Fällen unterdrückt (siehe Abb. 2-33 vgl. A mit E bzw. I). Diese Ergebnisse lassen auf eine Interaktion von Shrub und Lgd im Zytosol rückschließen. Der Verlust von *shrub* zeigt auch keine Veränderung der Lokalisierung von Lgd (siehe Abb. 2-33).

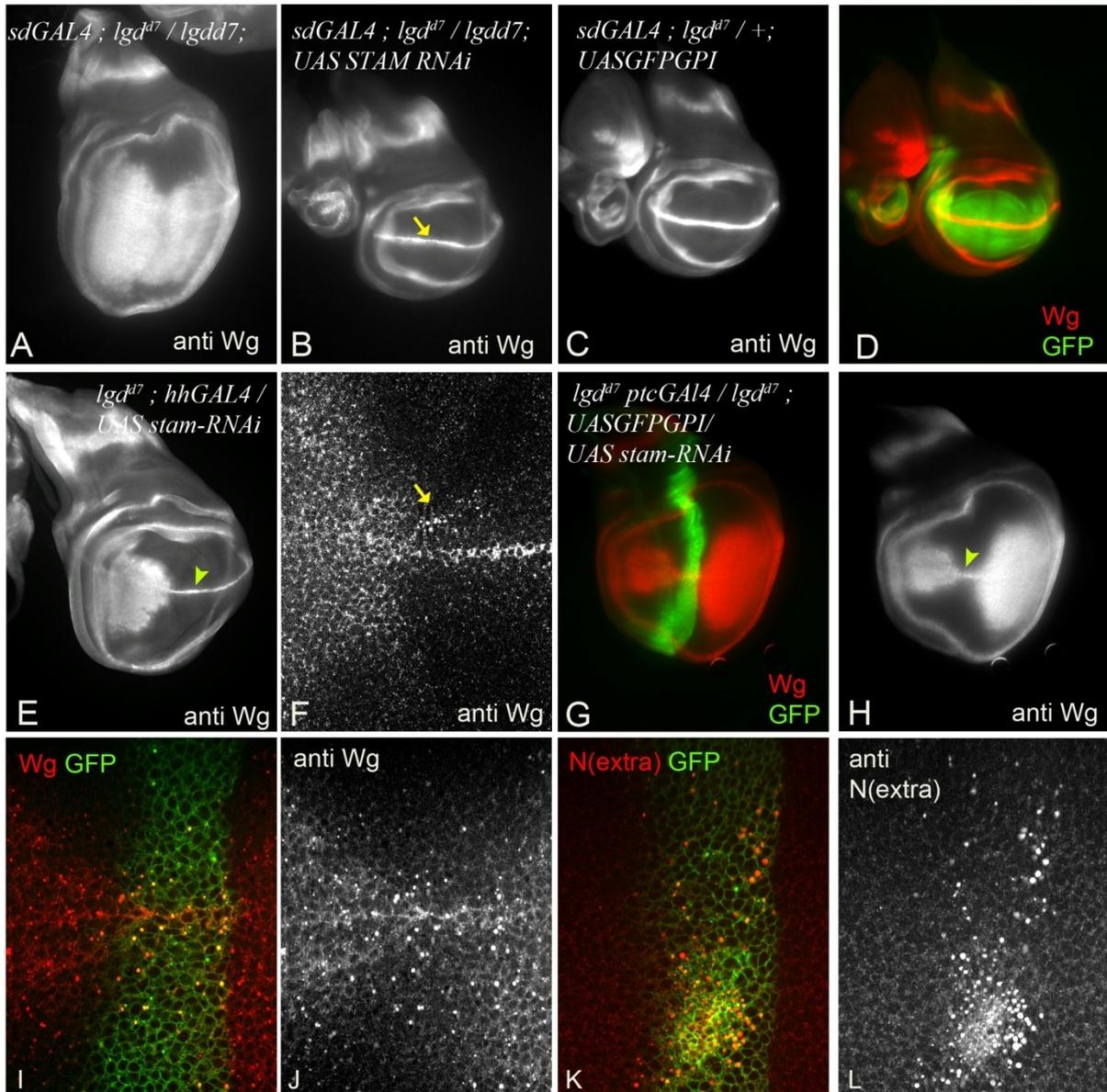


**Abb. 2-33: Lokalisierung von UASLgdRFP bei Funktionsverlust von VPS4.** Expression von UAS-LgdRFP mit *sdGAL4* (A). Knockdown von VPS4 (B-D) führt zur Akkumulation des Notch Rezeptors in großen vesikulären Strukturen (C) und viele tote Zellen, wie die Hoechstfärbung anhand der fragmentierten Zellkerne zeigt (gelbe Pfeile in D). Der VPS4 Verlust unterdrückt das Wachstum der Imaginalscheibe aber die Lokalisierung von LgdRFP bleibt zytoplasmatisch (E-H). Regionen die eine endosomale Lokalisierung von LgdRFP vermuten lassen, weisen vermehrten Zelltod auf (Gelbe Pfeilspitzen in H, siehe auch D,L). Die Unterdrückung der ESCRT III Untereinheit *shrub* zeigt ein ähnliches Ergebnis und zeichnete sich ebenfalls durch viele tote Zellen im Gewebe aus (I-L).

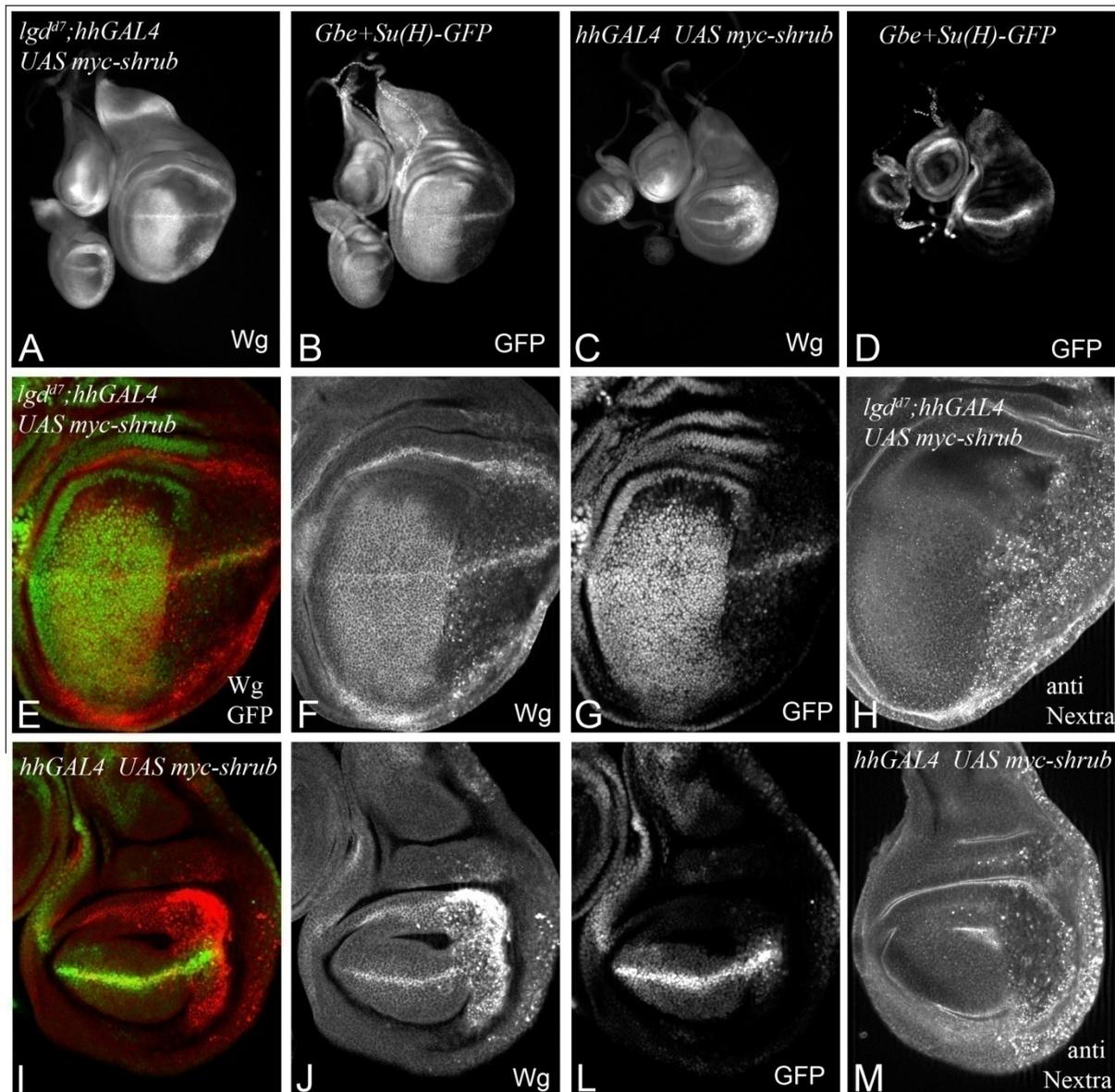
## 2.4 Verlust der ESCRT-0/III Funktion unterdrückt die ectopische Aktivierung von Notch

Die Unterdrückung der ectopischen Aktivierung in *lgd hrs* doppelmutanten Zellen wurde mit der Funktion von Hrs als ESCRT-0 Untereinheit in Verbindung gebracht (Jaekel und Klein 2006). Es wäre aber auch möglich, dass andere Funktionen von Hrs betroffen sind, da auch ESCRT unabhängige Funktionen beim endosomalen Recycling beschrieben wurden (Hanyaloglu, McCullagh et al. 2005, Du, Kazim et al. 2012). Um zu überprüfen, ob eine ESCRT-0 abhängige Funktion von Hrs betroffen ist, wurde folglich der Funktionsverlust des *Drosophila* Homologs der anderen ESCRT-0 Untereinheit, *dSTAM*, mittels RNAi untersucht. In *lgd* mutanten Imaginalscheiben wurde beim Verlust der Funktion von STAM die Unterdrückung der ectopischen Aktivierung des Notch-Signalwegs festgestellt (siehe Abb. 2-34). Die liganden-abhängige Aktivierung an der D/V Grenze wird davon nicht beeinflusst (siehe Abb. 2-34 Pfeile in B,E,H). Darüber hinaus tritt auch die endosomale Akkumulation von Notch und Wg ähnlich wie in *lgd hrs* doppelmutanten Zellen auf (siehe Abb. 2-34 I-L). Der Verlust der anderen ESCRT-0 Untereinheit STAM in *lgd* mutanten Zellen zeigt, dass die Unterdrückung der ESCRT-0 Funktion und höchstwahrscheinlich keine davon unabhängige Funktion von Hrs für die Unterdrückung der ectopischen Aktivierung verantwortlich ist.

Es wurde durch weitere Experimente überprüft, ob die Beeinträchtigung der ESCRT-III Funktion zur Unterdrückung der ectopischen Aktivierung des Notch-Signalwegs führt. Hierzu wurde die Interaktion mit *shrub* weiter durch die Überexpression von UAS myc-*shrub* analysiert. Im Wildtyp führt die Überexpression zu einer Vergrößerung der Notch enthaltenden Endosomen ((Troost, Jaekel et al. 2012), siehe Abb. 2-35), wodurch sich ein negativer Einfluss auf die endosomalen Funktionen der Zellen zeigt. Die Überexpression im *lgd* mutanten Hintergrund führt zur Unterdrückung der ectopischen Aktivierung des Notch-Signalwegs (siehe Abb. 2-35). Die Akkumulation von Wg erscheint bei der Expression im Wildtyp verstärkt.



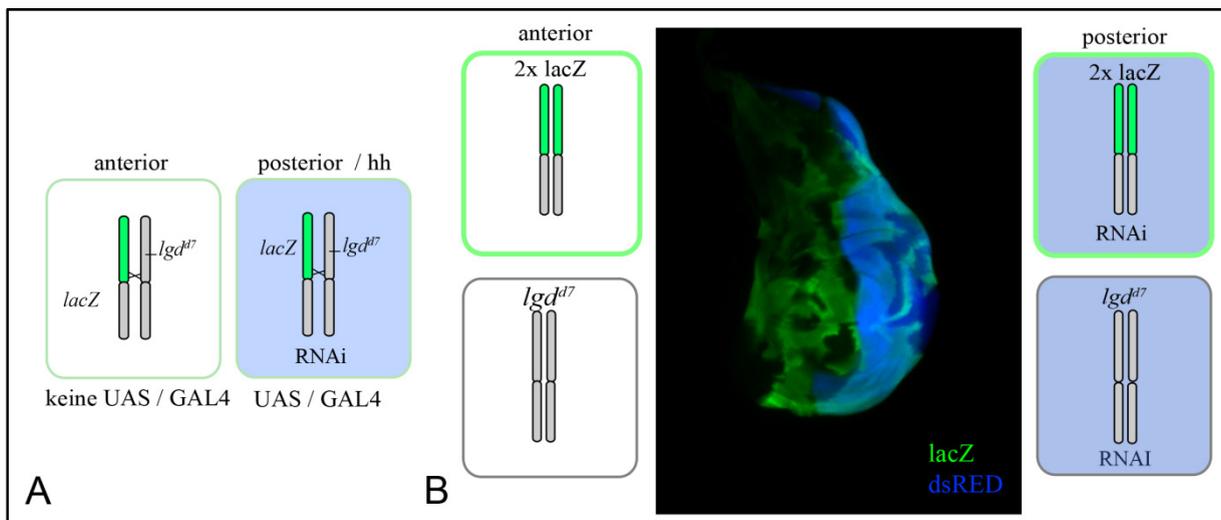
**Abb. 2-34: Unterdrückung der ektopischen Notchaktivität durch den Verlust von Stam.** (A-D) Unterdrückung der ESCRT-0 Funktion durch die Expression von UAS *stam*-RNAi im Flügelfeld durch *sdGAL4* (UAS-GFP zeigt das Expressionsmuster in D) im *lgd* mutanten Hintergrund. Durch die Unterdrückung der Funktion von STAM wird die ektopische Aktivierung von Wg an der D/V Grenze unterdrückt ohne die liganden-abhängige Expression zu beeinflussen (vgl. B mit C/A). (E-F) Bei der Reduktion von *Stam* im posterioren Kompartiment durch *hhGAL4* (E-F) wird die Expression von Wg normalisiert (Pfeil in E), aber es zeigen sich Wg Vesikel abseits der D/V Grenze (Pfeil in F). Anterior zeigt sich an der D/V Grenze die verbreiterte Expression von Wg. (G-L) Die Expression von UAS-*Stam*-RNAi im *lgd* mutanten Hintergrund mit *ptcGAL4* führt im Expressionsbereich (markiert durch UAS-GFP GPI Expression) zur Unterdrückung der ektopischen Aktivierung (H). Auf hoher Vergrößerung zeigt sich die verstärkte endosomalen Akkumulation von Wg (I-J) und Notch (K-L). (Expression bei 29°C)



**Abb. 2-35 Unterdrückung der ektopischen Notchaktivität durch die Überexpression von UAS-mycshrub.** (A-M) Überexpression von mycshrub im *lgd*<sup>Δ7</sup> mutanten Hintergrund (A-B und E-H) und im Wildtyp (C-D und I-K). Die ektopische Expression des Zielgens Wg (A,F) und des Notchreporters (B,G) wird durch die Überexpression von myc-shrub im *lgd* mutanten Hintergrund unterdrückt. Die Wg Färbung zeigt aber Akkumulationen im Expressionbereich von myc-shrub. In die Expression im Wildtyp zeigt eine starke Akkumulation von Wg (I-J) und eine unregelmäßige Expression des Reporters an der D/V Grenze (L). Die Expression von UAS myc-shrub führt offensichtlich zur Reduktion des Flügelfeldes. Die Expression führt außerdem zur starken Akkumulation des Notch Rezeptors im *lgd* mutanten Hintergrund (H) und auch im Wildtyp (M).

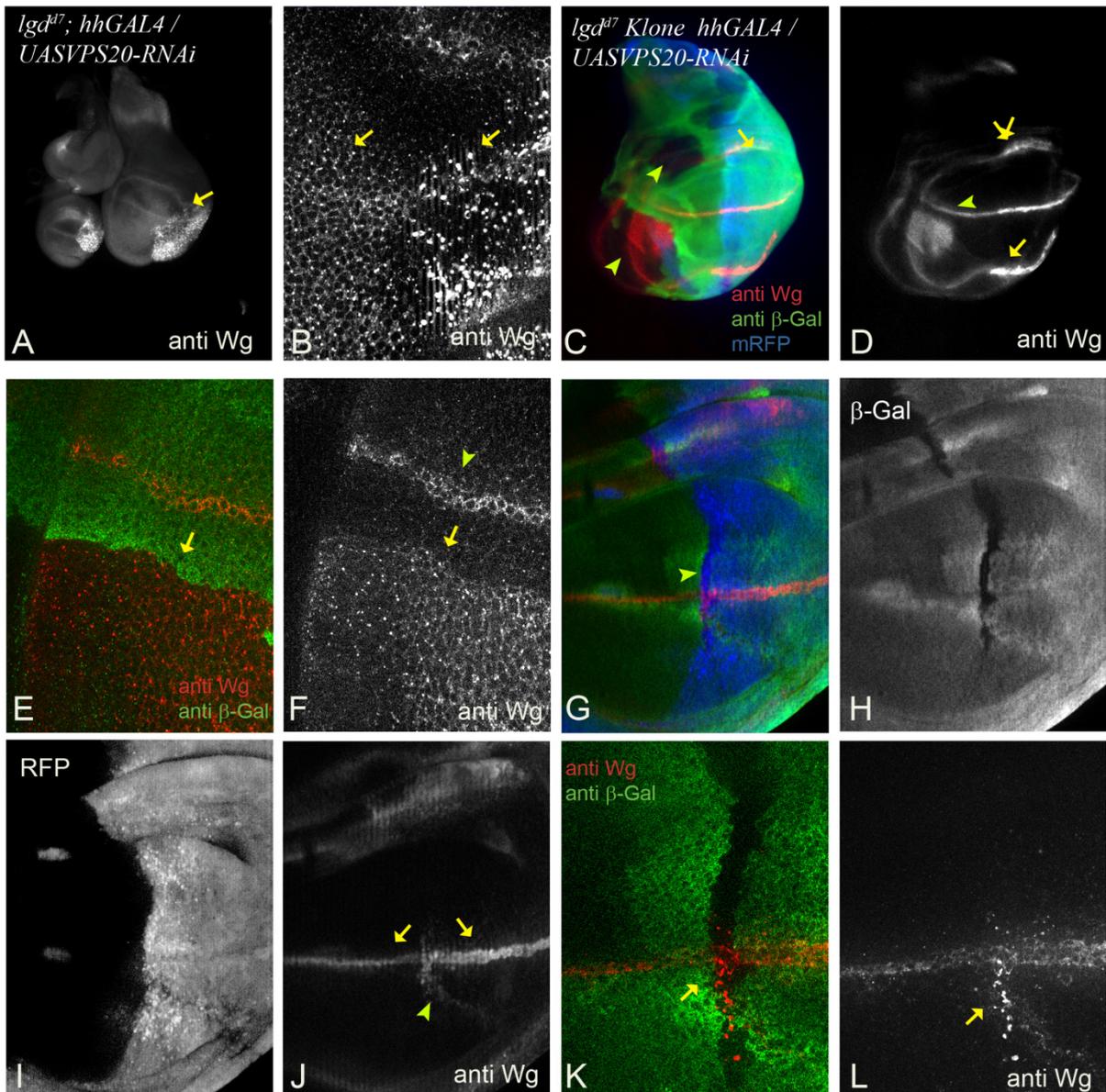
Zur weiteren Analyse der genetischen Interaktion mit ESCRT wurde auch der Funktionsverlust der ESCRTIII Untereinheit VPS20 untersucht. Der bereits erwähnte Modifier Screen (Böcke 2007) deckte neben *shrub* auch mögliche Interaktionen mit den anderen ESCRT-III Untereinheiten VPS20 und VPS2 (Jäckel 2010). Das VPS20 Allel, *vps20*<sup>LD3</sup> (Vaccari, Lu et al. 2008) wurde mit *lgd*<sup>SH495</sup> rekombiniert, aber die Heterozygose von VPS20 führte weder zur verfrühten Letalität noch zu einer deutlichen Modifikation des *lgd* Phänotyps und verfrühten Letalität wie es die Heterozygose des *shrub*<sup>4</sup> Allels herbeiführte.

Der durch RNAi vermittelte Funktionsverlust von VPS20 zeigt hingegen drastische Auswirkungen im *Igd*<sup>d7</sup> Hintergrund (s. folgende Abb. 2-37 A,B). Für einen besseren Vergleich wurde der Funktionsverlust in wildtypischen und *Igd* mutanten Zellen im selben Gewebe untersucht. Hierzu wurde im posterioren Kompartiment mittels hhGAL4 die VPS20 Funktion durch RNAi unterdrückt und *Igd*<sup>d7</sup> mutante Klone durch das FLP/FRT System induziert. Dies erlaubt den Vergleich von *Igd* mutanten und wildtypischen Bereichen bei Funktionsverlust von VPS20 im posteriore Kompartiment sowie bei intakter VPS20 Funktion im anterioren Kompartiment (s. Abb. 2-36).



**Abb. 2-36: Untersuchung von *Igd* Klonen bei Reduktion der VPS20 Funktion.** Im posterioren Kompartiment wird VPS20RNAi mittels hhGAL4 exprimiert (Expressionsdomäne markiert durch UASdsRED, in blau). Anteriore Zellen sind nicht vom VPS20 Funktionsverlust betroffen (A). Die Induktion von *Igd* mutanten Klonen generiert ein Mosaikgewebe in dem anteriore wildtypische und *Igd* mutante Bereiche (markiert durch Verlust von lacZ) mit posterioren Bereichen die den Funktionsverlust von VPS20 aufweisen, verglichen werden können.

Der Funktionsverlust von VPS20 führt im Wildtyp zu einer leichten Akkumulation von Wg an der D/V Grenze und in der ringförmigen Domäne im posterioren Kompartiment (siehe Abb. 2-37 D). In anterioren *Igd* Klonen zeigt sich die ektopische Aktivierung des Notch-Signalwegs anhand der Expression von Wg (s. Abb. 2-37 E,F). Die verstärkte Aktivität des Notch-Signalwegs verschafft den mutanten Zellen einen Wachstumsvorteil gegenüber den Wildtypzellen, da der Notch-Signalweg die Zellproliferation fördert (Baonza und Garcia-Bellido 2000). Klone im posterioren Kompartiment zeigen bei Funktionsverlust von VPS20 nur ein reduziertes Wachstum und eine starke Akkumulation von Wg in Endosomen (siehe Abb. 2-37 L). Dies bestätigt, dass der Verlust der ESCRT-III Funktion die ektopische Aktivierung von Notch in *Igd* mutanten Zellen verhindert und zum Verlust des Wachstumsvorteils führt.



**Abb. 2-37: Funktionsverlust der ESCRTIII Untereinheit VPS20 unterdrückt den *Igd* Phänotyp.** (A-B) Die Expression des RNAi-Konstrukts führt im *Igd* Hintergrund zur verstärkten Akkumulation von Wg in Vesikeln (Übersicht in A, Detailaufnahme in B). (C-L) *Igd<sup>d7</sup>* Klone (durch den Verlust von *lacZ* markiert) bei VPS20 RNA Interferenz im posterioren Kompartiment (markiert durch UAS-RFP Koexpression). Der Unterdrückung von VPS20 führt zu einer verstärkten Färbung von Wg an der D/V Grenze und der ringförmigen Domäne im posterioren Kompartiment (Pfeile in D), mit einer schwachen Ausbreitung an der D/V Grenze (Pfeile in J). *Igd* Klone im anterioren Bereich zeigen eine Aktivierung des Notch-Signalwegs anhand der Wg Expression (Pfeil in C, Detailaufnahmen E-F). Die Wg Färbung zeigt hier wie an der D/V Grenze eine Färbung des Zellkortex (vgl. F mit B (anterior)). Im RNA-Interferenzbereich zeigen *Igd* Klone ein stark reduziertes Wachstum, der Klon befindet sich posterior direkt an der A/P Grenze (G-L). Hier zeigt die Wg-Färbung in VPS20RNAi exprimierenden *Igd<sup>d7</sup>* mutanten Zellen eine viel deutlichere und ausschließliche Akkumulation in Vesikeln (Vgl L mit B). (Genotyp: *hsFlp UASmRFP; arm-lacZ FRT40A / Igd<sup>d7</sup> FRT40A; hhGAL4 / UAS VPS20RNAi*). (Expression bei 25°C)

Insgesamt zeigen die Experimente, dass die Aktivität des ESCRT Komplexes für die Aktivierung des Notch Rezeptors in *Igd* mutanten Zellen benötigt wird. Da die allgemeine

Funktion des ESCRT Komplexes die ILV Bildung ist, scheint daher die ILV Bildung für die Aktivierung von Notch in *Igd* Zellen benötigt zu werden.

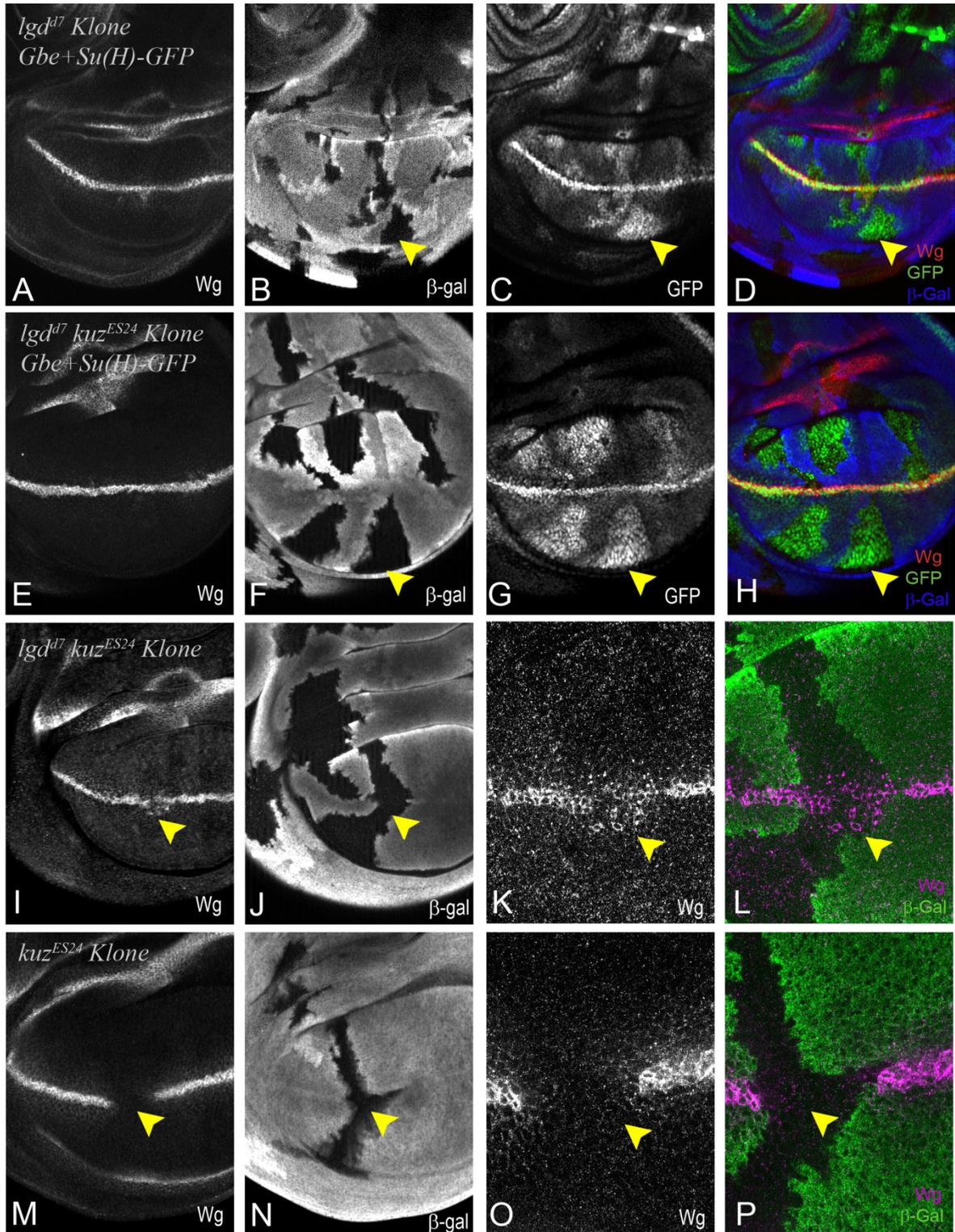
## **2.5 Untersuchung der ectopischen Aktivierung des Notch-Signalwegs in *Igd* mutanten**

### **Zellen**

In den vorigen Abschnitten wurde gezeigt, dass die Aktivierung des Notch-Signalwegs in *Igd* mutanten Zellen von der Funktion der ESCRT-0 und III Komplexe abhängig ist und dass die verstärkte Akkumulation von überexprimierten Proteinen im endosomalen Transportweg die Aktivierung des Notch Rezeptors in *Igd* Zellen unterdrückt. Die folgende Abschnitte befassen sich mit weiteren Kernkomponenten des Notch-Signalwegs und dem endosomalen Reifungsprozess, um deren Voraussetzung für die Aktivierung des Signalwegs in *Igd* mutanten Zellen weiter zu klären.

### **2.5.1 Die ectopische Aktivierung von Notch in *Igd* Zellen ist unabhängig von *kuz***

Die bisherigen Studien zeigten, dass die Aktivierung von Notch in *Igd* Zellen unabhängig der Liganden Dl und Ser abläuft, aber abhängig von der Aktivität der  $\gamma$ -Sekretase und dem ESCRT 0 Komplex ist (Childress, Acar et al. 2006, Gallagher und Knoblich 2006, Jaekel und Klein 2006). Die liganden-unabhängige Aktivierung des Notch Rezeptors warf die Frage auf, ob die Aktivierung *kuz* abhängig ist. *kuz* mutante Klone zeigen eine zellautonome Unterbrechung des Notch-Signalwegs ((Klein 2002), siehe Abb. 2-38). Zur Klärung wurde durch klonale Analyse von *Igd kuz* doppelmutanten Zellen die Aktivierung des Notch-Signalwegs überprüft. In den *Igd<sup>d7</sup> kuz<sup>ES24</sup>* doppelmutanten Zellen zeigt sich eine starke Gbe+Su(H) Expression (siehe Abb. 2-38). Dies bedeutet, dass die liganden-unabhängige Aktivierung des Notch-Signalwegs in *Igd* Zellen auch unabhängig von *kuz* ist. Für die Expression von Wg zeigen sich Unregelmäßigkeiten an der D/V Grenze in den *Igd kuz* doppelmutanten Zellen. Teilweise zeigen sich sowohl Unterbrechungen von Wg als auch ectopische Expression in mutanten Bereichen, welche die D/V Grenze überschreiten (siehe Abb. 2-38 I-L). Dies ist auf den Ausfall der liganden-abhängigen Aktivierung zurückzuführen und resultiert in einer abgeschwächten Aktivierung des Notch-Signalweg. Die Stärke der ectopischen Aktivierung ohne die Aktivierung durch die Liganden scheint nicht immer die nötigen Aktivitätslevel für die Expression von Wg zu erreichen. In *kuz* mutanten Zellklonen, ohne die liganden-unabhängige Aktivierung, kommt es hingegen zu einer klaren, zellautonomen Unterbrechung der Wg Expression an der D/V Grenze ( siehe Abb. 2-38 M-P, (Schneider, Troost et al. 2012)).



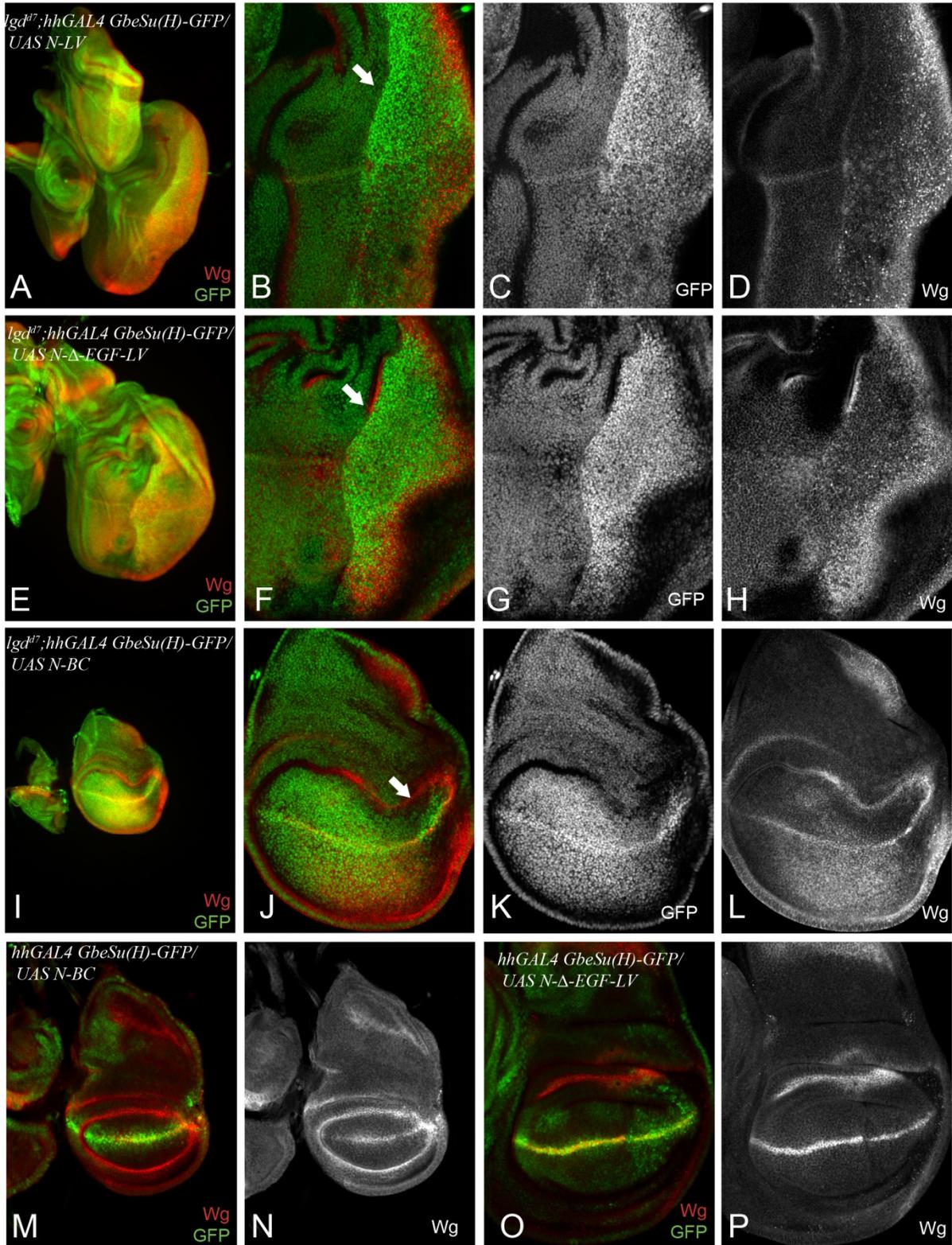
**Abb. 2-38. Aktivierung von Notch in *Igd<sup>d7</sup> kuz<sup>ES24</sup>* Zellen.** (A-D) In *Igd<sup>d7</sup>* Klonen, markiert durch den Verlust des Markers *lacZ* (anti  $\beta$ -gal in blau) zeigt sich die Aktivierung von Gbe+Su(H)-GFP (in grün in D, H) und auch eine leichte Ausbreitung von Wg (Pfeil in A ). (E-L) In *Igd<sup>d7</sup> kuz<sup>ES24</sup>* doppelmutanten Klonen zeigt sich auch die Aktivierung von Gbe+Su(H) (E-H). Die Aktivierung von Wg an der D/V Grenze ist teilweise unregelmäßig und variiert zwischen leichten Unterbrechungen und/oder ektopischer Aktivierung (I-L, Pfeilspitzen in K). (M-P) In *kuz* Klonen kommt es zu einer klaren Unterbrechung der Wg Expression (O, gelbe Pfeilspitzen).

(Genotyp: *hsFlp; Igd<sup>d7</sup>, kuz<sup>ES24</sup> oder Igd<sup>d7</sup> kuz<sup>ES24</sup> FRT40A / arm-lacZ FRT40A; Gbe+Su(H)-GFP oder +*)

### 2.5.2. Der S1 Schnitt erscheint notwendig für die Aktivierung von Notch in *lgd* Zellen

Da der Verlust der *lgd* Funktion in allen Imaginalscheibenzellen zu einer Aktivierung des Notch-Signalwegs führt, die unabhängig von den Liganden und dem S2- Schnitt durch *kuz* ist, wurde untersucht, welche Domänen des Notch Rezeptors für dessen Aktivierung in *lgd* Zellen benötigt werden. Zu diesem Zweck wurden verschiedene Notch Deletionskonstrukte in *lgd* mutanten Flügelscheiben exprimiert und ihr Einfluss auf die Aktivierung des Signalwegs verfolgt (Bachelorarbeit Jochen Steinbring, siehe Abb. 2-39). Die Expression des vollständigen Notch Rezeptors in *lgd* Zellen führt zur deutlichen Verstärkung der Aktivität des Signalwegs ((Jaekel und Klein 2006), siehe Abb. 2-39 A-D). Auch die Expression von NΔEGF (Loewer, Soba et al. 2004) verstärkt in ähnlicher Weise die Aktivität des Signalwegs in *lgd* mutanten Zellen. Dieser Variante fehlen die EGF-Wiederholungen und folglich der größte Teil der extrazellulären Domäne, aber sie beinhaltet immer noch die LNR. Dies deutet daraufhin, dass NΔEGF in *lgd* mutanten Zellen aktiviert werden kann (Abb. 2-39 E-H). Im Wildtyp führt die Expression dieser Variante zu einer leichten Unterdrückung der Wg Expression an der D/V Grenze (Abb. 2-39 O,P). Dies lässt die Unterdrückung der liganden-abhängigen Aktivierung von Notch vermuten. Das bedeutet, dass NΔEGF im Wildtypzellen nicht aktiviert wird, sondern vielmehr die liganden-abhängige Notch Aktivierung unterdrückt, aber in *lgd* Zellen in einer liganden-unabhängigen Weise aktiviert wird. Die Expression einer Variante, N-BC, welcher der Bereich für den S1-Schnitt durch die Furin-ähnliche Konvertase fehlt (Kidd und Lieber 2002), führt sowohl im Wildtyp als auch in *lgd* Zellen zur Unterdrückung des Notch-Signalwegs. Dies zeigt, dass N-BC in keinem der beiden Zelltypen aktiviert wird und außerdem zur Beeinträchtigung der liganden-abhängigen Aktivierung des endogenen Notch Rezeptors führt (Abb. 2-39 I-N).

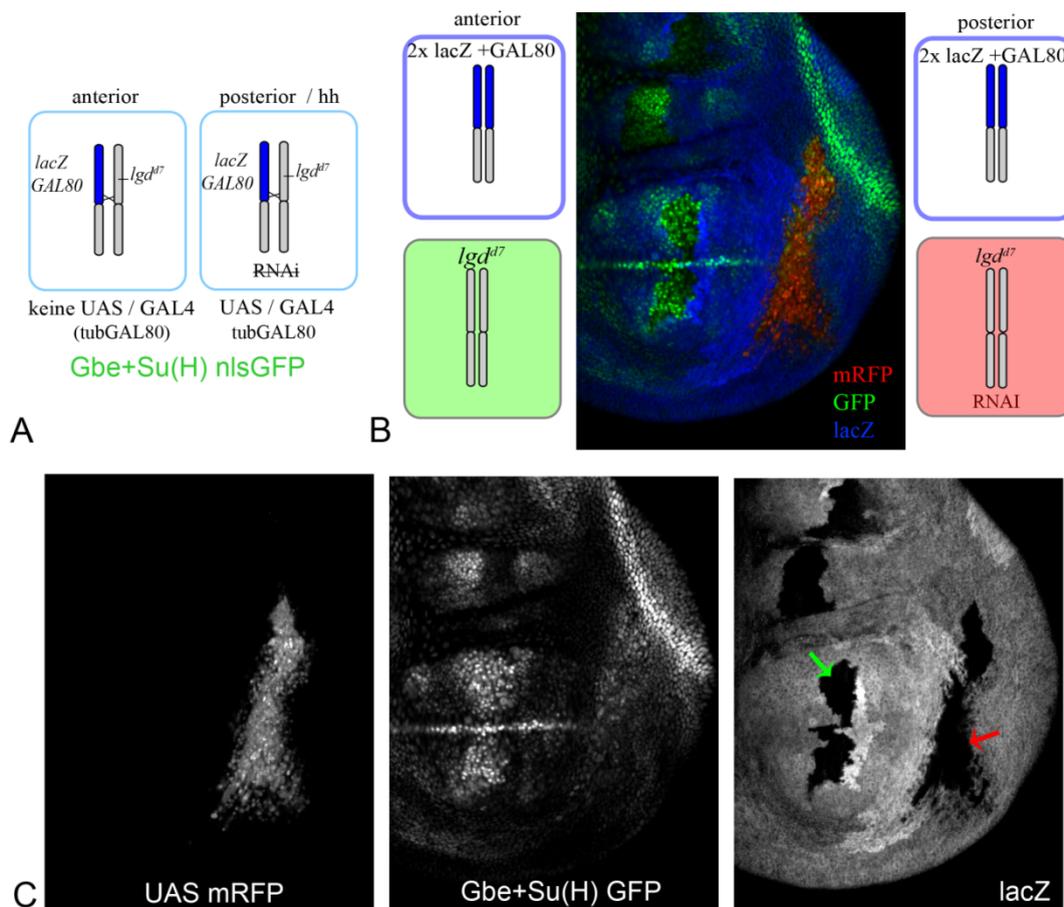
Dies lässt darauf schließen, dass die EGF-Wiederholungssequenzen für die in *lgd* Zellen auftretende ektopische Aktivierung von Notch nicht notwendig sind, aber der S1-Schnitt und die Heterodimerisierung des Rezeptors für die Aktivierung in *lgd* Zellen benötigt werden.



**Abb. 2-39: Überexpression von Notch Rezeptor Deletionskonstrukten.** (A-H) Überexpression im *Igd* Hintergrund. Der vollständige Notch Rezeptors (A-D) sowie eine Variante, der die EGF-Wiederholungen fehlen (E-H), verstärken die ektopische Aktivierung des Signalwegs in *Igd* Zellen, angezeigt durch die verstärkte Expression von Wg und Gbe+Su(H)-GFP. (I-L) Die Überexpression einer Variante N-BC, bei der die Furin-Schnittstelle entfernt wurde, unterdrückt die Aktivierung in *Igd* mutanten Zellen. (M-P) N-BC (M,N) und N-EGF-LV (O-P) zeigen im Wildtyp eine Beeinträchtigung der liganden-abhängigen Aktivierung des Notch-Signalwegs, die zu reduzierter Expression von Wg und unregelmäßiger Expression von Gbe+Su(H)-GFP an der D/V Grenze führt, und im Falle von N-BC, die Proliferation des Flügelgewebes stark beeinträchtigt.

### 2.5.3 Die Aktivität der V-ATPase wird für die Aktivierung von Notch in *Igd* Zellen benötigt

Die Ansäuerung des endosomalen Lumens wird durch die V-ATPase vermittelt (Huotari und Helenius 2011). Durch die Untersuchung des Funktionsverlust einer V-ATPase Untereinheit sollte überprüft werden, ob die Ansäuerung für die Aktivierung von Notch in *Igd* Zellen benötigt wird. Hierzu wurde in *Igd* mutanten Scheiben mittels RNAi die V-ATPase Funktion unterdrückt. Im *Igd* mutanten Hintergrund sterben die Larven bereits vor dem dritten Larvenstadium. Im wildtypischen Hintergrund konnten nur wenige Scheiben analysiert werden. Diese Scheiben zeigen fast ausschließlich Zelltod im posterioren Kompartiment und ein deutlich reduziertes Wachstum (s. Abb. 2-41 A-D). Dies deutet auf einen starken zell-letalen Effekt aufgrund des Funktionsverlusts der V-ATPase hin. Bei den V-ATPase Untereinheiten handelt es sich um essentielle Gene (Allan, Du et al. 2005, Forgac 2007). Um die frühzeitige Letalität zu umgehen, wurden *MARCM* Klone erzeugt. Die *Igd* Klone im posterioren Kompartiment exprimieren das RNAi Konstrukt und werden durch die Expression von UASmRFP sowie durch den Verlust des Markers lacZ markiert (s. Abb. 2-40).

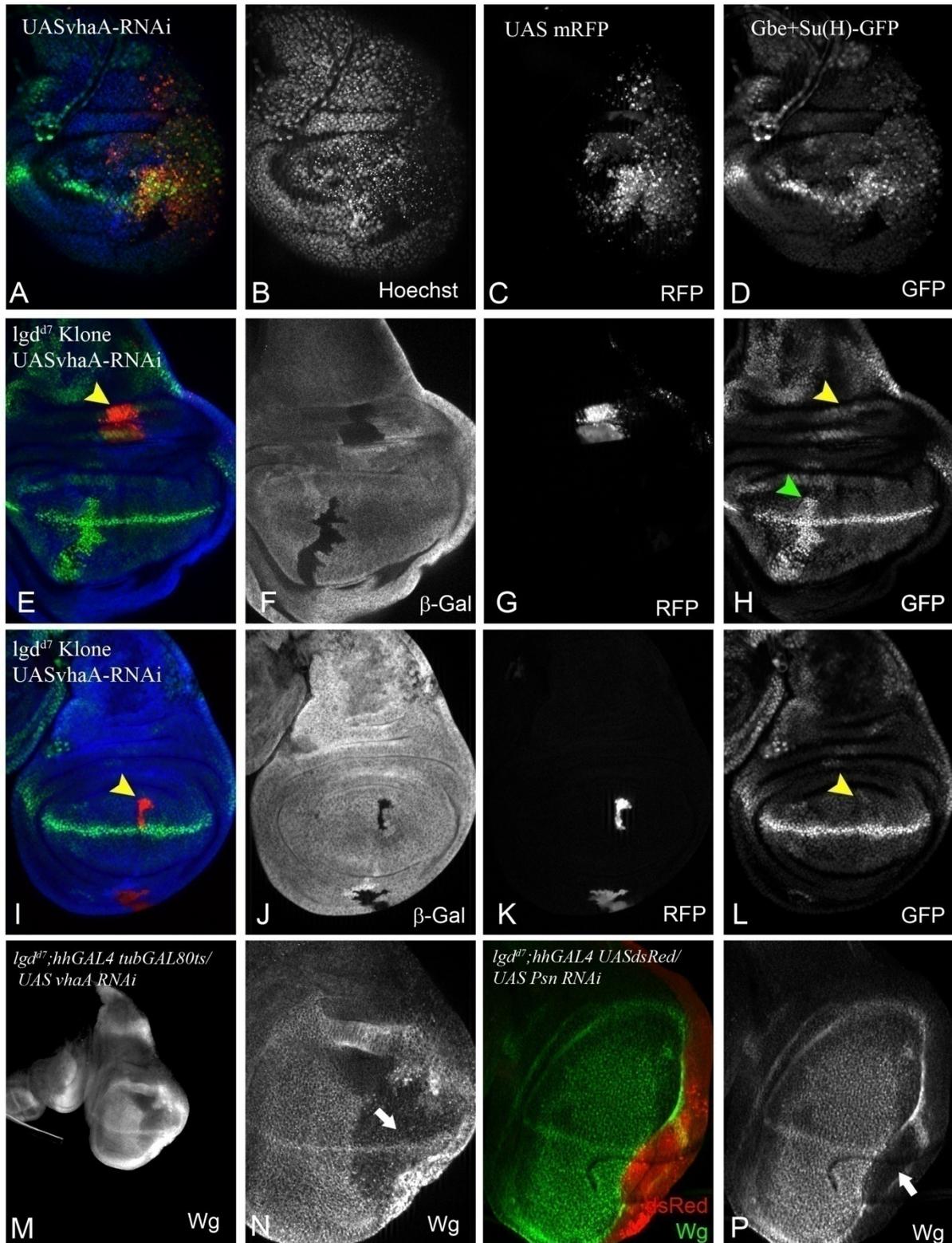


**Abb. 2-40 Unterdrückung der V-ATPase Funktion in *Igd* mutanten Zellen.** (A) Situation vor der Induktion der Klone. Alle Zellen exprimieren arm-*lacZ* und *tubGAL80*. (B) Die Flp/FRT vermittelte Rekombination führt zu *Igd* mutanten Bereichen, welche den Marker *lacZ* und den GAL4-Repressor *GAL80* verlieren. Die *Igd* Klone im

posterioren Kompartiment exprimieren das vhaA-RNAi Konstrukt mittels hhGAL4 und werden zusätzlich durch die Expression von mRFP markiert. Dies erlaubt den Vergleich zwischen *Igd* Klonen bei Funktionsverlust der V-ATPase (posterior) und *Igd* Klonen (anterior) sowie wildtypischen Bereichen innerhalb der Mosaikscheibe. (C) Die Analyse des Notchreporters Gbe+Su(H)-GFP zeigt eine Unterdrückung der ektopischen Aktivierung nur im posterioren mRFP markierten Zellklon. Dieser liegt allerdings in der Peripodialmembran. Die anterioren Klone zeigen die erwartete ektopische Aktivierung des Signalwegs. (Genotyp: *hsFlp UASmRFP; tubGAL80, arm-lacZ FRT40A / Igd<sup>d7</sup> FRT40A; hhGAL4 Gbe+Su(H)GFP / UASvhaA-RNAi*)

Anteriore Klone, markiert durch den Verlust von lacZ, dienen hier als Kontrollbereiche ohne den Funktionsverlust der V-ATPase (s. Abb. 2-40). Durch die Untersuchung des Notch Reporters Gbe+Su(H)-GFP sollten Rückschlüsse auf die ektopische Aktivierung bei Funktionsverlust der V-ATPase in *Igd* mutanten Zellen gezogen werden. Allerdings waren im posterioren Kompartiment Klone nur selten aufzufinden, trotz des reduzierten Expressionsbereiches und der erst nach der Induktion der Klone einsetzenden Unterdrückung durch die Expression des RNAi Konstrukts. Große Klone wurden im posterioren Kompartiment nur in der Peripodialmembran gefunden und die Zellen scheinen dort eher zu überleben. Es zeigt sich aber im Gegensatz zur starken Expression von Gbe+Su(H) in anterioren Klonen keine ektopische Aktivierung (siehe Abb. 2-41). Ein in derselben Scheibe befindlicher Klon außerhalb des Flügelfeldes zeigt ebenfalls keine Anzeichen für eine ektopische Aktivierung des Signalwegs. Andere posterior gelegenen Klone innerhalb des Flügelfelds zeigen keine ektopische Expression von Gbe+Su(H)-GFP (siehe Abb. 2-41 I-L).

Schließlich wurde der Verlust der V-ATPase Funktion im *Igd* mutanten Hintergrund erst im dritten Larvenstadium durch Temperaturerhöhung induziert. Die Expression des RNAi-Konstrukts wurde durch hhGAL4 in Kombination mit der temperatur sensitiven GAL80 Variante *tubGAL80<sup>ts</sup>* (McGuire et al. 2003) kontrolliert. Im posterioren Expressionsbereich wird die ektopische Aktivierung des Notch-Signalwegs unterdrückt. Die liganden-abhängige Aktivierung an der D/V Grenze erscheint davon unbeeinflusst (siehe Abb. 2-41 M,N). Die Reduktion der Aktivität des  $\gamma$ -Secretase Komplexes durch Expression von UAS $\Psi$ sn-RNAi führt erwartungsgemäß auch zur Unterdrückung der liganden-abhängigen Notch Aktivität. Das posteriore Kompartiment ist durch den Verlust der Aktivität des Notch-Signalwegs im Wachstum gehemmt und die Wg Expression an der D/V Grenze wird unterdrückt (siehe Abb. 2-41 O,P). Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass der Verlust der V-ATPase Funktion die ektopische Aktivierung des Notch-Signalwegs in *Igd* Zellen unterdrückt.



**Abb. 2-41: Die Notch-Aktivierung in *Igd* Zellen benötigt die Aktivität der V-ATPase.** (A-D) Wildtyp. Die Expression von UASvhaA-RNAi im posterioren Kompartiment markiert durch Koexpression von UASmRFP (C,rot) und die Expression des Notchreporters (D, in grün), die Flügelscheiben zeigen ein stark unterdrücktes Wachstum sowie deutliche Anzeichen von Zelltod. (E-L) Expression von UASvhaA-RNAi in posterioren *Igd<sup>d7</sup>* Klonen. Anteriore *Igd<sup>d7</sup>* Klone (markiert durch den Verlust von lacZ) aktivieren den Notchreporter Gbe+Su(H)-GFP. Koexpression von mRFP markiert zusätzlich die posterioren Klone, in denen keine ektopische Aktivierung sichtbar wird. (Genotyp A-L: *hsFlp UASmRFP; tubGAL80 arm-lacZ FRT40A / Igd<sup>d7</sup> FRT40A; hhGAL4 Gbe+Su(H)GFP / UASvhaA-RNAi*). (Expression bei 25°C) (M-N) Expression von UASvhaA-RNAi im dritten Larvenstadium über zwei Tage durch Temperaturerhöhung auf 29°C unter Verwendung des GAL80<sup>ts</sup>-

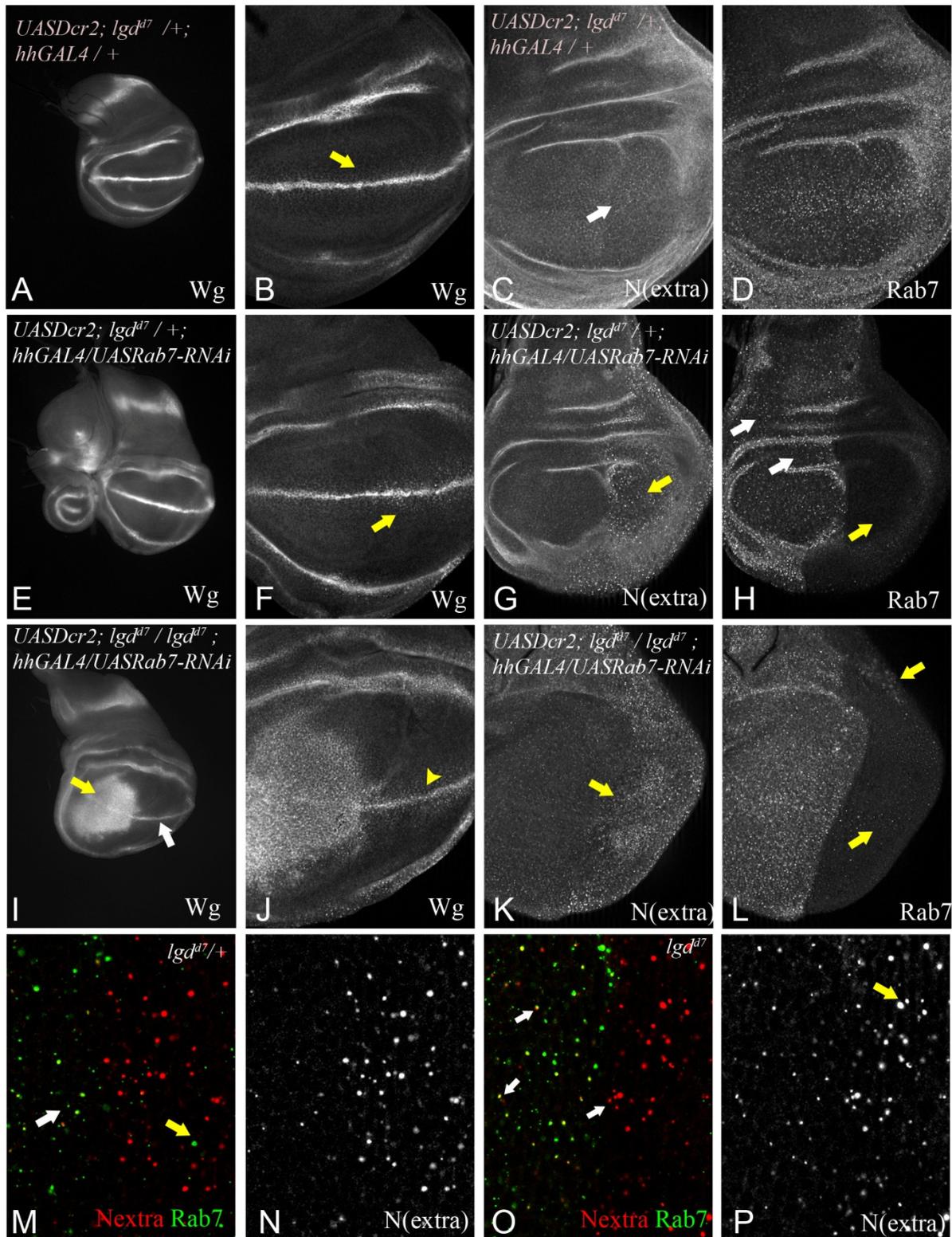
Repressors. Übersicht der Wg Expression in *Igd<sup>d7</sup>* mutanten Imaginalscheiben (M). In der Flügeltasche wird im posterioren Kompartiment die Wg Expression reduziert, ohne dabei die liganden-abhängige Aktivierung zu beeinträchtigen (N). **(O,P)** Der Knock-down von *Psn* führt zum vollständigen Verlust der Wg Expression im posterioren Kompartiment.

#### **2.5.4 Die Aktivierung von Notch in *Igd* Zellen benötigt die Fusion mit dem Lysosom**

Die Reduzierung der *shrub* Aktivität unterdrückt die Aktivierung von Notch in *Igd* Zellen und in den Zellen dieses Genotyps sind die Endosomen stark vergrößert und mit den endosomalen Proteinen Spinster und Hrs markiert. Der spät-endosomale Marker Rab7 ist aber kaum an den Notch Endosomen zu finden. In *Igd* mutanten Zellen zeigt sich die deutliche Assoziation mit Rab7. Da aber die Reduktion von *shrub* in *Igd* Zellen eine reduzierte Assoziation der Endosomen mit Rab7 zur Folge hat, stellte sich die Frage, ob der Verlust von Rab7 die ektopische Notchaktivität in *Igd* Zellen unterdrückt. Um diese Annahme zu überprüfen wurde in *Igd* mutanten Scheiben ein UAS-Rab7-RNAi Konstrukt exprimiert, wodurch ein weitgehender Verlust von Rab7 im posterioren *hhGAL4*- Expressionsbereich auftritt (siehe Abb. 2-42). In *Igd* mutanten Imaginalscheiben zeigt sich bei Verlust von Rab7 die Unterdrückung der ektopischen Aktivierung (siehe Abb. 2-42). Die liganden-abhängige Aktivierung entlang der D/V Grenze, d.h. die Expression von Wg in einem schmalen Streifen, wird aber nicht unterdrückt (Pfeil in Abb. 2-42). Diese Ergebnisse zeigen, dass der Verlust der Rab7 Funktion die ektopische Aktivierung in *Igd* Zellen verhindert. Weiterhin liefern die Ergebnisse Grund zur Annahme, dass die Aktivierung von Notch in *Igd<sup>d7</sup>,shrub<sup>4</sup>/Igd<sup>d7</sup>,+* Zellen durch die Abwesenheit von Rab7 am reifenden Endosom verhindert wird.

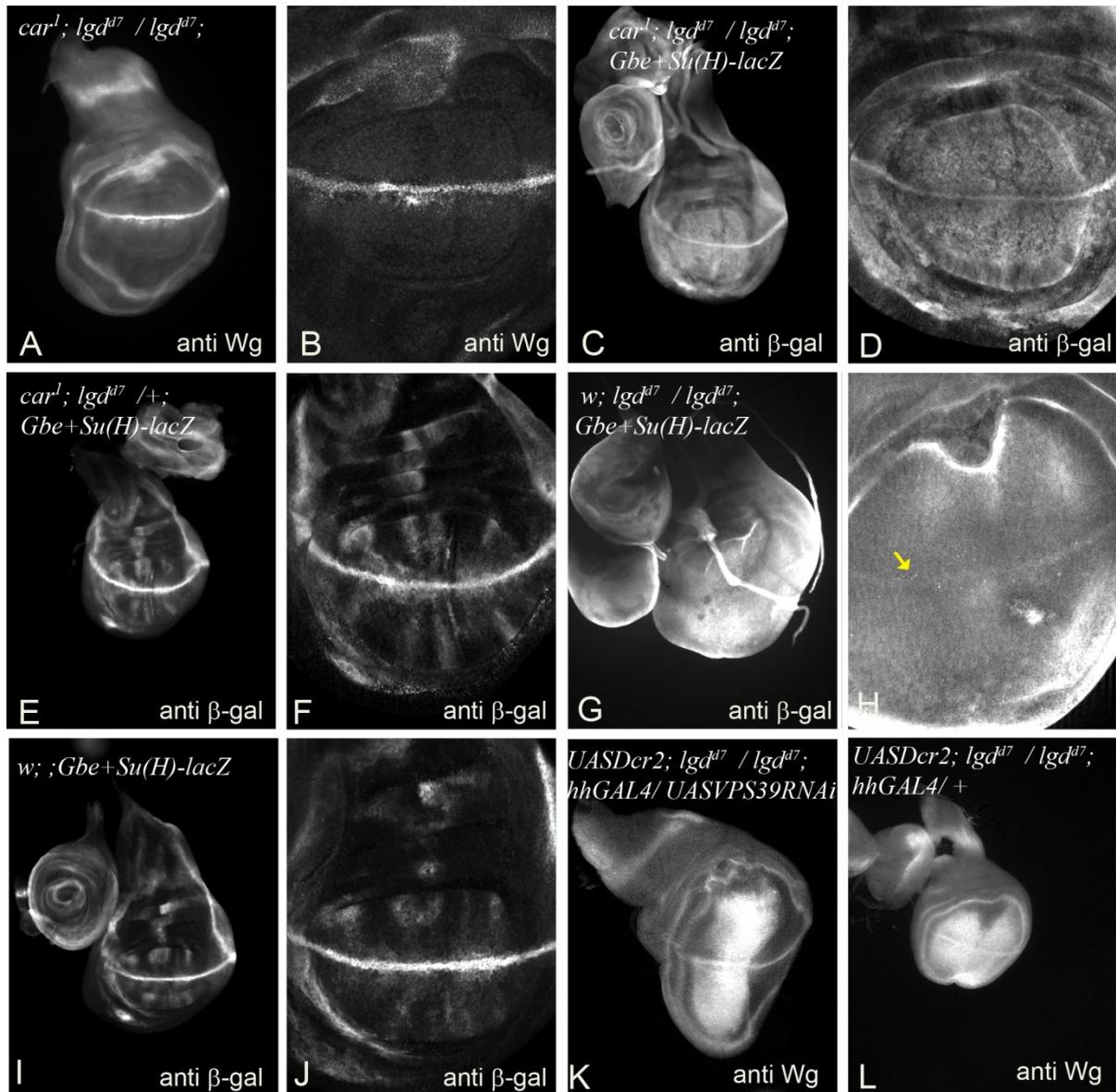
Die Hauptfunktion von Rab7 ist die Organisation der Fusion der reifenden Endosomen mit dem Lysosom (Übersichten in (Zerial und McBride 2001, Huotari und Helenius 2011, Wang, Ming et al. 2011). Um weitere Hinweise dafür zu erhalten, dass die Fusion mit dem Lysosom für die Aktivierung von Notch in *Igd* Zellen benötigt wird, wurde der HOPS Komplexes, der die Fusion mit dem Lysosom vermittelt näher untersucht. Zu erst wurde die *car<sup>1</sup> ; Igd<sup>d7</sup>* Doppelmutante erzeugt. Carnation (*car*) ist das Ortholog von VPS33A und wird für die Fusion mit dem Lysosom benötigt (Akbar, Ray et al. 2009). Es zeigt sich, dass *car<sup>1</sup>* in Homo- oder Hemizygotie die ektopische Aktivierung des Notch-Signalwegs in *Igd* Imaginalscheiben unterdrückt (siehe Abb. 2-43 A-B,C-D). Wiederum zeigt sich die liganden-abhängige Aktivierung unbeeinflusst (siehe Abb. 2-43). Weiterhin führt auch die Unterdrückung der Funktion von VPS39, einer weiteren, spezifischen Komponente des HOPS Komplexes (Epp,

Rethmeier et al. 2011) mittels RNAi in *lgd* mutanten Zellen zu einer Unterdrückung der liganden-unabhängigen ektopischen Aktivierung des Notch Rezeptors (siehe Abb. 2-43 K,).



**Abb. 2-42 Unterdrückung der Rab7 Funktion durch RNAi verhindert die ektopische Aktivierung des Notch-Signalwegs in *lgd* Zellen.** (A-D) Wildtyp-Kontrolle ohne Rab7RNAi Expression, Wg (B) und Notch (C) zeigen keine Auffälligkeiten und Rab7(D) ist vorhanden. (E-H, M-N) Wt-Kontrolle der Expression von UAS-Rab7-RNAi durch hhGAL4. Der Funktionsverlust führt zur leichten Akkumulation von Wg (F) und deutlichen Akkumulation von Notch (G, M-N). Die Rab7 Antikörperfärbung zeigt die Effektivität der RNAi (H). (I-L, O-P) Rab7-RNAi im *lgd*

Hintergrund. Die ektopische Aktivierung von Notch wird unterdrückt und Wg ist im posterioren Kompartiment auf die D/V Grenze beschränkt (I,J). Der Knockdown ist effektiv (L). Der Notch Rezeptor akkumuliert stärker im posterioren Kompartiment (K, O-P). Im anterioren Kompartiment akkumuliert der Notch Rezeptor in Rab7-positiven Endosomen. Es wurden nur vereinzelte Rab7-positive Endosomen im posterioren Kompartiment gefunden (gelber Pfeil in L,M). (Expression bei 29°C)



**Abb. 2-43 Unterdrückung des HOPS Komplex unterdrückt die ektopische Aktivierung des N-Signalwegs in *lgd* Zellen. (A-J)** Die ektopische Aktivierung des Notch-Signalwegs wird durch *car<sup>1</sup>* (HOPS-Komplex Untereinheit VPS33) unterdrückt, wie die Expression von Wg zeigt (A,B). Die ektopisch Aktivität der Notchreporters ist noch ersichtlich, aber die Expression an der D/V Grenze hebt sich deutlich ab (C-D und zum Vergleich E-J). Die Mutante *car<sup>1</sup>* zeigt im Wildtyp oder *lgd* Heterozygose keinen Einfluss auf die Aktivität des Notch-Signalwegs (E,F). **(K,L)** Die Unterdrückung der Funktion der HOPS-Komplex Untereinheit VPS39 mittels RNAi (bei 29°C und Koexpression von UAS-Dcr2) führt zur Unterdrückung der ektopischen Aktivierung des Notch-Signalwegs, die Aktivierung an der D/V Grenze durch die Liganden bleibt unbeeinflusst.

Insgesamt legen die Ergebnisse den Schluss nahe, dass die von Rab7 kontrollierte Fusion der reifenden Endosomen mit dem Lysosom für die Aktivierung des Rezeptors in *lgd* mutanten

Zellen benötigt wird. Dies lässt vermuten, dass die Aktivierung von Notch in *lgd* mutanten Zellen im Lysosom stattfindet.

## **2.6 Untersuchung der Interaktion von Fng, Dl und Ser während der Flügelentwicklung**

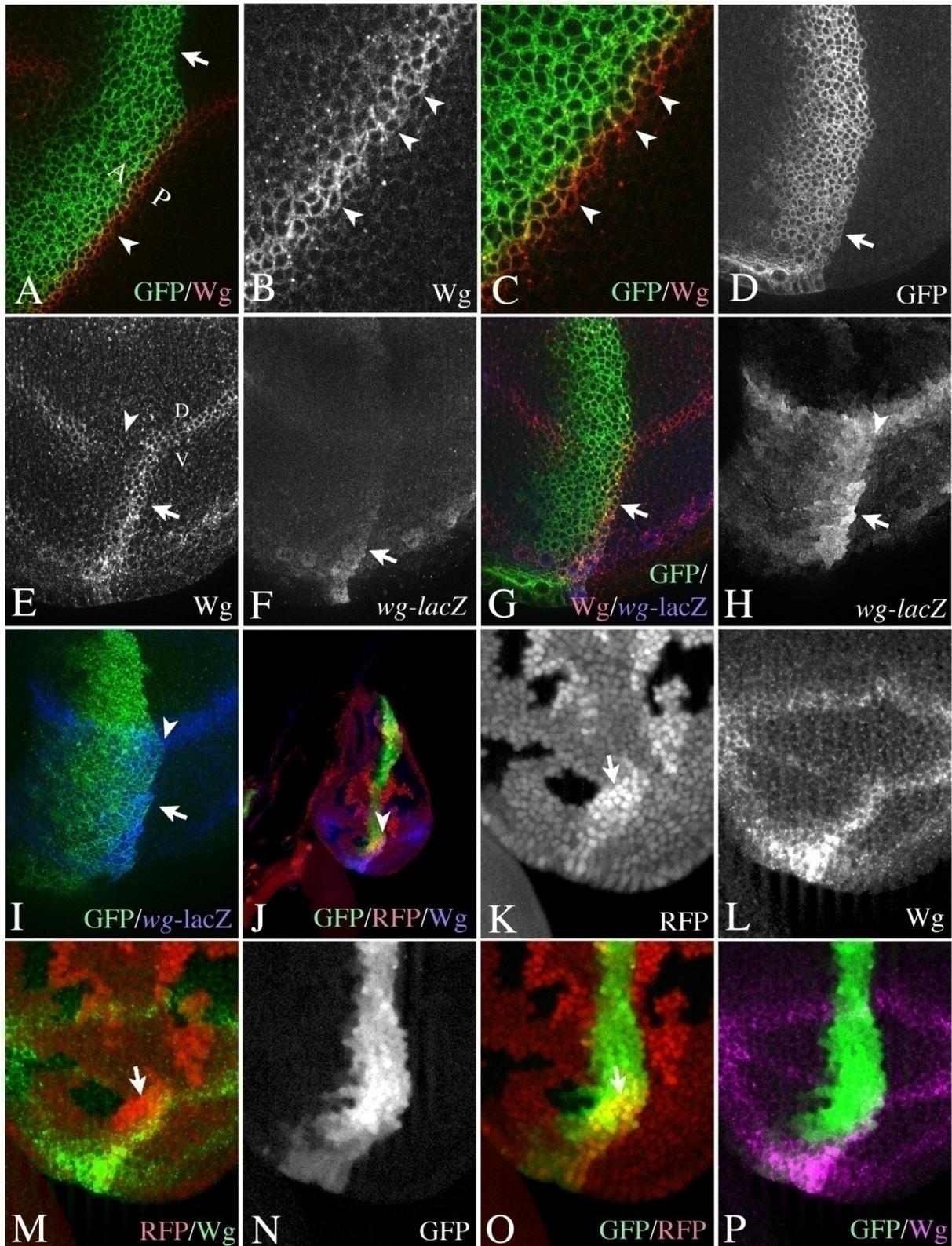
In diesem Abschnitt des Ergebnisteils wird das andere Projekt zur Untersuchung der liganden-abhängigen Aktivierung des Notch-Signalwegs an einer Fringe Grenze (FG) behandelt. Hierzu wurde zunächst die Funktionen von Fng sowie der Notch-Liganden Ser und Dl während der frühen Flügelentwicklung an einer ektopischen FG untersucht. Die Untersuchung an der ektopischen FG sollte es ermöglichen die räumlichen Voraussetzungen der Liganden an einer FG zu untersuchen. An der D/V Grenze ist dies nur bedingt möglich, da der Verlust des Notch Signalwegs zum Verlust dieser Grenze führt. Die A/P Grenze wird durch den Verlust des Notch-Signalwegs nicht beeinträchtigt und Klone überschreiten diese Grenze nicht. An der ektopischen FG sollte außerdem die differentielle Expression der Liganden, zumindest in frühen Phasen, nicht gegeben sein. Mit Hilfe der Erkenntnisse aus dieser Untersuchung wurden anschließend die Mechanismen an der D/V Grenze erneut untersucht.

### **2.6.1 Asymmetrische Expression von Notch-Zielgenen an einer ektopischen Fringegrenze (FG)**

Um die räumlichen Voraussetzungen von Dl und Ser untersuchen zu können wurde eine ektopische FG mit Hilfe des UAS/GAL4 Systems erzeugt. Mit Hilfe von *ptcGAL4* wird *UASfng* in einem breiten Streifen mit steigender Expressionsstärke zum posterioren Kompartiment hin auf der anterioren Seite entlang der antero-posterioren Kompartimentgrenze (A/P Grenze) exprimiert (siehe Abb. 2-44). Fng-exprimierende Zellen befinden sich auf der anterioren Seite und die Fng nicht exprimierenden Zellen sind auf der posterioren Seite. Auf diese Art und Weise stimmt die ektopische FG mit der A/P Grenze überein. Am Anfang des dritten larvalen Stadiums ist die Expression von Wg im gesamten ventralen Bereich der Flügeltasche zu sehen (siehe Abb. 2-45 A). Diese Expression löst sich im späteren Verlauf in

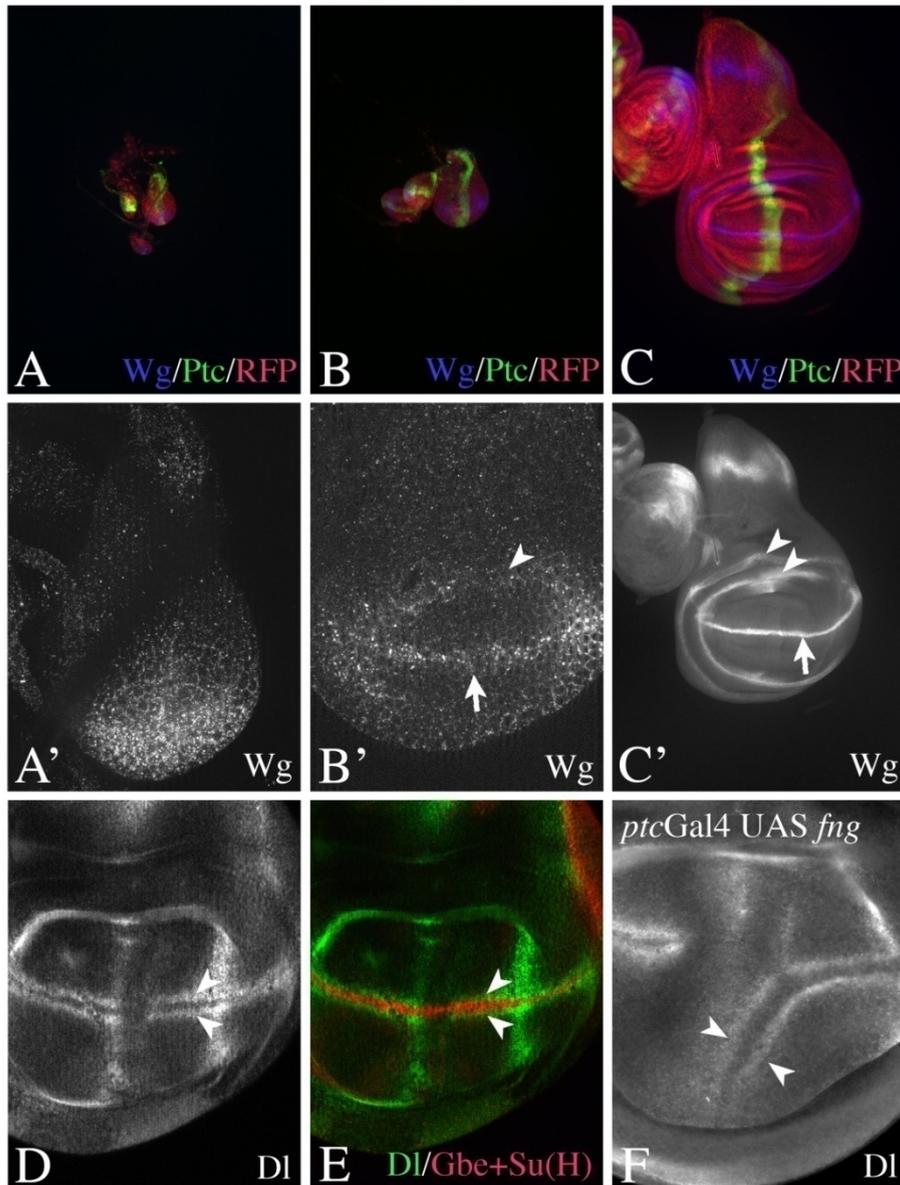
die Domäne an der D/V Grenze und in eine ringartige, das Flügelfeld begrenzende Domäne auf. Die Domäne an der D/V Grenze wird durch den Notch-Signalweg kontrolliert und ist für die Entwicklung und die Musterbildung im Flügel erforderlich (Übersicht in (Klein 2001)). In späteren Phasen erscheint eine zweite ringartige Domäne (siehe Abb. 2-45 C). Die ektopische Expression von *Fng* bewirkt einen Streifen ektopischer *Wg*-Expression, welcher der ektopischen FG bzw. der A/P Grenze folgt. Die Expression ist der *Wg*-Expression an der D/V Grenze sehr ähnlich und wird im späten dritten Larvenstadium symmetrisch. Diese ektopische FG ist auf die ventralen Zellen des Flügelfeldes beschränkt, da die endogene *fng* Expression in den dorsalen Zellen keine ektopische FG zulässt. Zuerst fokussiert sich die Analyse auf das frühe bis mittlere dritte Larvenstadium und die Expression von *Wg* und *wg-lacZ* um die Notchaktivität anzuzeigen. Während dieses Stadiums zeigt sich die Expression der Marker in Zellen auf der anterioren Seite der A/P Grenze (aGz) (siehe Abb. 2-44 D-I). Zellklone des anterioren und posterioren Kompartiments überschreiten nicht die A/P Grenze. Stattdessen ordnen sie sich an der Grenze an. Eine klonale Analyse an der FG bestätigt, dass die *Wg*-Expression mit Fringe exprimierenden Zellen übereinstimmt (siehe Abb. 2-44 J-P).

Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass in frühen Phasen der Flügelentwicklung, Notch asymmetrisch in Fringe exprimierenden Zellen aktiviert wird. Im späten dritten Larvenstadium ist die *Wg*-Expression symmetrisch auf beiden Seiten der ektopischen FG ((Panin, Papayannopoulos et al. 1997) siehe Abb. 2-44 A-C). In Imaginalscheiben des späten dritten Larvenstadiums, ist die Expression von *DI* an der ektopischen FG in zwei Streifen entlang der *Wg* exprimierenden Zellen sichtbar, in ähnlicher Art und Weise wie an der D/V Grenze (siehe Abb. 2-45 D-F Pfeile). Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass an der ektopischen FG ähnlich wie an der D/V Grenze in späten Phasen die symmetrische Expression von *Wg* durch den *DI/Ser/Wg* Feedbackloop erreicht wird.



**Abb. 2-44 Asymmetrische Aktivierung des Notch-Signalwegs an der ektopischen FG während der frühen Flügelentwicklung.** (A-C) Die ektopische Expression von Wg in Flügelimaginalscheiben im späten dritten Larvenstadium zeigt sich beidseitig der Grenze. Pfeilspitzen deuten auf die Expression von Wg in den pGz. Die Expressionsdomäne von *ptcGAL4* wird durch die Fluoreszenz von GFPGPI dargestellt. Die Expression von *ptcGAL4* nimmt zur in Richtung der A/P Grenze zu und ist in den aGz am stärksten. PGz zeigen keine Expression. (D-I) Expression von *UASfng* mit *ptcGAL4* führt zur ektopischen Aktivierung der Expression von Wg und *wg-lacZ* in Flügelimaginalscheiben des frühen dritten Larvenstadiums. Expressionsdomäne von *ptcGAL4* (D). Die induzierte Expression von Wg und *wg-lacZ* ist auf die GFP positiven aGz beschränkt (E-I). Die Pfeilspitze zeigt die

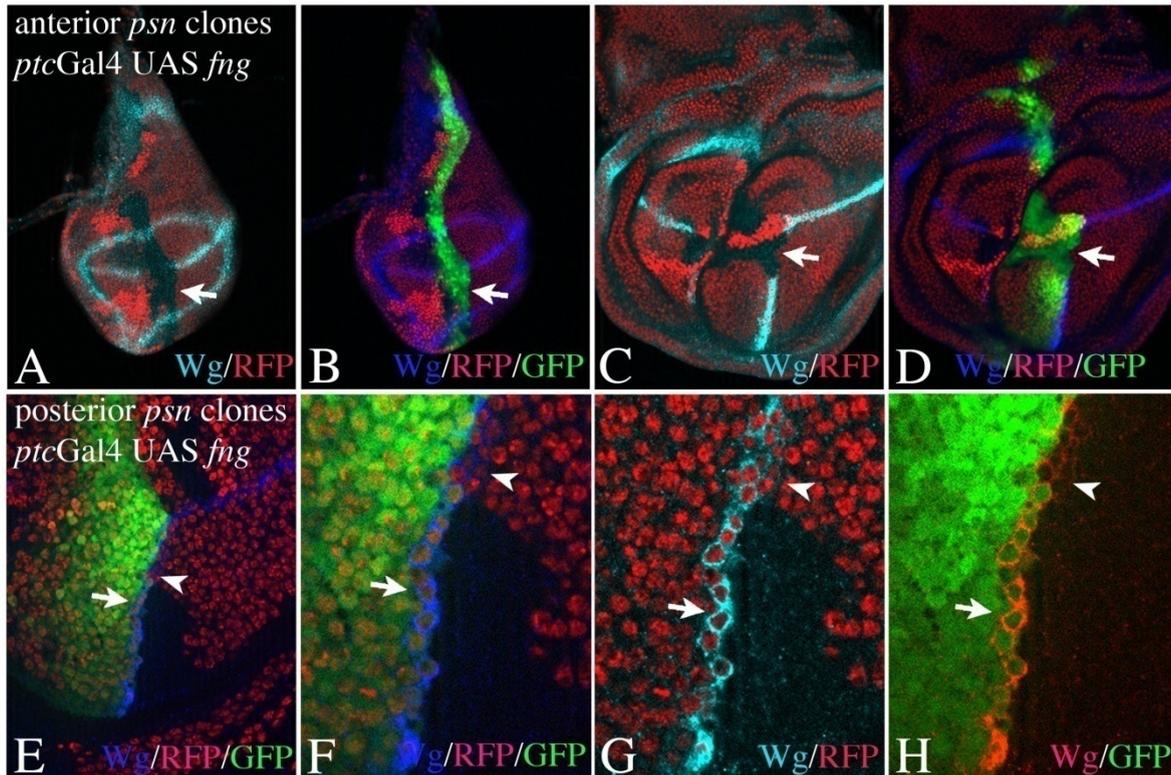
Unterbrechung der Wg Expression an der D/V Grenze aufgrund der ektopischen *fng* Expression (G,I). Die selbe Scheibe wie in (D-G) aber auf die *wg-lacZ* Expression fokussiert (H-I). Die Überlagerung (I) zeigt, dass die Expression auf die aGz beschränkt ist. Die Pfeilspitze zeigt die A/P Grenze. **(J-P)** Bestimmung der ektopischen Expression Domäne von Wg mit Hilfe der klonalen Analyse. Die A/P Grenze wird durch *ptcGAL4 UASGFP* markiert. Die Pfeilspitze in (J) zeigt auf den RFP homozygoten Klon auf der anterioren Seite der A/P Grenze, welcher vergrößert in (K-P) dargestellt wird.



**Abb. 2-45 (A-C)** Expression von *ptcGAL4* und Wg während des dritten Larvenstadiums. Wg Expression zeigt sich zu Beginn in einer ventralen Domäne, welche das Flügelanlage definiert (A). Die ventrale Domäne löst sich in eine streifen-artige Domäne an der D/V Grenze auf (Pfeil) und die proximale ring-artige Domäne (Pfeilspitze) auf (B). In späteren Stadien erscheint eine zweite ring-artige Domäne (C, Pfeilspitze). **(D-F)** Spätes Expressionsmuster von DI in einer wildtypischen Imaginalscheibe (D,E) und einer Scheibe mit ektopischer Fng Expression durch *ptcGAL4* (F). DI ist in zwei Streifen entlang der D/V Grenze (gezeigt durch *Gbe+Su(H)-lacZ*) exprimiert (D,E). Ähnliche Streifen sind in der Region der ektopischen Fng Grenze zu erkennen (Pfeilspitzen in F).

### 2.6.2 Voraussetzung der Notch Aktivität an der ektopischen FG

Um die asymmetrische Aktivierung des Notch-Signalwegs zu bestätigen, wurde durch klonale Analyse bestimmt auf welcher Seite der ektopischen FG die Aktivität von Notch benötigt wird. Im Gegensatz zur D/V Grenze ist die Etablierung und Aufrechterhaltung der A/P Grenze nicht abhängig von der Aktivität des Notch-Signalwegs und Klone, die mutant für Komponenten des Signalwegs sind, respektieren diese Grenze (Micchelli und Blair 1999, Rauskolb, Correlá et al. 1999). Um die A/P Grenze zu markieren wurde UASGFP in der *ptc* Domäne exprimiert. Dadurch konnte die anteriore oder posteriore Herkunft der Klone an den Klengrenzen eindeutig bestimmt werden. Es zeigt sich, dass die *Psn* mutanten Klone auf der anterioren Seite die Expression von *Wg* an der FG in frühen (siehe Abb. 2-46 A,B) und in späten Stadien (s. Abb. 2-46 C,D) verhindert. Dieses Ergebnis bestätigt, dass Notch asymmetrisch in den anterioren Grenzzellen (aGz) benötigt wird. Weiterhin deutet es daraufhin, dass die Aktivierung in frühen Stadien in den aGz für die späte symmetrische Expression von *Wg* vorausgesetzt wird. *Psn* mutante Klone, die sich von der posterioren Seite an die FG anschließen zeigen keinen Einfluss auf die Expression von *Wg* in aGz, verhindern jedoch die späte symmetrische Expression von *Wg*, was sich durch den Verlust der *Wg*-Expression auf der posterioren Seite zeigt (siehe Abb. 2-46 E-H). Daher wird die Aktivierung des Notch-Signalwegs für die Etablierung der Expression von *Wg* in der Phase der symmetrischen Expression in den posterioren Grenzzellen (pGz) benötigt.



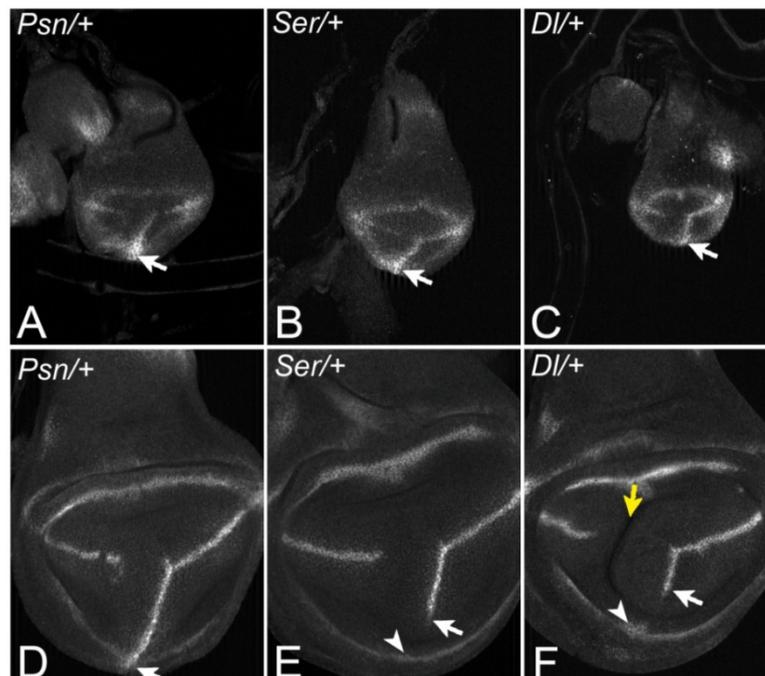
**Abb. 2-46. Räumliche Voraussetzung für die Notch Aktivität an der ektopische Fng Grenze in frühen und späten Stadien der Flügelentwicklung.** Mutante Klone werden durch den Verlust von RFP markiert. (A-D) *Psn* Klone auf der anterioren Seite der Grenze führen zum Verlust der Wg Expression in frühen (A,B) wie in späten Stadien (C,D). (E-H) Posteriore *Psn* Klone führen dazu, dass die Wg Expression in Nachbarschaft der Klone auf die aGz beschränkt bleibt (Pfeile). In Nachbarschaft der wildtypischen pGz kommt es zur symmetrischen Expression von Wg (Pfeilspitzen). Genotyp: *hsFlp; ptcGAL4 UASGFP/UAS fng; FRT2A His2AvD-RFP / FRT2A Psn<sup>C1</sup>*

### 2.6.3 Die Funktion von *Dl* und *Ser* an der ektopischen FG

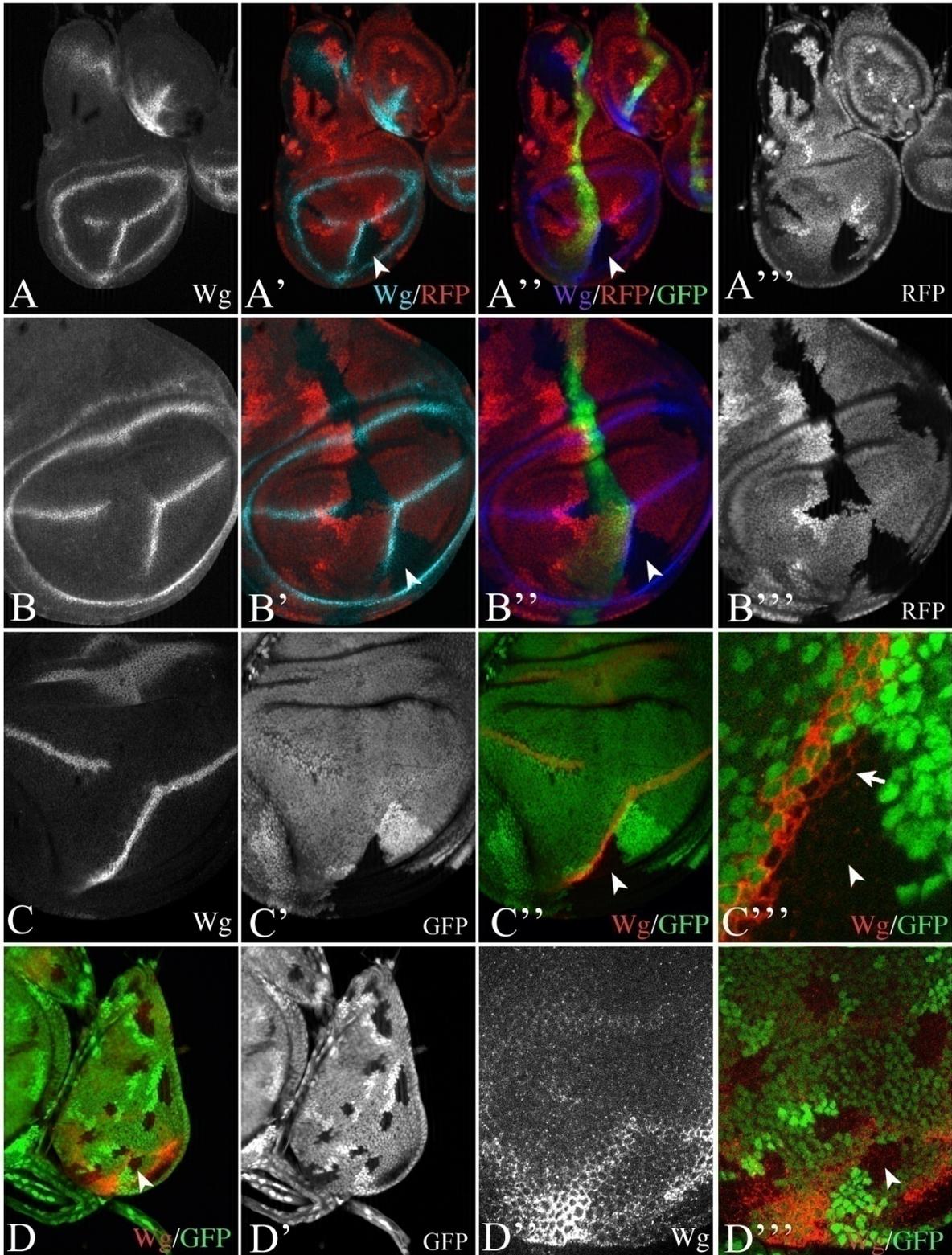
Zur Bestimmung des Liganden, der für die Induktion der frühen asymmetrischen Expression von Wg an der ektopischen FG gebraucht wird, wurden *Ser* und *Dl* mutante Klone, die sich an die A/P Grenze, d.h. an die FG anschließen, untersucht (siehe Abb. 2-47 – Abb. 2-49). Im Rahmen dieser Untersuchungen war auffällig, dass in *Dl* oder *Ser* heterozygoten Flügelscheiben des späten dritten Larvenstadiums, die ektopische Wg Expression manchmal verkürzt erscheint, was in *Psn* heterozygoten Flügelscheiben nicht auftrat. In *Dl* heterozygoten Scheiben ist dieser Effekt am stärksten (siehe Abb. 2-47 D-F). In frühen Stadien des dritten Larvenstadiums sind die drei Genotypen anhand der ektopischen Wg Expression aber nicht zu unterscheiden (siehe Abb. 2-47 A-C). In einer ersten Reihe von Experimenten wurde die A/P Grenze nicht durch die Expression von UASGFP markiert. Dies gestaltete in einigen Fällen die eindeutige Identifizierung der Kompartimentzugehörigkeit

der Klone, ob aGz, pGz oder beide betroffen sind, sehr schwierig. Daher wurde in der klonalen Analyse an der ektopischen FG UASGFP zusammen mit UASfng koexprimiert. Einige Beispiele von *Ser* Klonen aus den anfänglichen Experimenten bei denen die Klonherkunft eindeutig ist wurden im Rahmen der Analyse berücksichtigt (siehe Abb. 2-48 und Abb. 2-49).

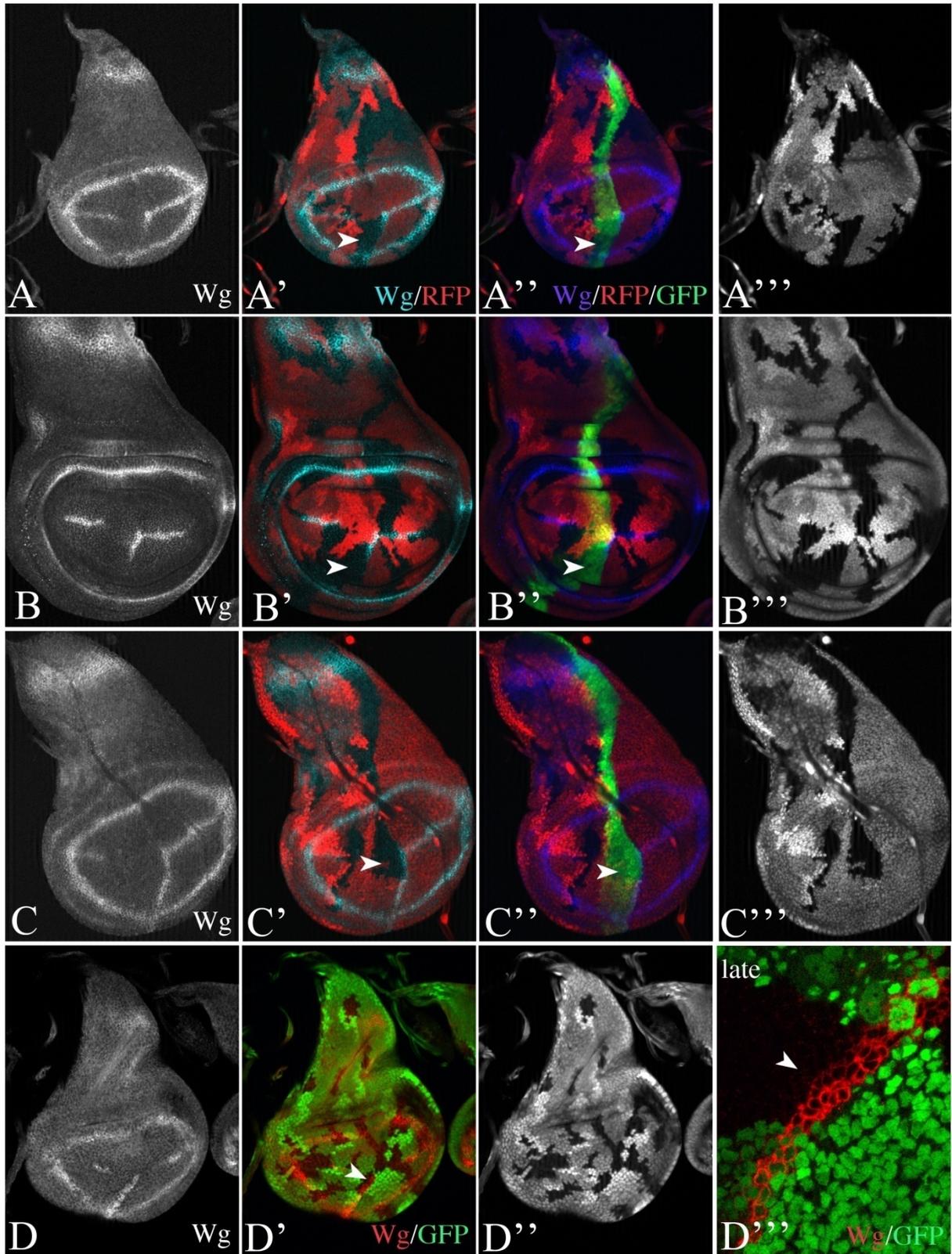
Der Verlust der Funktion von *Ser* in den pGz der Fng-Grenze zeigt einen geringen Einfluss auf die Wg-Expression in frühen und späten Stadien (s. Abb. 2-48). Wg wird normal exprimiert und die symmetrische Expression wird etabliert (s. Abb. 2-48 C). Die Folge des Verlusts auf der anterioren Seite ist in frühen und späten Scheiben variabel (siehe Abb. 2-49). In vielen Scheiben wurde eine drastische Verkürzung der ektopischen Wg Domäne in den mutanten Bereichen festgestellt (s. Abb. 2-49). In anderen Fällen ist die ektopische Wg-Domäne vorhanden (s. Abb. 2-49 C), in diesen Fällen tritt aber keine späte symmetrische Expression auf (s. Abb. 2-49 D'''/E). Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass *Ser* in frühen Stadien in Fng exprimierenden aGz benötigt wird und vermutlich eine Verstärkung des Notch-Signalwegs an der FG herbeiführt. Ferner wird *Ser* für die Etablierung der symmetrischen Expression von Wg in späten Phasen benötigt.



**Abb. 2-47** Unterschiedliche Ausprägung der durch *ptcGAL4* induzierten ektopischen Wg Expressionsdomäne in unterschiedlichen genetischen Hintergründen. Flügelscheiben des frühen (A-C) und des späten (D-F) dritten Larvenstadiums. Die Ausprägung der Wg Expressiondomäne zeigt in frühen Stadien keine Unterschiede, in den späteren Stadien zeigt sich jedoch in *Ser* heterozygoten und noch stärker im *DI* heterozygoten Hintergrund eine Verkürzung der ektopischen Wg Expressionsdomäne.



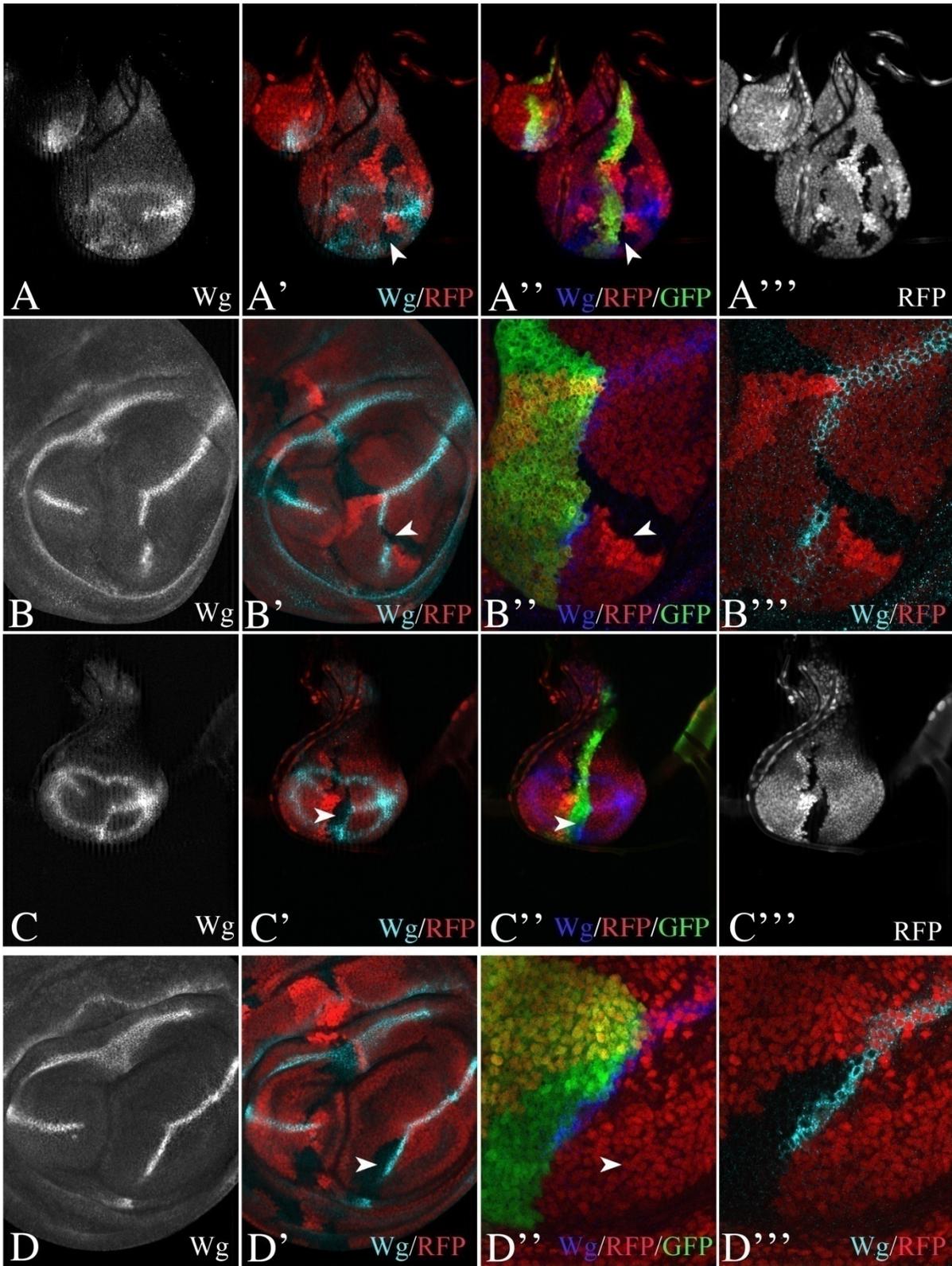
**Abb. 2-48 Räumliche Voraussetzungen der Ser Aktivität an der ektopischen Fng Grenze während der Flügelentwicklung.** Mutante Klone werden durch den Verlust von RFP oder GFP markiert. Posteriore Ser Klone beeinflussen weder in frühen (A,D) noch in späten Stadien (B,C) die Expression von Wg an der ektopischen Grenze. Pfeilspitzen zeigen auf die Klone auf der posterioren Seite (A-D). Flügelscheibe des späten dritten Larvenstadium mit einem großen Ser Klon auf der posterioren Seite (C, Pfeilspitze). Die symmetrische Wg Expression wird etabliert (C''). *hsFlp; ptcGAL4 UASGFP/UAS fng; FRT82B ubi RFPnls/ FRT82B Ser<sup>VX82</sup>*



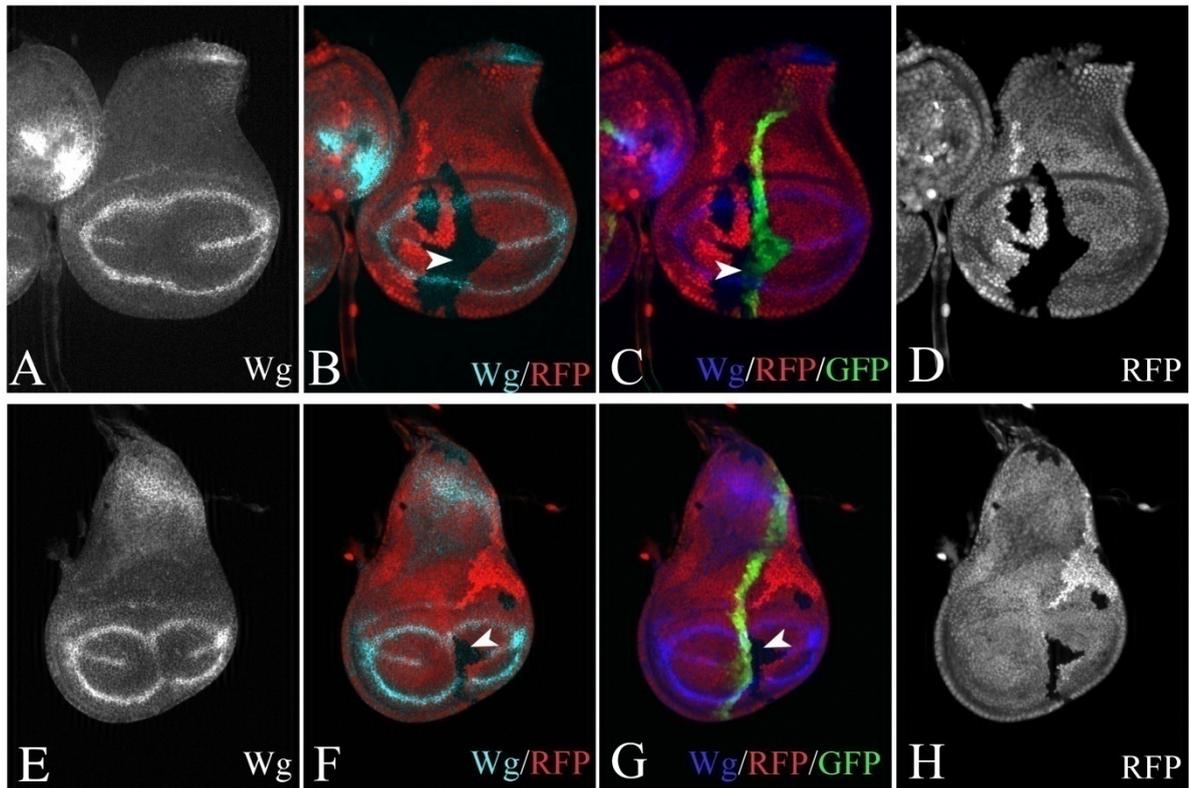
**Abb. 2-49 Räumliche Bedingungen für die Aktivität von Ser an der ektopischen Fng Grenze während der Flügelentwicklung.** Ser Klone auf der anterioren Seite der Grenze zeigen einen variablen Effekt. Pfeilspitzen zeigen auf die Klone (A-D). Ein Teil der Scheiben zeigt eine Verkürzung der Wg Expression in mutanten Bereichen. In anderen Fällen zeigt sich kein Einfluss auf die Expression von Wg. In diesen Fällen ist die Expression in späten Stadien auf die aGz beschränkt, dies lässt darauf schließen, dass die symmetrische Expression in den mutanten Regionen nicht etabliert wird (D''').

Der Verlust von *DI* in den *pGz* unterbindet die Expression von *Wg* an der *FG* in angrenzenden anterioren Zellen in frühen und späten Imaginalscheiben (siehe Abb. 2-50 A-C). Dies zeigt, dass ein *DI* vermitteltes Signal von den *pGz* die frühe Expression von *Wg* in den *aGz* anschaltet. Ferner ist diese frühe asymmetrische Expression Voraussetzung für die später auftretende Phase symmetrischer Expression. Anteriore Klone zeigen keinen Effekt auf die Expression von *Wg* (siehe Abb. 2-50).

Weiterhin wurde auch das Verhalten von *DI Ser* doppelmutanten Klonen in frühen Stadien untersucht (s. Abb. 2-51). Wie zu erwarten unterbrechen posteriore Klone die Expression von *Wg* in den *aGz* (siehe Abb. 2-51). Jedoch zeigen auch anteriore Klone eine vollständige Unterbrechung von *Wg*, was auf den Verlust der Notchaktivität zurückzuführen ist. Die *Ser* mutanten Klonen führen im Vergleich zu einer drastischen Reduktion, aber nicht zur vollständigen Unterbrechung der *Wg* Expression. Daher deutet dieses Ergebnis an, dass auch *DI* zur Aktivierung von Notch in den *fng* exprimierenden Zellen benötigt wird. Ferner bedeutet es, dass *DI* in *Fng* exprimierenden *aGz* signalisieren kann, aber die Aktivierung zu schwach ist, um die Expression von *Wg* zu induzieren.



**Abb. 2-50. Räumliche Bedingungen der Aktivität von *Dl* an der ektopischen Fng Grenze während der Flügelentwicklung.** (A-D) *Dl* Klone auf der posterioren Seite (A-B) und auf der anterioren Seite (C-D) der ektopischen Fng Grenze. Lediglich die Klone auf der posterioren Seite führen zur Unterbrechung der *Wg* Expression. Dies zeigt, dass *Dl* auf der posterioren Seite benötigt wird. Auch in späteren Stadien zeigt sich keine *Wg* Expression (B). Anteriore Klone zeigen keine Effekt auf die Expression von *Wg*. Eine Verkürzung des ektopischen *Wg* Streifens tritt bereits bei *Dl* Heterozygose häufig auf (siehe Abb. 2-47 F) *hsFlp; ptcGAL4 UASGFP/UAS fng; FRT82B ubi RFPnls/ FRT82B Dl<sup>rev10</sup>*



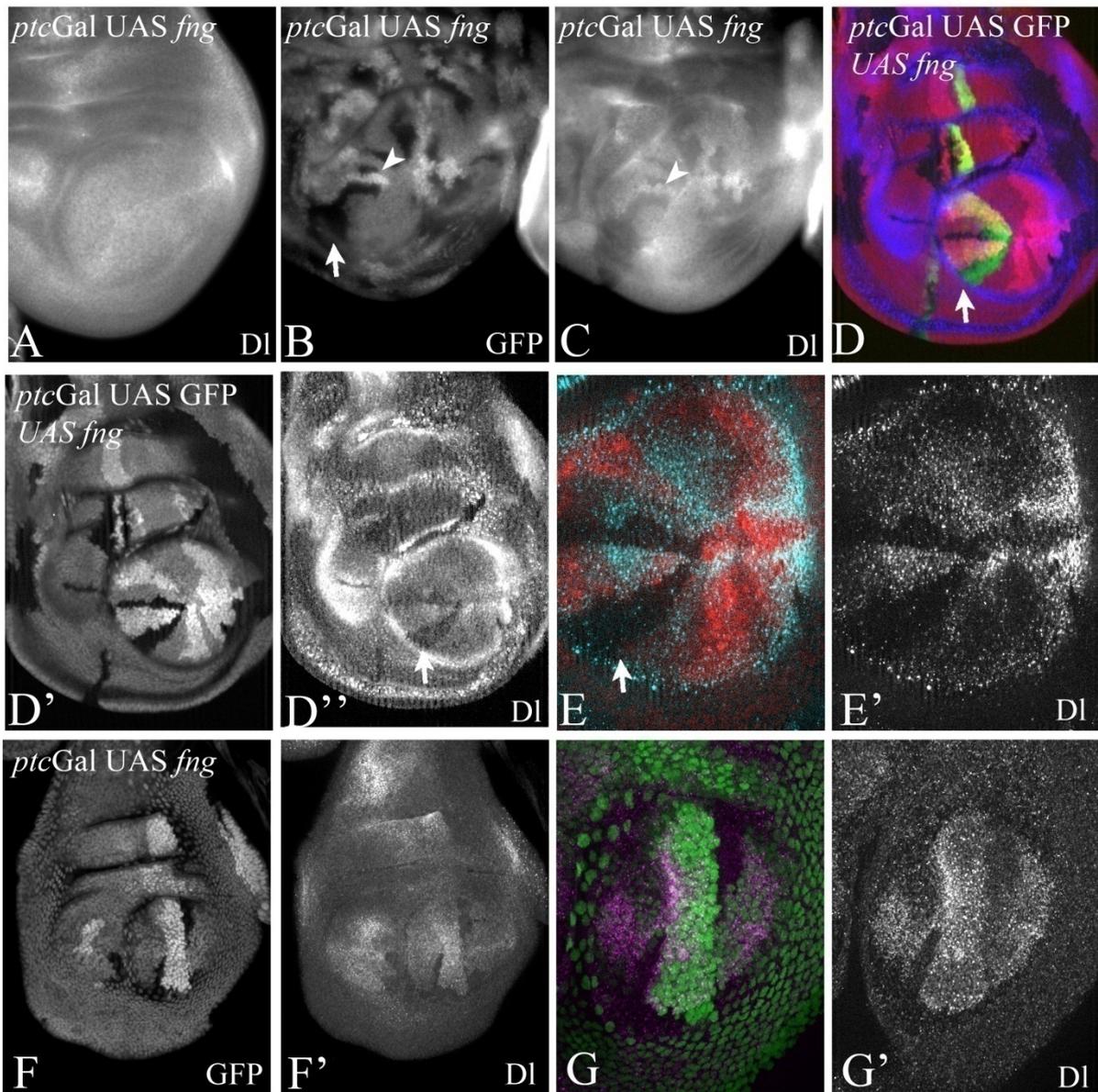
**Abb. 2-51. Räumliche Bedingungen der Aktivität von *DI Ser* an der ectopischen Fng Grenze während der Flügelentwicklung.** (A-H) *DI Ser* doppelmutante Klone auf der posterioren und der anterioren Seite unterbrechen die ectopische Expression bereits in frühen Stadien. *hsFlp; ptcGAL4 UASGFP/UAS fng; FRT82B ubi RFPnls/ FRT82B Dlr<sup>ev10</sup> Ser<sup>VX82</sup>*

#### 2.6.4 Delta ist in allen Zellen der Flügelanlage exprimiert

Die bisherigen Ergebnisse legen nahe, dass *DI* das anfängliche Signal an der ectopischen FG ist. Daher muss *DI* in frühen Stadien der Flügelentwicklung im gesamten ventralen Bereich exprimiert sein. Um dies zu überprüfen wurden *DI* mutante Klone in der Flügelanlage mit anti *DI* gefärbt. Vermeintliche Hintergrundsignale, die in anti *DI* Färbungen zu beobachten sind, erscheinen stark reduziert in *DI* mutanten Bereichen (s. Abb. 2-52). Weiterhin weisen die Zellen mit zwei wildtypischen *DI* Allelen eine stärkere Färbung auf als die heterozygoten Nachbarzellen (s. Abb. 2-52) Diese Beobachtungen zeigen, dass *DI* in der gesamten Flügelanlage in niedrigen Konzentrationen vorhanden ist. Die ubiquitäre *DI* Expression kann die ectopische Aktivierung des Notch-Signalwegs an der ectopischen FG erklären.

Weiterhin zeigt es, dass die Effekte von *Fng* auf die Aktivität von *DI* an der ectopischen FG abhängig von der Lokalisierung von *DI* ist: Im experimentellen Ansatz, ist *Fringe* ectopisch in einem breiten Streifen in der Flügeltasche exprimiert. Aber die Aktivierung der *Wg*-Expression bleibt auf die FG beschränkt. Dies deutet an, dass *DI* innerhalb *Fng*-

exprimierender Zellen nur unzureichende Aktivität für eine ektopische Expression von Wg innerhalb der gesamten Fringe-Domäne aufweist. Die Voraussetzung für die Induktion von Wg in Fringe exprimierenden Zellen ist, dass DI aus dem posterioren Kompartiment, also in posterioren Grenz-Zellen ohne Fringe-Expression, signalisiert. Nur dort kann ein Signal generiert werden, welches den Schwellenwert der Notch Aktivität für die Wg Induktion in Fringe exprimierenden aGz erreicht.

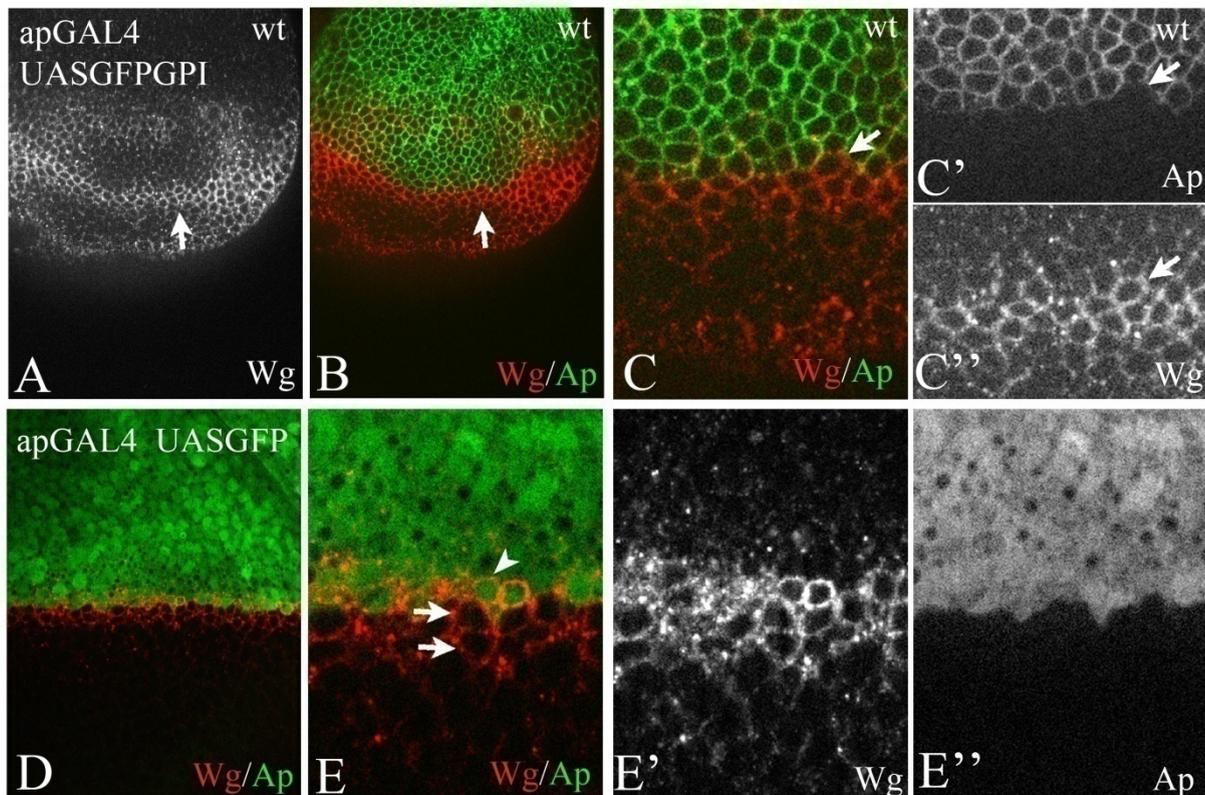


**Abb. 2-52. DI Expression im gesamten Flügelprimordium des frühen dritten Larvenstadiums. (A-C)** Expression von DI im frühen dritten Larvenstadium bei Expression von UAS *fng* mit *ptcGAL4*. DI Expression in einer Scheibe ohne Klone (A). DI Expression in einer Scheibe mit *Df<sup>rev10</sup>* mutanten Klonen, die durch Verlust des GFP Markers markiert sind (Pfeil in B,C). Pfeilspitzen deuten auf Klone die homozygot für GFP und das wildtypische DI Allel sind. Der Vergleich von (B) und (C) zeigt, dass die Färbung in *Df<sup>rev10</sup>* mutanten Klonen stark reduziert ist und in Klonen, die homozygot für das wildtypische Allel sind verstärkt ist. **(D-G)** Beispiel mit Koexpression von GFP zur Markierung der ektopischen Fng Domäne (D-E). Die Lokalisierung von DI an der Zellmembran ist auf höherer Vergrößerung schwierig festzustellen die Lokalisation ist apikal wahrscheinlich in Endosomen und an der

Zellmembran (E,E'). Weiteres Beispiel einer Scheibe mit *Dl* Klonen. Die Darstellung erfolgt hier mit Hilfe von Z-Projektionen mehrerer Bildebenen. Dies führt dazu, dass Zellen der Peripodialmembran die oberhalb der apikalen Oberfläche des eigentlichen Flügelprimordiums liegen, teilweise in der gleichen Fokusebene liegen und in F den Klon überdecken.

### 2.6.5 Aktivierung des Notch-Signalwegs an der D/V Grenze

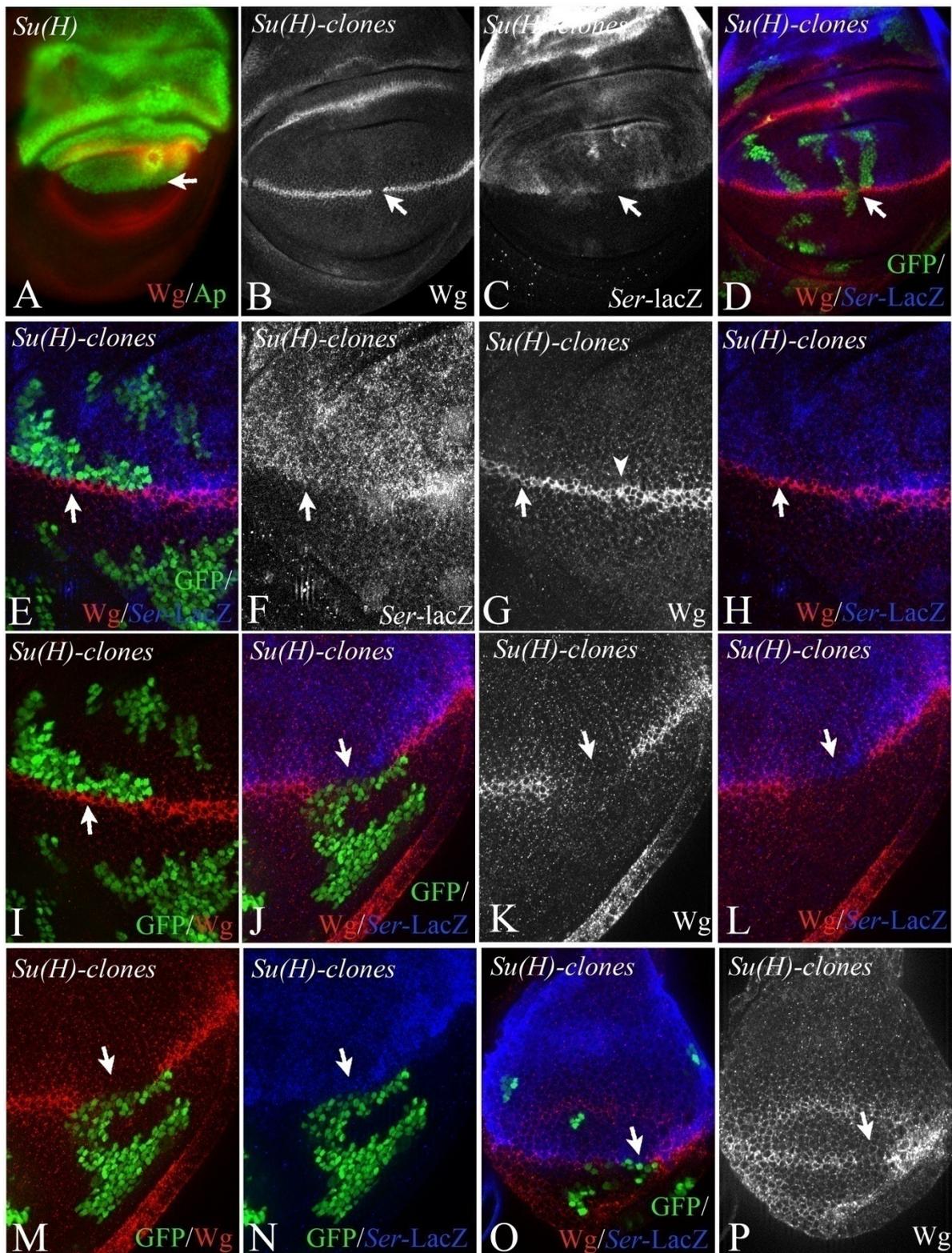
Aufgrund der beobachteten sequentiellen Aktivierung des Notch Rezeptors an der ektopischen FG wurde die Notchaktivierung an der D/V Grenze während der frühen Flügelentwicklung untersucht. Dafür wurde die anfängliche Expression von Wg an der D/V Grenze mit der (dorsalen) Ap Expression verglichen. Es zeigt sich, dass die Expression von Wg anfänglich auf die ventralen Grenzzellen beschränkt ist (s. Abb. 2-53 A-C). Dies deutet auf eine asymmetrische Aktivierung des Notch-Signalwegs auch an der D/V Grenze hin. Wie schon zuvor berichtet wurde, wird die Wg Expression während später Stadien der Flügelentwicklung in dorsalen und ventralen Grenzzellen symmetrisch (Kim et al. 1995, siehe auch Abb. 2-53). Jedoch kann auch in späten Phasen eine Asymmetrie beobachtet werden, da die Expression auf die Reihe der dorsalen Grenz-Zellen beschränkt bleibt, aber in ventralen Grenzzellen (siehe Abb. 2-53 D-E) und in der angrenzenden Reihe in ventralen Zellen auftritt (siehe Abb. 2-53 E).



**Abb. 2-53. Asymmetrische Aktivierung an der D/V Grenze.** (A-C) Expression von Wg und Ap in Flügelscheiben des frühen dritten Larvenstadiums. Die Expression von Wg ist hauptsächlich auf die ventralen Grenzzellen entlang der Ap Domäne beschränkt (Pfeile in A-C''). (D-E) In späteren Stadien zeigt sich die Expression auch in

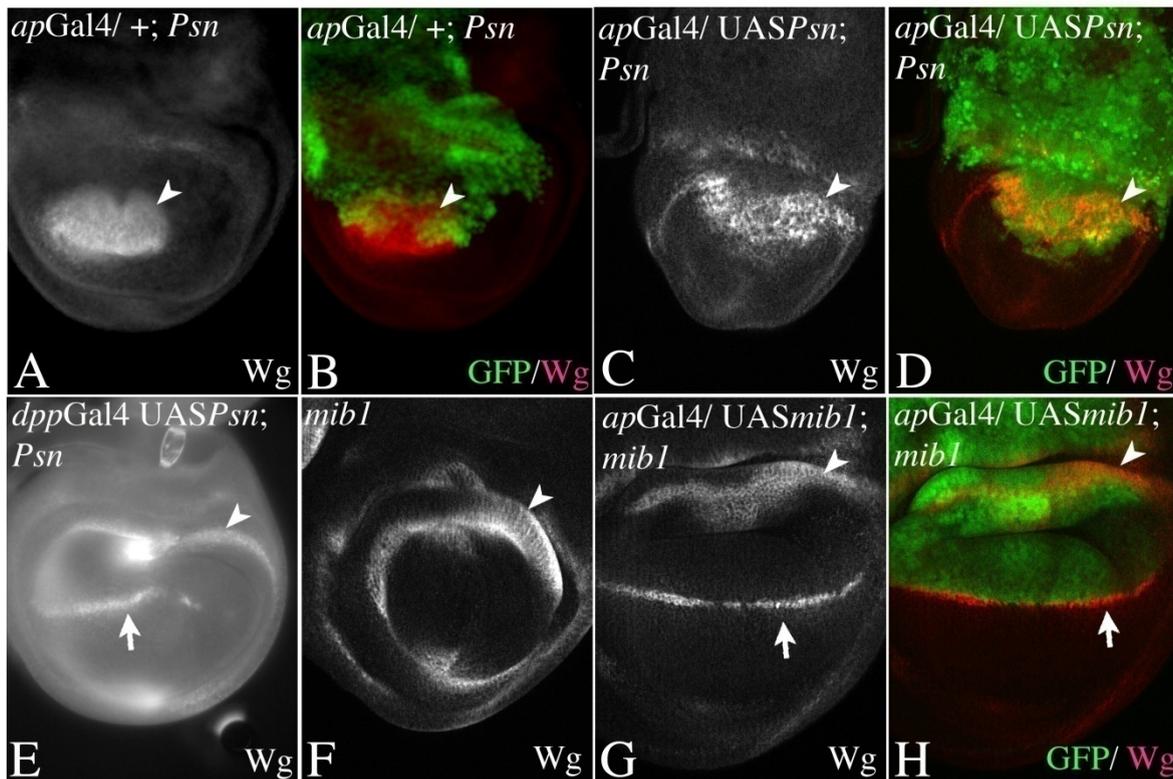
den dorsalen Grenzzellen und ist auf der dorsalen Seite auf die Grenzzellen beschränkt. Die Expression auf der ventralen Seite hingegen ist in den ventralen Grenzzellen sowie in der angrenzenden Reihe ventralen Zellen zu finden (Pfeile in E).

Die Bedeutsamkeit des asymmetrischen Signals an der D/V Grenze während der frühen Flügelentwicklung wurde durch mehrere Experimente überprüft. Zum einen wurde der Ausfall von *Su(H)* untersucht. Hier wurde sich die Tatsache zu Nutze gemacht, dass *Su(H)* mutante Klone nicht die D/V Grenze Kompartimentgrenze verletzen (Kölzer Klein 2006; Micchelli Blair 1999; Rauskolb 1999}, siehe Abb. 2-53). Es wurden Klone untersucht, die dorsal oder ventral der D/V Grenze entstanden sind. Die Herkunft der Klone konnte durch *Ser-lacZ* bestimmt werden. *Ser-lacZ* spiegelt die frühe Ap abhängige Ser Expression wider (Konstrukt II-9.5, (Bachmann und Knust 1998)). Wie zu erwarten führen mutante Bereiche, welche die D/V Grenze überschreiten, zur Unterbrechung der Wg-Expression entlang der Grenze (s. Abb. 2-54 B-D). Die Klone, die auf der dorsalen Seite liegen führen zu keiner Unterbrechung, aber zur Beschränkung der Wg Expression auf ventrale Grenzzellen (s. Abb. 2-54 E-H). Klone von der ventralen Seite führen zu einer Unterbrechung der Wg-Expression an der D/V Grenze in frühen und in späten Stadien (s. Abb. 2-54 J-P). Dies zeigt, dass die Aktivierung des Notch-Signalwegs in ventralen Grenzzellen benötigt wird um die Expression von Wg einzurichten.



**Abb. 2-54. Klonale Analyse des Nullallels  $Su(H)^{D47}$  mit dem MARCM System.** Klone sind positiv markiert durch die Expression von GFP. (A) Expression von Ap in einer  $Su(H)^{D47}$  mutanten Flügelimaginalscheibe. Der Grenzverlauf der Ap exprimierenden Zellen und nicht exprimierenden Zellen zeigt keine Unregelmäßigkeiten, daher wird die D/V Kompartimentgrenze in Abwesenheit der  $Su(H)$  Funktion gebildet. (B-P)  $Su(H)$  mutante Klone auf der dorsalen und/oder ventralen Seite der Kompartimentgrenze. Genotyp:  $hsFlp tubGAL4 UASGFPnls; Su(H)^{D47} P(B) FRT40A / tubGAL80 FRT40A; Ser-lacZ / +$ .

Durch weitere Experimente wurde die Aktivierung des Notch-Signalwegs auf die dorsalen Zellen beschränkt. Die alleinige Aktivierung von Notch in dorsale Zellen durch Expression von UAS*Psn* in *Psn* mutanten Scheiben mit *ap*GAL4 führt dazu, dass sich die Flügelanlage nicht richtig entwickelt. Die Expression von Wg an der D/V Grenze ist nicht vorhanden und der Durchmesser der übrigen ringartigen Domäne drastisch reduziert, wie es auch in *Psn* mutanten der Fall ist ((Troost und Klein 2012), siehe Abb. 2-55 A-D). Wenn die Expression von UAS*Psn* in den *Psn* mutanten durch *dpp*GAL4 beidseitig, dorsal und ventral durchgeführt wird, kommt es zu einer Wiederherstellung der Wg Domäne an der D/V Grenze ((Troost und Klein 2012), siehe Abb. 2-55 E). Diese Experimente zeigen, dass die Beschränkung der Notchaktivität auf die dorsale Seite nicht ausreichend ist, damit die Flügelentwicklung stattfindet. Es ist nicht möglich UAS-*Psn* ausschließlich in ventralen Zellen zu exprimieren, da es keine geeignete GAL4 Aktivator Linie gibt. Deshalb wurden alternative Experimente durchgeführt. Erstens wurde die Aktivität der Liganden auf die dorsalen Zellen beschränkt. Dies wurde mit Hilfe der Expression von UAS-*mib1* mit *mib1* mutanten Imaginalscheiben mit *ap*GAL4 erreicht ((Troost und Klein 2012), siehe Abb. 2-55 F-H). Vorangehende Arbeiten zeigten dass Mib1 absolut für die Aktivität von Ser und Dl benötigt wird (Lai, Roegiers et al. 2005, Le Borgne, Remaud et al. 2005, Wang und Struhl 2005). Die Expression von Wg an der D/V Grenze in *mib1* mutanten ist nicht vorhanden ((Lai, Roegiers et al. 2005, Le Borgne, Remaud et al. 2005, Wang und Struhl 2005), siehe Abb. 2-55 F). Die Expression von UAS*mib* nur in dorsalen Zellen führt zu einer Etablierung des Wg Domäne an der D/V Grenze ((Troost und Klein 2012), siehe Abb. 2-55 G-H). Dies legt nahe, dass ein Signal von dorsalen zu ventralen Grenzzellen ausreichend ist, damit die Wg Expression und die Flügelentwicklung initiiert werden können.

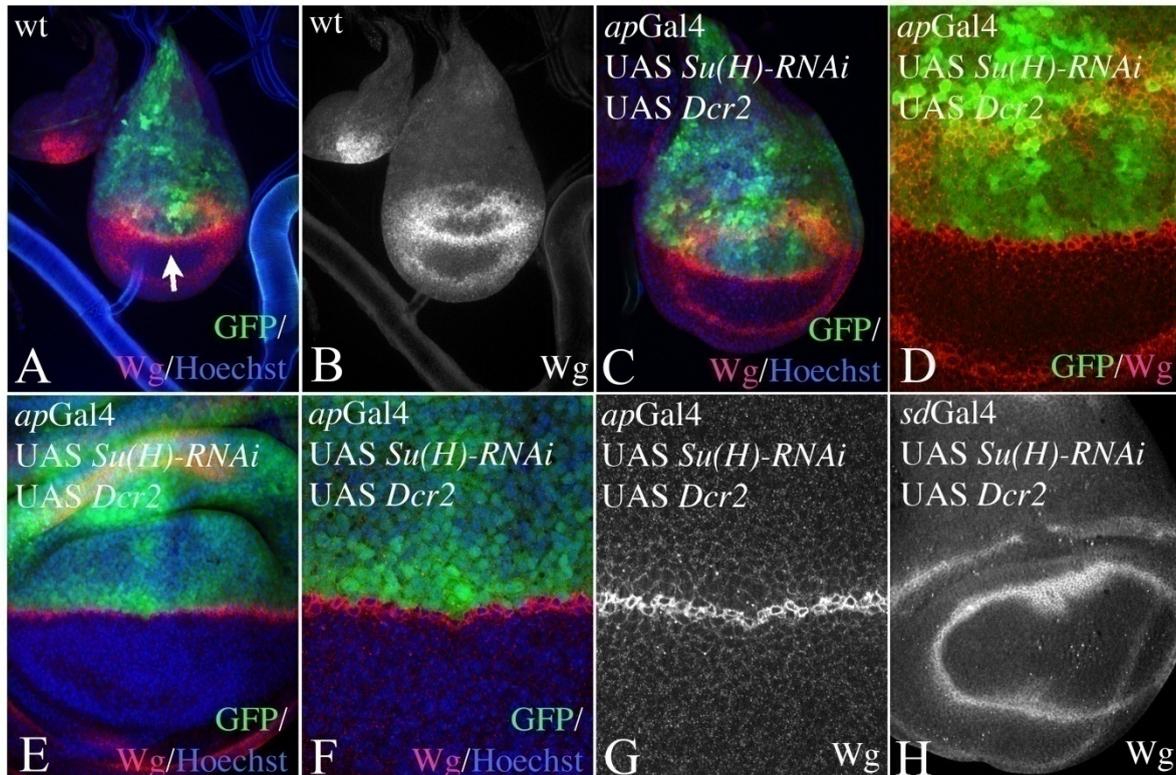


**Abb. 2-55. Relevanz der Notch Aktivität in dorsalen und ventralen Grenzzellen für die Flügelentwicklung. (A-D)** Die UAS*Psn* Expression in einem *Psn* mutanten Hintergrund ist auf die dorsalen Zellen mit *apGAL4* beschränkt. Die Pfeilspitze zeigt auf die innere ring-artige Domäne von *Wg* in der proximalen Flügelanlage. Die Expression von *Ap* (grün) und *Wg* (rot) in einer *Psn<sup>ci</sup>* mutanten Flügelimaginalscheibe. Die Grenze der *Ap* exprimierenden und nicht exprimierenden Zellen ist unregelmäßig, da die Kompartiment Grenze nicht gebildet wird. Darüber hinaus ist der Durchmesser der inneren Ring-artigen Domäne von *Wg* stark reduziert und die Expression an der D/V Grenze fehlt (A,B). Ein ähnlicher Phänotyp wird beobachtet, wenn UAS *Psn* ausschließlich in dorsalen Zellen mit *apGAL4* exprimiert wird. Daher ist die ausschließliche Aktivität in den dorsalen Zellen nicht ausreichend um die Expression von *Wg* an der D/V Grenze wiederherzustellen (C,D). **(E)** Im Gegensatz dazu, führt die Expression von UAS*Psn* mit *dppGAL4* zu einer Wiederherstellung der *Wg* Expression (Pfeil). **(F-H)** Die ausschließliche Expression von UAS *mib1* in dorsalen Zellen mit *apGAL4* ist ausreichend, um die Expression von an der D/V Grenze wiederherzustellen und die Flügelentwicklung zu erlauben. ( übernommen aus Troost und Klein 2012, von Thomas Klein)

In einem zweiten Experiment wurde die Aktivität des Notch-Signalwegs durch die Expression von UAS*Su(H)*-RNAi mittels *apGAL4* in dorsalen Zellen unterdrückt. Diese Scheiben sehen morphologisch relativ normal aus. Der Durchmesser der ring-artigen Domäne von *Wg* ähnelt dem Wildtyp und *Wg* wird auch an der D/V Grenze exprimiert (s. Abb. 2-56 A-G). Ein Vergleich mit der *ap* Domäne zeigt, dass die Expression von *Wg* auf der ventralen Seite nahe der Grenze auch in späten Phasen beschränkt ist (s. Abb. 2-56 D,F). Von daher scheint die Aktivität des N-Signalwegs in ventralen Zellen für den Ablauf der Flügelentwicklung auszureichen. Wurde das *Su(H)*-RNAi Konstrukt im gesamten Flügel durch *sdGAL4*

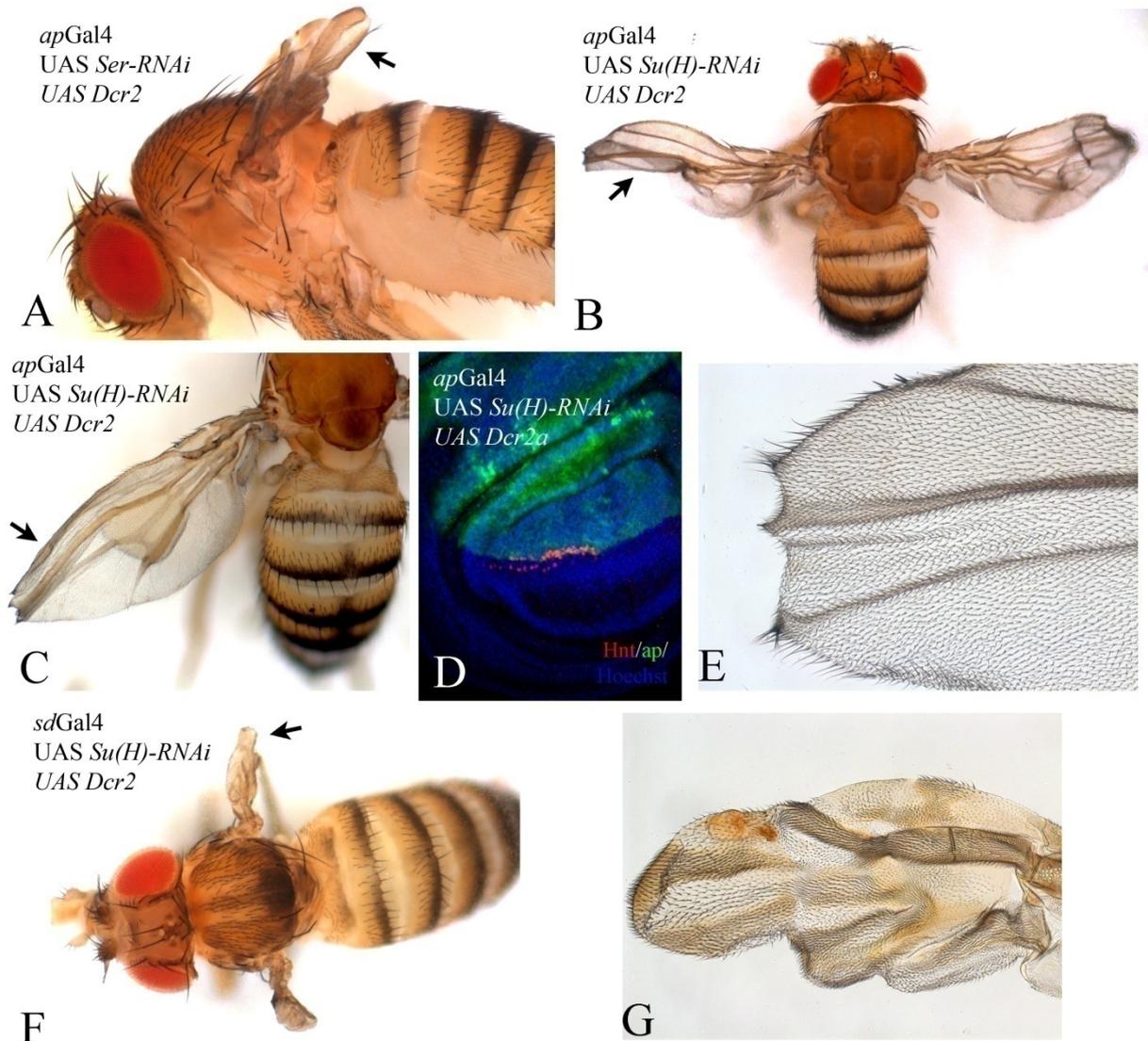
(*scalloped*, *sd*) angeschaltet, zeigt sich ein Funktionsverlust, der *Su(H)* Nullmutanten stark ähnelt (s. Abb. 2-56 H vgl. Abb. 2-54 A). Dies zeigt, dass das RNAi Konstrukt effektiv ist.

Ähnliche Resultate lieferte die Expression von UAS H mit *apGAL4* (Troost und Klein 2012). Die durch die RNAi gegen *Su(H)* generierten adulten Fliegen zeigen die zu erwartenden Phänotypen. Im Falle des Funktionsverlust in dorsalen Zellen durch *apGAL4* zeigen sich auf dem Notum fast keine Borsten. Die Flügel sind jedoch recht normal, bis auf die verbreiterten dorsalen Flügelvenen und gelegentlich auftretende distale Kerben (s. Abb. 2-57). Die Analyse des Flügelrandes zeigt, dass die Borsten ventral liegen. Nichtsdestotrotz zeigen sich ein paar dorsale „stout bristles“. Dies deutet daraufhin, dass die neuronalen Vorläufer der dorsalen Borsten induziert werden, aber aufgrund der wiederholten Voraussetzung des N-Signalwegs während deren gesamten Entwicklung (Hartenstein und Posakony 1990), nicht korrekt gebildet werden. Die Tatsache, dass sie induziert werden, zeigt, dass die ventrale Restriktion der *Wg* Domäne ausreicht um die Musterbildung des Flügels in einer annähernd normalen Weise zu gestalten. Aus der Expression von *Su(H)*-RNAi mittels *sdGAL4* resultiert ein stark verkrüppelter Flügel, welcher der *Ser* Null-Situation ähnelt (Troost und Klein 2012).



**Abb. 2-56. Relevanz der Notch Aktivität in dorsalen und ventralen Grenzstellen für die Flügelentwicklung.** (A-B) Ap und Wg Expression in frühen Stadien der Flügelentwicklung. (C-H) Expression von *Su(H)*-RNAi während der Flügelentwicklung mit *apGAL4* (C-G) und *sdGAL4* (H). Expression mit *apGAL4* führt zur Bildung einer annähernd normalen Flügelanlage. Der Vergleich mit der *ap* Expression zeigt, dass die *Wg* Domäne auf die

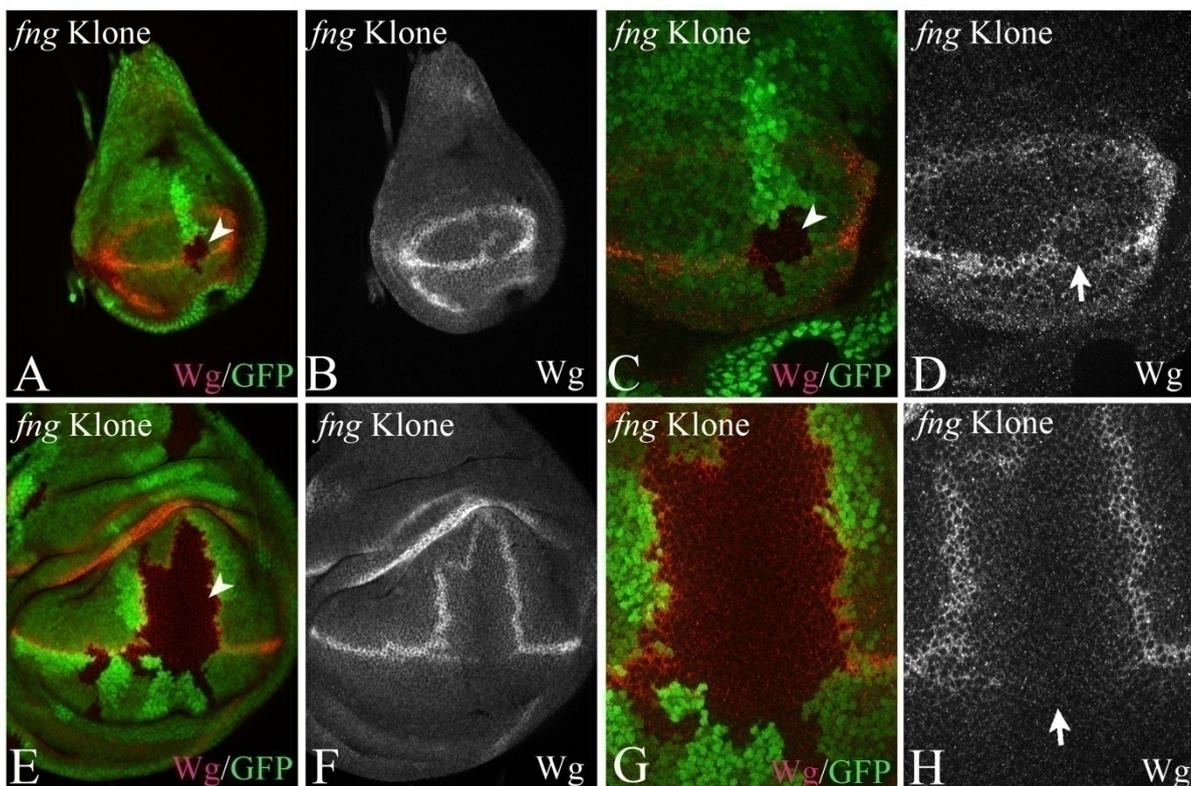
ventralen Grenzzellen in frühen (C,D) sowie in späten Stadien (E-G) beschränkt ist. (H) Die Expression mit *sdGAL4* in beiden Hälften des Flügels führt zum Verlust der *Wg* Expression an der D/V Grenze. (29°C)



**Abb. 2-57 (A)** Die Expression von *Ser*-RNAi in dorsalen Flügelsellen mit *apGAL4* hat einen stark verkrüppelten Flügel zur Folge (Pfeil). (B-D) Wird *Su(H)*-RNAi in dieser Weise exprimiert, entwickelt sich ein fast normaler Flügel mit verbreiterten dorsalen Flügelvenen (Pfeil). Die Borsten auf dem Notum werden nicht gebildet. (D) Flügelscheibe mit Expression von *Su(H)*-RNAi mit *apGAL4*. Überzählige SOPs (sensory organ precursor cells) werden auf der dorsalen Seite der Flügeltasche in Abwesenheit von *Su(H)* gebildet. (F,G) Die Expression von *Su(H)*-RNAi auf der dorsalen und ventralen Seite der Flügeltasche mit *sdGAL4* führt zu einem stark verkrüppelten Flügel (Pfeil). (Expression bei 29°C)

### 2.6.6 Fng wird für das Ser Signal benötigt

Die Auswirkung des Funktionsverlust von *fng* auf den Notch-Signalweg wurde mittels klonaler Analyse untersucht (s. Abb. 2-58). Bemerkenswert ist hier, dass die Expression von Wg an der D/V Grenze in *fng* mutanten Klonen schon in frühen Phasen unterbrochen wird (s. Abb. 2-58 A-D). Weiterhin zeigt sich, dass der Verlust auch nicht in späteren Phasen kompensiert werden kann (s. Abb. 2-58 E-H). Da *Ser* für die anfängliche Expression von Wg in frühen Phasen benötigt wird, deutet dies daraufhin, dass Fng für das Ser-Signal an die ventralen Grenzzellen benötigt wird.



**Abb. 2-58 Klonale Analyse des null Allels *fng*<sup>13</sup>.** (A-H) Klone, welche die D/V Grenze überschreiten, unterbrechen die Expression von Wg entlang der Grenze in frühen (A-D) und in späten Scheiben des dritten Larvenstadiums. Pfeilspitzen zeigen auf die Klonbereiche, die durch Verlust von GFP markiert wurden. *Genotyp*: *hsFlp; +/+; FRT80B GFP / FRT80B fng*<sup>13</sup>.

### 3. Diskussion

#### 3.1 Struktur-/ Funktionsanalyse von Lgd

In dieser Arbeit wurde eine detaillierte Struktur-Funktionsanalyse von Lgd in *D.m.* durchgeführt. Mit Hilfe des entwickelten Rettungsassay konnte erstmals die Analyse der weitgehend unbekanntes Lgd-Familie in einem Modellorganismus durchgeführt werden. Ähnliche Analysen für die humanen oder murinen Orthologen wurden in Zellkultur durchgeführt (Zhao, Li et al. 2010). Die Verwendung eines endogenen Promotors, d.h. der Verzicht auf die Überexpression der Lgd-Konstrukte, erwies sich als unerlässlich, da der untersuchte Prozess des endosomalen Proteintransports sehr empfindlich gegenüber der Überexpression von Lgd ist (Jaekel und Klein 2006). Dies lässt darauf schließen, dass auch die auf Überexpression basierenden Studien in Zellkultur mit Vorsicht zu interpretieren sind. Der Einfluss der Überexpression zeigt sich auch anhand anderer endosomaler Proteine, wie z.B. durch die UAS/GAL4 vermittelte Überexpression von FYVE-GFP, Rab5-GFP oder Rab7-GFP (Wucherpfeffig, Wilsch-Brauninger et al. 2003, Jaekel und Klein 2006). Darüber hinaus führte die Überexpression dieser Marker zur Unterdrückung der ektopischen Aktivierung des Notch-Signalwegs in *lgd* Zellen (Jaekel und Klein 2006). Dies deutet daraufhin, dass die Überexpression dieser endosomalen Proteine signifikanten Einfluss auf den endosomalen Proteintransport nimmt.

In den Experimenten konnte gezeigt werden, dass die DM14 Domänen für die Lgd Funktion von entscheidender Bedeutung sind. Die DM14 Wiederholungen wirken redundant und stellen bisher unbekannte Interaktionsmodule für die direkte Interaktion mit dem ESCRT III Protein Shrub dar (Troost, Jaekel et al. 2012). Die Zellkultur basierten Untersuchungen (Nakamura, Naito et al. 2008) deuten auf einen entscheidenden Einfluss der vierten DM14 Domäne von Lgd2 hin. In der Arbeit von Nakamura et al. (2008) wurde Lgd2 eine Funktion als Gerüstprotein zugewiesen. Diese Funktion wird für den Ablauf der PDK1/Akt Signalkette benötigt, die durch den EGF Signalweg aktiviert wird. In den hier durchgeführten Experimenten wurde in Bezug auf die Rettung der *lgd* Mutanten jedoch kein gravierender Unterschied zwischen den DM14 Domänen festgestellt. Vielmehr waren alle Lgd Varianten, die mindestens zwei DM14 Domänen aufweisen, in der Lage den mutanten Phänotyp vollständig zu retten. Wenn jedoch die Aktivität von Shrub reduziert wird (*shrub<sup>4</sup>/+*) zeigen die Varianten mit nur zwei DM14 Domänen eine reduzierte Funktionalität. Dies deutet

daraufhin, dass das Vorhandensein von vier Domänen die Interaktionen zwischen Lgd und Shrub unempfindlicher gestaltet, so dass eine Reduktion von *shrub* toleriert werden kann. Der Screen, der die DM14 Domänen aufdeckte suchte nach Domänen, die vermutlich durch interne Duplikationen in Genen entstanden sind (Ponting, Mott et al. 2001). Da nahezu alle Vertreter der Lgd-Familie vier DM14 Domänen aufweisen birgt dies wahrscheinlich einen evolutionären Vorteil in sich und wurde konserviert. Vier Wiederholungen haben den Vorteil, dass die Heterozygose von *lgd* und *shrub* toleriert werden kann. Die Rettungsexperimente im sensitivierten *lgd, shrub /lgd, +* Hintergrund deuten eher daraufhin, dass die zweite oder die ersten beiden DM14 Domänen in *Drosophila* am wichtigsten sind. Dies widerspricht den Ergebnissen der Zellkultur Experimente mit hLgd2 (Nakamura, Naito et al. 2008). In den Zellkultur Experimenten wurde die weit über dem endogenen Expressions-Level liegende Überexpression der Lgd Orthologe untersucht. Da mit Hilfe des GAL4 Systems kaum eine sensitive Analyse möglich war, sollten auch diese Ergebnisse vorsichtig interpretiert werden.

Da die DM14 Domänen die Interaktion mit Shrub vermitteln, könnten neben qualitativen Unterschieden in den jeweiligen Domänen lediglich quantitative Unterschiede vorliegen, und der Verlust von bestimmten Domänen durch eine gesteigerte Proteinmenge kompensiert werden kann. Weitere Rettungsexperimente im sensitivierten *lgd, shrub /lgd, +* Hintergrund mit den unterschiedlichen DM14 Konstrukte in unterschiedlichen Konzentrationen und Kombinationen könnte weitere Erkenntnis über die Voraussetzungen der unterschiedlichen Domänen bringen. Eine weitere Verfeinerung der Struktur-/Funktionsanalyse von Lgd könnte durch den Austausch von hoch-konservierten Aminosäuren in den DM14 Domänen erreicht werden um wichtige Aminosäurereste zu identifizieren und weitere Hinweise auf die Funktion zu erhalten.

Mit Hilfe von *in vitro* Assays wurde für die C2 Domäne von Lgd die Bindung an Phospholipide nachgewiesen (Gallagher und Knoblich 2006). Weiterhin zeigten Zellfraktionierungsexperimente mit zytosolischen Extrakten von wildtypischen Tieren und *lgd<sup>08</sup>* Mutanten, die eine verkürztes Protein ohne C2 Domäne produzieren, dass ein geringer Anteil mit der Membran in C2 abhängiger Weise assoziiert ist (Gallagher und Knoblich 2006). Diese biochemischen Untersuchungen widersprachen den mikroskopischen Untersuchungen, welche keine auffällige Assoziation mit Membranen, sondern eine zytoplasmatische Verteilung von

Lgd zeigte (Childress, Acar et al. 2006, Gallagher und Knoblich 2006, Jaekel und Klein 2006). Übereinstimmend konnte gezeigt werden, dass die endogen exprimierten markierten Lgd-Varianten im Zytosol lokalisiert vorliegen. Außerdem wurde für ein Konstrukt, das fast ausschließlich die C2 Domäne enthält, eine ähnliche Lokalisation wie für vollständiges Lgd gezeigt, also die Verteilung im Zytoplasma ohne auffällige Konzentrationen oder Präferenz für etwaige endosomale Strukturen. Das Konstrukt (Lgd $\Delta$ 1-664) entspricht einem Lgd Fragment, das in den Phospholipidbindungs-Assay *in vitro* verwendet wurde (Gallagher und Knoblich 2006). Die Unterschiede zwischen den biochemischen und den mikroskopischen Daten könnte dadurch erklärt werden, dass nur ein geringer Anteil von Lgd mit Membranen assoziiert ist. Diese Fraktion könnte mit Antikörperfärbungen nicht detektierbar sein. Obwohl eine Interaktion von Lgd mit Shrub vorliegt, ist es erstaunlich, dass es keine Assoziation von Lgd mit Membranen bei Verlust der VPS4 Funktion gibt, da der ESCRT III Komplex unter diesen Umständen an der Membran zurückbleibt. Dies sollte auch zu einer stärkeren Konzentration einer begrenzten Membranfraktion von Lgd führen. Deshalb scheint es wahrscheinlich, dass Lgd im Zytoplasma lokalisiert ist und wahrscheinlich auch dort wirkt. Dies wird weiter durch Varianten bestätigt denen die C2 Domäne fehlt. Diese Konstrukte retten den *lgd* Phänotyp zu einem großen Anteil, trotz der, verglichen mit dem endogenen Lgd sowie den anderen Lgd Konstrukten, sehr niedrigen Expression (Troost, Jaeckel et al. 2012).

Es wurden drei Funktionen für die C2 Domäne bestimmt. Erstens scheint sie für die Stabilität des Proteins verantwortlich zu sein, da die Varianten ohne C2 Domäne im Vergleich zu den anderen Konstrukten mit dieser Domäne, nur wenig Protein produzierten (Troost, Jaeckel et al. 2012). Eine zweite Funktion besteht in der Lokalisation des Proteins im Zytosol. Diese Funktion kann die Unterschiede zwischen den *in vivo* und den biochemischen Untersuchungen erklären, da sich zeigte, dass Varianten ohne C2 Domäne im Zellkern lokalisiert sind. Der Grund für diese Fehllokalisierung von Lgd $\Delta$ C2 ist unklar. Es wurden keine Kernlokalisierungssequenzen (NLS) in Lgd gefunden. Von daher scheint es möglich, dass es zusammen im Komplex mit einem anderen, NLS enthaltenen Protein in den Kern gelangt.

Eine dritte Funktion der C2 Domäne zeigt sich dadurch, dass Lgd $\Delta$ DM14, welches alleine keine Funktion im Rettungssassay zeigt, NES<sub>Lgd</sub> $\Delta$ C2 durch die C2 Domäne verdrängen kann und die partielle Rettung in *lgd* Mutanten unterbindet (Troost, Jaeckel et al. 2012). Von

daher vermittelt die C2 Domäne wahrscheinlich über Protein-Protein Interaktion eine Konzentrierung von Lgd am Wirkungsort im Zytosol. Übereinstimmend hierfür wurde für die C2 Domänen von Nedd4L, PKC und PKC- $\epsilon$  gezeigt, dass sie Protein-Protein Interaktionen vermitteln (Benes, Wu et al. 2005). Weiterhin wurde für hLgd2/CC2D1A eine Interaktion mittels der C2 Domäne mit dem E2 Enzym Ubc13 während des NF- $\kappa$ B Signalweges gezeigt (Zhao, Li et al. 2010). Deshalb besteht durchaus die Möglichkeit, dass die C2 Domäne von Lgd nicht die Lokalisation von Lgd an eine bestimmte Membran sondern Protein-Protein Interaktionen im Zytoplasma vermittelt. Möglicherweise verhindert diese Interaktion eine Translokation von Lgd in den Zellkern. Einen möglicherweise vorhandenen Interaktionspartner der C2 Domäne zu finden sollte als wichtiges Ziel weiterer Untersuchungen in Erwägung gezogen werden.

Vorige Untersuchungen in Zellkultur deuteten auf eine Rolle von Lgd1 und Lgd2 als transkriptionale Repressoren hin (Ou, Lemonde et al. 2003, Hadjighassem, Austin et al. 2009). Durch die hier durchgeführten Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass eine Lokalisation im Zytoplasma für die Funktion von Lgd ausschlaggebend ist. Dies lässt sich nur schwer mit der beschriebenen genregulatorischen Funktion von Lgd1 und Lgd2 in Einklang bringen, so dass eine Funktion als Transkriptionsfaktor in *D.m.* eher unwahrscheinlich ist. Weitere Klärung könnte durch die Analyse von gezielt lokalisierten Lgd-Konstrukten z.B. eines kernlokalisierten NLS-Lgds, eines kernexportierten NES-Lgds erfolgen. Weiterhin könnte eine gezielte Membranlokalisierung (Plasmamembran oder Endosom) oder auch der Austausch der C2-Domäne mit homologen Domänen aus anderen Proteine erfolgen.

### **3.2 Lgd, die ESCRT Maschinerie und die Aktivierung von Notch**

Vorige Arbeiten zeigten, dass der Funktionsverlust der ESCRTI-III Komplexe zu nicht-zellautonomer und zellautonomer Proliferation und Aktivierung des Notch-Signalwegs führt. Die mutanten Zellen verlieren darüber hinaus ihre epitheliale Organisation und sterben schließlich (Moberg, Schelble et al. 2005, Thompson, Mathieu et al. 2005, Vaccari und Bilder 2005). In *lgd* mutanten Zellen sind die Aktivierung des Notch-Signalwegs und die Proliferation zellautonom. Die mutanten Zellen zeigen keinen Verlust der Zellpolarität und überleben (Schneider, Troost et al. 2012). Die Phänotypen sind nicht identisch, stimmen aber teilweise überein. Trotzdem zeigt sich eine innige Beziehung zwischen der ESCRT III Komponente Shrub und Lgd. Die physische Interaktion der Proteine ist auch *in vivo* von

Bedeutung wie die starke genetische Interaktion zeigt. Die Tatsache, dass die Letalität in der *lgd* hypomorphen Situation (spät puppal) durch die Reduktion von Shrub (frühes drittes Larvenstadium) früher stattfindet als in *lgd* null-mutanten Tieren (früh puppal) lässt vermuten, dass die Interaktion mit *Lgd* für die Funktion von Shrub benötigt wird. Da der Genfunktionsverlust von *shrub* verheerender ist und weitere Aspekte als der *lgd* Funktionsverlust betrifft, trägt *Lgd* vermutlich zur Funktion von Shrub bei, ohne absolut dafür vorausgesetzt zu werden. Von daher könnte der Verlust von *lgd* nur einen bestimmten Aspekt der Funktion von *shrub* betreffen oder die Aktivität unterhalb eines Schwellenwerts sinken lassen, der für die vollständige Funktionalität benötigt wird. Bisherige Arbeiten lassen darauf schließen, dass *Snf7/Shrub* lange homopolymere Filamente auf der zytosolischen Seite der Endosomenmembran bildet. Die Polymerisierung wird für die Abschnürung der Vesikel ins endosomale Lumen benötigt und sie erfordert, dass *Snf7/Shrub* von der geschlossenen Form in eine offene Form umgewandelt wird (Babst, Katzmann, Estepa-Sabal et al. 2002, Henne, Buchkovich et al. 2012). Nach der ILV Bildung wird Shrub durch die Aktivität von VPS4 unter Verbrauch von ATP in die geschlossene Form überführt. Die Ergebnisse deuten daraufhin, dass Shrub und *Lgd* im Zytoplasma interagieren. Daher könnte es sein, dass *Lgd* dabei hilft Shrub für eine erneute Polymerisierung an der endosomalen Membran bereitzustellen. Weitere Untersuchungen könnten darüber aufklären, ob *Lgd* an der Konformationsänderung von Shrub beteiligt ist und darüber zur Regulation der Aktivität beiträgt.

Die genetischen Untersuchungen deuten auf eine antagonistische Beziehung zwischen *Lgd* und verschiedenen Komponenten der ESCRT Komplexe in Hinsicht auf die Aktivierung von Notch. Dies schließt ein, dass die Aktivierung von Notch in *lgd* Zellen von der Funktion der ESCRT Komplexe abhängig ist. Daher muss die Aktivierung des Notch-Signalwegs in *lgd* Zellen in anderer Art und Weise ablaufen als in ESCRT mutanten Zellen. Die Ergebnisse deuten daraufhin, dass der Verlust der *lgd* Funktion die Aktivität von Shrub beeinflusst und dies zur Aktivierung des Notch-Signalweges führt. Der Antagonismus zwischen *lgd* und ESCRT zeigt sich aber nur bezüglich der Aktivierung des Notch Rezeptors. Bei Betrachtung der Morphologie der Endosomen deutet sich eine synergistische Beziehung an. Die Reduktion von *shrub* bewirkt eine enorme Vergrößerung der Endosomen in *lgd* hypomorphen Zellen. Die *lgd* Zellen zeigen sonst keine Anzeichen solcher starken Defekte.

Da die Aktivierung von Notch ohne die Freisetzung von NICD ins Zytosol nicht möglich ist, kann angenommen werden, dass in *lgd* Zellen ein Teil der Notch Rezeptoren an der limitierenden Membran des Endosoms verbleibt und nicht in ILV verpackt wird. Unter drei möglichen Umständen könnte dies auftreten: 1.) Es werden keine ILV gebildet. 2.) Der Notch Rezeptor wird nicht effizient in die ILV verpackt oder 3.) Es kommt zur Rückfusion der ILV mit der limitierenden Membran. Der letztgenannte Prozess wurde in Zellen von Vertebraten dokumentiert (Falguieres, Luyet et al. 2009). Die Ergebnisse deuten daraufhin dass der *lgd* Verlust die Aktivität von Shrub reduziert. Von daher ist bei Verlust von *lgd* am ehesten die ineffiziente Verpackung des Notch Rezeptors in ILVs aufgrund der reduzierten Aktivität von Shrub beeinträchtigt.

### **3.3 Die Aktivierung von Notch in *lgd* Zellen**

Vorherige Arbeiten hatten gezeigt, dass der Verlust von *lgd* in Imaginalscheibenzellen zur liganden-unabhängigen Aktivierung des Notch-Signalwegs führt. Diese Aktivierung war abhängig von der Aktivität von Psn, der katalytisch aktiven Komponente des  $\gamma$ -Sekretase Komplex. Die Charakterisierung von *lgd* wurde fortgesetzt und die Umstände näher bestimmt, die in *lgd* Zellen zur Aktivierung des Signalweges führen. Die Analyse der *lgd* Zellen auf ultra-struktureller Ebene zeigen, dass eine Fraktion der Endosomen von *lgd* Zellen tatsächlich vergrößert ist und ILV enthalten.

Auch in anderen Geweben, nämlich dem Follikel-epithel, wurde gezeigt, dass der Funktionsverlust von *lgd* zu einer ektopischen Aktivierung von Notch führt (Schneider, Troost et al. 2012, Schneider 2012). Daher lässt sich vermuten, dass die ektopische Aktivierung eine generelle Konsequenz des *lgd* Funktionsverlust in *Drosophila* Zellen ist (Schneider, Troost et al. 2012).

In einem Modell kann die mögliche Funktion von *lgd* bei der Aktivierung des Notch Rezeptors skizziert werden (siehe Abb.3-1). Notch wird normal endozytiert und zu den reifenden Endosomen zwecks Abbau transportiert. Für eine Aktivierung des Rezeptors wird vorausgesetzt, dass NICD dem Zytosol zugewandt sein muss, um in den Zellkern zu gelangen. Während des normalen Abbaus wird Notch in ILV verpackt und NICD kann nicht mehr in den Zellkern gelangen. Dies deutet daraufhin, dass in *lgd* Zellen die Bildung der ILV entweder nicht stattfindet oder der Notch Rezeptor nicht effizient in die ILV verpackt wird. Die EM Analyse zeigte, dass die vergrößerten reifenden Endosomen ILV enthielten. Deshalb

erscheint die Bildung der ILV bei Funktionsverlust von *lgd* nicht besonders stark betroffen. Über ähnliche Interaktionen zwischen den Orthologen der Säuger von Lgd (CC2D1A/B) und Shrub (CHMP 4a,b,c) wurde jüngst berichtet (Martinelli, Hartlieb et al. 2012, Usami, Popov et al. 2012). Weiterhin deuten *in vitro* Experimente daraufhin, dass Lgd1 und Lgd2 die Polymerisierung der CHMP Proteine beeinflussen (Martinelli, Hartlieb et al. 2012).

Da Lgd mit Shrub interagiert und für dessen volle Funktion gebraucht wird, ist wahrscheinlich die effiziente Verpackung von Notch bei *lgd* Funktionsverlust betroffen. Dies könnte dazu führen, dass die Notch Rezeptoren oder nur ein Bruchteil davon an der limitierenden Membran des späten Endosoms verbleiben (NLM Fraktion). Diese NLM Fraktion wird dann liganden-unabhängig aktiviert. Obwohl eine NLM Fraktion für die Notch Aktivierung in *lgd* Zellen vorausgesetzt wird, reicht sie aber nicht für die Aktivierung aus. Es wurde zuvor berichtet, dass der Verlust von *hrs* die Notch Aktivierung in *lgd* Zellen verhindert (Childress, Acar et al. 2006, Gallagher und Knoblich 2006, Jaekel und Klein 2006). In dieser Mutante, wird die Bildung der ILV unterdrückt (Lloyd, Atkinson et al. 2002), und als Resultat bleibt die Fracht (Notch) an der limitierenden Membran. In *lgd hrs* Zellen zeigte sich auch ein Einfluss auf den endosomalen Reifungsprozess. Durch den Verlust der Funktion von *hrs* könnte die Rab5/Rab7 Konversion betroffen sein oder auch Störungen bei der Endozytose auftreten und dadurch die Reifung und letztlich die Fusion mit dem Lysosom verhindert werden. Eine kürzlich erschienene Studie in der Hefe deutet daraufhin, dass Störungen bei der Rab5/Rab7 Konversion eine Konsequenz aus der Fehlfunktion von ESCRT sind (Russell, Shideler et al. 2012).

Die Ergebnisse geben weiteren Einblick in die Aktivierung des Notch Rezeptors. Es konnte gezeigt werden, dass die Notch Aktivierung nicht nur unabhängig von den Liganden sondern auch unabhängig von *kuz* ist. *kuz* wird für das Ectodomain Shedding, einer Voraussetzung für RIP durch den  $\gamma$ -Secretase Komplex, gebraucht. Die Aktivität der  $\gamma$ -Sekretase ist notwendig für die Aktivierung von Notch in *lgd* Zellen (Klein 2003, Jaekel und Klein 2006). Deshalb muss das Ectodomain Shedding in anderer Art und Weise zu Stande kommen. Die Untersuchungen zeigen, dass für die Aktivierung von Notch die Fusion der Endosomen mit dem Lysosom benötigt wird. Dies legt nahe, dass auch die Aktivierung im Lysosom und nicht im reifenden Endosom stattfindet. Dieser Befund hat weitreichende Auswirkungen. Erstens deutet es auf einen Defekt im endosomalen Reifungsprozess in *lgd* Zellen hin, da die Fusion reifer Endosomen mit dem Lysosom nicht zur Aktivierung von Notch in Wildtyp Zellen führt.

Zweitens zeigt es, dass obwohl die *lgd* Zellen einen Defekt im Abbau von Transmembranproteinen zeigen, letztlich die Fusion mit dem Lysosom stattfindet. Daher wird der Abbau eher verzögert als verhindert. Die Verzögerung der Fusion erklärt die Beobachtung, dass *lgd* Zellen z.T. moderat vergrößerte MVBs aufweisen, da mehr homotypische Fusionen zwischen den reifenden Endosomen auftreten und so über die Zeit ein größerer Umfang erreicht wird als unter normalen Bedingungen. Drittens, wurde gezeigt, dass die beobachtete Akkumulation von Notch in späten Endosomen nicht *per se* der Grund für die Aktivierung des Signalwegs ist. Dies wird durch die Beobachtung gestützt, dass obwohl alle Zellen den Signalweg aktivieren, nicht alle Zellen eine starke Akkumulation von Notch in reifenden Endosomen zeigen (Schneider, Troost et al. 2012, Schneider 2012). Insgesamt deuten die untersuchten endosomalen Phänotypen darauf hin, dass die Verstärkung der eher milden Akkumulation von Notch in *lgd* Zellen, mit Ausnahme der Überexpression von aktivierbaren Notch-Rezeptoren der Aktivierung entgegenwirkt.

Eine einfache Erklärung für das alternative Ectodomain Shedding der NLM Fraktion im Lysosom ist der Abbau der ins Lumen hineinragenden NECD durch die aktivierten Hydrolasen. Auf diese Weise entsteht ein NEXT-ähnliches Fragment, das nun ein Substrat für den  $\gamma$ -Secretase Komplex darstellt. Es wurde gezeigt, dass der  $\gamma$ -Secretase Komplex im Lysosom aktiviert ist (Pasternak, Bagshaw et al. 2003) und wahrscheinlich kann die Freisetzung von NICD durch RIP ins Zytosol erfolgen. Übereinstimmend zeigt sich, dass N $\Delta$ EGF in *lgd* aber nicht in wildtypischen Zellen aktiviert wird. Dies lässt vermuten, dass die verbleibende LNR von N $\Delta$ EGF, die von der LM ins Lumen ragen, in *lgd* Zellen einer Konformationsänderung unterzogen oder abgebaut werden.

Es konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von Notch in *lgd* Zellen die Funktion der V-ATPase benötigt. Diese Protonenpumpe wird für die Ansäuerung des Lumens der reifenden Endosomen benötigt. Diese Ansäuerung wiederum wird für die Aktivierung der Hydrolasen im Lysosom benötigt. Die Funktion der V-ATPase bei der Aktivierung des Notch-Signalwegs in *lgd* Zellen könnte daher zweifach benötigt werden. Einerseits wird die Aktivität für die Aktivierung der Hydrolasen vorausgesetzt. Andererseits könnte die Azidifizierung des Lumens auch NECD denaturieren oder sogar die Calcium-Brücke zwischen NICD und NECD auflösen. Es sei darauf hingewiesen, dass die Funktion der V-ATPase bei der Aktivierung von Notch in *lgd* Zellen sich von der Beteiligung an der liganden-abhängigen Aktivierung

unterscheidet. Diese scheint im frühen Endosom stattzufinden, dessen pH deutlich höher ist (Huotari und Helenius 2011).

In dem Modell kann die Aktivierung von Notch in *lgd* Zellen weiter erklärt werden (Abb. 3-1). Der Funktionsverlust von *lgd* bewirkt wahrscheinlich eine reduzierte Aktivität von Shrub. Dies hat zur Folge, dass der Notch Rezeptor teilweise an der limitierenden Membran der reifen Endosomen zurückbleibt. Durch die Fusion mit dem Lysosom werden die Hydrolasen aktiviert und bewirken wahrscheinlich in Kombination mit dem sauren Milieu ein alternatives Ectodomain Shedding. Dadurch entsteht ein NEXT-ähnliches Substrat, das durch den  $\gamma$ -Sekretase Komplex prozessiert wird und so für die Freisetzung von NICD sorgt. Das Modell ähnelt dem vorgeschlagenen Modell für die Aktivierung des Notch-Signalwegs durch die E3-Ubiquitin-Ligase Deltex (Dx) (Wilkin, Tonggok et al. 2008). Eine kürzlich erschienene Arbeit berichtet über eine enge funktionale Beziehung zwischen dem  $\beta$ -Arrestin ähnlichen Protein Kurtz (Krz), Dx und Shrub bei der Regulation des Notch-Signalwegs (Hori, Sen et al. 2011). Es wurde ein Modell vorgeschlagen, in dem Shrub die Aktivität von Notch durch die Verpackung des polyubiquitinierten Rezeptors in ILV herunterreguliert, und Dx der Verpackung entgegen wirkt und die Aktivierung fördert. Dx vermittelt diese Funktion durch die Regulation der Ubiquitinierungsstatus von NICD. Die Überexpression verschiebt das Gleichgewicht zwischen Poly- und Monoubiquitinierung zu Gunsten der Polyubiquitinierung des Notch Rezeptors.

Die Phänotypen des *lgd* Funktionsverlusts sind qualitativ dem Phänotyp der Überexpression von Dx ähnlich, allerdings ist die Aktivierung von Notch stärker. Dies könnte daraufhin deuten, dass Lgd der Funktion von Dx entgegenwirkt. Das Model von Hori et al. (2011) vermutet, dass Dx die Verpackung von Notch in ILV durch Shrub verhindert. Lgd beeinflusst die Aktivität von Shrub durch direkte physische Interaktion (Jäckel 2010, Troost, Jaeckel et al. 2012). Daher wäre es möglich, dass die Beziehung zwischen Dx und Lgd indirekt ist und durch Shrub vermittelt wird.

Die Untersuchungen zeigen, dass der zur Aktivierung von Notch führende Prozess in *lgd* Zellen eine begrenzte Aufnahmefähigkeit hat. Möglicherweise ist der S3-Schnitt der limitierende Faktor, da eine ektopische Aktivierung von Notch in *lgd* Zellen durch die Verminderung der Aktivität des  $\gamma$ -Sekretase Komplexes unterdrückt wird. Wenn dies der Fall ist, so muss nun erklärt werden, wie andere Transmembranproteine die mit Notch

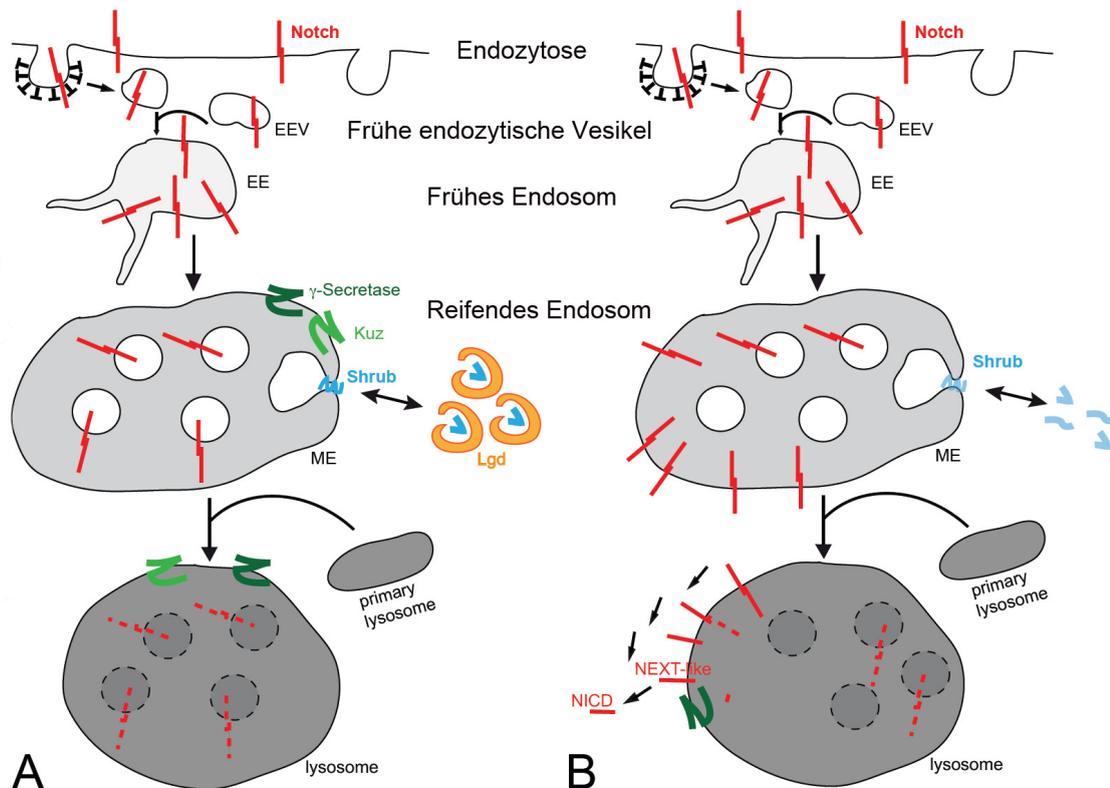
konkurrieren zum Substrat für den  $\gamma$ -Sekretase Komplex werden. Eine Möglichkeit ist, dass sie ebenso einem alternativen Ectodomain Shedding unterzogen werden. Zukünftige Untersuchungen müssen klären, ob und in welchem Zusammenhang Lgd hier wirkt.

### **3.4 Aktivierung des Notch Rezeptors in unterschiedlichen endosomalen Kompartimenten**

Der Verlust von *shrub* führt auch während der Oogenese zur Aktivierung des Notch-Signalweges führt (Schneider, Troost et al. 2012). Die Aktivierung von Notch tritt bei Funktionsverlust von *shrub* früher auf als bisher berichtet wurde und ist stärker als bei Verlust der Lgd Funktion (Schneider, Troost et al. 2012, Schneider 2012). Dies wird durch die Beobachtung gestützt, dass bei Funktionsverlust von *shrub* die Aktivierung der Hindsight (Hnt) Expression in frühen Stadien auftritt, wo hingegen bei *lgd* Verlust lediglich ektope Gbe+Su(H) Expression auftritt (Schneider, Troost et al. 2012, Schneider 2012). Weitere Hinweise, die die vorherige Annahme stützen, dass Notch in *shrub* Zellen anders aktiviert wird als im Falle von *lgd*, liefert die gegen Rab7 gerichtete RNAi, die nur in *lgd* Zellen, nicht aber in *shrub* Zellen die ektope Aktivierung verhindern kann (Schneider, Troost et al. 2012, Schneider 2012). Dieser Befund zeigt, dass in *shrub* Zellen die Aktivierung eher im späten Endosom als im Lysosom auftritt. Dies zeigt auch, dass die Aktivierung von Notch in unterschiedlichen endosomalen Kompartimenten stattfinden kann (Schneider, Troost et al. 2012). RNAi-Experimente, die Teil eines größeren Screens waren, deuteten daraufhin, daß die Aktivierung von Notch durch den Funktionsverlust von ESCRT-I-III abhängig von Kuz ist (Saj, Arziman et al. 2010). Da die ektope Aktivierung in *lgd* Zellen unabhängig von Kuz ist, könnte diese zu überprüfende Voraussetzung bei Verlust von ESCRT möglicherweise mit der Aktivierung in unterschiedlichen Kompartimenten im Zusammenhang stehen. Zukünftige Untersuchungen müssten dem nachgehen und könnten weiteren Aufschluß geben.

Möglicherweise kann die unterschiedliche starke Inaktivierung von *shrub* auch in unterschiedlicher Art und Weise zur Aktivierung des Notch-Signalwegs führen. Der Funktionsverlust von *shrub* hat eine starke Aktivierung des Notch-Signalwegs und den Verlust der epithelialen Integrität zur Folge (Hori, Sen et al. 2011, Troost, Jaekel et al. 2012). Eine geringe Reduktion der *shrub* Funktion führt jedoch zu einer schwachen Aktivierung und scheint kaum die epitheliale Integrität zu beeinflussen (Hori, Sen et al. 2011). Daher könnte die Reduktion der Aktivität von Shrub in unterschiedlicher Art und Weise zur Aktivierung des Notch-Signalweges führen, als dies bei vollständigem Verlust der *shrub* Funktion der Fall ist.

Weitere Untersuchungen könnten die Frage beantworten, ob diese schwache Aktivierung im Lysosom oder im Endosom stattfindet.



**Abb. 3-1. Modell der Aktivierung von Notch in *Lgd* Zellen.** (A) Normaler Abbau des Notch Rezeptors. Lgd interagiert mit Shrub im Zytosol. Diese Interaktion wird für die vollständige Aktivität von Shrub benötigt. Notch wird durch die Verpackung in ILV vollständig von der LM entfernt und anschließend durch die Fusion mit dem Lysosom vollständig abgebaut. (B) Die Aktivierung von Notch während des endosomalischen Transports in *Lgd* Zellen. Der Funktionsverlust von Lgd hat eine Reduktion der Shrub Aktivität zur Folge. Dies bedingt, dass Notch teilweise oder komplett an der LM des reifenden Endosoms verbleibt. Nach der Fusion mit dem Lysosom führen die aktivierten Hydrolasen, vermutlich in Kombination mit dem sauren Milieu zu alternativem Ectodomain Shedding. Dadurch wird ein NEXT-ähnliches Substrat geschaffen, dass durch den  $\gamma$ -Sekretase Komplex prozessiert werden kann, und die Freisetzung von NICD ins Zytosol zur Folge hat. EEV: early endocytic vesicle; EE early endosome; ME: maturing endosome. (Schneider, Troost et al. 2012)

### **3.5 Interaktionen von Fng, Ser und Dl während der Flügelentwicklung an einer FG**

Während der Flügelentwicklung ist die Aktivität des Notch-Signalwegs für die Etablierung einer Expressionsdomäne erforderlich, in der Zielgene an der dorso-ventralen Grenze angeschaltet werden, die entscheidend das Wachstum und die Musterbildung des Flügels steuern, vor allem Wg und Vg (Klein 2001). Die D/V Grenze ist eine Fringe Grenze (FG), die eine bedeutende Schnittstelle für die Aktivierung von Notch und die Etablierung dieses Organisationszentrum darstellt. Gegenwärtiger Kenntnisstand dieses Prozesses ist, dass Fng durch die Modifikation des Notch Rezeptors das Signal durch Dl fördert und das Signal durch Ser hemmt. Daraus resultiert, dass Dl von ventralen zu dorsalen und Ser von dorsalen nach ventralen Grenzzellen (vGz) signalisiert (deCelis und Bray 1997, Panin, Papayannopoulos et al. 1997). Die simultanen Signale der Liganden in entgegengesetzter Richtung etablieren die Expression der Notch Zielgene beidseitig der FG (deCelis und Bray 1997, Panin, Papayannopoulos et al. 1997). Für die Funktionalität dieses Modells an der D/V Grenze ist es entscheidend, dass die Induktion von Ser auf die dorsale und die von Dl auf die ventrale Seite beschränkt ist. Wenn z.B. Dl Expression auch in dorsalen Zellen durch Notch induziert würde, käme es zu einer Ausbreitung der Notch Aktivität im gesamten dorsalen Teil der Flügelanlage. In Übereinstimmung tritt die Ser Expression im dorsalen Kompartiment auf, wenn aktiviertes Notch in dorsalen und ventralen Zellen exprimiert wird (Micchelli, Rulifson et al. 1997, Panin, Papayannopoulos et al. 1997). Die Kombination dieser räumlich beschränkten Expression der Liganden und der operierenden Dl / Ser Schleife führt während der frühen Flügelentwicklung zur Aktivierung des Notch-Signalwegs an der D/V Grenze (Panin, Papayannopoulos et al. 1997). In der Mitte des dritten Larvenstadiums übernimmt die Dl/Ser/Wg Schleife die Aufrechterhaltung der Aktivität des Notch-Signalwegs. Deshalb ist die Etablierung der Wg Expression in den Grenzzellen ein kritischer Schritt bei der Begrenzung der Aktivität von Notch. Wenn dieser erreicht wird, sichert diese zweite Rückkopplungsschleife die Expression von Wg und die Aktivität des Notch-Signalwegs während der gesamten Flügelentwicklung.

Während dieses Modell die Ereignisse an der D/V Grenze erklären kann, funktioniert es an der ektopischen Grenze nicht mehr, da hier eine differentielle Expression der Liganden unwahrscheinlich ist. Allerdings ist die Expression von Wg auch hier auf die ektopische FG beschränkt (Kim, Irvine et al. 1995). Die Untersuchungen bringen weitere Klarheit bezüglich der Fng vermittelten Ereignisse. Weitere Details, welche die Ereignisse an der ektopische FG

erklären, können dem Modell hinzugefügt werden. Der erste Zusatz ist die anfänglich sequentielle Etablierung der Expressionsdomäne von Wg durch die asymmetrische Aktivierung des Notch-Signalwegs in frühen Phasen der Flügelentwicklung. Es wurde eine asymmetrische Expression von Wg ausschließlich in vGz an der D/V Grenze beobachtet, was auf die ausreichend hohe Aktivität von Notch für die Expression von Wg in diesen Zellen hindeutet. Die Existenz dieser frühen asymmetrischen Phase der Aktivierung von Notch war überraschend, da die Aktivierung von Notch zur Aktivierung der Expression der Liganden führt (Doherty, Feger et al. 1996, Panin, Papayannopoulos et al. 1997, Klein und Arias 1998b). Konsequenterweise sollte die Aktivierung in ventralen Zellen zu einer sofortigen Steigerung der Expression von Dl in den ventralen Zellen und zu einem Signal zurück zu den dorsalen Zellen führen. Wenn diese asymmetrische Phase existierte, wäre sie der Erwartung nach zu kurz um detektiert zu werden. Wichtig ist, dass diese anfängliche asymmetrische Phase eine generelle Eigenschaft des Notch-Signalwegs an der FG zu sein scheint, da sie auch an der untersuchten ektopischen FG zu beobachten war. Die Existenz der asymmetrischen Phase deutet weiterhin daraufhin, dass eine FG zur Generierung von Aktivitätsdomänen des Notch-Signalwegs auch dann dazu führt, wenn die Expression der Liganden durch die Aktivierung des Notch-Signalwegs nicht stattfindet. Bisher wurde diese Schleife nur in der Flügeltasche beobachtet. Das Ausbleiben dieser Schleife würde einen Verbleib in der asymmetrischen Phase bedeuten, was zu einem Zellstreifen mit hoher Notch Aktivität führen würde, welcher uniform Dl in Abwesenheit von Ser aufweist.

An der ektopischen Grenze zeigte sich, dass die Eliminierung der Aktivität des Notch-Signalwegs in posterioren Zellen entlang der FG nicht zum Verlust der Wg Expression in den aGz führt. Lediglich die späte Phase der symmetrischen Expression wird verhindert. Dies zeigt, dass die Etablierung der Dl/Ser Feedback-Schleife in A/P Grenzzellen nicht entscheidend für eine ausreichend hohe Notch Aktivität ist, die zur Induktion der Wg Expression führt. Ähnlich verhält es sich an der D/V Grenze. RNAi-Experimente mit Su(H) (oder auch die Überexpression von H, (Troost und Klein 2012)) führten zu einer Beschränkung der Wg-Expression auf die vGz, aber zu keiner Unterbrechung. Dies lässt vermuten, dass die Dl/Ser Schleife vermutlich hauptsächlich für die später auftretenden Musterbildungsprozesse des zukünftigen Flügelrandes benötigt wird, aber nicht für die Etablierung des Flügelgewebes.

Ein weiterer Zusatz besteht darin, dass die Grundexpression von *DI* unabhängig vom *Ser*-Signal ist. Dies zeigen die Beobachtungen, dass einerseits *DI* in frühen Scheiben in der gesamten Flügelanlage exprimiert wird und andererseits das *DI* ein Signal zu den dorsalen Grenzzellen (*dGz*) an der *D/V* Grenze in Abwesenheit der *Ser* Funktion sendet. Dies trifft auch an der ektopischen *FG* zu, da *DI* zu den *aGz* in Abwesenheit von *Ser* signalisieren kann. Aber in beiden Fällen ist das *DI*-Signal nicht stark genug um die *Wg* Expression zu initiieren, einem wichtigen Ereignis während der Flügelentwicklung.

Im Hinblick auf die anderen Ergebnisse ist dies eine interessante Beobachtung, da die klonale Analyse von *Psn* an der ektopischen *FG* vermuten lässt, dass die Notch Aktivität in posterioren Grenzzellen (*pGz*) in der frühen Phase nicht benötigt wird. Außerdem zeigte sich, dass *Ser* in *aGz* für die Expression von *Wg* benötigt wird, trotz der *Fng* Expression. Dies war in einem Teil der untersuchten Scheiben der Fall. Diese Voraussetzung kann nicht durch *Ser*-Signale von den *aGz* zu den *pGz* und eine dortige Verstärkung von *DI* Expression und ein Rücksignalisieren zu den *aGz* erklärt werden (*Ser/DI* Rückkopplungsschleife). Der Grund ist vielmehr, dass die Aktivität des Notch-Signalwegs in *pGz* in der frühen asymmetrischen Phase nicht benötigt wird. Von daher ist die Verstärkung der *DI* Expression durch *Ser* vernachlässigbar. Daher muss *Ser* den Signalweg in den *Fng* exprimierenden *aGz* aktivieren. Diese wahrscheinlich schwache Aktivität trägt zur gesamten Aktivierung von Notch in diesen Zellen bei und garantiert eine ausreichend hohe Aktivität des Signalweges, die über dem Schwellenwert für die Expression von *Wg* liegt. In Abwesenheit von *Ser* führt also die Aktivierung durch *DI* von *pGz* in einem Teil der untersuchten Scheiben dazu, dass dieser Schwellenwert nicht mehr erreicht wird. Übereinstimmend hiermit ist, dass die ektopische *Fng* Expression zu einer breiten Expression von *Ser* führt (Panin, Papayannopoulos et al. 1997).

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der gleichzeitige Verlust der *Ser* und *DI* Funktion in *aGz* die Expression von *Wg* an der ektopischen Grenze unterbindet. Folglich muss *DI* auch in *Fng* exprimierenden *aGz* zur Aktivität des Notch-Signalwegs innerhalb dieser Zellen beitragen. Es deutet sich an, dass die gesamte Notch Aktivität in den *aGz* insgesamt aus *DI* und *Ser* Signalen innerhalb der Fringe Domäne und den *DI* Signalen außerhalb, von den *pGz* zu den *aGz*, besteht. Das *DI* Signal der *pGz* zu den *aGz* ist hierbei entscheidender, da der Verlust immer zu einer Unterbrechung der *Wg*-Expression führte.

Weiterhin werden dem geläufigen Modell zwei antagonistische Effekte von Fng auf die Liganden hinzugefügt. Für die Modifikation von Notch durch Fringe ist bekannt, dass sie an der D/V Grenze die Signale polarisiert und zwar durch die Verstärkung der Signale von Dl und durch die Unterdrückung der Signale von Ser (Panin, Papayannopoulos et al. 1997). Die hier vorgelegten Ergebnisse deuten auf zwei gegensätzliche Effekte von Fng auf die Aktivität von Notch abhängig vom Ligand hin. Der Verlust der *fng* Funktion in frühen Phasen der Flügelentwicklung unterbricht die Expression von Wg zu einem Zeitpunkt, in der die Expression abhängig von *Ser* ist. Diese Beobachtung deutet auf einen positiven Effekt auf das *Ser* Signal, zusätzlich zum bekannten negativen Effekt. Eine Verstärkung des *Ser* Signals findet beim Senden von *fng* exprimierenden Zellen zu nicht-exprimierenden ventralen Zellen statt und diese Verstärkung wird für die Aktivierung von Wg in Zellen an der Grenze vorausgesetzt. Diese Erkenntnisse sind übereinstimmend mit vorherigen Studien, die zeigten, dass Fng die Eigenschaft von Ser einen ektopischen Flügelrand zu induzieren bei Koexpression verstärkt (Klein und Arias 1998b). Möglicherweise ist dieser positive Einfluss auf Ser indirekt, da die Modifikation des Notch Rezeptors durch Fng zu einer verringerten Bindung von Ser an Notch führt. Freies Ser in Fng exprimierenden Grenzzellen kann daher an Notch Rezeptoren der nicht Fng-exprimierenden Grenzzellen binden.

Die Analyse der ektopischen Fringe-Grenze zeigte, dass Dl in Fng nicht-exprimierenden pGz benötigt wird, damit die Aktivität des Notch-Signalweges über einen Schwellenwert gehoben wird, der für die Wg Expression in Fringe exprimierenden aGz ausreicht, trotz einer in frühen Phasen ubiquitären Dl-Expression. Dl ist in beiden Zellpopulation vorhanden. Dies zeigt, dass Dl zwar die Notch-Aktivität in der Fng-Domäne induzieren kann, aber diese Aktivität nicht ausreicht, um Wg zu induzieren. Der Schwellenwert wird erst durch das Dl-Signal überschritten, das außerhalb der Fng-Domäne generiert wird. Dieses Kriterium wird nur an der FG erreicht. Diese Eigenschaften gewährleisten, dass die Expression von Wg auf die FG beschränkt wird, selbst dann wenn in dem Gewebe Dl oder Ser uniform exprimiert werden, so wie es im Fall der ektopischen FG auftritt.

Ein Unterschied zwischen der ektopischen FG und der D/V Grenze ist, dass die Rolle der Liganden umgekehrt erscheint: An der ektopischen FG wird Dl zu Beginn für die Etablierung der asymmetrischen Phase benötigt und Ser etabliert die symmetrische Phase und sorgt für die Aufrechterhaltung hoher Notch Aktivität. Im Gegensatz werden die Signale von Ser für

die asymmetrische Phase an der D/V Grenze und DI für die Etablierung der späteren symmetrischen Phase und vermutlich für die Aufrechterhaltung während der späteren Stadien benötigt. Die Aktivierung an der ektopischen FG kann also durch beide Liganden erfolgen. Ein weiterer Unterschied ist die unterschiedliche Lokalisation des asymmetrischen Wg Streifens. An der ektopischen FG ist dieser Streifen auf die Fng exprimierenden Zellen beschränkt, im Falle der D/V Grenze liegt er innerhalb der nicht exprimierenden Zellen. Die beobachteten Ereignisse an der ektopischen Grenze stellen vermutlich die allgemeineren Interaktionen dar, da hier die Gesamtverlauf im ventralen Bereich der Flügeltasche betrachtet wird. Der Hauptunterschied ist hier die Anwesenheit oder Abwesenheit von Fng. Bei den Interaktionen an der D/V Grenze ist zu berücksichtigen, dass hier auch immer der Unterschied zwischen dorsalen und ventralen Zellen bezüglich des dorsalen Selektorproteins Ap auftritt. Dies modifiziert möglicherweise den weiteren Verlauf.

### **3.6 Interaktionen an einer Grenze von Fng exprimierenden und nicht-exprimierenden Zellen**

Basierend auf diesen Ergebnissen können erstmals die Ereignisse an der ektopischen Fringe-Grenze beschrieben werden. In frühen Stadien der Flügelentwicklung ist DI ubiquitär in der gesamten ventralen Flügeltasche exprimiert. Die ektopische Expression von *fng* mittels *ptcGAL4*, generiert eine streifenartige Fringe Domäne in der ventralen Flügeltasche. In frühen Stadien aktivieren DI und Ser (vermutlich induziert durch DI) den Notch-Signalweg in der gesamten Fringedomäne auf einem so niedrigen Level, der nicht für die ektopische Wg Expression ausreicht. An der Fng Grenze signalisiert DI von pGz zu aGz, und die Verstärkung durch Fng führt zur Aktivität des N-Signalweges oberhalb des Schwellenwertes für die Wg Expression in den aGz. Weiterhin wird die Expression von Ser in aGz verstärkt. Dies etabliert die asymmetrische Phase. Im weiteren Verlauf führt das (durch Fng verstärkte) Ser –Signal von den aGz zu den pGz zur Wg-Expression in den nicht Fng-exprimierenden pGz. Nachdem die symmetrische Induktion von Wg eingesetzt hat, übernimmt die DI/Ser/Wg Schleife die Aufrechterhaltung des Notch-Signalwegs an der D/V Grenze. In den Ser mutanten Imaginalscheiben des frühen dritten Larvenstadiums wurde eine breitere Expression von Gbe+Su(H)-lacZ bei ektopischer Fng Expression beobachtet (Troost und Klein 2012). Weiterhin war die Expression von Wg bei ektopischer Expression von *fng* mit *ptcGAL4* in *Ser H*, aber nicht in *H* mutanten Scheiben in der gesamten ventralen *ptc*-Domäne ausgebreitet (Troost und Klein 2012). Deshalb trägt Ser vermutlich dazu bei, dass der Notch-Signalweg

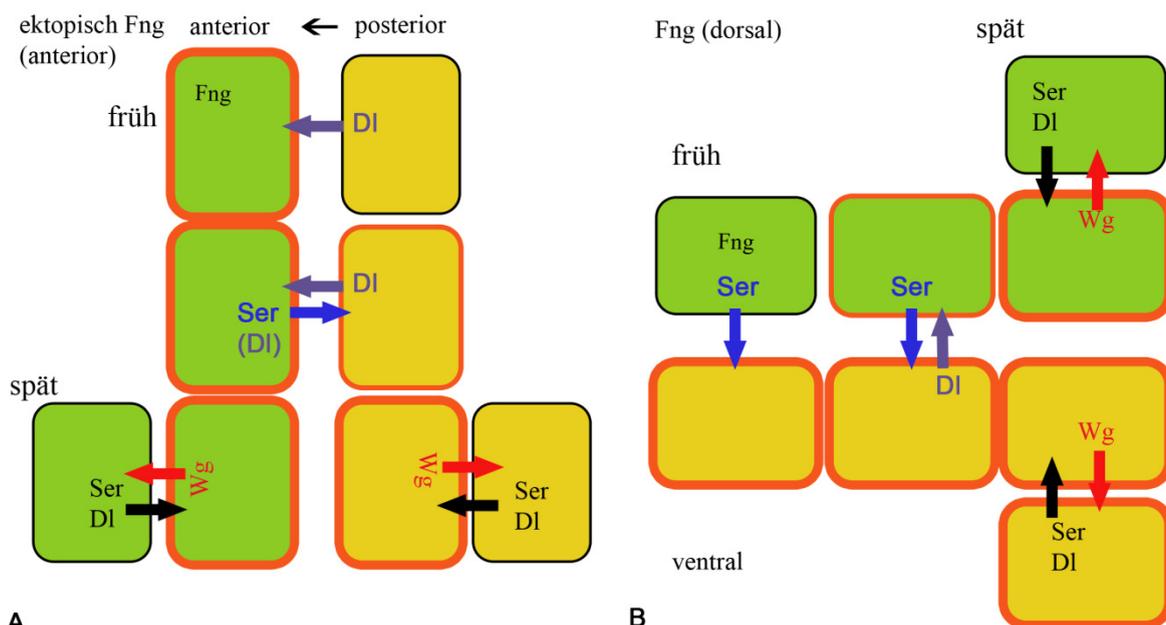
innerhalb der Fng Domäne auf einem niedrigen Aktivitätslevel gehalten wird. Es ist bekannt, dass die Expression von Ser zur Unterdrückung des Notch-Signalweges in zell-autonomer Weise durch cis-Inhibition beiträgt (Klein, Brennan et al. 1997).

An der D/V Grenze wird die Signalkaskade unterschiedlich initiiert. Es wurde gezeigt, dass der Verlust der Aktivität des Signalwegs in dorsalen Zellen nicht die Etablierung der Expression von Wg an der Grenze verhindert, aber die Expression auf die vGz beschränkt und die Flügelentwicklung fortlaufen lässt. Deshalb ist das von dorsal nach ventral gerichtete Signal durch Ser so gewichtig. Dies lässt sich mit dem Nullphänotypen von Ser (Speicher, Thomas et al. 1994, Troost und Klein 2012) vereinbaren. Ser und Fng sind anfänglich in allen dorsalen Zellen exprimiert (Irvine und Wieschaus 1994). Fringe verstärkt das Ser-Signal zu den vGz, aber unterdrückt das Signal in dorsalen Zellen. Dieses stark polarisierte Signal resultiert in der Aktivierung der Wg-Expression und der verstärkten Dl Expression in vGz (siehe Abb. 2-67 D). Es ist wahrscheinlich, dass der *cis* inhibitorische Effekt von Ser (Lei, Xu et al. 2003) während der initialen Phase der Flügelentwicklung zur Unterdrückung der Notch Aktivität in dorsalen Zellen beiträgt, da in der gesamten Flügelanlage von frühen *Ser* mutanten Flügelscheiben die Expression von GbeSu(H)-lacZ beobachtet wurde (Troost und Klein 2012). Die Analyse der *Ser* Null- und *Ser H* Doppelmutanten deutet daraufhin, dass Dl den Notch-Signalweg in Abwesenheit von Ser anschalten kann (Troost und Klein 2012). Die Aktivierung reicht jedoch nicht für die Expression von Wg aus, obwohl die FG vorhanden ist. Es erscheint an der D/V Grenze so, dass Ser die Expression von Dl in vGz verstärken muss bis der Schwellenwert von Dl in den ventralen Zellen ausreicht um Wg in den dGz zu induzieren. Fringe trägt zur Induktion der Wg Expression durch die Verstärkung des Dl-Signals von den nicht Fringe exprimierenden vGz zu den dGz bei. Wenn eine Akkumulation von Dl vorausgesetzt wird, könnte dies zur beobachteten Verzögerung bis zur Etablierung der Phase der symmetrischen Expression beitragen.

Nach der anfänglichen asymmetrischen Phase wird die Ser/Dl/Wg Schleife etabliert um den Notch-Signalweg aufrechtzuerhalten und um die Wg Expression symmetrisch zu halten. Die Ergebnisse führen zu dem Schluss, dass das anfängliche Fng-verstärkte Ser-Signal stark genug ist, um Wg in den vGz anzuschalten und so den Ser/Dl/Wg Loop zu starten. Dies wird durch die Beobachtung verdeutlicht, dass die Unterdrückung des Notch-Signalweges während der gesamten Flügelentwicklung in dGz nicht die Aufrechterhaltung der Wg Expression im späten

dritten Larvenstadium beeinträchtigt. Sogar die Entwicklung des ausgewachsenen Flügels verläuft mit nur geringen Musterbildungsdefekten. Das späte Signal der vGz zu den dGz ist daher hauptsächlich für die Musterbildung am Flügelrand erforderlich.

Es wurde gezeigt, dass asymmetrische Signalabläufe vermittelt vom Hh Signalweg das Organisationszentrum der A/P Achse auf der anterioren Seite der Grenze etablieren (Dahmann und Basler 1999). Es wurde bisher angenommen, dass ein Unterschied in der Etablierung des D/V Organisationszentrum dessen symmetrische Platzierung an der D/V Grenze sei. Die Ergebnisse zeigen, dass zumindest in frühen Phasen die Etablierung der D/V Grenze auch asymmetrisch erfolgt und dass die etablierten Organisationszentren funktionieren, wenn sie nach ventral versetzt sind. Daher sind die Signal vermittelnden Prozesse an den beiden Grenzen wohl doch ähnlicher als angenommen. Dies konnte bereits in früheren Arbeiten für die Etablierung der Kompartimentgrenzen beobachtet werden (Koelzer und Klein 2006).



**Abb. 3-2. Modell der Aktivierung von Notch an einer Fng-Grenze.** An der ektopischen Fringe-Grenze (A/P-Grenze) signalisiert DI in der frühen asymmetrischen Phase von posterioren Zellen zu anterioren Fng-exprimierenden Zellen und Ser wird für die Aufrechterhaltung der Wg-Expression benötigt bis in der späten symmetrischen Phase die Expression der Liganden von Wg kontrolliert wird (A). An der D/V Grenze signalisiert Ser in der frühen asymmetrischen Phase von dorsalen zu den ventralen Fng nicht-exprimierenden Zellen. DI signalisiert zurück und in der späten symmetrischen Phase wird die Expression der Liganden durch Wg kontrolliert (B). Der Einfluss durch und auf die cis-Inhibition kann in diesem Modell nicht geklärt werden.

#### 4. Zusammenfassung / Summary

Frühere Arbeiten zeigten, dass die Störungen im späten Verlauf des endosomalen Transportwegs durch den Funktionsverlust des Tumorsuppressorgens *lethal (2) giant discs (lgd)* oder der ESCRT I-III Komplexe zu einer liganden-unabhängigen Aktivierung des Notch-Signalwegs in allen Zellen der Imaginalscheiben in *Drosophila melanogaster* führt (Childress, Acar et al. 2006, Gallagher und Knoblich 2006, Jaekel und Klein 2006). Die Störung im endosomalen Transport führt in *lgd* mutanten Zellen zur Akkumulation des Notch Rezeptors in reifen Endosomen. Die EM Analyse zeigte, dass *lgd* Zellen vergrößerte MVBs enthalten. Darüber hinaus zeigen *lgd* mutante Zellen eine Verzögerung im Abbau von Transmembranproteinen, die in der Plasmamembran lokalisiert sind. *lgd* kodiert ein Mitglied einer unbekanntenen Proteinfamilie, deren Mitglieder eine C2 Domäne und vier DM14 Wiederholungen mit unbekannter Funktion enthalten. Die detaillierte Struktur-Funktionsanalyse von Lgd offenbarte, dass die DM14 Domänen für die Funktion von Lgd essentiell sind und redundant wirken. Weiterhin zeigte die Analyse, dass die DM14 Domänen die spezifische Funktion von Lgd vermitteln und die C2 Domäne für die subzelluläre Lokalisation von Lgd benötigt wird. Lgd interagiert mit dem ESCRT III Protein Shrub direkt über die DM14 Domänen (Troost et al. 2012). Es konnte gezeigt werden, dass die Interaktion für die Funktion *in vivo* von Bedeutung ist. Daher trägt Lgd zur Funktion des ESCRT-III Komplexes bei. Die genetischen Studien in dieser Arbeit weisen daraufhin, dass die Aktivität von Shrub und anderen ESCRT Komponenten für die Aktivierung von Notch in *lgd* mutanten Zellen benötigt wird. Die weitere Untersuchung der Folgen des Genfunktionsverlust von *lgd* und der Erfordernisse für die auftretende Aktivierung des Notch-Signalwegs zeigt, dass die Aktivierung unabhängig von Kuz und den EGF-Wiederholungen des Notch Rezeptors stattfindet. Weiterhin zeigten die Ergebnisse, dass die Aktivierung von Notch in *lgd* mutanten Zellen im Lysosom stattfindet und die endosomale Reifung notwendig ist.

Die Flügelentwicklung in *Drosophila* erfordert die Aktivierung von Wg in einem schmalen Streifen entlang der Grenze von Fringe (Fng) exprimierenden und nicht-exprimierenden Zellen. Die Fringegrenze (FG) stimmt mit der dorso-ventralen (D/V) Grenze der Flügelimaginalscheibe überein. Die Induktion der Expression von Wg wird durch die Interaktionen von dorsalen und ventralen Zellen durch den Notch-Signalweg vermittelt. Es scheint, dass die beiderseitigen Signale von dorsalen und ventralen Zellen, durch die Notch

Liganden Serrate (Ser) bzw. Delta (DI) eine symmetrische Wg Domäne etablieren, die beiderseits der D/V Grenze liegt. Die gerichtete Signale der Liganden benötigt die Modifizierung von Notch in dorsalen Zellen durch die Glykosyltransferase Fng und die beschränkte Expression der Liganden, mit Ser Expression auf der dorsalen und DI Expression auf der ventralen Seite der Flügelanlage. Der Mechanismus des Notch-Signalwegs an der FG wurde in Bezug auf die Interaktionen von Fng, Ser und DI während der Flügelentwicklung an einer ektopischen FG und an der D/V Grenze untersucht. Es zeigte sich, dass der Notch-Signalweg anfänglich in einer asymmetrischen Weise auf einer Seite der FG angeschaltet wird. Während dieser anfänglichen, asymmetrischen Phase wird nur ein Ligand benötigt. Ser leitet die Aktivierung des Notch-Signalwegs an der D/V Grenze und DI an der ektopischen FG ein. Die Analyse legt nahe, dass Fng auch einen positiven Effekt auf das Signal von Ser hat. Aufgrund der ergänzten Eigenschaften wird die differentielle Expression der Liganden im gängigen Modell nicht für die Beschränkung der Aktivität des Notch-Signalwegs auf die FG benötigt.

### **Summary**

Previous work showed that endosomal trafficking defects by loss of function of lethal(2) giant discs (*lgd*) or ESCRT I-III lead to ligand-independent activation of the Notch signaling pathway in imaginal disc cells in *Drosophila melanogaster* (Childress, Acar et al. 2006, Gallagher und Knoblich 2006, Jaekel und Klein 2006). The endosomal defects in *lgd* mutant cells (*lgd* cells) leads to accumulation of Notch in mature endosomes. Ultrastructural analysis by electron microscopy showed, that *lgd* cells contain enlarged multi vesicular bodies (MVBs). *Lgd* encodes a member of an unknown protein family with a C2 domain and four DM14 repeats of unknown function. A detailed structure-/function analysis revealed that the DM14 domains are essential and act redundantly. The DM14 domains mediate the specific function of *Lgd* while the C2 domain is important for subcellular localization and stability of the protein. *Lgd* interacts directly with the ESCRT-III component Shrub via the DM14 domains (Troost, Jaekel et al. 2012). It was furthermore shown that this interaction is important in vivo and therefore *Lgd* is involved in the function of the ESCRT-III complex. Genetic studies in this work showed that activity of Shrub and other ESCRT components is required for the activation of Notch in *lgd* cells. Further analysis showed that the activation of Notch in *lgd* cells is not only independent of the ligands but also independent of *kuz*, while

$\gamma$ -secretase activity is required. Endosomal maturation and fusion with the lysosome are further requirements for the activation of Notch in *lgd* cells, which indicates that Notch is activated in lysosomes in *lgd* cells.

Wing development in *Drosophila* requires the activation of Wg in a narrow stripe along the boundary of Fringe-(Fng) expressing and non-expressing cells. The Fringe boundary (FB) coincides with the dorsal-ventral (D/V) boundary of the wing imaginal disc. The induction of Wg expression is mediated by the interactions of dorsal and ventral cells through the Notch signaling pathway. It seems that mutual signaling from dorsal and ventral cells through the Notch ligands Serrate (Ser) and Delta (DI) establish a symmetrical domain of Wg on both sides of the D/V boundary. The polarized signals of the ligands require the modification of Notch in dorsal cells by the glycosyltransferase Fng and the restricted expression of the ligands, with Ser expression on the dorsal side and DI on the ventral side of the wing anlage. The mechanism of Notch signaling at an FB was analysed with respect to the interactions of Fng, Ser and DI throughout wing development. It was shown, that Notch signaling is initiated asymmetrically on one side of the FB. During this initial asymmetric phase only one ligand is required. Ser initiates activation of the Notch signaling pathway at the D/V boundary and DI at the ectopic FB. The analysis points to a positive effect on Ser signaling by Fng. Differential expression of the ligands is not required for the restriction of Notch activity at an FB.

## 5. Material und Methoden

### 5.1 Geräte und Arbeitsmaterialien

**Computer und Software:** Apple Mac mit OS X und höher und IBM kompatible PCs mit Windows XP, Windows VISTA und Windows 7. Axiovision Rel. 4.6 – 4.8 (Windows PC, Zeiss), Photoshop CS2 (Adobe), Photoshop CS3 (Adobe), Acrobat Reader (Adobe), ImageJ Ver. 1.37 – 1.46 (NIH), Vector NTI (Invitrogen), Serial Cloner ( ), CLC Workbench (CLC), CLC Viewer (PC), Office 2007 (Microsoft, PC und Mac), Heliconfocus (Helicon).

**Internetdatenbanken:**

NCBI Pubmed, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>, Blast <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, SMART, <http://smart.embl-heidelberg.de/>, Flybase, <http://flybase.org/>, VDRC <http://stockcenter.vdrc.at>, Bloomington <http://flystocks.bio.indiana.edu/>, NIG-Fly: <http://www.shigen.nig.ac.jp/fly/nigfly/index.jsp>

**Geldokumentation:** BioRad, Peqlab

**Gelelektrophorese:** Eigenbau der Werkstatt des Instituts für Genetik, Universität zu Köln bzw. Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

**Inkubatoren:** 18°C Raum und 25°C Raum Gebäude 26.02.02, sowie Inkubatoren von Memmert und Heraeus

**Micropipette-puller:** Sutter Instruments Co. Model P-97

**Rocking Platform:** Heidolph Polymax 2040

**Mikroskope und Photographie:** Axio Imager Z1 mit Apotom und AxioCam MRm, Axio Plan 2 mit Apotom und AxioCamMRm, Axio Phot mit AxioCamMRC (alle von Zeiss). Leica Fluoreszenzbinokular mit Pixelfly Kamera, STEMI 2000 mit AxioCamMRC, STEMI 1000, Olympus BH2 (für Injektionen)

**Mikrowellenofen:** Sharp

**PCR-Maschinen / Thermocycler :** Biometra Professional Thermocycler, MJ Research PTC-200

**Plastikartikel:** 2ml, 1,5 ml, 0,5 ml Eppendorfreaktionsgefäße, Falcontubes 50 ml

**Quarzküvetten:** 105-QS, 70µl, Schichtdicke 10mm (Hellma)

**Scanner:** Epson Expression 1680 Pro

**Spektralphotometer:** Genequant II von Pharmacia, Nanodrop

**Zentrifugen & Zubehör:** Tischzentrifugen von Eppendorf, Hettich, Heraeus, Sorvall. Beckmann Coulter Avanti J-26 XP ; **Rotoren:** SS34

**Sequenzierer:** ABI 377A DNA-Sequenzierer (Perkin Elmer) (Institut für Genetik, Universität zu Köln)

## 5.2 Chemikalien, Enzyme und Kits

Analysereine Substanzen (p.A.) der Firmen Boehringer, Fluka, Gibco-BRL, Merck, Pharmacia, Riedel-de-Häen, Roth, Serva und Sigma-Aldrich.

### Feinchemikalien und Reaktionskits:

DNA-Größenstandard	Gene Ruler™ 1 kb, Fermentas Hyperladder I, Bioline MassRuler™ DNA Ladder Mix, Fermentas
DNA-Ladepuffer	6x MassRuler™ DNA Loading Dye, Fermentas
Gelextraktionskit	EZNA Gel-Extraction Kit (Omega Bio-tek)
Expand High Fidelity Plus PCR Kit	Illustra GFX Purification Kit (GE Healthcare) Roche
ABI Prism Big Dye Terminator (V. 3.1)	Perkin Elmer
Nucleobond Midi-Präparation Kit	Macherey und Nagel
Restriktionsendonukleasen	MBI Fermentas und NEB
Vectashield	Vector Laboratories
Natural Goat Serum (NGS)	Dianova
Hoechst 33258	Sigma Aldrich

## 5.3 Lösungen

S1- Puffer: 12,5 ml Tris-HCl (1 M)  
5 ml EDTA (0,5 M)  
pH 8,0  
auf 250 ml mit dH<sub>2</sub>O auffüllen  
25 mg RNase (Pulver)

S2-Puffer: 10 ml NaOH (5 M)  
25 ml SDS (10%ig)  
215 ml dH<sub>2</sub>O

S3-Puffer: 68,71 g Kaliumacetat in 150 ml dH<sub>2</sub>O lösen (2,8 M)  
mit 100 %iger Essigsäure auf pH 5,1 einstellen  
auf 250 ml mit dH<sub>2</sub>O auffüllen

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

TE : 10 mM Tris-HCl, pH 8,0  
1 mM EDTA

1x PBS (phosphate-buffered saline): 137 mM NaCl  
2,7 mM KCl  
10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
2 mM KH<sub>2</sub>PO

0,1M PO<sub>4</sub>- Puffer: 36 ml 0,2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
14 ml 0,2 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
50 ml dH<sub>2</sub>O  
pH 7,2

Stammlösungen:

X-Gal in 10% Dimethylformamid (DMF)

IPTG 0,5 M in dH<sub>2</sub>O

RNAse-A Stammlösung 5 µg/µl in 10mM Tris pH 7,5

0,15 M NaCl

Hoechst 33258 5mg/ml in dH<sub>2</sub>O

Antibiotika-Stammlösung:

Ampicillin (100 mg/ml in dH<sub>2</sub>O)

**5.4 Medien und Agarplatten**

Medien zur Kultivierung von *E.coli* :

LB-Medium: 10 g Bactotrypton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl. pH mit NaOH auf 7,2 einstellen und mit H<sub>2</sub>O auf 1 Liter Endvolumen auffüllen.

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

## 5.5 Verwendete Antikörper

**Tabelle 5-1 : Liste der eingesetzten primären Antikörper** für die Antikörperfärbung der Imaginalscheiben;  
DSHB: Developmental Studies Hybridoma Bank

Antigen	Herkunft (Organismus)	Verdünnung	Bezugsquelle/Referenz (Klonbezeichnung)
N(extra)	Maus	1:100	DSHB (C458.2H)
N(intra)	Maus	1:500	DSHB (C17.9C6)
Cut	Maus	1:100	DSHB (2B10)
Wg	Maus	1:50	DSHB (4D4)
Beta-Galactosidase	Kaninchen	1:5000 (preabsorbiert)	Cappel
HA	Ratte	1:250	Roche
Rab5	Kaninchen	1:500	Michael Hoch
Rab7	Kaninchen	1:3000	Tanaka und Nakamura 2008
Rab11	Kaninchen	1:8000	Tanaka und Nakamura 2008
Hrs-FL	Meerschweinchen	1:500 – 1:1000	Lloyd et al. 2002
Delta	Maus	1:500	DSHB (C594.9B)
Serrate	Kaninchen	1:50	Andre Bachmann (Thomas et al. 1991)
Spinster	Meerschweinchen	1:500	Sweeney et al. 2002
Hnt	Maus	1:100	DSHB (1G9)

**Tabelle 5-2 : Liste der eingesetzten sekundären Antikörper**

Antigen + Farbstoff	Herkunft (Organismus)	Verdünnung f. Antikörperfärbung d. Imaginalscheiben	Hersteller
Maus Alexa-488	Ziege	1:500	Invitrogen
Maus Alexa-568	Ziege	1:500	Invitrogen
Maus Alexa -647	Ziege	1:500	Invitrogen
Kaninchen Alexa-488	Ziege	1:500	Invitrogen
Kaninchen Alexa-568	Ziege	1:500	Invitrogen
Kaninchen Alexa-647	Ziege	1:500	Invitrogen
Meerschweinchen Dylight 594	Ziege	1:500	Dyomics
Ratte Alexa-568	Ziege	1:500	Invitrogen*
Ratte A647	Ziege	1:500	Invitrogen*
Ratte A488	Ziege	1:500	Invitrogen*
*präabsorbiert gegen Maus, um Kreuzreaktionen auszuschließen			

## 5.6 Bakterien und Plasmide

Verwendete Bakterienstämme (Bezugsquelle: Invitrogen)

*E. coli* DH5 $\alpha$ : F-  $\phi$ 80 lacZ $\Delta$ M15  $\Delta$ (lacZYA-argF)U169 recA1 endA1 hsdR17(rk-,mk+) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1  $\lambda$ -

*E. coli* Mach-1TM-T1R: F- $\phi$ 80(lacZ)  $\Delta$ IM15  $\Delta$ lacX74 hsd R (rk-,mk+)  $\Delta$ recA1398 end A1 tonA

## 5.7. DNA-Methoden

Es wurden molekularbiologische Standardmethoden nach (Maniatis, Fritsch et al. 1982) verwendet.

### 5.7.1 Plasmid-Minipräparation nach dem TENS Protokoll

1,5 ml einer Übernachtskultur werden in ein Eppendorfggefäß überführt und zwei Minuten bei 13.000rpm zentrifugiert (Tischzentrifuge). Der Überstand wird abgegossen und das Pellet in 50-100 $\mu$ l des Überstandes durch vortexen resuspendiert. Nach Zugabe von 300 $\mu$ l TENS-Lösung wird erneut für 5-10 Sekunden gevortext. Nun werden 150 $\mu$ l Natriumacetat (3M, pH 5,2) hinzugegeben und es wird erneut gevortext. Daraufhin wird das Gemisch 10-15 Minuten bei 13.000rpm zentrifugiert. Der Überstand wird in ein anderes Eppendorfggefäß überführt. Das Pellett wird verworfen. Zu dem Überstand werden 900 $\mu$ l Ethanol gegeben, der eine Temperatur von -20°C hat. Danach inkubiert das Gemisch für 5-10 Minuten bei -20°C. Daraufhin wird es bei 4°C und 13.000rpm für 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet mit 500 $\mu$ l 70%igem Ethanol gewaschen und 10 Minuten bei 13.000rpm zentrifugiert. Nach der Trocknung des Pellets bei 37°C wird es in 30-50 $\mu$ l destilliertem Wasser resuspendiert.

### 5.7.2 Plasmid-Midipräparation

Für die Midipräparation wurde das Kit „Nucleobond-AX100-Kit“ der Firma Machery&Nagel verwendet um nach Angaben des Herstellers Plasmid-DNA zu gewinnen. Um zuvor die Plasmid DNA mit Hilfe von *E. coli* zu vermehren, wurden 100 $\mu$ l einer Übernachtskultur in 100ml LB +Amp-Medium gegeben und über Nacht bei 37°C inkubiert.

### 5.7.3 DNA-Restriktionsverdau

Der Ansatz eines Restriktionsverdau unterscheidet sich nur in den verwendeten Enzymen und den vom Hersteller empfohlenen Puffern, in denen die Enzyme am besten arbeiten. BSA wurde hinzugefügt, sofern es für ein Restriktionsenzym empfohlen wurde. Alle verwendeten Restriktionsenzyme und Puffer wurden von der Firma New England Biolabs (NEB) bezogen. Ein Restriktionsansatz besteht aus folgenden Komponenten:

DNA	Variabel
Restriktionsenzyme	Max. 2 $\mu$ l
Puffer (10x)	2 $\mu$ l
(BSA) (100x)	0,2 $\mu$ l
Destilliertes Wasser	Auf 20 $\mu$ l Gesamtvolumen aufgefüllt

### 5.7.4 Ligation

Bei der Ligation wird ein DNA-Fragment in einen Vektor eingefügt. Hierzu wird die DNA-Ligase des Bakteriophagen T4 verwendet, die Reparaturen von Einzelstrangbrüchen durchführen kann, wodurch glatte oder kohäsive DNA-Doppelstrangenden miteinander verknüpft werden können. Ein Ligationsansatz enthält 10xT4Ligase-Puffer, 0,4 U T4 Ligase (NEB, Fermentas), 50-250 $\mu$ g des geschnittenen Vektors und das DNA-Fragment, im molekularen Verhältnis 4 zu 1 zum Vektor eingesetzt wird. Bei nicht kohäsiven Enden wurde die Fragmente im Verhältnis 5 zu 1 eingesetzt. Mit destilliertem Wasser wird auf ein Endvolumen von 10 $\mu$ l aufgefüllt. Der Ligationsansatz inkubiert dann entweder 1 Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C.

### 5.7.5 Transformation chemisch kompetenter Zellen

Die Plasmide wurden durch Transformation in *E.coli* integriert und vermehrt. Zunächst werden die bei -70°C gelagerten Bakterien (100 $\mu$ l chemisch kompetente *E.coli* Mach1 oder DH5 $\alpha$ ) auf Eis inkubiert. Nach Zugabe des Ligationsansatz inkubieren die Bakterien für 30 (bis 90) Minuten auf Eis. Der Hitzeschock erfolgt für eine Minute Inkubation bei 37°C im Wasserbad, wodurch die Aufnahme der DNA vermittelt. Die Bakterien inkubieren weitere fünf Minuten auf Eis. Nach Zugabe von 900 $\mu$ l LB-Medium ohne Zusatz eines Antibiotikums inkubieren die Bakterien eine Stunde bei 37°C unter Schütteln. Daraufhin werden die

Bakterien bei 4.500rpm für 2 Minuten in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wird bis auf 100µl entfernt und das Pellet wurde in diesen resuspendiert. Anschließend werden die Bakterien auf LB-Agar-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Selektion erfolgte über Antibiotika Resistenz-Kassetten in den verwendeten Plasmidvektoren, meist Ampicillin.

#### **5.7.6 Extraktion von DNA aus einem Agarosegel**

Die DNA wurde auf einem 0,8%igen Agarosegel mit Ethidiumbromid aufgetrennt. Nach der Auftrennung kann das Bandenmuster durch Bestrahlung mit UV-Licht (Wellenlänge  $\lambda=312$  nm) sichtbar gemacht werden. Die benötigten DNA-Fragmente wurden mit Hilfe eines sauberen Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und in ein Eppendorfgefäß überführt. Für die weitere Bearbeitung wurden Puffer und Lösungen aus dem EZNA Gel-Extraction Kit<sup>®</sup>™ von Omega Bio-tek verwendet.

#### **5.7.7 DNA Sequenzierung**

Die Sequenzierung der Transgene wurde von der Firma SeqLab durchgeführt. Für diese Serviceleistung wurden 500-700ng der zu sequenzierenden DNA und 2µl einer 10mM Lösung des Sequenzierprimers, in destilliertem Wasser in einem Gesamtvolumen von 10 µl gelöst und anschließend verschickt.

Viele Sequenzierungen wurden am Anfang der Arbeit im Institut für Genetik an der Universität zu Köln durchgeführt. Die klonierten Fragmente wurden mit dem Big Dye<sup>®</sup> Termination v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) sequenziert, das auf der Abbruchmethode durch fluoreszenzmarkierte dNTPs bei der Strangsynthese basiert. Der Ansatz mit einem Gesamtvolumen von 10 µl enthielt 1 µl Big Dye v3.1 Reaktionsmischung, 1,5 µl Big Dye v3.1 Sequenzierungspuffer, 1 µl Oligonukleotid (10 µM) und 200-300 ng dsDNA. Das Sequenzierungsprogramm bestand nach einer initialen Denaturierung für 5 min. bei 96°C aus 25 Zyklen mit 96°C für 30 sec., 50°C für 15 sec. und 60°C für 4 min. Anschließend wurden 10 µl ddH<sub>2</sub>O zum Ansatz gegeben und die Proben in der Sequenziereinheit des Instituts abgegeben, wo die Sequenz mit Hilfe des ABI373A und ABI377 Systems automatisiert ermittelt wurde.

**Tab. 5-3 Primersequenzen für die Generierung der Lgd Deletionskonstrukte durch PCR**

\* Firma Roth #Invitrogen ^Biotex, siehe auch Abb. 5-1

Bezeichnung	Sequenz
C1*	CGAATTCGCGCCGCATGTTCTCCAGAAAGAAGC
C4*	CTCTAGAGGTACCTCAAGCGTAATCTGGCACATCGTATGGGTAAG
A2*	GGCTTCTAGATTATCCCTTTGTGATGTGTCCACAGTCGTCGTTG
A3*	CCACGACGACTGTGGACACATCACAAGGGATAATCTAGAAGCC
B2 <sup>#</sup>	GCTCGAGGAGCAGTTTCATTGTGTCCACAGTCGTC
B3 <sup>#</sup>	GACGACTGTGGACACAATGAAACTGCTCCTCGAGC
C2*	GGAATTCAGAAACTCAGCTGTGTCCACAGTCGTC
C3 *	CACGACGACTGTGGACACAGCTGAGTTTCTTGAATTCC
D2 <sup>#</sup>	CTTCTAGATTATCCCTTTGTGACATATTTGTTGCAGCTGCTAG
D3 <sup>#</sup>	CTAGCAGCTGCAACAAATATGTCACAAAGGGATAATCTAG
E2*	CAATTGGCTTTACACTTGTGTCCACAGTCGTC
E3*	CGACTGTGGACACAAGTGTAAGCCAAT
F2*	CTTCTAGATTATCCCTTTGTGATTGTTGCTCGGCAATATTATTCT
F3*	CCGAGCAACAATCACAAGGGATAATC
4713 NcoI <sup>#</sup>	CCATGGCCATGTTCTCCAGAAAGAAGC
XmaI 4713HA <sup>#</sup>	CCCGGGTCAAGCGTAATCTGGCACATCG
NotI ATG NES <sup>#</sup>	GTCTAGCGGCCGCATGGGATCTCTCGCGCTGAAACTCG
XhoI 4713 <sup>#</sup>	GCGCTCGAGGAGCAGTTTCATTTGTTGC
N2 <sup>#</sup>	CGAATTCGCGCCGCATGAGTGAGCTTGAAATTGTTG

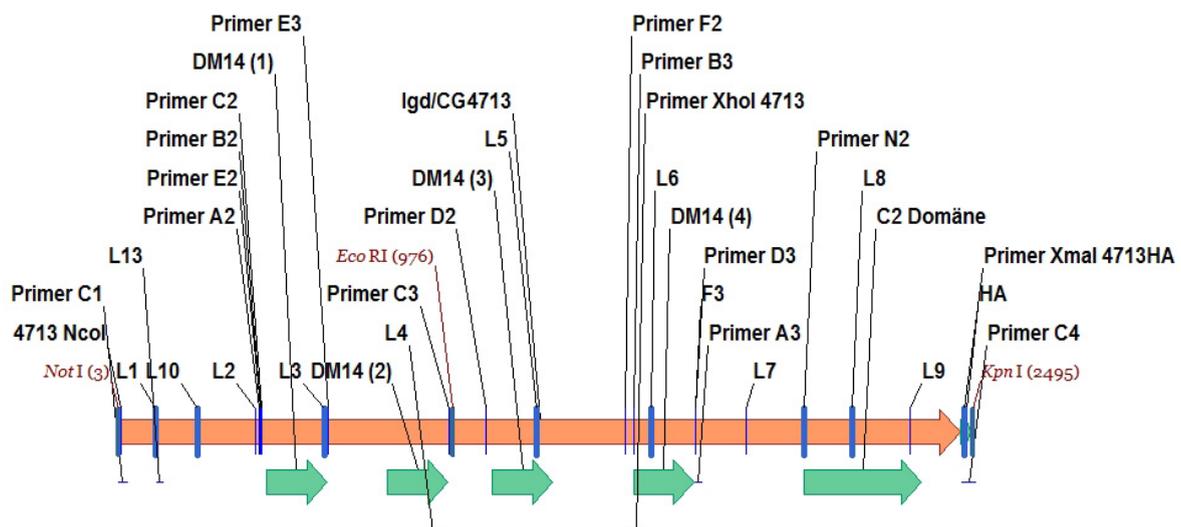
**Tab. 5-4 Oligonukleotide für die Sequenzierung der Lgd-Deletionskonstrukte (größtenteils aus Jaekel, Dissertation 2006), siehe auch Abb. 5-1**

Bezeichnung	Sequenz	
L1	ATATGGTGAGGACGATGGGG	Roth*
L2	AGACCTTTCTGCCCACGAC	Roth*
L3	TGAAGTCAGTGTAAGCC	Roth*
L4	AAATGTGTGAAGACGGACAGG	Roth*
L5	ACAAGGCAGGCAAACCAG	Roth*
L6	CAAAAAGCGGGAGAAATAG	Roth*
L7	TATGGGAGATGTAGCAGG	Roth*
L8	CAGTCCTGACTACGATGAAC	Roth*
L9	GACCAAGTGCAGATACAC	Roth*
L10	AGCTGTCGGCTATCATTTTG	Roth*
L13	CCCATCGTCCTCACCATATC	Roth*
L15	ACCTCTGAAACAACACAG	Roth*
P 01	CTGAAATCTGCCAAGAAG	Roth*, ( für pUAST)
P 02	GTTGGAATCTAAAATACAC	Roth* (für pUAST)
Seq F1	GATTTCACTGGAAGTAGG	Invitrogen (für IgDP)
Seq R1	CATGATTACGCCAAGCTC	Invitrogen (für IgDP)

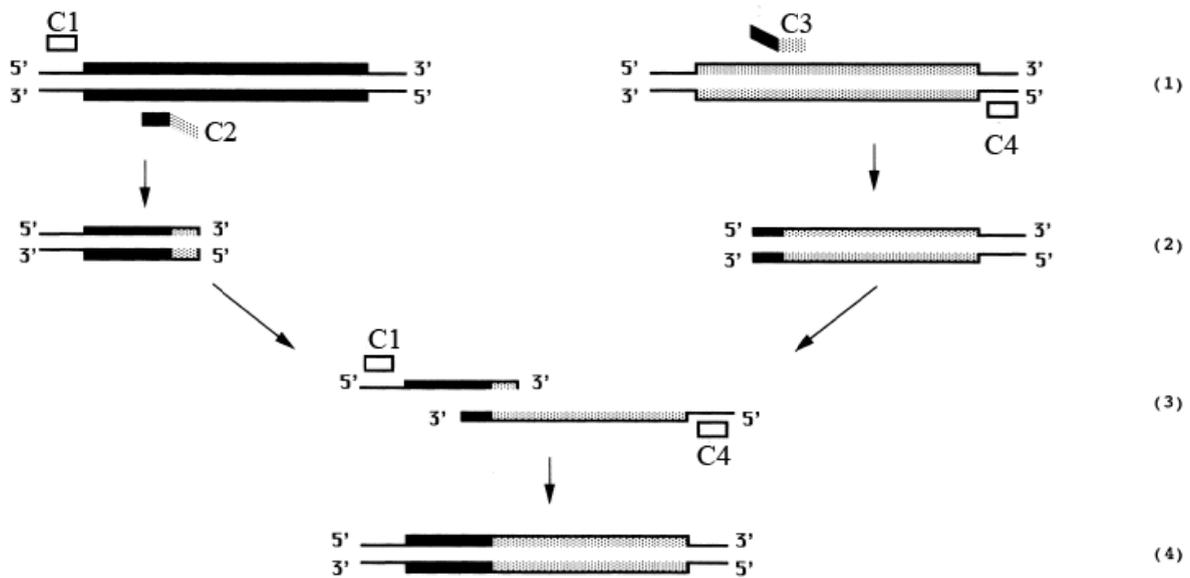
## 5.8 Herstellung der Lgd-Konstrukte

Die meisten Lgd Deletionskonstrukte waren bereits im pUAST-Vektor vorhanden und wurden mit Hilfe geeigneter Primer durch SOE-PCR (Splicing Over Extension, (Horton, Hunt et al. 1989), siehe Abb. 5-1 und 5-2) mit Lgd-HA/CG4713-HA (Jaekel und Klein 2006) als Matrize vor dieser Arbeit generiert (siehe Tab. 5-5). Es wurde der Expand High Fidelity PCR Kit (Roche) entsprechend den Herstellerangaben eingesetzt. Die erwünschten Fragmente wurden in den pUAST Vektor (Brand und Perrimon 1993) mit NotI und KpnI kloniert (Jaekel 2006, Troost 2007). Alle Konstrukte wurden vor der Injektion sequenziert.

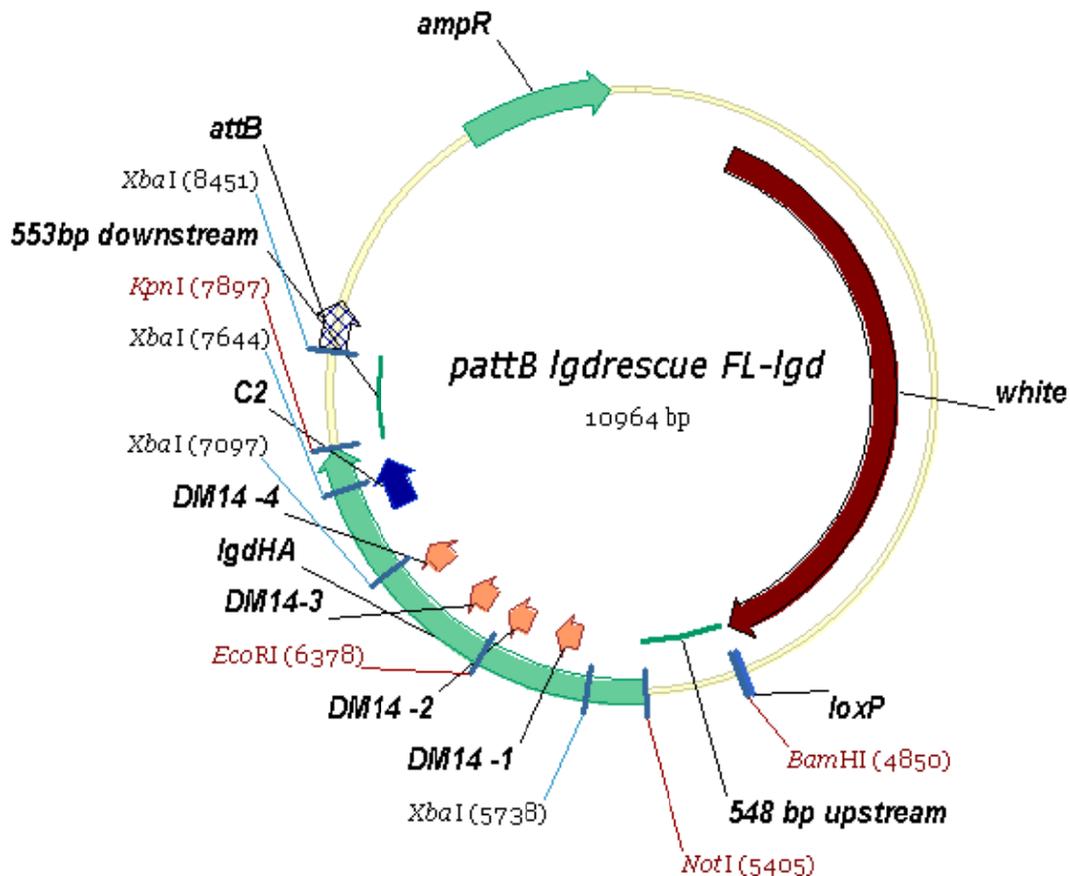
Für die Analyse unter Kontrolle des endogenen Promotors (IgdP) wurde die Firma Genscript (Genscript Corp. P.O.Box 855, Scotch Plains, NJ 07076) beauftragt eine DNA-Sequenz zu synthetisieren. Die Sequenz enthält den *IgdP* Bereich, 553bp vor dem Startcodon und 548bp nach dem Stopcodon, verbunden durch eine kurze Sequenz mit Restriktionsschnittstellen (NotI, XhoI und KpnI) und wurde über BamHI und XbaI aus puc57 in den pattB Vektor kloniert und dadurch der Zielvektor *plgdPattB* generiert. Die Lgdkonstrukte wurden über die NotI und KpnI Schnittstellen aus pUAST in den Zielvektor subkloniert. Noch nicht vorhandene Konstrukte wurden durch SOE-PCR generiert oder durch Restriktionsverdau generiert (siehe Abb. 5-1). Alle Konstrukte wurden vor der Injektion sequenziert.



**Abb. 5-1 Lgd-HA mit Primern für die Generierung und Sequenzierung der Konstrukt.** Die eingesetzten Primer sind in den Tabellen 5-3 und 5-4 aufgelistet. Für die Darstellung der einzelnen Konstrukte siehe Abb. 2-10.



**Abb. 5-2 : Schematische Darstellung der SOE-PCR:** Von der Matrize (pUAST-Igd-HA) werden zwei Fragmente amplifiziert durch Einsatz von Primern mit komplementären Überhängen ((1) z.B. C1+C2 und C3+C4). Die beiden amplifizierten Fragmente (2) werden durch eine zweite PCR (Primer C1+C4) amplifiziert und miteinander verbunden (3,4) und anschließend in den Zielvektor kloniert. (übernommen und verändert aus (Warrens, Jones et al. 1997))



**Abb. 5-3 Vektorkarte von pattB-IgdP-Igd-HA.** DM14 (Pfeile, orange) und C2 Domäne (Pfeile, blau), genomische Bereiche upstream und downstream (schwarze Balken), der Selektionsmarker white, die Ampicillinresistenz ampR (grün), die attB site (gestrichelter Pfeil) und die loxP site sind angegeben.

Tabelle 5-5 Auflistung der eingesetzten Vektoren und Konstrukte, \*UAS-Konstrukte wurden in *plgdPattB* subkloniert (siehe auch Abb. 5-3 und 5-4)

Konstrukt	Vektor	Nr.	Bezugsquelle oder Referenz (Primer)
Lgd-HA	pPUAST	1*	Jaekel und Klein 2006
Lgd-RFP	pPUAST	2*	Robert Jaekel / Gaby Altmann
GFP-Lgd	pPUAST	3*	Gallagher und Knoblich 2006
Lgd $\Delta$ C2-HA	pPUAST	4*	Jaekel 2006
NES-Lgd $\Delta$ C2-HA	pPUAST	5*	Troost 2007
Lgd $\Delta$ DM14-HA	pPUAST	6*	Jaekel Dissertation (C1,A2,A3,C4)
Lgd $\Delta$ DM14(1-2)-HA	pPUAST	7*	Jaekel Dissertation (C1,C2,C3,C4)
Lgd $\Delta$ DM14(1-3)-HA	pPUAST	8*	Troost 2007 (C1,B2,B3,C4)
Lgd $\Delta$ DM14(3-4)-HA	pPUAST	9*	Troost 2007 (C1,D2,D3,C4)
Lgd $\Delta$ DM14(1)-HA	pPUAST	10*	Troost 2007 (C1,E2,E3,C4)
Lgd $\Delta$ DM14(4)-HA	pPUAST	11*	Troost 2007 (C1,F2,F3,C4)
Lgd $\Delta$ DM14(1;4)-HA	plgdPattB	12	Nr. 10+11 (EcoRI Restriktionsverdau)
Lgd $\Delta$ DM14(1;3-4)-HA	plgdPattB	13	Nr. 10+9 (EcoRI Restriktionsverdau)
Lgd $\Delta$ DM14(2-3)-HA	plgdPattB	14	Niklas Berleth
NES Lgd $\Delta$ DM14 $\Delta$ C2-HA	plgdPattB	15	Nr. 5+6
Lgd $\Delta$ (1-664)-RFP	pPUAST	16	nur UAS (MluI Restriktionsverdau)
His2AVD-RFP	pattB	17	Julie Barskaja (Schuh et al. 2007)

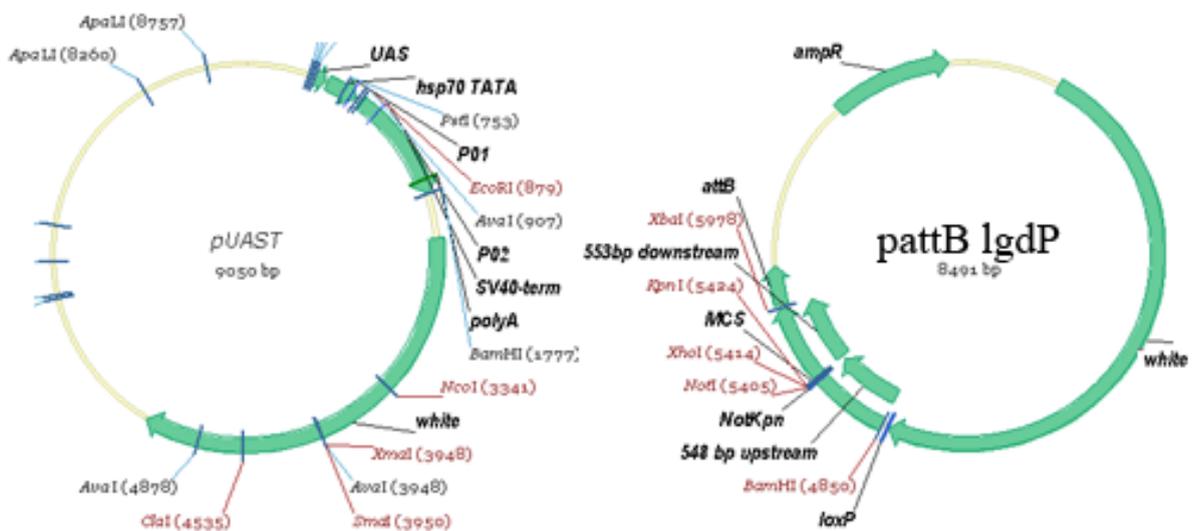


Abb. 5-4 Vektorkarten von pUAST und pattB lgdP

## **5.9 Drosophila Methoden**

Balancerchromosomen sowie verwendete dominante und rezessive Marker werden im „roten Buch“ (Lindsley und Zimm 1992) beschrieben. Standardmethoden sind in (Roberts 1986, Ashburner 1989, Dahmann 2008) beschrieben.

### **5.9.1 Medien, Agarplatten und Lösungen**

#### Medien zur Kultivierung von *Drosophila melanogaster*

Fliegenfutter: 100 g Agar, 1,4 kg Maismehl, 336 g Trockenhefe, 190 g Sojamehl, 900 g Malzextrakt, 800 g Zuckerrübensirup, 90 ml Propionsäure und 30 g Nipaginpulver in 20 L destilliertem Wasser.

### **5.9.2 Fliegenhaltung**

Die Haltung der Fliegenstämme erfolgte auf dem Futtermedium in durchsichtigen, zylindrischen Plastikröhrchen, die mit Schaumstoffstopfen verschlossen gehalten werden. Die Haltung der Fliegen erfolgte bei RT oder 18°C. Für Experimente wurden die Fliegen bei 25°C gehalten, sofern nicht anders angegeben. Für Kreuzungen wurden frisch geschlüpfte jungfräuliche Weibchen gesammelt und mit Männchen verpaart. Um große Mengen an Embryonen für die Injektion zu erhalten, wurden die Fliegen in Käfigen gehalten, deren Boden mit einer Apfelsaft-Agarplatte verschlossen wurde. In der Mitte der Apfelsaft-Agarplatte wurde etwas Bäckerhefe positioniert. Die Agarplatte wurde etwa alle 30 Minuten gewechselt um Embryonen für die Erzeugung der transgenen Fliegen (siehe 5.3.3) zu sammeln.

### **5.9.3. Präparation von Flügelimaginalscheiben**

Die Präparation von Imaginalscheiben wurde nach Standardprotokoll mit sekundären Fluorochrom gekoppelten Antikörpern durchgeführt (Klein 2008). Für die histologischen Färbungen wurden Larven des frühen bis späten dritten Larvenstadiums präpariert. Die Larven werden aus dem Futterröhrchen in PBS überführt und werden mit Hilfe von zwei feinen Pinzetten (Dumont Nr.5) in zwei Hälften geteilt, wobei die hintere Hälfte verworfen

und die vordere Hälfte umgestülpt wird. Kaltes PBS schränkt die Bewegungsfähigkeit der Larven ein. Die Larvenhälften wurden durch Entfernung des Fettkörper weiter freipräpariert. Die Larvenhälften werden in kleinen Körben in 24er-Multiwellplatten gesammelt und anschließend dem Färbeprotokoll unterzogen.

Färbeprotokoll:

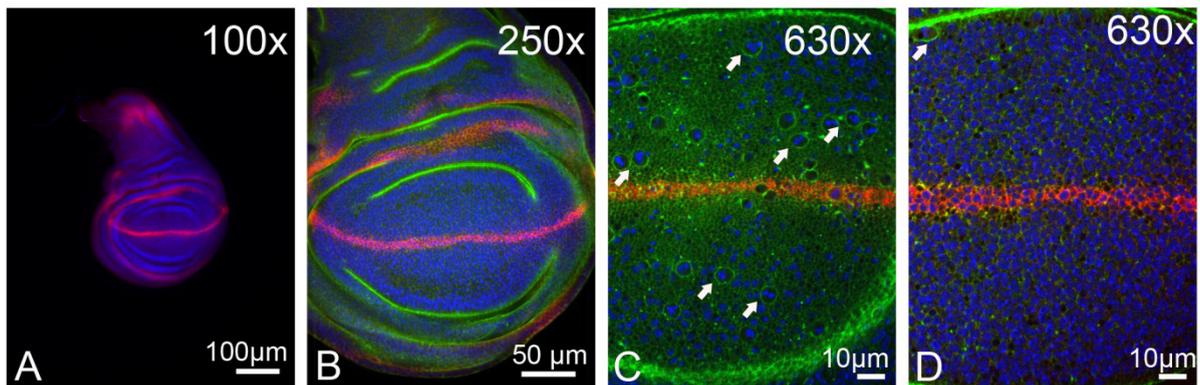
- 30 Min. fixieren in 4% PFA bei Raumtemperatur.
- 3 x 10 Min. waschen mit 0,3% PBT
- 30 Min. blocken in Blockierlösung 5% NGS in 0,3% PBT
- 90 Min. Inkubation mit primärem Antikörper verdünnt in 500 µl 5% NGS in 0,3% PBT
- 3 x 15 Min. waschen mit 0,3% PBT
- 60 Min. Inkubation mit sekundärem Antikörper verdünnt in 500 µl 5% NGS in 0,3% PBT
- 10 Min. waschen mit 0,3% PBT
- 4 Min. Inkubation mit Hoechst-33258 (Stammlösung 5mg/ml in ddH<sub>2</sub>O, Gebrauchslösung 50µg/ml in ddH<sub>2</sub>O, Anwendung: 1:100 in 0,3% PBT)
- 2 x 10 Min. waschen mit 0,3% PBT

Danach erfolgt die Frei-Präparation der Imaginalscheiben (für zweites oder frühes drittes Larvenstadium feinere Pinzetten Dumont Nr.5b) von den gefärbten Larvenhälften in PBS und das Eindeckeln der Imaginalscheiben in Vectashield.

Für die EM-Analyse erfolgte die Präparation analog, aber während der gesamten Präparation der Larven wird eiskalter 0,1M Phosphatpuffer verwendet und die präparierten Larvenhälften werden bis zur Fixierung ständig auf Eis inkubiert. Die anschließende Aufbereitung der Larvenhälften für die EM-Analyse erfolgte in 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäßen. Die Aufbereitung für die Analyse am TEM wurde von Ferdi Grawe mit Hilfe von Sylvia Tannebaum durchgeführt. Die Larvenhälften wurden mit 2,5 % Glutaraldehyd (EM-Grade) und nach Waschschritten mit dem PO<sub>4</sub>-Puffer mit 2% OsO<sub>4</sub> fixiert und in Uranylacetat inkubiert und mit einer aufsteigenden Ethanolreihe und Aceton dehydriert. Anschließend wurden die Präparate in Araldit eingebettet und Semi- und Ultradünnschnitte für die TEM-Analyse erstellt.

### 5.9.3.1 Dokumentation der Imaginalscheiben und Mikroskopie

Die Orientierung der dokumentierten Imaginalscheiben ist stets so, dass anterior/links posterior/rechts und dorsale/oben und ventral/unten liegt. Es wurden Übersichtsaufnahmen der gesamten Imaginalscheibe (10x Objektiv), des Flügelfeldes (25x Objektiv) und Detailaufnahmen dokumentiert (63x Objektiv). Beispielaufnahmen mit Maßstabsbalken werden in Abbildung 5-5 gezeigt. Die Kollagen wurden mit Photoshop erstellt.



**Abb. 5-5. Wildtypische Flügelimaginalscheibe mit Maßstabsbalken:** (Genotyp: *w*; ) gefärbt mit anti Wg (rot), Phalloidin (in grün, gekoppelt mit A647, Invitrogen) färbt des Zytoskeletts und visualisiert die Faltung des Epithels, sowie mit Hoechst 33258 zur Färbung des Zellkerns (in blau). Übersichtsaufnahme mit 10x Objektiv (Neo-FLUAR Numerische Apertur (NA), in A: Maßstabsbalken 100 µm), Übersichtsaufnahme mit 25x Objektiv (, in B: Maßstabsbalken 50 µm) und Detailaufnahme mit 63x Objektiv (Apo-Plan Neo Fluor 1,4 NA, in C und D: Maßstabsbalken 10 µm). C zeigt einen optischen Schnitt nahe der apikalen Zelloberfläche mit teilenden Zellen (Pfeile in C bzw. D). In D liegt die Schnittebene tiefer.

### 5.9.4 Herstellung transgener Fliegen durch P-Element vermittelte Insertion

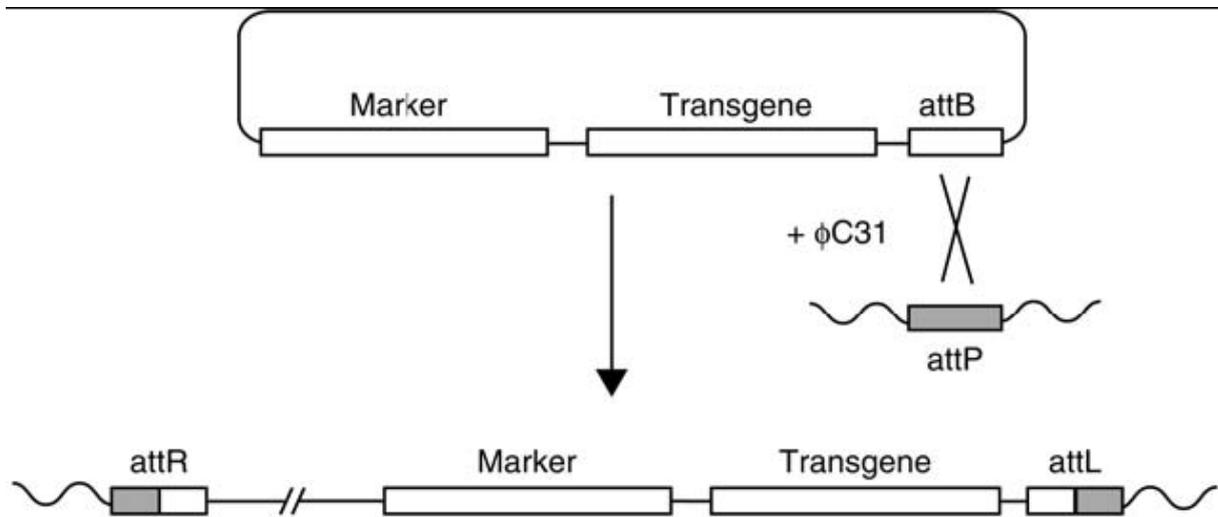
Diese Methode wird detailliert in (Bachmann und Knust 2008) beschrieben. Die erstellten transgenen Fliegen mit UAS Konstrukten wurden durch P-Element vermittelte Transformation von *Drosophila* Embryonen erstellt. Hierbei wird die DNA über ein Transposon in die Keimbahn der Fliege integriert (Rubin und Spradling 1982). Als Vektor für die Deletionskonstrukte wurde der pPUAST verwendet. Der Vektor enthält neben dem zu injizierenden Transgen das *white(+)* Gen. Erkennungssequenzen für eine Transposase, die mittels eines Hilfsvektors ( $\Delta 2-3$  Transposase Vektor) ko-injiziert wurde, flankieren das unter UAS-Kontrolle stehende Transgen und das *white(+)* Gen. Der Hilfsvektor kann nicht integriert werden, da die dafür notwendigen Erkennungssequenzen in diesem Vektor nicht vorhanden sind. Der Injektionsmix wurde in einem Endvolumen von 30 µl angesetzt und enthielt den P-Element Vektor (400 ng/µl) und den Hilfsvektor (100 ng/µl) in Wasser. Injiziert wurde der Injektionsmix in etwa 0,5 h alte *w*-Embryonen. Die geschlüpften Fliegen wurden gegen den „Multibalancer Stamm“ (*w*; *Igf/CyO<sup>wg-lacZ</sup>*; *MKRS/TM6B*) gekreuzt, um die potentiellen

Transformanten in der folgenden Generation auf erfolgreiche Integrationen in die Keimbahn zu überprüfen. Die rotäugigen Fliegen wurden erneut gegen den Multibalancerstamm gekreuzt, um die betroffenen Chromosomen zu bestimmen.

#### **5.9.5. Herstellung transgener Fliegen durch gerichtete Insertion mittels attP/attB**

Dieses weiter entwickelte System zur Transgenherstellung wurde in Bischof et al. 2007 beschrieben. Im Gegensatz zur zufälligen Insertion der P-Elemente vermittelt die  $\Phi$ C-31 Integrase die gerichtete Insertion in attP Integrationsstellen („landing sites“). Die Integrationsstellen sind im Genom von *Drosophila* nicht vorhanden, sondern wurden durch ein M-Element (*Mariner*(M) Transposon, M{3xP3RFP attP}) ins Genom integriert und der jeweilige Insertionsort wurde bestimmt, wodurch für jedes Chromosom mehrere Integrationsstellen zur Verfügung stehen. Die stabile Integration der Transgene wird durch die Expression einer stabil (in der attP site 2A) im Genom integrierten  $\Phi$ C-31 Integrase (markiert durch 3xP3 eGFP) unter Kontrolle des *vasa* Promotors in der Keimbahn erreicht. Der Injektionsmix enthält nur den Vektor (z.B. *plgdPattB*) mit dem jeweiligen Konstrukt (ca. 200-800 ng/ $\mu$ l) und benötigt kein Helferplasmid. Ansonsten unterscheidet sich die Injektion nur durch die verwendeten Embryonen. Die Fliegenstämme, die für die Transgenese verwendet wurden enthalten die  $\Phi$ C-31-Integrase in attPZH2A auf dem X-Chromosom (*y w* Hintergrund) und die Insertionsstelle attP86Fb oder att68E. Wie bei der P-Element vermittelten Integration zeigen sich die Integrationsereignisse in der folgenden Generation. Der Selektionsmarker (*w+*) erlaubt die Identifikation von stabilen Integrationsereignissen anhand der roten Augenfarbe, die eine charakteristische vom Integrationsort abhängige, und keine zufällige Augenfarbe (Bischof, Maeda et al. 2007). Integrationsereignisse an der Stelle attP86Fb führen zu einer leicht erkennbaren roten (orange-rot kurz nach dem Schlüpfen) Augenfarbe, bei der Stelle att68E ist die Augenfarbe leicht orange und bei frisch geschlüpften Tiere schwieriger zu erkennen. Im Falle der Insertionsstellen mit schwacher Expression des Selektionsmarkers hilft der Blick auf die Ocelli, in denen die roten Pigmente besser zu erkennen sind (Bischof, Maeda et al. 2007). Die *attP* Insertionsstellen enthalten als Marker RFP unter Kontrolle des artifiziellen 3xP3 Promotors. Die Expression ist im Gehirn der Larve anhand der Fluoreszenz sichtbar und wird in Adulten im differenzierten Auge exprimiert. Im Auge der Fliege lässt sich dies an einer sichtbaren rosa Färbung erkennen. Die Stärke der Färbung ist von der Anzahl der markierten attP-Sites im Genom abhängig und

nimmt mit dem Alter der Fliegen zu. Bei erfolgreicher Integration bzw.  $w^+$  im Genom ist die rosa Färbung nicht sichtbar.

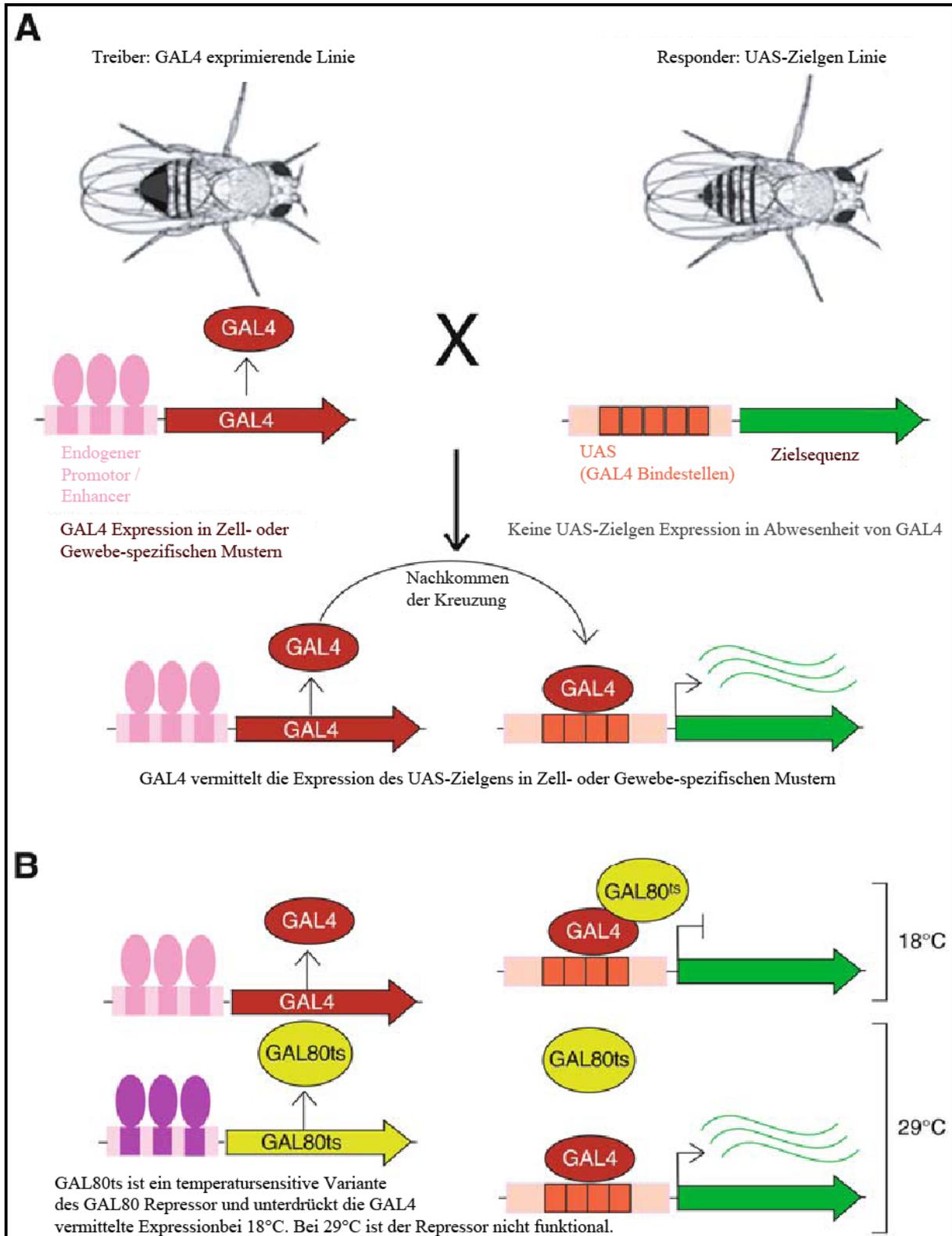


**Abb. 5-5 Schematische Darstellung der  $\Phi$ C31 vermittelten Integration in attP Sites.** übernommen aus *Drosophila*, Methods and Protocols Dahmann (Bischof und Basler 2008).

### 5.9.6 Das UAS/GAL4 System Expressionssystem

Das UAS/GAL4 System erlaubt die räumlich und zeitlich definierte ektopische Expression von Genen *in vivo* (Brand und Perrimon 1993). Das System basiert auf zwei Transgenen, einer Aktivator-Komponente und einer Effektor-Komponente. Das aktivierende Element ist der Transkriptionsfaktor GAL4 aus der Hefe, der in *Drosophila* natürlicherweise nicht vorkommt. In einer GAL4-Treiberlinie steht die Expression des Transkriptionsfaktors unter der Kontrolle eines spezifischen Promotors. Bei der Effektorkomponente handelt es sich um ein Gen, das hinter eine „upstream activating sequence“ (UAS) kloniert wurde. Werden beide Komponenten durch Kreuzung zusammengebracht, aktiviert der Transkriptionsfaktor GAL4 unter der Kontrolle des spezifischen Promotors durch Bindung an die „UAS“ die Expression des UAS-Transgens (siehe Abb. 5-6). Das Gen hinter der UAS kann ein Protein (z.B. GFP-Fusionsproteine) oder eine dsRNA für die RNAi kodieren. Eine Erweiterung des UAS/GAL4 Systems stellt GAL80, der Repressor von GAL4 aus der Hefe dar. Diese Komponente kommt auch beim MARCM System (siehe 5.9.7) zum Einsatz. Durch Verwendung einer temperatursensitiven GAL80 Variante, GAL80ts, kann die GAL4 vermittelte Expression zeitlich kontrolliert werden (McGuire, Le et al. 2003). Bei permissiver Temperatur (18°C) ist der

Repressor aktiv und verhindert die GAL4 vermittelte Expression. Bei restriktiver Temperatur (29°C) wird die Repression durch GAL80ts aufgehoben.



**Abb. 5-6 Das GAL4/UAS System (A) und GAL80ts (B).** Durch Kreuzung von Treiber- und Responderlinie werden die Komponenten zusammengebracht und in den Nachkommen wird das UAS-Zielgen exprimiert (A). GAL80ts ist eine temperatur-sensitive Variante des GAL80 Repressors, der bei 29°C inaktiv ist. (Übernommen und verändert aus *Drosophila*, Methods and Protocols, Dahmann (Elliott und Brand 2008))

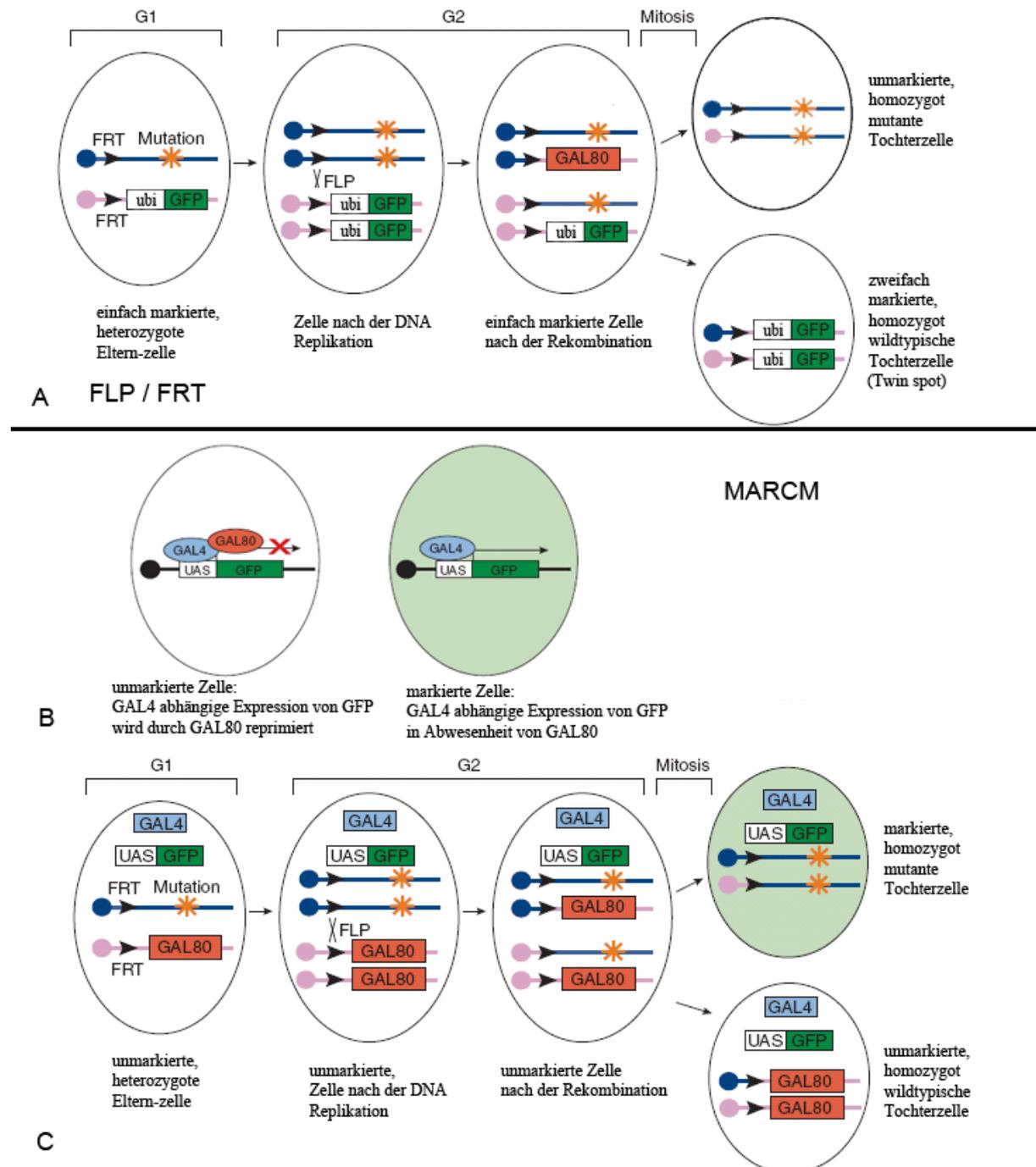
### 5.9.7. Klonale Analyse mit dem Flp/FRT System

Die klonale Analyse erlaubt in *Drosophila* die Untersuchung von embryonal-letalen Mutationen zu späteren Zeitpunkten der Entwicklung. Durch Chromosomenarmaustausch (homologe Rekombination während der Mitose) tragen die Tochterzellen den distal des Rekombinationsereignis gelegenen Chromosomenabschnitt in Homozygose. Durch die Nutzung des FLP/FRT Systems kann die Effizienz bei der Induktion der Klone gegenüber ursprünglich verwendeter ionisierender Strahlung (z.B. Röntgenstrahlen) deutlich gesteigert werden (Xu und Rubin 1993). Das FLP/FRT System entstammt aus der Hefe und FLP (Flippase) vermittelt die Rekombination an spezifischen Erkennungssequenzen (Flippase Recombinase Target sequence) und führt in *Drosophila* zu einer hohen Rate von mitotischen Rekombinationsereignissen zwischen FRT Sequenzen auf homologen Chromosomenarmen (Golic und Lindquist 1989, Golic 1991). Die Einführung von zellulären Markern auf dem homologen FRT Chromosom erlaubt die Identifizierung der Klone, die durch den Verlust des zellulären Markers (z.B. GFP, RFP oder  $\beta$ -Gal) identifiziert werden, wobei der wildtypische Zwilling („twin spot“) des mutanten Klons die zweifache Dosis des Markers aufweist. Alternativ kann auch das Chromosom mit der zu untersuchenden Mutation markiert werden.

Es existieren verschiedene Varianten dieses Systems. Das MARCM (Mosaic Analysis with a Repressible Cell Marker) System verbindet das UAS/GAL4 System mit der klonalen Analyse und nutzt die Eigenschaften des GAL80 Repressors, die Unterdrückung der GAL4 vermittelten Expression, aus (Lee und Luo 1999). Hierbei werden die mutanten Klone durch Expression von GFP markiert. Dieses System hat den Vorteil, dass sich innerhalb der Klone auch weitere Transgene unter Kontrolle von UAS/GAL4 angeschaltet werden können. Prinzipiell können auch Transgene außerhalb des mutanten Klons exprimiert werden, wenn GAL80 und die zu untersuchende Mutation *in cis* vorliegen (Reverses MARCM). Im Rahmen dieser Arbeit wurde das GAL80 FRT40A Chromosom mit einem weiteren Reporter *arm-lacZ* rekombiniert, dadurch können mutante MARCM-Klone bei Verwendung einer geeigneten GAL4 Linie (z.B. hhGAL4) mit Kontrollklonen ohne die Expression der UAS Transgene (MARCM mit klassischem FLP/FRT) verglichen werden.

Durch die Verwendung von unterschiedlichen Promotoren, welche die Expression von FLP kontrollieren, kann die Dauer und Zeitpunkt der Induktion der Klone bestimmt werden. Es können gewebespezifische Promotoren (z.B. *eyeless (eyFlp)*), UAS-Flp mit einer spezifischen

GAL4 Linie (EGUF/hid , (Stowers und Schwarz 1999)) verwendet werden. Für die klonale Analyse wurde *hsFlp122* unter Kontrolle des *hs(heatshock)* Promotors (Hitzeschock induzierbarer Promotor) verwendet. Der Hitzeschock (70 Minuten Inkubation des Futterröhrchens mit den Larven bei 37°C im Wasserbad) 24-48h nach Eiablage durchgeführt.



**Abb. 5-7 FLP/FRT MARCM: (A)** Das FLP/FRT System ermöglicht die Induktion von homozygot mutanten Klonen durch mitotische Rekombination. Die mutanten Zellen können anhand des Verlusts eines Markers (z.B. GFP oder lacZ) identifiziert werden. (B,C) Bei der MARCM Variante werden die Zellen durch Vorhandensein eines Markers unter Kontrolle von UAS (z.B. GFP oder mRFP) positiv markiert. Dies wird durch den Verlust des GAL80 Repressors erreicht. Mit Hilfe dieses Systems lassen sich auch weitere UAS-Transgene in den mutanten Zellen exprimieren. (übernommen und verändert aus (Wu und Luo 2006))

### 5.9.8 RNAi

RNA Interferenz (RNAi) hat sich als wichtige Methode für die Analyse von Genfunktionen in *D. melanogaster* etabliert (Dietzl, Chen et al. 2007). Das GAL4-UAS Systems (Brand und Perrimon 1993) steuert die Expression eines Genfragments, das dimerisiert und eine doppelsträngige RNA (dsRNA) Haarnadel Struktur bildet, wodurch eine sequenzspezifische, post-transkriptionale Unterdrückung und RNAi Antwort ausgelöst wird. Durch Kreuzung von UAS-GenX-RNAi (meist als UAS-GenX-RNAi bezeichnet, die Bezeichnung UAS-dsGenX wird seltener verwendet) mit einer GAL4 Treiber Linie wird das transgene RNAi-Konstrukt gewebespezifisch angeschaltet, wodurch der „Knockdown“ räumlich und zeitlich kontrolliert werden kann. In *Drosophila* wirkt die RNAi zellautonom und nicht systemisch (van Roessel und Brand 2004). Zwei unabhängig etablierte Bibliotheken stellen UAS-RNAi Linien (NIG Fly, VDRC) zur Verfügung.

### 5.9.9. Fliegenstämme

**Tabelle 5-9. Fliegenstämme.** Weitere Information unter Flybase.org, Bloomington.

<b>Für Transgenese und Stammetablierung bzw. Balancierung verwendete Stämme</b>	
<i>Genotyp</i>	Anmerkung
<i>y w M{eGFP.vas.int.Dm}ZH2A; M{RFP.attP}2H-68E</i>	Bischof et al. 2007, Integrase auf dem X Chromosom inseriert, attP 68E Chr. 3L
<i>y w M{eGFP.vas.int.Dm}ZH2A; M{RFP.attP}2H-86Fb</i>	Bischof et al. 2007 Integrase auf dem X Chromosom inseriert, attP 86Fb Chr. 3R
<i>w;</i>	für P-Element vermittelte Transgenese
<i>w; If / CyO<sup>wg-lacZ</sup>; TM6B / MKRS</i>	Multibalancer (MB) Stamm
<i>hsFlp; If / CyO<sup>wg-lacZ</sup>; TM6B / MKRS</i>	hsFlp 122 MB-Stamm
<i>hsFlp; If / SM6a – TM6B</i>	
<i>hsFlp UASRFP; If / CyO; TM6B / MKRS</i>	
<i>w; If / SM6a – TM6B</i>	Compound Balancer
<i>w; Gl<sup>a</sup> / SM6a-TM6B</i>	Compound Balancer
<b>Transgene Linien</b>	
<i>Genotyp</i>	Anmerkung
<i>w; If / CyO<sup>wg-lacZ</sup>; IgdP IgdHA att86Fb / TM6B</i>	falls nicht anders vermerkt, werden die inserierten Transgene homozygot
<i>w; If / CyO<sup>wg-lacZ</sup>; IgdP IgdΔC2HA att86Fb / TM6B</i>	
<i>w; If / CyO<sup>wg-lacZ</sup>; IgdP IgdΔC2HA att68E / TM6B</i>	
<i>w; If / CyO<sup>wg-lacZ</sup>; IgdP NESIgdΔC2HA att86Fb / TM6B</i>	
<i>w; If / CyO<sup>wg-lacZ</sup>; IgdP NESIgdΔC2HA att68E FRT2A / TM6B</i>	

<i>w; lf / CyO<sup>wg-lacZ</sup> ; lgdP lgdΔDM14HA att86Fb / TM6B</i>	
<i>w; lf / CyO<sup>wg-lacZ</sup> ; lgdP lgdΔDM14HA att68E / TM6B</i>	≠ Insertion wird nicht homozygot
<i>w; lf / CyO<sup>wg-lacZ</sup> ; lgdP lgdΔDM14(1-3)HA att86Fb / TM6B</i>	
<i>w; lf / CyO<sup>wg-lacZ</sup> ; lgdP lgdΔDM14(1;3-4)HA att86Fb / TM6B</i>	
<i>w; lf / CyO<sup>wg-lacZ</sup> ; lgdP lgdΔDM14(1)HA att86Fb / TM6B</i>	
<i>w; lf / CyO<sup>wg-lacZ</sup> ; lgdP lgdΔDM14(4)HA att86Fb / TM6B</i>	
<i>w; lf / CyO<sup>wg-lacZ</sup> ; lgdP lgdΔDM14(1;4)HA att86Fb / TM6B</i>	
<i>w; lf / CyO<sup>wg-lacZ</sup> ; lgdP lgdΔDM14(1-2)-HA att86Fb / TM6B</i>	
<i>w; lf / CyO<sup>wg-lacZ</sup> ; lgdP lgdΔDM14(3-4)HA att86Fb / TM6B</i>	
<i>w; lf / CyO<sup>wg-lacZ</sup> ; lgdP lgdΔDM14(2-3)HA att86Fb / TM6B</i>	
<i>w; lf / CyO<sup>wg-lacZ</sup> ; lgdP lgdRFP att86Fb / TM6B</i>	
<i>w; lf / CyO<sup>wg-lacZ</sup> ; lgdP GFP lgd att86Fb / TM6B</i>	
<i>w; lf / CyO<sup>wg-lacZ</sup> ; lgdP lgdRFP att68E / TM6B</i>	
<i>w; lf / CyO<sup>wg-lacZ</sup> ; lgdP GFP lgd att68E / TM6B</i>	
<i>w; lf / CyO<sup>wg-lacZ</sup> ; lgdP lgdRFP att68E FRT2A / TM6B</i>	Rekombiniert mit FRT2A
<i>w; lf / CyO<sup>wg-lacZ</sup> ; lgdP GFP lgd att68E FRT2A / TM6B</i>	≠ nach Rekombination Rekombiniert mit FRT2A
<i>w; lf / CyO<sup>wg-lacZ</sup> ; lgdP NES lgdΔDM14ΔC2HA att86Fb / TM6B</i>	
<i>w; lf / CyO<sup>wg-lacZ</sup> ; His2AVD-RFP att68E FRT2A</i>	≠ (Schuh, Lehner et al. 2007), Diplomarbeit Julia Barskaja
<b>Stämme für Rettungsassay</b>	® = Rettung von <i>lgd<sup>d7</sup></i>
<i>w; lgd<sup>d7</sup> FRT40A ; lgdP lgdHA att86Fb / SM6-TM6B</i>	®
<i>w; lgd<sup>d7</sup> FRT40A ; lgdP lgdΔC2HA att86Fb / SM6-TM6B</i>	+ att68E
<i>w; lgd<sup>d7</sup> FRT40A; lgdP lgdΔDM14-HA att86Fb / SM6-TM6B</i>	+ att68E ≠
<i>w; lgd<sup>d7</sup> FRT40A; lgdP lgdΔDM14(1-2)-HA att86Fb / SM6-TM6B</i>	®
<i>w; lgd<sup>d7</sup> FRT40A; lgdP lgdΔDM14(1-3)HA att86Fb / SM6-TM6B</i>	≠

<i>w; lgd<sup>d7</sup>FRT40A; lgdP lgdΔDM14(3-4)HA att86Fb / SM6A-TM6B</i>	®
<i>w; lgd<sup>d7</sup>FRT40A; lgdP lgdΔDM14(2-3)HA att86Fb / SM6-TM6B</i>	®
<i>w; lgd<sup>d7</sup>FRT40A ; lgdP lgdΔDM14(1;4)HA att86Fb / SM6-TM6B</i>	®
<i>w; lgd<sup>d7</sup>FRT40A ; lgdP lgdΔDM14(1;3-4)HA att86Fb / SM6-TM6B</i>	≠
<i>w; lgd<sup>d7</sup>FRT40A; lgdP lgdΔDM14(1)HA att86Fb / SM6-TM6B</i>	®
<i>w; lgd<sup>d7</sup>FRT40A ; lgdP lgdΔDM14(4)HA att86Fb / SM6-TM6B</i>	®
<i>w; lgd<sup>d7</sup>FRT40A ; lgdP lgdRFP att86Fb / SM6-TM6B</i>	® + att68E
<i>w; lgd<sup>d7</sup>FRT40A ; lgdP GFP lgd att86Fb / SM6-TM6B</i>	® + att68E
<i>w; lgd<sup>d7</sup>FRT40A; lgdP NES lgdΔC2HA att86Fb / SM6-TM6B</i>	+ att68E
<i>w; lgd<sup>d7</sup>FRT40A; lgdP NES lgdΔDM14ΔC2HA att86Fb / SM6-TM6B</i>	
<i>w; lgd<sup>d7</sup>FRT40A; Gbe+Su(H)-lacZ / SM6-TM6B</i>	Gbe+Su(H)-lacZ: Furriols und Bray, 2001
<i>w; lgd<sup>SH495</sup>FRTG13 shrub<sup>4-1</sup> ; Gbe+Su(H)-lacZ / SM6-TM6B</i>	
<i>w; lgd<sup>SH495</sup>FRTG13 shrub<sup>4-1</sup> ; Gbe+Su(H)-GFP / SM6-TM6B</i>	Gbe+Su(H)-GFP: de Nevascués et al. 2012
<i>w; lgd<sup>d7</sup>FRTG13 shrub<sup>4-1</sup> ; Gbe+Su(H)-GFP / SM6a-TM6B</i>	
<b>Aufstellung der untersuchten Allele</b>	
<i>w; lgd<sup>d7</sup>FRT40A / CyO<sup>wg-lacZ</sup> ; TM6B / MKRS</i>	Jaekel und Klein, 2006
<i>w; hrs<sup>D28</sup>FRT40A / CyO<sup>wg-lacZ</sup> ; TM6B / MKRS</i>	Lloyd et al., 2002
<i>w; lgd<sup>08</sup>FRT40A / CyO<sup>wg-lacZ</sup> ; TM6B / MKRS</i>	Gallagher und Knoblich, 2006
<i>w; lgd<sup>rsk73a</sup> / CyO<sup>wg-lacZ</sup> ; TM6B / MKRS</i>	Jaekel und Klein 2006
<i>w; lgd<sup>SH495</sup> / CyO<sup>wg-lacZ</sup> ; TM6B / MKRS</i>	(SH0495) Oh et al. 2003, Jaekel und Klein 2006
<i>w; FRTG13 shrub<sup>4-1</sup> / CyO<sup>wg-lacZ</sup> ; TM6B / MKRS</i>	Sweeney et al. 2006 , shrub <sup>4</sup>
<i>w; lgd<sup>SH495</sup>FRTG13 shrub<sup>4-1</sup> / CyO<sup>wg-lacZ</sup> ; TM6B / MKRS</i>	Jäckel 2010, Troost et al. 2012
<i>w; lgd<sup>d7</sup>FRTG13 shrub<sup>4-1</sup> / CyO<sup>wg-lacZ</sup> ; TM6B / MKRS</i>	Ohlenhard 2011, Troost et al. 2012
<i>w; kuz<sup>ES24</sup>FRT40A / CyO<sup>wg-lacZ</sup> ; TM6B / MKRS</i>	Klein, 2002
<i>w; lgd<sup>d7</sup>kuz<sup>ES24</sup>FRT40A / CyO<sup>wg-lacZ</sup> ; TM6B / MKRS</i>	Schneider et al. 2012
<i>car<sup>1</sup> ;</i>	BL#19
<i>car<sup>1</sup> ; lgd<sup>d7</sup> / CyO</i>	Schneider et al. 2012

<i>w; Su(H)<sup>Δ47</sup> P(B) FRT40A / CyO<sup>wg-lacZ</sup> ;</i>	Lecourtois und Schweisguth 1995
<i>Ser<sup>VX82</sup> e FRT82B / TM6B</i>	Micchelli et al. 1997
<i>DI<sup>rev10</sup> e FRT82B / TM6B</i>	Micchelli et al. 1997
<i>DI<sup>rev10</sup> Ser<sup>VX82</sup> e FRT82B / TM6B</i>	Micchelli et al. 1997
<i>Psn<sup>C1</sup> FRT2A / TM6B</i>	Struhl und Greenwald 1999
<i>mib1<sup>1</sup> / mib1<sup>3</sup></i>	Le Borgne et al. 2005
<i>fng<sup>13</sup></i>	Grammont und Irvine 2001
<b>Fliegenstämme für Klonale Analyse</b>	
<b>Genotyp</b>	<b>Anmerkung</b>
<i>hsFlp; arm-lacZ FRT40A / CyO<sup>wg-lacZ</sup> ; tubRab5CFP, tubRab7YFP / TM6B</i>	hsFlp 122: Struhl und Basler 1993 Rab-FPs: Marois et al. 2006
<i>w; Igd<sup>d7</sup> hrs<sup>D28</sup> FRT40A / CyO<sup>wg-lacZ</sup> ; TM6B / MKRS</i>	Jaekel und Klein 2006
<i>hsFlp; If / CyO<sup>wg-lacZ</sup> ; FRT2A 2xGFP / TM6B</i>	FRT2A 2xGFP Bloomington
<i>w; If / CyO<sup>wg-lacZ</sup> ; IgdP IgdRFP att68E FRT2A / TM6B</i>	
<i>hsFlp; If / CyO<sup>wg-lacZ</sup> ; FRT2A IgdP GFP-Igd att68E / TM6B</i>	≠
<i>w; Igd<sup>d7</sup> FRT40A ; IgdP IgdRFP att68E FRT2A / SM6-TM6B</i>	
<i>w; Igd<sup>d7</sup> ,shrub<sup>4</sup> FRT40A ; IgdP IgdRFP att68E FRT2A / SM6-TM6B</i>	
<i>Gbe+Su(H)-lacZ; Igd<sup>d7</sup> FRT40A ; IgdP IgdRFP att68E FRT2A / SM6-TM6B</i>	Gbe+Su(H)-lacZ: Furriols und Bray, 2001
<i>w; Igd<sup>d7</sup> ,shrub<sup>4</sup> FRT40A ; IgdP IgdRFP att68E FRT2A / SM6-TM6B</i>	
<i>hsFlp; Igd<sup>d7</sup> / CyO<sup>wg-lacZ</sup> ; FRT2A 2xGFP / TM6B</i>	
<i>hsFlp; Igd<sup>SH495</sup> shrub<sup>4-1</sup> / CyO<sup>wg-lacZ</sup> ; FRT2A 2xGFP / TM6B</i>	
<i>hsFlp; Igd<sup>SH495</sup> / CyO<sup>wg-lacZ</sup> ; FRT2A 2xGFP / TM6B</i>	
<i>hsFlp; Igd<sup>SH495</sup> ; FRT2A 2xGFP / SM6-TM6B</i>	
<i>hsFlp; Igd<sup>d7</sup> ; FRT2A 2xGFP / SM6-TM6B</i>	
<i>hsFlp; Igd<sup>d7</sup> ,shrub<sup>4-1</sup> ; FRT2A 2xGFP / SM6- TM6B</i>	
<i>hsFlp UASmRFP; arm-lacZ FRT40A / CyO<sup>wg- lacZ</sup> ; hhGAL4 / TM6B</i>	
<i>hsFlp; arm-lacZ FRT40A / CyO<sup>wg-lacZ</sup> ; hhGAL4 / TM6B</i>	
<i>hsFlp; arm-lacZ FRT40A / CyO<sup>wg-lacZ</sup> ; hhGAL4 UASdsRed / TM6B</i>	
<i>hsFlp UASmRFP; tubGAL80 arm-lacZ FRT40A / CyO; hhGAL4 Gbe+Su(H)-GFP / TM6B</i>	
<i>hsFlp; ptcGAL4 / CyO<sup>wg-lacZ</sup> ; FRT82B ubi GFPnls / TM6B</i>	

<i>hsFlp; ptcGAL4 UASGFP / CyO<sup>wg-lacZ</sup>; FRT82B ubi NLSmRFP/TM6B</i>	FRT82B ubiNLSmRFP Bloomington
<i>w; UASfng; Ser<sup>VX82</sup> e FRT82B / TM6B</i>	UAS fng22
<i>w; UASfng; Df<sup>rev10</sup> e FRT82B / TM6B</i>	UAS fng22
<i>w; UASfng; Df<sup>rev10</sup> Ser<sup>VX82</sup> e FRT82B / TM6B</i>	UAS fng22
<i>hsFlp; ptcGAL4 UASGFP / CyO<sup>wg-lacZ</sup>; FRT2A His2AvD-RFP att68E</i>	His2AvD-RFP in attP68E rekombiniert mit FRT2A
<i>hsFlp; ptcGAL4 / CyO<sup>wg-lacZ</sup>; FRT2A ubi GFPnls/TM6B</i>	
<i>w; UASfng; Psn<sup>C1</sup> FRT2A / TM6B</i>	Struhl und Greenwald, 1999
<i>hsFlp tubGAL4 UASGFP / FM7; FRT40A tubGAL80 / CyO</i>	Bloomington
<i>w; Su(H)<sup>Δ47</sup> P(B) FRT40A / CyO<sup>wg-lacZ</sup>; Ser-lacZ / TM6B</i>	Lecourtois und Schweisguth, Ser-lacZ Bachmann und Knust, 1998
<i>hsFlp;; FRT80B ubi GFPnls/TM6B</i>	Bloomington
<i>w,lf/CyO<sup>wg-lacZ</sup>; fng<sup>13</sup> /TM6B</i>	Grammont und Irvine, 2001
<b>weitere Stämme</b>	
<i>FRT2A</i>	für Rekombination mit IgdP-Konstrukten
<i>w; Sp / CyO; tubGAL80ts</i>	BL #7018
<i>w; FRT40A arm-lacZ / CyO<sup>wg-lacZ</sup>; TM6B / MKRS</i>	arm-lacZ FRT40A Chromosom
<i>w; FRT40A tubGAL80/ CyO<sup>wg-lacZ</sup>; TM6B / MKRS</i>	FRT40A tubGAL80 Chromosom
<i>w; FRT40A tubGAL80 arm-lacZ / CyO<sup>wg-lacZ</sup>; TM6B / MKRS</i>	FRT40A tubGAL80 arm-lacZ Chromosom
<i>w; Igd<sup>d7</sup> ptcGAL4 / CyO<sup>wg-lacZ</sup>; TM6B / MKRS</i>	Jaekel und Klein, 2006
<i>w; Igd<sup>d7</sup> ptcGAL4 / CyO<sup>wg-lacZ</sup>; IgdP Igd-RFP / TM6B</i>	
<i>w; apGAL4 UASGFP/CyO<sup>wg-lacZ</sup>; UASDcr2 / TM6B</i>	Thomas Klein
<i>sdGAL4; Gbe+Su(H)-lacZ</i>	Thomas Klein
<i>sdGAL4; UASDcr2; Gbe+Su(H)-lacZ</i>	Thomas Klein
<i>sdGAL4; Igd<sup>d7</sup> FRT40A / SM6-TM6B</i>	Thomas Klein
<i>UASDcr2; Igd<sup>d7</sup>; hhGAL4 / SM6-TM6B</i>	Thomas Klein
<i>w; Igd<sup>d7</sup>; hhGAL4 / SM6-TM6B</i>	Thomas Klein
<i>w; Igd<sup>d7</sup> FRT40A; hhGAL4 tubGAL80ts / SM6-TM6B (oder CyO<sup>wg-lacZ</sup>; TM6B)</i>	
<i>w; Igd<sup>d7</sup> shrub<sup>4</sup>; hhGAL4 UASdsRed / SM6-TM6B (oder CyO<sup>wg-lacZ</sup>; TM6B)</i>	
<i>w; Igd<sup>d7</sup> FRT40A; tubRab5CFP tubRab7YFP / SM6-TM6B</i>	
<b>verwendete GAL4 Treiber Linien</b>	
<i>hhGAL4</i>	(Tanimoto, Itoh et al. 2000)
<i>ptcGAL4</i>	(Speicher, Thomas et al. 1994)
<i>ptcGAL4 UASGFP</i>	
<i>sdGAL4</i>	(Klein und Arias 1998a)
<i>apGAL4 UASGFP</i>	(Calleja, Moreno et al. 1996), Thomas Klein

<i>dppGAL4</i>	(Wilder und Perrimon 1995)
<i>hhGAL4 tubGAL80ts</i>	rekombiniert hhGAL4 mit Bl#7018
<i>hhGAL4 Gbe+Su(H)-GFP</i>	rekombiniert
<i>hhGAL4 UAST48-GFP</i>	rekombiniert
<b>UAS Konstrukte und RNAi</b>	
UASGFP	(Yeh, Gustafson et al. 1995)
<i>UASGFPLamp1</i>	(Pulipparacharuvi, Akbar et al. 2005)
<i>UAS-CeN</i>	(Sanders, Munoz-Descalzo et al. 2009)
<i>UAS-GFPGPI</i>	(Greco, Hannus et al. 2001)
<i>UAS-tkvGFP</i>	Marco Gonzales-Gaitan (Dudu, Bittig et al.)
<i>UAS-T48GFP</i>	Kölsch et al. 2007, AG Leptin (Köln)
<i>UAS-N-LV</i>	(Loewer, Soba et al. 2004)
<i>UAS-N-ΔEGF-LV</i>	(Loewer, Soba et al. 2004)
<i>UAS-N-BC</i>	(Kidd und Lieber 2002)
UAS fng	(Kim, Irvine et al. 1995) (UAS fng (22))
UAS-Psn	(Struhl und Greenwald 1999)
UAS-Mib1	(Le Borgne, Remaud et al. 2005)
UAS-Dcr2	(Lee, Nakahara et al. 2004) (Chr. X, II und III)
<i>UASDsRed</i>	Bloomington
UASmRFP	Bloomington
UAS-Lgd Konstrukte	Jaekel 2006, Troost 2007
UAS-Stam-RNAi (III. Chromosom)	VDR#22497
UAS-Hrs-RNAi (II.)	VDR#9846 (nicht mehr verfügbar)
UAS-VPS4-RNAi (III.)	VDR#35126
UAS-VPS20-RNAi (III.)	VDR#47653
UAS-VPS39-RNAi (III.)	VDR#40427
UAS-Lgd-RNAi	NIG-DGRC #4713-1 #4713-3
UAS-Lgd RNAi 1+3 (III.)	NIG-DGRC rekombiniert
UAS-Rab7-RNAi (III.)	VDR#40337
UAS-vhaA-RNAi (III.)	VDR#17102
UAS-Psn-RNAi (III.)	VDR#43082, 43083
UAS-Shrub-RNAi (III.)	Sweeney et al. 2006
UAS-Ser-RNAi (III.)	VDR#27172
UAS-Su(H)-RNAi (II.)	NIG-DGRC#3497R-1
<b>Reportergenkonstrukte und Marker (nicht UAS)</b>	
tub.Rab5CFP, tub.Rab7YFP	Marois E. et al. 2006
Gbe+Su(H)-lacZ (X) (III)	Furriols, Bray 2001, X und III. Chromosom
<i>wg-lacZ</i>	<i>CyO<sup>wg-lacZ</sup></i>
Gbe+Su(H)-GFP	de Nevascués et al. 2012
<i>Ser-lacZ</i>	Bachmann und Knust 1998

## 6. Literaturverzeichnis

Akbar, M. A., S. Ray and H. Kramer (2009). "The SM protein Car/Vps33A regulates SNARE-mediated trafficking to lysosomes and lysosome-related organelles." Mol Biol Cell **20**(6): 1705-1714.

Allan, A. K., J. Du, S. A. Davies and J. A. Dow (2005). "Genome-wide survey of V-ATPase genes in *Drosophila* reveals a conserved renal phenotype for lethal alleles." Physiol Genomics **22**(2): 128-138.

Artavanis-Tsakonas, S., M. D. Rand and R. J. Lake (1999). "Notch signaling: Cell fate control and signal integration in development." Science **284**(5415): 770-776.

Ashburner, M. (1989). Drosophila. A laboratory handbook, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Babst, M. (2005). "A protein's final ESCRT." Traffic **6**(1): 2-9.

Babst, M., D. J. Katzmann, E. J. Estepa-Sabal, T. Meerloo and S. D. Emr (2002). "ESCRT-III: An endosome-associated heterooligomeric protein complex required for MVB sorting." Developmental Cell **3**(2): 271-282.

Babst, M., D. J. Katzmann, W. B. Snyder, B. Wendland and S. D. Emr (2002). "Endosome-associated complex, ESCRT-II, recruits transport machinery for protein sorting at the multivesicular body." Developmental Cell **3**(2): 283-289.

Babst, M., T. K. Sato, L. M. Banta and S. D. Emr (1997). "Endosomal transport function in yeast requires a novel AAA-type ATPase, Vps4p." Embo Journal **16**(8): 1820-1831.

Babst, M., B. Wendland, E. J. Estepa and S. D. Emr (1998). "The Vps4p AAA ATPase regulates membrane association of a Vps protein complex required for normal endosome function." Embo Journal **17**(11): 2982-2993.

Bache, K. G., C. Raiborg, A. Mehlum and H. Stenmark (2003). "STAM and Hrs are subunits of a multivalent ubiquitin-binding complex on early endosomes." Journal of Biological Chemistry **278**(14): 12513-12521.

Bachmann, A. and E. Knust (1998). "Dissection of cis-regulatory elements of the *Drosophila* gene *Serrate*." Development Genes and Evolution **208**(6): 346-351.

Bachmann, A. and E. Knust (2008). The Use of P-Element Transposons to Generate Transgenic Flies. Drosophila. C. Dahmann, Humana Press. **420**: 61-77.

Bajorek, M., H. L. Schubert, J. McCullough, C. Langelier, D. M. Eckert, W.-M. B. Stubblefield, N. T. Uter, D. G. Myszka, C. P. Hill and W. I. Sundquist (2009). "Structural basis for ESCRT-III protein autoinhibition." Nature Structural & Molecular Biology **16**(7): 754-U795.

Baonza, A. and A. Garcia-Bellido (2000). "Notch signaling directly controls cell proliferation in the *Drosophila* wing disc." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(6): 2609-2614.

Barolo, S., T. Stone, A. G. Bang and J. W. Posakony (2002). "Default repression and Notch signaling: Hairless acts as an adaptor to recruit the corepressors Groucho and dCtBP to Suppressor of Hairless." Genes & Development **16**(15): 1964-1976.

Benes, C. H., N. Wu, A. E. H. Elia, T. Dharia, L. C. Cantley and S. P. Soltoff (2005). "The C2 domain of PKC delta is a phosphotyrosine binding domain." Cell **121**(2): 271-280.

Bischof, J. and K. Basler (2008). Recombinases and Their Use in Gene Activation, Gene Inactivation, and Transgenesis. Drosophila. C. Dahmann, Humana Press. **420**: 175-195.

Bischof, J., R. K. Maeda, M. Hediger, F. Karch and K. Basler (2007). "An optimized transgenesis system for *Drosophila* using germ-line-specific phi C31 integrases." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(9): 3312-3317.

Blair, S. S. (2000). "Notch signaling: Fringe really is a glycosyltransferase." Current Biology **10**(16): R608-R612.

Böcke, A. (2007). "Die Lokalisation von Notch im endosomalen Transportweg und Proteininteraktionspartner des Tumorsuppressors Lethal (2) giant disc. Diplomarbeit, Universität zu Köln."

Bokel, C., A. Schwabedissen, E. Entchev, O. Renaud and M. Gonzalez-Gaitan (2006). "Sara endosomes and the maintenance of Dpp signaling levels across mitosis." Science **314**(5802): 1135-1139.

Brand, A. H. and N. Perrimon (1993). "Targeted Gene-Expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes." Development **118**(2): 401-415.

Bray, S. J. (2006). "Notch signalling: a simple pathway becomes complex." Nature Reviews Molecular Cell Biology **7**(9): 678-689.

Brocker, C., S. Engelbrecht-Vandre and C. Ungermann (2010). "Multisubunit tethering complexes and their role in membrane fusion." Curr Biol **20**(21): R943-952.

Bruckner, K., L. Perez, H. Clausen and S. Cohen (2000). "Glycosyltransferase activity of fringe modulates notch-delta interactions." Nature **406**(6794): 411-415.

- Bryant, P. J. and Schubige, G. (1971). "GIANT AND DUPLICATED IMAGINAL DISCS IN A NEW LETHAL MUTANT OF DROSOPHILA-MELANOGASTER." Developmental Biology **24**(2): 233-&.
- Bucci, C., P. Thomsen, P. Nicoziani, J. McCarthy and B. van Deurs (2000). "Rab7: a key to lysosome biogenesis." Mol Biol Cell **11**(2): 467-480.
- Buratovich, M. A. and P. J. Bryant (1995). "DUPLICATION OF L(2)GD IMAGINAL DISKS IN DROSOPHILA IS MEDIATED BY ECTOPIC EXPRESSION OF WG AND DPP." Developmental Biology **168**(2): 452-463.
- Buratovich, M. A. and P. J. Bryant (1997). "Enhancement of overgrowth by gene interactions in lethal(2)giant discs imaginal discs from Drosophila melanogaster." Genetics **147**(2): 657-670.
- Calleja, M., E. Moreno, S. Pelaz and G. Morata (1996). "Visualization of gene expression in living adult Drosophila." Science **274**(5285): 252-255.
- Carlton, J. G. and J. Martin-Serrano (2007). "Parallels between cytokinesis and retroviral budding: A role for the ESCRT machinery." Science **316**(5833): 1908-1912.
- Chen, M. S., R. A. Obar, C. C. Schroeder, T. W. Austin, C. A. Poodry, S. C. Wadsworth and R. B. Vallee (1991). "Multiple forms of dynamin are encoded by shibire, a Drosophila gene involved in endocytosis." Nature **351**(6327): 583-586.
- Childress, J. L., M. Acar, C. Tao and G. Halder (2006). "Lethal giant discs, a novel C2-domain protein, restricts notch activation during endocytosis." Current Biology **16**(22): 2228-2233.
- Clague, M. J., H. Liu and S. Urbe (2012). "Governance of endocytic trafficking and signaling by reversible ubiquitylation." Dev Cell **23**(3): 457-467.
- Couso, J. P., E. Knust and A. M. Arias (1995). "Serrate and wingless cooperate to induce vestigial gene expression and wing formation in Drosophila." Current Biology **5**(12): 1437-1448.
- Dahmann, C. (2008). Drosophila : methods and protocols. Totowa, NJ, Humana Press.
- Dahmann, C. and K. Basler (1999). "Compartment boundaries - at the edge of development." Trends in Genetics **15**(8): 320-326.
- de Celis, J. F. and A. Garcia-Bellido (1994). "Roles of the Notch gene in Drosophila wing morphogenesis." Mech Dev **46**(2): 109-122.
- de Navascues, J., C. N. Perdigoto, Y. Bian, M. H. Schneider, A. J. Bardin, A. Martinez-Arias and B. D. Simons (2012). "Drosophila midgut homeostasis involves neutral competition between symmetrically dividing intestinal stem cells." EMBO J **31**(11): 2473-2485.

De Strooper, B., W. Annaert, P. Cupers, P. Saftig, K. Craessaerts, J. S. Mumm, E. H. Schroeter, V. Schrijvers, M. S. Wolfe and W. Ray (1999). "A presenilin-1-dependent -secretase-like protease mediates release of Notch Intracellular domain N&V." NATURE: 518-521.

deCelis, J. F. and S. Bray (1997). "Feed-back mechanisms affecting Notch activation at the dorsoventral boundary in the Drosophila wing." Development **124**(17): 3241-3251.

deCelis, J. F., A. GarciaBellido and S. J. Bray (1996). "Activation and function of Notch at the dorsal-ventral boundary of the wing imaginal disc." Development **122**(1): 359-369.

Di Fiore, P. P. and P. De Camilli (2001). "Endocytosis and signaling. an inseparable partnership." Cell **106**(1): 1-4.

DiazBenjumea, F. J. and S. M. Cohen (1995). "Serrate signals through Notch to establish a Wingless-dependent organizer at the dorsal/ventral compartment boundary of the Drosophila wing." Development **121**(12): 4215-4225.

Dietzl, G., D. Chen, F. Schnorrer, K. C. Su, Y. Barinova, M. Fellner, B. Gasser, K. Kinsey, S. Oettel, S. Scheiblauer, A. Couto, V. Marra, K. Keleman and B. J. Dickson (2007). "A genome-wide transgenic RNAi library for conditional gene inactivation in Drosophila." Nature **448**(7150): 151-156.

Dimaano, C., C. B. Jones, A. Hanono, M. Curtiss and M. Babst (2008). "Ist1 regulates Vps4 localization and assembly." Mol Biol Cell **19**(2): 465-474.

Djiane, A., A. Krejci, F. Bernard, S. Fexova, K. Millen and S. J. Bray (2013). "Dissecting the mechanisms of Notch induced hyperplasia." EMBO J **32**(1): 60-71.

Dobrowolski, R. and E. M. De Robertis (2012). "Endocytic control of growth factor signalling: multivesicular bodies as signalling organelles." Nat Rev Mol Cell Biol **13**(1): 53-60.

Doherty, D., G. Feger, S. YoungerShepherd, L. Y. Jan and Y. N. Jan (1996). "Delta is a ventral to dorsal signal complementary to Serrate, another Notch ligand in Drosophila wing formation." Genes & Development **10**(4): 421-434.

Du, X., A. S. Kazim, A. J. Brown and H. Yang (2012). "An essential role of Hrs/Vps27 in endosomal cholesterol trafficking." Cell Rep **1**(1): 29-35.

Dudu, V., T. Bittig, E. Entchev, A. Kicheva, F. Julicher and M. Gonzalez-Gaitan (2006). "Postsynaptic mad signaling at the Drosophila neuromuscular junction." Curr Biol **16**(7): 625-635.

Elliott, D. and A. Brand (2008). The GAL4 System. Drosophila. C. Dahmann, Humana Press. **420**: 79-95.

Epp, N., R. Rethmeier, L. Kramer and C. Ungermann (2011). "Membrane dynamics and fusion at late endosomes and vacuoles--Rab regulation, multisubunit tethering complexes and SNAREs." Eur J Cell Biol **90**(9): 779-785.

Falguieres, T., P.-P. Luyet and J. Gruenberg (2009). "Molecular assemblies and membrane domains in multivesicular endosome dynamics." Experimental Cell Research **315**(9): 1567-1573.

Fleming, R. J., Y. Gu and N. A. Hukriede (1997). "Serrate-mediated activation of Notch is specifically blocked by the product of the gene fringe in the dorsal compartment of the Drosophila wing imaginal disc." Development **124**(15): 2973-2981.

Forgac, M. (2007). "Vacuolar ATPases: rotary proton pumps in physiology and pathophysiology." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(11): 917-929.

Fortini, M. E. (2002). "gamma-secretase-mediated proteolysis in cell-surface-receptor signalling." Nature Reviews Molecular Cell Biology **3**(9): 673-684.

Furriols, M. and S. Bray (2000). "Dissecting the mechanisms of suppressor of hairless function." Developmental Biology **227**(2): 520-532.

Furriols, M. and S. Bray (2001). "A model Notch response element detects Suppressor of Hairless-dependent molecular switch." Current Biology **11**(1): 60-64.

Gallagher, C. M. and J. A. Knoblich (2006). "The conserved C2 domain protein lethal (2) giant discs regulates protein trafficking in Drosophila." Developmental Cell **11**(5): 641-653.

Garcia-Bellido, A. and J. R. Merriam (1971). "Genetic analysis of cell heredity in imaginal discs of Drosophila melanogaster." Proc Natl Acad Sci U S A **68**(9): 2222-2226.

Garcia-Bellido, A., P. Ripoll and G. Morata (1973). "Developmental compartmentalisation of the wing disk of Drosophila." Nat New Biol **245**(147): 251-253.

Go, M. J., D. S. Eastman and S. Artavanis-Tsakonas (1998). "Cell proliferation control by Notch signaling in Drosophila development." Development **125**(11): 2031-2040.

Golic, K. G. (1991). "Site-specific recombination between homologous chromosomes in Drosophila." Science **252**(5008): 958-961.

Golic, K. G. and S. Lindquist (1989). "The FLP recombinase of yeast catalyzes site-specific recombination in the Drosophila genome." Cell **59**(3): 499-509.

Gordon, W. R., D. Vardar-Ulu, G. Histén, C. Sanchez-Irizarry, J. C. Aster and S. C. Blacklow (2007). "Structural basis for autoinhibition of Notch." Nature structural & molecular biology **14**(4): 295-300.

- Greco, V., M. Hannus and S. Eaton (2001). "Argosomes: A potential vehicle for the spread of morphogens through epithelia." Cell **106**(5): 633-645.
- Greenwald, I. and G. Seydoux (1990). "Analysis of gain-of-function mutations of the lin-12 gene of *Caenorhabditis elegans*." Nature **346**(6280): 197-199.
- Hadjighassem, M. R., M. C. Austin, B. Szewczyk, M. Daigle, C. A. Stockmeier and P. R. Albert (2009). "Human Freud-2/CC2D1B: A Novel Repressor of Postsynaptic Serotonin-1A Receptor Expression." Biological Psychiatry **66**(3): 214-222.
- Haines, N. and K. D. Irvine (2003). "Glycosylation regulates Notch signalling." Nat Rev Mol Cell Biol **4**(10): 786-797.
- Hanyaloglu, A. C., E. McCullagh and M. von Zastrow (2005). "Essential role of Hrs in a recycling mechanism mediating functional resensitization of cell signaling." EMBO J **24**(13): 2265-2283.
- Hartenstein, V. and J. W. Posakony (1990). "A dual function of the Notch gene in *Drosophila* sensillum development." Developmental Biology **142**(1): 13-30.
- Henne, W. M., N. J. Buchkovich and S. D. Emr (2011). "The ESCRT Pathway." Developmental Cell **21**(1): 77-91.
- Henne, W. M., N. J. Buchkovich, Y. Zhao and S. D. Emr (2012). "The endosomal sorting complex ESCRT-II mediates the assembly and architecture of ESCRT-III helices." Cell **151**(2): 356-371.
- Herskowitz, I. (1987). "Functional inactivation of genes by dominant negative mutations." Nature **329**(6136): 219-222.
- Herz, H. M., Z. Chen, H. Scherr, M. Lackey, C. Bolduc and A. Bergmann (2006). "vps25 mosaics display non-autonomous cell survival and overgrowth, and autonomous apoptosis." Development **133**(10): 1871-1880.
- Hori, K., A. Sen, T. Kirchhausen and S. Artavanis-Tsakonas (2011). "Synergy between the ESCRT-III complex and Deltex defines a ligand-independent Notch signal." J Cell Biol **195**(6): 1005-1015.
- Horton, R. M., H. D. Hunt, S. N. Ho, J. K. Pullen and L. R. Pease (1989). "ENGINEERING HYBRID GENES WITHOUT THE USE OF RESTRICTION ENZYMES - GENE-SPLICING BY OVERLAP EXTENSION." Gene **77**(1): 61-68.
- Huotari, J. and A. Helenius (2011). "Endosome maturation." EMBO J **30**(17): 3481-3500.

Hurley, J. H. and H. Stenmark (2011). "Molecular mechanisms of ubiquitin-dependent membrane traffic." Annu Rev Biophys **40**: 119-142.

Im, Y. J., T. Wollert, E. Boura and J. H. Hurley (2009). "Structure and function of the ESCRT-II-III interface in multivesicular body biogenesis." Dev Cell **17**(2): 234-243.

Irvine, K. D. (1999). "Fringe, Notch, and making developmental boundaries." Current Opinion in Genetics & Development **9**(4): 434-441.

Irvine, K. D. and C. Rauskolb (2001). "Boundaries in development: Formation and function." Annual Review of Cell and Developmental Biology **17**: 189-214.

Irvine, K. D. and E. Wieschaus (1994). "FRINGE, A BOUNDARY-SPECIFIC SIGNALING MOLECULE, MEDIATES INTERACTIONS BETWEEN DORSAL AND VENTRAL CELLS DURING DROSOPHILA WING DEVELOPMENT." Cell **79**(4): 595-606.

Jack, J. and Y. DeLotto (1995). "Structure and regulation of a complex locus: the cut gene of Drosophila." Genetics **139**(4): 1689-1700.

Jäckel, S. (2010). Identifizierung eines Interaktionspartners von Lethal (2) giant discs (Lgd) in Drosophila melanogaster und konditionale Inaktivierung der lgd-Orthologen in der Maus. Dissertation, Universität zu Köln.

Jaekel, R. (2006). Regulation des Notch-Signalweges durch Lethal (2) giant discs (Lgd) und durch die Notch-Liganden. Dissertation, Universität zu Köln.

Jaekel, R. and T. Klein (2006). "The Drosophila notch inhibitor and tumor suppressor gene lethal (2) giant discs encodes a conserved regulator of endosomal trafficking." Developmental Cell **11**(5): 655-669.

Jekely, G. and P. Rorth (2003). "Hrs mediates downregulation of multiple signalling receptors in Drosophila." EMBO Rep **4**(12): 1163-1168.

Ju, B. G., S. Jeong, E. Bae, S. Hyun, S. B. Carroll, J. Yim and J. Kim (2000). "Fringe forms a complex with Notch." Nature **405**(6783): 191-195.

Katzmann, D. J., M. Babst and S. D. Emr (2001). "Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-I." Cell **106**(2): 145-155.

Katzmann, D. J., C. J. Stefan, M. Babst and S. D. Emr (2003). "Vps27 recruits ESCRT machinery to endosomes during MVB sorting." Journal of Cell Biology **162**(3): 413-423.

Kidd, S. and T. Lieber (2002). "Furin cleavage is not a requirement for Drosophila Notch function." Mechanisms of Development **115**(1-2): 41-51.

Kidd, S., T. Lieber and M. W. Young (1998). "Ligand-induced cleavage and regulation of nuclear entry of Notch in Drosophila melanogaster embryos." Genes & Development **12**(23): 3728-3740.

Kim, J., K. D. Irvine and S. B. Carroll (1995). "CELL RECOGNITION, SIGNAL INDUCTION, AND SYMMETRICAL GENE ACTIVATION AT THE DORSAL-VENTRAL BOUNDARY OF THE DEVELOPING DROSOPHILA WING." Cell **82**(5): 795-802.

Kim, J., J. Magee and S. B. Carroll (1997). "Intercompartmental signaling and the regulation of vestigial expression at the dorsoventral boundary of the developing Drosophila wing." Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology **62**: 283-291.

Klein, T. (2001). "Wing disc development in the fly: the early stages." Current Opinion in Genetics & Development **11**(4): 470-475.

Klein, T. (2002). "kuzbanian is required cell autonomously during Notch signalling in the Drosophila wing." Dev Genes Evol **212**(5): 251-255.

Klein, T. (2003). "The tumour suppressor gene *l(2)giant discs* is required to restrict the activity of Notch to the dorsoventral boundary during Drosophila wing development." Developmental Biology **255**(2): 313-333.

Klein, T. (2008). Immunolabeling of Imaginal Discs. Drosophila. C. Dahmann, Humana Press. **420**: 253-263.

Klein, T. and A. M. Arias (1998a). "Different spatial and temporal interactions between Notch, wingless, and vestigial specify proximal and distal pattern elements of the wing in Drosophila." Developmental Biology **194**(2): 196-212.

Klein, T. and A. M. Arias (1998b). "Interactions among Delta, Serrate and Fringe modulate Notch activity during Drosophila wing development." Development **125**(15): 2951-2962.

Klein, T. and A. M. Arias (1999). "The Vestigial gene product provides a molecular context for the interpretation of signals during the development of the wing in Drosophila." Development **126**(5): 913-925.

Klein, T., K. Brennan and A. M. Arias (1997). "An intrinsic dominant negative activity of serrate that is modulated during wing development in Drosophila." Developmental Biology **189**(1): 123-134.

Koch, U. and F. Radtke (2010). NOTCH SIGNALING IN SOLID TUMORS. Notch Signaling. R. Kopan. **92**: 411-455.

Koelzer, S. and T. Klein (2003). "A Notch-independent function of Suppressor of Hairless during the development of the bristle sensory organ precursor cell of *Drosophila*." Development **130**(9): 1973-1988.

Koelzer, S. and T. Klein (2006). "Regulation of expression of Vg and establishment of the dorsoventral compartment boundary in the wing imaginal disc by Suppressor of Hairless." Developmental Biology **289**(1): 77-90.

Kolsch, V., T. Seher, G. J. Fernandez-Ballester, L. Serrano and M. Leptin (2007). "Control of *Drosophila* gastrulation by apical localization of adherens junctions and RhoGEF2." Science **315**(5810): 384-386.

Kooh, P. J., R. G. Fehon and M. A. Muskavitch (1993). "Implications of dynamic patterns of Delta and Notch expression for cellular interactions during *Drosophila* development." Development **117**(2): 493-507.

Kopan, R. and M. X. Ilagan (2009). "The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism." Cell **137**(2): 216-233.

Kostelansky, M. S., J. Sun, S. H. Lee, J. Kim, R. Ghirlando, A. Hierro, S. D. Emr and J. H. Hurley (2006). "Structural and functional organization of the ESCRT-I trafficking complex." Cell **125**(1): 113-126.

Lai, E. C., F. Roegiers, X. L. Qin, Y. N. Jan and G. M. Rubin (2005). "The ubiquitin ligase *Drosophila* Mind bomb promotes Notch signaling by regulating the localization and activity of Serrate and Delta." Development **132**(10): 2319-2332.

Lawrence, P. A. (1973). "Maintenance of boundaries between developing organs in insects." Nat New Biol **242**(114): 31-32.

Le Borgne, R., S. Remaud, S. Hamel and F. Schweisguth (2005). "Two distinct E3 ubiquitin ligases have complementary functions in the regulation of Delta and Serrate signaling in *Drosophila*." Plos Biology **3**(4): 688-696.

Lecourtois, M. and F. Schweisguth (1998). "Indirect evidence for Delta-dependent intracellular processing of notch in *Drosophila* embryos." Current Biology **8**(13): 771-774.

Lee, T. and L. Luo (1999). "Mosaic analysis with a repressible neurotechnique cell marker for studies of gene function in neuronal morphogenesis." Neuron **22**(3): 451-461.

Lee, Y. S., K. Nakahara, J. W. Pham, K. Kim, Z. Y. He, E. J. Sontheimer and R. W. Carthew (2004). "Distinct roles for *Drosophila* Dicer-1 and Dicer-2 in the siRNA/miRNA silencing pathways." Cell **117**(1): 69-81.

Lei, L., A. G. Xu, V. M. Panin and K. D. Irvine (2003). "An O-fucose site in the ligand binding domain inhibits Notch activation." Development **130**(26): 6411-6421.

Lieber, T., S. Kidd and M. W. Young (2002). "kuzbanian-mediated cleavage of Drosophila Notch." Genes Dev **16**(2): 209-221.

Lindsley, D. L. and G. G. Zimm (1992). The Genome of Drosophila melanogaster.

Lloyd, T. E., R. Atkinson, M. N. Wu, Y. Zhou, G. Pennetta and H. J. Bellen (2002). "Hrs regulates endosome membrane invagination and tyrosine kinase receptor signaling in Drosophila." Cell **108**(2): 261-269.

Loewer, A., P. Soba, K. Beyreuther, R. Paro and G. Merdes (2004). "Cell-type-specific processing of the amyloid precursor protein by Presenilin during Drosophila development." EMBO Rep **5**(4): 405-411.

Logeat, F., C. Bessia, C. Brou, O. LeBail, S. Jarriault, N. G. Seidah and A. Israël (1998). "The Notch1 receptor is cleaved constitutively by a furin-like convertase." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(14): 8108-8112.

Lu, H. and D. Bilder (2005). "Endocytic control of epithelial polarity and proliferation in Drosophila." Nature Cell Biology **7**(12): 1232-1239.

Lu, Q., L. W. Hope, M. Brasch, C. Reinhard and S. N. Cohen (2003). "TSG101 interaction with HRS mediates endosomal trafficking and receptor down-regulation." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(13): 7626-7631.

Maniatis, T., E. Fritsch and J. Sambrook (1982). Molecular Cloning: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.

Marois, E., A. Mahmoud and S. Eaton (2006). "The endocytic pathway and formation of the Wingless morphogen gradient." Development **133**(2): 307-317.

Marshansky, V. and M. Futai (2008). "The V-type H<sup>+</sup>-ATPase in vesicular trafficking: targeting, regulation and function." Curr Opin Cell Biol **20**(4): 415-426.

Martinelli, N., B. Hartlieb, Y. Usami, C. Sabin, A. Dordor, N. Miguet, S. V. Avilov, E. A. Ribeiro, Jr., H. Gottlinger and W. Weissenhorn (2012). "CC2D1A is a regulator of ESCRT-III CHMP4B." J Mol Biol **419**(1-2): 75-88.

Maxfield, F. R. and T. E. McGraw (2004). "Endocytic recycling." Nat Rev Mol Cell Biol **5**(2): 121-132.

Maxfield, F. R. and D. J. Yamashiro (1987). "Endosome acidification and the pathways of receptor-mediated endocytosis." Adv Exp Med Biol **225**: 189-198.

McGuire, S. E., P. T. Le, A. J. Osborn, K. Matsumoto and R. L. Davis (2003). "Spatiotemporal rescue of memory dysfunction in *Drosophila*." Science **302**(5651): 1765-1768.

Micchelli, C. A. and S. S. Blair (1999). "Dorsoventral lineage restriction in wing imaginal discs requires Notch." Nature **401**(6752): 473-476.

Micchelli, C. A., E. J. Rulifson and S. S. Blair (1997). "The function and regulation of cut expression on the wing margin of *Drosophila*: Notch, Wingless and a dominant negative role for Delta and Serrate." Development **124**(8): 1485-1495.

Michelet, X., A. Djeddi and R. Legouis (2010). "Developmental and cellular functions of the ESCRT machinery in pluricellular organisms." Biol Cell **102**(3): 191-202.

Moberg, K. H., S. Schelble, S. K. Burdick and I. K. Hariharan (2005). "Mutations in *erupted*, the *Drosophila* ortholog of mammalian tumor susceptibility gene 101, elicit non-cell-autonomous overgrowth." Developmental Cell **9**(5): 699-710.

Moloney, D. J., V. M. Panin, S. H. Johnston, J. H. Chen, L. Shao, R. Wilson, Y. Wang, P. Stanley, K. D. Irvine, R. S. Haltiwanger and T. F. Vogt (2000). "Fringe is a glycosyltransferase that modifies Notch." Nature **406**(6794): 369-375.

Morel, V. and F. Schweisguth (2000). "Repression by suppressor of hairless and activation by Notch are required to define a single row of single-minded expressing cells in the *Drosophila* embryo." Genes Dev **14**(3): 377-388.

Mukherjee, A., A. Veraksa, A. Bauer, C. Rosse, J. Camonis and S. Artavanis-Tsakonas (2005). "Regulation of notch signalling by non-visual beta-arrestin." Nature Cell Biology **7**(12): 1191-1201.

Mumm, J. S., E. H. Schroeter, M. T. Saxena, A. Griesemer, X. L. Tian, D. J. Pan, W. J. Ray and R. Kopan (2000). "A ligand-induced extracellular cleavage regulates gamma-secretase-like proteolytic activation of Notch1." Molecular Cell **5**(2): 197-206.

Munro, S. and M. Freeman (2000). "The Notch signalling regulator Fringe acts in the Golgi apparatus and requires the glycosyltransferase signature motif DxD." Current Biology **10**(14): 813-820.

Musse, A. A., L. Meloty-Kapella and G. Weinmaster (2012). "Notch ligand endocytosis: Mechanistic basis of signaling activity." Seminars in Cell & Developmental Biology **23**(4): 429-436.

Muziol, T., E. Pineda-Molina, R. B. Ravelli, A. Zamborlini, Y. Usami, H. Gottlinger and W. Weissenhorn (2006). "Structural basis for budding by the ESCRT-III factor CHMP3." Developmental Cell **10**(6): 821-830.

Nakamura, A., H. Arai and N. Fujita (2009). "Centrosomal Aki1 and cohesin function in separase-regulated centriole disengagement." Journal of Cell Biology **187**(5): 607-614.

Nakamura, A., M. Naito, T. Tsuruo and N. Fujita (2008). "Freud-1/Aki1, a novel PDK1-interacting protein, functions as a scaffold to activate the PDK1/Akt pathway in epidermal growth factor signaling." Molecular and Cellular Biology **28**(19): 5996-6009.

Nalefski, E. A. and J. J. Falke (1996). "The C2 domain calcium-binding motif: Structural and functional diversity." Protein Science **5**(12): 2375-2390.

Nellen, D., R. Burke, G. Struhl and K. Basler (1996). "Direct and long-range action of a DPP morphogen gradient." Cell **85**(3): 357-368.

Neumann, C. J. and S. M. Cohen (1996). "A hierarchy of cross-regulation involving Notch, wingless, vestigial and cut organizes the dorsal/ventral axis of the Drosophila wing." Development **122**(11): 3477-3485.

Neumann, C. J. and S. M. Cohen (1997). "Long-range action of Wingless organizes the dorsal-ventral axis of the Drosophila wing." Development **124**(4): 871-880.

Nickerson, D. P., M. West and G. Odorizzi (2006). "Did2 coordinates Vps4-mediated dissociation of ESCRT-III from endosomes." J Cell Biol **175**(5): 715-720.

O'Donnell, K. H., C. T. Chen and P. C. Wensink (1994). "Insulating DNA directs ubiquitous transcription of the Drosophila melanogaster alpha1-tubulin gene." Molecular and Cellular Biology **14**(9): 6398-6408.

Obita, T., S. Saksena, S. Ghazi-Tabatabai, D. J. Gill, O. Perisic, S. D. Emr and R. L. Williams (2007). "Structural basis for selective recognition of ESCRT-III by the AAA ATPase Vps4." Nature **449**(7163): 735-739.

Odorizzi, G., M. Babst and S. D. Emr (1998). "Fab1p PtdIns(3)P 5-kinase function essential for protein sorting in the multivesicular body." Cell **95**(6): 847-858.

Oh, S. W., T. Kingsley, H. Shin, Z. Y. Zheng, H. W. Chen, X. Chen, H. Wang, P. Z. Ruan, M. Moody and S. X. Hou (2003). "A P-element insertion screen identified mutations in 455 novel essential genes in Drosophila." Genetics **163**(1): 195-201.

Ohlenhard, N. (2011). „Determination des strukturellen Bindemotivs von Mindbomb1 in den intrazellulären Domänen von DSL-Liganden.“ Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Ou, X. M., S. Lemonde, H. Jafar-Nejad, C. D. Bown, A. Goto, A. Rogaeva and P. R. Albert (2003). "Freud-1: A neuronal calcium-regulated repressor of the 5-HT1A receptor gene." Journal of Neuroscience **23**(19): 7415-7425.

Panin, V. M., V. Papayannopoulos, R. Wilson and K. D. Irvine (1997). "Fringe modulates notch ligand interactions." Nature **387**(6636): 908-912.

Parks, A. L., K. M. Klueg, J. R. Stout and M. Muskavitch (2000). "Ligand endocytosis drives receptor dissociation and activation in the Notch pathway." Development **127**(7): 1373-1385.

Pasternak, S. H., R. D. Bagshaw, M. Guiral, S. Zhang, C. A. Ackerley, B. J. Pak, J. W. Callahan and D. J. Mahuran (2003). "Presenilin-1, nicastrin, amyloid precursor protein, and gamma-secretase activity are co-localized in the lysosomal membrane." J Biol Chem **278**(29): 26687-26694.

Piddini, E., F. Marshall, L. Dubois, E. Hirst and J. P. Vincent (2005). "Arrow (LRP6) and Frizzled2 cooperate to degrade Wingless in Drosophila imaginal discs." Development **132**(24): 5479-5489.

Polo, S. and P. P. Di Fiore (2006). "Endocytosis conducts the cell signaling orchestra." Cell **124**(5): 897-900.

Polo, S., S. Sigismund, M. Faretta, M. Guidi, M. R. Capua, G. Bossi, H. Chen, P. De Camilli and P. P. Di Fiore (2002). "A single motif responsible for ubiquitin recognition and monoubiquitination in endocytic proteins." Nature **416**(6879): 451-455.

Ponting, C. P., R. Mott, P. Bork and R. R. Copley (2001). "Novel protein domains and repeats in Drosophila melanogaster: Insights into structure, function, and evolution." Genome Research **11**(12): 1996-2008.

Poteryaev, D., S. Datta, K. Ackema, M. Zerial and A. Spang (2010). "Identification of the switch in early-to-late endosome transition." Cell **141**(3): 497-508.

Prag, G., H. Watson, Y. C. Kim, B. M. Beach, R. Ghirlando, G. Hummer, J. S. Bonifacino and J. H. Hurley (2007). "The Vps27/Hse1 complex is a GAT domain-based scaffold for ubiquitin-dependent sorting." Developmental Cell **12**(6): 973-986.

Pulipparacharuvil, S., M. A. Akbar, S. Ray, E. A. Sevrioukov, A. S. Haberman, J. Rohrer and H. Kramer (2005). "Drosophila Vps16A is required for trafficking to lysosomes and biogenesis of pigment granules." J Cell Sci **118**(Pt 16): 3663-3673.

Raiborg, C., K. G. Bache, D. J. Gillooly, I. H. Madshush, E. Stang and H. Stenmark (2002). "Hrs sorts ubiquitinated proteins into clathrin-coated microdomains of early endosomes." Nature Cell Biology **4**(5): 394-398.

Raiborg, C., B. Bremnes, A. Mehlum, D. J. Gillooly, A. D'Arrigo, E. Stang and H. Stenmark (2001). "FYVE and coiled-coil domains determine the specific localisation of Hrs to early endosomes." Journal of Cell Science **114**(12): 2255-2263.

Raiborg, C. and H. Stenmark (2009). "The ESCRT machinery in endosomal sorting of ubiquitylated membrane proteins." Nature **458**(7237): 445-452.

Rand, M. D., L. M. Grimm, S. Artavanis-Tsakonas, V. Patriub, S. C. Blacklow, J. Sklar and J. C. Aster (2000). "Calcium depletion dissociates and activates heterodimeric notch receptors." Mol Cell Biol **20**(5): 1825-1835.

Rauskolb, C., T. Correla and K. D. Irvine (1999). "Fringe-dependent separation of dorsal and ventral cells in the Drosophila wing." Nature **401**(6752): 476-480.

Reggiori, F. and H. R. Pelham (2001). "Sorting of proteins into multivesicular bodies: ubiquitin-dependent and -independent targeting." EMBO J **20**(18): 5176-5186.

Ren, X. and J. H. Hurley (2010). "VHS domains of ESCRT-0 cooperate in high-avidity binding to polyubiquitinated cargo." Embo Journal **29**(6): 1045-1054.

Rink, J., E. Ghigo, Y. Kalaidzidis and M. Zerial (2005). "Rab conversion as a mechanism of progression from early to late endosomes." Cell **122**(5): 735-749.

Roberts, D. B. (1986). Drosophila: a practical approach, IRL press.

Rodahl, L. M., K. Haglund, C. Sem-Jacobsen, F. Wendler, J. P. Vincent, K. Lindmo, T. E. Rusten and H. Stenmark (2009). "Disruption of Vps4 and JNK function in Drosophila causes tumour growth." PLoS One **4**(2): e4354.

Rohrer, J., A. Schweizer, D. Russell and S. Kornfeld (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**(4): 565-576.

Rooke, J., D. Pan, T. Xu and G. M. Rubin (1996). "KUZ, a conserved metalloprotease-disintegrin protein with two roles in Drosophila neurogenesis." Science **273**(5279): 1227-1231.

Rubin, G. M. and A. C. Spradling (1982). "Genetic transformation of Drosophila with transposable element vectors." Science **218**(4570): 348-353.

Rue, S. M., S. Mattei, S. Saksena and S. D. Emr (2008). "Novel Ist1-Did2 complex functions at a late step in multivesicular body sorting." Molecular Biology of the Cell **19**(2): 475-484.

Russell, M. R., T. Shideler, D. P. Nickerson, M. West and G. Odorizzi (2012). "Class E compartments form in response to ESCRT dysfunction in yeast due to hyperactivity of the Vps21 Rab GTPase." J Cell Sci **125**(Pt 21): 5208-5220.

Saj, A., Z. Arziman, D. Stempfle, W. van Belle, U. Sauder, T. Horn, M. Durrenberger, R. Paro, M. Boutros and G. Merdes (2010). "A combined ex vivo and in vivo RNAi screen for notch regulators in *Drosophila* reveals an extensive notch interaction network." Dev Cell **18**(5): 862-876.

Sakamoto, K., O. Ohara, M. Takagi, S. i. Takeda and K.-i. Katsube (2002). "Intracellular Cell-Autonomous Association of Notch and Its Ligands: A Novel Mechanism of Notch Signal Modification." Developmental Biology **241**(2): 313-326.

Saksena, S. and S. D. Emr (2009). "ESCRTs and human disease." Biochemical Society Transactions **37**: 167-172.

Saksena, S., J. Wahlman, D. Teis, A. E. Johnson and S. D. Emr (2009). "Functional Reconstitution of ESCRT-III Assembly and Disassembly." Cell **136**(1): 97-109.

Sanchez-Irizarry, C., A. C. Carpenter, A. P. Weng, W. S. Pear, J. C. Aster and S. C. Blacklow (2004). "Notch subunit heterodimerization and prevention of ligand-independent proteolytic activation depend, respectively, on a novel domain and the LNR repeats." Mol Cell Biol **24**(21): 9265-9273.

Sanders, P. G., S. Munoz-Descalzo, T. Balayo, F. Wirtz-Peitz, P. Hayward and A. M. Arias (2009). "Ligand-independent traffic of Notch buffers activated Armadillo in *Drosophila*." PLoS Biol **7**(8): e1000169.

Schneider, M., T. Troost, F. Grawe, A. Martinez-Arias and T. Klein (2012). "Activation of Notch in *lgd* mutant cells requires the fusion of late endosomes with the lysosome." Journal of Cell Science.

Schneider, M. H. (2012). "Die Analyse der Funktion des Tumorsuppressors Lethal (2) giant discs (*Lgd*) während der Oogenese und die Analyse der Determination der sensorischen Vorläuferzellen im peripheren Nervensystem von *Drosophila melanogaster*." Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Schuh, M., C. F. Lehner and S. Heidmann (2007). "Incorporation of *Drosophila* CID/CENP-A and CENP-C into centromeres during early embryonic anaphase." Curr Biol **17**(3): 237-243.

Schweisguth, F. (2004). "Regulation of notch signaling activity." Current Biology **14**(3): R129-R138.

Scott, A., H. Y. Chung, M. Gonciarz-Swiatek, G. C. Hill, F. G. Whitby, J. Gaspar, J. M. Holton, R. Viswanathan, S. Ghaffarian, C. P. Hill and W. I. Sundquist (2005). "Structural and mechanistic studies of VPS4 proteins." Embo Journal **24**(20): 3658-3669.

Seto, E. S., H. J. Bellen and T. E. Lloyd (2002). "When cell biology meets development: endocytic regulation of signaling pathways." Genes Dev **16**(11): 1314-1336.

Seugnet, L., P. Simpson and M. Haenlin (1997). "Requirement for Dynamin during Notch Signaling in *Drosophila* Neurogenesis." Developmental biology **192**(2): 585-598.

Shestakova, A., A. Hanono, S. Drosner, M. Curtiss, B. A. Davies, D. J. Katzmann and M. Babst (2010). "Assembly of the AAA ATPase Vps4 on ESCRT-III." Molecular Biology of the Cell **21**(6): 1059-1071.

Shim, S., L. A. Kimpler and P. I. Hanson (2007). "Structure/function analysis of four core ESCRT-III proteins reveals common regulatory role for extreme C-terminal domain." Traffic **8**(8): 1068-1079.

Slagsvold, T., R. Aasland, S. Hirano, K. G. Bache, C. Raiborg, D. Trambaiolo, S. Wakatsuki and H. Stenmark (2005). "Eap45 in mammalian ESCRT-II binds ubiquitin via a phosphoinositide-interacting GLUE domain." Journal of Biological Chemistry **280**(20): 19600-19606.

Soldati, T. and M. Schliwa (2006). "Powering membrane traffic in endocytosis and recycling." Nat Rev Mol Cell Biol **7**(12): 897-908.

Sorkin, A. and M. von Zastrow (2009). "Endocytosis and signalling: intertwining molecular networks." Nat Rev Mol Cell Biol **10**(9): 609-622.

Sotillos, S., F. Roch and S. Campuzano (1997). "The metalloprotease-disintegrin Kuzbanian participates in Notch activation during growth and patterning of *Drosophila* imaginal discs." Development **124**(23): 4769-4779.

Speicher, S. A., U. Thomas, U. Hinz and E. Knust (1994). "THE SERRATE LOCUS OF *DROSOPHILA* AND ITS ROLE IN MORPHOGENESIS OF THE WING IMAGINAL DISKS - CONTROL OF CELL-PROLIFERATION." Development **120**(3): 535-544.

Stowers, R. S. and T. L. Schwarz (1999). "A genetic method for generating *Drosophila* eyes composed exclusively of mitotic clones of a single genotype." Genetics **152**(4): 1631-1639.

Strigini, M. and S. M. Cohen (2000). "Wingless gradient formation in the *Drosophila* wing." Current Biology **10**(6): 293-300.

Struhl, G. and A. Adachi (1998). "Nuclear access and action of notch in vivo." Cell **93**(4): 649-660.

Struhl, G. and I. Greenwald (1999). "Presenilin is required for activity and nuclear access of Notch in *Drosophila*." Nature **398**(6727): 522-525.

Stuchell-Brereton, M. D., J. J. Skalicky, C. Kieffer, M. A. Karren, S. Ghaffarian and W. I. Sundquist (2007). "ESCRT-III recognition by VPS4 ATPases." Nature **449**(7163): 740-744.

Sweeney, N. T., J. E. Brenman, Y. N. Jan and F. B. Gao (2006). "The coiled-coil protein Shrub controls neuronal morphogenesis in *Drosophila*." Current Biology **16**(10): 1006-1011.

Sweeney, S. T. and G. W. Davis (2002). "Unrestricted synaptic growth in spinster - A late endosomal protein implicated in TGF-beta-mediated synaptic growth regulation." Neuron **36**(3): 403-416.

Tanimoto, H., S. Itoh, P. ten Dijke and T. Tabata (2000). "Hedgehog creates a gradient of DPP activity in *Drosophila* wing imaginal discs." Molecular Cell **5**(1): 59-71.

Teis, D., S. Saksena and S. D. Emr (2008). "Ordered Assembly of the ESCRT-III Complex on Endosomes Is Required to Sequester Cargo during MVB Formation." Developmental Cell **15**(4): 578-589.

Teis, D., S. Saksena, B. L. Judson and S. D. Emr (2010). "ESCRT-II coordinates the assembly of ESCRT-III filaments for cargo sorting and multivesicular body vesicle formation." Embo Journal **29**(5): 871-883.

Teo, H., O. Perisic, B. Gonzalez and R. L. Williams (2004). "ESCRT-II, an endosome-associated complex required for protein sorting: Crystal structure and interactions with ESCRT-III and membranes." Developmental Cell **7**(4): 559-569.

Thompson, B. J., J. Mathieu, H. H. Sung, E. Loeser, P. Rorth and S. M. Cohen (2005). "Tumor suppressor properties of the ESCRT-II complex component vps25 in *Drosophila*." Developmental Cell **9**(5): 711-720.

Troost, T. (2007). "Struktur- Funktionsanalyse von Lethal(2)giant disks in *Drosophila*." Diplomarbeit, Universität zu Köln.

Troost, T., S. Jaeckel, N. Ohlenhard and T. Klein (2012). "The tumour suppressor Lethal (2) giant discs is required for the function of the ESCRT-III component Shrub/CHMP4." J Cell Sci **125**(Pt 3): 763-776.

Troost, T. and T. Klein (2012). "Sequential Notch Signalling at the Boundary of Fringe Expressing and Non-Expressing Cells." Plos One **7**(11).

Usami, Y., S. Popov, E. R. Weiss, C. Vriesema-Magnuson, A. Calistri and H. G. Gottlinger (2012). "Regulation of CHMP4/ESCRT-III function in human immunodeficiency virus type 1 budding by CC2D1A." J Virol **86**(7): 3746-3756.

Vaccari, T. and D. Bilder (2005). "The *Drosophila* tumor suppressor vps25 prevents nonautonomous overproliferation by regulating Notch trafficking." Developmental Cell **9**(5): 687-698.

Vaccari, T., H. Lu, R. Kanwar, M. E. Fortin and D. Bilder (2008). "Endosomal entry regulates Notch receptor activation in *Drosophila melanogaster*." Journal of Cell Biology **180**(4): 755-762.

Vaccari, T., T. E. Rusten, L. Menut, I. P. Nezis, A. Brech, H. Stenmark and D. Bilder (2009). "Comparative analysis of ESCRT-I, ESCRT-II and ESCRT-III function in *Drosophila* by efficient isolation of ESCRT mutants." Journal of Cell Science **122**(14): 2413-2423.

van Roessel, P. and A. H. Brand (2004). "Spreading silence with Sid." Genome Biol **5**(2): 208.

Vonderheit, A. and A. Helenius (2005). "Rab7 associates with early endosomes to mediate sorting and transport of Semliki forest virus to late endosomes." PLoS Biol **3**(7): e233.

Wang, T., Z. Ming, W. Xiaochun and W. Hong (2011). "Rab7: role of its protein interaction cascades in endo-lysosomal traffic." Cell Signal **23**(3): 516-521.

Wang, W. D. and G. Struhl (2005). "Distinct roles for Mind bomb, Neuralized and Epsin in mediating DSL endocytosis and signaling in *Drosophila*." Development **132**(12): 2883-2894.

Warrens, A. N., M. D. Jones and R. I. Lechler (1997). "Splicing by overlap extension by PCR using asymmetric amplification: an improved technique for the generation of hybrid proteins of immunological interest." Gene **186**(1): 29-35.

Wilder, E. L. and N. Perrimon (1995). "Dual Functions of Wingless in the *Drosophila* leg imaginal disc." Development **121**(2): 477-488.

Wilkin, M., P. Tongngok, N. Gensch, S. Clemence, M. Motoki, K. Yamada, K. Hori, M. Taniguchi-Kanai, E. Franklin, K. Matsuno and M. Baron (2008). "*Drosophila* HOPS and AP-3 complex genes are required for a Deltex-regulated activation of notch in the endosomal trafficking pathway." Dev Cell **15**(5): 762-772.

Wilkin, M. B., A. M. Carbery, M. Fostier, H. Aslam, S. L. Mazaleyrat, J. Higgs, A. Myat, D. A. Evans, M. Cornell and M. Baron (2004). "Regulation of notch endosomal sorting and signaling by *Drosophila* Nedd4 family proteins." Curr Biol **14**(24): 2237-2244.

Windler, S. L. and D. Bilder (2010). "Endocytic Internalization Routes Required for Delta/Notch Signaling." Current biology : CB **20**(6): 538-543.

Wu, J. S. and L. Luo (2006). "A protocol for mosaic analysis with a repressible cell marker (MARCM) in *Drosophila*." Nat Protoc **1**(6): 2583-2589.

Wucherpennig, T., M. Wilsch-Brauninger and M. Gonzalez-Gaitan (2003). "Role of Drosophila Rab5 during endosomal trafficking at the synapse and evoked neurotransmitter release." Journal of Cell Biology **161**(3): 609-624.

Xiao, J., X. W. Chen, B. A. Davies, A. R. Saltiel, D. J. Katzmann and Z. Xu (2009). "Structural basis of Ist1 function and Ist1-Did2 interaction in the multivesicular body pathway and cytokinesis." Mol Biol Cell **20**(15): 3514-3524.

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

Yamamoto, S., W. L. Charng and H. J. Bellen (2010). "Endocytosis and intracellular trafficking of Notch and its ligands." Curr Top Dev Biol **92**: 165-200.

Ye, Y., N. Lukinova and M. E. Fortini (1999). "Neurogenic phenotypes and altered Notch processing in Drosophila Presenilin mutants." Nature **398**(6727): 525-529.

Yeh, E., K. Gustafson and G. L. Boulianne (1995). "GREEN FLUORESCENT PROTEIN AS A VITAL MARKER AND REPORTER OF GENE-EXPRESSION IN DROSOPHILA." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(15): 7036-7040.

Yousefian, J. (2007). „Charakterisierung der *lethal (2) giant discs* Funktion mittels *lgd*RNAi und ultrastrukturelle Untersuchung des *lgd*-Phänotyps.“ Diplomarbeit, Universität zu Köln.

Zamborlini, A., Y. Usami, S. R. Radoshitzky, E. Popova, G. Palu and H. Gottlinger (2006). "Release of autoinhibition converts ESCRT-III components into potent inhibitors of HIV-1 budding." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(50): 19140-19145.

Zecca, M., K. Basler and G. Struhl (1996). "Direct and long-range action of a wingless morphogen gradient." Cell **87**(5): 833-844.

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

Zhang, M., L. Chen, S. Wang and T. Wang (2009). "Rab7: roles in membrane trafficking and disease." Biosci Rep **29**(3): 193-209.

Zhao, M., X.-D. Li and Z. Chen (2010). "CC2D1A, a DM14 and C2 Domain Protein, Activates NF-kappa B through the Canonical Pathway." Journal of Biological Chemistry **285**(32): 24372-24380.

7.Anhang

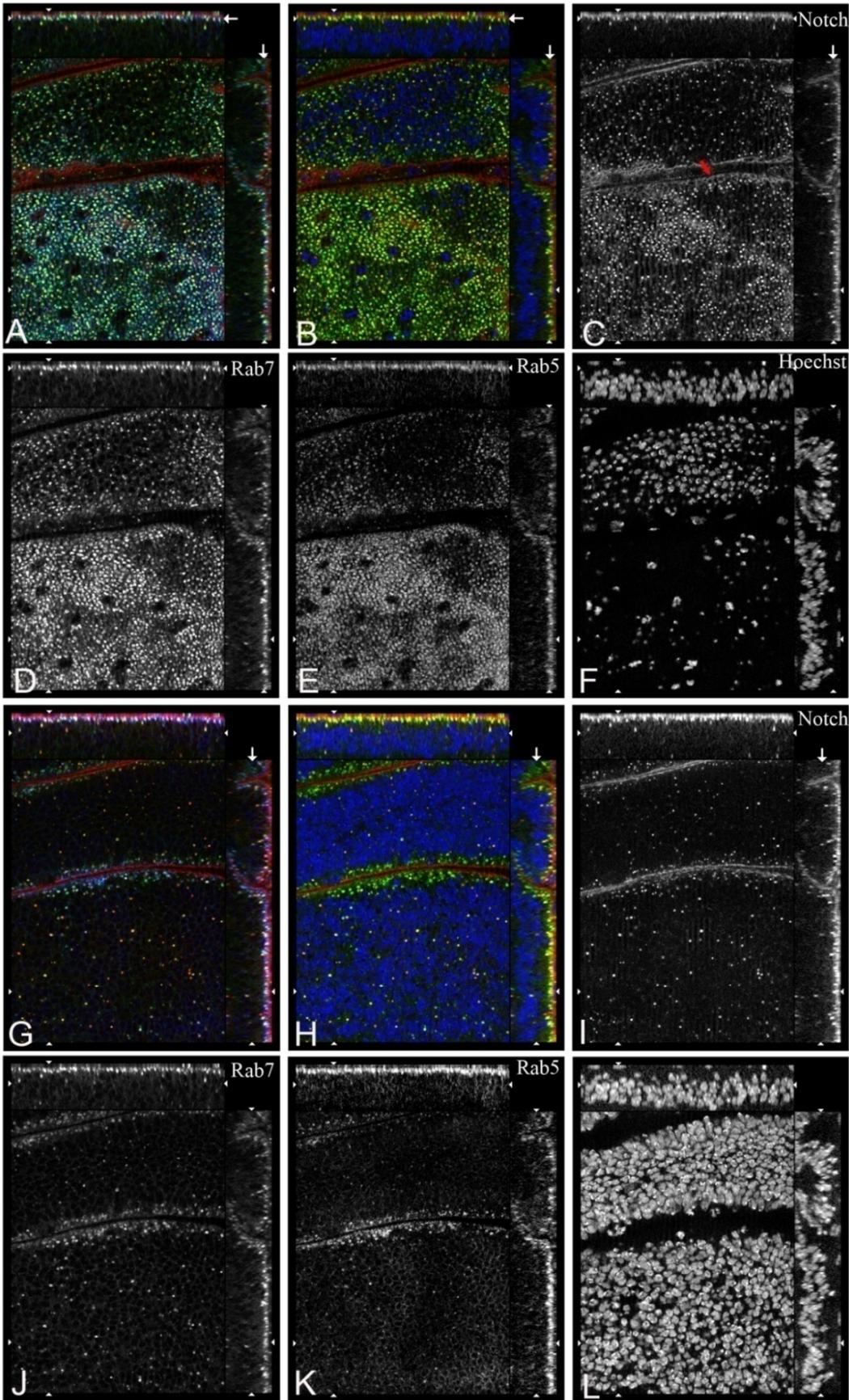
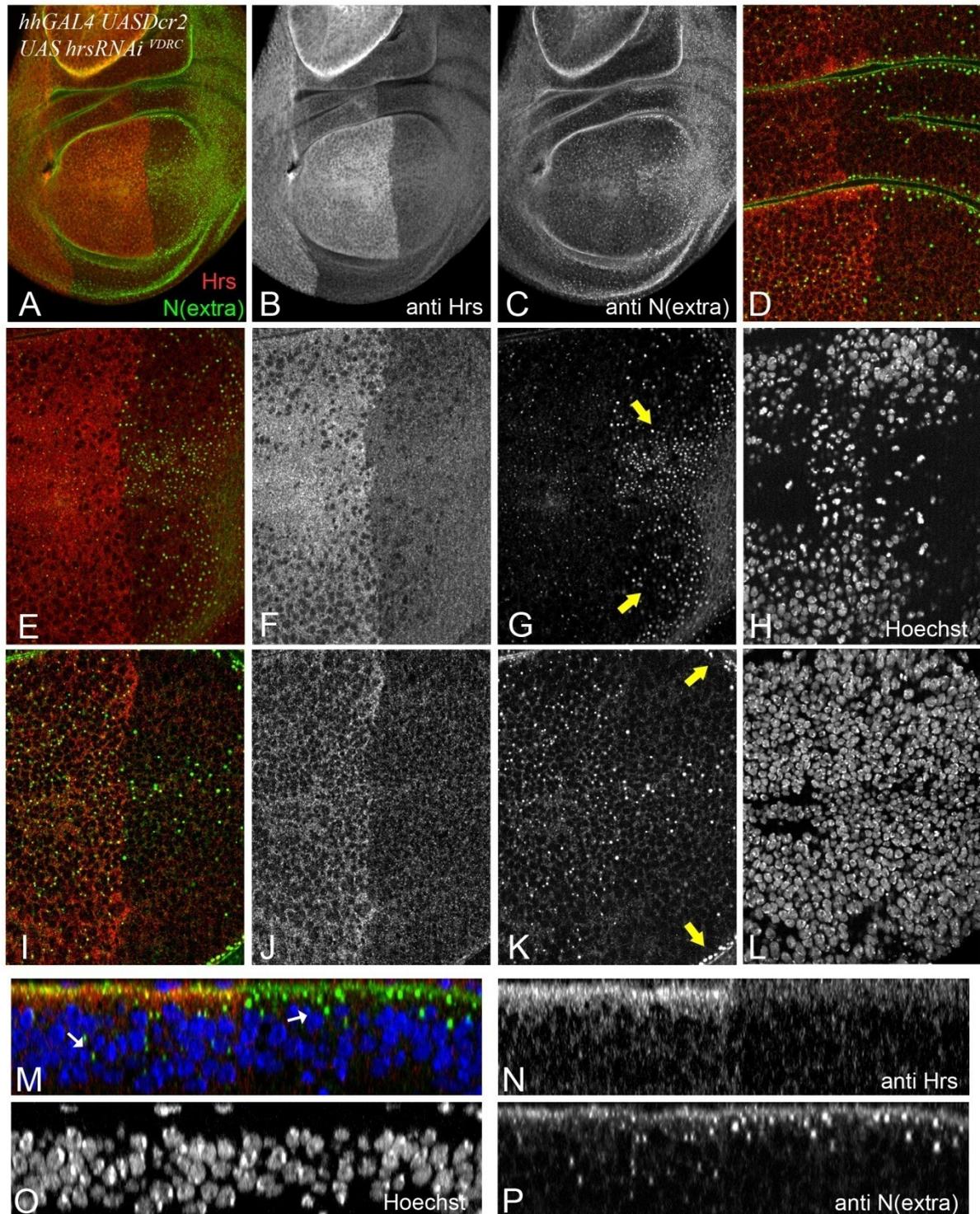


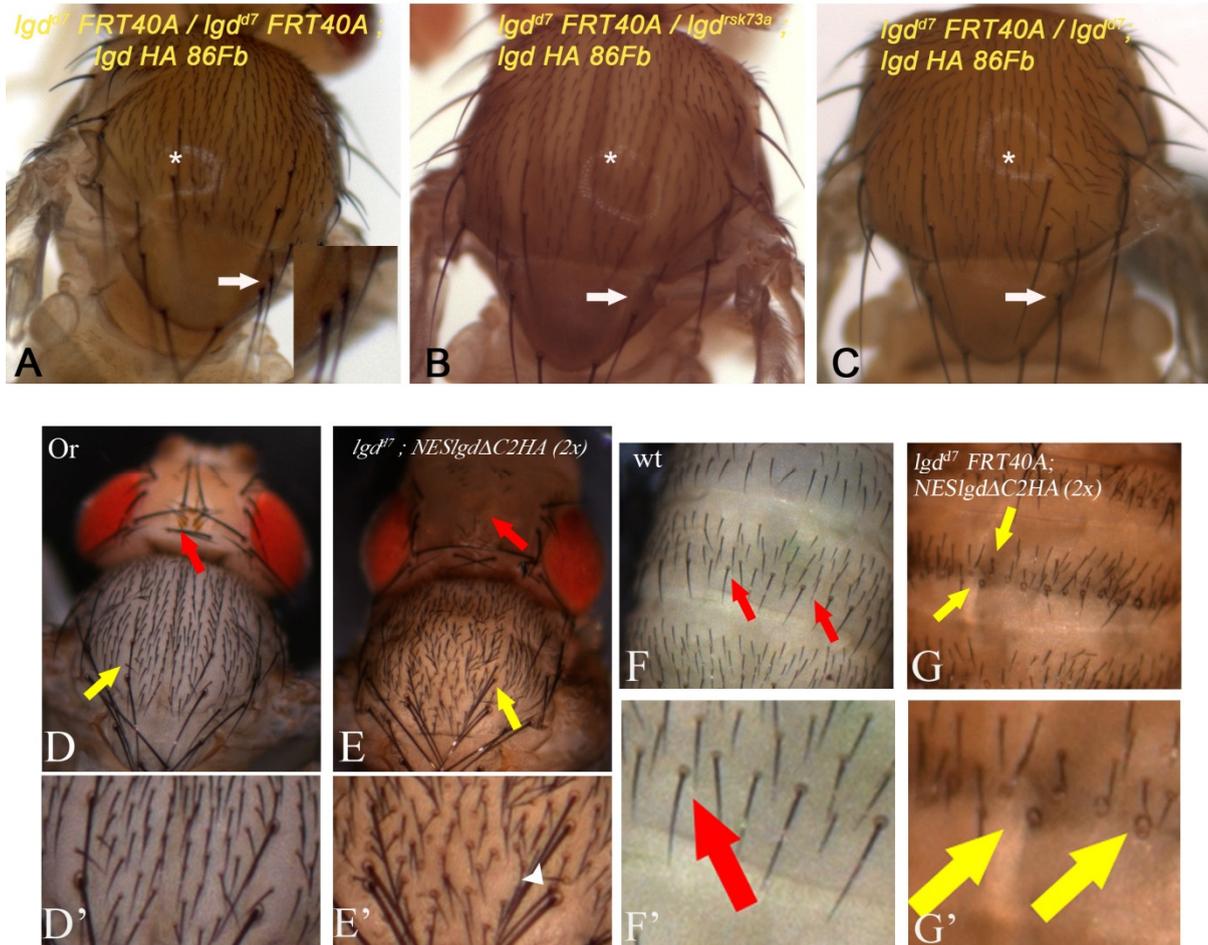
Abb. 7-1 Verteilung der endosomalen Marker Rab5, Rab7 und des Notchrezeptors. (A-F) Notch ist an der apikalen Plasmamembran und in Vesikeln zu finden, die mit den endosomalen Markern Rab5 und Rab7

assoziiert sind. Nahe der apikalen Membran finden sich viele Notch Endosomen, die mit den endosomalen Markern überlappen. (Weisse Pfeile markieren den optischen Schnitt in der Z-Achse.) (G-L) In tieferen optischen Schnitten sind die gegenüberliegenden apikalen Zellmembranen in den Falten sichtbar. Weiter entfernt von der apikalen Oberfläche sind die Vesikel mit Rab7 assoziiert. Rab5 ist kaum noch mit diesen Vesikeln assoziiert. (Z-Distanz, 0,5  $\mu\text{m}$ )

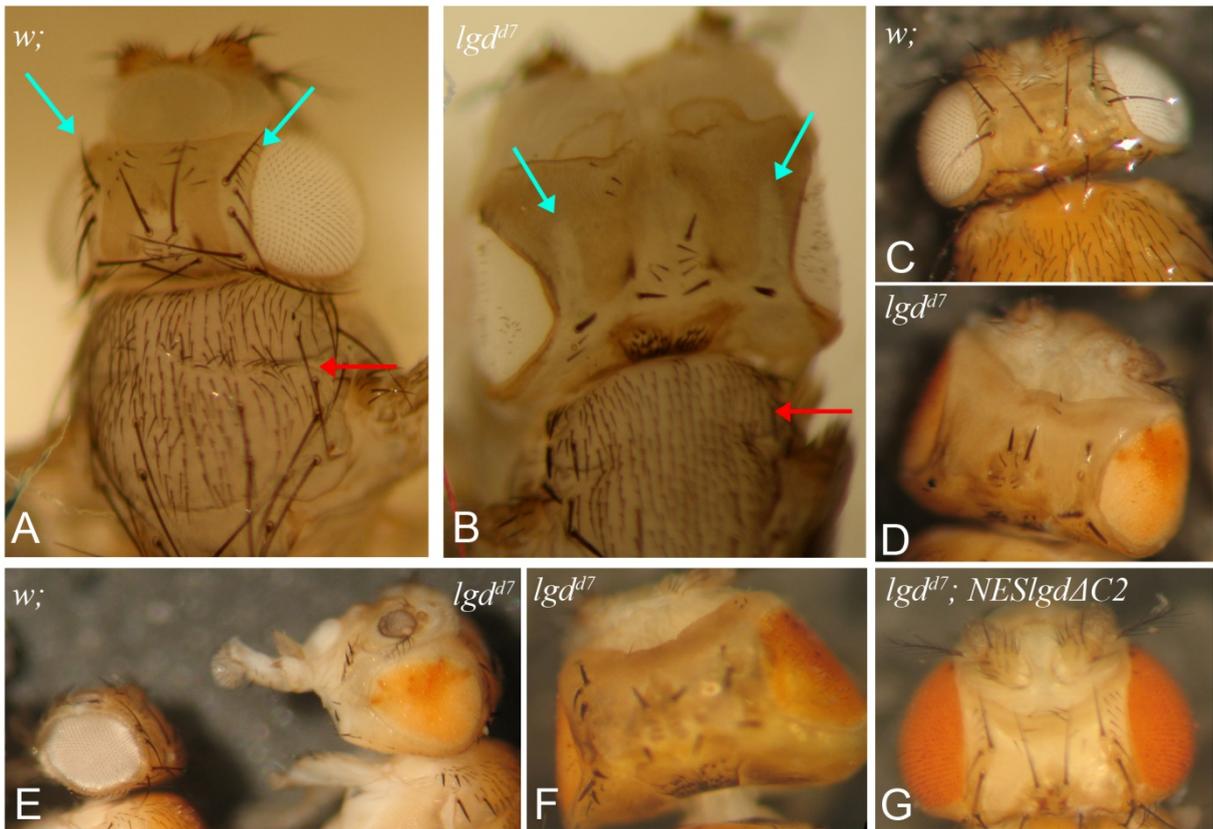


**Abb. 7-2 Unterdrückung der hrs Funktion durch RNAi.** Koexpression von UASDcr2 und UAShrs-RNAi mit hhGAL4 führen zur deutlichen Reduktion von Hrs im posterioren Kompartiment, wie die Hrs Antikörperfärbung zeigt (rot in A,E,I, bzw. B,F,J). Die Akkumulation des Notch Rezeptors ist verstärkt in Endosomen nahe der apikalen Membran sichtbar (Pfeile in G und K). Projektion der Z-Achse in M-P: Die Endosomen auf der posterioren Seite sind größer und treten verstärkt nahe der apikalen Membran (markiert durch Notch) auf. Notch-Endosomen auf der anterioren wildtypischen Seite befinden sich weiter entfernt von der Peripherie. Die

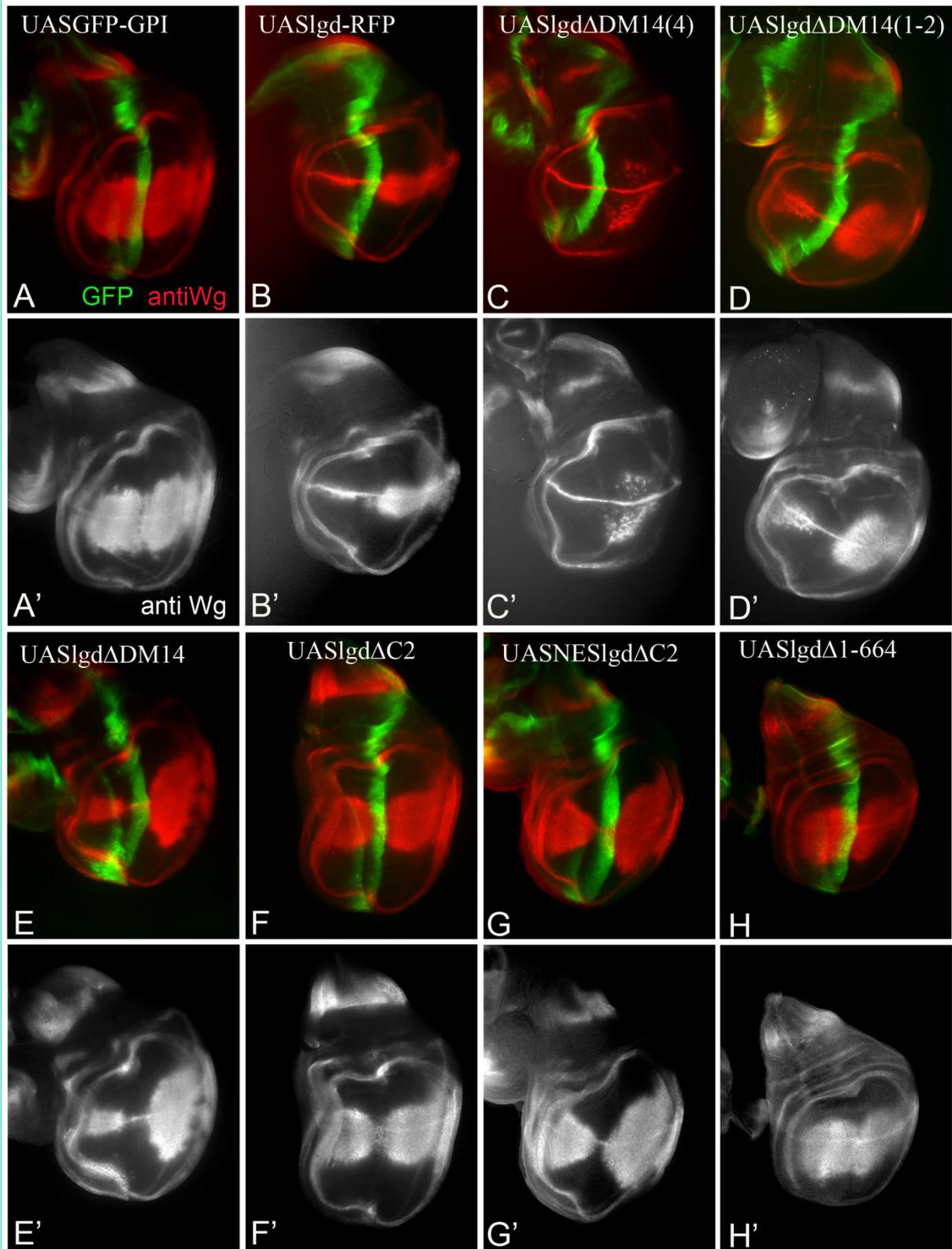
Notchfärbung an der apikalen Membran ist nicht beeinflusst. An der apikalen Seite wird die Reduktion der Hrs Färbung besonders deutlich. Oberhalb der apikalen Plasmamembran sind die Zellkerne in der Peripodialmembran durch die Hoechst 33258 Färbung sichtbar. (Expression bei 29°C)



**Abb. 7-3: Beobachtete Phänotypen bei Rettung des *Igd* mutanten Hintergrund mit *IgdP*-Konstrukten.** (A-C) Auftretende Borstenduplikationen im geretteten *Igd<sup>d7</sup> FRT40A* Hintergrund (Pfeil in A). Bei anderen *Igd* Kombinationen tritt dies nicht auf (B, C). \* Reflexion der Beleuchtung. Oregon Red (Or) Pharat Adult (D,F) und Pharat Adult *Igd<sup>d7</sup> FRT40A ; NESIgdΔC2 HA 86 Fb* (E,G). Bei den aufgefundenen geretteten Pharat Adults treten Borstenduplikationen am Notum und Borstenverlust am Kopf auf (Pfeile in E und E'). Am Abdomen sind duplizierte Sockel zu finden (G vgl. mit F)

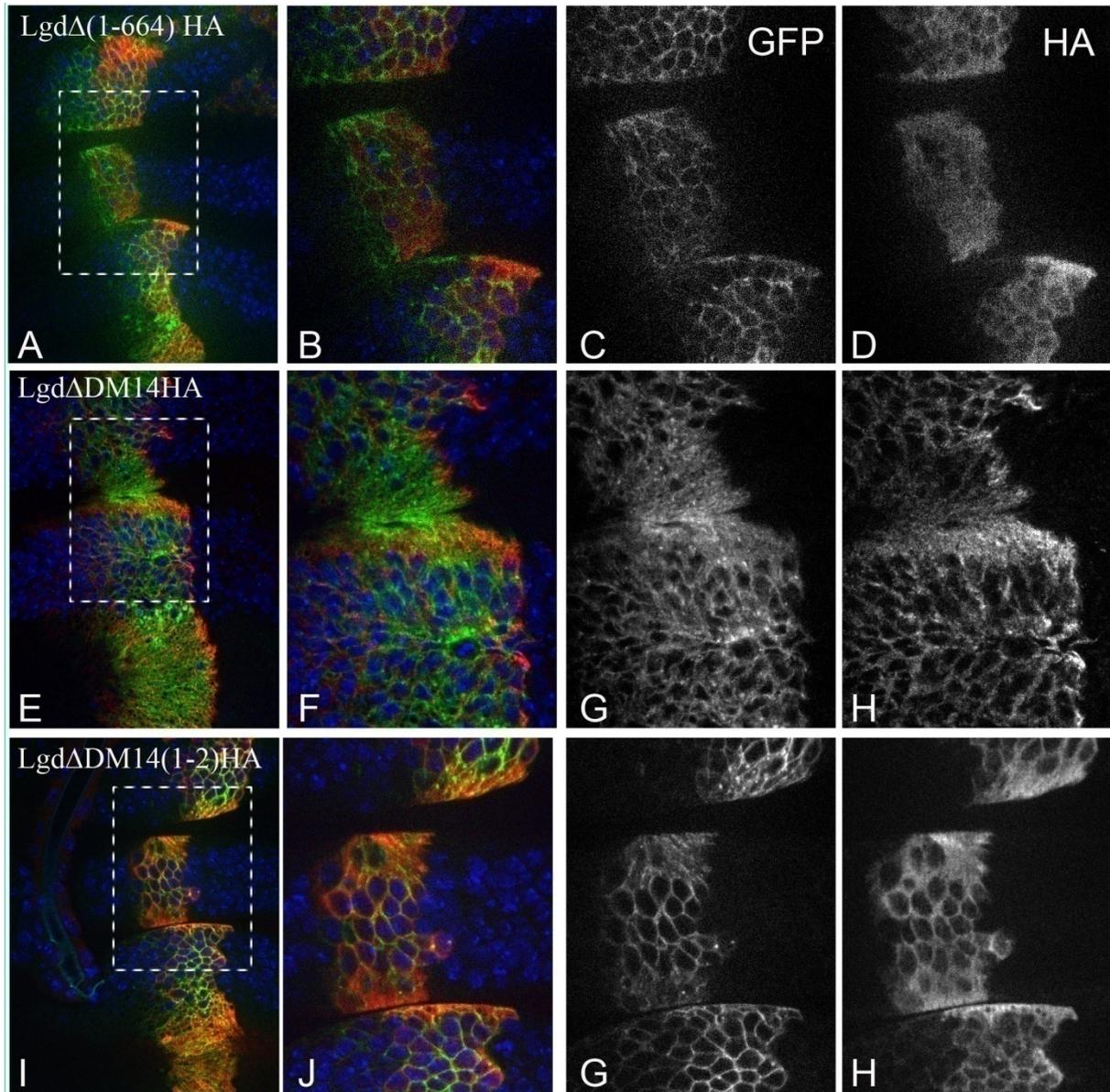


**Abb. 7-4: Differenzierung von *lgd* mutanten Zellen.** Wildtyp Fliegen (*w;*) und Fliegen mit *lgd* mutanter Kopfkapsel (A-F). Die mutanten Köpfe wurden mit Hilfe der EGUF/*hid* Technik generiert (Genotyp: *w; lgd<sup>d7</sup> FRT40A/ I(2)\* GMRhid FRT40A; MKRS / eyGAL4 UASFlp*). Die UAS-Flp vermittelte mitotische Rekombination in *eyeless* (*ey*) GAL4 exprimierenden Zellen induziert die *lgd<sup>d7</sup>* mutanten Klone. *I(2)\** ist eine unbekannte Mutation die zu Zellletalität führt und *hid* unter Kontrolle von GMR induziert Apoptose im differenzierenden Auge, wodurch nur die *lgd* mutanten Zellen überleben können (EGUF/*hid* Technik, (Stowers und Schwarz, 1999)) (A,B) Pharat Adults. C-F. Adulte. NESlgdΔC2HA unterdrückt die Phänotypen, aber die Köpfe erschienen etwas größer.



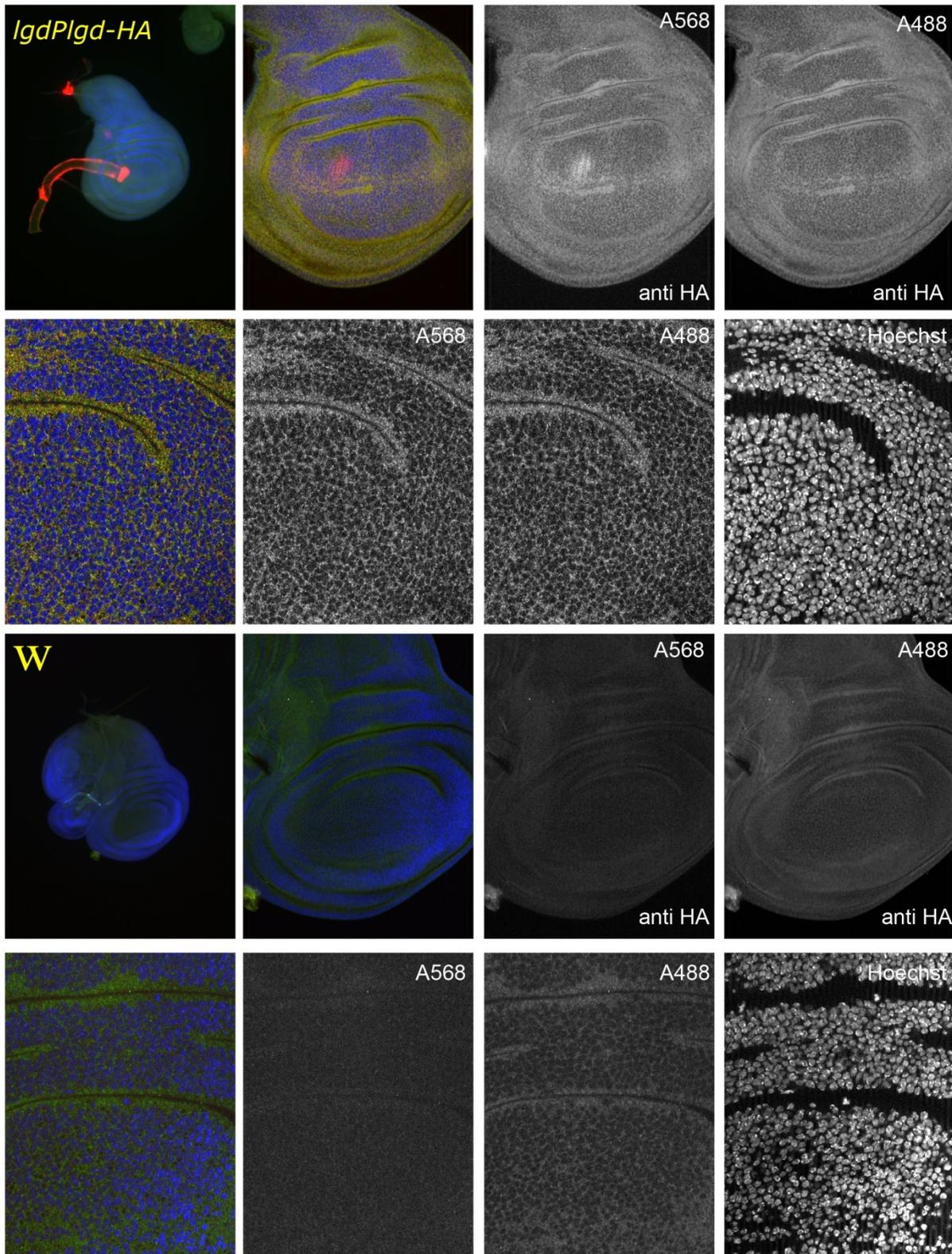
**Abb. 7-5 Rettungsexperimente mit UAS Lgd-Konstrukten.** (A-H) In der *ptc*GAL4 Expressionsdomäne, markiert durch UASGFP-GPI (A) zeigt sich bei Überexpression der Lgd Konstrukte (B-G) eine Unterdrückung der Wg Expression. Vollständige Varianten und die Deletionskonstrukte mit zwei oder mehr DM14 Domänen retten auch im anterioren Kompartiment auch außerhalb des sichtbaren Expressionsbereichs. Schwache GAL4 unabhängige Expression führte bei einigen Deletionskonstrukten auch zur Unterdrückung auf der posterioren Seite (Bsp. in C). Nur das Konstrukt LgdΔ1-664 (H) führt zu keiner Unterdrückung der ektopischen Aktivierung

des Notch-Signalwegs. (A'-H') Einzelkanäle der Wg Antikörperfärbung. (Genotyp: *w; lgd<sup>d7</sup>ptcGAL4/lgd<sup>d7</sup>; UASGFP GPI / UASLgd-Konstrukt*) (modifiziert aus Troost Diplomarbeit)

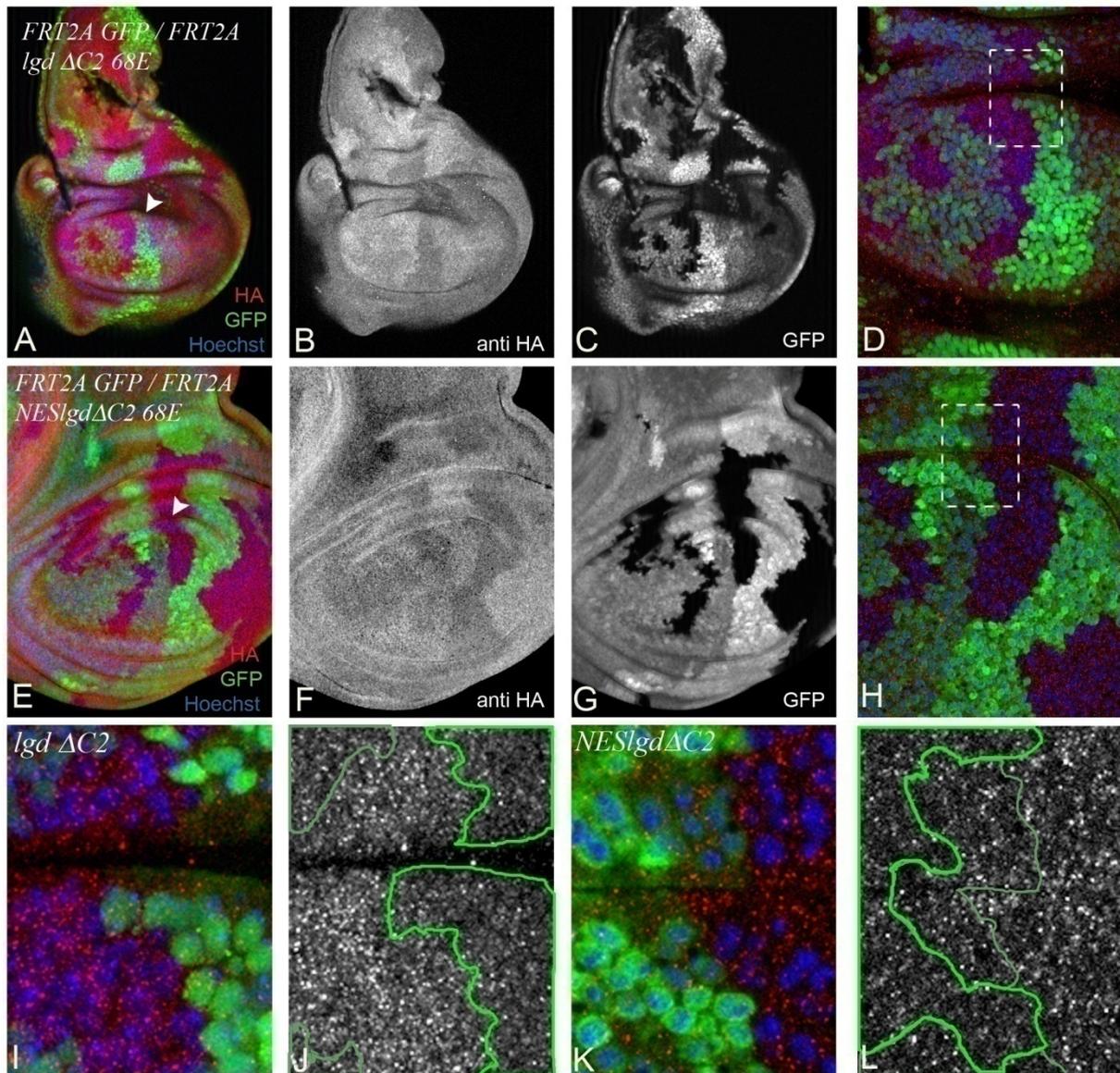


**Abb. 7-6 Lokalisation von UAS-Lgd Deletionskonstrukten.** Überexpression der UASLgd Konstrukte mit *ptcGAL4*. Koexpression von UAS-GFP GPI zur Färbung der äußeren Membran und Hoechstfärbung zur Visualisierung der Zellkerne. Die Lgd-Konstrukte lokalisieren hauptsächlich im Zytoplasma ohne spezifische Membranlokalisation zu zeigen. (anti HA in rot, GFP in grün, Hoechst 33258 in blau)

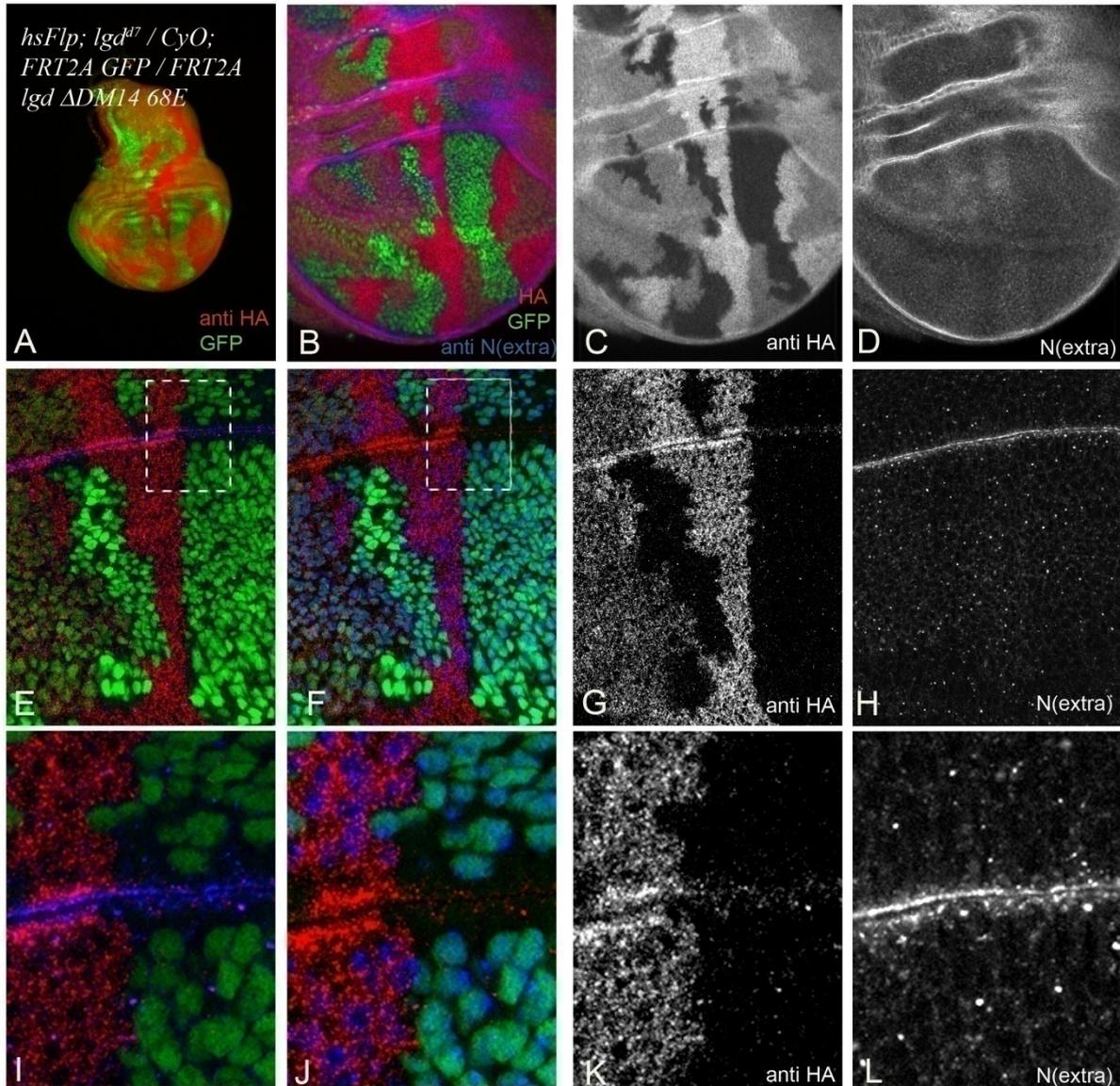
(Genotyp: *w; ptcGAL4/lf* oder *CyO<sup>wg-lacZ</sup>; UASGFP GPI / UASLgd-Konstrukt*)



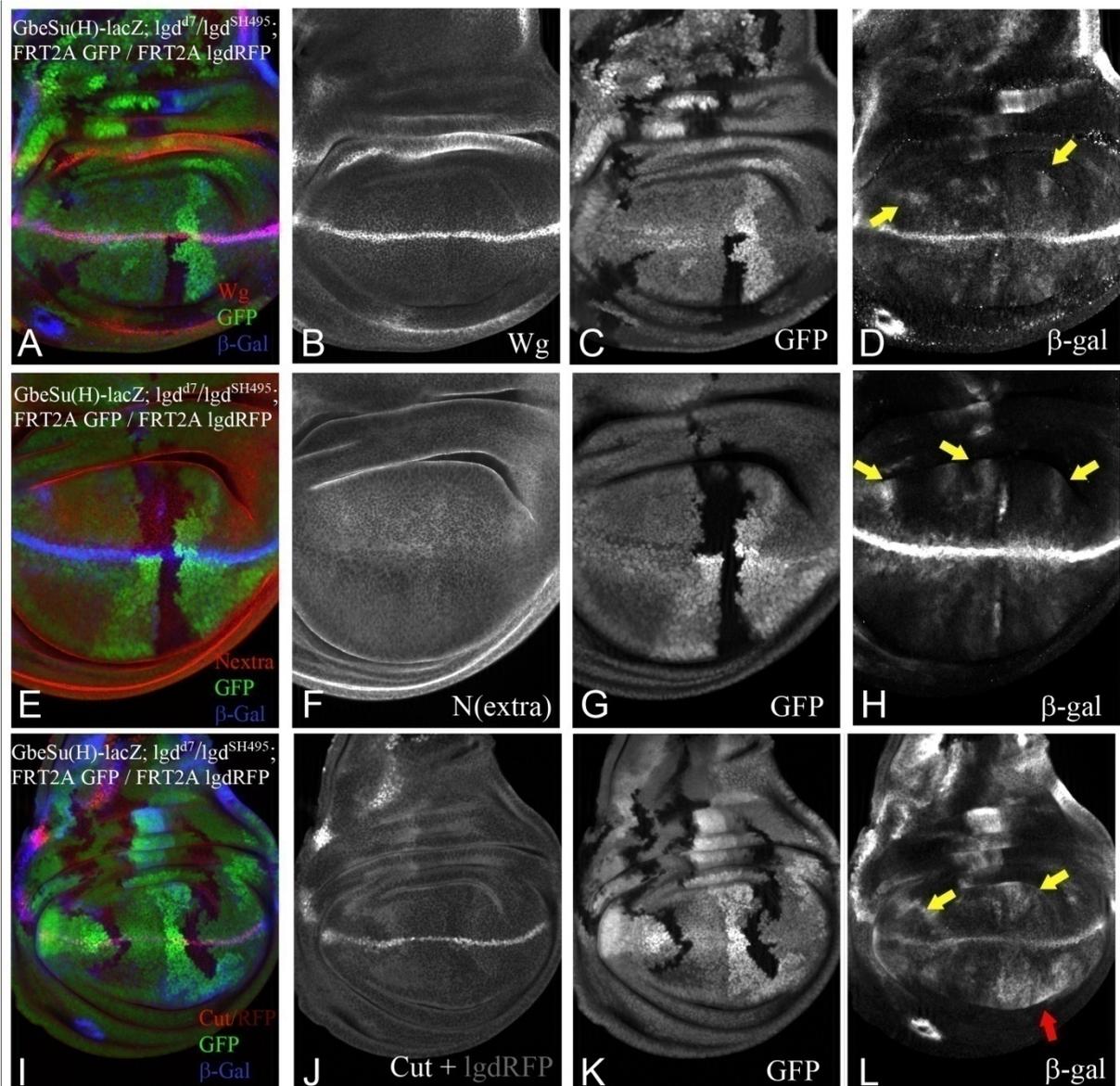
**Abb. 7-7 Lokalisation von Lgd-HA.** (A-H) Der Nachweis von LgdPlgdHA zeigt eine ubiquitäre, aber schwache Färbung und die Lokalisierung im Zytoplasma (*w*; *lgd<sup>d7</sup> FRT40A*; *lgdP.lgd-HA 86Fb*). Starke Fluoreszenz in der Übersicht in A (in rot) ist auf den Marker des Insertionsort ( $3 \times P3 >> mRFP$ ) zurückzuführen. In Wildtypscheiben (Genotyp: *w*;) zeigt eine Färbung aufgrund unspezifisch gebundener Antikörper annähernd das gleiche Bild, aber die Intensität der Färbung war im Vergleich zu LgdPlgdHA etwas schwächer. Die unspezifische Bindung des sekundären Alexa-568 gekoppelten Antikörpers erscheint gegenüber dem Alexa-488 gekoppelten Antikörper reduzierter. Bei der Beobachtung durch das Okular waren die Imaginalscheiben kaum zu unterscheiden. Auch im Falle der GFP oder RFP-Lgd Fusionsproteine ist die Fluoreszenz durch die schwache Expression von *lgdP* kaum wahrnehmbar.



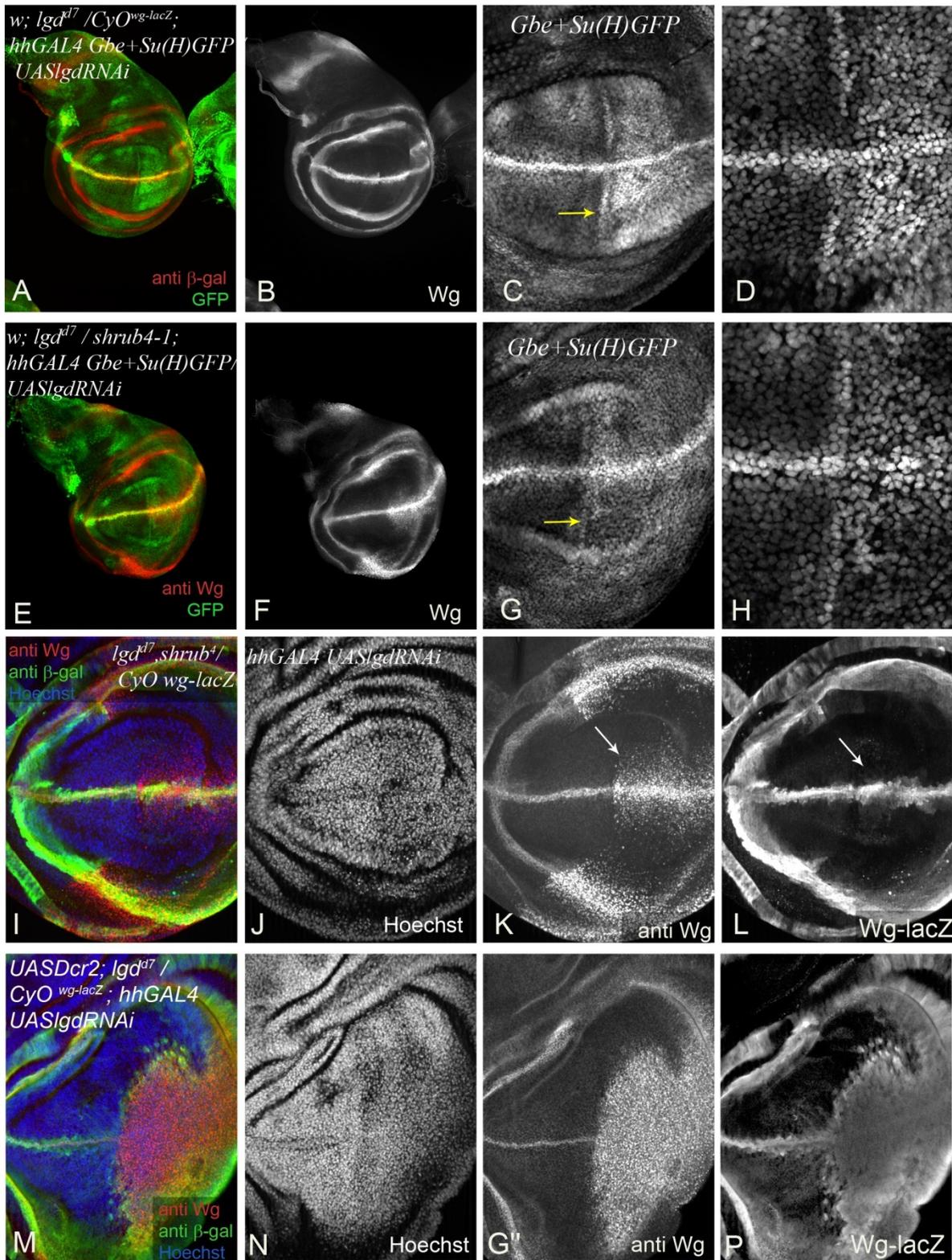
**Abb. 7-8: Lokalisierung von Lgd $\Delta$ C2-HA und NES-Lgd $\Delta$ C2-HA.** In den Imaginalscheiben mit Bereichen mit zwei Kopien der Lgd-Deletionskonstrukte (markiert durch den Verlust von GFP) zeigt sich ein verstärktes Signal. Die Unterschiede zwischen den verschiedenen Mengen heben sich in der HA-Antikörperfärbung nur geringfügig voneinander ab. Die weißen Rahmen in D und H, sind in der unteren Reihe vergrößert dargestellt. Grüne Umrahmung in den Einzelkanälen J und L zeigen die Grenzen anhand der GFP-Intensitäten. Unterschiede in der Expressionstärke sind kaum erkennbar, die Signale in Bereichen ohne GFP sind aber leicht erhöht. Im Falle von Lgd $\Delta$ C2-HA zeigt sich verglichen mit NESLgd $\Delta$ C2-HA eine Konzentration in Kernnähe (vgl. GFP-freie Bereiche in I und K). Eine Unterscheidung von der Hintergrundfärbung ist jedoch schwierig und bei höherer Auflösung nicht mehr oder kaum möglich. Die Konstrukte werden nur sehr schwach exprimiert und das Expressionslevel liegt weiter unterhalb der anderen Konstrukte (Sandra Jäckel, Troost, Jaeckel et al 2012). (Mehrkanalbilder: anti HA in rot, GFP in grün und Hoechst 33258 in blau). (Genotyp: *hsFlp; lf / CyO; FRT2A GFP / FRT2A lgdP.lgd-Konstrukt 68E*)



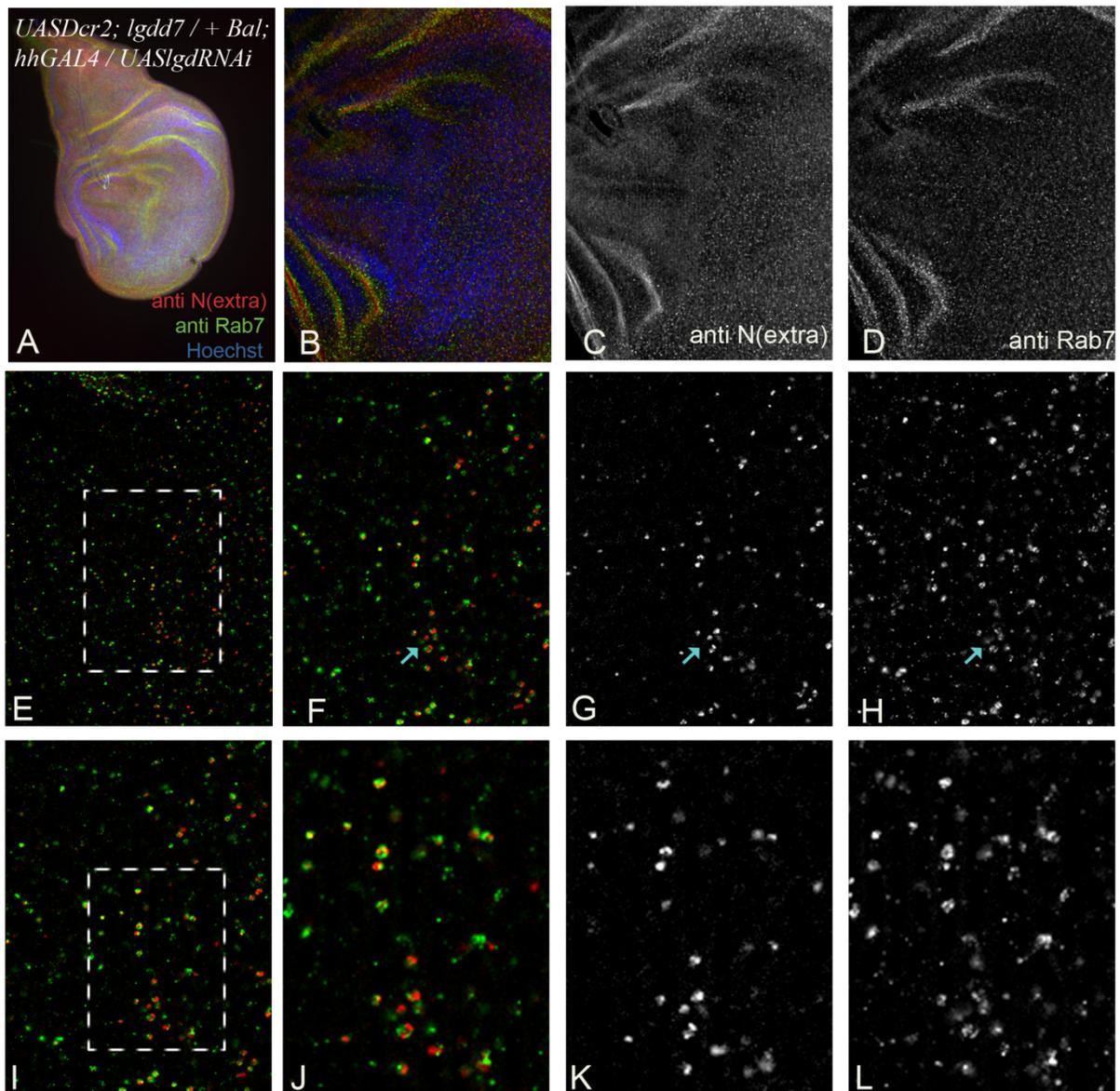
**Abb. 7-9 Lokalisierung von LgdDM14-HA.** Die Bereiche unterschiedliche Expressionsstärke des Deletionskonstrukts DM14-HA werden durch die Antikörperfärbung gegen das HA-Epitop und zur Kontrolle durch die GFP-Expression markiert. Große Klone zeigen die unterschiedlichen Expressionsstärken anhand der HA Antikörperfärbung, die sich deutlich vom Hintergrund abhebt (A-D). Die unterschiedlichen Proteinnmengen zeigen keinen Einfluss auf den Transport des Notch Rezeptors (E-L). Die Lokalisierung des Konstrukts zeigt sich zytoplasmatisch, teilweise in Vesikeln, die gelegentlich auch mit dem Notch Rezeptor überlappen. Geringe Signale der HA-Färbung in den 2xGFP positiven Klonen, die kein Protein mehr exprimieren treten dennoch auf. Das Auftreten einer schwachen Kreuzreaktion der Antikörper gegen Ratte und Maus kann hierbei nicht vollständig ausgeschlossen werden. Im *lgd<sup>Δ7</sup>* Hintergrund konnten keine Klone mit dem Konstrukt generiert werden. (Genotyp: siehe A)



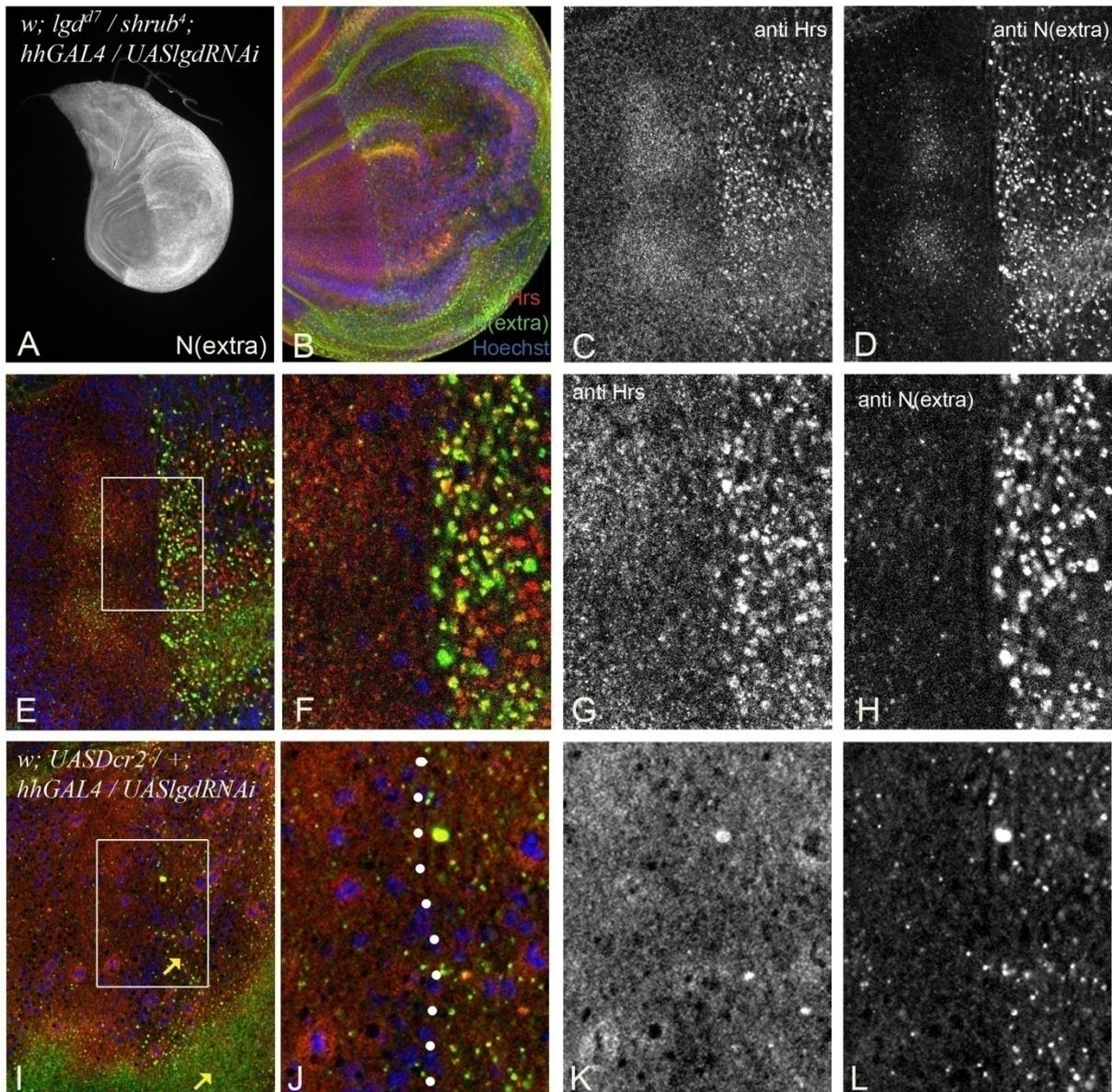
**Abb. 7-10: Aktivierung des Notch Signalwegs in *lgd<sup>SH495</sup>/lgd<sup>d7</sup>* Zellen.** (A-L) Kontrollklone ohne das *shrub<sup>4</sup>* Allel werden durch die Präsenz von zwei Kopien GFP (grün) gekennzeichnet. Die Marker für die starke Aktivität von Notch an der D/V Grenze, Wg und Cut (rot in A und E Einzelkanäle in B und J), zeigen keine ektopische Expression. Der Gbe+Su(H)-lacZ Reporter zeigt nur in einem Beispiel deutlichere Anzeichen ektopischer Expression (Roter Pfeil in L), gelbe Pfeile (in D,H,L) deuten auf die endogene Notchaktivität, die bei der Etablierung der späteren Flügelvenen benötigt wird. Eine stärkere Aktivierung des Signalwegs wurde nicht beobachtet. Weder für Wg noch für Notch zeigt sich eine auffällige Akkumulation innerhalb der Klone (B,F). Die schwache Expression von lgdP-IgdRFP kann im Hintergrund der in diesem Fall schwachen Cut Färbung (Einzelkanal J) abseits der D/V Grenze erahnt werden, wobei die eindeutige Unterscheidung zwischen der Hintergrundfärbung der anti-Cut Färbung und RFP-Fluoreszenz nicht gegeben ist. Anti-Cut Färbungen zeigen abgesehen vom spezifischen Signal im Zellkern eine Hintergrundfärbung des Gewebes. (Genotyp: *hsFlp / Gbe+Su(H)-lacZ; lgd<sup>d7</sup>/lgd<sup>SH495</sup>; FRT2A ubiGFP / FRT2A lgdP.lgd-RFP 68E*)



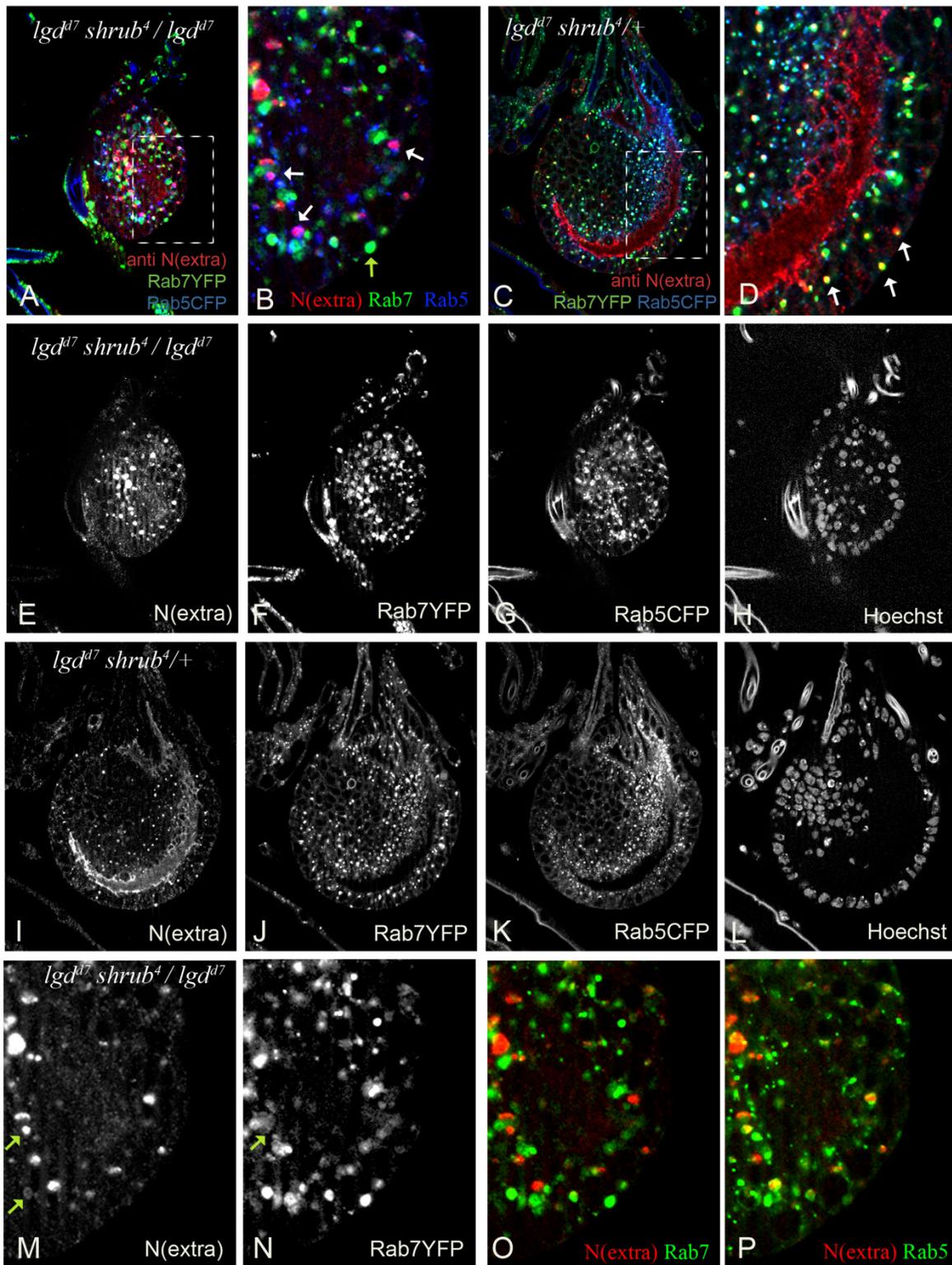
**Abb. 7-11: Die verstärkte Akkumulation von Wg ist nicht auf die verstärkte Aktivität des Notch-Signalwegs zurückzuführen. (A-L)** Reduktion der *Igd* Funktion im posterioren Kompartiment mittels hhGAL4 ohne UAS Dcr2 Expression mit intakter (A-D) oder reduzierter Funktion von *shrub* (E-H). Ohne Dcr2 Koexpression ist die ektopische Aktivierung von Notch zu schwach um Wg Expression zu induzieren (B), aber es zeigt sich die ektopische Gbe+Su(H) Expression auf der posterioren Seite (C,D). Bei Reduktion von *shrub* zeigt sich eine Akkumulation von Wg (F, I, K), aber weder Gbe+Su(H)-GFP (G,H) noch *wg-lacZ* (L) zeigen eine übereinstimmende ektopische Aktivierung. Durch Koexpression von Dcr2 wird die *Igd*-RNAi verstärkt und führt zur übereinstimmenden ektopischen Expression von Wg und *wg-lacZ* (M-P).



**Abb. 7-12 Akkumulation von Notch in *Igd* RNAi Zellen.** (A-L) Koexpression von UASIgd-RNAi und UASDcr2 im posterioren Kompartiment führt zur Akkumulation des Notch Rezeptors im spät endosomalen Kompartiment. (E-I) Die Endosomen auf der posterioren Seite sind größer und zahlreicher als im anterioren Wildtypbereich. Rahmen in E vergrößert in F-H. Einrahmung in I vergrößert in J-L. Der Notch Rezeptor ist mit Rab7 positiven reifen Endosomen assoziiert. (Expression bei 29°C; Genotyp: *UASDcr2; Igd<sup>d7</sup> / If* oder *CyO; hhGAL4 / UASIgdRNAi 1+3* )



**Abb. 7-13: Charakterisierung der vergrößerten Endosomen bei Funktionsverlust von *Igd* in *shrub*<sup>4</sup> Heterozygose durch RNA Interferenz.** (A,B) Übersicht der Flügelimaginalscheibe. (C-E) Fokussierung auf die vergrößerten Endosomen. Im RNAi-Expressionsbereich zeigt sich die Akkumulation des Notch Rezeptors (in grün) und der ESCRT-0 Untereinheit Hrs (in rot) deutlich verstärkt gegenüber dem anterioren Kontrollbereich. (F-H) Vergrößerter Bereich aus E. (I,-L) Bei Verlust von *Igd* und normaler *shrub* Funktion ist die Assoziation von Notch mit Hrs und auch die Assoziation von Hrs mit Endosomen weniger deutlich sichtbar. (Expression bei 29°C)



**Abb. 7-14: Charakterisierung der vergrößerten Endosomen in *lgd,shrub* / *lgd* Zellen.** In den *lgd,shrub*/*lgd* Zellen ist der Notch Rezeptor (N(extra),rot) mit Rab5 (CFP,blau) aber kaum mit Rab7 (YFP,grün) assoziiert (A,B, E-F, M-P. Genotyp: *w; lgd<sup>d7</sup> shrub<sup>4</sup> / lgd<sup>d7</sup>; tub.rab5-CFP tub.rab7YFP / Gbe+Su(H)-lacZ*). In *lgd,shrub*/+ Zellen kolokalisiert Notch auch mit Rab7 (C,D, I-L. *w; lgd<sup>d7</sup> shrub<sup>4</sup>; tub.rab5-CFP tub.rab7YFP / SM6-TM6B*).

## 8.Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Thomas Klein für die Bereitstellung der interessanten Projekte, die gute Betreuung, die Diskussionen, aber auch für das nimmermüde Erstellen und Besorgen von Fliegenstämmen, bereits durchgeführte Experimente und nicht zuletzt auch für die eingeräumten experimentellen Freiheiten bedanken.

Herrn Prof. Dr. Hermann Aberle danke ich für die Übernahme des Koreferats.

Für die Bereitstellung von diversen Arbeitmaterialien (Antikörper/Serum, Plasmide oder Fliegenstämmen) möchte ich mich bei der „*Drosophila* Community“ für den selbstverständlichen Austausch von Arbeitsmaterial bedanken. Vielen Dank an die Labore von Alfonso Martinez-Arias, Saray Bray, Marcos Gonzales-Gaitan, Konrad Basler, Jürgen Knoblich, Maria Leptin, Frank Sprenger, Helmut Krämer, Tor Erik Rusten, Steffen Heidmann, Suzan Eaton, Christian Klämbt, Elisabeth Knust ... sowie an das Bloomington Stock Center, VDRC, NIG-Fly, DGRC und DSHB. Besonderer Dank an Akira Nakamura für die Übersendung des Rab7 Antikörpers.

Besonders bedanken möchte ich mich beim bald patenten Anwalt Dr. Robert Jaekel für die vorangegangenen Arbeiten zu den bearbeiteten Projekten.

Für gute Zusammenarbeit danke ich Sandra Jäckel bei der Untersuchung der Interaktion von Lgd mit Shrub und insbesondere für ihre biochemischen Untersuchungen mit den Lgd-Konstrukten. In diesem Zusammenhang möchte ich mich auch bei Nadja Ohlenhard und bei Markus Hubertus Schneider für die gute Zusammenarbeit im *lgd* Projekt bedanken.

Ganz spezieller Dank an Jahan Yousefian, nicht nur für die ultimative Fahrgemeinschaft.

Sabrina Haenlein (Untersuchung von Deletionskonstrukten im sensitivierten Hintergrund), Lena Tveriakina (VPS39-RNAi Untersuchung), Jochen Steinbring (Untersuchung der Notch-Konstrukte), Niklas Berleth (Klonierung: Lgd $\Delta$ DM14(2-3)), Christine Benschmidt (Klonierung: Lgd $\Delta$ DM14(1;3-4)) und Julia Barskaja (His2RFP attB) danke ich für ihre Beiträge zu dieser Arbeit. Die Erfahrung und der Einsatz von Ferdi Grawe war für die EM-Analyse unentbehrlich. Vielen Dank auch an Sylvia Tannebaum für die zahlreichen Injektionen und für die zeitaufwändige Aufrechterhaltung meiner Stammsammlung während des Zusammenschreibens. Bei Gisela Helbig und Evelin Fahle möchte ich mich für die Hilfe bei den Subklonierungen bedanken. Für die Verwaltung der Stammsammlung und Hilfe bei der

Praktikumsvorbereitung danke ich Elke Henze. Vielen Dank an Monika Meier und Mehmet Gunaydin für die Vorbereitung und Nachbereitung der experimentellen Arbeiten. Vielen Dank für die Hilfe beim Kontakt mit Verwaltung und Organisation an Brigitte Haumann und Christina Zühlke. Und bei Dr. André Bachmann möchte ich mich bedanken. Der gesamten Arbeitsgruppe Klein danke ich für fachliche Diskussion, Organisation im Labor, die gute Arbeitsatmosphäre und so manche Feier.

Mein Dank gilt außerdem der ehemaligen AG Klein aus Köln, Hannelore Wirges-Koch und Evelin Fahle, Alexandra Böcke, Gaby Altmann sowie der AG Leptin und AG Sprenger, insbesondere Jayan Nair, Martina Rembold und Norman Zielke, zu Beginn der Arbeit an der Universität zu Köln.

Vielen Dank für die gute Atmosphäre auf dem gesamten Flur auch an die pflanzlichen Nachbarn der AG Simon.

Zu letzt, auch wenn der Dank hier zu kurz kommt, möchte ich meinen Eltern dafür danken mir mein Studium ermöglicht zu haben.

## 9. Erklärung

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

Düsseldorf, März 2013

Tobias Troost

Teilpublikationen im Rahmen dieser Arbeit:

Troost, T., S. Jaeckel, N. Ohlenhard and T. Klein (2012). "The tumour suppressor Lethal (2) giant discs is required for the function of the ESCRT-III component Shrub/CHMP4." J Cell Sci **125**(Pt 3): 763-776.

Troost, T. and T. Klein (2012). "Sequential Notch Signalling at the Boundary of Fringe Expressing and Non-Expressing Cells." Plos One **7**(11).

Schneider, M., T. Troost, F. Grawe, A. Martinez-Arias and T. Klein (2012). "Activation of Notch in lgd mutant cells requires the fusion of late endosomes with the lysosome." Journal of Cell Science. ePub ahead of print / in press

Yousefian, J., T. Troost, F. Grawe, T. Sasamura, M. Fortini and T. Klein (2013). "Dmon1 controls recruitment of Rab7 to maturing endosomes in Drosophila." J Cell Sci. ePub ahead of print / in press