

Analyse der intrazellulären Lysine des *Drosophila* Notch-Rezeptors

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Björn Schnute
aus Lübbecke

Düsseldorf, November 2019

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

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

Berichterstatter:

1. Prof. Dr. Thomas Klein

2. Prof. Dr. Hermann Aberle

Tag der mündlichen Prüfung: 19.12.2019

1	Einleitung	1
1.1	Der Notch-Signalweg	1
1.1.1	Synthese und Sekretion des Notch-Rezeptors	2
1.1.2	Liganden-abhängige Aktivierung des Notch-Rezeptors	2
1.2	Der Mechanismus der Ubiquitinierung.....	5
1.3	Der endosomale Transport des Notch-Rezeptors	6
1.3.1	Liganden-unabhängige Aktivierung des Notch-Rezeptors	9
1.4	Die Ubiquitinligasen Deltex und Suppressor of Deltex	11
2	Ziele der Arbeit	16
3	Ergebnisse	17
3.1	Herstellung und Expression eines lysinmutanten <i>Drosophila</i> Notch-Rezeptors	17
3.2	Analyse der Aktivierung des Notch-Signalweges durch N-HA und N ^{K2R} -HA	18
3.3	Untersuchung der liganden-unabhängigen Aktivierung des N ^{K2R} -HA Rezeptors.....	24
3.4	Untersuchung der proteolytischen Spaltungen von N-HA und N ^{K2R} -HA.....	30
3.5	Analyse der subzellulären Lokalisation von N-HA und N ^{K2R} -HA	36
3.5.1	Etablierung eines pulse-chase-Assays für transgene Notch-Rezeptoren in Flügelimaginalscheiben	36
3.5.2	Untersuchung der Sekretion und des endosomalen Transportes von N-HA und N ^{K2R} -HA.....	39
3.6	Herstellung von NICD Konstrukten zur Untersuchung des Abbaus im Zellkern	46
3.6.1	Untersuchung des Abbaus von NICD-HA und NICD ^{K2R} -HA im Zellkern.....	48
3.7	Beeinflussung der Endozytose des endogenen Rezeptors durch N-HA und N ^{K2R} -HA.....	51
3.8	Untersuchung der Aktivität von N-HA und N ^{K2R} -HA in Notch mutanten Zellklonen.....	53
3.9	Analyse der endosomalen Lokalisation von N-HA und N ^{K2R} -HA	55
3.9.1	Untersuchung des endosomalen Ursprungs von N ^{K2R} -HA positiven Vesikeln.....	57
3.9.2	Analyse eines Uptake-Assays mit N-HA und N ^{K2R} -HA in S2 Zellen.....	61
3.10	Regulation der Notch-Aktivität durch eine liganden-unabhängige Aktivierung vom Endosom.	65
3.11	Einfluss der Ubiquitinligasen Dx und Su(dx) auf N-HA und N ^{K2R} -HA	70
3.11.1	Untersuchung der Ubiquitinierung von N-HA und N ^{K2R} -HA durch Dx und Su(dx)	70
3.11.2	Beeinflussung der Endozytose von N-HA und N ^{K2R} -HA durch Dx und Su(dx)	72
3.11.3	Untersuchung der Beeinflussung der endosomalen Lokalisation von N-HA und N ^{K2R} -HA durch Dx und Su(dx)	74

3.11.4	Untersuchung der Beeinflussung der Notch-Aktivierung durch Dx und Su(dx)	79
3.12	Ein Dileucinmotiv als mögliches Endozytosesignal	81
3.12.1	Auswirkungen des Dileucinmotives auf die Endozytose von N-HA und N ^{K2R} -HA	82
3.12.2	Untersuchung der endosomalen Lokalisation von N ^{LL2AA} -HA und N ^{K2R-LL2AA} -HA	84
3.12.3	Auswirkungen des Dileucinmotives auf die Aktivierung von N-HA und N ^{K2R} -HA	85
4	Diskussion	87
4.1	Regulation der Aktivierung des N ^{K2R} -HA Rezeptors	87
4.1.1	Auswirkungen der endosomalen Lokalisation von N ^{K2R} -HA auf die Aktivierung des Signalweges... 87	
4.1.2	Auswirkungen von Dx und Su(dx) auf die endosomale Lokalisation und die Aktivität des Notch-Rezeptors	92
4.1.3	Auswirkungen von N ^{ΔEGF(11-12)} -HA und N ^{ΔEGF(11-12)-K2R} -HA auf die Aktivität des Notch-Signalweges .. 97	
4.1.4	Untersuchung des Abbaus der intrazellulären Domäne des Notch-Rezeptors im Zellkern	99
4.2	Regulation der Endozytose des Notch-Rezeptors.....	101
4.2.1	Auswirkungen von Dx und Su(dx) auf die Endozytose von N-HA und N ^{K2R} -HA	102
4.2.2	Modell einer ubiquitinierungs-unabhängigen Notch-Endozytose durch Dx und Su(dx).....	103
4.2.3	Ein Dileucinmotiv als alternatives Endozytosesignal.....	106
5	Zusammenfassung.....	109
6	Summary.....	110
7	Material und Methoden	111
7.1	Material.....	111
7.1.1	Geräte und Arbeitsmaterialien	111
7.1.2	Chemikalien, Kits und Enzyme	113
7.1.3	Puffer und Lösungen:	115
7.1.4	Medien	118
7.1.5	Antikörper	118
7.1.6	Bakterienstämme:.....	120
7.1.7	<i>D. melanogaster</i> Zellen	120
7.1.8	Fliegenstämme	120
7.1.9	Primer (Oligonukleotide).....	123
7.1.10	Vektoren	125
7.2	Methoden	126
7.2.1	Molekularbiologische Methoden	126
7.2.1.1	Plasmid-Minipräparation	126
7.2.1.2	Plasmid Midi-Präparation	126
7.2.1.3	Gelextraktion	126

7.2.1.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	127
7.2.1.5	Gibson Assembly.....	128
7.2.1.6	Ligation	129
7.2.1.7	Transformation chemisch kompetenter Bakterien	130
7.2.1.8	Restriktionsspaltung	130
7.2.1.9	Sequenzierung	131
7.2.2	Herstellung transgener Notch-Konstrukte	131
7.2.3	Immunhistochemische Färbung von Flügelimaginalscheiben.....	135
7.2.4	Immunhistochemische Färbung von Western Blots	136
7.2.5	Immunhistochemische Färbung von S2 Zellen.....	137
7.2.6	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese zur Auftrennung von Proteinen.....	138
7.2.7	Western Blot mittels Semy-Dry-Blotverfahren	138
7.2.8	S2 Zellkultur.....	138
7.2.9	Transfektion von S2 Zellen	139
7.2.10	Luciferase-Assay zur Quantifizierung der Notch-Aktivität in S2 Zellen	140
7.2.11	Notch Uptake-Assay in S2 Zellen	141
7.2.12	Ubiquitinierungs-Assay.....	142
7.2.13	Isolierung von Notch-Proteinen aus <i>Drosophila</i> Larven	144
7.2.14	Mikroskopie.....	146
7.2.14.1	Fluoreszenzintensitätsmessungen.....	146
7.2.15	Signifikanztest.....	147
7.2.16	<i>Drosophila</i> Methoden.....	148
7.2.16.1	Fliegenhaltung	148
7.2.16.2	Herstellung transgener Fliegen.....	148
7.2.16.3	Das GAL4/UAS-System.....	149
7.2.16.4	Klonale Analyse mittels Flp/FRT System	151
7.2.16.5	Das Reporter-genkonstrukt Gbe+Su(H)-lacZ.....	152
8	Literaturverzeichnis.....	154
9	Abkürzungsverzeichnis	166
10	Anhang.....	169
11	Danksagung.....	175
12	Eidesstattliche Erklärung	176

1 Einleitung

1.1 Der Notch-Signalweg

Der Notch-Signalweg ist entscheidend an Musterbildungsvorgängen und der Proliferation während der Entwicklung vielzelliger Organismen beteiligt (Übersicht in (Bray, 2016)). Eine gestörte Regulation des Notch-Signalweges steht häufig im Zusammenhang mit Missbildungen während der Entwicklung und der Entstehung von zahlreichen Krankheiten wie z.B. Krebs (Übersicht in (Aster et al., 2017)).

Die Regulation der Aktivität des Signalweges ist daher von entscheidender Wichtigkeit. Die Aktivierung des Signalweges wird über Transmembranproteine ausgelöst und benötigt einen direkten Zellkontakt. Durch die räumliche Nähe zweier benachbarter Zellen kommt es zu einer Bindung zwischen dem Notch-Rezeptor der signalempfangenden Zelle und dem Liganden der DSL-Familie (Delta, Serrate, Lag2) der signalsendenden Zelle. Diese Bindung löst proteolytische Spaltungen des Notch-Rezeptors aus und führt zu der Freisetzung der intrazellulären Domäne (NICD) in das Zytoplasma. Die intrazelluläre Domäne des Rezeptors wird in den Zellkern transportiert und löst als Transkriptionsfaktor die Expression der Notch-Zielgene aus (Übersicht in (Bray, 2016)).

Die Anzahl der Komponenten des Notch-Signalweges variiert stark zwischen Säugetieren und *Drosophila*. Während es in Säugetieren drei Liganden der Delta-like Familie (DLL1, DLL3, DLL4) und zwei Serrate Homologe (JAG1, JAG2 (Jagged)) gibt, beschränken sich die Liganden in *Drosophila* auf Dl (Delta) und Ser (Serrate). Darüber hinaus gibt es in Säugetieren vier Rezeptoren (N1-N4), während in *Drosophila* nur ein Notch-Rezeptor bekannt ist (Übersicht in (Bray, 2016)). Die geringere Anzahl der Komponenten in *Drosophila* vereinfacht das Verständnis des Signalweges. Aus diesem Grund wurden viele grundlegende Untersuchungen zur Regulation des Notch-Signalweges mit Hilfe des Modellorganismus *Drosophila* durchgeführt.

In *Drosophila* wird der Notch-Signalweg unter anderem für die Zellschicksalsdetermination von SOPs (sensory organ precursor) und der dorso-ventralen Organisation während der Flügelentwicklung benötigt (Kim et al., 1995; Simpson, 1990). Insbesondere die Flügelimaginalscheibe von *Drosophila* wird in dieser Arbeit als Modellgewebe für die Untersuchung des Notch-Signalweges verwendet.

1.1.1 Synthese und Sekretion des Notch-Rezeptors

Bei dem Notch-Rezeptor handelt es sich um ein Typ1 Transmembranprotein das am ER (Endoplasmatischem Retikulum) synthetisiert und in den Golgi-Apparat transportiert wird. Im Golgi-Apparat wird der Notch-Rezeptor durch die O-fucosyltransferase glykosyliert. Die Glykosylierung des Notch-Rezeptors ist entscheidend für eine spätere Aktivierung durch die Liganden (Okajima and Irvine, 2002; Sasamura et al., 2003; Shi and Stanley, 2003). Darüber hinaus kann durch eine weitere Modifikation der Glykosylierung durch Fringe (Fng) die Affinität des Rezeptors für den Liganden Delta (Dl) erhöht und für Serrate (Ser) unterdrückt werden (Fleming et al., 1997; Lei et al., 2003; Panin et al., 1997).

Im *trans*-Golgi-Apparat findet die erste proteolytische Spaltung des Notch-Rezeptors statt (S1). Der als Vorläuferprotein synthetisierte Rezeptor wird durch die Furin-ähnliche Konvertase geschnitten (Blaumueller et al., 1997). Anschließend kommt es zu einer Ca^{2+} abhängigen Heterodimerisierung zwischen der extrazellulären (NECD) und der intrazellulären Domäne (NICD) (Rand et al., 2000) (Abb. 1 A1). Der gereifte heterodimere Notch-Rezeptor wird an die Zelloberfläche befördert und über die Transmembrandomäne in der Plasmamembran verankert.

1.1.2 Liganden-abhängige Aktivierung des Notch-Rezeptors

Die extrazelluläre Domäne des gereiften *Drosophila* Notch-Rezeptors setzt sich aus 36 EGF-ähnliche Wiederholungen (epidermal growth factor), drei LNR-Wiederholungen (Lin12 Notch repeats) und der Herterodimerisierungsdomäne zusammen. Die LNR-Wiederholungen und die Herterodimerisierungsdomäne bilden die NRR (negative regulatory region). Die intrazelluläre Domäne setzt sich aus einer RAM-Domäne (RBPJ-associated module), gefolgt von Ankyrin-Wiederholungen und einer C-terminalen PEST-Domäne ((P) Prolin, (E) Glutamat, (S) Serin, (T) Threonin) zusammen (Übersicht in (Bray, 2006)) (Abb. 1 B). Die Liganden Dl und Ser verfügen ebenfalls über extrazelluläre EGF-ähnliche Wiederholungen und eine N-terminale DSL-Domäne (Übersicht in (Bray, 2006)). Die Interaktion zwischen dem Rezeptor und den Liganden findet über die EGF-ähnlichen Wiederholungen 11 und 12 des Rezeptors und der DSL-Domäne sowie den EGF-ähnlichen Wiederholungen der Liganden statt (Luca et al., 2015; Parks et al., 2006; Rebay et al., 1991; Shimizu et al., 1999). Die Interaktion kann sowohl zwischen den Liganden der signalsendenden und dem Rezeptor der signalempfangenden Zelle (*trans*-Interaktion) (Abb. 1 A3), als auch in derselben Zelle auftreten (*cis*-Interaktion) (Abb. 1 A2). Während die *trans*-Interaktion zu einer Aktivierung des Rezeptors führt (*trans*-Aktivierung), kommt es durch die

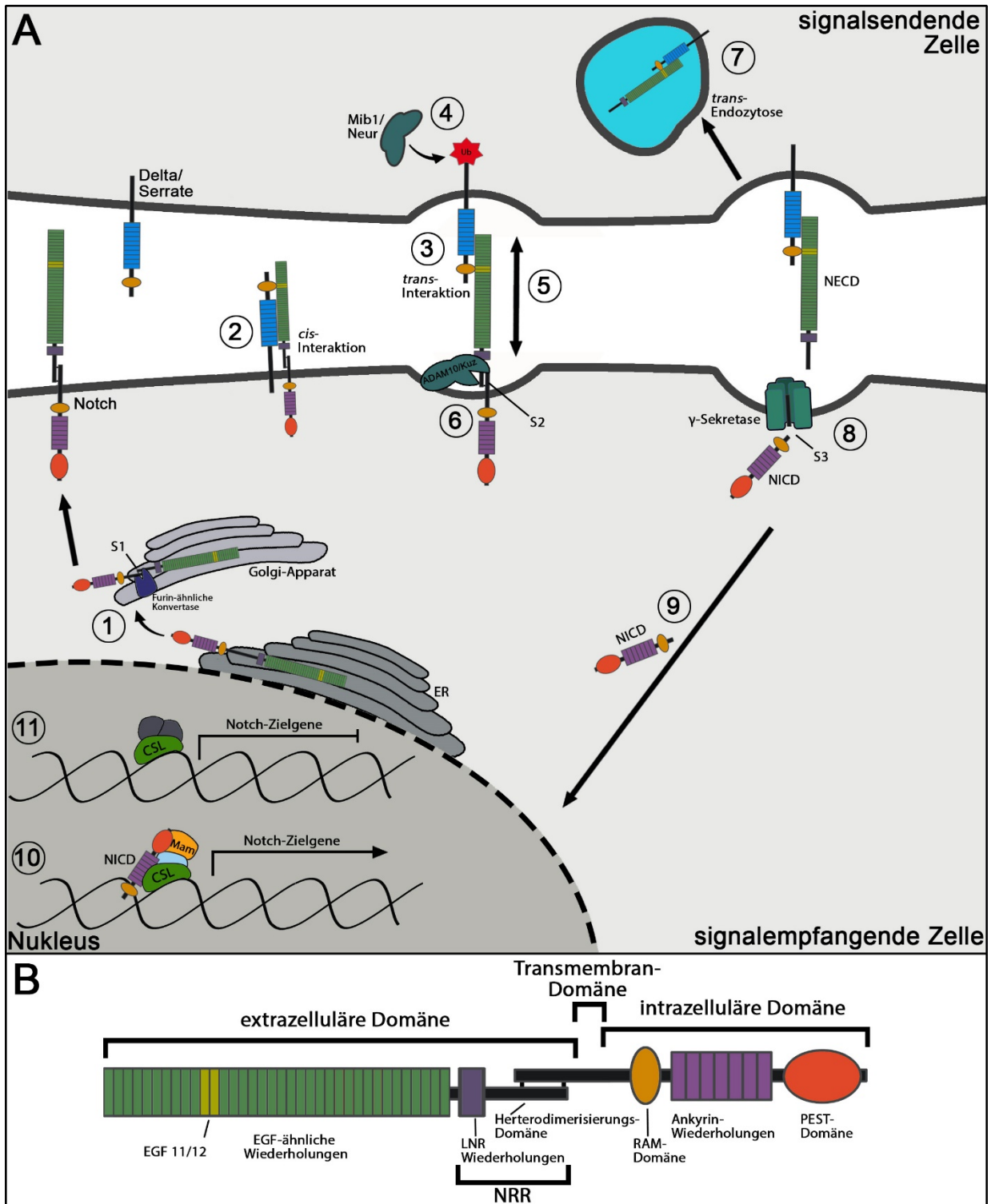


Abb. 1: Schematische Darstellung des Notch-Signalweges. Der Notch-Rezeptor wird im ER synthetisiert und zum Golgi-Apparat transportiert. Im Golgi-Apparat wird der Notch-Rezeptor glykosyliert und durch die Furin-ähnliche Konvertase gespalten (1). Der auf diese Weise gereifte transheterodimer Rezeptor wird zur Zelloberfläche transportiert und mit der Transmembrandomäne in der Plasmamembran verankert. Die Interaktion des Rezeptors mit den Liganden DL und Ser kann in *cis* (2), oder in *trans* (3) auftreten. Während die *trans*-Interaktion eine Aktivierung des Notch-Signalweges auslöst, führt die *cis*-Interaktion zu einer Unterdrückung des Notch-Signalweges. Die Aktivierung des Rezeptors ist abhängig von der Aktivität der Ubiquitinligasen Mib1 und Neur, die eine Ubiquitinierung der Liganden auslösen (4). Durch die Ubiquitinierung der Liganden wird eine Endozytose ausgelöst, die zu einer Zugkraft auf den Liganden-Rezeptor Komplex führt. Auf diese Weise wird die Schnittstelle für die Metalloprotease ADAM10/Kuz freigelegt (5). Die zweite proteolytische Spaltung des Rezeptors wird durch die Metalloprotease ADAM10/Kuz durchgeführt (6). Die abgespaltene extrazelluläre Domäne wird zusammen mit dem Liganden in die signalsendende Zelle *trans*-endozytiert (7). In der Membran der signalempfangenden Zelle befindet sich das NEXT-Fragment, welches von der γ -Sekretase als Substrat erkannt wird und proteolytisch geschnitten wird. Die Spaltung durch die γ -Sekretase führt zu einer Freisetzung von NICD in das Zytoplasma (8). Die freigesetzte intrazelluläre Domäne transloziert in den

Zellkern (9). Die Bildung eines Komplexes aus NICD, CSL und Mam führt zu der Aktivierung der Notch-Zielgene (10). In Abwesenheit von NICD bildet CSL mit weiteren Korepressoren einen Komplex der die Expression der Notch-Zielgene unterdrückt (11) (A). Der *Drosophila* Notch-Rezeptor verfügt über 36 EGF-ähnliche Wiederholungen von denen die Wiederholungen 11 und 12 wichtig für die Interaktion mit den Liganden sind. Die drei LNR-Wiederholungen bilden zusammen mit der Heterodimerisierungsdomäne die NRR. Durch die Struktur der NRR wird die Schnittstelle für die Metalloprotease ADAM10/Kuz verdeckt. Die intrazelluläre RAM-Domäne und die Ankyrin-Wiederholungen vermitteln die Bindung von NICD mit CSL. Über die C-terminale PEST-Domäne wird der Abbau von NICD ausgelöst (B).

cis-Interaktion zu einer Unterdrückung der Notch-Aktivität (*cis*-Inhibierung) (Übersicht in (del Alamo et al., 2011)). Die *trans*-Aktivierung des Signalweges ist abhängig von der Endozytose der Liganden, sowie des Rezeptors (Seugnet et al., 1997; Windler and Bilder, 2010). Die Endozytose der Liganden wird über die E3-Ubiquitinligasen Mib1 (Mind bomb1) und Neur (Neuralized) reguliert (Le Borgne et al., 2005; Wang and Struhl, 2005) (Abb. 1 A4). Es wird vermutet, dass durch die Endozytose der Liganden und des Rezeptors eine Zugkraft auf den Liganden-Rezeptor Komplex ausgeübt wird, die zu der Freilegung der NRR (negative regulatory region) führt und die zweite proteolytische Spaltung des Rezeptors ermöglicht (S2) (Meloty-Kapella et al., 2012; Nichols et al., 2007; Parks et al., 2000) (Abb. 1 A5). Die S2 Spaltung des Rezeptors wird durch die Metalloprotease ADAM10/Kuz (Kuzbanian) vermittelt und führt zu der Ablösung von NECD („Ectodomain Shedding“) (Mumm et al., 2000) (Abb. 1 A6). Nach der S2 Spaltung kommt es zu einer *trans*-Endozytose des Liganden und NECD in die signalsendende Zelle (Parks et al., 2000) (Abb. 1 A7). In der Membran der signalempfangenden Zelle verbleibt das geschnittene NEXT (Notch extracellular truncation) Fragment und wird als Substrat von dem γ -Sekretase-Komplex erkannt. Der γ -Sekretase-Komplex schneidet das NEXT-Fragment innerhalb der Transmembrandomäne (S3) und führt zu der Freisetzung der NICD in das Zytoplasma (DeStrooper and Schroeter, 1999; Lecourtois and Schweisguth, 1998; Struhl and Greenwald, 1999; Ye et al., 1999) (Abb. 1 A8). Die freigesetzte NICD transloziert in den Zellkern (Kidd et al., 1998; Struhl and Adachi, 1998; Struhl and Greenwald, 1999) (Abb. 1 A9). Im Zellkern bildet NICD zusammen mit dem DNA bindenden Protein CSL (Vertebraten: CBF1/RBP-J κ / *Drosophila melanogaster*: Su(H) / *C. elegans*: Lag1), dem Koaktivator Mam (Mastermind) und weiteren Koaktivatoren einen transkriptionsaktivierenden Komplex, der die Expression der Notch-Zielgene auslöst (Furriols and Bray, 2000) (Abb. 1 A10). Die Bindung von NICD an CSL wird über die RAM-Domäne und die Ankyrin-Wiederholungen des Rezeptors vermittelt (Kovall and Blacklow, 2010; Nam et al., 2006; Wilson and Kovall, 2006). In Abwesenheit von NICD bildet CSL zusammen mit Korepressoren einen Komplex, der die Expression der Notch-Zielgene unterdrückt (Furriols and Bray, 2001; Morel and Schweisguth, 2000) (Abb. 1 A11).

Die Auflösung des transkriptionsaktivierenden Komplexes wird in Säugetieren durch eine CDK8 (Cyclin-dependent kinase 8) vermittelte Hyperphosphorylierung und eine Ubiquitinierung der

PEST-Domäne von NICD ausgelöst (Fryer et al., 2004). Die durch Fbw7, (F-box/WD repeat-containing protein 7) vermittelte Ubiquitinierung der PEST-Domäne führt zu einem proteasomalen Abbau von NICD (Fryer et al., 2004; Gupta-Rossi et al., 2001; Oberg et al., 2001).

1.2 Der Mechanismus der Ubiquitinierung

Bei der Ubiquitinierung handelt es sich um eine posttranslationale Modifikation bei der es zur Kopplung des Polypeptids Ubiquitin an Lysine des Zielproteins kommt (Übersicht in (Metzger et al., 2012)). Die bekannteste Funktion der Ubiquitinierung ist die Markierung von Proteinen für den proteasomalen Abbau (Ganoth et al., 1988; Hough et al., 1986). Neben der Markierung für den proteasomalen Abbau kann durch die Kopplung von Ubiquitin auch die Endozytose von Transmembranproteinen und der Proteintransport reguliert werden (Übersicht in (Metzger et al., 2012; Swatek and Komander, 2016)). Die große Anzahl verschiedener Regulationsmechanismen wird durch verschiedene Formen der Ubiquitin-Kopplung ermöglicht. Dabei kann hauptsächlich zwischen der Kopplung eines einzelnen Ubiquitins (Monoubiquitinierung) und der Kopplung einer Ubiquitinkette (Polyubiquitinierung) unterschieden werden (Abb. 2 B). Während durch Monoubiquitinierungen nicht-degradative Prozesse wie die Einleitung der Endozytose und der Transport von Transmembranproteinen gesteuert werden, kann durch Polyubiquitinierungen sowohl der proteasomale Abbau, als auch nicht-degradative Prozesse ausgelöst werden (Übersicht in (Metzger et al., 2012; Swatek and Komander, 2016)).

Der Mechanismus der Ubiquitinierung basiert auf einer Kaskade bei der drei Enzyme beteiligt sind (Metzger et al., 2012). Das erste Enzym vermittelt unter ATP Verbrauch die Bindung von freiem Ubiquitin und wird als Ubiquitin aktivierendes Enzym bezeichnet (E1). Das so aktivierte Ubiquitin wird von E1 auf ein Ubiquitin konjugierendes Enzym (E2) übertragen. Die Substratspezifität der Ubiquitinierung wird über Ubiquitinligasen (E3) vermittelt. E3-Ligasen interagieren direkt mit dem Substrat und vermitteln die verschiedenen Formen der Ubiquitinkopplung an das Zielprotein. E3-Ligasen lassen sich in zwei Gruppen aufteilen (Metzger et al., 2012). E3-Ligasen mit einer RING-Domäne (really interesting new gene) interagieren mit dem Substrat und E2 und führen zu einem direkten Transfer des Ubiquitins von E2 auf das Substrat. Bei E3-Ligasen mit einer HECT-Domäne (homologous to the E6AP carboxyl terminus) kommt es erst zu einem Transfer des Ubiquitins von E2 auf die E3-Ligase und anschließend zu einer Übertragung auf das Substrat (Abb. 2 A).

In der Regel wird die Kopplung von Ubiquitin an Lysine des Zielproteins vermittelt. Es sind allerdings auch Ausnahmen bekannt, bei denen es zu einer Übertragung von Ubiquitin an

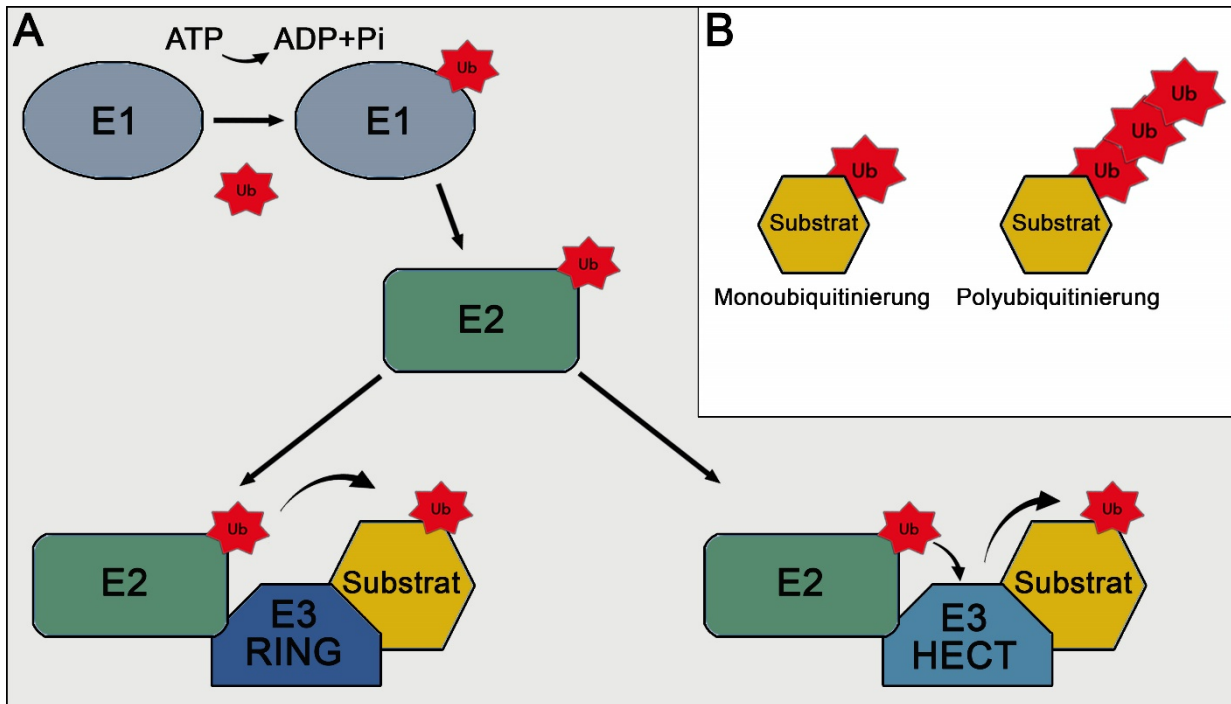


Abb. 2: Schematische Darstellung der Ubiquitinierungskaskade. Bei der Ubiquitinierung handelt es sich um eine posttranslationale Modifikation, bei der ein Polypeptid (Ubiquitin) an Lysine des Zielproteins gekoppelt wird. Der Prozess der Ubiquitinierung wird durch drei Enzyme gesteuert. Das E1 Ubiquitin aktivierende Enzym vermittelt unter ATP Verbrauch die Bindung von Ubiquitin mit sich selbst. Das auf diese Weise aktivierte Ubiquitin wird auf das E2 Ubiquitin konjugierende Enzym übertragen. Die Übertragung von Ubiquitin auf das Substrat wird durch E3 Ubiquitinligasen eingeleitet. E3 Ubiquitinligase interagieren sowohl mit dem Substrat, als auch mit dem E2 Ubiquitin konjugierendem Enzym. E3 Ubiquitinligasen lassen sich in zwei Gruppen einteilen. E3 Ubiquitinligasen mit einer RING-Domäne vermitteln die direkte Übertragung des Ubiquitins von dem E2 Ubiquitin konjugierendem Enzym auf das Substrat. Bei E3 Ubiquitinligasen mit einer HECT-Domäne wird das Ubiquitin erst von dem E2 Ubiquitin konjugierendem Enzym auf die E3 Ubiquitinligase übertragen und darauf folgend an das Substrat gekoppelt (A). Die Vielzahl von verschiedenen Regulationsmechanismen wird durch unterschiedliche Formen der Kopplung von Ubiquitin an das Zielprotein ermöglicht. Bekannte Formen der Ubiquitinierung sind: Monoubiquitinierungen, multi-Monoubiquitinierungen, Polyubiquitinierungen und verzweigte Polyubiquitinierungen (B).

alternative Bindungsstellen des Zielproteins kommt. Eine Form der alternativen Ubiquitinierung ist die Übertragung von Ubiquitin an den N-Terminus des Zielproteins (Übersicht in (Ciechanover and Ben-Saadon, 2004)). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Ubiquitin auch auf die Aminosäuren Threonin, Serin und Cystein übertragen werden kann (Cadwell and Coscoy, 2005; Carvalho et al., 2007; Ishikura et al., 2010; Shimizu et al., 2010; Tait et al., 2007; Wang et al., 2007; Williams et al., 2007).

1.3 Der endosomale Transport des Notch-Rezeptors

Der endosomale Transportweg ermöglicht es Transmembranproteine von der Zelloberfläche in einem vom Zytoplasma isolierten, als Lysosom bezeichneten, Kompartiment abzubauen (Übersicht in (Huotari and Helenius, 2011)). Der erste Schritt für einen gezielten lysosomalen Abbau von Transmembranproteinen ist die als Endozytose bezeichnete Einstülpung der Plasmamembran und die anschließende Abschnürung von Vesikeln in das Zytoplasma. Der Prozess der Endozytose kann clathrin-abhängig oder unabhängig eingeleitet werden. Bei Clathrin

handelt es sich um ein triskelionförmig aufgebautes Gerüstprotein, das über Adapterproteine an der eingestülpten Membran assoziiert und diese stabilisiert. Bei dieser Form der Endozytose binden die Adapterproteine nicht nur an der Clathrinhülle, sondern interagieren auch mit den Transmembranproteinen die über den endosomal Transport abgebaut werden sollen (Übersicht in (Benmerah and Lamaze, 2007)). Die Interaktion zwischen Transmembranproteinen und den Adapterproteinen kann einerseits direkt über konservierte Motive innerhalb der Transmembranproteine, oder durch die Kopplung von Ubiquitin an Transmembranproteine ausgelöst werden. Im letzteren Fall wird ein zusätzliches Ubiquitin bindendes Protein benötigt. Ein gut untersuchtes Beispiel für ein Protein mit Ubiquitin interagierenden Motiven (UIMs ubiquitin interactin motif) ist Epsin. Epsin kann sowohl mit den ubiquitinierten Transmembranproteinen, als auch mit Adapterproteinen interagieren. Auf diese Weise vermittelt Epsin die Interaktion zwischen dem ubiquitinierten Transmembranprotein und den Adapterproteinen. Ein gut untersuchtes Adapterprotein, das sowohl mit Epsin, als auch mit konservierten Endozytosemotiven innerhalb der Transmembranproteine interagieren kann, ist AP-2 (Adapter Protein 2) (Übersicht in (Benmerah and Lamaze, 2007)). Nach dem Aufbau des Komplexes folgt die Abschnürung des Vesikels von der Zellmembran durch die GTPase (Guanosin Triphosphat) Dynamamin (Übersicht in (Benmerah and Lamaze, 2007)).

Die clathrin-unabhängige Endozytose von Transmembranproteinen wird über Cholesterol und GPI (glycosylphosphatidylinositol) angereicherte Membrandomänen, die als „lipid rafts“ bezeichnet werden, ausgelöst (Übersicht in (Huotari and Helenius, 2011; Levental et al., 2010)).

Wie andere Transmembranproteine wird auch der Notch-Rezeptor konstitutiv endozytiert, über den endosomal Weg transportiert und im Lysosom abgebaut (Jekely and Rorth, 2003; Vaccari et al., 2008). Dabei konnte gezeigt werden, dass der Notch-Rezeptor sowohl clathrin-abhängig als auch unabhängig endozytiert wird (Windler and Bilder, 2010). Der Notch-Rezeptor befindet sich nach der Endozytose in der Membran der abgeschnürten Vesikel, die als EEVs (early endosomal vesicles) bezeichnet werden (Abb. 3 (1)).

Die gebildeten EEVs fusionieren miteinander zu frühen Endosomen (EE early endosome), oder fusionieren mit bereits vorhandenen EEs. Die Fusion der Kompartimente wird über den „tethering“-Komplex CORVET reguliert (Übersicht in (Balderhaar and Ungermann, 2013)) (Abb. 3 (2)). Ab dem frühen Endosom werden Prozesse eingeleitet die über den weiteren Transport der Transmembranproteine entscheiden. So können Proteine ab dem frühen Endosom zurück zur Membran transportiert werden (Abb. 3 (3)), oder dem endosomal Transport bis zum lysosomal Abbau zugeführt werden. Die Prozesse am Endosom werden maßgeblich durch

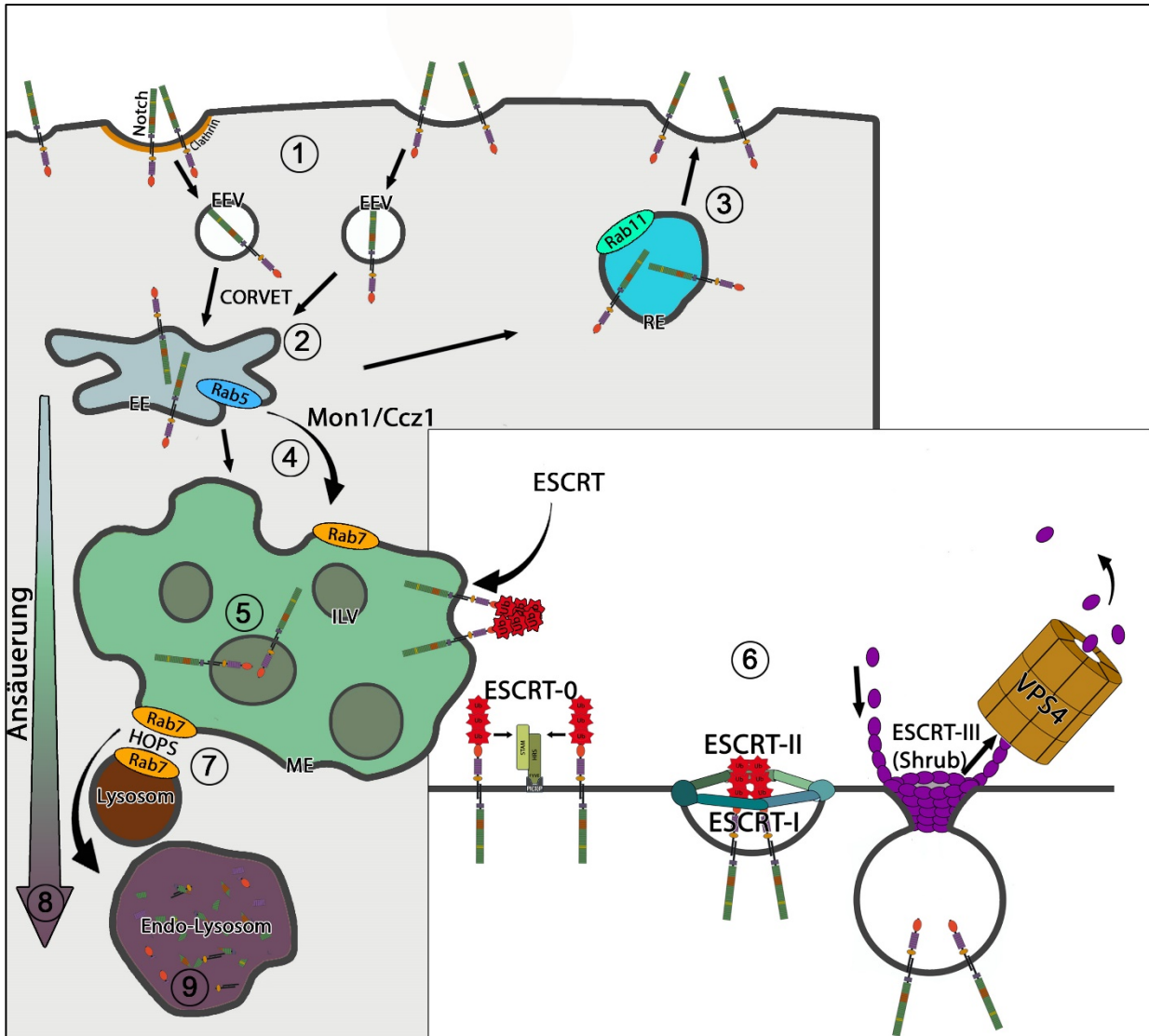


Abb. 3: Schematische Darstellung der konstitutiven Endozytose des Notch-Rezeptors. Der Notch-Rezeptor kann sowohl clathrin-abhängig, als auch unabhängig endozytiert werden (1). Nach der Endozytose von der Plasmamembran befindet sich der Notch-Rezeptor in der Membran von frühen endosomalen Vesikeln (EEVs). Die Fusionen von EEVs und frühen Endosomen (EEs) bzw. EEs untereinander wird durch den „tethering“-Komplex CORVET reguliert (2). Die Prozesse am EE werden über Rab-GTPasen gesteuert. Ab dem EE wird entschieden ob die endosomale Fracht recycelt (3), oder dem Abbau im Lysosom zugeführt wird. Während der endosomalen Reifung kommt es zu einem Austausch der Rab GTPase Rab5 gegen Rab7. Dieser Austausch wird über den GEF Mon1/Ccz1 eingeleitet (4). Am reifenden Endosom (ME) kommt es zu der Einschnürung der endosomalen Membran, die zu der Bildung von intraluminalen Vesikeln (ILVs) führt. Die endosomale Fracht wird auf diese Weise von dem dem Zytoplasma isoliert (5). Die Bildung der ILVs wird über vier sequenziell wirkende ESCRT-Komplexe gesteuert. Die ESCRT-Komplexe führen zu einer Akkumulation von ubiquitiniertes endosomaler Fracht und sorgen für eine Einstülpung der endosomalen Membran. Über die Polymerisierung der ESCRT-III Komponente Shrub wird eine Spirale um die endosomale Fracht gebildet, welche zu einer weiteren Einschnürung und Ablösung der ILVs von der endosomalen Membran führt. Die ESCRT-III Polymere werden über die Aktivität der AAA-ATPase Vps4 aufgelöst und für die Bildung weiterer ILVs reaktiviert (6). Nachdem die endosomale Fracht in ILVs verpackt ist kommt es zu der Fusion des späten Endosoms mit dem Lysosom. Diese Fusion wird über den „tethering“-Komplex HOPS gesteuert (7). Während der endosomalen Reifung kommt es zu einer permanenten Ansäuerung der endosomalen Kompartimente (8), die zu der Aktivierung von sauren Hydrolasen im Lysosom führt. Die endosomale Fracht wird im Lumen des Lysosoms abgebaut (9).

GTPasen der Rab-Familie (Ras-related in brain) beeinflusst. Die verschiedenen endosomalen Kompartimente sind mit spezifischen Rab GTPasen assoziiert, welche die Rekrutierung weiterer Effektorproteine auslösen und die Prozesse der endosomalen Reifung und der Membranfusion regulieren. Recycling Endosomen verfügen beispielsweise über Rab11, während frühe

Endosomen mit Rab5 und reifende Endosomen mit Rab7 markiert sind (Übersicht in (Zerial and McBride, 2001)). Während der endosomalen Reifung kommt es zu einem Austausch der GTPase Rab5 zu Rab7 (Rink et al., 2005) (Abb. 3 (4)).

In dem weiteren Prozess der endosomalen Reifung kommt es zu einer Einstülpung der endosomalen Membran, die zu der Bildung von intraluminalen Vesikeln (ILVs) führt. Mit Hilfe dieses Prozesses werden Transmembranproteine vollständig von dem Zytoplasma isoliert (Abb. 3 (5)). Die Bildung von ILVs wird durch vier ESCRT-Komplexe (0-III) (endosomal sorting complex required for transport) und Vps4 (vacuolar protein sorting 4) reguliert. Die ESCRT-Komplexe werden beginnend mit ESCRT-0 sequenziell an die endosomale Membran rekrutiert (Übersicht in (Hurley, 2015)). Die Rekrutierung der ESCRT-Komplexe führt zu der Akkumulation von ubiquitiniertes, endosomaler Fracht und zu der Einstülpung der endosomalen Membran (Übersicht in (Schmidt and Teis, 2012; Wollert and Hurley, 2010)). Die Abschnürung des ILVs wird über den ESCRT-III Komplex ausgelöst. Die Komponente des ESCRT-III Komplexes Shrub/CHMP4 (charged multi-vesicular body protein) wird an die Membran rekrutiert und bildet eine Spirale, welche die endosomale Fracht umschließt und zur Abschnürung des ILVs führt. Der aus ESCRT-III Polymeren bestehende Komplex wird durch Vps4 aufgelöst und für die Bildung von weiteren ILVs reaktiviert (Übersicht in (Schoneberg et al., 2017)) (Abb. 3 (6)).

Nach der Internalisierung der Transmembranproteine in das endosomale Lumen kann eine Fusion des gereiften Endosoms (ME maturing endosome) mit dem Lysosom eingeleitet werden. Die Fusion mit dem Lysosom wird über die GTPase Rab7 reguliert. Rab7 rekrutiert den „tethering“-Komplex HOPS (homotypic fusion and protein sorting) der zu einer SNARE-Protein abhängigen Fusion des späten Endosoms mit dem Lysosom führt (Übersicht in (Balderhaar and Ungermann, 2013)) (Abb. 3 (7)). Während der endosomalen Reifung kommt es zu einer permanenten Ansäuerung der Kompartimente durch die Aktivität der v-ATPase (Übersicht in (Cotter et al., 2015)) (Abb. 3 (8)). Die Ansäuerung der Kompartimente ist essentiell für die Aktivität von sauren Hydrolasen, die zu einem Abbau der Transmembranproteine im lysosomalen Lumen führen (Übersicht in (Huotari and Helenius, 2011)) (Abb. 3 (9)).

1.3.1 Liganden-unabhängige Aktivierung des Notch-Rezeptors

Wie bereits erwähnt führt die Internalisierung von Transmembranproteinen in ILVs zu der vollständigen Isolierung der Proteine vom Zytoplasma. Dieser Schritt ist besonders wichtig um z.B. die ektopische Aktivierung von Transmembranrezeptoren wie dem Notch-Rezeptor zu

unterdrücken. So konnte gezeigt werden, dass der Ausfall der ESCRT-Komponenten Vps25 und Tsg101 zu einer Akkumulation des Notch-Rezeptors an Endosomen führt und eine ektopische Aktivierung des Notch-Signalweges ausgelöst wird (Moberg et al., 2005; Thompson et al., 2005; Vaccari and Bilder, 2005).

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass ein Ausfall des Tumorsuppressorgens *lgd* (*lethal* (*2 giant discs*)) ebenfalls zu einer starken Akkumulation des Notch-Rezeptors an endosomalen Kompartimenten führt und eine ektopisch Aktivierung des Notch-Signalweges ausgelöst wird (Childress et al., 2006; Gallagher and Knoblich, 2006; Jaekel and Klein, 2006). In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass Lgd direkt mit dem *Drosophila* CHMP4 Ortholog Shrub interagieren und für die vollständige Funktion von Shrub benötigt wird (McMillan et al., 2017; Troost et al., 2012). Ein Ausfall von *shrub* im Follikelepithel führt ebenfalls zu einer ektopischen Aktivierung des Notch-Signalweges (Schneider et al., 2013). Da die ESCRT-III Komponente Shrub/CHMP4 essentiell für die Bildung von ILVs ist und Lgd darüber hinaus für die Funktion von Shrub benötigt wird, verbleibt durch den Ausfall dieser Komponenten vermutlich ein Teil des Notch-Rezeptors an der limitierenden Membran des Endosoms und wird auf diese Weise ektopisch, liganden-unabhängig aktiviert (Übersicht in (Schnute et al., 2018)).

Die ektopische Aktivierung durch einen Ausfall von *lgd* wird unabhängig von der Aktivität der Metalloprotease Kuz ausgelöst (Schneider et al., 2013). Diese Beobachtung führt zu der Vermutung, dass es durch die verstärkte Akkumulation des Rezeptors an der limitierenden Membran des Endosoms zu einem alternativen „Ectodomain Shedding“ kommen muss. Die ektopische Aktivierung in *lgd^{d7}* mutanten Flügelimaginalscheiben kann durch eine Reduzierung der v-ATPase Funktion unterdrückt werden (Schneider et al., 2013). Es ist daher zu vermuten, dass ein alternatives „Ectodomain Shedding“ durch die Aktivität von sauren Hydrolasen ausgelöst wird und zu einer Freisetzung der sich im Kontakt mit dem Zytoplasma befindenden intrazellulären Domäne des Rezeptors führt.

Interessanterweise wird für die ektopische Aktivierung des Notch-Signalweges in *lgd^{d7}* mutanten Flügelimaginalscheiben die Fusion mit dem Lysosom benötigt. Im Gegensatz dazu führt der Ausfall von *shrub* im Follikelepithel zu einer ektopischen Notch-Aktivierung, die unabhängig von der Fusion des späten Endosoms mit dem Lysosom ausgelöst wird (Schneider et al., 2013). Die ektopische Aktivierung des Notch-Signalweges lässt sich allerdings nicht nur durch die Beeinträchtigung der ESCRT-Maschinerie beobachten, sondern kann auch durch Notch-spezifischen E3-Ligasen ausgelöst werden. Die Auswirkungen dieser E3-Ligasen werden im folgenden Abschnitt eingeleitet.

1.4 Die Ubiquitinligasen Deltex und Suppressor of Deltex

Gut untersuchte E3-Ligasen, die den Notch-Rezeptor beeinflussen, sind Deltex (Dx) und Suppressor of *deltex* (Su(dx)). Beide E3-Ligasen regulieren sowohl die Endozytose, die endosomale Lokalisation und die Aktivität des Notch-Rezeptors (Übersicht in (Baron, 2012)).

Bei einem Ausfall von *dx* kommt es zu einem Flügelphänotyp der sich durch die Bildung von Kerben und verbreiterten Flügelvenen auszeichnet und mit einem Notch „loss of function“ Phänotyp vergleichen lässt. Der Ausfall von *Su(dx)* führt hingegen zu einem Verlust von Venengewebe und ist vergleichbar mit einem Notch „gain of function“ Phänotyp. Der Phänotyp, der durch den Ausfall von *dx* hervorgerufen wird, lässt sich durch den zusätzlichen Verlust von einer Kopie von *Su(dx)* retten und erklärt die Namensgebung von *Su(dx)* (Busseau et al., 1994; Fostier et al., 1998; Xu and Artavanis-Tsakonas, 1990). Aus diesen Versuchen wurden die ersten Hinweise von Dx als positiver und Su(dx) als negativer Regulator des Notch-Signalweges hergeleitet.

Dx verfügt über drei wesentliche Proteindomänen. Am N-Terminus befinden sich zwei WWE Domänen die an die Ankyrin-Wiederholungen der intrazellulären Domäne des Notch-Rezeptors binden können (Aravind, 2001; Diederich et al., 1994; Matsuno et al., 1995; Matsuno et al., 1998; Zweifel et al., 2005). Gefolgt wird die Domäne von einer SH3-Domäne (SRC Homology 3) und einer C-terminalen RING-H2-finger-Domäne, durch die Dx zu den E3-Ubiquitinligasen gezählt werden kann (Matsuno et al., 2002). In einer weiteren Veröffentlichung konnte gezeigt werden, dass Dx eine Monoubiquitinierung des Notch-Rezeptors auslöst (Hori et al., 2011).

Su(dx) beinhaltet eine N-terminale Phospholipid-bindende C2-Domäne, gefolgt von WW-Domänen und einer C-terminalen HECT-Domäne und lässt sich dadurch in die Nedd4-Familie der Ubiquitinligasen einordnen (Cornell et al., 1999). Su(dx) ist an der Membran lokalisiert und interagiert über die WW-Domänen mit dem Notch-Rezeptor (Wilkin et al., 2004). In einer späteren Studie konnte zudem gezeigt werden, dass Su(dx) zu einer Ubiquitinierung des Notch-Rezeptors führt (Shimizu et al., 2014). Um welche Form der Ubiquitinierung es sich handelt, ist bisher allerdings nicht bekannt.

Neben Su(dx) gibt es in *Drosophila* ein weiteres Mitglied der Nedd4-Familie (DNedd4) mit einer C2-Domäne, drei WW-Domänen und einer C-terminalen HECT-Domäne. DNedd4 interagiert über die WW-Domänen direkt mit einer PPSY-Sequenz der intrazellulären Domäne des Notch-Rezeptors und führt ebenfalls zu einer Ubiquitinierung des Rezeptors (Sakata et al., 2004).

Die Auswirkungen von Dx und Su(dx) auf den Notch-Rezeptor lassen sich in zwei Funktionen einteilen. Zum einen wird durch die Ubiquitinligasen die Regulation der Endozytose beeinflusst

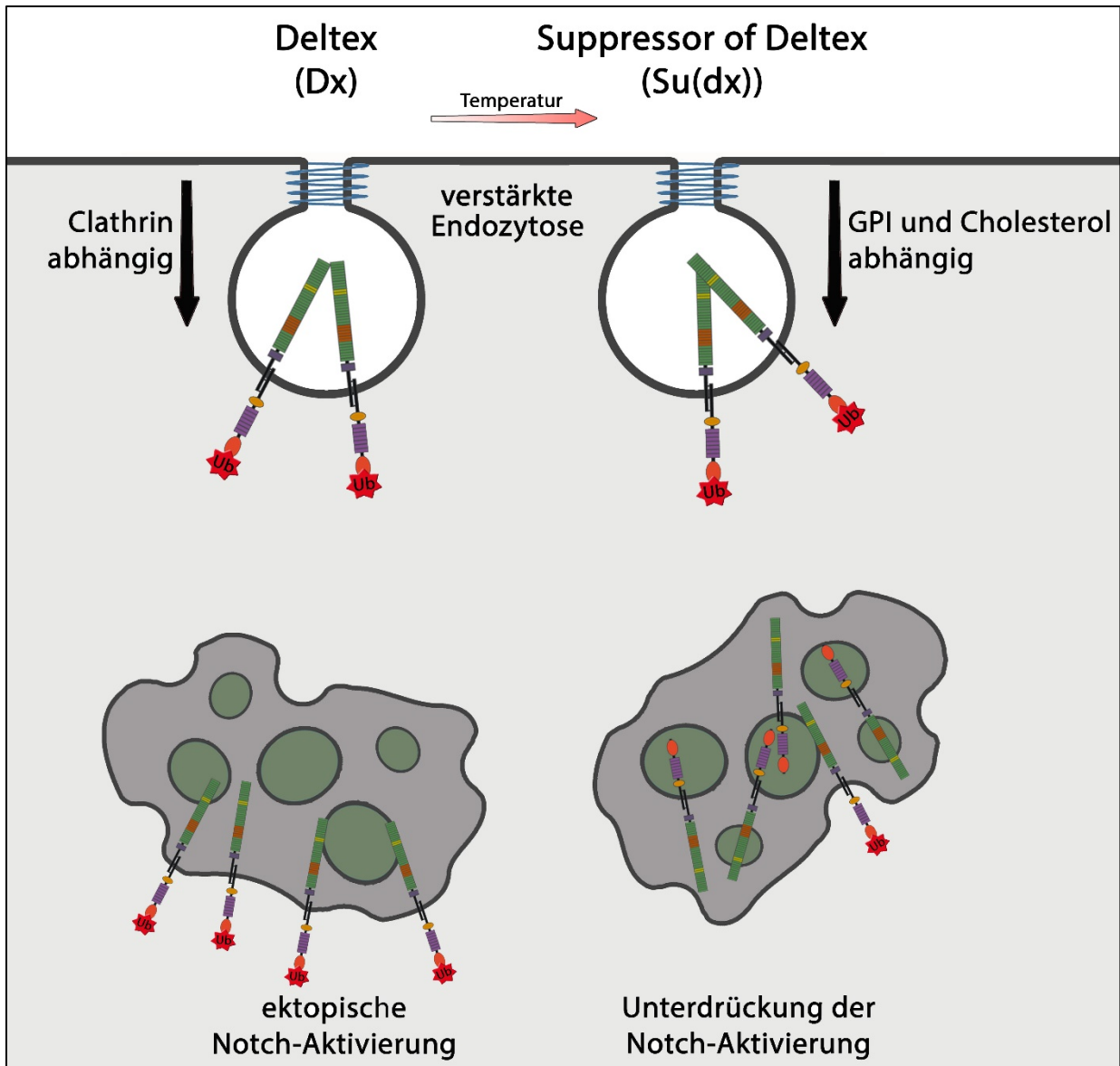


Abb. 4: Schematische Darstellung der Auswirkungen von Dx und Su(dx) auf den Notch-Rezeptor. Sowohl Dx als auch Su(dx) können direkt mit dem Notch-Rezeptor interagieren und führen zu einer Ubiquitinierung des Rezeptors. Dx und Su(dx) können die Endozytose des Notch-Rezeptors einleiten. Während Dx zu einer clathrin-abhängigen Endozytose von Notch führt, wird durch Su(dx) eine Endozytose über Cholesterol und GPI angereicherte Membrandomänen eingeleitet. Die zweite Funktion von Dx und Su(dx) ist die Regulation der Proteinmenge des Notch-Rezeptors an der limitierenden endosomalen Membran. Dx führt zu einer Akkumulation des Notch-Rezeptors an der limitierenden Endosomalen Membran und löst eine ektopische liganden-unabhängige Aktivierung des Notch-Signalweges aus. Su(dx) führt zu einer verstärkten Internalisierung des Notch-Rezeptors in das endosomale Lumen und führt zu einer Unterdrückung der Notch-Aktivierung. Die Effekte von Dx und Su(dx) sind in *Drosophila* temperaturabhängig. Die Auslösung der liganden-unabhängigen Aktivierung durch Dx wird bei geringen Temperaturen aktiv, während die Effekte durch Su(dx) bei höheren Temperaturen verstärkt auftreten.

und zum anderen steuern Dx und Su(dx) die Lokalisation des Notch-Rezeptors an endosomalen Kompartimenten (Übersicht in (Baron, 2012)).

Durch einen Ausfall von *dx* kommt es zu einer verstärkten Akkumulation des Notch-Rezeptors an der apikalen Membran in Flügelimaginalscheiben (Yamada et al., 2011). Eine Überexpression von Dx führt hingegen zu einer verstärkten Endozytose des Notch-Rezeptors (Hori et al., 2004; Shimizu et al., 2014; Wilkin et al., 2008). Der Ausfall von *Su(dx)* hat in Flügelimaginalscheiben keinen Effekt auf die apikale Lokalisation von Notch. Durch eine Überexpression von Su(dx)

konnte allerdings eine verstärkte Endozytose des Notch-Rezeptors festgestellt werden (Shimizu et al., 2014; Wilkin et al., 2004). Beide Ubiquitinligasen können daher als positive Regulatoren der Notch-Endozytose angesehen werden.

Die Überexpression von Dx führt zu Vesikeln bei denen der Notch-Rezeptor an der limitierenden endosomalen Membran lokalisiert. Darüber hinaus wird durch die Überexpression eine ektopische Aktivität des Notch-Signalweges ausgelöst (Shimizu et al., 2014; Wilkin et al., 2008). Die ektopische Aktivierung lässt sich durch den Ausfall des HOPS-Komplexes unterdrücken und spricht für eine liganden-unabhängige Aktivierung des Notch-Rezeptors vom Lysosom (Wilkin et al., 2008).

Die Überexpression von Su(dx) führt hingegen zu einer Unterdrückung der endogenen Notch-Aktivität in Flügelimaginalscheiben (Wilkin et al., 2004). Darüber hinaus kann durch die Überexpression von Su(dx) auch die durch Dx induzierte ektopische Notch-Aktivierung unterdrückt werden (Shimizu et al., 2014; Wilkin et al., 2008). Ähnliche Beobachtungen konnten auch durch die Expression von DNedd4 gemacht werden (Sakata et al., 2004).

Interessanterweise wird die durch Dx ausgelöste Lokalisation des Notch-Rezeptors an der limitierenden endosomalen Membran durch eine zusätzliche Überexpression von Su(dx) beeinflusst. Su(dx) führt zu einer verstärkten Internalisierung des Notch-Rezeptors in das endosomale Lumen (Shimizu et al., 2014; Wilkin et al., 2008). Die Beeinflussung der endosomalen Lokalisation des Notch-Rezeptors durch Dx und Su(dx) steht vermutlich in einem direkten Zusammenhang mit der Beeinflussung der Aktivierung des Notch-Rezeptors. Während Dx durch die Lokalisation des Notch-Rezeptors an der limitierenden Membran eine ektopische, liganden-unabhängige Aktivierung auslöst, führt Su(dx) zu einer verstärkten Internalisierung des Rezeptors in das endosomale Lumen und unterdrückt auf diese Weise die ektopisch Notch-Aktivierung.

Zusammengefasst scheinen Dx und Su(dx) bei der Endozytose des Notch-Rezeptors eine synergistische Funktion zu haben, während sie bei der Lokalisation des Rezeptors an der limitierenden endosomalen Membran antagonistisch wirken.

In einer aktuelleren Studie konnte zudem gezeigt werden, dass Dx und Su(dx) den Notch-Rezeptor durch unterschiedliche endozytotische Routen dem endosomalen Transportweg zuführen. Dx führt dabei zu einer clathrin-abhängigen Endozytose des Notch-Rezeptors, während Su(dx) zu einer Endozytose des Rezeptors führt, die über Cholesterol und GPI angereicherte Membrandomänen eingeleitet wird (Shimizu et al., 2014). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Dx und Su(dx) die Aktivierung des Notch-Rezeptors in *Drosophila* temperaturabhängig regulieren (Cornell et al., 1999; Fostier et al., 1998; Mazaleyrat et al., 2003;

Shimizu et al., 2014; Wilkin et al., 2008). In diesem Modell wird die liganden-unabhängige Aktivierung durch Dx bei niedrigen Temperaturen aktiv, um eine reduzierte liganden-abhängige Aktivierung des Rezeptors auszugleichen und die Aktivität des Notch-Signalweges über einem kritischen Schwellenwert zu halten. Die Unterdrückung der liganden-unabhängigen Aktivierung durch Su(dx) wird hingegen bei höheren Temperaturen aktiv, um eine ektopische Aktivierung des Notch-Signalweges zu vermeiden (Shimizu et al., 2014) (Abb. 4).

Wie stark die Ubiquitinierung des Notch-Rezeptors durch Dx und Su(dx) an den beschriebenen Funktionen beteiligt ist, ist nicht im Detail geklärt. Es konnte allerdings gezeigt werden, dass die Überexpression von Su(dx) mit nicht-funktionaler HECT-Domäne weiterhin zu einer Endozytose des Notch-Rezeptors führt, aber gleichzeitig eine verstärkten Lokalisation des Rezeptors an der limitierenden endosomalen Membran und eine ektopische Aktivierung des Notch-Signalweges auslöst (Shimizu et al., 2014; Wilkin et al., 2004). Aus diesen Beobachtungen wurde die Hypothese aufgestellt, dass die durch Su(dx) eingeleitete Endozytose des Notch-Rezeptors ubiquitinierungs-unabhängig initiiert wird, aber die Funktion der Internalisierung von Notch in das endosomale Lumen ubiquitinierungs-abhängig ist.

Für Dx konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass eine Mutation in der RING-H2-finger-Domäne zwar zu einer Unterdrückung der Dx Funktion führt, aber durch einen Austausch gegen die Dimerisierungsdomäne GST (Glutathione-S-Transferase) gerettet werden kann. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine Oligomerisierung von Dx durch die RING-H2-finger-Domäne, aber nicht die Ubiquitinierung des Notch-Rezeptors wichtig für die Funktion als positiver Regulator des Notch-Signalweges ist (Matsuno et al., 2002).

Dx interagiert darüber hinaus mit dem β -Arrestin Krz (Kurtz) und bildet so einen Komplex aus Notch-Dx und Krz der zu einer Polyubiquitinierung und einem Abbau des Notch-Rezeptors führt. Im Gegensatz dazu führt der Ausfall von *krz* zu einer verstärkten Akkumulation des Notch-Rezeptors an der apikalen Membran von Flügelimaginalscheiben, der mit einem *dx* Ausfall vergleichbar ist. Krz scheint für die Endozytose des Notch-Rezeptors benötigt zu werden, unterdrückt allerdings im Gegensatz zur Dx Überexpression die Notch-Aktivität (Hori et al., 2011; Mukherjee et al., 2005). Krz gilt daher als weiterer Faktor der die Ubiquitinierung und die Aktivierung des Notch-Rezeptors beeinflusst.

Die Zusammenhänge der Ubiquitinierung des Notch-Rezeptors durch die verschiedenen Ubiquitinligasen und den Auswirkungen auf die Aktivität des Notch-Signalweges sind sehr komplex und nicht im Detail verstanden. Die bisherigen Veröffentlichungen deuten allerdings darauf hin, dass einige Funktionen von Dx und Su(dx) bei der Regulation des Notch-Rezeptors ubiquitinierungs-unabhängig ausgeführt werden.

Im Gegensatz zu *Drosophila* gibt es in Säugetieren fünf Orthologe von Dx, die als DTX1-4 und DTX3L (Deltex 3 like) bezeichnet werden. DTX1, DTX2 und DTX4 verfügen über WWE-Domänen und können an die intrazelluläre Domäne des N1-Rezeptors binden. Im Gegensatz dazu verfügen DTX3 und DTX3L über keine WWE-Domänen und können nicht mit Notch interagieren (Chastagner et al., 2017; Kishi et al., 2001; Matsuno et al., 1998).

Die Effekte der Säugetierorthologe auf die Aktivität des Notch-Signalweges sind widersprüchlich. So konnte zum einen gezeigt werden, dass DTX1, DTX2 und DTX4 zu einer Unterdrückung der liganden-abhängigen Notch-Aktivierung während der T-Zell Entwicklung führen (Lehar and Bevan, 2006; Maillard et al., 2004). Zum andern konnte gezeigt werden, dass die murinen Dx Orthologe auch als Notch-Aktivatoren wirken können (Kishi et al., 2001). In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass DTX4 den N1-Rezeptor ubiquitinieren kann und zu einer Endozytose führt, die eine verstärkte proteolytische Spaltung des Rezeptors durch die Metalloprotease ADAM10 auslöst. In diesem Zusammenhang ist DTX4 ein positiver Regulator der liganden-abhängigen Notch-Aktivität (Chastagner et al., 2017).

Das Säugetierortholog von Su(dx) wird als AIP4/Itch bezeichnet. AIP4/Itch verfügt über WW-Domänen, kann allerdings nicht direkt an den N1-Rezeptor binden. Die Interaktion mit Notch wird über DTX1 als Adapterprotein eingeleitet. AIP4/Itch löst eine Polyubiquitinierung von N1 aus, die zu einem Abbau des Rezeptors im Lysosom führt (Chastagner et al., 2008). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass AIP4/Itch ebenfalls zu einer Ubiquitinierung und einem Abbau von DTX1 führt (Chastagner et al., 2006).

2 Ziele der Arbeit

Um zu überprüfen, wie stark die Ubiquitinierung an der Regulation des Notch-Rezeptors beteiligt ist, soll ein transgener Rezeptor hergestellt werden, der über keine intrazellulären Lysine verfügt. Mit diesem Rezeptor sollen folgende Fragestellungen überprüft werden:

Welchen Auswirkungen hat die Modifizierung des Rezeptors auf die Aktivierung des Notch-Signalweges?

Welchen Einfluss hat der Austausch der Lysine auf die Endozytose und den endosomalen Transport des Rezeptors?

Welchen Einfluss haben die E3-Ligasen D \times und Su(dx) auf die Aktivierung und den Transport des Rezeptors?

Um zu überprüfen wie stark die Aktivierung des Notch-Signalweges durch die Modifizierung des Rezeptors beeinflusst wird, soll eine Analyse mit Mutanten unterschiedlicher Komponenten des Notch-Signalweges durchgeführt werden.

Um den Einfluss der Lysine auf die Endozytose und den endosomalen Transport des Rezeptors zu testen, sollen Lokalisationsstudien in der Flügelimaginalscheibe von *D. melanogaster* durchgeführt werden.

3 Ergebnisse

3.1 Herstellung und Expression eines lysinmutanten *Drosophila* Notch-Rezeptors

In vorherigen Veröffentlichungen wurden zahlreiche Untersuchungen zu verschiedenen E3-Ligasen durchgeführt die den Notch-Rezeptor ubiquitinieren. Dabei konnte ein direkter Einfluss auf die Aktivierung und den Transport des Notch-Rezeptors nachgewiesen werden (Übersicht in (Moretti and Brou, 2013)). Durch die teils redundanten Funktionen dieser Ligasen ist es schwer, möglich Rückschlüsse über die generelle Funktion der Ubiquitinierung des Notch-Rezeptors zu ziehen.

Da für diese Fragestellung die Untersuchung einzelner Ubiquitinligasen ungeeignet ist, sollte ein Notch-Rezeptor hergestellt werden, an den kein Ubiquitin gekoppelt werden kann. Ubiquitin wird hauptsächlich an Lysine des Zielproteins gekoppelt. Aus diesem Grund sollten alle intrazellulären Lysine des Rezeptors durch die strukturell ähnliche Aminosäure Arginin ausgetauscht werden. Durch die strukturelle Ähnlichkeit zwischen Lysin und Arginin soll einer möglichen Konformationsänderung des Notch-Rezeptors durch den Austausch der Aminosäuren vorgebeugt werden (Abb. 5).

Der *D. melanogaster* Notch-Rezeptor verfügt über 27 intrazelluläre Lysine. Es sollte demzufolge ein Konstrukt hergestellt werden, in dem alle 27 intrazellulären Lysine durch Arginine ausgetauscht wurden. Um den transgenen Rezeptor von dem endogenen Rezeptor unterscheiden zu können, wurde ein C-terminaler HA-Tag angefügt. Der hergestellte Rezeptor wird als N^{K2R}-HA bezeichnet (Abb. 5 B). Als Kontrolle dient ein Rezeptor, der über alle 27 Lysine in der intrazellulären Domäne verfügt und ebenfalls einen C-terminalen HA-Tag aufweist. Dieser Rezeptor wird als N-HA bezeichnet (Abb. 5 A). Beide Konstrukte verfügen über eine vorgeschaltete UAS (upstream activating sequence) Sequenz und ermöglichen die gewebespezifische Expression mit Hilfe des GAL4/UAS Expressionssystem (Brand and Perrimon, 1993; Phelps and Brand, 1998) (Material und Methoden 7.2.16.3). Die Konstrukte

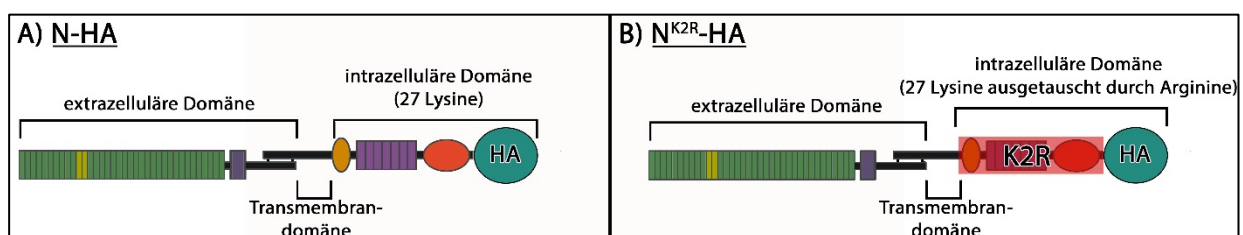


Abb. 5: Darstellung der Konstrukte N-HA und N^{K2R}-HA. Bei N-HA handelt es sich um einen „full length“ *Drosophila* Notch-Rezeptor mit einem C-terminalen HA-Tag (A) Bei N^{K2R}-HA handelt es sich um einen *Drosophila* Notch Rezeptor in dem alle 27 intrazellulären Lysine durch Arginine ausgetauscht wurden. N^{K2R}-HA verfügt ebenfalls über einen C-terminalen HA-Tag (B). Beide Konstrukte wurden in das Genom von *Drosophila* integriert und verfügen über eine vorgeschaltete UAS-Sequenz mit der eine gewebespezifische Expression durch das GAL4/UAS Expressionssystem ermöglicht wird.

wurden stabil in das Genom der Fliege integriert. Um Beeinflussungen der Expressionsstärke durch Positionseffekte zu vermeiden, wurden innerhalb der Experimente nur Rezeptoren miteinander verglichen, die in der gleichen genomischen attP-„landing site“ integriert wurden (Bischof et al., 2007).

3.2 Analyse der Aktivierung des Notch-Signalweges durch N-HA und N^{K2R}-HA

Um die Aktivität dieser Rezeptoren zu testen wurden, Flügelimaginalscheiben des späten dritten Larvenstadiums von *D. melanogaster* verwendet. Die gut untersuchten Musterbildungsvorgänge und der Aufbau als einschichtiges Epithel bieten optimale Bedingungen für eine fluoreszenzmikroskopische Analyse der Notch-Aktivität. Als Aktivitätsmarker wird in diesem Gewebe die Expression des Proteins Wingless (Wg) verwendet. *wg* ist an der dorso-ventralen Grenze (D/V Grenze) der Flügelimaginalscheibe ein direktes Zielgen des Notch-Signalweges (Klein, 2001). Als weitere Marker für die Notch-Aktivierung wurden die Reportergenkonstrukte Gbe+Su(H)-lacZ (Grainyhead binding element + Suppressor of Hairless) (in dieser Arbeit als NRE-lacZ bezeichnet) (Furriols and Bray, 2001) und NRE-GFP (Notch responsive element-green fluorecent protein) verwendet (Housden et al., 2012) (Material und Methoden 7.2.16.5). Die Aktivität der Reporter überlappt mit der Wg Expression an der D/V Grenze. Darüber hinaus zeigen die Reporter die gesamte Aktivität des Signalweges auch außerhalb der D/V Grenze an (Abb. 6).

Die Expression von N-HA und N^{K2R}-HA wurde unter Kontrolle des *ptc(patch)*-GAL4 Treibers konstitutiv durchgeführt. Die *ptc*-Expressionsdomäne verläuft von der anterior-posterioren Grenze (A/P Grenze) mit abnehmender Expressionsstärke in das anteriore Kompartiment der Flügelimaginalscheibe (Abb. 7 A u. A'). Die Expression von N-HA führt zu einer leichten ektopischen Wg Expression (Abb. 7 B). Die ektopische Notch-Aktivität lässt sich ebenfalls mit Hilfe des NRE-lacZ Konstruktes detektieren (Abb. 7 B'). Im Vergleich dazu führt die Expression von N^{K2R}-HA zu einer massiven ektopischen Expression von Wg und des Reporters NRE-lacZ (Abb. 7.C u. C'). Darüber hinaus wird durch die N^{K2R}-HA Expression eine deutliche Überproliferation der Flügelimaginalscheibe ausgelöst (Abb. 7 C, Pfeile).

Die Aktivierung des Zielgens *wg*, sowie die starke Aktivierung des Reportergenkonstruktes NRE-lacZ, als auch die Überproliferation der Flügelimaginalscheiben deuten darauf hin, dass der Austausch der intrazellulären Lysine von Notch zu einer verstärkten Aktivierung des Signalweges führt. Dabei beschränkt sich die Aktivierung durch N-HA und N^{K2R}-HA auf die

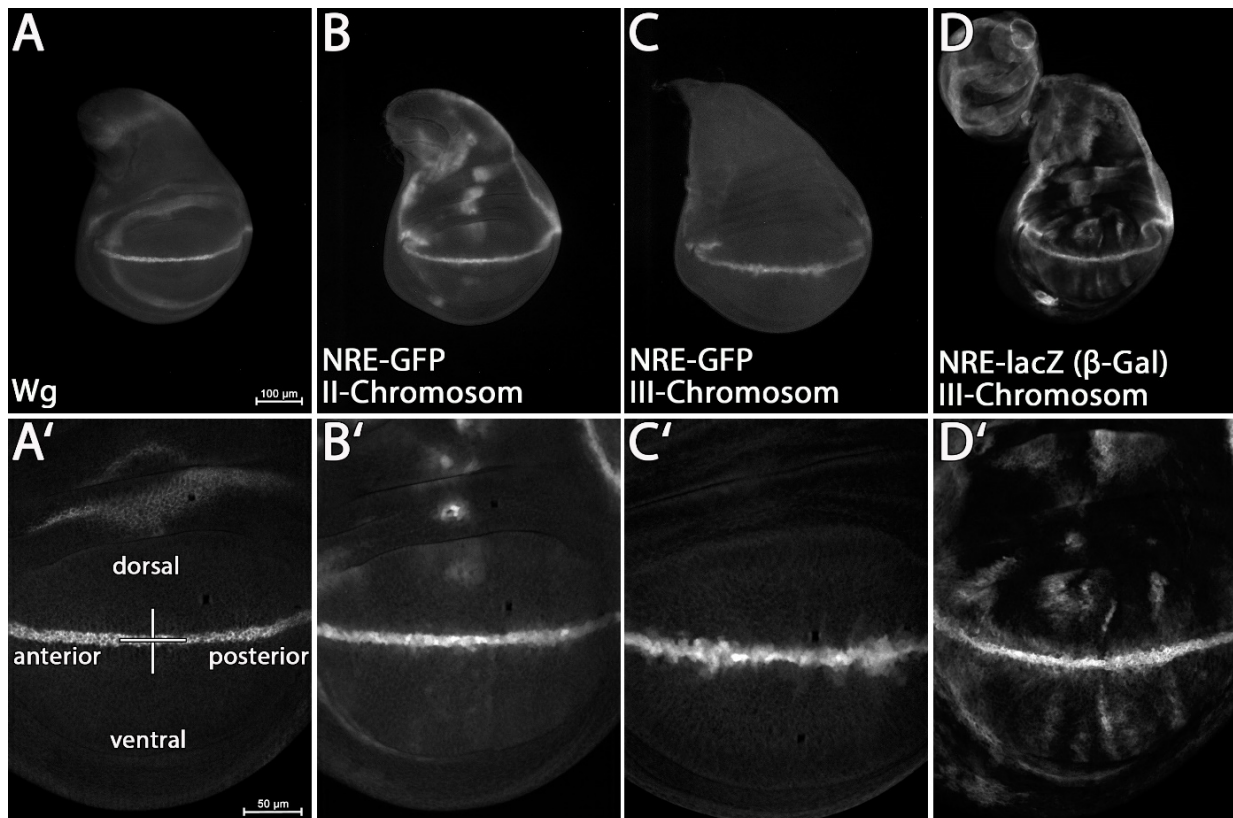


Abb. 6: Darstellung verschiedener Aktivitätsmarker des Notch-Signalweges in der Flügelimaginalscheibe. *wg* ist ein direktes Zielgen des Notch-Signalweges an der D/V Grenze (A u. A'). Mit Hilfe der NRE-Konstrukte kann die Notch-Aktivität auch außerhalb der D/V Grenze detektiert werden (B-D'). Die Insertion von NRE-GFP auf dem zweiten Chromosom zeigt ein stärkeres Signal im Vergleich zu NRE-GFP auf dem dritten Chromosom (B-C'). Die sensitivste Darstellung der Notch-Aktivität lässt sich mit Hilfe von NRE-lacZ und einer anschließenden Antikörperfärbung gegen β -Gal erreichen (D u. D').

ptc-Expressionsdomäne und lässt sich klar zu den benachbarten Zellen abgrenzen (Abb. 7 B-C'', Vergrößerungen). Es handelt sich daher um eine zellautonome Aktivierung des Notch-Signalweges.

Um die Unterschiede der Aktivierung zwischen N^{K2R} -HA und N-HA näher zu analysieren, wurde auf ein temperaturregulierbares GAL4/UAS-Expressionssystem zurückgegriffen (McGuire et al., 2003) (Material und Methoden 7.2.16.3). Dabei ermöglicht die Verwendung des Temperatur-sensitiven Repressors GAL80^{ts} die zeitlich begrenzte Expression der Konstrukte. Bei einer Temperatur von 18°C wird die Expression der Konstrukte durch GAL80^{ts} unterdrückt. Die Unterdrückung kann durch einen Temperaturwechsel auf 29°C aufgehoben werden. Die Expression von N-HA und N^{K2R} -HA erfolgte unter Kontrolle des *hh*-GAL4 Treibers im posterioren Kompartiment der Flügelimaginalscheiben (Tanimoto et al., 2000). Beide Konstrukte wurden für 14,5h exprimiert. Die Notch-Aktivität wurde mit Hilfe des NRE-GFP Reporters dargestellt. Bei dieser geringen Expressionsdauer kann die durch N^{K2R} -HA ausgelöste Überproliferation größtenteils unterbunden werden (Abb. 8 B-B''). Nach 14,5h N-HA Expression ist bereits eine leichte ektopische Aktivierung von NRE-GFP zu erkennen (Abb. 8 A).

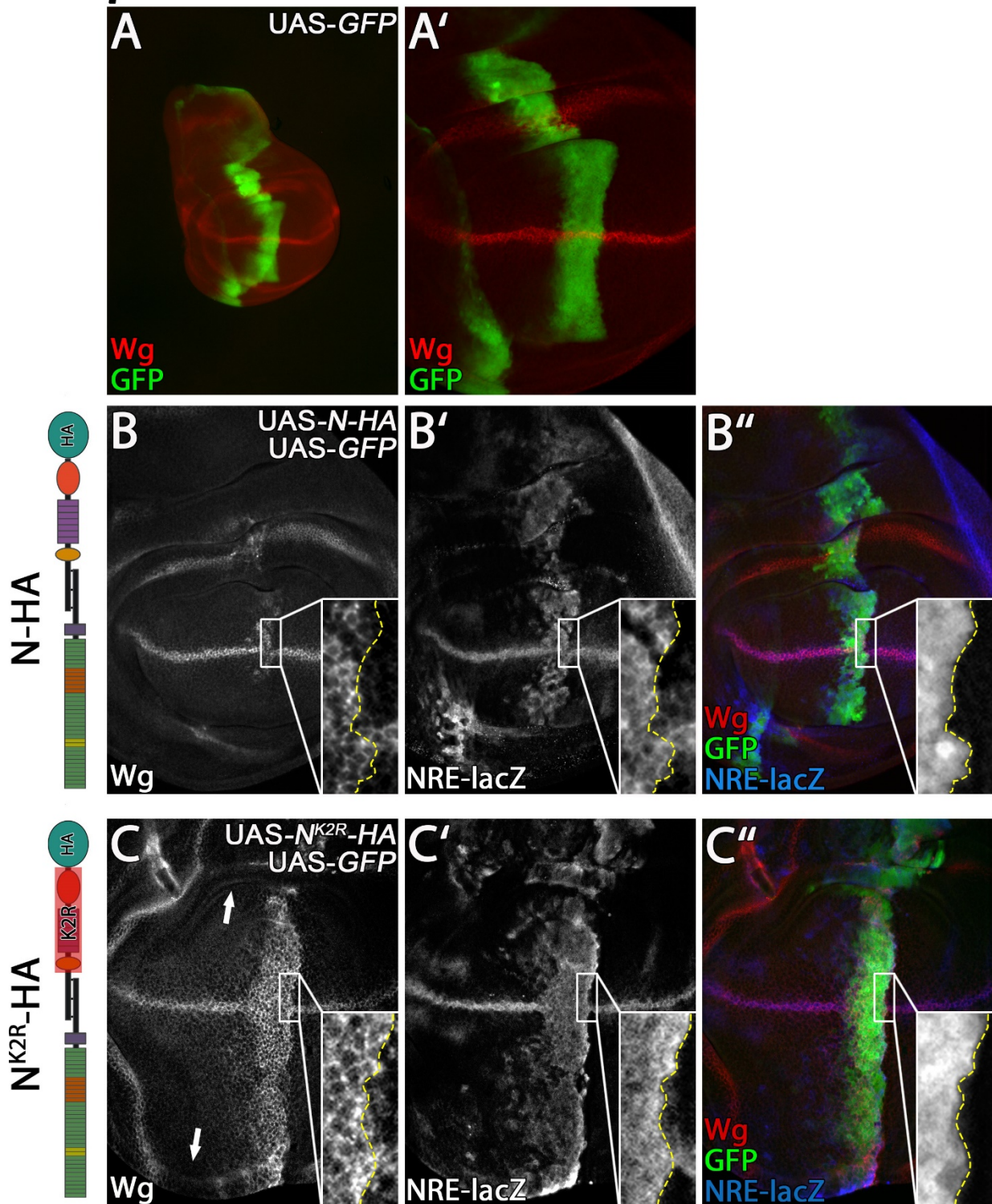
***ptc*-GAL4**

Abb. 7: Konstitutive Expression von N-HA und N^{K2R}-HA in Flügelimaginalscheiben. Die Expression von N-HA und N^{K2R}-HA erfolgte unter Kontrolle des *ptc*-GAL4 Treibers (A u.A'). Die Expressionsdomäne von *ptc*-GAL4 wurde mit UAS-GFP dargestellt. Als Marker für die Notch-Aktivität wurde eine Wg Antikörperfärbung und das NRE-lacZ Konstrukt verwendet (β -Gal Antikörperfärbung). Die gestrichelte gelbe Linie in der Vergrößerung gibt die posteriore Grenze der *ptc*-Expressionsdomäne an. Die Expression von N-HA führt zu einer leichten ectopischen Wg und NRE-lacZ Expression (B-B''). Die Expression von N^{K2R}-HA führt zu einer starken ectopischen Expression von Wg und NRE-lacZ (C-C'') und einer Überproliferation der Flügelimaginalscheibe (C Pfeile).

Eine Auswirkung auf die Wg Expression ist zu diesem Zeitpunkt noch nicht zu beobachten (Abb. 8 A', Vergrößerung). Die Expression von N^{K2R}-HA führt zu einem deutlichen Anstieg des NRE-GFP Signals (Abb. 8 B) und einer leichten ektopischen Expression von Wg (Abb. 8 B', Vergrößerung).

Um die Aktivität des Notch-Signalweges zu quantifizieren, wurde die Fluoreszenzintensität des NRE-GFP Konstruktes gemessen. Die Messungen wurden im ventralen Flügelfeld der Flügelimaginalscheibe durchgeführt, da es in diesem Bereich zu den geringsten Schwankungen innerhalb einer Messreihe kommt (Abb. 8 A u. B, rote Umrandung). Um mögliche Schwankungen der Fluoreszenzintensität zwischen verschiedenen Flügelimaginalscheiben einer Messreihe auszugleichen, wurde bei jeder Messung zusätzlich eine Messung des anterioren Bereiches des Flügelfeldes durchgeführt. Da in diesem Bereich keine Expression der Notch-Konstrukte stattfindet (Abb. 8 A'' u. B''), kann diese Messung für die Normalisierung der posterioren Fluoreszenzintensität verwendet werden. Das endogene Verhältnis zwischen anterior und posterior in nicht manipulierten Kontrollscheiben beträgt 0,91 und ist damit nahezu ausgeglichen (Abb. 8 C). Im Verhältnis zur endogenen Notch-Aktivität führt die 14,5 stündige Expression von N-HA zu einer 1,5-fachen Erhöhung der Aktivität. Im Vergleich dazu sorgt die Expression von N^{K2R}-HA für eine 4-fachen Erhöhung der Notch-Aktivität (Abb. 8 C).

Die Ergebnisse zeigen, dass N^{K2R}-HA im Vergleich zu N-HA sowohl qualitativ als auch quantitativ eine verstärkte Aktivierung des Notch-Signalweges in Flügelimaginalscheiben auslöst.

Um die Aktivierung ebenfalls in einem Zellkultur Experiment zu überprüfen, wurde auf einen Luciferase-Assay in *Drosophila* Schneiderzellen (S2) zurückgegriffen. Als Marker für die Aktivität wurde das Konstrukt NRE-Fluc (Firefly luciferase) verwendet. Im Gegensatz zu Flügelimaginalscheiben kommt es in S2 Zellen zu keiner endogenen Expression von Notch und des Liganden Delta (Fehon et al., 1990). Der Ligand Serrate wird nur in einem sehr geringen Ausmaß exprimiert (Saj et al., 2010). In den folgenden Experimenten wurden ausschließlich die transgenen Notch-Rezeptoren exprimiert. Da die Liganden nicht bzw. nur sehr gering vorhanden sind, wird mit Hilfe dieses Assays hauptsächlich die liganden-unabhängige Aktivierung der Notch-Rezeptoren angezeigt. Die erhobenen Werte wurden auf die Aktivität von N-HA normalisiert.

Verglichen mit der schwachen basalen Aktivität des NRE-Fluc Konstruktes, kommt es bei N-HA zu einem leichten aber nicht signifikanten Anstieg der Aktivität. Gegenüber N-HA führt die

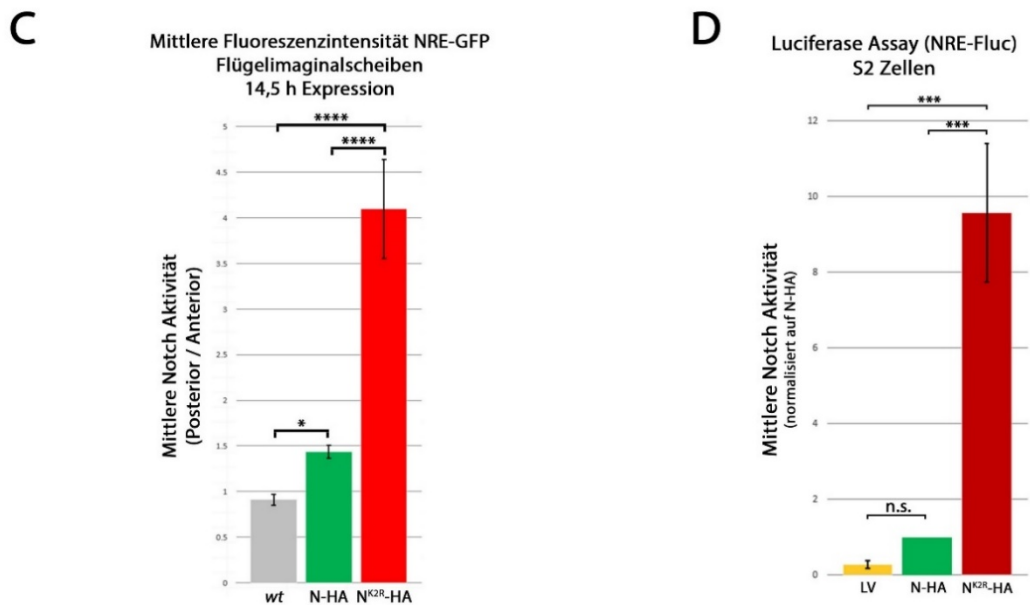
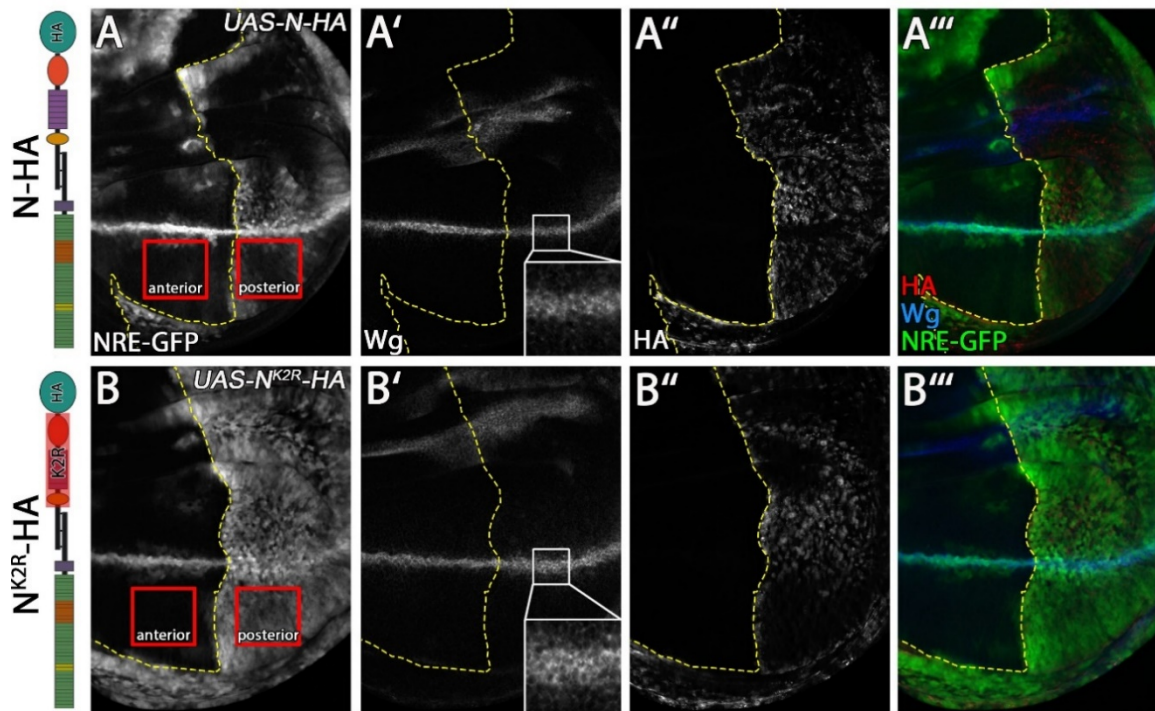
hh-GAL4, tub-GAL80^{ts} 14,5 h Expression

Abb. 8: Aktivitätsmessung von N-HA und N^{K2R}-HA. Die Expression von N-HA und N^{K2R}-HA erfolgte für 14,5h unter Kontrolle des *hh*-GAL4 Treibers mit *tub*-GAL80^{ts} im posterioren Kompartiment von Flügelimaginalscheiben. Die gestrichelte gelbe Linie markiert die Expressionsgrenze der Notch-Rezeptoren (HA Antikörperfärbung). Die Expression der Rezeptoren für 14,5h führt zu einem ektopischen NRE-GFP Signal, aber zu keiner erkennbaren Überproliferation (A u. B). N^{K2R}-HA führt zu einer leichten ektopischen Wg Expression (B'). Eine Fluoreszenzintensitätsmessung des NRE-GFP Signals wurde im ventralen Kompartiment der Flügelimaginalscheiben sowohl in der posterioren *hh*-Expressionsdomäne, als auch im anterioren Bereich durchgeführt (A u. B rote Umrandungen). Die anterioren Messungen wurde als interne Referenzen der Imaginalscheiben verwendet. Bei der Aktivitätsmessung wurde das posteriore Signal im Verhältnis zum anterioren Signal aufgetragen. N-HA und N^{K2R}-HA führen im Vergleich zur endogenen Notch-Aktivität zu einer signifikanten Erhöhung der Aktivität. Die Aktivierung des Signalweges durch N^{K2R}-HA ist im Vergleich zu N-HA um ein Vielfaches erhöht (*wt*: n=9 / N-HA: n=7 / N^{K2R}-HA: n=11) (C). Eine Aktivitätsmessung von N-HA und N^{K2R}-HA wurde ebenfalls mit Hilfe eines Luciferase-Assays in S2 Zellen durchgeführt. Als Aktivitätsmarker wurde NRE-Fluc verwendet. In S2 Zellen gibt es keine endogene Expression von Notch und dem Liganden Delta. Serrate wird nur in einem sehr geringen Ausmaß exprimiert. Die angezeigte Aktivität wird daher hauptsächlich liganden-unabhängig erzeugt. Die Werte der Messungen wurden auf die Aktivität von N-HA normalisiert. N-HA führt zu einer leichten, aber nicht signifikanten Aktivitätssteigerung im Vergleich zum Leervektor (LV). N^{K2R}-HA führt zu einer starken Aktivierung im Vergleich zu N-HA (LV (Leervektor) / N-HA / N^{K2R}-HA: n=3) (D). Signifikanztest: One-way ANOVA ($p > 0,05$ (n.s.) / $p < 0,05$ (*) / $p < 0,001$ (***) / $p < 0,0001$ (****)).

Expression von N^{K2R}-HA zu einem sehr starken Anstieg der Notch-Aktivität (Abb. 8 D). Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass N^{K2R}-HA stark liganden-unabhängig aktiviert wird. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung könnten strukturelle Veränderungen des Rezeptors durch den Austausch der Lysine sein. Sollte der Rezeptor beispielsweise bei der Synthese nicht vollständig gefaltet werden, könnte die intrazelluläre Domäne unreguliert in den Zellkern gelangen und dort zu einer ektopischen Expression der Zielgene führen. Ähnliche Auswirkungen wären auch bei einer strukturell bedingten unkontrollierten Degradation denkbar.

Um zu überprüfen, ob die starke Aktivierung von N^{K2R}-HA durch einen möglichen Synthetisierungs- oder Degradierungsdefekt des Rezeptors hervorgerufen wird, wurde das Protein mit Hilfe eines Western Blots analysiert. Die Konstrukte N-HA und N^{K2R}-HA wurden hierzu für 24h unter Kontrolle des *tub*-GAL4 Treibers exprimiert. Anschließend wurden Larven des dritten Stadiums lysiert und für die Analyse verwendet. Der Notch-Rezeptor wird nach der Interaktion mit einem Liganden proteolytisch gespalten und auf diese Weise aktiviert. Aus diesem Grund sollten mit Hilfe des Western Blots sowohl der ungeschnittene Rezeptor („full length“) bei ca. 300 kDa, als auch die geschnittene intrazelluläre Domäne (NICD) bei ca. 110 kDa, sowie weitere Intermediärprodukte zu identifizieren sein (Kidd et al., 1998; Wesley and Saez, 2000).

Unter Verwendung eines HA Antikörpers lassen sich verschiedene Proteinbanden für die Rezeptoren identifizieren. Bei beiden Konstrukten ist dabei besonders die Bande auf Höhe des ungeschnittenen Rezeptors stark ausgeprägt. Im Gegensatz dazu lassen sich auf Höhe der intrazellulären Domäne Unterschiede zwischen N-HA und N^{K2R}-HA feststellen. Die NICD Bande ist im Vergleich zu N-HA bei N^{K2R}-HA stärker ausgeprägt (Abb. 9 A). Um diese Beobachtung quantitativ zu überprüfen, wurde die Bandenstärke der Western Blots gemessen. Für die Quantifizierung wurden die Banden für NICD und „full length“ Notch herangezogen. Normalisiert wurde dabei auf die Ladekontrolle alpha-Catenin und die Gesamtproteinmenge von N-HA, die sich aus der Summe des „full length“ Rezeptors und NICD zusammensetzt (Abb. 9 B). Durch die Expression der Rezeptoren kommt es bei N^{K2R}-HA, im Vergleich zu N-HA, zu einem signifikanten Anstieg der NICD Proteinmenge (Abb. 9 B).

Zusammengefasst führt der Austausch der intrazellulären Lysine von Notch zu einer starken ektopischen Aktivierung des Notch-Signalweges. Die Synthese des „full length“ Rezeptors scheint durch den Lysinaustausch nicht beeinflusst zu werden. Zu beobachten ist allerdings eine Akkumulation der intrazellulären Domäne. Diese Akkumulation liefert eine mögliche Erklärung

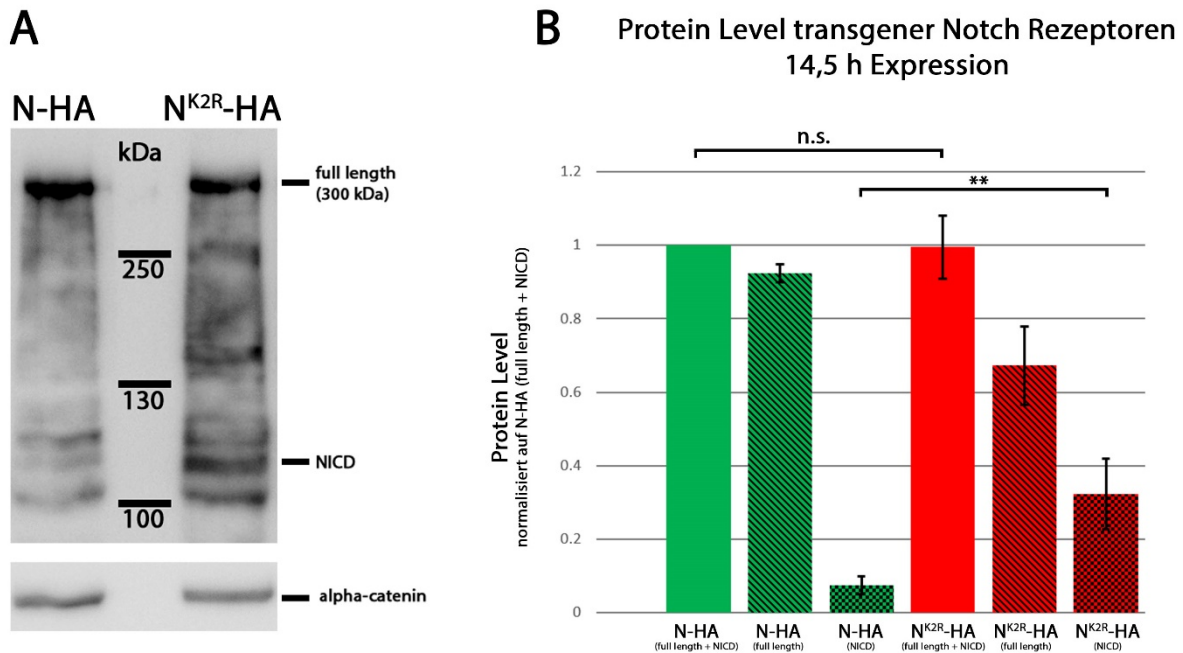


Abb. 9: Analyse der transgenen Notch-Proteine. N-HA und N^{K2R}-HA wurden unter Kontrolle des *tub*-GAL4 Treibers mit *tub*-GAL80^{ts} für 24h exprimiert. Die Larvenlysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Eine HA Antikörperfärbung des Westen Blots zeigt die verschiedenen Proteinprodukte des N-HA und N^{K2R}-HA Rezeptors an. Bei N-HA und N^{K2R}-HA können sowohl der „full length“ Rezeptor, als auch die geschnittene intrazelluläre Domäne, sowie weitere Intermediärprodukte identifiziert werden. Als Ladekontrolle wurde eine Antikörperfärbung gegen alpha-Catenin durchgeführt (A). Für die Quantifizierung der Proteinmenge des Notch-Rezeptors wurden ausschließlich die „full-length“ Band, sowie die NICD Bande verwendet. Als gesamte Proteinmenge wurde die Summe aus NICD und „full-length“ Rezeptor herangezogen. Als Referenz der Proteinmengen wurde alpha-Catenin verwendet. Alle Messungen wurden auf die Gesamtproteinmenge von N-HA normalisiert. Während es bei der Gesamtproteinmenge zwischen N-HA und N^{K2R}-HA zu keinem signifikanten Unterschied kommt, lässt sich bei N^{K2R}-HA eine stärkere Akkumulation von NICD identifizieren (N-HA / N^{K2R}-HA: n=4) (B). Signifikanztest: One-way ANOVA ($p \geq 0,05$ (n.s.) / $p < 0,01$ (**)).

für die starke Aktivierung des Notch-Signalweges in der Flügelimaginalscheibe. Da die Aktivierung von N^{K2R}-HA in Zellkulturexperimenten zu einem Großteil liganden-unabhängig erzeugt wird, stellt sich die Frage ob diese Form der Aktivierung auch *in vivo* auftritt.

3.3 Untersuchung der liganden-unabhängigen Aktivierung des N^{K2R}-HA Rezeptors

Ein Ausfall von *mib1* führt zu einer Unterdrückung der Aktivierung der Liganden und somit zum Verlust der Notch-Aktivierung (Le Borgne et al., 2005; Pitsouli and Delidakis, 2005; Wang and Struhl, 2005). *mib1* mutante Flügelimaginalscheiben sind stark verkleinert und verfügen über keine Wg Expression an der D/V Grenze (Abb. 10 A Pfeil). Da die Unterdrückung der Notch-Aktivität durch die mangelnde Aktivierung der Liganden ausgelöst wird, können mit Hilfe der *mib1*^{EY09780} Mutante Rückschlüsse über die liganden-abhängige Notch-Aktivierung geschlossen werden (Abb. 10 D). Um zu testen, ob die Notch-Aktivierung auch bei der Expression von N^{K2R}-HA unterdrückt werden kann, wurden N-HA und N^{K2R}-HA unter Kontrolle des *ci*-GAL4

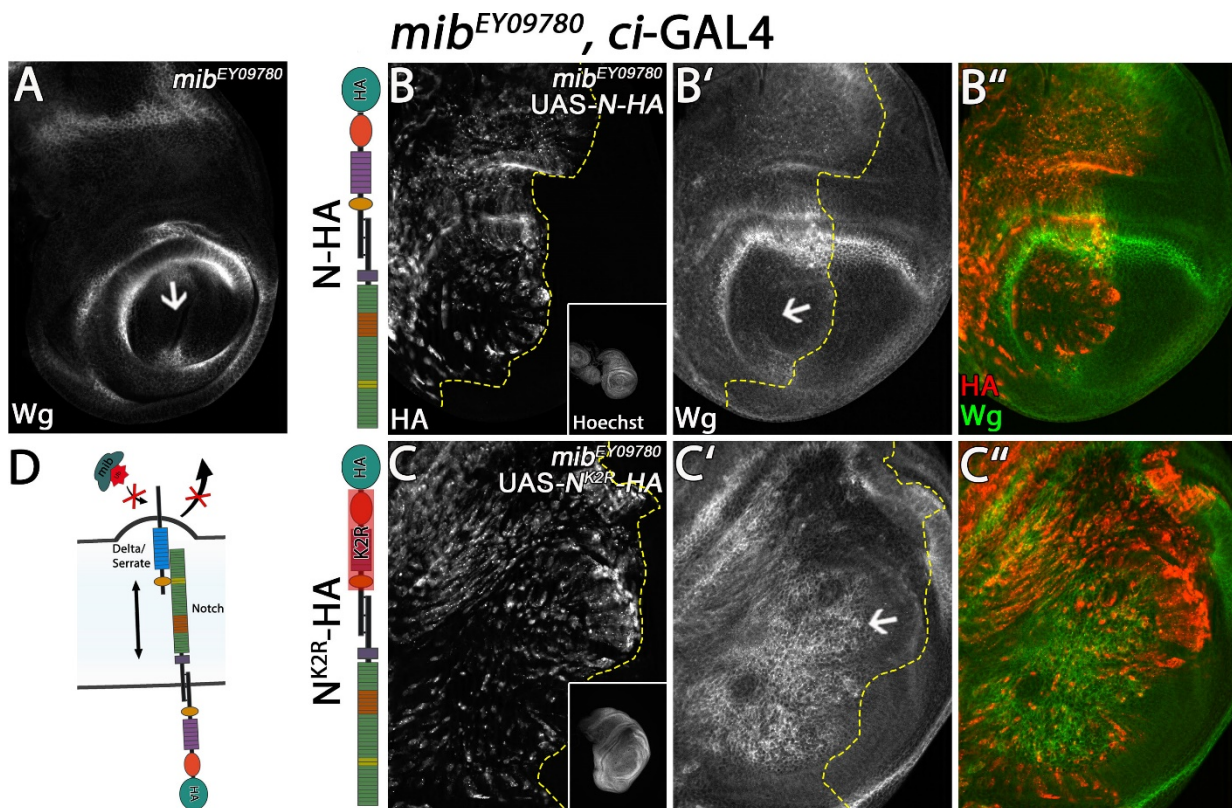


Abb. 10: Aktivierung von N-HA und N^{K2R}-HA in *mib^{EY09780}* mutanten Flügelimaginalscheiben. Mib1 ist an der Ubiquitinierung und der Aktivierung der Notch-Liganden beteiligt (D). Der Ausfall von *mib1* führt zu einem Verlust der Wg Expression an der D/V Grenze (A Pfeil). Die Expression der transgenen Notch-Rezeptoren erfolgte konstitutiv unter Kontrolle des *ci-GAL4* Treibers in *mib^{EY09780}* mutanten Flügelimaginalscheiben (B-C''). Die gestrichelte gelbe Linie markiert die Expressionsgrenze der Rezeptoren. Durch die Expression von N-HA kommt es zu keiner ektopischen Wg Expression (B', Pfeil). N^{K2R}-HA führt hingegen zu einer starken ektopischen Wg Expression (C', Pfeil) und einer Überproliferation des anterioren Kompartimentes (C, Box). N^{K2R}-HA führt zu einer deutlichen Mib1 unabhängigen Notch-Aktivierung.

Treibers (*cubitus interruptus*) (Croker et al., 2006) im anterioren Kompartiment von *mib^{EY09780}* mutanten Flügelimaginalscheiben konstitutiv exprimiert. Die Expression von N-HA führt weiterhin zu der Ausbildung verkleinerter Imaginalscheiben (Abb. 10 B, Box) und zur Unterdrückung der Wg Expression an der D/V Grenze (Abb. 10 B-B'', Pfeil). Die Expression von N^{K2R}-HA führt hingegen zu einer ektopischen Wg Expression (Abb. 10 C-C'', Pfeil) und einer Überproliferation der Imaginalscheibe (Abb. 10 C, Box).

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Expression von N^{K2R}-HA zu einer Mib1 unabhängigen Aktivierung des Signalweges führt.

Um die direkten Auswirkungen der Liganden auf die Aktivierung des Signalweges durch N^{K2R}-HA zu testen, wurde eine klonale Analyse mit den Allelen *Dl^{rev10}* und *Ser^{RX82}* (Micchelli et al., 1997) in Flügelimaginalscheiben durchgeführt. Um Zellklone zu erzeugen, wurde das Flp/FRT-System verwendet (Golic and Lindquist, 1989) (Material und Methoden 7.2.16.4). N-HA und N^{K2R}-HA wurden konstitutiv unter Kontrolle des *ptc-Gal4* Treibers exprimiert. *Dl^{rev10} Ser^{RX82}* Zellklone sind durch das Fehlen des RFP Markers gekennzeichnet.

In *Dl^{rev10} Ser^{RX82}* Zellklonen kommt es zu einer Unterbrechung der endogenen Notch-Aktivität (Abb. 11 A-A‘‘, Pfeilkopf). Eine ektopische Notch-Aktivität tritt an den Klongrenzen auf und beschränkt sich auf einen Zelldurchmesser innerhalb der Zellklone (Abb. 11 A‘, Pfeil). Diese Aktivierung des Notch-Signalweges wird über die Aufhebung der *cis*-Inhibition innerhalb mutanter Zellen an den Klongrenzen ausgelöst (Micchelli and Blair, 1999; Miller et al., 2009). Um Aussagen über eine mögliche Aktivierung der transgenen Notch-Konstrukte in *Dl^{rev10} Ser^{RX82}* mutanten Zellklonen zu treffen, muss demzufolge die Aktivität des Reporters mindestens zwei Zelldurchmesser von der Klongrenze entfernt beobachtet werden.

Die Expression von N-HA führt innerhalb der Klone zu keiner Aktivierung des Notch-Reporters (Abb. 11 B-B‘‘, Pfeil). Auch die Aktivität an der D/V Grenze wird innerhalb der Klone unterbrochen (Abb. 11 B‘, Box). Im Gegensatz dazu führt die Expression von N^{K2R}-HA zu einer starken Aktivierung innerhalb der mutanten *Dl^{rev10} Ser^{RX82}* Klone. Diese Aktivität erstreckt sich über die gesamte Expressionsdomäne und ist ebenfalls an der D/V Grenze zu beobachten (Abb. 11 C-C‘‘, Pfeil und Box). Die Beobachtungen legen nahe, dass der N^{K2R}-HA auch in Flügelimaginalscheiben liganden-unabhängigen aktiviert wird und somit eine starke Aktivität des Notch-Signalweges auslöst.

Um die liganden-unabhängige Aktivierung des Signalweges durch N^{K2R}-HA auch auf Ebene des Rezeptors zu belegen, wurden Notch-Konstrukte hergestellt bei denen die Interaktion mit den Liganden unterdrückt wird. Die Liganden Dl und Ser interagieren mit dem Rezeptor über die EGF-Wiederholungen 11 und 12 (Rebay et al., 1991). Um die Interaktion zu unterbinden, wurden in N-HA und N^{K2R}-HA diese EGF-Wiederholungen deletiert (Abb. 12 A). Wenn N^{K2R}-HA liganden-unabhängig aktiviert wird, sollte die unterbrochene Interaktion mit den Liganden keine Auswirkung auf die starke Aktivierung des Signalweges haben. Im Gegensatz dazu sollte die liganden-abhängige Aktivierung durch N-HA unterdrückt werden. N^{ΔEGF(11-12)}-HA und N^{ΔEGF(11-12)-K2R}-HA wurden für 24h im posterioren Kompartiment der Flügelimaginalscheiben exprimiert (Abb. 12 C-D‘‘). Eine Expression für 14,5h zeigte keine starken Veränderungen des NRE-GFP Signals. Aus diesem Grund wurde die Expression auf 24h erhöht. Bei der Expression von N^{ΔEGF(11-12)}-HA kommt es zu einer ektopischen Notch-Aktivierung in einzelnen Zellen (Abb. 12 C‘, roter Pfeil), während die Aktivität in großen Teilen der Expressionsdomäne unterdrückt wird (Abb. 12 C‘). Zu beobachten ist ebenfalls eine Unterdrückung der endogenen Notch-Aktivität, die sich durch die Unterbrechung des NRE-GFP Signals an der D/V Grenze darstellt (Abb. 12 C‘, weißer Pfeil). Während N-HA und N^{K2R}-HA eine zellautonome Aktivierung auslösen, kommt es bei N^{ΔEGF(11-12)}-HA zu einer nicht-zellautonomen Aktivierung von einem Zelldurchmesser an

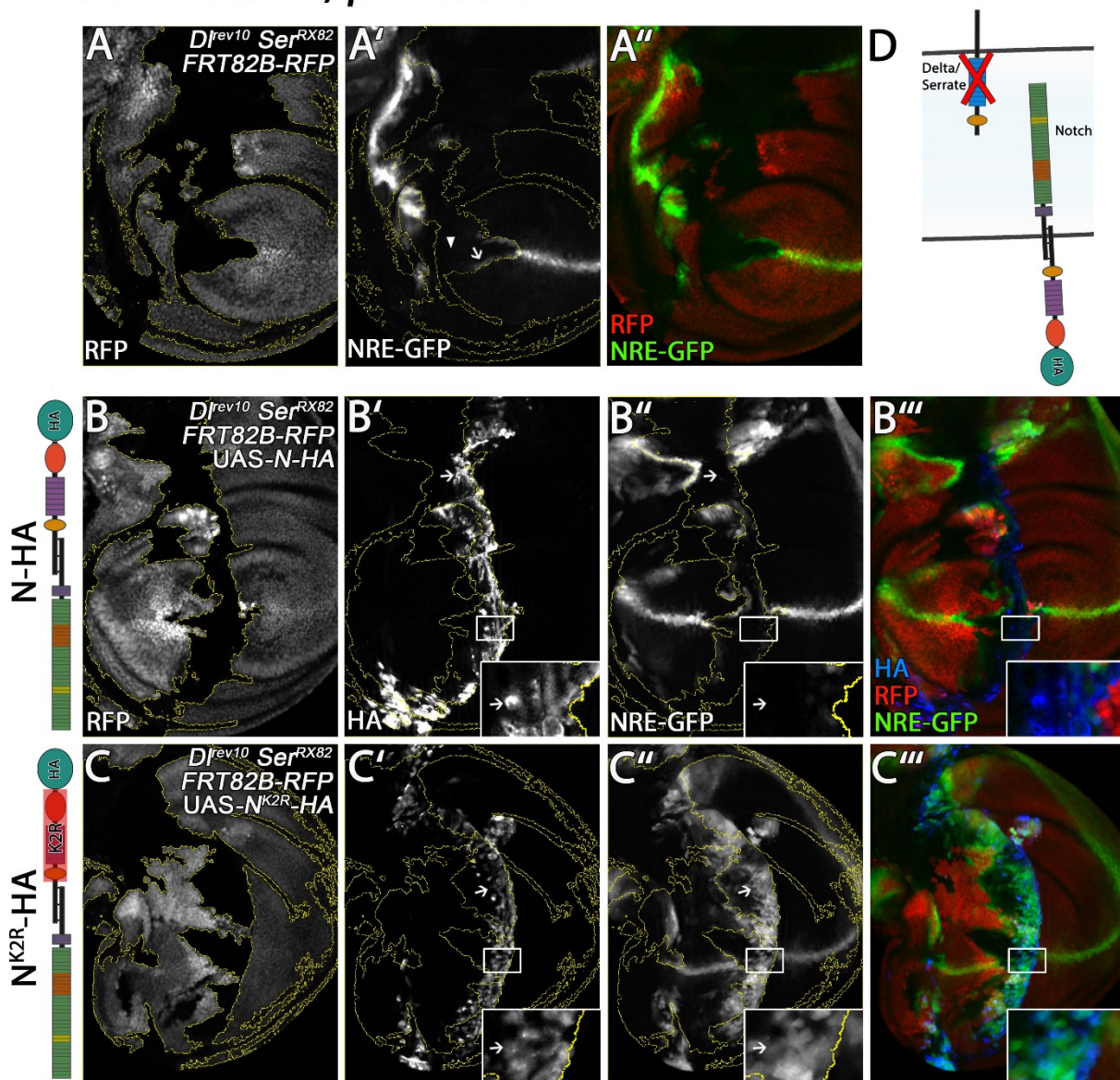
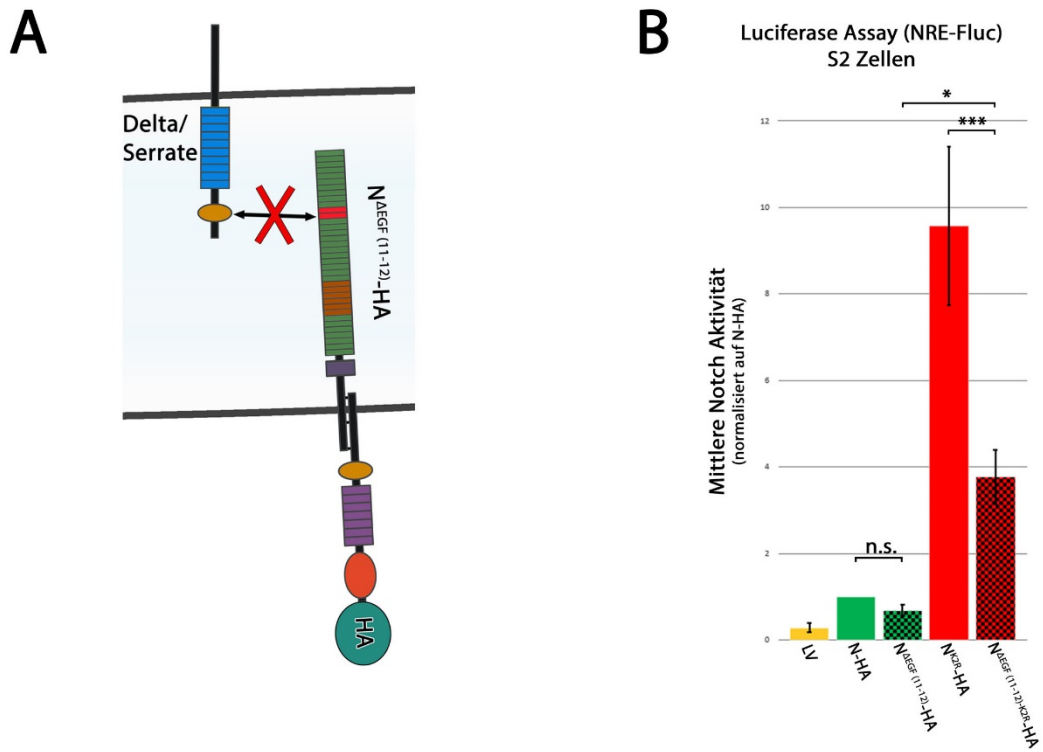
Dl^{rev10} Ser^{RX82}, ptc-GAL4

Abb. 11: Aktivierung von N-HA und N^{K2R}-HA in *Dl^{rev10} Ser^{RX82}* mutanten Zellklonen in Flügelimaginalscheiben. Durch den Verlust der Liganden *Dl* und *Ser* wird die liganden-abhängige Aktivierung des Notch-Signalweges unterbrochen (D). Zellklone wurde mit Hilfe des Flp/FRT Systems induziert. *Dl^{rev10} Ser^{RX82}* mutante Klone sind durch das Fehlen des RFP Markers zu identifizieren. Die Klongrenzen sind mit einer gelben Umrandung markiert. Als Marker für die Notch-Aktivität wurde NRE-GFP verwendet. Sowohl die Flippase als auch die Rezeptoren wurden unter Kontrolle des *ptc*-GAL4 Treibers exprimiert. Die Aktivität des endogenen Notch-Rezeptors wird innerhalb *Dl^{rev10} Ser^{RX82}* mutanter Klone unterbrochen (A', Pfeilkopf). An den Klongrenzen kommt es zu einer ektopischen Notch-Aktivierung (A', Pfeil). Die Expression von N-HA führt zu keiner identifizierbaren Notch-Aktivität innerhalb von *Dl^{rev10} Ser^{RX82}* mutanter Klone (B', Pfeil). Es kommt weiterhin zu einer Unterbrechung der D/V Grenze (B', Box). Die Expression von N^{K2R}-HA führt zu einer starken Aktivität auch innerhalb *Dl^{rev10} Ser^{RX82}* mutanter Klone (C', Pfeil). Diese Aktivierung ist auch an der D/V Grenze erkennbar (C', Box). N^{K2R}-HA führt zu einer liganden-unabhängigen Aktivierung des Notch-Signalweges.

der anterioren Grenze der Expressionsdomäne (Abb. 12 C-C'', Box). Die Expression von N^{ΔEGF(11-12)-K2R}-HA führt ebenfalls zu einer Aktivität in einzelnen Zellen (Abb. 12 D' roter Pfeil). Ein Großteil der zuvor beobachteten Aktivierung durch N^{K2R}-HA wird allerdings durch die Deletion der EGF-Wiederholungen 11 und 12 unterdrückt (Vergleich Abb. 12 D' und Abb. 8 B).



hh-GAL4, *tub*-GAL80^{ts} 24 h Expression

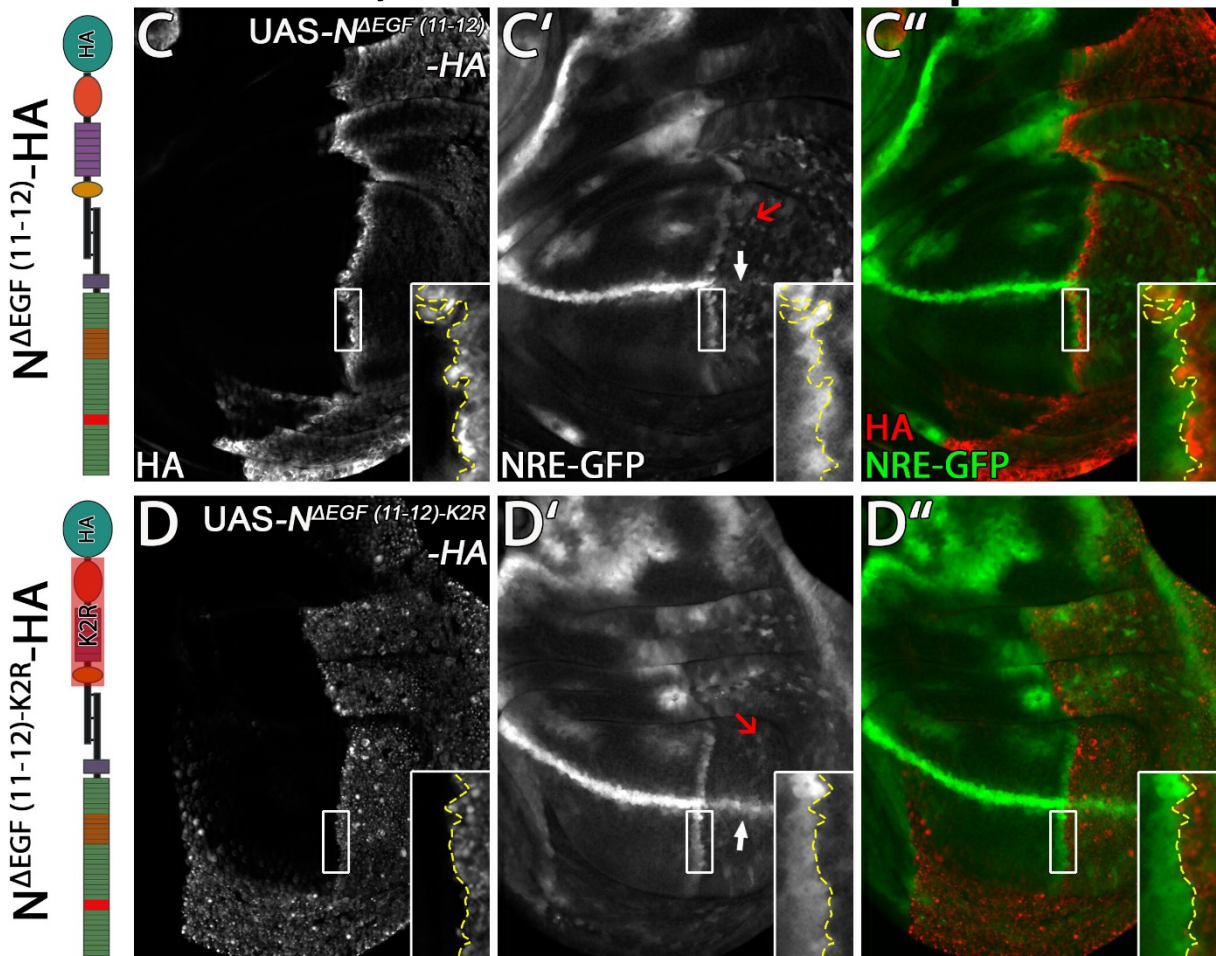


Abb. 12: Untersuchung der Aktivierung von N Δ EGF(11-12)-HA und N Δ EGF(11-12)-K2R-HA. Die EGF-Wiederholungen 11 und 12 der extrazellulären Domäne des Notch-Rezeptors vermitteln die Interaktion mit den Liganden *Dl* und *Ser* (A). Die Luciferase-Aktivität des N Δ EGF(11-12)-HA Rezeptors ist im Vergleich zu N-HA leicht, aber nicht signifikant reduziert. N Δ EGF(11-12)-K2R-HA

führt im Gegensatz zu N^{K2R}-HA zu einer deutlichen Unterdrückung der Aktivität (N-HA / N^{K2R}-HA / N^{ΔEGF(11-12)}-HA / N^{ΔEGF(11-12)-K2R}-HA: n=3). Signifikanztest: One-way ANOVA (p>=0,05 (n.s.) / p<=0,05 (*) / p<=0,001 (***)) (B). Die Rezeptoren N^{ΔEGF(11-12)}-HA und N^{ΔEGF(11-12)-K2R}-HA wurden unter Kontrolle des *hh*-GAL4 Treibers mit *tub*-GAL80^{ts} für 24h in Flügelimaginalscheiben exprimiert (C-D''). Als Marker für die Notch-Aktivität wurde NRE-GFP verwendet. N^{ΔEGF(11-12)}-HA führt zu einer ektoptischen Aktivierung in vereinzelt Zellen (C', roter Pfeil), aber unterdrückt die endogene NRE-GFP Aktivität an der D/V Grenze (C' weißer Pfeil). Es kommt zu einer ein Zelldurchmesser breiten ektoptischen Aktivierung außerhalb der Expressionsdomäne (C', Box) (die anteriore Grenze der Expressionsdomäne wird durch die gestrichelte gelbe Linie innerhalb der Box gekennzeichnet). N^{ΔEGF(11-12)-K2R}-HA führt ebenfalls zu einer ektoptischen Aktivierung in einzelnen Zellen (D', roter Pfeil) und löst eine Abschwächung, aber keine Unterbrechung der Aktivität an der D/V Grenze aus (D', weißer Pfeil). Es kommt außerhalb der Expressionsdomäne ebenfalls zu einer ein Zelldurchmesser breiten ektoptischen Notch-Aktivierung (D', Box).

Im Gegensatz zu N^{ΔEGF(11-12)}-HA führt N^{ΔEGF(11-12)-K2R}-HA zu keiner Unterdrückung aber zu einer leichten Abschwächung der endogenen Notch-Aktivität an der D/V Grenze (Abb. 12 D', weißer Pfeil). Auch in diesem Fall ist eine ein Zelldurchmesser breite nicht-zellautonome Aktivierung an der anterioren Expressionsgrenze zu erkennen (Abb. 12 D-D'', Box). Auffällig ist darüber hinaus, dass N^{ΔEGF(11-12)-K2R}-HA verstärkt in Vesikeln lokalisiert ist (Abb. 12 D).

Entgegen den Erwartungen wird die Aktivität des N^{K2R}-HA Rezeptors durch die Deletion der EGF-Wiederholungen 11 und 12 unterdrückt. Dieses Ergebnis steht somit im Widerspruch zu den Ergebnissen der klonalen Analyse mit Hilfe der Allele *Dl^{rev10}* *Ser^{RX82}*. Auffällig ist die teilweise Unterdrückung der endogenen Notch-Aktivität. Da durch die EGF-Deletion keine Interaktion mit den Liganden auftreten sollte, ist zu vermuten, dass die EGF Deletionskonstrukte mit dem endogenen Rezeptor interagieren und auf diese Weise die endogene Notch-Aktivität unterdrücken.

Um die Aktivität von N^{ΔEGF(11-12)}-HA und N^{ΔEGF(11-12)-K2R}-HA ohne den Einfluss des endogenen Rezeptors zu testen, wurde ein Luciferase-Assay in S2 Zellen durchgeführt (Abb. 12 B). Durch die Expression von N^{ΔEGF(11-12)}-HA in S2 Zellen kommt es im Vergleich zu N-HA zu einer leichten, aber nicht signifikanten Abschwächung der Notch-Aktivität. Die Expression von N^{ΔEGF(11-12)-K2R}-HA zeigt im Vergleich zu N^{K2R}-HA eine deutliche Abschwächung der Aktivität. N^{ΔEGF(11-12)-K2R}-HA führt im Vergleich zu N^{ΔEGF(11-12)}-HA allerdings weiterhin zu einer stärkeren Aktivität und könnte eine Erklärung für die nicht vollständige Unterdrückung der endogenen Notch-Aktivität in der Flügelimaginalscheibe sein (Abb. 12 B).

Die reduzierte Aktivität von N^{ΔEGF(11-12)}-HA und N^{ΔEGF(11-12)-K2R}-HA in S2-Zellen könnte auf eine strukturelle Instabilität durch die Deletion der EGF-Wiederholungen hinweisen. Die Ergebnisse zeigen, dass die liganden-unabhängige Aktivierung durch N^{K2R}-HA mit Hilfe der EGF Deletionskonstrukte nicht eindeutig nachgewiesen werden kann.

Zusammengefasst lässt sich sowohl *in vivo* als auch in Zellkultur eine starke liganden-unabhängige Aktivierung des Notch-Signalweges durch N^{K2R}-HA nachweisen. *In vivo* kann dies sowohl anhand *mib1* mutanter Flügelimaginalscheiben, als auch mit Hilfe der klonalen Analyse

der *Di^{rev10} Ser^{RX82}* Mutanten gezeigt werden. In Zellkultur kann dieser Effekt mit Hilfe eines Luciferase-Assays in *Drosophila* S2 Zellen beobachtet werden. Mit Hilfe der EGF Deletionskonstrukte lässt sich die liganden-unabhängige Aktivität durch N^{K2R}-HA hingegen nicht eindeutig nachweisen.

3.4 Untersuchung der proteolytischen Spaltungen von N-HA und N^{K2R}-HA

Da die bisherigen Ergebnisse stark darauf hindeuten, dass es durch N^{K2R}-HA zu einer liganden-unabhängig Aktivierung des Signalweges kommt, stellt sich die Frage, ob für die Aktivierung weiterhin die proteolytischen Spaltungen notwendig sind oder, ob der Rezeptor unabhängig von diesem Mechanismus aktiviert wird.

Um die Effekte der proteolytischen Spaltungen auf die Aktivierung der Rezeptoren in Zellkultur zu überprüfen, wurde ein Luciferase-Assay in S2-Zellen durchgeführt. Die Aktivität von Kuz und der γ -Sekretase sollten in diesem Versuch mit Hilfe von Inhibitoren unterdrückt werden. Bei der Interpretation der Ergebnisse ist allerdings darauf zu achten, dass der Assay nur zweifach wiederholt werden konnte. Die Ergebnisse sind daher als Tendenzen anzusehen.

Durch Zugabe des Kuz Inhibitors BB94 wird die Aktivität von N-HA größtenteils unterdrückt. Bei N^{K2R}-HA kommt es zu einer Reduzierung, aber nicht zu einer vollständigen Unterdrückung der Aktivität (Abb. 13). Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass N^{K2R}-HA in S2-Zellen teilweise Kuz unabhängig aktiviert wird.

Zur Unterdrückung der Aktivität der γ -Sekretase wurde der Inhibitor DAPT verwendet. Die Aktivität von N-HA wird durch die Zugabe von DAPT stark unterdrückt. Eine starke Abschwächung der Aktivität lässt sich auch bei N^{K2R}-HA feststellen. Im Vergleich zu N-HA ist dieser Effekt bei N^{K2R}-HA schwächer ausgeprägt. Der Großteil der N^{K2R}-HA induzierten Aktivität scheint allerdings in S2 Zellen γ -Sekretase abhängig zu sein. Darüber hinaus führt die Inhibierung der γ -Sekretase zu einer stärkeren Abschwächung der N^{K2R}-HA Aktivierung im Vergleich zur Inhibierung der Metalloprotease Kuz (Abb. 13).

Um eine Kuz unabhängige Aktivierung von N^{K2R}-HA *in vivo* zu überprüfen, wurde eine klonale Analyse mit Hilfe des Allels *kuz^{ES24}* in Flügelimaginalscheiben durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass es in *kuz^{ES24}* mutanten Zellklonen in Flügelimaginalscheiben zu einer zellautonomen Unterdrückung der Aktivität des Notch-Signalweges kommt (Klein, 2002). Um N-HA und N^{K2R}-HA in Zellklonen zu exprimieren wurde das MARCM (Mosaic Analysis with a Repressible Cell Marker) System verwendet (Lee and Luo, 1999) (Material und Methoden

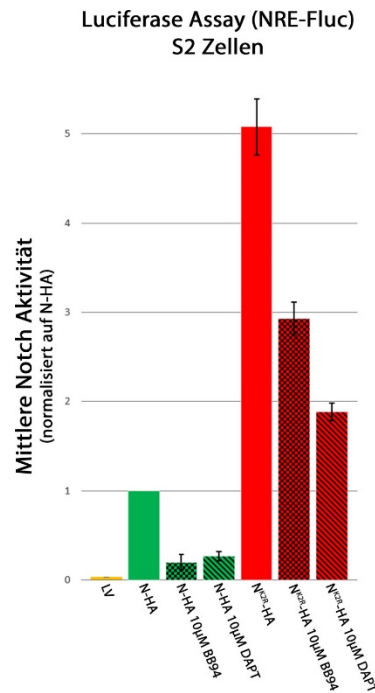


Abb. 13: Auswirkungen der Inhibitoren BB94 und DAPT auf die Aktivität von N-HA und N^{K2R}-HA in S2 Zellen. Um zu testen ob die Aktivität von N-HA und N^{K2R}-HA abhängig von den proteolytischen Spaltungen durch Kuz und die γ -Sekretase ist, wurde ein Luciferase Assay in S2 Zellen durchgeführt. Hierzu wurden die Rezeptoren in S2 Zellen exprimiert und die Zellen mit den Kuz Inhibitor BB94, oder dem γ -Sekretase Inhibitor DAPT behandelt. Die Aktivität von N-HA wird sowohl durch BB94, als auch durch DAPT stark unterdrückt. Die Aktivität von N^{K2R}-HA wird durch BB94 abgeschwächt, ist aber weiterhin deutlich ausgeprägt. Die Zugabe von DAPT sorgt im Vergleich zu BB94 für eine stärkere Abschwächung der N^{K2R}-HA Aktivität, aber nicht für eine vollständige Unterdrückung (LV (Leervektor) / N-HA / N-HA DAPT / N^{K2R}-HA / N^{K2R}-HA DAPT / N-HA BB94 / N^{K2R}-HA BB94 n=2).

7.2.16.4). *hs(heat shock)* induzierte Zellklone können durch die Abwesenheit des Markers *arm-lacZ* identifiziert werden. Die Expression von N-HA und N^{K2R}-HA erfolgte unter Kontrolle des *hh-GAL4* Treibers im posterioren Kompartiment der Flügelimaginalscheibe. Außerhalb der Zellklone wurde die Expression von N-HA und N^{K2R}-HA durch den Repressor GAL80 unterdrückt. N-HA und N^{K2R}-HA positive Zellklone sind durch UAS-RFP markiert. Als Kontrolle wurden *π -myc* Zellklone erzeugt. *π -myc* Klone haben keine Auswirkung auf die endogene Notch-Aktivität (Abb. 14 A1-A1'''' und B1-B1'''). Die Expression von N-HA in *π -myc* Klonen führt zu einer leichten ektopischen Notch-Aktivität (Abb. 14 A2-A2'''). Die Expression von N^{K2R}-HA in *π -myc* Klonen führt zu einer starken ektopischen Notch-Aktivität (Abb. 14 B2-B2'''). Da beide Rezeptoren in den Kontrollklonen zu einer ektopischen Aktivierung des Notch-Signalweges führen, kann mit Hilfe *kuz^{ES24}* mutanter Zellklone überprüft werden, ob diese Aktivierung Kuz abhängig oder unabhängig erzeugt wird.

In *kuz^{ES24}* mutanten Zellklone kommt es zu einer deutlichen Unterdrückung der Notch-Aktivität. (Abb. 15 A-A''/C1-C1''/D1-D1'''). Die zuvor beobachtete ektopische Aktivierung durch die Expression von N-HA wird in *kuz^{ES24}* Klonen unterdrückt (Abb. 15 C2-C2'''). Im Gegensatz dazu führt die Expression von N^{K2R}-HA weiterhin zu einer starken ektopischen Aktivität (Abb. 15 D2-D2''').

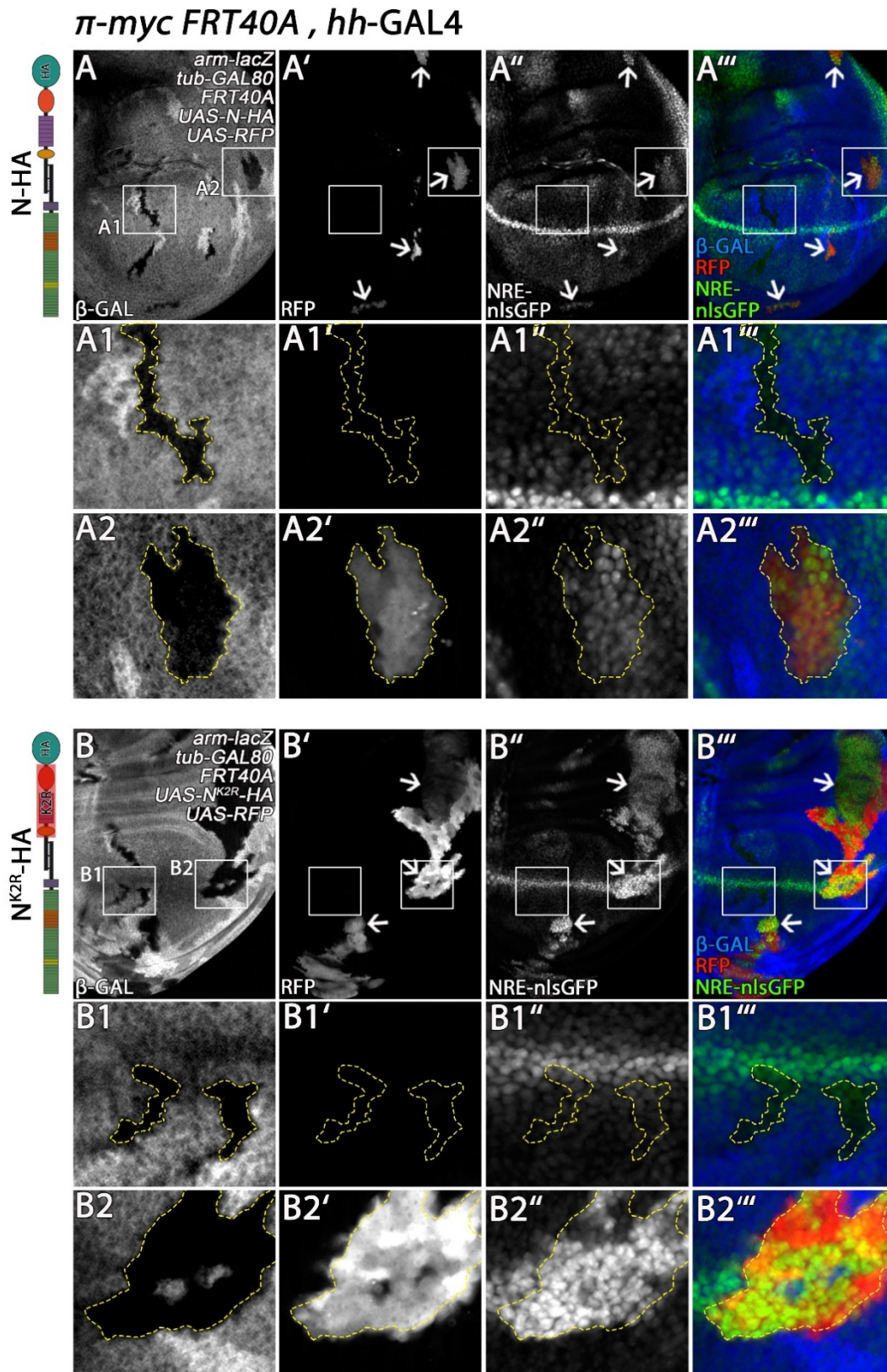


Abb. 14: Expression von N-HA und N^{K2R}-HA in π -myc Klonen in Flügelimaginalscheiben. π -myc Klonen wurden unter Verwendung des MARCM-Systems durch *hs-Flp* induziert. π -myc Klonen sind durch eine fehlende *arm-lacZ* Expression markiert (A u. B). Die Expression der Notch-Rezeptoren in π -myc Klonen erfolgte unter Kontrolle des *hh-GAL4* Treibers im posterioren Kompartiment und wurde außerhalb der Klonen durch *GAL80* unterdrückt. Klone, die die transgenen Rezeptoren exprimieren, wurden durch *UAS-RFP* markiert. Als Marker für die Notch-Aktivität wurde *NRE-nlsGFP* verwendet. Weiß umrandete Boxen werden als vergrößerte Bereiche dargestellt. Die gestrichelte gelbe Linie markiert die Klonegrenzen. π -myc Klonen haben keinen Effekt auf die endogene Notch-Aktivität (A1-A1''' u. B1-B1'''). Die Expression von N-HA führt zu einer leichten ektopischen Notch-Aktivierung in π -myc Klonen (A2-A2'''). N^{K2R}-HA führt zu einer starken ektopischen Notch-Aktivität in π -myc Klonen (B2-B2''').

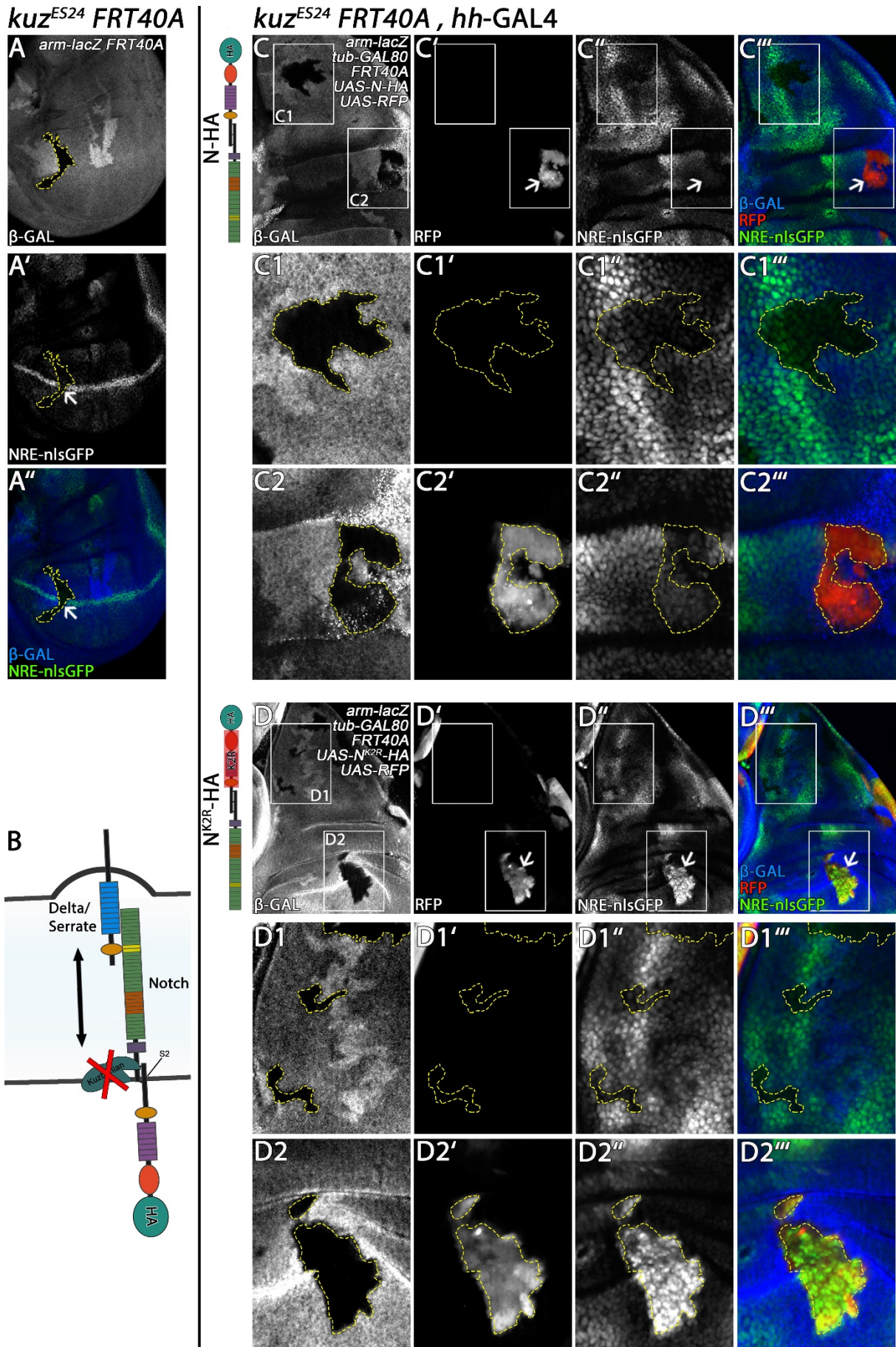


Abb. 15: Expression von N-HA und N^{K2R}-HA in *kuz^{ES24}* Klonen in Flügelimaginalscheiben. Bei Kuz handelt es sich um eine Metalloprotease die den Notch-Rezeptor in der extrazellulären Domäne schneidet (B). *kuz^{ES24}* Klone wurden unter Verwendung

des MARCM-Systems durch *hs-Flp* induziert. *kuz^{ES24}* Klone sind durch eine fehlende *arm-lacZ* Expression markiert (A/C/D). Die Expression der Notch-Rezeptoren in *kuz^{ES24}* Klonen erfolgte unter Kontrolle des *hh-GAL4* Treibers im posterioren Kompartiment und wurde außerhalb der Klone durch GAL80 unterdrückt. Klone, die die transgenen Rezeptoren exprimieren, wurden durch UAS-RFP markiert (C'-C'''' u. D'-D''', Pfeile). Als Marker für die Notch-Aktivität wurde NRE-nlsGFP verwendet. Weiß umrandete Boxen werden als vergrößerte Bereiche dargestellt (C1/C2/D1/D2). Die gestrichelte gelbe Linie markiert die Klonegrenzen. In *kuz^{ES24}* Klonen kommt es zu einer Unterdrückung der liganden-abhängigen Notch-Aktivierung an der D/V Grenze (A-A'', Pfeil). Eine Unterdrückung der Notch-Aktivität findet auch außerhalb der D/V Grenze statt (C1-C1'''' u. D1-D1'''). Die ektopische Notch-Aktivität durch N-HA wird in *kuz^{ES24}* Klonen unterdrückt (C2-C2'''). N^{K2R}-HA führt in *kuz^{ES24}* Klonen weiterhin zu einer starken ektopischen Notch-Aktivierung (D2-D2''').

Diese Beobachtungen zeigen, dass die Aktivierung des Notch-Signalweges durch N-HA Kuz abhängig, die von N^{K2R}-HA hingegen eine Kuz unabhängige ausgelöst wird.

Um zu überprüfen ob die Aktivierung des Signalweges durch N^{K2R}-HA in Flügelimaginalscheiben ebenfalls unabhängig von dem γ -Sekretase-Komplex ausgelöst wird, wurde die Mutante *Psn^{C1}* verwendet (Struhl and Greenwald, 1999). Bei Psn (Preseñilin) handelt es sich um eine Komponente des γ -Sekretase-Komplexes. Durch den Ausfall von *Psn* kommt es zu einer Unterdrückung der Funktion der γ -Sekretase. *Psn^{C1}* führt in Homozygose zu einer Unterbrechung der Notch-Aktivität in Flügelimaginalscheiben. Dies äußert sich zum einen durch die Ausprägung verkleinerter Flügelimaginalscheiben bei denen das Flügelfeld nicht vollständig ausgebildet wird und zum anderen durch die fehlende Wg Expression an der D/V Grenze (Abb. 16 A-A'). Um zu überprüfen, ob die Aktivität von N^{K2R}-HA Psn abhängig oder unabhängig ist, wurden die transgenen Rezeptoren in homozygot mutanten *Psn^{C1}* Flügelimaginalscheiben exprimiert. Die Expression der Rezeptoren erfolgte konstitutiv unter Kontrolle des *ptc-GAL4* Treibers. Die Expression von N-HA in *Psn^{C1}* mutanten Imaginalscheiben führt zu keiner morphologischen Veränderung. Die Imaginalscheiben sind weiterhin sehr klein und das Flügelfeld ist nicht ausgeprägt (Abb. 16 B u. B1). Darüber hinaus kommt es durch die Expression von N-HA zu keiner ektopischen Wg Expression (Abb. 16 B-B'', Pfeile). Die Expression von N^{K2R}-HA führt ebenfalls zu keiner starken morphologischen Veränderung der Imaginalscheibe (Abb. 16 C u. C1) und zu keiner ektopischen Wg Expression (Abb. 16 C-C'', Pfeile).

Die Beobachtungen, dass weder N-HA noch N^{K2R}-HA zu einer ektopischen Wg Expression in *Psn^{C1}* mutanten Flügelimaginalscheiben führen, deuten auf eine γ -Sekretase abhängige Aktivierung von N-HA und N^{K2R}-HA hin.

Zusammengefasst führt der Austausch der intrazellulären Lysine des Notch-Rezeptors in Flügelimaginalscheiben zu einer starken Kuz unabhängigen, aber γ -Sekretase abhängigen Aktivierung des Signalweges. In S2 Zellen kann diese Beobachtung weitestgehend bestätigt werden. Allerdings führt die Unterdrückung von Kuz auch zu einer leichten Abschwächung der N^{K2R}-HA Aktivität und deutet darauf hin, dass ein Teil des Rezeptors ebenfalls Kuz abhängig aktiviert wird. Darüber hinaus führt die Unterdrückung der γ -Sekretase zu keiner vollständigen Unterbrechung der N^{K2R}-HA Aktivität und deutet darauf hin, dass ein Teil der N^{K2R}-HA

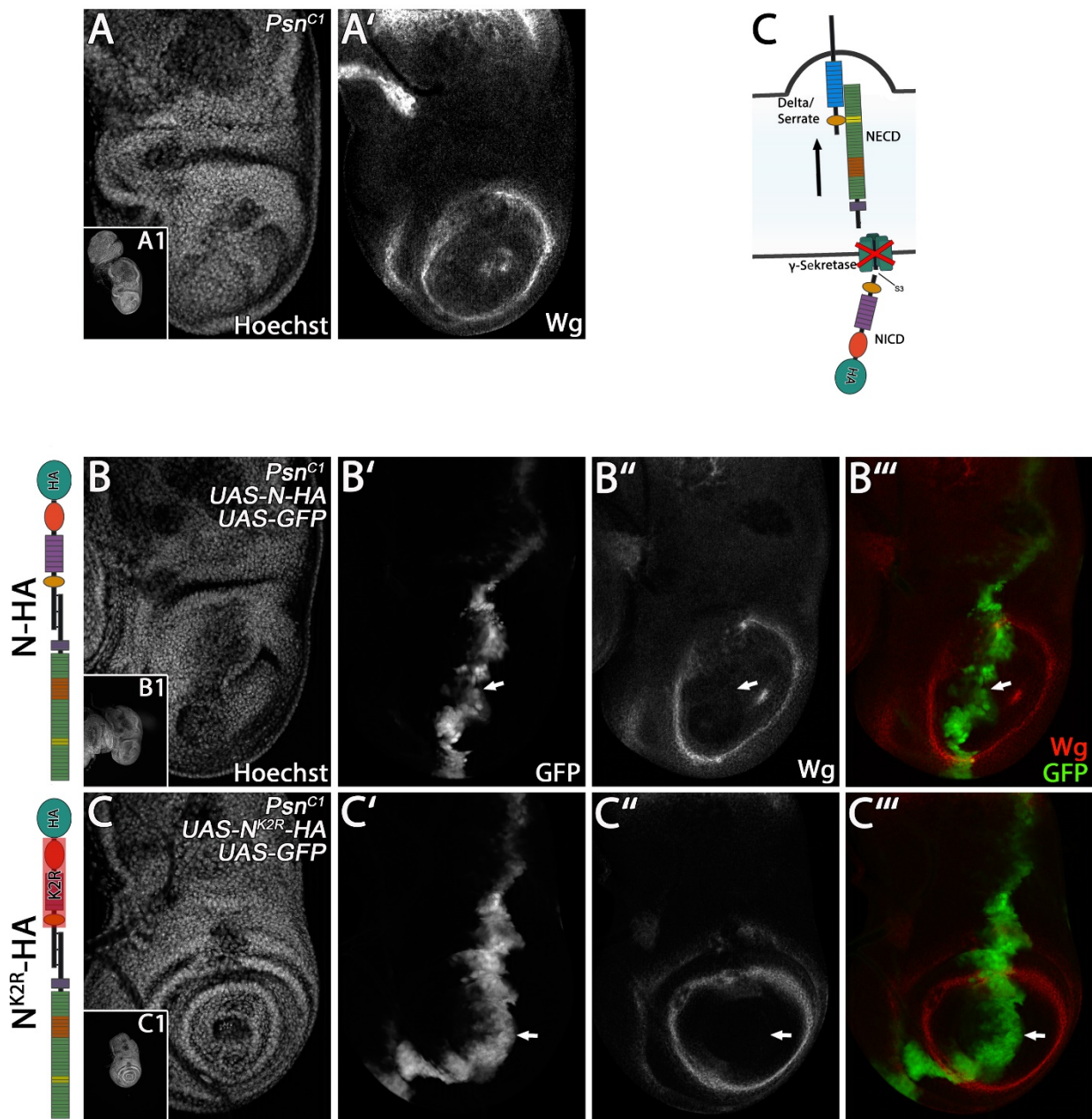
Psn^{C1}, *ptc*-GAL4

Abb. 16: Expression von N-HA und N^{K2R}-HA in *Psn^{C1}* mutanten Flügelimaginalscheiben. Die Aktivität des γ -Sekretase-Komplexes führt zu der proteolytische Spaltung des Notch-Rezeptors und der Freisetzung der intrazellulären Domäne in das Zytoplasma (C). *Psn^{C1}* mutante Flügelimaginalscheiben sind stark verkleinert und verfügen über kein ausgeprägtes Flügelfeld (A u. A1). Als Marker für die Aktivität des Notch-Signalweges wurde eine Antikörperfärbung gegen Wg durchgeführt. *Psn^{C1}* mutante Flügelimaginalscheiben zeigen keine Wg Expression an der D/V Grenze (A'). N-HA und N^{K2R}-HA wurden unter Kontrolle des *ptc*-GAL4 Treibers konstitutiv in homozygot mutanten *Psn^{C1}* Flügelimaginalscheiben exprimiert (B-C''). Die *ptc*-Expressionsdomäne wurde mit UAS-GFP markiert. Weder die Expression von N-HA noch von N^{K2R}-HA führt zu einer Überproliferation der Imaginalscheiben (B/B1 u. C/C1). Weder durch die Expression von N-HA, noch durch N^{K2R}-HA kommt es zu einer ektopischen Wg Expression (B-B'' u. C-C'' Pfeile).

Aktivierung ebenfalls γ -Sekretase unabhängig ausgelöst wird. Die Restaktivität von N^{K2R}-HA könnte allerdings auch auf eine unvollständige Hemmung der γ -Sekretase durch DAPT zurückzuführen sein. Auch wenn es in den Zellkultur-Experimenten zu keiner vollständigen Unterdrückung der N^{K2R}-HA Aktivität durch die Hemmung der γ -Sekretase kommt, deuten die

in vivo Ergebnisse in der Flügelimaginalscheibe auf eine γ -Sekretase abhängige Aktivierung des Rezeptors hin.

Die beschriebene Form der liganden-unabhängigen Aktivierung des N^{K2R}-HA Rezeptors konnte bereits in verschiedenen Mutanten in *Drosophila* gezeigt werden. Viele dieser Mutationen führen zu Ausfällen verschiedener Komponenten des endosomalen Transportweges und lösen somit Defekte der endosomalen Degradation des Rezeptors aus (Übersicht in (Palmer and Deng, 2015)). In wie weit der Verlust der intrazellulären Lysine zu einem veränderten Transport des Rezeptors führt, sollte mit Hilfe von Lokalisationsstudien in der Flügelimaginalscheibe von *D. melanogaster* untersucht werden.

3.5 Analyse der subzellulären Lokalisation von N-HA und N^{K2R}-HA

3.5.1 Etablierung eines pulse-chase-Assays für transgene Notch-Rezeptoren in Flügelimaginalscheiben

Sollte die Endozytose des Notch-Rezeptors über die Ubiquitinierung der intrazellulären Lysine reguliert werden, so wäre zu erwarten, dass N^{K2R}-HA stark an der Zelloberfläche akkumuliert und nicht endozytiert bzw. über den endosomalen Transportweg abgebaut wird. In den vorherigen Experimenten konnte eine klare liganden-unabhängige Aktivierung des Signalweges durch N^{K2R}-HA gezeigt werden. Wie bereits beschrieben steht eine liganden-unabhängige Aktivierung des Notch-Signalweges häufig im direkten Zusammenhang mit einer Störung des endosomalen Transportes des Rezeptors (Palmer and Deng, 2015). Sollte es also durch den Austausch der Lysine zu einer Unterbrechung der Endozytose des Rezeptors kommen, so müsste die liganden-unabhängige Aktivität des Rezeptors ebenfalls unabhängig von dessen endosomalen Transport ausgelöst werden. Es sollte daher untersucht werden, in wie weit der endosomale Transport des Rezeptors durch den Austausch der Lysine beeinträchtigt wird.

Um sowohl die Sekretion des Rezeptors als auch die Endozytose und den endosomalen Transport näher zu analysieren, wurde ein „pulse chase“ Assay entwickelt. Hierbei wurde mit Hilfe des temperaturregulierbaren GAL4/UAS Expressionssystem ein kurzer Expressionspuls der transgenen Rezeptoren ausgelöst. Nach einer kurzen Expressionsdauer wurden verschiedene Zeitpunkte der Rezeptorreifung und des Abbaus beobachtet und mit verschiedenen sekretorischen und endosomalen Markern verglichen.

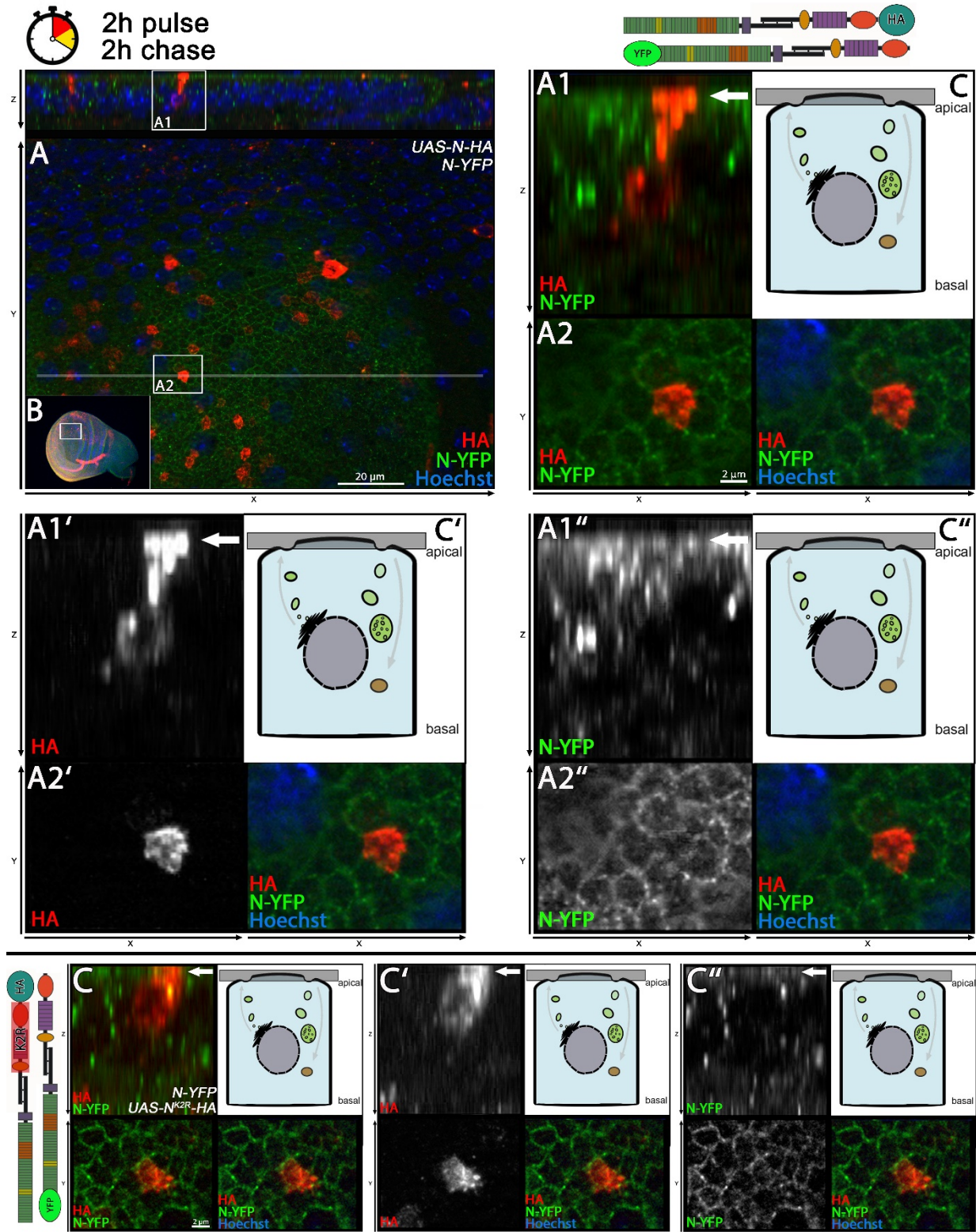


Abb. 17: Etablierung eines „pulse-chase“-Assays für transgene Notch-Rezeptoren in Flügelimaginalscheiben. N-HA und N^{K2R}-HA wurden unter Kontrolle des *hh*-GAL4 Treibers mit *tub*-GAL80^{ts} für 2h exprimiert (29°C). Nach 2h Expression erfolgten verschiedenen „chase“-Zeitpunkte (18°C) zu denen die Imaginalscheiben fixiert wurden. In diesem Fall wurden 2h „pulse“ und 2h „chase“ verwendet. Um sowohl den endogenen, als auch den transgenen Rezeptor zu identifizieren, wurde N-YFP („protein-trap“) verwendet und eine Antikörperfärbung gegen HA durchgeführt. Mit Hilfe des kurzen „pulse“ kommt es zu einer Expression der Rezeptoren in nur wenigen Zellen, die gut voneinander zu unterscheiden sind. N-YFP ist hingegen in jeder Zelle vorhanden (A). Um die apico-basale Lokalisation des Rezeptors darzustellen, wurden Z-Stapel der Imaginalscheiben aufgenommen. Die weiße Box in der Übersicht (B) zeigt den Bereich an, der vergrößert wurde (A). Die weißen Boxen in A markieren den Bereich einer N-HA positiven Zelle in der Z-Auflösung (A1) und in der X/Y-Auflösung (A2). Die Z-Stapel werden immer von apikal zu basal dargestellt (siehe Schema Zelle) (A1 u. C). Der weiße Pfeil (A1) und der graue Balken

(C) verweisen auf die Ebene die in der X/Y-Dimension dargestellt wird (A2). Es werden sowohl die Einzelkanäle für HA (A1' u. A2'), sowie für N-YFP (A1'' u. A2'') dargestellt. In den Überlagerungen der Kanäle wird zusätzlich eine Kernfärbung mittels Hoechst gezeigt. N-YFP lokalisiert in netzartigen Strukturen an der subapikalen Membran (A1/A1'' u. A2/A2''). N-HA und N^{K2R}-HA akkumulieren an der gesamten apikalen Oberfläche der Zelle (A1/A1'/A2/A2' u. C-C'').

Für die Durchführung der Experimente wurden Larven des dritten Larvenstadiums verwendet. Die Expression der Rezeptoren erfolgte unter Kontrolle des *hh*-GAL4 Treibers mit *tub*-GAL80^{ts}. Der Expressionspuls erfolgte für 2h bei 29°C. Nach der Expressionszeit folgte ein Temperaturwechsel der Larven auf 18°C. Da bei dieser Temperatur keine weitere Expression der transgenen Konstrukte stattfindet, kann die Sekretion und der Abbau des Rezeptors durch die Fixierung der Flügelimagnalscheiben zu verschiedenen Zeitpunkten untersucht werden.

Die Expression der Rezeptoren für 2h führt zur Expression in nur wenigen Zellen, die gut voneinander zu unterscheiden sind (Abb. 17 A). Diese Eigenschaft ermöglicht es, den Transport des Rezeptors auf Ebene einer einzelnen Zelle zu analysieren. Als Kontrolle wurde N-YFP (Lowe et al., 2014; Lye et al., 2014), ein „protein-trap“ des endogenen Notch-Rezeptors, verwendet. Mit Hilfe von N-YFP ist es möglich den Transport des transgenen Rezeptors mit dem des endogenen Rezeptors zu vergleichen.

In allen folgenden Abbildungen wird ausschließlich der Ausschnitt einer einzelnen Zelle, die die Transgene exprimiert dargestellt (Abb. 17 A2). Es wird sowohl die Lokalisation des Rezeptors in der gesamten Z-Ebene (Abb. 17 A1), als auch die X/Y-Ebene einzelner Z-Positionen gezeigt (Abb. 17 A2). Die schematische Zelle deutet dabei auf die Z-Position hin, die in der X/Y-Ebene dargestellt wird (Abb. 17 C). Als Beispiel wird die apikale Ansicht einer Flügelimagnalscheibe gezeigt, bei der N-HA für 2h exprimiert („pulse“) und weitere 2h verfolgt („chase“) wurde (Abb. 17). Zu diesem Zeitpunkt befindet sich der Notch-Rezeptor größtenteils im apikalen Bereich der Zelle. Dabei ist sowohl eine klare Lokalisation an der Zelloberfläche, als auch in Form von apikalen Vesikeln zu sehen (Abb. 17 A1'). Eine leichte Akkumulation des Rezeptors findet sich ebenfalls auf Höhe des Zellkerns aber nicht im basalen Bereich der Zelle (Abb. 17 A1'). Während N-YFP stark in einem netzartigen Muster an der subapikalen Membran lokalisiert, bildet der transgene N-HA Rezeptor eine gleichmäßige Verteilung an der apikalen Oberfläche der Zelle (Abb. 17 A2). Diese Eigenschaft kann auch bei dem N^{K2R}-HA Rezeptor beobachtet werden (Abb. 17 C-C'').

Der Transport der transgenen Rezeptoren scheint also in den apikalen Bereich der Zelle zu erfolgen. Um genauere Aussagen über die Sekretion und den Rezeptorabbau zu erhalten wurden verschiedene „chase“ Zeitpunkte gewählt.

3.5.2 Untersuchung der Sekretion und des endosomalen Transportes von N-HA und N^{K2R}-HA

Werden die Imaginalscheiben direkt nach dem zweistündigen „pulse“ fixiert, kann sowohl bei N-HA als auch bei N^{K2R}-HA nur in einigen Zellen ein schwaches Signal identifiziert werden. Dieses Signal beschränkt sich in den meisten Fällen bei beiden Rezeptoren auf den perinukleären Bereich, kann aber nicht innerhalb des Kerns identifiziert werden (Abb. 18 A-A‘‘ u. B-B‘‘). In seltenen Fällen ist ebenfalls eine apikale Ausbreitung des Signals zu beobachten (Abb. 19 B u. B‘). Das Signal um den Zellkern ist in vesikelartigen Strukturen zu sehen. Eine Kollokalisierung mit N-YFP tritt zwar auf, ist allerdings bei beiden Rezeptoren nur selten zu identifizieren (Abb. 18 A-B‘‘, Pfeile). Da es sich um den frühesten zu beobachtenden Zeitpunkt des „pulse-chase“-Experiments handelt und bei kürzeren Zeitpunkten kein Signal zu identifizieren ist, ist zu vermuten, dass die Proteinkonzentration erst nach zwei Stunden die Grenze der Detektierbarkeit erreicht. In einem frühen Stadium der Proteinreifung sollte das Protein im ER zu finden sein. Um zu überprüfen, ob es sich bei den perinukleären Vesikeln um eine ER Lokalisation handelt, wurde eine Antikörperfärbung gegen den ER-Marker Calnexin verwendet (Abb. 19 A-B‘‘). Calnexin lässt sich sowohl apikal, basal als auch perinukleär identifizieren (Abb. 19 A‘‘ u. B‘‘). Bei beiden Rezeptoren ist in einigen Fällen eine Kollokalisierung der Vesikel mit Calnexin zu beobachten und spricht für eine Anreicherung der Proteine im ER (Abb. 19 A-B‘‘, Pfeile). Diese Beobachtung kann allerdings nicht für alle Vesikel bestätigt werden und könnte darauf hindeuten, dass sich die Proteine bereits im Golgi-Apparat befinden.

Im nächsten Schritt wurden Imaginalscheiben nach zwei Stunden „puls“ und einer Stunde „chase“ fixiert (Abb. 18 C-D‘‘). Zu diesem Zeitpunkt kann bei beiden Rezeptoren eine apikale Ausdehnung des Signals identifiziert werden (Abb. 18 C‘ und D‘).

Um zu testen ob die Sekretion der transgenen Rezeptoren über den Golgi-Apparat abläuft, wurden die Marker Rab1-YFP und Golgin verwendet. Bei Rab1-YFP handelt es sich um einen „protein trap“ des endogenen Rab1 (Dunst et al., 2015). Rab1 ist ein Marker für Vesikel die Proteine zwischen dem ER und dem Golgi-Apparat transportieren (Sato et al., 1997). Der Antikörper Golgin richtet sich hingegen gegen ein Golgi-Apparat assoziiertes Protein und markiert somit indirekt den Golgi-Apparat (Riedel et al., 2016). Der Fokus wurde hierbei auf den Bereich apikal des Zellkerns gelegt, da es an dieser Position zu einer deutlichen Akkumulation der Rezeptoren in Vesikeln kommt (Abb. 19 C‘ und D‘ Pfeile).

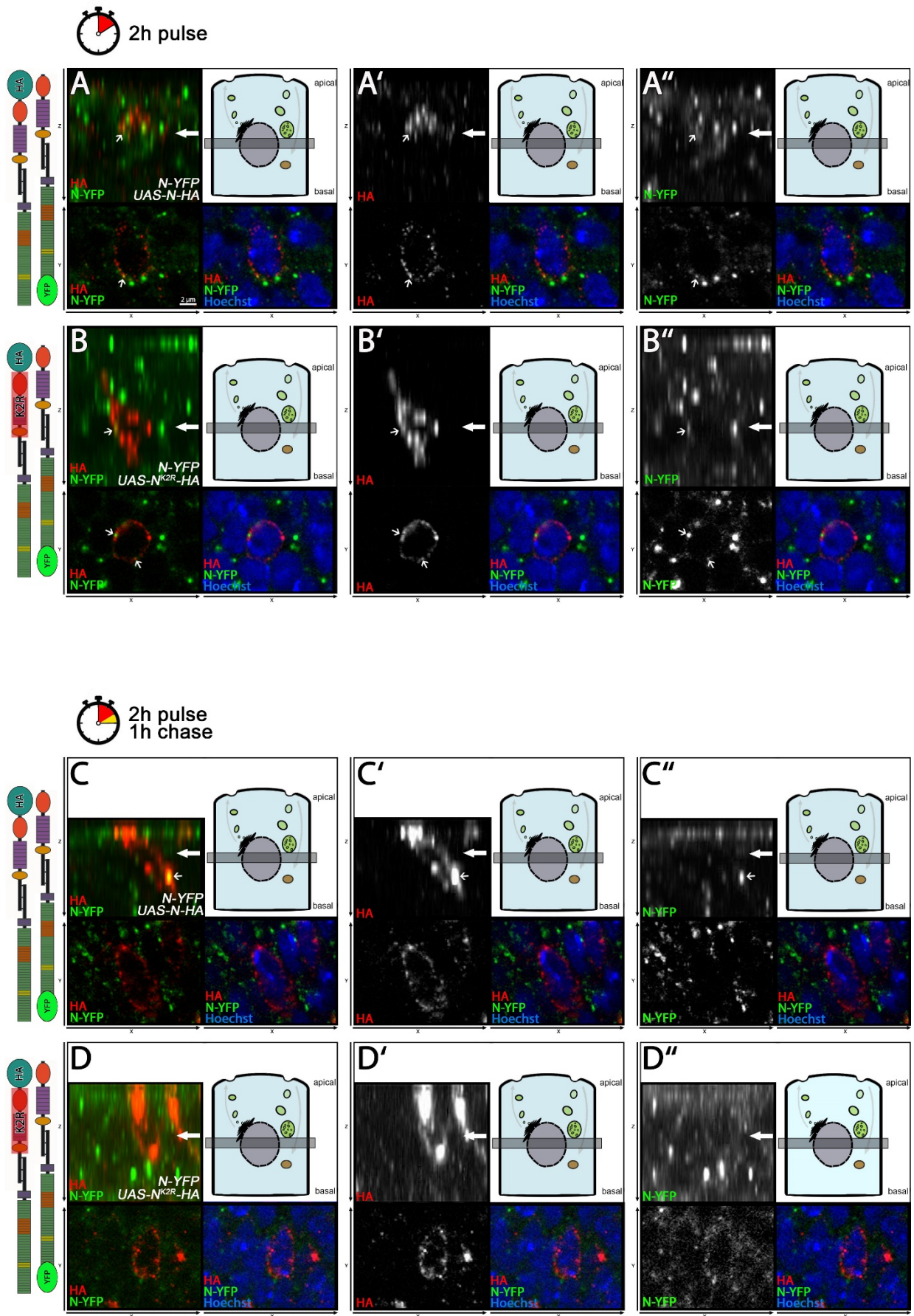


Abb. 18

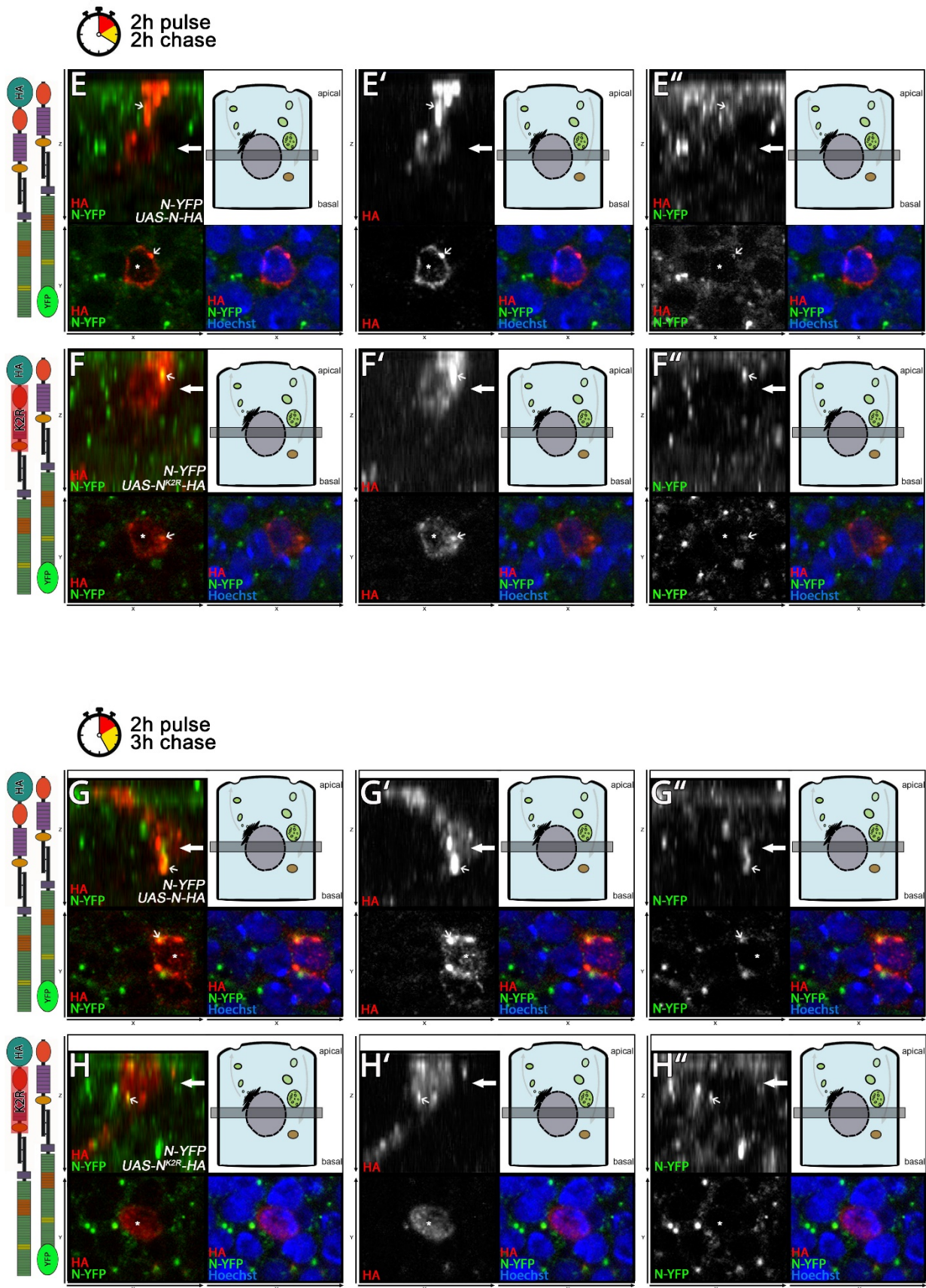


Abb. 18

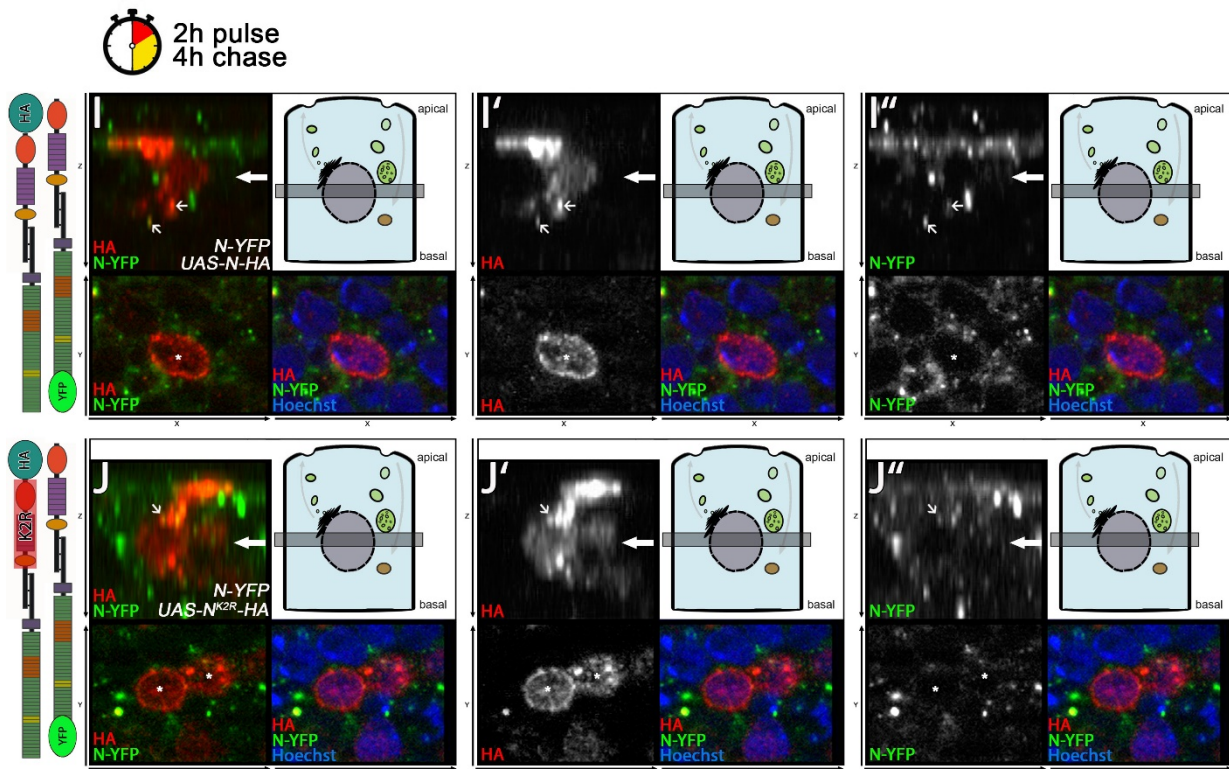


Abb. 18: Subzelluläre Lokalisation von N-HA und N^{K2R}-HA in Flügelimaginalscheiben. Zur Untersuchung der Lokalisation von N-HA (A/C/E/G/I) und N^{K2R}-HA (B/D/F/H/J) wurde ein „pulse-chase“-Assay in Flügelimaginalscheiben durchgeführt. Die Expression der Rezeptoren erfolgte unter Kontrolle des *hh*-GAL4 Treibers mit *tub*-GAL80^{ts}. Nach einer zweistündigen Expression („pulse“) auf 29°C wurden die Larven auf 18°C („chase“) gekühlt und nach verschiedenen Zeitpunkten präpariert und fixiert. Larven wurden nach 2h „pulse“ (A-B‘‘), nach 1h „chase“ (C-D‘‘), nach 2h „chase“ (E-F‘‘), nach 3h „chase“ (G-H‘‘) und nach 4h „chase“ (I-J‘‘) fixiert. Als Kontrolle wurde ein „protein-trap“ des endogenen Notch-Rezeptors verwendet (N-YFP). Durch einen 2h „pulse“ kommt es zur Expression der Rezeptoren in nur wenigen Zellen die gut voneinander unterschieden werden können. Gezeigt wird immer ein Ausschnitt einer HA positiven Zelle in der Z-Auflösung (oberer Abschnitt eines Feldes) und der X/Y-Auflösung (unterer Abschnitt eines Feldes). Die schematische Zelle zeigt den optischen Schnitt in der Z-Ebene an, der in der X/Y-Dimension dargestellt wird. In diesem Fall wird ausschließlich die Ebene der Zellkerne in X/Y dargestellt. Im zeitlichen Verlauf kommt es bei beiden Rezeptoren erst zu einer Akkumulation um den Zellkern (A-B‘‘), dann zu einer Sekretion an die apikale Membran (C-D‘‘) und danach zu einer Anreicherung im Zellkern. Bei N^{K2R}-HA scheint es verglichen mit N-HA zu einer früheren Anreicherung im Zellkern (E-F‘‘). Zu späteren Zeitpunkten kommt es zur Bildung basaler N-HA und N^{K2R}-HA Vesikel die häufig mit N-YFP kolokalisieren (G-J‘‘). Eine Kolokalisation zwischen HA und N-YFP wird über weiße Pfeile angedeutet. Eine Lokalisation im Zellkern wird mit einem Sternchen markiert.

Rab1-YFP tritt in Vesikeln auf, die entlang des gesamten Zellquerschnitts verteilt sind (Abb. 19 C‘‘ u. D‘‘). Rab1-YFP Vesikel kolokalisieren deutlich mit N-HA und mit N^{K2R}-HA positiven Vesikeln (Abb. 19 C-C‘‘ u. D-D‘‘, Pfeile). Golgin ist ebenfalls in Vesikeln entlang des gesamten Zellquerschnitts vertreten (Abb. 19 E‘‘ und F‘‘). Auch in diesem Fall kommt es zu einer Kolokalisation zwischen Golgin und den N-HA und N^{K2R}-HA positiven Vesikeln (Abb. 19 E-F‘‘, Pfeile).

Da sowohl N-HA als auch N^{K2R}-HA vom ER zum Golgi-Apparat transportiert werden, scheint der Austausch der intrazellulären Lysine des Rezeptors keinen Einfluss auf die Sekretion des Proteins zu haben. Zudem kommt es nach 2h „chase“ zu einer deutlichen Akkumulation beider Rezeptoren an der apikalen Membran (Abb. 17 A1-A1‘‘ u. C-C‘‘). Diese Beobachtung spricht für einen lysin-unabhängigen Transport des Notch-Rezeptors zur apikalen Plasmamembran.

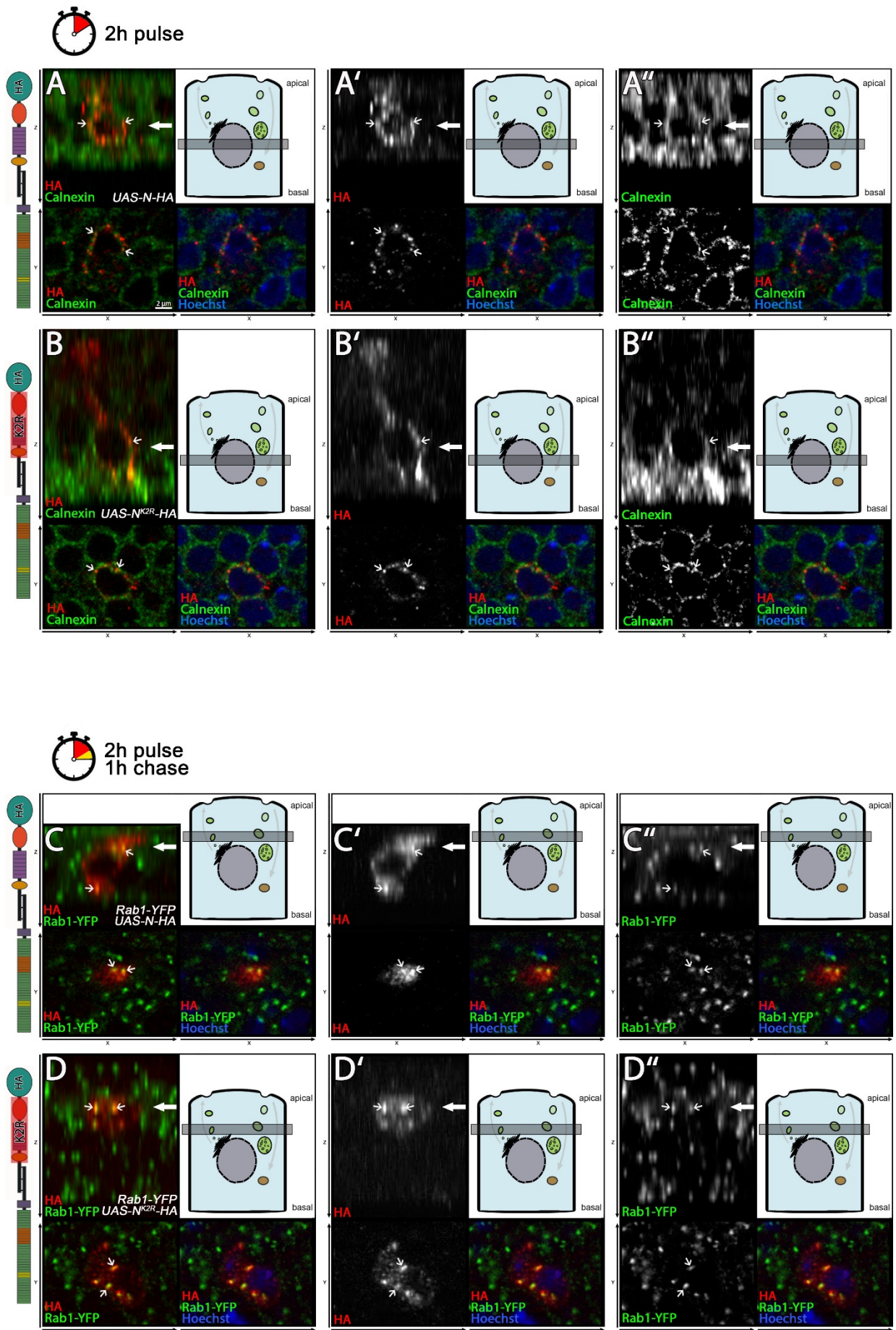


Abb. 19

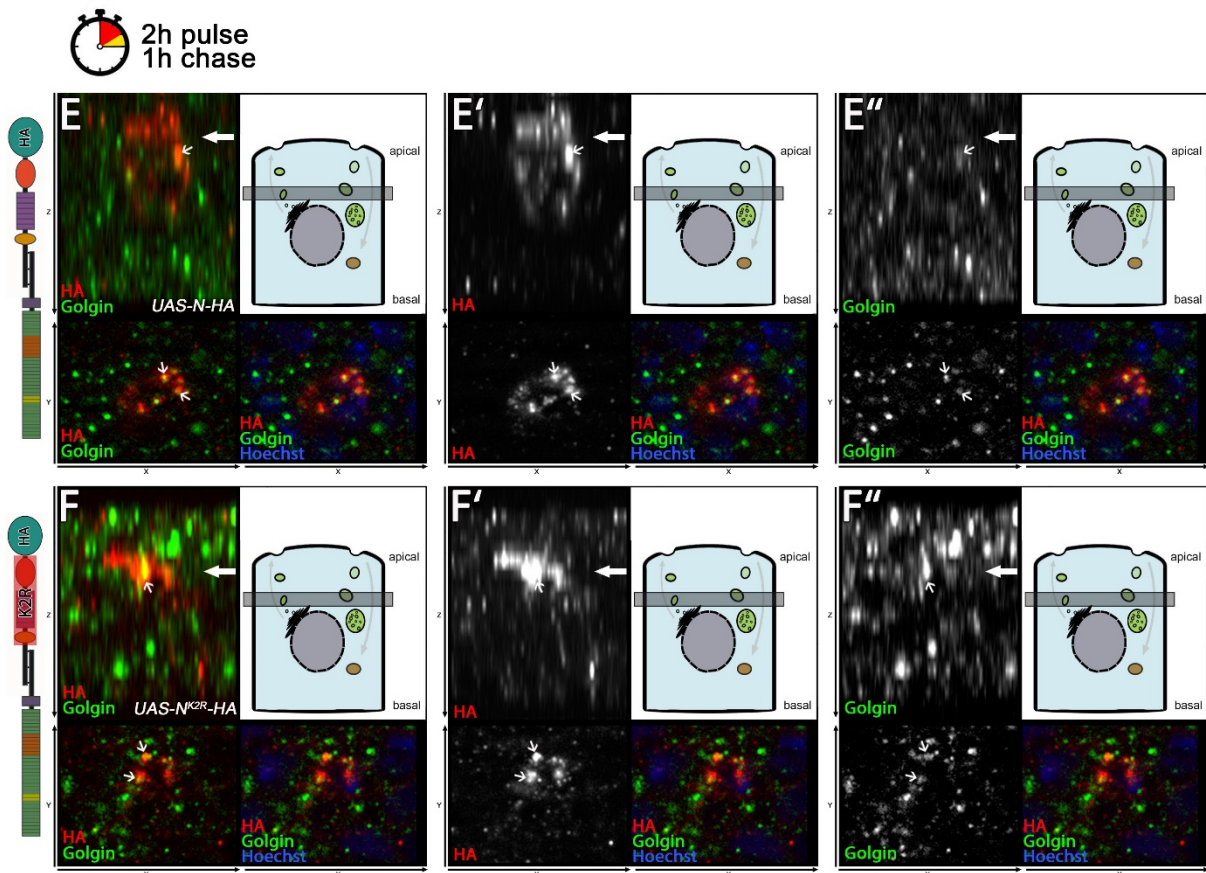


Abb. 19: Sekretion von N-HA und N^{K2R}-HA an die apikale Membran von Flügelimaginalscheiben. Zur Untersuchung der Sekretion von N-HA und N^{K2R}-HA an die apikale Membran wurde ein „pulse-chase“-Assay in Flügelimaginalscheiben durchgeführt. Die Expression der Rezeptoren erfolgte unter Kontrolle des *hh*-GAL4 Treibers mit *tub*-GAL80^{ts}. Nach einer zweistündigen Expression („pulse“) auf 29°C wurden die Larven auf 18°C („chase“) gekühlt und zu verschiedenen Zeitpunkten präpariert und fixiert. Gezeigt wird immer ein Ausschnitt einer HA positive Zelle in der Z-Auflösung (oberer Abschnitt eines Feldes) und der X/Y-Auflösung (unterer Abschnitt eines Feldes). Die schematische Zelle zeigt den optischen Schnitt in der Z-Ebene an, der in der X/Y-Dimension dargestellt wird. Kolokalisationen werden über weiße Pfeile angedeutet. Mit Hilfe einer Antikörperfärbung gegen den ER Marker Calnexin kann gezeigt werden, dass die vesikelartige Akkumulation der Rezeptoren um den Zellkern nach 2h Expression teilweise mit dem ER überlappt (A-B“ weiße Pfeile). Um den Transport zwischen dem ER und dem Golgi darzustellen wurde der „protein-trap“ Rab1-YFP verwendet. Nach 1h „chase“ lassen sich kommt es zu einer Kolokalisation von N-HA und N^{K2R}-HA positiven Vesikeln mit Rab1-YFP (C-D“ weiße Pfeile). Zu diesem Zeitpunkt kommt es auch zu Kolokalisationen mit dem Golgi-Apparat Marker Golgin (E-F“ weiße Pfeile). N-HA und N^{K2R}-HA werden über das ER und den Golgi-Apparat sekretiert und an die apikale Membran transportiert.

Auffällig ist, dass es bei diesem Zeitpunkt, im Vergleich zu N-HA, zu einer leicht vermehrten Anreicherung von N^{K2R}-HA im Zellkern kommt (Abb. 18 E-E“ u. F-F“, Sternchen). Um zu testen, ob es zu späteren Zeitpunkten auch bei dem N-HA Rezeptor zu einer Akkumulation im Zellkern kommt, wurden Flügelimaginalscheiben nach 2h „pulse“ und 3h „chase“ fixiert. Ab diesem Zeitpunkt ist auch bei N-HA ein Signal im Zellkern zu erkennen (Abb. 18 G-G“, Sternchen). N^{K2R}-HA akkumuliert weiterhin stark im Zellkern (Abb. 18 H-H“, Sternchen). Nach 4h „chase“ kommt es bei beiden Rezeptoren zu einer stark ausgeprägten Kernlokalisation (Abb. 18 I-I“ u. J-J“, Sternchen).

Um zu testen, ob die transgenen Rezeptoren über den endosomalen Weg transportiert werden, wurden Imaginalscheiben nach 2h „pulse“ und 4h „chase“ fixiert. Als endosomale Marker wurden die Konstrukte *tub*-Rab5-CFP und *tub*-Rab7-YFP verwendet (Marois et al., 2006). Bei

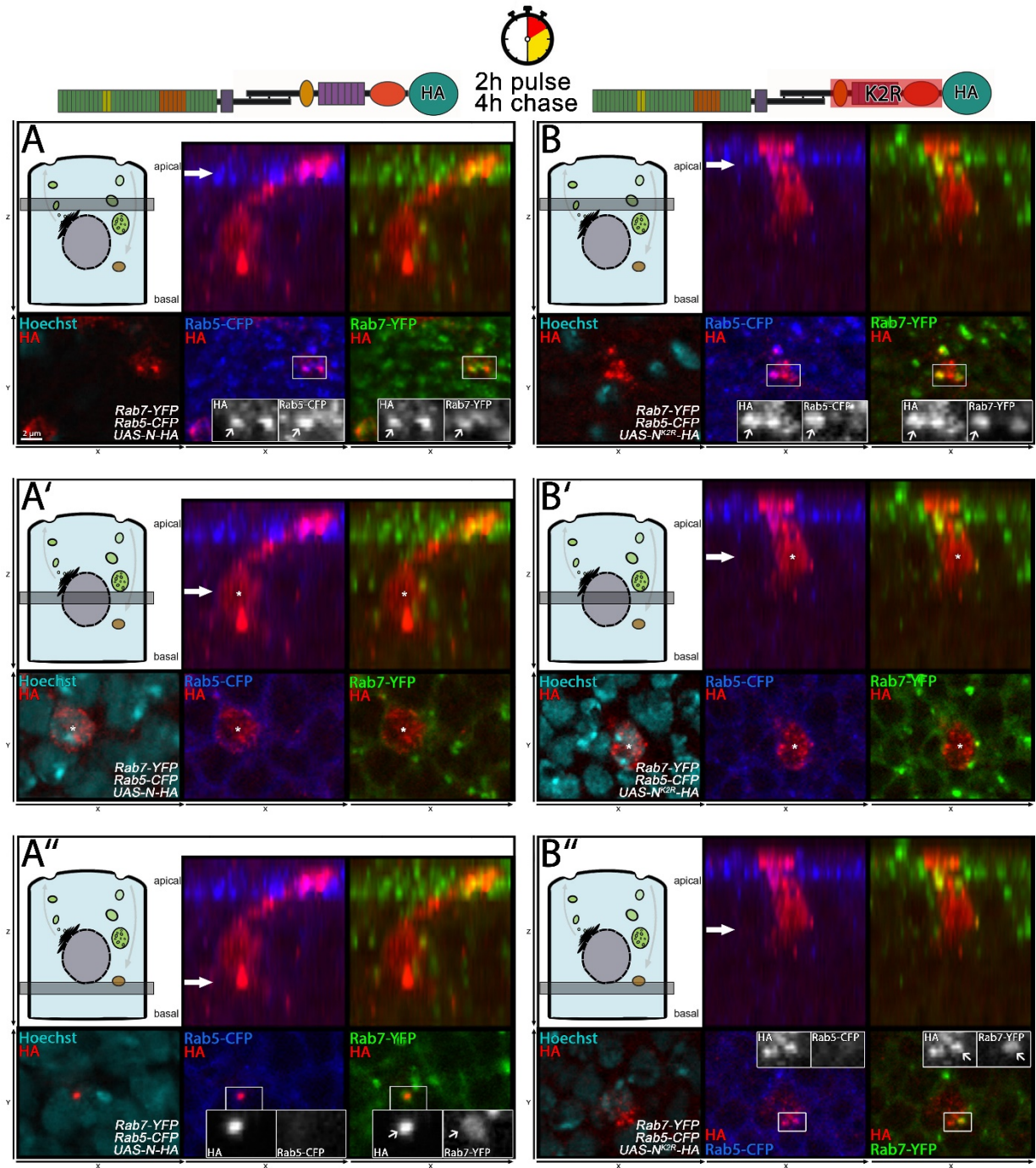


Abb. 20: Endosomal Transport von N-HA und N^{K2R}-HA in Flügelimaginalscheiben. Zur Untersuchung des endosomal Transportes von N-HA und N^{K2R}-HA wurde ein „pulse-chase“-Assay in Flügelimaginalscheiben durchgeführt. Die Expression der Rezeptoren erfolgte unter Kontrolle des *hh*-GAL4 Treibers mit *tub*-GAL80^{ts}. Nach einer zweistündigen Expression („pulse“) auf 29°C wurden die Larven auf 18°C („chase“) gekühlt und nach 4h „chase“ präpariert und fixiert. Gezeigt wird immer ein Ausschnitt einer HA positive Zelle in der Z-Auflösung (oberer Abschnitt eines Feldes) und der X/Y-Auflösung (unterer Abschnitt eines Feldes). Die schematische Zelle zeigt den optischen Schnitt in der Z-Ebene an, der in der X/Y-Dimension dargestellt wird. Kolokalisationen werden über weiße Pfeile angedeutet. Akkumulationen im Zellkern werden über ein Sternchen markiert. Die Lokalisation von N-HA und N^{K2R}-HA in Endosomen wird mit Hilfe der Marker Rab5-CFP (frühe Endosomen) und Rab7-YFP (späte Endosomen) dargestellt. Weiß umrandete Boxen markieren vergrößerte Bereiche in denen die Kanäle als Graustufen gezeigt werden. Apikale N-HA und N^{K2R}-HA positive Vesikel kolokalisieren häufig sowohl mit Rab5, als auch mit Rab7 (A u. B, weiße Pfeile). Bei beiden Rezeptoren kommt es zu einer Akkumulation im Zellkern (A' u. B', Sternchen). Bei basalen N-HA und N^{K2R}-HA positiven Vesikeln kommt es häufig zu einer Kolokalisation mit Rab7, aber selten mit Rab5 (A'' u. B'', weiße Pfeile). Sowohl N-HA, als auch N^{K2R}-HA werden über den endosomal Weg transportiert.

Rab5 handelt es sich um einen früh-endosomalen Marker. Rab7 markiert hingegen reife Endosomen. Für die Analyse wurden sowohl apikale, als auch basale Notch-Vesikel ausgewertet. Wie im Experiment zuvor kommt es zu diesem Zeitpunkt zu einer klaren Kernlokalisierung von N-HA und N^{K2R}-HA (Abb. 20 A' u. B' Sternchen). Das apikale Signal der Rezeptoren beschränkt sich nicht nur auf die apikale Oberfläche der Zelle, sondern ist ebenfalls in subapikalen Notch-Vesikeln zu identifizieren (Abb. 20 A u. B). Sowohl bei N-HA, als auch bei N^{K2R}-HA kann eine Kollokalisierung dieser Vesikel mit Rab5 beobachtet werden. Die Vesikel sind häufig ebenfalls positiv für Rab7 (Abb. 20 A u. B, Pfeile). Vesikel die basal des Zellkerns vorkommen, sind bei beiden Rezeptoren häufig Rab7 positiv, hingegen aber nicht, oder nur leicht Rab5 positiv (Abb. 20 A'' u. B'', Pfeile).

Zusammengefasst verhalten sich beide Rezeptoren sehr ähnlich. Die Synthese von N-HA und N^{K2R}-HA erfolgt am perinukleären ER. Des Weiteren werden beide Rezeptoren über den Golgi-Apparat sekretiert und zum apikalen Pol der Zelle transportiert. Dort akkumulieren N-HA und N^{K2R}-HA deutlich an der apikalen Oberfläche der Zelle. Der Transport von Notch an die apikale Membran scheint demzufolge lysin-unabhängig abzulaufen. Sowohl N-HA und N^{K2R}-HA werden dem endosomalen Transportweg zugeführt. Diese Beobachtung spricht für eine lysin-unabhängige Endozytose des Rezeptors. Der einzige erkennbare Unterschied zwischen N-HA und N^{K2R}-HA scheint ein früherer Eintritt von N^{K2R}-HA in den Zellkern zu sein.

Da die Lokalisation der intrazellulären Domäne von Notch im Zellkern essentiell für die Auslösung des Notch-Signals ist, könnte die frühere Akkumulation von N^{K2R}-HA im Zellkern eine Erklärung für die starke ektopische Aktivierung durch N^{K2R}-HA sein. Eine mögliche Ursache für diese Beobachtung könnte in dem proteasomalen Abbau der intrazellulären Domäne des Rezeptors liegen. Für N1 konnte gezeigt werden, dass eine Phosphorylierung und anschließende Ubiquitinierung der PEST-Domäne am C-terminus von NICD als Signal für den proteasomalen Abbau benötigt wird (Fryer et al., 2004; Gupta-Rossi et al., 2001; Oberg et al., 2001). Sollte diese Form des Abbaus auch für den *Drosophila* Notch-Rezeptor gelten, so würde ein Verlust der Lysine zu einer Unterbrechung des Abbaus und somit zu einer Akkumulation von NICD im Zellkern führen.

3.6 Herstellung von NICD Konstrukten zur Untersuchung des Abbaus im Zellkern

Um zu testen, ob der Verlust der intrazellulären Lysine zu einem Abbaufekt des Rezeptors führt, wurden Konstrukte hergestellt, die ausschließlich über die intrazelluläre Domäne des

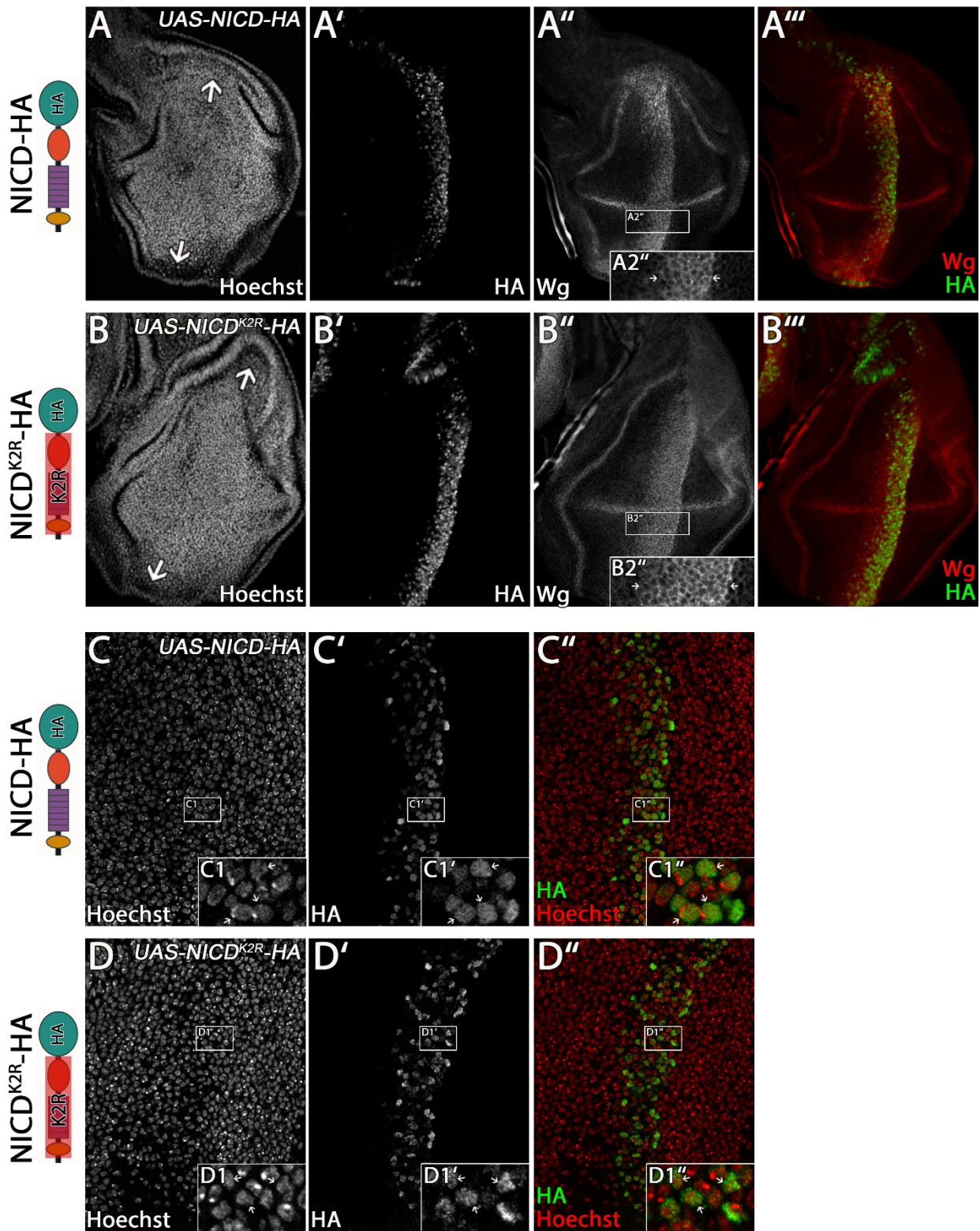
***ptc*-GAL4, *tub*-GAL80^{ts} 48 h Expression**

Abb. 21: Expression von NICD-HA und NICD^{K2R}-HA in Flügelimaginalscheiben. Die Expression der Konstrukte wurde unter Kontrolle des *ptc*-GAL4 Treibers mit *tub*-GAL80^{ts} für 48h durchgeführt. Als Marker für die Aktivität des Notch-Signalweges wurde eine Antikörperfärbung gegen Wg durchgeführt (A'' u. B''). Zur Identifikation der transgenen Notch-Rezeptoren wurde einer Antikörperfärbung gegen HA durchgeführt (A'/B'/C'/D'). Eine Kernfärbung wurde mit Hilfe des Farbstoffes Hoechst durchgeführt (A/B/C/D). Die Expression von NICD-HA und NICD^{K2R}-HA führt zu einer deutlichen Überproliferation der Flügelimaginalscheiben (A u. B, Pfeile). NICD^{K2R}-HA führt im Vergleich zu NICD-HA zu einer stärkeren anterioren Ausbreitung der ektopischen Wg Expression (A''/A2'' u. B''/B2'', Pfeile). Sowohl NICD-HA als auch NICD^{K2R}-HA sind ausschließlich im Zellkern zu identifizieren (C'/C1' u. D'/D1', Pfeile).

Rezeptors verfügen. Da bei diesen Konstrukten weder das Signalpeptid, noch die extrazelluläre Domäne und die Transmembrandomäne vorhanden sind, sollten die Rezeptoren direkt in den Zellkern gelangen. Als Kontrolle wurde ein Konstrukt hergestellt bei dem alle Lysine vorhanden sind. Beide Konstrukte verfügen über einen C-terminalen HA-Tag. Um die Kernlokalisation von NICD-HA und NICD^{K2R}-HA zu überprüfen, wurden die Konstrukte unter Kontrolle des *ptc*-Gal4 Treibers für 48h exprimiert.

Die Expression beider Konstrukte führt zu einer starken Überproliferation der Flügelimaginalscheiben (Abb. 21 A1 u. B1, Pfeile). Die Wg Expression dehnt sich sowohl bei NICD-HA als auch NICD^{K2R}-HA über das gesamte Flügel Feld in dorso-ventraler Richtung aus (Abb. 21 A'' und B''). Im Gegensatz zu NICD-HA führt NICD^{K2R}-HA zu einer stärkeren Ausdehnung der Wg Expression in die anteriore Richtung (Abb. 21 A2'' u. B2'', Pfeile). Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass NICD^{K2R}-HA im Vergleich zu NICD-HA zu einer stärkeren Aktivierung der Notch-Zielgene führt. Beide Rezeptoren lokalisieren ausschließlich im Zellkern (Abb. 21 C-C'' u. D-D'').

3.6.1 Untersuchung des Abbaus von NICD-HA und NICD^{K2R}-HA im Zellkern

Um den Abbau der intrazellulären Domäne näher zu analysieren wurde in Zusammenarbeit mit Marvin Lyga (Lyga, 2016) ein „pulse-chase“ Experiment durchgeführt. Für diesen Versuch wurden die Rezeptoren unter Kontrolle des *ptc*-GAL4 Treibers exprimiert. Um die Anreicherung der intrazellulären Domänen im Zellkern zu untersuchen, wurden die Konstrukte für 10h exprimiert und die HA positiven Zellkerne ausgezählt (Abb. 22 A-C). Die Auszählung der Zellkerne erfolgte im ventralen Bereich der Flügelimaginalscheiben (Abb. 22 A'' u. B'', Umrandung). Sowohl bei NICD-HA als auch bei NICD^{K2R}-HA kommt es nach 10h Expression noch nicht zu einer ektopischen Wg Expression (Abb. 22 A u. B, Pfeile). Die Auszählung der NICD^{K2R}-HA positiven Zellkerne zeigt im Vergleich zu NICD-HA einen signifikanten Anstieg der NICD^{K2R}-HA positiven Zellkerne (Abb. 22 C). Die höhere Anzahl HA positiver Zellkerne weist auf eine stärkere Akkumulation von NICD^{K2R}-HA im Zellkern hin.

Um zu zeigen ob diese Akkumulation auf einen Abbaufekt zurückzuführen ist, wurden NICD-HA und NICD^{K2R}-HA für 10h exprimiert („pulse“) und anschließend für 16h auf 18°C inkubiert („chase“). Nach dieser Zeit wurden die verbleibenden HA positiven Zellkerne ausgezählt (Abb. 22 D-F). Da es bei diesem Zeitpunkt bereits zu einer starken Abnahme der HA positiven

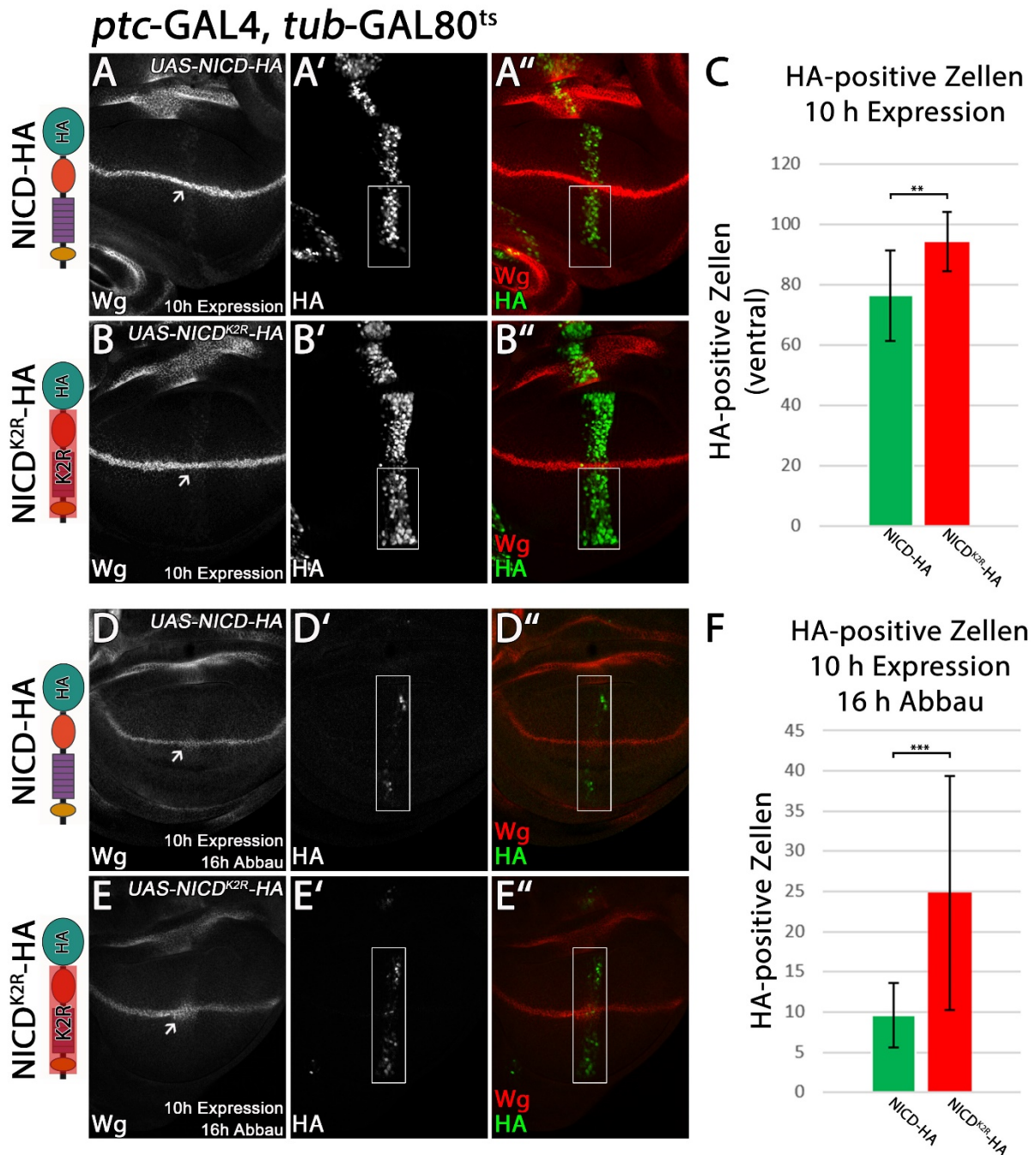


Abb. 22: Untersuchung des Abbaus von NICD-HA und NICD^{K2R}-HA im Zellkern. NICD-HA und NICD^{K2R}-HA wurden unter Kontrolle des *ptc-GAL4* Treibers mit *tub-GAL80^{ts}* für 10h (29°C) exprimiert (A-C). Zur Identifizierung der transgenen Rezeptoren wurde eine HA Färbung durchgeführt. Als Marker für die Notch-Aktivität wurde eine Antikörperfärbung gegen Wg durchgeführt. Zur Quantifizierung der HA positiven Zellkerne wurde eine Zählung des ventralen Bereiches durchgeführt (A' u. B' weiße Box). Nach 10h Expression kommt es im Vergleich zu NICD-HA zu einem vermehrten Auftreten von NICD^{K2R}-HA positiven Zellkernen (NICD-HA: n=14 / NICD^{K2R}-HA n=12 Flügelimaginalscheiben) (C). 10h Expression führt sowohl bei NICD-HA, als auch bei NICD^{K2R}-HA zu keiner ektopischen Wg Expression (A u. B Pfeile). Zur Untersuchung des Abbaus im Zellkern wurden die Rezeptoren für 10h Exprimiert (29°C) und im Anschluss für 16h auf restriktiver Temperatur (18°C) gehalten (D-F). Nach 16h Abbau kommt es bei NICD-HA und NICD^{K2R}-HA zu einer leichten ektopischen Wg Expression (D u. E, Pfeile). Die verbliebenen HA positiven Zellen wurden im gesamten Flügel Feld ausgezählt (D' u. E', weiße Box). Nach 16h Abbau sind im Vergleich zu NICD-HA deutlich mehr NICD^{K2R}-HA positive Zellkerne zu identifizieren (NICD-HA n=17 / NICD^{K2R}-HA n=20 Flügelimaginalscheiben) (F). Der Austausch der intrazellulären Lysine des Notch-Rezeptors führt zu einer Unterdrückung des Abbaus der intrazellulären Domäne im Zellkern. Signifikanztest: tTest ($p < 0,01$ (**) / $p < 0,001$ (***)).

Zellkerne kommt, wurden die verbleibenden HA positiven Zellkerne im gesamten Flügelfeld ausgezählt (Abb. 22 D'-D'' u. E'-E'', Umrandung). Trotz der deutlich reduzierten Anzahl von HA positiven Zellkernen, lässt sich sowohl bei NICD-HA als auch NICD^{K2R}-HA eine leichte ektopische Wg Expression identifizieren (Abb. 22 D u. E, Pfeile). Die Auszählung der verbliebenen HA positiven Zellkerne zeigt im Vergleich zu NICD-HA einen signifikanten Anstieg der verbleibenden NICD^{K2R}-HA positiven Zellkerne (Abb. 22 F). Der Unterschied ist deutlich stärker ausgeprägt als durch die Auszählung der Zellkerne nach 10h Expression (Abb. 22 Vergleich C u. F).

Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass es durch den Austausch der intrazellulären Lysine des Notch-Rezeptors zu einer deutlichen Verzögerung des Abbaus der intrazellulären Domäne im Zellkern kommt. Dieser Effekt ist bereit bei 10h Expression zu beobachten, verstärkt sich allerdings deutlich im Verlauf des Proteinabbaus. Eine ektopische Wg Expression lässt sich erst nach 16h „chase“ beobachten. Da es sich bei wg um ein Zielgen des Notch-Signalweges handelt, ist zu vermuten, dass das verzögerte Auftreten der ektopischen Wg Expression auf die Signalauslösung im Zellkern und die Synthese des Wg Proteins zurückzuführen ist.

Die Beobachtung, dass N^{K2R}-HA im Vergleich zu N-HA im „pulse-chase“-Experiment zu einem früheren Zeitpunkt im Zellkern zu identifizieren ist (Abb. 18), könnte auf den Abbaufekt der intrazellulären Domäne des Rezeptors im Zellkern zurückzuführen sein. Der Abbaufekt von NICD^{K2R}-HA würde so im Verlauf der Expression zu einer Anreicherung der intrazellulären Domäne im Zellkern führen und eine verstärkten Aktivierung der Notch-Zielgene auslösen. Der Unterschied der Aktivierung von NICD-HA und NICD^{K2R}-HA fällt im Vergleich zu den „full-length“ Rezeptoren allerdings geringer aus. Die starke ektopische Aktivierung des N^{K2R}-HA Rezeptors kann daher nicht ausschließlich auf den Abbaufekt im Zellkern zurückgeführt werden. Die Beobachtungen legen nahe, dass der „full length“ N^{K2R}-HA Rezeptor durch die Kuz unabhängige Aktivierung vermehrt gespalten wird und auf diese Weise mehr NICD entsteht und in den Zellkern transloziert. Im Zellkern kommt es anschließend zu einem verzögerten Abbau von NICD. Die ektopische Aktivität des Notch-Signalweges durch die Expression von N^{K2R}-HA ist daher vermutlich auf eine Kombination aus verstärkter Abspaltung der intrazellulären Domäne und einem Abbaufekt im Zellkern zurückzuführen.

3.7 Beeinflussung der Endozytose des endogenen Rezeptors durch N-HA und N^{K2R}-HA

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Austausch der intrazellulären Lysine des Notch-Rezeptors nicht zu einer Unterbrechung der Endozytose führt. Dabei muss allerdings beachtet werden, dass in allen bisher durchgeführten Experimenten der endogene Rezeptor vorhanden war. Es besteht daher die Möglichkeit, dass die Endozytose der transgenen Rezeptoren durch den endogenen Rezeptor, oder umgekehrt, beeinflusst wird.

Um zu testen, ob es zu einer Beeinflussung zwischen dem endogenen und den transgenen Rezeptoren kommt, wurden N-HA und N^{K2R}-HA konstitutiv unter Kontrolle des *ptc*-Gal4 Treibers exprimiert und die Lokalisation von endogenem mit YFP markiertem Notch analysiert. Entlang der Expressionsdomäne kommt es bei N-HA und N^{K2R}-HA zu einem starken HA Signal (Abb. 23 A und B). Beide Rezeptoren sind an der apikalen Membran zu beobachten (Abb. 23 A1 und B1, Pfeile). N-YFP lässt sich sowohl an der apikalen Membran als auch in Vesikeln beobachten (Abb. 23 A' und B'). Auffällig ist, dass es durch die Expression von N-HA und N^{K2R}-HA zu einer verstärkten Akkumulation von N-YFP Vesikeln kommt (Abb. 23 A-A'' und B-B'', Pfeile). Bei genauerer Betrachtung der Membranlokalisation von N-YFP lässt sich feststellen, dass die Expression von N-HA zu einer Abschwächung des N-YFP Membransignals führt (Abb. 23 A1', Pfeile). Dieser Effekt ist hingegen durch die Expression von N^{K2R}-HA nicht klar erkennbar (Abb. 23 B1', Pfeile). Diese Beobachtung lässt sich auch durch die Expression von N-HA und N^{K2R}-HA für 14,5h im posterioren Kompartiment verifizieren (Abb. 23 D-E', Pfeile). Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass N-HA im Vergleich zu N^{K2R}-HA eine verstärkte Endozytose von N-YFP auslöst. Da die Expression beider Rezeptoren zu einer verstärkten Akkumulation von N-YFP in Vesikeln führt, ist davon auszugehen, dass es zusätzlich zu einer Beeinflussung des endosomalen Transportes von N-YFP kommt.

Anhand dieses Experimentes lässt sich allerdings nicht feststellen, ob die verstärkte Akkumulation von N-YFP ausschließlich durch transgene Notch-Rezeptoren ausgelöst wird, oder ob es sich um einen unspezifischen Effekt durch die Überexpression von Transmembranproteinen handelt. Es ist vorstellbar, dass die Überexpression von Transmembranproteinen generell eine verstärkte Endozytose auslöst und der endogene Notch-Rezeptor als sekundäre Fracht endozytiert wird. Um zu testen, ob es sich um einen spezifischen, oder unspezifischen Effekt handelt, wurde das Transmembranprotein Smo (Smoothened) exprimiert (Abb. 23 C-C''). Bei Smo handelt es sich um einen Rezeptor des Hh-Signalweges.

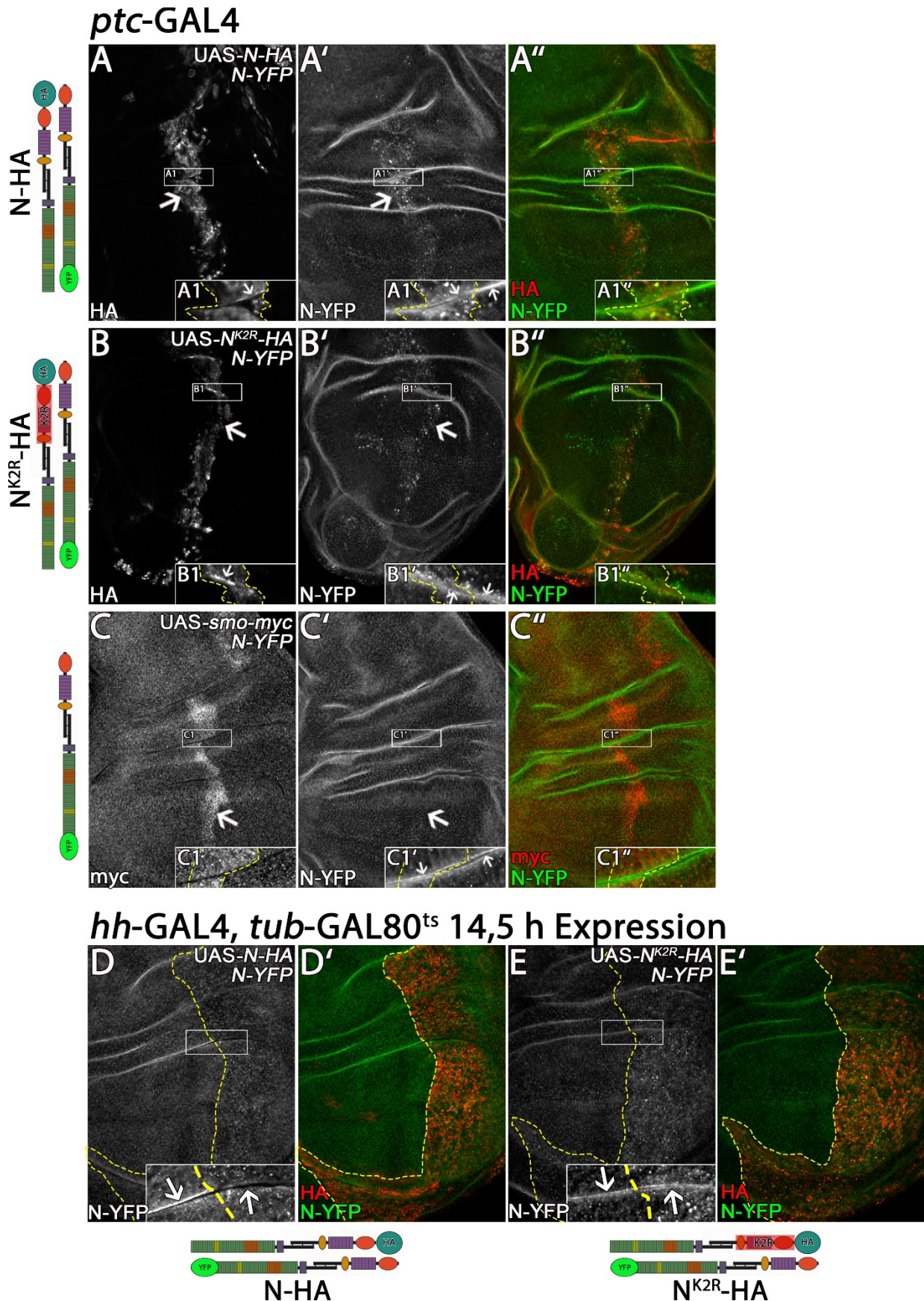


Abb. 23: Einfluss der Expression von N-HA und N^{K2R}-HA auf die Lokalisation des endogenen Rezeptors in Flügelimaginalscheiben. N-HA und N^{K2R}-HA wurden unter Kontrolle des *ptc*-Gal4 Treibers konstitutiv exprimiert. Zur Identifikation des endogenen Notch-Rezeptors wurde der „protein-trap“ N-YFP verwendet. Zur Identifikation der transgenen Rezeptoren wurde eine Antikörperfärbung gegen HA verwendet. Als Kontrolle wurde das Transmembranprotein Smo exprimiert. Smo verfügt über einen myc-Tag, der mit Hilfe eines myc-Antikörpers gefärbt wurde. Die weißen Boxen innerhalb der Abbildung

markieren Bereiche die vergrößert wurden. Gestrichelte gelbe Linien markieren die Grenzen der Expressionsdomäne. Sowohl N-HA als auch N^{K2R}-HA führen zu einer Akkumulation von N-YFP in Vesikeln (A-A'' u. B-B'', Pfeile). N-HA führt zu einer Reduzierung von N-YFP an der apikalen Membran (A1', Pfeile). Dieser Effekt lässt sich bei N^{K2R}-HA nicht beobachten (B1', Pfeile). Durch die Expression von N-HA unter Kontrolle des *hh*-GAL4 Treibers mit *tub*-GAL80^S für 14,5h kann die abgeschwächte N-YFP Akkumulation an der Membran bestätigt werden (D-D', Pfeile). Die Expression von N^{K2R}-HA führt zu keiner deutlichen Abschwächung von N-YFP an der Membran, aber zu einer starken Akkumulation in Vesikeln (E-E'). Durch die Überexpression von Smo-myc ist weder eine Akkumulation von N-YFP in Vesikeln (C-C'', Pfeile), noch eine abgeschwächte Membranlokalisation zu erkennen (C1', Pfeile). Die Beeinflussung der Lokalisation von N-YFP scheint spezifisch durch die Expression von N-HA und N^{K2R}-HA ausgelöst zu werden.

Die Konzentration des Rezeptors an der Zelloberfläche wird ähnlich wie bei Notch über die Endozytose reguliert (Li et al., 2012). Sollte der endogene Notch-Rezeptor als sekundäre Fracht durch die Überexpression von Transmembranproteinen endozytiert werden, so sollte es auch in diesem Experiment zu einer Akkumulation von N-YFP in Vesikeln kommen.

Im Gegensatz zu den transgenen Notch-Rezeptoren, kann dieser Effekt durch die Expression von Smo-myc nicht hervorgerufen werden. Es kommt weder zu einer Akkumulation von N-YFP in Vesikeln (Abb. 23 C-C'', Pfeile), noch lässt sich ein abgeschwächtes Membransignal an der apikalen Membran identifizieren (Abb. 23 C1-C1'', Pfeile).

Die Ergebnisse legen nahe, dass es sich bei der veränderten Lokalisation von N-YFP um einen spezifischen Effekt durch die Expression der transgenen Notch-Rezeptoren handelt und deuten darauf hin, dass es zu einer Interaktion zwischen dem endogenen und den transgenen Rezeptoren kommt.

3.8 Untersuchung der Aktivität von N-HA und N^{K2R}-HA in Notch mutanten Zellklonen

Da es durch die Expression von N-HA und N^{K2R}-HA zu einer Beeinflussung der Lokalisation des endogenen Rezeptors kommt, sollte überprüft werden, ob sich dieser Effekt auf die Aktivierung von N-HA und N^{K2R}-HA auswirkt. Um diese Frage zu beantworten, wurde eine klonale Analyse mit Hilfe des Nullallels *N^{55el1}* (Lehmann et al., 1983) in Flügelimaginalscheiben durchgeführt. Die Expression von N-HA und N^{K2R}-HA wurde unter Kontrolle des *ptc*-GAL4 Treibers durchgeführt. *N^{55el1}* mutante Zellklone sind durch die Abwesenheit des RFP Markers gekennzeichnet. Eine Färbung mit Hilfe des NECD Antikörpers zeigt in *N^{55el1}* Zellklonen eine klare Unterbrechung des Fluoreszenzsignals (Abb. 24 A'). Die Aktivität des Notch-Signalweges wird in *N^{55el1}* Klonen klar unterbrochen (Abb. 24 A'', Pfeil). An den *N^{55el1}* Klonegrenzen kommt es in einem Zelldurchmesser außerhalb der Klone zu einer verstärkten Notch-Aktivität (Abb. 24 A'' Pfeilkopf). Diese Aktivität lässt sich auf die Aufhebung der *cis*-Inhibition durch den Ausfall von Notch zurückführen (Becam et al., 2010). Die Expression von N-HA führt zu keinen deutlichen Unterschieden der Notch-Aktivität in *N^{55el1}* mutanten Zellklonen und wildtypischen

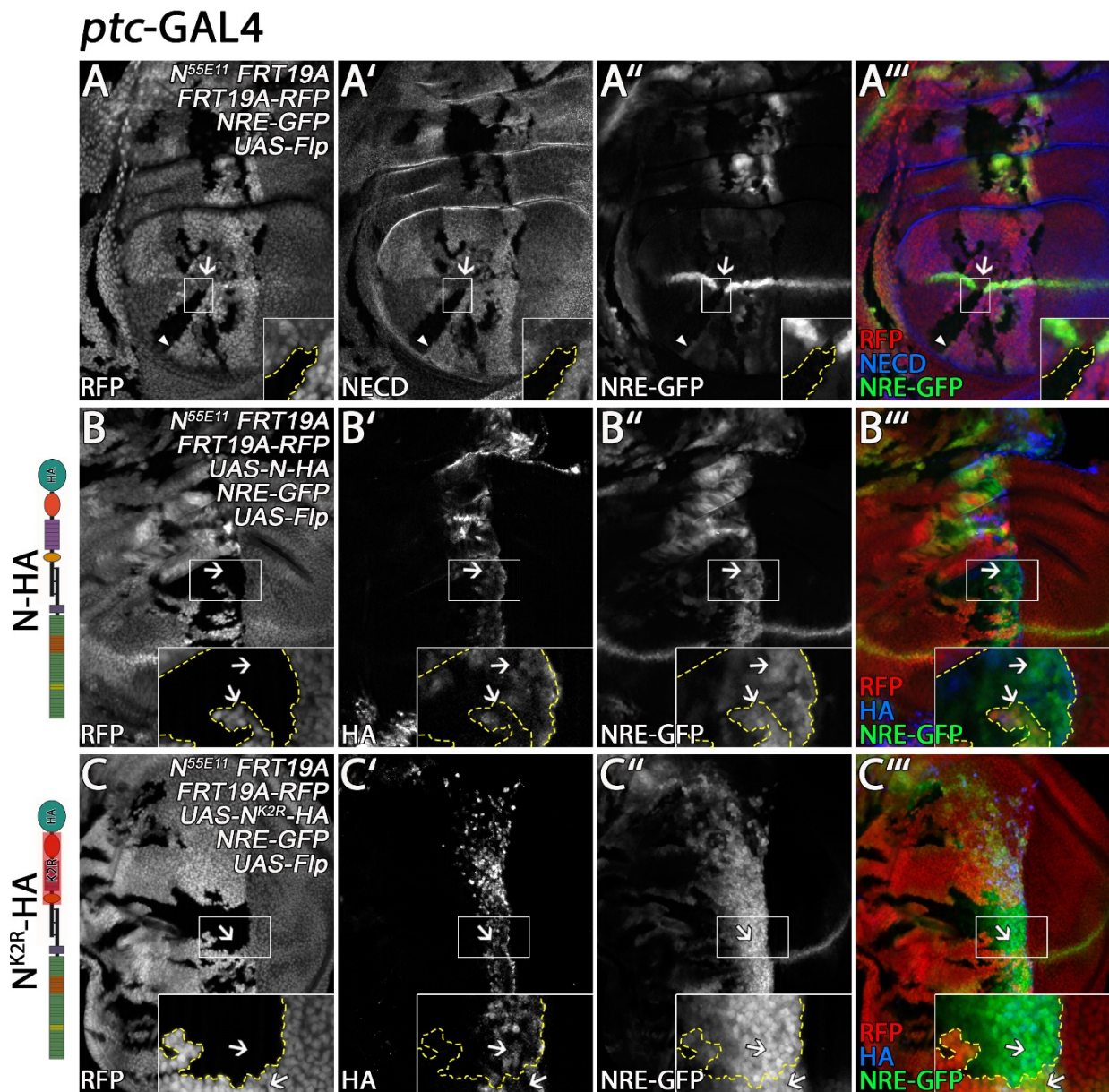


Abb. 24: Aktivierung von N-HA und N^{K2R}-HA in N^{55E11} mutanten Zellklonen. Die Induktion der Zellklone erfolgte mit Hilfe des Flp/FRT Systems. Homozygot mutante N^{55E11} Klone sind durch die Abwesenheit von RFP zu identifizieren. Als Marker für die Notch-Aktivität wurde NRE-GFP verwendet. Sowohl die Flipase als auch N-HA, sowie N^{K2R}-HA wurden unter Kontrolle des *ptc-GAL4* Treibers exprimiert. Vergrößerte Bereiche werden durch weiße Boxen gekennzeichnet. Die gestrichelte gelbe Linie markiert die Klongenzen. Innerhalb von N^{55E11} mutanten Klone kommt es zu keiner detektierbaren Färbung mit Hilfe des NECD Antikörpers (A'). Innerhalb N^{55E11} mutanter Klone kommt es zu einer Unterbrechung der NRE-GFP Signals (A'', Pfeil) Außerhalb der Klongenzen kommt es zu einer ein Zelldurchmesser breiten ektopischen Notch-Aktivierung (A'', Pfeilkopf). Die Expression der transgenen Notch-Rezeptoren wird über eine Antikörperfärbung gegen HA dargestellt (B' u. C'). Innerhalb von N^{55E11} mutanten Klonen kommt es zu keinen deutlichen Beeinflussungen der N-HA Aktivität (B'', Vergrößerung Pfeile). Die Expression von N^{K2R}-HA führt Innerhalb von N^{55E11} mutanten Klonen ebenfalls zu keiner Veränderung der Aktivierung des Notch-Signalwegs (C'', Vergrößerung Pfeile).

Bereichen (Abb. 24 B-B''', Vergrößerung Pfeile). Die Expression von N^{K2R}-HA führt ebenfalls zu keinen detektierbaren Unterschieden in der Notch-Aktivität zwischen N^{55E11} Klonen und wildtypischen Bereichen (Abb. 24 C-C''', Vergrößerung Pfeile). Die Ergebnisse zeigen, dass der endogene Rezeptor keine deutlichen Auswirkungen auf die ektopische Notch-Aktivierung durch N-HA und N^{K2R}-HA hat. Trotz der durch N-HA und N^{K2R}-HA ausgelösten verstärkten Vesikel-Akkumulation des endogenen Rezeptors, wird die ektopische Aktivierung des Notch-

Signalweges hauptsächlich durch die transgenen Rezeptoren ausgelöst und nicht, oder nur gering durch eine mögliche Interaktion zwischen den transgenen und dem endogenen Rezeptor beeinflusst.

3.9 Analyse der endosomalen Lokalisation von N-HA und N^{K2R}-HA

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Austausch der intrazellulären Lysine des Notch-Rezeptors zu einer starken liganden-unabhängigen Aktivierung des Notch-Signalweges führt. Da gezeigt werden konnte, dass eine liganden-unabhängige Notch-Aktivität in der Regel am Endosom/Lysosom ausgelöst wird (Übersicht in (Palmer and Deng, 2015)), sollte in den folgenden Experimenten die subzelluläre Lokalisation von N-HA und N^{K2R}-HA detailliert untersucht werden. Dazu wurden N-HA und N^{K2R}-HA im posterioren Kompartiment von Flügelimaginalscheiben für 24h exprimiert. Um den endogenen Rezeptor zu verfolgen, wurde der N-YFP „protein-trap“ verwendet.

Die Expression von N-HA für 24h führt zu einer Akkumulation des Rezeptors an der apikalen Membran, sowie im basalen Kompartiment (Abb. 25 A, Pfeile). Im Gegensatz dazu kommt es bei N^{K2R}-HA zu einer sehr starken basalen Akkumulation des Rezeptors (Abb. 25 C, Pfeile). In diesem Fall ist die Lokalisation an der apikalen Membran durch das starke basale Vesikelsignal kaum erkennbar, aber dennoch vorhanden. Durch eine Übersättigung des Signals kann die apikale Lokalisation sichtbar gemacht werden (Abb. 25 C'''' u. C''''', Pfeile). N-YFP ist in beiden Fällen stark in Vesikeln lokalisiert (Abb. 25 A' und C').

Die basalen N-HA positiven Vesikel koloalisieren mit N-YFP (Abb. 25 B-B'', Pfeile). Bei den basalen N^{K2R}-HA positiven Vesikeln kommt es im Vergleich zu N-HA zu der deutlichen Ausprägung eines Lumens. N-YFP ist in denselben Vesikeln vorhanden, scheint sich allerdings im Inneren des Lumens zu befinden (Abb. 25 D-D'', Pfeile).

Um diese Beobachtung zu verifizieren- wurden SIM (Structured Illumination Microscopy) Aufnahmen durchgeführt. Die Analyse zeigt, dass sich N-HA im Lumen basaler Vesikel befindet, die häufig mit N-YFP assoziiert sind (Abb. 25 E-E''). Im Gegensatz dazu ist bei N^{K2R}-HA positiven Vesikeln eine Vergrößerung und ein klares Lumen erkennbar. N-YFP kann deutlich innerhalb des Lumens identifiziert werden (Abb. 25 F-F'').

Die Ergebnisse legen nahe, dass die intrazellulären Lysine des Rezeptors für eine Internalisierung von Notch in das Lumen der Vesikel benötigt werden. Die starke Akkumulation von N^{K2R}-HA an der limitierenden Membran der Vesikel könnte daher durch eine Unterdrückte Verpackung

hh-GAL4, *tub*-GAL80^{ts} 24 h Expression

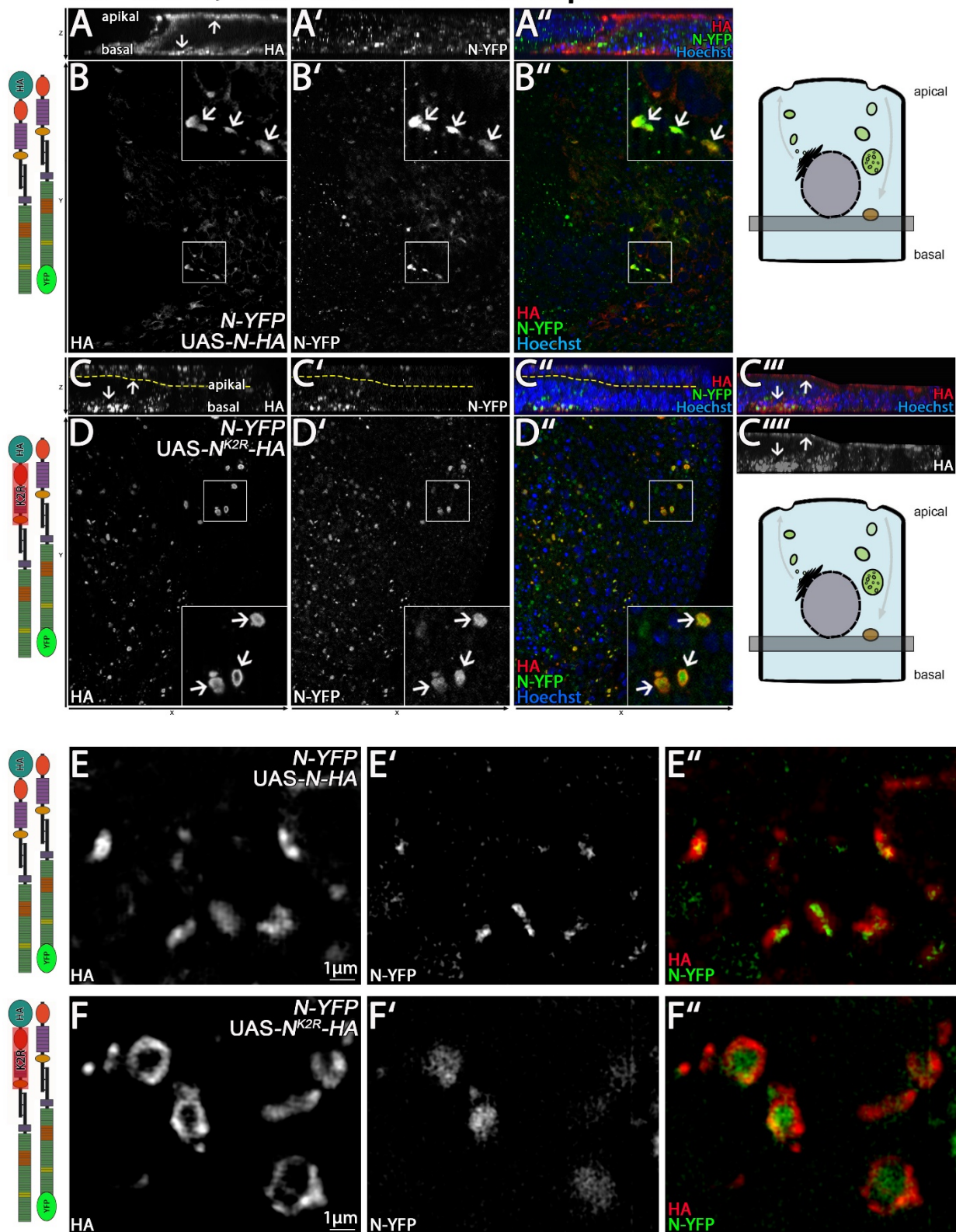


Abb. 25: Untersuchung von N-HA und N^{K2R}-HA positiven Vesikeln in Flügelimaginalscheiben. N-HA und N^{K2R}-HA wurden unter Kontrolle des *hh*-GAL4 Treibers mit *tub*-GAL80^{ts} für 24h exprimiert. Zur Verfolgung des endogenen Notch-Rezeptors wurde N-YFP verwendet. Um die apiko-basale Lokalisation der Rezeptoren darzustellen wurden Z-Stapel der Imaginalscheiben aufgenommen (A-A'' u. C-C'''). Die schematische Zelle in der X/Y-Ebene dargestellt wird. Vergrößerte Bereiche sind durch weiße Boxen gekennzeichnet. Die transgenen Rezeptoren wurden mit Hilfe einer Antikörperfärbung gegen HA dargestellt. N-HA lokalisiert stark an der apikalen Membran und im basalen Kompartiment der Imaginalscheibe (A, Pfeile). Die Position der apikalen Membran wird mit einer gestrichelten gelben Linie markiert (C-C'''). N^{K2R}-HA ist stark in basalen Vesikeln vertreten (C, Pfeile). Durch das starke Signal in Vesikeln wird die Lokalisation an der apikalen Membran überdeckt. Zur Visualisierung der Membranfärbung wurde das Signal verstärkt und die Färbung der

Peripodialmembran überdeckt (C'''' u. C''''', Pfeile). Basale N-HA positive Vesikel kolokalisieren deutlich mit N-YFP (B-B''). Basale N^{K2R}-HA positive Vesikel weisen häufig ein Lumen auf und kolokalisieren ebenfalls mit N-YFP (D-D''). Zur detaillierteren Darstellung wurden SIM (structured illumination microscopy) Aufnahmen von basalen Vesikeln durchgeführt. Hierdurch kann bestätigt werden, dass es zu einer Kolokalisation von N-HA und N-YFP kommt (E-E''). Basale N^{K2R}-HA positive Vesikel weisen im Vergleich zu N-HA eine Vergrößerung und ein klares Lumen auf. N-YFP befindet sich innerhalb des Lumens vergrößerter N^{K2R}-HA positiver Vesikel (F-F'').

in ILVs von gereiften Endosomen zurückzuführen sein. Hingegen scheint die Internalisierung des endogenen Rezeptors nicht beeinflusst zu werden. Die Lokalisation von N^{K2R}-HA an der limitierenden Membran der Vesikel bietet zudem eine mögliche Erklärung für die starke ektopische Aktivierung des Rezeptors. So kommt es auch bei Ausfällen von Komponenten der endosomalen Reifung zu einer ektopischen Notch-Aktivierung, die vermutlich auf eine fehlerhafte Verpackung des Rezeptors in ILVs gereifter Endosomen zurückzuführen ist. Beispiele hierfür sind der Ausfall von *lgd* oder der ESCRT-III Komponente *shrub* (Schneider et al., 2013; Troost et al., 2012). Ein weiteres Beispiel für diesen Effekt ist die Überexpression der E3-Ligase Dx (Baron, 2012; Hori et al., 2011; Shimizu et al., 2014; Wilkin et al., 2008).

Da die Aktivierung in all diesen Fällen in endosomalen/lysosomalen Kompartimenten stattfindet, stellt sich die Frage, ob es sich bei den vergrößerten basalen N^{K2R}-HA positiven Vesikeln ebenfalls um endosomale Kompartimente handelt.

3.9.1 Untersuchung des endosomalen Ursprungs von N^{K2R}-HA positiven Vesikeln

Um zu untersuchen, ob es sich bei den vergrößerten basalen N^{K2R}-HA Vesikeln um endosomale Kompartimente handelt, wurde eine Antikörperfärbung gegen Rab7 durchgeführt. N-HA und N^{K2R}-HA wurden für 24h im posterioren Kompartiment von Flügelimaginalscheiben exprimiert. Die Expression von N-HA führt im Gegensatz zu N^{K2R}-HA zu einer starken Entwicklung von Zelltod (Abb. 26 A-A2 u. B-B2). Da die toten Zellen im basalen Bereich der Imaginalscheibe akkumulieren und das Gewebe stark geschädigt ist, wird die Analyse basaler Vesikel erschwert. Bei basalen N-HA positiven Vesikel kann keine deutliche Kolokalisation mit Rab7 beobachtet werden (Abb. 26 A2-A2'', Pfeile). Die vergrößerten basalen N^{K2R}-HA positiven Vesikel mit Lumen weisen ebenfalls keine klare Kolokalisation mit Rab7 auf. Dabei ist auffällig, dass es zwar zu keiner direkten Kolokalisation kommt, Rab7 positive Vesikel aber häufig in direkter räumlicher Nähe auftreten (Abb. 26 B2-B2'', Pfeile).

Diese Beobachtungen deutet darauf hin, dass es sich bei den basalen Notch-Vesikeln nicht um endosomale Kompartimente handelt. Da aber gezeigt werden konnte, dass sowohl N-HA, als auch N^{K2R}-HA über den endosomalen Transportweg transportiert werden, ist zu vermuten, dass es durch die starke Überexpression zu einer Akkumulation basaler Vesikel kommt, die die

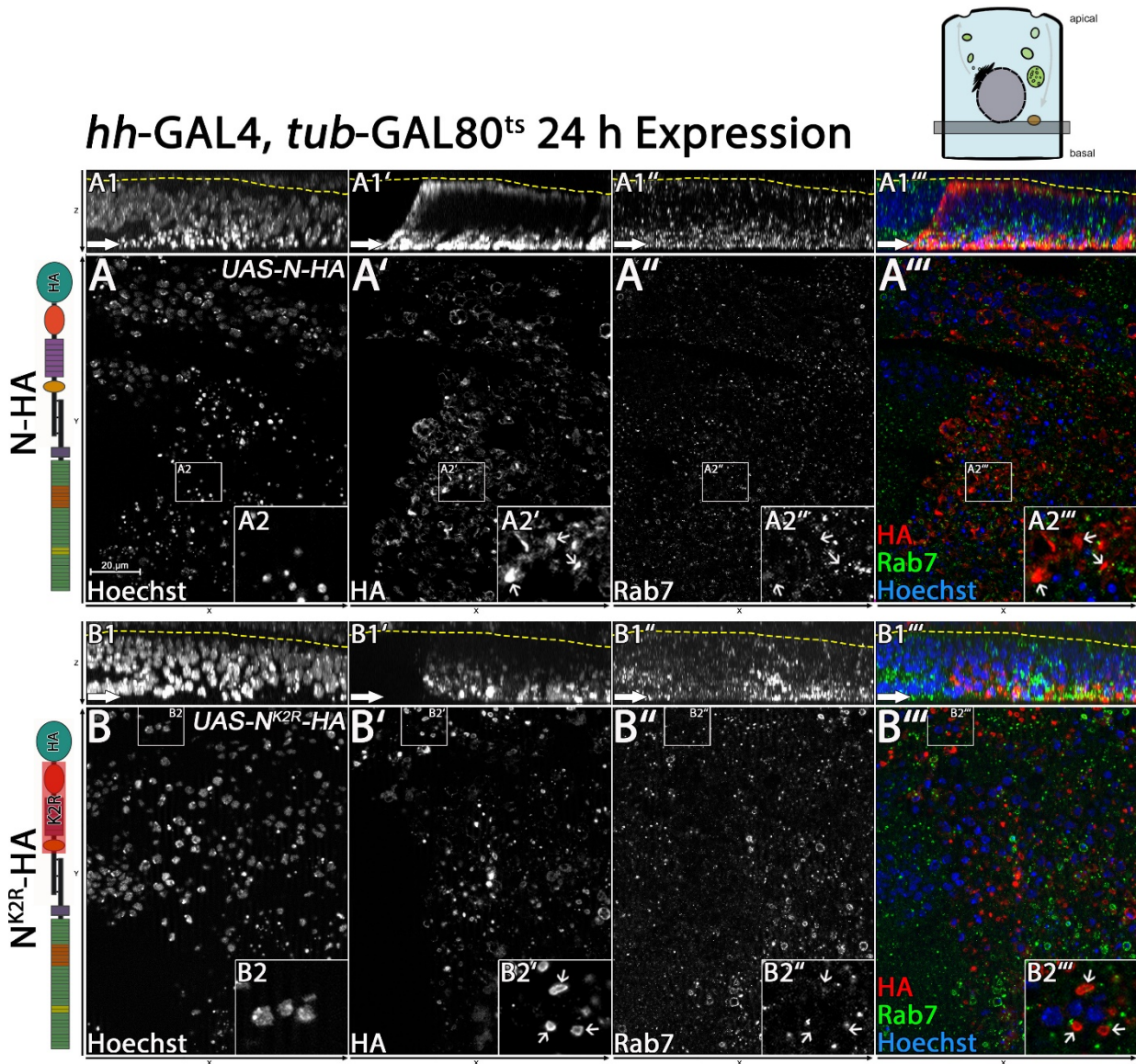


Abb. 26: Untersuchung der endosomalen Identität von N-HA und N^{K2R}-HA Vesikeln in Flügelimaginalscheiben. N-HA (A-A2''') und N^{K2R}-HA (B-B2''') wurden unter Kontrolle des *hh*-GAL4 Treibers temperaturabhängig für 24h exprimiert. Als Marker für spät-endosomale Kompartimente wurde eine Antikörperfärbung gegen Rab7 durchgeführt. Um die apiko-basale Lokalisation der Rezeptoren darzustellen wurden Z-Stapel der Imaginalscheiben aufgenommen (A1-A1'' u. B1-B1'''). Die schematische Zelle markiert die Z-Position die in der X/Y-Ebene dargestellt wird. Vergrößerte Bereiche sind durch weiße Boxen dargestellt. Die Pfeile markieren die Position der HA positiven Vesikel (A2-A2'' u. B2-B2''). Die transgenen Rezeptoren wurden mit Hilfe einer Antikörperfärbung gegen HA dargestellt. Zellkerne wurden mit Hilfe einer Hoechst Färbung markiert. Die Expression von N-HA führt zu einer starken Bildung von Zelltod (A/A1/A2). Stark vergrößerte basale N-HA Vesikel kolokalisieren nicht mit Rab7 (A2-A2'' Pfeile) Die Position der apikalen Membran in N^{K2R}-HA Imaginalscheiben wird mit einer gestrichelten gelben Linie markiert (B1-B1'''). Bei N^{K2R}-HA kommt es zu einer Bildung von basalen Vesikeln mit Lumen, die keine Kolokalisation mit Rab7 aufweisen (B2-B2'' Pfeile).

endosomalen Marker verlieren. Zudem lässt sich durch das starke Auftreten von Zelltod bei N-HA keine klare Aussage zu den Vesikeln treffen. Um die Auswirkungen der starken Überexpression zu reduzieren, wurde die Expression beider Rezeptoren auf 14,5 Stunden begrenzt. Als endosomale Marker wurden die Konstrukte *tub*-Rab5-CFP und *tub*-Rab7-YFP verwendet. Zur Unterscheidung der apiko-basalen Lokalisation wurde ein Z-Stapel aufgenommen und im folgenden Experiment die apikalen (Abb. 27 A-A⁶ u. B-B⁶) und die

hh-GAL4, tub-GAL80^{ts} 14,5 h Expression

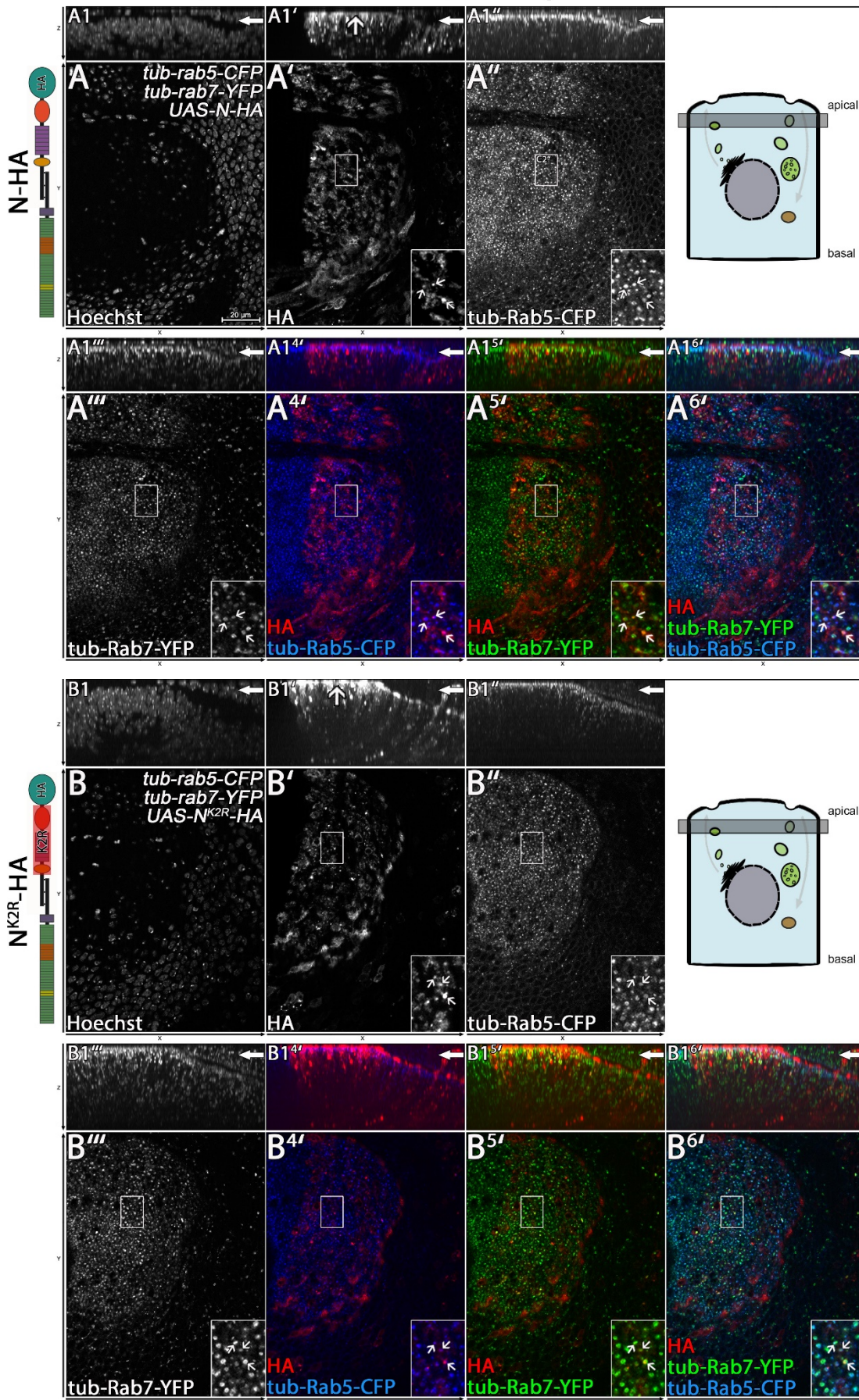


Abb. 27

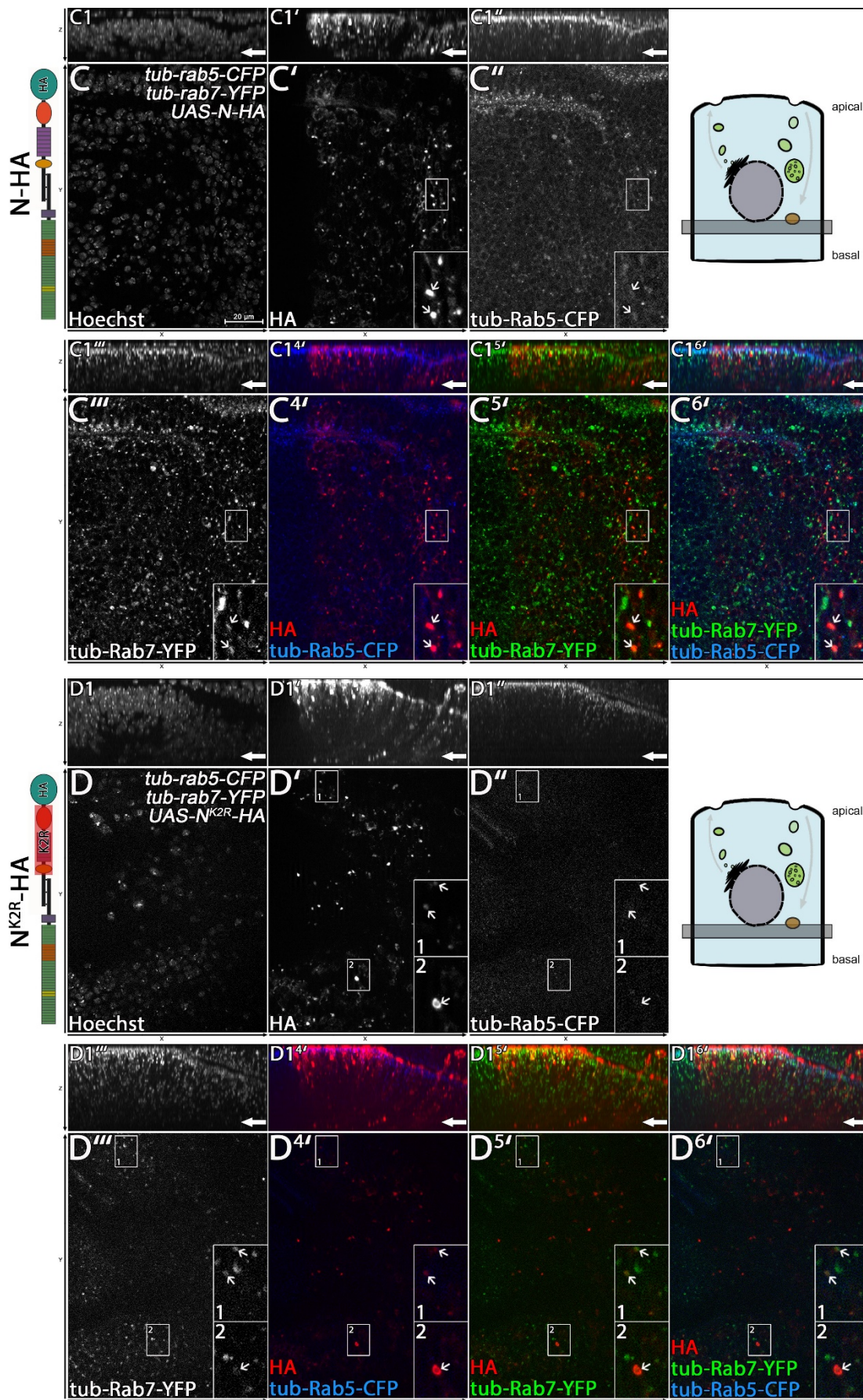


Abb. 27: Analyse der Lokalisation von N-HA und N^{K2R}-HA an Endosomen. N-HA und N^{K2R}-HA wurden unter Kontrolle des *hh*-GAL4 Treibers mit *tub*-GAL80^{ts} für 14,5h exprimiert. Als endosomale Marker wurden die Transgene *tub-rab5-CFP* und

tub-rab7-YFP verwendet. Um die apiko-basale Lokalisation der Rezeptoren darzustellen wurden Z-Stapel der Imaginalscheiben aufgenommen (A1-A1^{6'}/B1-B1^{6'}/C1-C1^{6'}/D1-D1^{6'}). Die schematischen Zellen markiert die Z-Position die in der X/Y-Ebene dargestellt wird. Für N-HA und N^{K2R}-HA wurden sowohl apikale (A-B^{6'}), als auch basale (C-D^{6'}) Notch-Vesikel in der X/Y-Ebene dargestellt und analysiert. Vergrößerte Bereiche sind durch weiße Boxen gekennzeichnet. Die Pfeile markieren die Position der HA positiven Vesikel. Die transgenen Rezeptoren wurden durch eine Antikörperfärbung gegen HA detektiert. Zellkerne wurden mit Hilfe einer Hoechst Färbung markiert. Apikale N-HA und N^{K2R}-HA positive Vesikel kolokalisieren sowohl mit Rab5-CFP als auch mit Rab7-YFP (A'-A^{6'}, u. B'-B^{6'}, Pfeile). Basale N-HA positive Vesikel kolokalisieren mit Rab7-YFP, aber nicht deutlich mit Rab5-CFP (C-C^{6'}, Pfeile). Kleine basale N^{K2R}-HA positive Vesikel ohne Lumen kolokalisieren mit Rab7-YFP, aber nicht mit Rab5-CFP (D-D^{6'}, Vergrößerung 1 Pfeile). Selten auftretende N^{K2R}-HA Vesikel mit Lumen kolokalisieren nicht mit Rab5-CFP und nur sehr schwach mit Rab7-YFP (D-D^{6'}, Vergrößerung 2 Pfeile).

basalen (Abb. 27 C-C^{6'} u. D-D^{6'}) Notch-Vesikel ausgewertet. Bei beiden Rezeptoren ist unter diesen Bedingungen ein klares apikales Membransignal zu erkennen (Abb. 27 A1' u. B1', Pfeile). Im Vergleich zu der 24-stündigen Expression kommt es bei 14,5 Stunden sowohl bei N-HA als auch bei N^{K2R}-HA zu einer deutlich schwächeren basalen Akkumulation von Notch-Vesikeln (Vergleich Abb. 26 A1'/B1' u. Abb. 27 A1'/B1'). Apikale N-HA und N^{K2R}-HA positive Vesikel kolokalisieren sowohl mit Rab5-CFP, als auch mit Rab7-YFP (Abb. 27 A'-A^{6'} u. D'-D^{6'}, Pfeile). Basale N-HA positive Vesikel kolokalisieren deutlich mit Rab7-YFP, aber nur schwach mit Rab5-CFP (Abb. 27 C'-C^{6'}, Pfeile). Die Expression von N^{K2R}-HA führt, im Vergleich zur 24-stündigen Expression, zu einer deutlich reduzierten Bildung von vergrößerten basalen Vesikeln mit Lumen (Vergleich Abb. 26 B' u. Abb. 27 F'). Diese Vesikel kolokalisieren nicht mit Rab5-CFP und nur in einigen Fällen sehr schwach mit Rab7-YFP (Abb. 27 D'-D^{6'}, Vergrößerung 2 Pfeile). Neben den vergrößerten Vesikeln, sind ebenfalls kleine Vesikel zu beobachten, bei denen es zu einer klaren Kolokalisation mit Rab7-YFP kommt (Abb. 27 D'-D^{6'} Vergrößerung 1 Pfeile). Während die apikalen Vesikel von N-HA und N^{K2R}-HA Endosomen sind, ist das im Fall der vergrößerten, basalen N^{K2R}-HA positiven Vesikel mit Lumen nicht klar, da sie weder für Rab5 noch eindeutig für Rab7 positiv sind. Die in einigen Fällen schwache Assoziation der vergrößerten N^{K2R}-HA positiven Vesikel mit Rab7-YFP deutet auf einen endosomalen Ursprung hin, dies lässt sich allerdings nicht eindeutig belegen.

3.9.2 Analyse eines Uptake-Assays mit N-HA und N^{K2R}-HA in S2 Zellen

Da sich die Frage nach der endosomalen Identität vergrößerter N^{K2R}-HA positiver Vesikel *in vivo* nicht eindeutig beantworten lässt, sollte mit Hilfe eines „Uptake-Assays“ in S2 Zellen untersucht werden, ob die N^{K2R}-HA positiven Vesikel das Ergebnis von Endozytose sind. Zu diesem Zweck wurden S2 Zellen mit N^{K2R}-HA oder N-HA transfiziert. Die Expression der Konstrukte erfolgte unter Kontrolle des *pMT-GAL4* Treibers auf 25°C für 24h. Nach der Expression erfolgte eine Behandlung der Zellen mit einem gegen die extrazelluläre Domäne von Notch gerichteten Antikörper. Auf diese Weise wird ausschließlich der membranständige Rezeptor an der

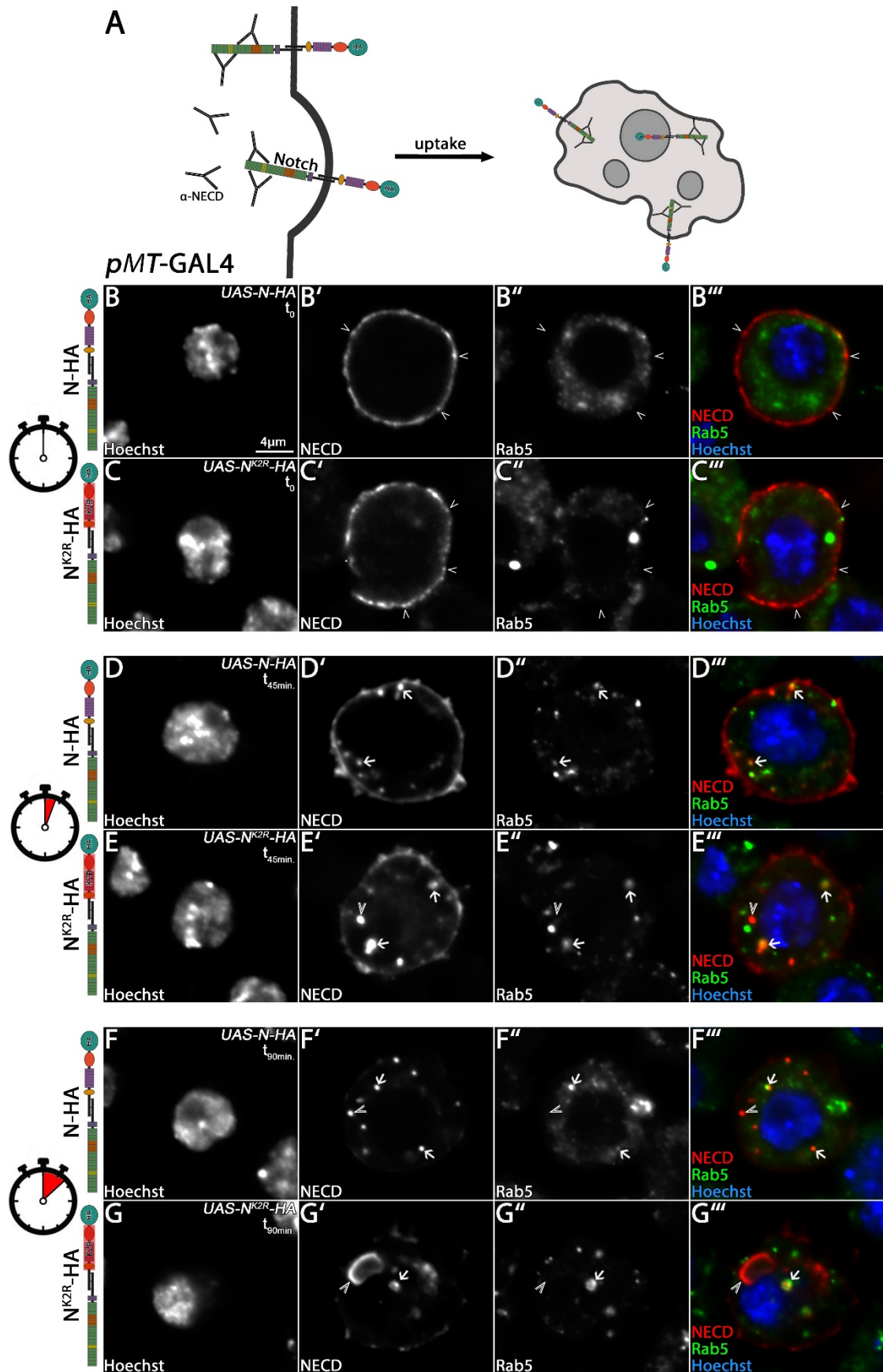


Abb. 28: Analyse eines „Uptake-Assay“ mit N-HA und N^{K2R}-HA in S2 Zellen. S2 Zellen wurden mit N-HA und N^{K2R}-HA transfiziert und unter Kontrolle des *pMT-GAL4* Treibers exprimiert. Nach einer 24-stündigen Expression folgte eine Inkubation mit dem NECD Antikörper auf 4°C. Durch eine erneute Inkubation auf 25°C wurde die Endozytose des membranassoziierten Rezeptors mit gebundenem NECD Antikörper ausgelöst (A). Es wurden Zellen zu dem Zeitpunkt *t*=0min. (B-C'''), *t*=45min. (D-E''') und *t*=90min. (F-G''') fixiert, permeabilisiert und mit einem sekundären Antikörper gefärbt.

Als Marker für früh-endosomale Kompartimente wurde eine Antikörperfärbung gegen Rab5 durchgeführt. Zellkerne wurden mit Hilfe einer Hoechst Färbung dargestellt. Pfeile markieren die Kolokalisation zwischen HA positiven Vesikeln und Rab5. Durch Pfeilspitzen werden Vesikel markiert die nicht mit Rab5 kolokalisieren. Zum Zeitpunkt $t=0$ min. kommt es bei N-HA und N^{K2R} -HA zu einer starken Färbung der Membran, aber zu keiner Vesikelbildung (B'-C''). An einigen Bereichen der Membran kommt es zu einem verstärkten HA Signal, dass allerdings nicht mit Rab5 kolokalisiert (B'-C'') Pfeilspitzen). Zum Zeitpunkt $t=40$ min. ist bei beiden Rezeptoren eine anhaltende Membranfärbung und die Bildung von Notch-Vesikeln zu beobachten die mit Rab5 kolokalisieren (D'-E'') Pfeile). Bei N^{K2R} -HA kommt es in einigen Fällen zu Vesikeln die nicht mit Rab5 assoziiert sind (E'-E'') Pfeilspitze). Zu dem Zeitpunkt $t=90$ min. ist bei N-HA und N^{K2R} -HA das Membransignal stark reduziert (F' u. G'). Es kommt weiterhin zur Bildung von N-HA positiven Vesikeln von denen einige eine Assoziation mit Rab5 aufweisen (F'-F'') Pfeile) und einige nicht (F'-F'') Pfeilspitze). Bei N^{K2R} -HA kommt es zu der Bildung von stark vergrößerten Vesikeln mit Lumen die keine Kolokalisation mit Rab5 aufweisen (G'-G'') Pfeilspitze). Kleinere Vesikel sind weiterhin mit Rab5 assoziiert (G'-G'') Pfeile).

Zelloberfläche detektiert. Um die Endozytose der Zellen zu inhibieren, wurde die Behandlung auf 4°C durchgeführt. Nach der Oberflächenfärbung folgte eine weitere Inkubation der Zellen auf 25°C . Dieser Temperaturwechsel führt zum erneuten Auslösen der Endozytose. Auf diese Weise wird der membranständige Notch-Rezeptor mit dem gebundenen Antikörper synchron endozytiert (Abb. 28 A). Mit Hilfe einer anschließenden Fixierung, Permeabilisierung und Färbung der Zellen mit einem sekundären Antikörper, wird ausschließlich der endozytierte Rezeptor detektiert. Um eine zeitliche Entwicklung der Endozytose darzustellen, wurde die Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten fixiert. Als Kontrolle wurden die Zellen zum Zeitpunkt 0, direkt nach der Antikörperinkubation, fixiert. Als weitere Zeitpunkte wurden 45 Minuten und 90 Minuten nach Einleitung der Endozytose untersucht. Um zu testen, ob es sich bei den entstehenden Notch-Vesikeln um Endosomen handelt, wurde zusätzlich eine Antikörperfärbung gegen Rab5 durchgeführt.

Zum Zeitpunkt 0 ist sowohl bei N-HA als auch bei N^{K2R} -HA ausschließlich eine Membranfärbung der Zellen zu beobachten (Abb. 28 B' und C'). In beiden Fällen kommt es an der Membran zu Bereichen an denen der Rezeptor stärker akkumuliert als in benachbarten Bereichen. Diese Bereiche kolokalisieren nicht mit Rab5 (Abb. 28 B'' und C'' Pfeilspitze). Es handelt sich demzufolge nicht um membran nahe frühe Endosomen. Nach 45 Minuten kommt es bei beiden Rezeptoren zu einer Bildung von Notch-Vesikeln die mit Rab5 kolokalisieren (Abb. 28 D-D'' u. E-E'', Pfeile). In beiden Fällen ist weiterhin ein deutliches Membransignal zu identifizieren (Abb. 28 D' und E'). Nach 90 Minuten ist das Membransignal in beiden Fällen stark reduziert (Abb. 28 F' und G'). Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass zu diesem Zeitpunkt nahezu der gesamte membranständige Rezeptor endozytiert wurde. Bei N-HA können nach 90 Minuten weiterhin Notch-Vesikel in der Zelle beobachtet werden. Dabei lassen sich sowohl Rab5 positive (Abb. 28 F-F'' Pfeile), als auch Rab5 negative Vesikel identifizieren (Abb. 28 F-F'' Pfeilspitze). Bei N^{K2R} -HA kommt es zu diesem Zeitpunkt zu extrem vergrößerten Vesikeln mit Lumen. Diese Vesikel sind nicht Rab5 positiv (Abb. 28 G-G'', Pfeilspitze). Ebenfalls auftretende kleinere Vesikel kolokalisieren weiterhin mit Rab5 (Abb. 28 G-G'', Pfeile). Anhand dieses Experimentes kann bestätigt werden, dass die vergrößerten N^{K2R} -HA

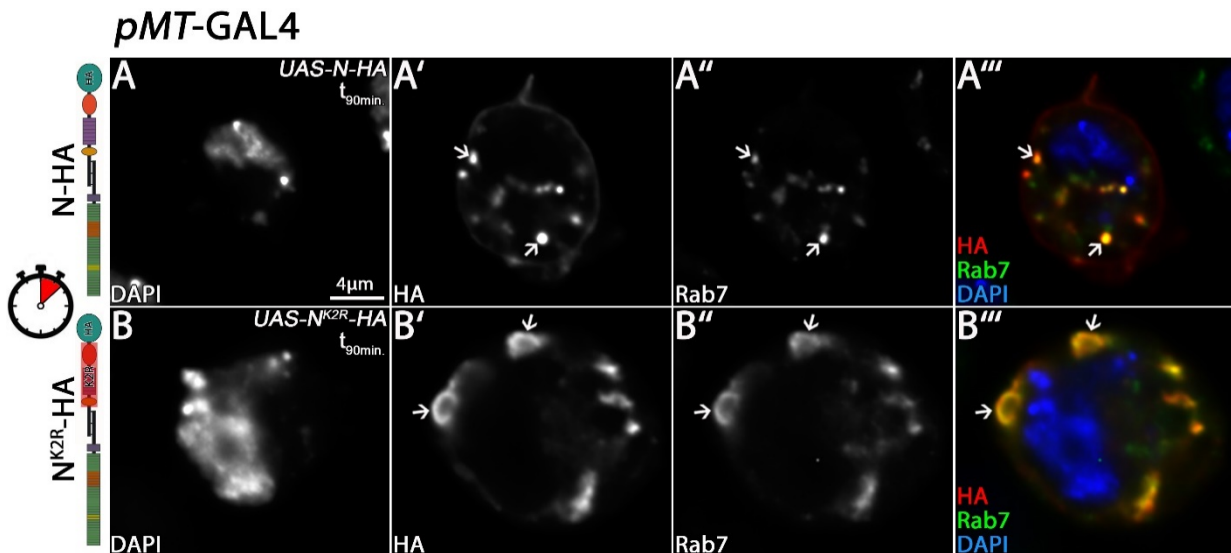


Abb. 29: Untersuchung von vergrößerten N^{K2R} -HA positiver Vesikeln in S2 Zellen. S2 Zellen wurden mit N-HA oder N^{K2R} -HA transfiziert und unter Kontrolle des *pMT*-GAL4 Treibers exprimiert. Nach einer 24 stündigen Expression folgte eine Inkubation auf 4°C. Um die Endozytose der membranständigen Notch-Rezeptoren zu starten wurden die Zellen für 90min. auf 25°C inkubiert. Nach der Inkubation folgte eine Fixierung, eine Permeabilisierung und eine Färbung mit einem HA Antikörper. Zusätzlich wurde ein Antikörper gegen den spätendosomalen Marker Rab7 verwendet. Zellkerne wurden mit Hilfe einer Hoechst Färbung dargestellt. Sowohl bei N-HA, als auch bei N^{K2R} -HA Vesikeln kommt es zu einer deutlichen Kolokalisation mit Rab7 (A-A''' u. B-B''', Pfeile).

positiven Vesikel durch die Endozytose des Rezeptors von der Plasmamembran entstehen. Es kann ebenfalls bestätigt werden, dass es sich bei diesen Vesikeln nicht um frühendosomale Kompartimente handelt. Bei der Analyse von N^{K2R} -HA in Flügelimaginalscheiben konnte gezeigt werden, dass die stark vergrößerten Vesikel ebenfalls nicht eindeutig Rab7 positiv sind. Um zu testen, ob diese Beobachtung in S2 Zellen bestätigt werden kann, wurde eine Rab7 Färbung durchgeführt. Da sowohl der NECD Antikörper, als auch der Rab7 Antikörper aus der Maus stammen, musste in diesem Experiment auf eine HA Färbung zurückgegriffen werden. Auf Grund des intrazellulären HA-Tags müssen die Zellen vor der Färbung permeabilisiert werden. Mit Hilfe einer HA-Färbung wird also nicht nur der endozytierte Rezeptor, sondern der gesamte exprimierte Rezeptor in der Zelle detektiert. Um vergleichbare Bedingungen zu schaffen, wurde ebenfalls ein „Uptake“ für 90 Minuten durchgeführt. Diese Analyse zeigt, dass sowohl N-HA positive Vesikel als auch die vergrößerten N^{K2R} -HA positiven Vesikel deutlich mit Rab7 kolokalisieren (Abb. 29 A-A''' u. B-B''', Pfeile).

Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass es sich bei den vergrößerten N^{K2R} -HA positiven Vesikeln um späte Endosomen handelt. Diese Beobachtung steht im Widerspruch zu der Analyse in der Flügelimaginalscheibe, wo es zu keiner eindeutigen Lokalisation von Rab7 an den vergrößerten N^{K2R} -HA positiven Vesikeln kommt. Da die Vesikel aber klar auf die Endozytose des N^{K2R} -HA Rezeptors zurückzuführen sind, ist zu vermuten, dass es sich in Flügelimaginalscheiben zwar um Kompartimente endosomalen Ursprungs handelt, die endosomalen Marker aber während der

Reifung verloren gehen. Dieser Effekt scheint in S2 Zellen nicht vorhanden zu sein. Da gezeigt werden konnte, dass die vergrößerten N^{K2R}-HA Vesikel durch die Endozytose des Rezeptors von der Plasmamembran entstehen, stellt sich die Frage, ob es einen Zusammenhang zwischen diesem Vesikel-Phänotyp und der starken liganden-unabhängigen Aktivierung durch N^{K2R}-HA gibt.

3.10 Regulation der Notch-Aktivität durch eine liganden-unabhängige Aktivierung vom Endosom

Wie bereits beschrieben steht eine liganden-unabhängige Aktivierung des Notch-Signalweges häufig in einem direkten Zusammenhang mit einem gestörten endosomalen Abbau des Rezeptors. Gut untersuchte Beispiele für diese Art der Rezeptor-Aktivierung sind der Ausfall von *shrub* und *lgd*. In beiden Fällen kommt es zu einer ektopischen Notch-Aktivierung (Übersicht in (Schnute et al., 2018)).

In Folge dessen wird postuliert, dass es durch die Beeinflussung der ESCRT-Funktion zu einer verstärkten Akkumulation des Notch-Rezeptors an der limitierenden Membran des Endosoms kommt und daraufhin eine liganden-unabhängige Spaltung des Rezeptors an der endosomalen/lysosomalen Membran auslöst wird (Schneider et al., 2013). Bei der Expression von N^{K2R}-HA zeigt sich eine deutliche Akkumulation des Rezeptors an der limitierenden Membran von vergrößerten Vesikeln mit endosomalem Ursprung. Diese Lokalisation des Rezeptors deutet ebenfalls auf eine Notch-Aktivierung am Endosom/Lysosom hin und ist eine mögliche Erklärung für die liganden-unabhängige Aktivierung des Rezeptors.

Um zu testen, ob die starke ektopische Aktivierung durch N^{K2R}-HA am Endosom/Lysosom ausgelöst wird, sollte die Ansäuerung während der endosomalen Reifung unterdrückt werden. Da die liganden-unabhängige Aktivierung in *lgd* Mutanten Kuz unabhängig, aber γ -Sekretase abhängig ausgelöst wird, wird vermutet, dass es zuvor zu einer alternativen Ablösung der extrazellulären Domäne kommen muss (alternatives „Ectodomain Shedding“) (Jaekel and Klein, 2006; Schneider et al., 2013; Troost et al., 2012). Der Abbau der ECD könnte einerseits über saure Hydrolasen ausgelöst werden, oder auf die Lösung der Ca²⁺ abhängigen Bindung zwischen der extrazellulären und der intrazellulären Domäne des Rezeptors auf Grund des sauren Milieus des Endosoms/Lysosoms zurückzuführen sein (Aster et al., 1999; Rand et al., 2000). In beiden Fällen ist die Ansäuerung des Kompartimentes essentiell. Im Verlauf der endosomalen Reifung

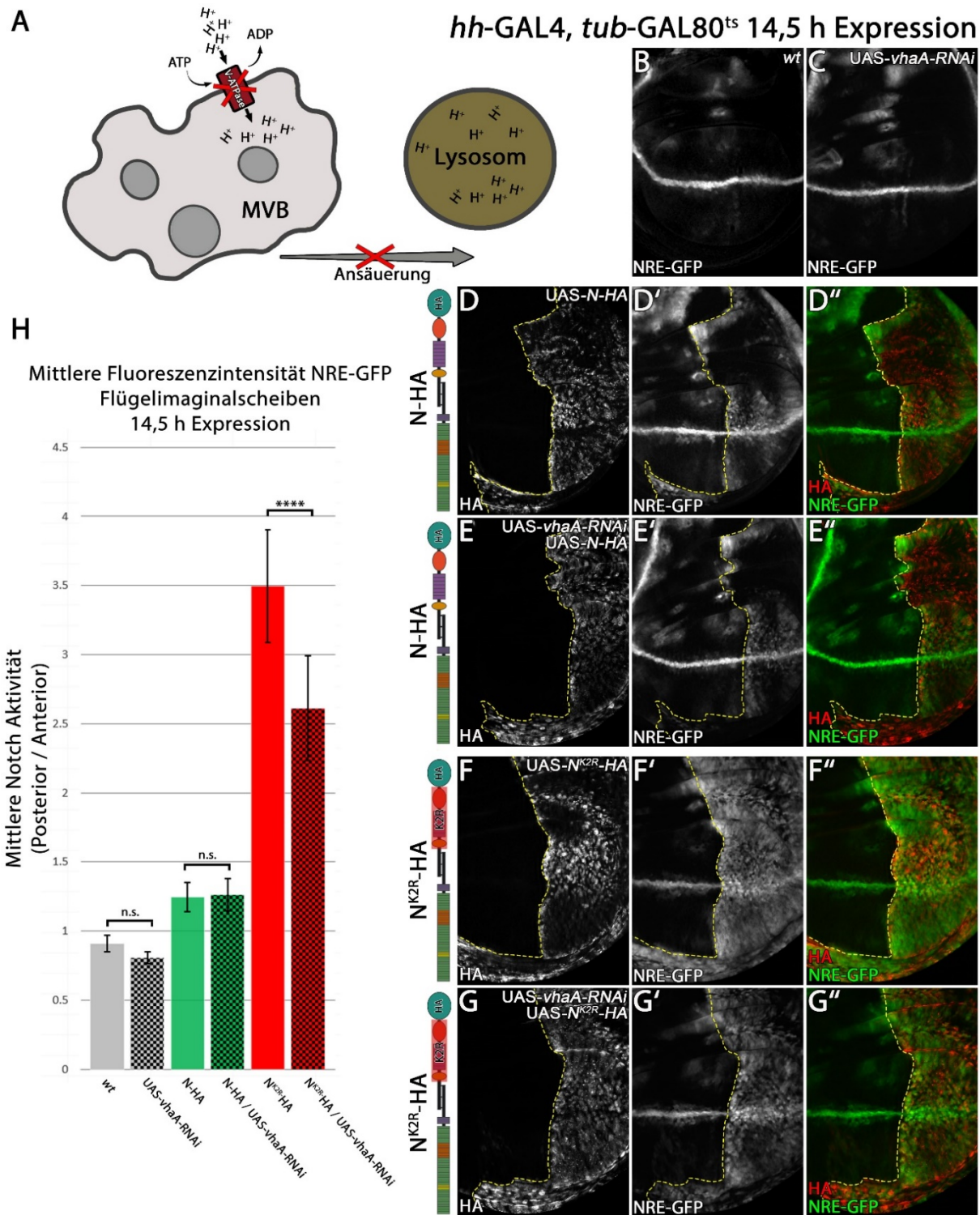


Abb. 30: Untersuchung der Effekte der endosomalen/lysosomalen Ansäuerung auf die Aktivität von N-HA und N^{K2R}-HA. Während der endosomalen Reifung kommt es zu einer Ansäuerung des Lumens durch die v-ATPase (A). Die Expression von N-HA oder N^{K2R}-HA und der *vhaA*-RNAi für 14,5h erfolgte unter Kontrolle des *hh*-GAL4 Treibers mit *tub*-GAL80^{ts}. N-HA und N^{K2R}-HA wurden sowohl einzeln (D-D'' u. F-F'') und in Koexpression mit *vhaA*-RNAi analysiert (E-E'' u. G-G''). Die gestrichelte gelbe Linie markiert die Expressionsgrenze der Notch-Rezeptoren (HA Antikörperfärbung). Als Marker für die Notch-Aktivität wurde NRE-GFP verwendet. Eine Fluoreszenzintensitätsmessung des NRE-GFP Signals wurde im ventralen Kompartiment der Flügelimaginalscheiben sowohl in der posterioren *hh*-Expressionsdomäne, als auch im anterioren Bereich durchgeführt. Die anterioren Messungen wurde als interne Referenzen der Imaginalscheiben verwendet. Bei der Aktivitätsmessung wurde das posteriore zum anterioren Verhältnis aufgetragen (H). Im Verhältnis zum Wildtyp führt die Expression der *vhaA*-RNAi zu keiner signifikanten Abschwächung der endogenen Notch-Aktivität (B/C u. H). Die *vhaA*-RNAi hat ebenfalls keinen Effekt auf die Aktivierung durch N-HA (D-E'' u. H). Durch Koexpression von N^{K2R}-HA und der *vhaA*-RNAi kommt es zu einer messbaren Abschwächung der ektopischen Notch-Aktivität (H). Signifikanztest: One-way ANOVA ($p > 0,05$ (n.s.) / $p < 0,0001$ (****)) (*wt*: n=9 / N-HA: n=7 / N^{K2R}-HA: n=11 / *vhaA*-RNAi: n=8 / N-HA *vhaA*-RNAi: n=6 / N^{K2R}-HA *vhaA*-RNAi: n= 9).

wird die Ansäuerung des Endosoms/Lysosoms durch die v-ATPase reguliert (Cotter et al., 2015). Mit Hilfe der Unterdrückung der v-ATPase kann auch die ektopische Notch-Aktivierung durch den Ausfall von *lgd* unterdrückt werden (Schneider et al., 2013).

Kommt es durch die Expression von N^{K2R}-HA zu einer Aktivierung des Rezeptors am Endosom/Lysosom, so sollte durch die Unterdrückung der endosomalen Ansäuerung auch die Aktivierung von N^{K2R}-HA unterdrückt werden. Um dies zu testen wurden N-HA oder N^{K2R}-HA mit einer RNAi gegen eine Untereinheit der v-ATPase koexprimiert (*vhaA*-RNAi). Die Expression wurde im posterioren Kompartiment der Flügelimaginalscheiben für 14,5h durchgeführt und die Aktivität des Notch-Signalweges quantifiziert.

Die Expression der *vhaA*-RNAi führt in Vergleich zum Wildtyp zu keiner signifikanten Veränderung der endogenen Notch-Aktivität (Abb. 30 B-C u. H). Durch die Koexpression mit N-HA kann ebenfalls kein signifikanter Unterschied der Aktivierung im Vergleich zur N-HA Expression identifiziert werden (Abb. 30 D-E“ u. H). Im Gegensatz dazu kann durch die Koexpression von N^{K2R}-HA und der RNAi eine leichte, aber signifikante Abschwächung der Notch-Aktivität im Vergleich zur N^{K2R}-HA Einzelexpression gemessen werden (Abb. 30 F-G“ u. H). Eine Koexpression von N^{K2R}-HA und der RNAi für 24h und 48h führt allerdings weiterhin zu einer starken Notch-Aktivität und einer Überproliferation der Imaginalscheiben (Anhang Abb. 55). Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass die Ansäuerung entweder keinen starken Effekt auf die Aktivierung von N^{K2R}-HA hat, oder dass es durch die RNAi zu keiner effizienten Unterdrückung der vATPase Aktivität kommt. Die leichte Unterdrückung der N^{K2R}-HA Aktivität kann daher nur als Hinweis auf eine Abhängigkeit von der Ansäuerung des Endosoms/Lysosoms gewertet werden.

Um die Aktivierung des N^{K2R}-HA Rezeptors weiter zu charakterisieren, sollte geprüft werden, ob die Fusion des späten Endosoms mit dem Lysosom essentiell für die Aktivierung ist. In *lgd* Mutanten wird die Fusion zwischen dem Endosom und dem Lysosom benötigt um die ektopische liganden-unabhängige Notch-Aktivierung auszulösen. Im Gegensatz dazu ist die Fusion der Kompartimente in *shrub* Mutanten nicht essentiell für die ektopische Notch-Aktivierung (Schneider et al., 2013).

Um zu testen, ob die Aktivierung von N^{K2R}-HA von der Fusion des späten Endosoms mit dem Lysosom abhängt, sollte diese Fusion im folgenden Experiment unterdrückt werden. Für die Unterdrückung der Fusion wurde die Nullmutante *trpml*¹ verwendet (Venkatachalam et al., 2008). Bei *Trpml* (transient receptor potential-mucolipin) handelt es sich um einen Kationenkanal der vorwiegend in endosomalen Vesikeln aktiv ist (Wong et al., 2012). In *Drosophila* wird Ca²⁺ für die Fusion des späten Endosoms mit dem Lysosom benötigt. Die

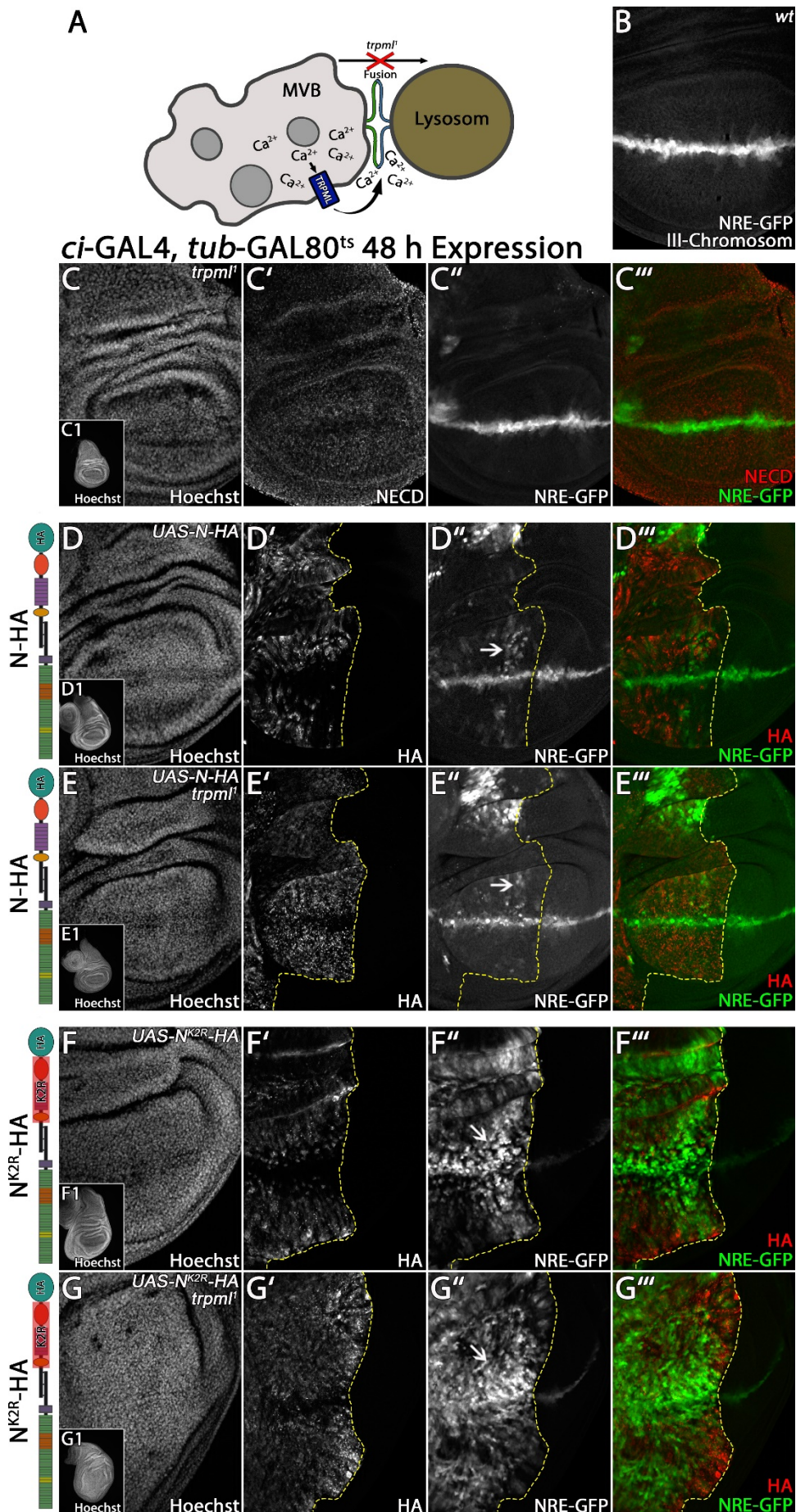


Abb. 31: Auswirkungen der Unterdrückung der Fusion zwischen dem späten Endosom und dem Lysosom auf die Aktivität von N-HA und N^{K2R}-HA. Durch den Ausfall des Kationenkanals Trpm1 wird die Fusion des späten Endosoms mit dem

Lysosom unterdrückt (A). Die Expression von N-HA und N^{K2R}-HA erfolgte für 48h unter Kontrolle des *ci*-GAL4 Treibers mit *tub*-GAL80⁸. N-HA und N^{K2R}-HA wurden in wildtypischen (D-D^{''''} u. F-F^{''''}) und in *trpml*^l mutanten Flügelimaginalscheiben (E-E^{''''} u. G-G^{''''}) exprimiert. Als Marker für die Notch-Aktivität wurde NRE-GFP (III-Chromosom) verwendet (B). Die gestrichelte gelbe Linie markiert die Expressionsgrenze der Notch-Rezeptoren (HA Antikörperfärbung). Zellkerne wurden mit Hilfe einer Hoechst Färbung dargestellt. Der Ausfall von *trpml* hat keine sichtbaren Auswirkungen auf die endogene Notch-Aktivität (C^{''}). Die ektoische Aktivierung von N-HA wird nicht durch *trpml*^l beeinflusst (D-E^{''''}, Pfeile). N^{K2R}-HA führt zu einer Überproliferation (F1) und einer starken ektoischen Aktivierung (F^{''} Pfeil). Weder die Überproliferation, noch die ektoische Aktivierung werden durch einen Ausfall von *trpml* unterdrückt (G1 u. G^{''} Pfeil).

Bereitstellung der für die Fusion benötigten Kationen wird über Trpml gewährleistet. Trpml schleust endosomale Kationen aus dem Lumen des Endosoms in das Zytoplasma und initiiert so die Fusion zwischen dem späten Endosom und dem Lysosom (Übersicht in (Venkatachalam et al., 2015)) (Abb. 31 A). Die Eigenschaft der Unterbrechung der Fusion zwischen dem späten Endosom und dem Lysosom durch den Ausfall von *trpml* konnte ebenfalls an einem anderen Beispiel gezeigt werden. So führt der zusätzliche Ausfall von *trpml* in *lgd*^{d7} mutanten Flügelimaginalscheiben zu einer Unterdrückung der ektoischen Aktivierung des Notch-Signalweges (unveröffentlichte Daten Thomas Breuer).

Für die Analyse wurden N-HA oder N^{K2R}-HA für 48h im anterioren Kompartiment von *trpml*^l mutanten Flügelimaginalscheiben exprimiert. Durch den Ausfall von *trpml* kommt es im Vergleich zu wildtypischen Imaginalscheiben zu keiner Beeinflussung der endogenen Notch-Aktivität (Abb. 31 B-C^{''''}). Die Aktivierung des Signalweges durch N-HA scheint durch den Ausfall von *trpml* ebenfalls nicht beeinflusst zu werden (Abb. 31 Vergleich D^{''} u. E^{''}, Pfeile). Auch die starke ektoische Aktivierung des Signalweges durch N^{K2R}-HA kann in *trpml*^l mutanten Flügelimaginalscheiben nicht erkennbar reduziert werden (Abb. 31 Vergleich F^{''} u. G^{''}, Pfeile).

Da sowohl der endogene, als auch der transgene N-HA Rezeptor liganden-abhängig aktiviert werden, erklärt sich, warum der Ausfall von *trpml*^l keinen sichtbaren Effekt auf die Aktivität des Signalweges hat. Die Aktivierung durch N^{K2R}-HA wird hingegen stark liganden-unabhängig ausgelöst. Die Beobachtung, dass es zu keiner Unterdrückung der starken ektoischen Aktivität des Signalweges durch N^{K2R}-HA in *trpml* Mutanten kommt, deutet darauf hin, dass die liganden-unabhängige Aktivierung des Rezeptors unabhängig von der Fusion des Endosoms mit dem Lysosom ausgelöst wird.

Zusammengefasst geben diese Ergebnisse Hinweise darauf, dass die Ansäuerung des Endosoms/Lysosoms für eine starke ektoische Aktivierung von N^{K2R}-HA benötigt wird. Des Weiteren scheint die Aktivität unabhängig von der Fusion des späten Endosom mit dem Lysosom zu sein. Diese Beobachtungen legen nahe, dass N^{K2R}-HA an der limitierenden endosomalen Membran aktiviert wird.

3.11 Einfluss der Ubiquitinligasen Dx und Su(dx) auf N-HA und N^{K2R}-HA

3.11.1 Untersuchung der Ubiquitinierung von N-HA und N^{K2R}-HA durch Dx und Su(dx)

Da aufgrund der gezeigten Ergebnisse davon ausgegangen werden kann, dass N^{K2R}-HA lysin-unabhängig endozytiert und Aktiviert wird, stellt sich die Frage, ob die E3-Ligasen Dx und Su(dx) einen Einfluss auf die Lokalisation und die Aktivität von N^{K2R}-HA haben.

Sowohl bei Dx als auch bei Su(dx) gibt es Hinweise auf eine ubiquitinierungs-unabhängige Funktion bei der Regulation der Endozytose von Notch (Matsuno et al., 2002; Shimizu et al., 2014; Wilkin et al., 2004). Neben der Einleitung der Endozytose regulieren Dx und Su(dx) darüber hinaus die Lokalisation von Notch am Endosom. Die Überexpression von Dx führt zu einer verstärkten Akkumulation von Notch an der limitierenden Membran des Endosoms und löst eine ektopische Aktivierung des Signalweges aus. Die Überexpression von Su(dx) führt hingegen zu einer starken Internalisierung des Rezeptors in das Lumen des Endosoms und zu einer Abschwächung der Aktivierung des Signalweges (Shimizu et al., 2014; Wilkin et al., 2008) (Abb. 32 A). Da N^{K2R}-HA über keine intrazellulären Lysine verfügt, sollte in der Regel keine Ubiquitinierung des Rezeptors möglich sein. Mit Hilfe von N^{K2R}-HA sollten daher mögliche ubiquitinierungs-unabhängige Funktionen von Dx und Su(dx) überprüft werden. In den folgenden Experimenten wurde daher der Einfluss von Dx und Su(dx) auf die Endozytose, die endosomale Lokalisation und die Aktivierung des N^{K2R}-HA Rezeptors analysiert.

Um eine mögliche ubiquitinierungs-unabhängige Funktion von Dx und Su(dx) zu überprüfen, musste zuvor getestet werden, ob die E3-Ligasen möglicherweise lysin-unabhängige Ubiquitinierungen des N^{K2R}-HA Rezeptors auslösen. Um diese Frage zu beantworten, wurde ein Ubiquitinierungs-Assay in S2-Zellen durchgeführt. Dazu wurden S2 Zellen mit den Rezeptoren N-HA oder N^{K2R}-HA, den E3-Ligasen und Flag-gekoppeltem Ubiquitin transfiziert und für 24h exprimiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die Rezeptoren mit Hilfe HA-gekoppelter Beads präzipitiert. Da in diesem Versuch Flag-gekoppeltes Ubiquitin verwendet wurde, sollte mittels eines Western Blots und einer anschließenden Flag-Färbung überprüft werden, ob es zu einer Ubiquitinierung der Notch-Rezeptoren kommt. Der „full length“ Notch-Rezeptor kann bei ca. 300 kDa identifiziert werden. Die Expression von N-HA, Su(dx) und Flag-Ubiquitin führt zu einer deutlich ausgeprägten Flag-Bande. Im Gegensatz dazu führt die Expression von N^{K2R}-HA, Su(dx) und Flag-Ubiquitin zu keiner detektierbaren Flag-Bande (Abb. 32 B). Vergleichbar mit Su(dx) führt auch die Expression von N-HA, Dx und Flag-Ubi^{mono} zu einer Flag-Bande. Die Expression von N^{K2R}-HA, Dx und Flag-Ubi^{mono} führt zu keiner

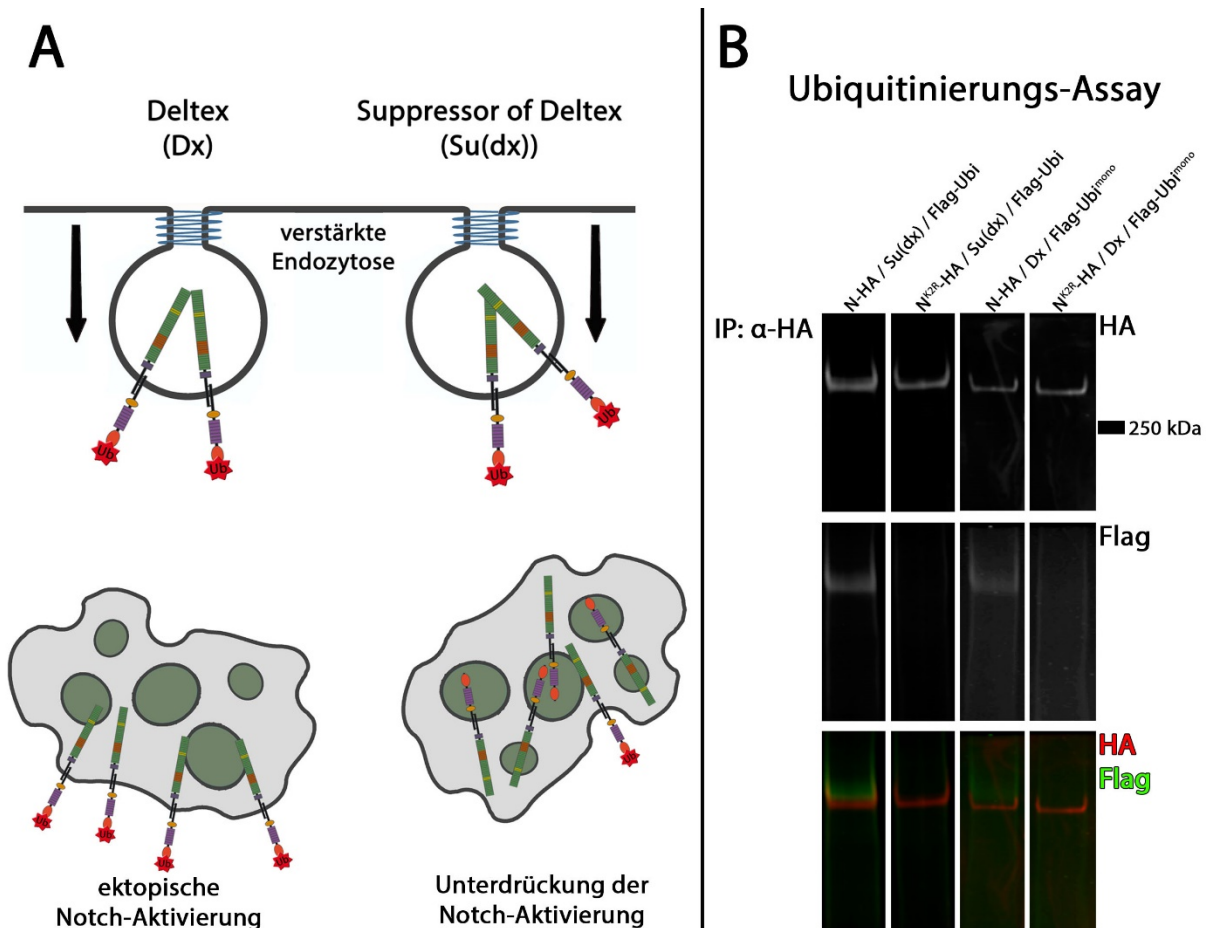


Abb. 32: Ubiquitinierungs-Assay transgener Notch-Rezeptoren in S2-Zellen. Sowohl die Überexpression von Dx, als auch von Su(dx) führen zu der Einleitung der Notch-Endozytose. Dx führt zu einer Akkumulation des Notch-Rezeptors an der limitierenden endosomalen Membran. Su(dx) verstärkt die Internalisierung des Rezeptors in das endosomale Lumen. Durch die Überexpression von Dx kommt es zu einer ektopischen Notch-Aktivierung. Su(dx) unterdrückt die Notch-Aktivierung (A). Für den Ubiquitinierungs-Assay wurden die Notch-Rezeptoren mit den E3-Ligasen Dx oder Su(dx) und Flag-gekoppelten Ubiquitin in S2-Zellen exprimiert. Für die Auslösung der Monoubiquitinierung durch Dx wurde monomeres Ubiquitin verwendet (Flag-Ubi^{mono}). Die Rezeptoren wurden mit Hilfe HA-gekoppelter Beads präzipitiert und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Zur Detektion der Rezeptoren wurde ein Antikörper gegen HA eingesetzt. Ubiquitin wurde mit Hilfe eines Flag-Antikörpers detektiert. Die „full-length“ Rezeptoren können auf Höhe von 300 kDa detektiert werden. Bei N-HA kann sowohl durch die Koexpression von Dx, als auch von Su(dx) eine Flag-Bande auf Höhe von 300 kDa detektiert werden. Bei N^{K2R}-HA kommt es weder durch Dx, noch durch Su(dx) zu einer Flag-Bande. N-HA wird durch Dx und Su(dx) ubiquitiniert. N^{K2R}-HA wird weder durch Dx, noch durch Su(dx) ubiquitiniert (B).

identifizierbaren Flag-Bande (Abb. 32 B).

Die Ergebnisse zeigen, dass der Austausch der intrazellulären Lysine des Notch-Rezeptors zu einer Unterdrückung der Ubiquitinierung durch Dx und Su(dx) führt. Dadurch können Ubiquitinierungen an alternativen Aminosäuren durch Dx und Su(dx) ausgeschlossen werden. Dabei ist allerdings zu beachten, dass der Ubiquitinierungs-Assay bisher nicht wiederholt werden konnte. Die Ergebnisse des Assays sind daher als Hinweise zu werten.

3.11.2 Beeinflussung der Endozytose von N-HA und N^{K2R}-HA durch Dx und Su(dx)

Als nächstes sollte überprüft werden, ob durch eine Überexpression von Dx und Su(dx) eine ubiquitinierungs-unabhängige Endozytose des N^{K2R}-HA Rezeptors ausgelöst wird. Dazu wurden die Notch-Rezeptoren mit Dx, oder Su(dx) in Flügelimaginalscheiben für 14,5h im posterioren Kompartiment koexprimiert. Eine apikale Ansicht der Flügelimaginalscheiben soll dabei helfen zu überprüfen, ob sich die Lokalisation des Rezeptors an der apikalen Plasmamembran durch die Überexpression der E3-Ligasen beeinflussen lässt. Der endogene Notch-Rezeptor akkumuliert stark an der subapikalen Membran der Zellen. Dies äußert sich durch netzartige Strukturen am apikalen Pol der Imaginalscheiben und durch ein starkes apikales Signal in der Z-Projektion (Abb. 33 A, Vergrößerung u. A', Pfeil). Durch die Überexpression von Dx kommt es zu einer Auflösung der netzartigen Akkumulation des endogenen Rezeptors an der subapikalen Membran und zu einer vermehrten Bildung von Notch positiven Vesikeln (Abb. 33 B, Vergrößerung u. B', Pfeile). Dieser Effekt kann durch die Überexpression von Su(dx) nicht beobachtet werden (Abb. 33 C, Vergrößerung u. C', Pfeile). Selbst eine konstitutive Expression von Su(dx) führt zu keinem sichtbaren Effekt auf die apikale Lokalisation des endogenen Notch-Rezeptors (Anhang Abb. 56).

Die Expression von N-HA führt zu einer Akkumulation des Rezeptors an der subapikalen Membran und der apikalen Oberfläche der Zellen (Abb. 33 D, Vergrößerung) Die Expression von N^{K2R}-HA führt ebenfalls zu einer Akkumulation des Rezeptors an der subapikalen Membran, die im Vergleich zu N-HA etwas stärker ausgeprägt ist (netzartig) (Abb. 33 G, Vergrößerung). Darüber hinaus kommt es durch die Expression von N^{K2R}-HA im Vergleich zu N-HA zu einer verstärkten basalen Akkumulation von N^{K2R}-HA positiven Vesikeln (Abb. 33 D' u. G'). Die Koexpression von N-HA und Dx führt zu einem deutlichen Verlust der Membranlokalisation und vermittelt eine starke Bildung von N-HA positiven Vesikeln (Abb. 33 E, Vergrößerung u. E', Pfeil). Die Koexpression von N-HA und Su(dx) führt zu einem ähnlichen Effekt, scheint allerdings schwächer ausgeprägt zu sein (Abb. 33 F, Vergrößerung u. F', Pfeil). Die Koexpression von Dx und N^{K2R}-HA führt ebenfalls zu einer deutlichen Auflösung der subapikalen Lokalisation und einer verstärkten Bildung von N^{K2R}-HA positiven Vesikeln (Abb. 33 H, Vergrößerung u. H', Pfeil). Dieser Effekt lässt sich auch durch die Koexpression mit Su(dx) beobachten (Abb. 33 I, Vergrößerung u. I' Pfeil). Um die Stärke der Akkumulation an der apikalen Membran von N-HA und N^{K2R}-HA zu quantifizieren, wurde das apikale Fluoreszenzsignal und das gesamte Fluoreszenzsignal ohne die apikale Membran gemessen. Um die Stärke der apikalen Akkumulation zu zeigen, wurde das Verhältnis des apikalen Signals zu

hh-GAL4, tub-GAL80^{ts} 14,5 h Expression

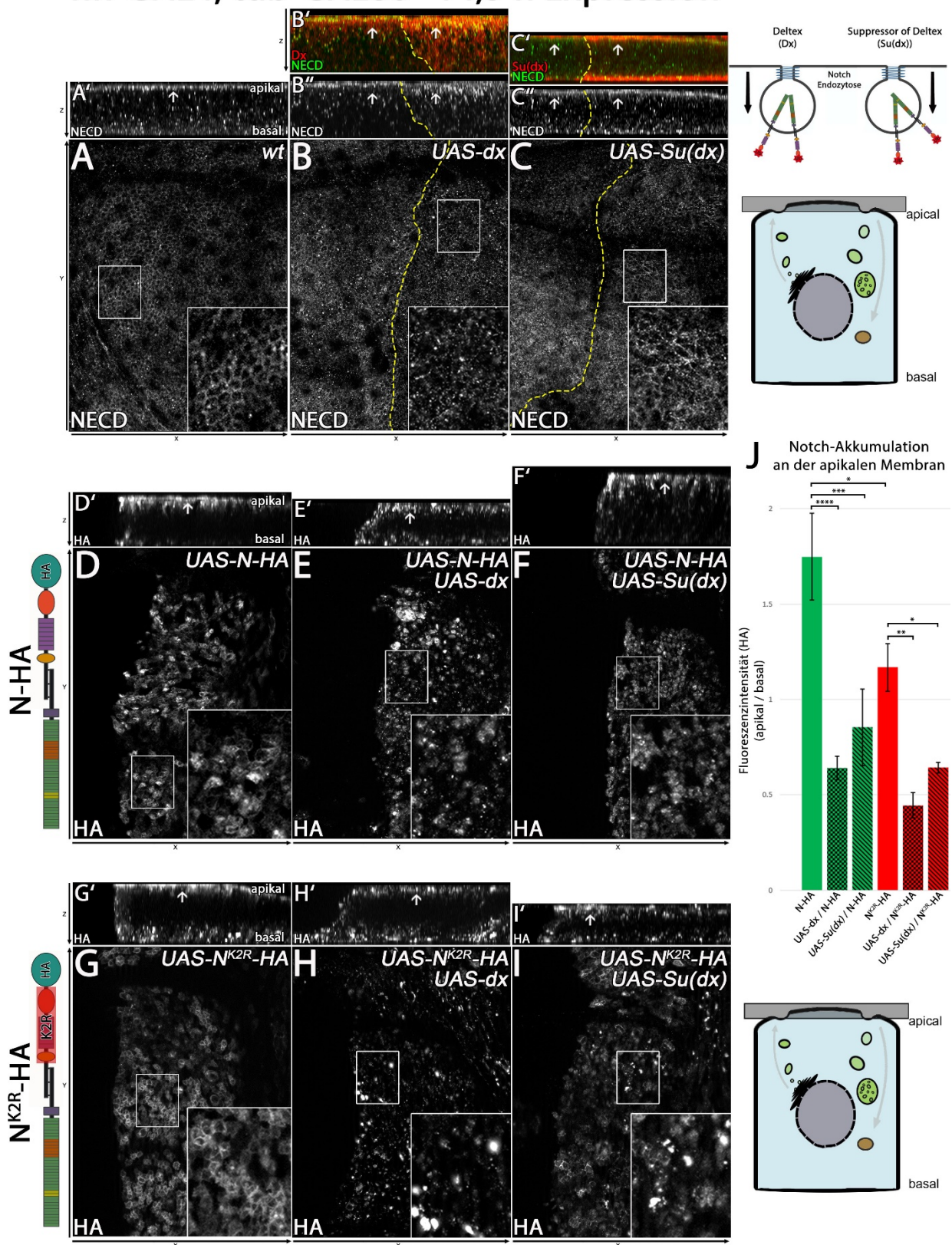


Abb. 33: Analyse der Endozytose von N-HA und NK^{2R}-HA durch die E3-Ligasen Dx und Su(dx). Die Rezeptoren N-HA und NK^{2R}-HA sowie die E3-Ligasen Dx und Su(dx) wurden sowohl einzeln, als auch in Koexpression für 14,5h unter Kontrolle des *hh-GAL4* Treibers mit *tub-GAL80^{ts}* exprimiert. Um die apiko-basale Lokalisation der Rezeptoren darzustellen wurden Z-Stapel der Flügelimaginalscheiben aufgenommen (A'/B'-B''/C'-C''/D'/E'/F'/G'/H'/I'). In der X/Y-Ebene werden apikale Ansichten der Flügelimaginalscheiben gezeigt. Zur Detektion der transgenen Rezeptoren wurde eine HA Antikörperfärbung durchgeführt. Zur Detektion des endogenen Rezeptors wurde der NECD Antikörper verwendet. Die Expression von Dx und Su(dx) wurde mit Antikörperfärbungen gegen Dx und Su(dx) dargestellt. Die gestrichelte gelbe Linie markiert die Grenze der

hh-Expressionsdomäne. Vergrößerte Bereiche sind durch weiße Boxen gekennzeichnet. Der endogene Notch-Rezeptor akkumuliert stark an der subapikalen Membran (A). Die Expression von Dx führt zu einer verstärkten Akkumulation des endogenen Rezeptors in Vesikeln (B⁺ Pfeile) und einer reduzierten Lokalisation an der subapikalen Membran (B, Vergrößerung). Die Expression von Su(dx) führt zu keiner verstärkten Akkumulation von Notch in Vesikel (C⁺, Pfeile). Der Rezeptor lokalisiert weiterhin an der subapikalen Membran (C, Vergrößerung). N-HA lokalisiert an der subapikalen Membran und an der apikalen Oberfläche der Zellen (D, Vergrößerung). N^{K2R}-HA akkumuliert stark an der subapikalen Membran (G, Vergrößerung). Die Membranlokalisierung reduziert sich durch die Koexpression von Dx mit N-HA und N^{K2R}-HA deutlich (E-E⁺ u. H-H⁺). Auch durch die Koexpression von Su(dx) mit N-HA und N^{K2R}-HA kommt es zu einer Reduzierung der apikalen Membranakkumulation (F-F⁺ u. I-I⁺). Um die apikale Lokalisation der Rezeptoren zu quantifizieren wurde die Fluoreszenzintensität der apikalen Membran gemessen und im Verhältnis zur gesamten Fluoreszenzintensität ohne die apikale Membran aufgetragen. Das Verhältnis der apikalen Fluoreszenzintensität ist bei N^{K2R}-HA im Vergleich zu N-HA schwächer ausgeprägt. Die apikale Fluoreszenzintensität von N-HA wird durch die Koexpression von Dx und Su(dx) abgeschwächt. Auch die apikale Fluoreszenzintensität von N^{K2R}-HA wird durch die Koexpression von Dx und Su(dx) abgeschwächt (für die Messung wurden von jedem Genotyp: n=3 Flügelimagnalscheiben ausgewertet) (J). Signifikanztest: One-way ANOVA (p<=0,05 (*)) / p<=0,01 (**) / p<=0,001 (***) / p<=0,0001 (****)).

dem gesamten Fluoreszenzsignal ohne apikale Membran dargestellt. Bei N-HA kommt es im Vergleich zu N^{K2R}-HA zu einer stärkeren apikalen Akkumulation des Rezeptors (Abb. 33 J). Dieser Effekt lässt sich vermutlich auf die verstärkte basale Vesikelakkumulation von N^{K2R}-HA zurückführen (Abb. 33 Vergleich D⁺ u. G⁺). Die apikale Akkumulation von N-HA wird sowohl durch die Dx als auch die Su(dx) Expression herabgesetzt. Su(dx) zeigt dabei einen schwächeren Effekt. Dx und Su(dx) führen ebenfalls zu einer abgeschwächten apikalen Akkumulation des N^{K2R}-HA Rezeptors. Auch in diesem Fall zeigt Su(dx) einen schwächeren Effekt (Abb. 33 J).

Zusammengefasst kommt es sowohl durch die Überexpression von Dx, als auch von Su(dx) zu einer Reduzierung der Lokalisation an der apikalen Membran von N-HA und N^{K2R}-HA. Darüber hinaus führt die Überexpression der E3-Ligasen zu einer verstärkten Akkumulation der Rezeptoren in Vesikeln. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass die Einleitung der Notch-Endozytose durch Dx und Su(dx) ubiquitinierungs-unabhängig ausgelöst wird. Die Ergebnisse durch die Analyse von Dx und Su(dx) mit nichtfunktionalen Ubiquitinierungsdomänen (Matsuno et al., 2002; Shimizu et al., 2014; Wilkin et al., 2004) können somit bestätigt werden. Darüber hinaus kann mit Hilfe von N^{K2R}-HA ein direkter ubiquitinierungs-unabhängiger Mechanismus der Notch-Endozytose aufgezeigt werden.

3.11.3 Untersuchung der Beeinflussung der endosomalen Lokalisation von N-HA und N^{K2R}-HA durch Dx und Su(dx)

Da die durch Dx und Su(dx) vermittelte Einleitung der Endozytose von N^{K2R}-HA ubiquitinierungs-unabhängig abzulaufen scheint, stellt sich die Frage, ob auch die Regulation der endosomalen Lokalisation des Rezeptors durch Dx und Su(dx) ubiquitinierungs-unabhängig beeinflusst wird. Um diese Frage zu beantworten wurden beide Rezeptoren und die E3-Ligasen für 14,5h im posterioren Kompartiment von Flügelimagnalscheiben exprimiert. Um reife

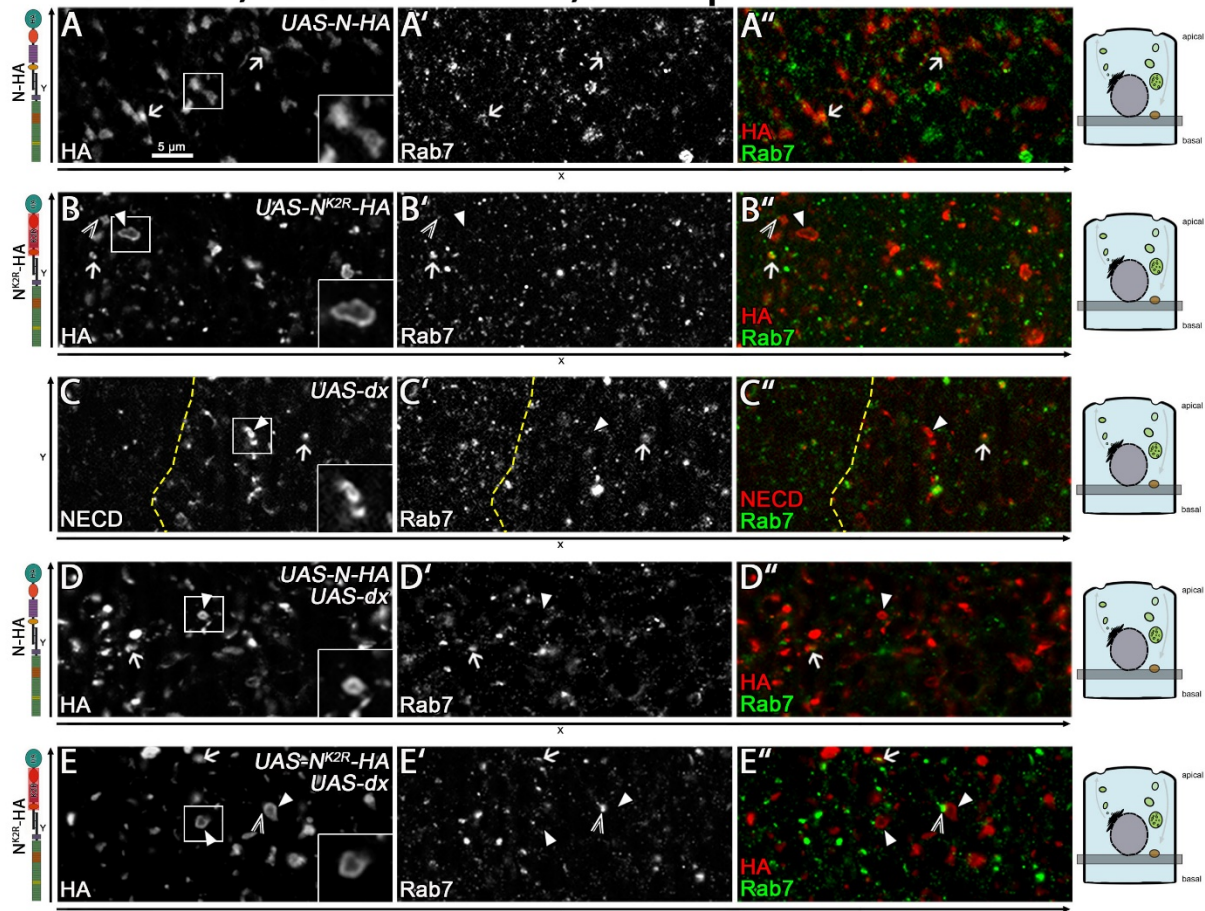
hh-GAL4, tub-GAL80^{ts} 14,5 h Expression

Abb. 34: Auswirkungen der Dx Überexpression auf die endosomale Lokalisation von N-HA und N^{K2R}-HA. Die Rezeptoren N-HA und N^{K2R}-HA, sowie die E3-Ligase Dx wurden für 14,5h unter Kontrolle des *hh*-GAL4 Treibers mit *tub*-GAL80^{ts} exprimiert. In der X/Y-Ebene werden basale Ansichten der Flügelimaginalscheiben gezeigt. Zur Detektion der transgenen Rezeptoren wurde eine HA Antikörperfärbung durchgeführt. Zur Detektion des endogenen Rezeptors wurde eine NECD Antikörperfärbung durchgeführt. Als Marker für spät-endosomale Kompartimente wurde eine Antikörperfärbung gegen Rab7 durchgeführt. Die gestrichelte gelbe Linie markiert die Grenze der *hh*-Expressionsdomäne. Vergrößerte Bereiche sind durch weiße Boxen gekennzeichnet. Pfeile markieren eine Kolo-kalisation mit Rab7. Geschlossene Pfeilspitzen markieren Notch positive Vesikel die nicht mit Rab7 kolo-kalisieren. Offene Pfeilspitzen markieren Rab7 positive Vesikel die sich in direkter räumlicher Nähe zu Notch-Vesikeln befinden. Basale N-HA positive Vesikel verfügen über kein ausgeprägtes Lumen (A, Vergrößerung) und kolo-kalisieren leicht mit Rab7 (A-A'', Pfeile). N^{K2R}-HA positive Vesikel verfügen über ein deutlich ausgeprägtes Lumen (B, Vergrößerung) und kolo-kalisieren nicht mit Rab7 (B-B'', geschlossene Pfeilspitze). Die Überexpression von Dx führt zu einer Akkumulation des endogenen Rezeptors in Vesikeln (C). In seltenen Fällen kommt es zu vergrößerten Vesikeln die ein leichtes Lumen aufweisen (C, Vergrößerung). Diese Vesikel kolo-kalisieren nicht mit Rab7 (C-C'', geschlossene Pfeilspitze). Dx führt bei einigen N-HA positiven Vesikeln zu der Bildung eines Lumens (D, Vergrößerung). Diese Vesikel kolo-kalisieren ebenfalls nicht mit Rab7 (D-D'', geschlossene Pfeilspitze). Dx hat keinen weiteren Effekt auf die Ausprägung des Lumens von N^{K2R}-HA positiven Vesikeln (E, Vergrößerung). Es kommt weiterhin zu keiner Kolo-kalisation mit Rab7 (E-E'', geschlossene Pfeilspitzen). In einigen Fällen kommt es zu einer Lokalisation von Rab7 positiven Vesikeln in direkter räumlicher Nähe zu N^{K2R}-HA positiven Vesikeln (E-E'', offene Pfeilspitze).

Endosomen zu markieren, wurde eine Antikörperfärbung gegen Rab7 durchgeführt. Analysiert wurden basale Notch positive Vesikel (Übersicht im Anhang Abb. 57 u. Abb. 58). Mit Hilfe des Rab7 Antikörpers kann eine Kolo-kalisation mit N-HA positiven Vesikeln beobachtet werden (Abb. 34 A-A'' Pfeile). Vergrößerte N^{K2R}-HA positive Vesikel mit einem stark ausgeprägten Lumen kolo-kalisieren, wie zuvor gezeigt, nicht eindeutig mit Rab7 (Abb. 34 B-B'' Pfeilspitze). Durch die Überexpression von Dx kommt es zu einer verstärkten Akkumulation des endogenen Rezeptors in Vesikeln (Abb. 34 C). Kleinere Notch positive Vesikel kolo-kalisieren häufig mit

Rab7 (Abb. 34 C-C'' Pfeil). Vergrößerte Vesikel sind in der Regel Rab7 negativ (Abb. 34 C-C'' Pfeilspitze). In seltenen Fällen kann eine leichte Ausprägung eines Lumens bei vergrößerter Notch positiven Vesikeln beobachtet werden (Abb. 34 C Vergrößerung).

Im Gegensatz zur Einzelexpression von N-HA kommt es durch die Koexpression mit Dx in einigen Fällen zu der Ausprägung eines Lumens der N-HA positiven Vesikel (Abb. 34 D, Vergrößerung). Die Koexpression von Dx und N^{K2R}-HA führt weiterhin zu einer Bildung von vergrößerten N^{K2R}-HA positiven Vesikel mit einem deutlich ausgeprägten Lumen (Abb. 34 E, Vergrößerung). Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Überexpression von Dx sowohl bei dem endogenen, als auch bei dem N-HA Rezeptor zu Notch positiven Vesikeln führt, bei denen der Rezeptor verstärkt an der limitierenden Membran akkumuliert. Hingegen scheint die Expression von Dx keinen weiteren Effekt auf die Lokalisation von N^{K2R}-HA an der limitierenden Membran von Notch positiven Vesikeln zu haben. Diese Beobachtung ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass sich N^{K2R}-HA bereits ohne die Überexpression von Dx größtenteils an der limitierenden Membran befindet. Auffällig ist, dass es bei vergrößerten Vesikeln mit einem ausgeprägten Lumen zu keiner eindeutigen Kollokalisierung mit Rab7 kommt (Abb. 34 A-E'', geschlossene Pfeilspitzen). In einigen Fällen kommt zu einer Assoziation von Rab7 positiven Vesikeln in direkter räumlicher Nähe zu vergrößerten Notch positiven Vesikeln (Abb. 34 A-E'', offene Pfeilspitzen). Hingegen kommt es bei kleineren Vesikeln häufig zu einer deutlichen Kollokalisierung mit Rab7 (Abb. 34 A-E'', Pfeile). Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass es durch die Vergrößerung der Vesikel tendenziell zu einem Verlust von Rab7 kommt.

Wie bereits beschrieben, zeigt die Überexpression von Su(dx) keine verstärkte Akkumulation des endogenen Rezeptors in Vesikeln (Abb. 35 A). Die Vesikel sind nicht vergrößert und sind häufig mit Rab7 assoziiert (Abb. 35 A-A'', Pfeile). Die Expression von Su(dx) scheint daher keinen starken Einfluss auf die endosomale Lokalisation des endogenen Rezeptors zu haben. Die Koexpression von Su(dx) und N-HA führt, vergleichbar mit der Einzelexpression von N-HA, zu Notch positiven Vesikeln bei denen in der Regel kein deutliches Lumen zu identifizieren ist (Abb. 35 B, Vergrößerung). Die Koexpression von Su(dx) und N^{K2R}-HA führt im Vergleich zur N^{K2R}-HA Einzelexpression zu einem schwächer ausgeprägten Lumen der Notch positiven Vesikel (Abb. 35 C, Vergrößerung). Diese Beobachtung deuten darauf hin, dass Su(dx) zu einer verstärkten Internalisierung des N^{K2R}-HA Rezeptors von der limitierenden Membran in das Lumen von Notch-Vesikeln führt. Auch in diesem Fall kommt es bei vergrößerten Notch positiven Vesikeln häufig zu keiner eindeutigen Kollokalisierung mit Rab7 (Abb. 35 A-C'', geschlossene Pfeilspitzen), aber in einigen Fällen zu einer direkten räumlichen Nähe von Rab7

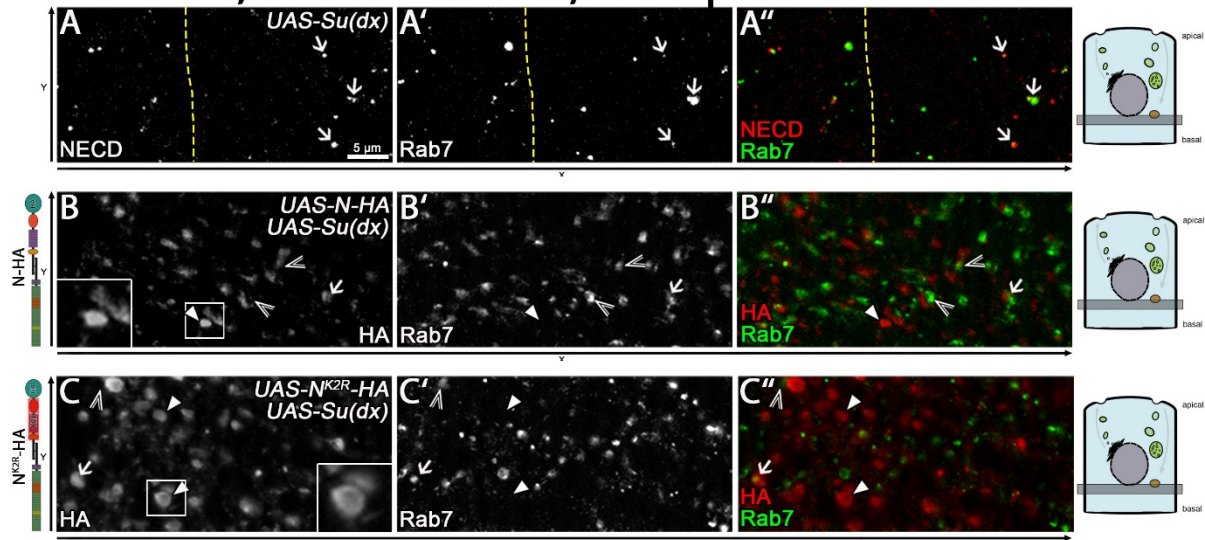
hh-GAL4, tub-GAL80^{ts} 14,5 h Expression

Abb. 35: Auswirkungen der Su(dx) Überexpression auf die endosomale Lokalisation von N-HA und N^{K2R}-HA. Die Rezeptoren N-HA und N^{K2R}-HA, sowie die E3-Ligase Su(dx) wurden für 14,5h unter Kontrolle des *hh*-Gal4 Treibers mit *tub-GAL80^{ts}* exprimiert. In der X/Y-Ebene werden basale Ansichten der Flügelimaginalscheiben gezeigt. Zur Detektion der transgenen Rezeptoren wurde eine HA Antikörperfärbung durchgeführt. Zur Detektion des endogenen Rezeptors wurde eine NECD Antikörperfärbung durchgeführt. Als Marker für spätendosomale Kompartimente wurde eine Antikörperfärbung gegen Rab7 durchgeführt. Die gestrichelte gelbe Linie markiert die Grenze der *hh*-Expressionsdomäne. Vergrößerte Bereiche sind durch weiße Boxen gekennzeichnet. Pfeile markieren eine Kolo-kalisation mit Rab7. Geschlossene Pfeilspitzen markieren Notch-Vesikel die nicht mit Rab7 kolo-kalisieren. Offene Pfeilspitzen markieren Rab7 positive Vesikel die sich in direkter räumlicher Nähe zu Notch-Vesikeln befinden. Die Überexpression von Su(dx) führt zu keiner vermehrten Akkumulation des endogenen Rezeptors in Vesikeln (A). Die vorhandenen Notch-Vesikel kolo-kalisieren mit Rab7 (A-A'' Pfeile). Die Lokalisation von N-HA innerhalb von Notch-Vesikeln wird durch Su(dx) nicht verändert (B, Vergrößerung). Diese Vesikel kolo-kalisieren in den meisten Fällen nicht eindeutig mit Rab7 (B-B'', geschlossene Pfeilspitze). Su(dx) scheint zu einer reduzierten Ausprägung des Lumens von N^{K2R}-HA positiven Vesikeln zu führen (C, Vergrößerung). Diese Vesikel kolo-kalisieren in den meisten Fällen nicht eindeutig mit Rab7 (C-C'', geschlossene Pfeilspitzen). In einigen Fällen führt die Su(dx) Expression zu einer Lokalisation von Rab7 positiven Vesikeln in direkter räumlicher Nähe zu N-HA und N^{K2R}-HA positiven Vesikeln (B-B'' u. C-C'' offene Pfeilspitzen).

positiven Vesikeln zu vergrößerten Notch positiven Vesikeln (Abb. 35 A-C'', offene Pfeilspitzen).

Um den Einfluss von Dx und Su(dx) auf die Lokalisation von N-HA und N^{K2R}-HA an der limitierenden Membran von Notch positiven Vesikeln quantitativ zu überprüfen, wurde eine Fluoreszenzintensitätsmessung der Vesikel durchgeführt. Bei einem stark ausgeprägten Lumen entsteht eine hohe Differenz der Fluoreszenzintensität zwischen dem Lumen und der limitierenden Membran eines Vesikels. Diese Differenz wurde als Maß für die Ausprägung des Lumens verwendet. Um darzustellen wie viel Signal sich innerhalb eines Lumens befindet, wurde die Differenz der Fluoreszenzintensität reziprok aufgetragen (Abb. 36 A).

Bei der Interpretation der Messergebnisse ist allerdings zu beachten, dass es bei den verschiedenen Vesikeln zu deutlichen Schwankungen in der Größe und der Fluoreszenzintensität kommt, welche die Messungen beeinflussen können. Daher sind die Ergebnisse dieser Messung als Hinweise zu verstehen.

Die qualitativen Beobachtungen können mit Hilfe der Fluoreszenzintensitätsmessung größtenteils bestätigt werden. So führt die Dx Expression zu einer reduzierten Akkumulation von

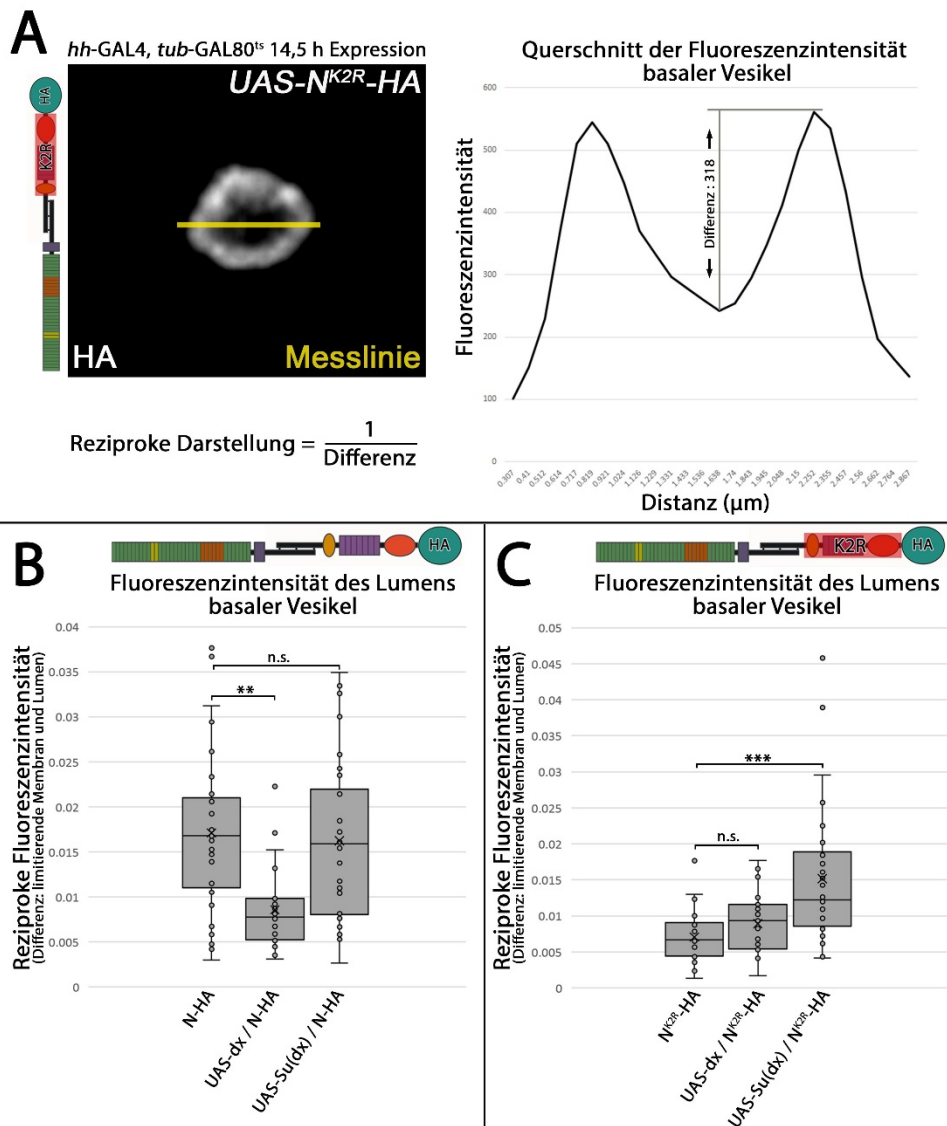


Abb. 36: Fluoreszenzintensitätsmessung basaler N-HA und N^{K2R}-HA positiver Vesikel. Um die Akkumulation von N-HA und N^{K2R}-HA im Lumen von Notch positiven Vesikeln zu quantifizieren, wurde die Differenz der Fluoreszenzintensität zwischen der limitierenden Membran und des Lumens gemessen. Um die Intensität der Fluoreszenz innerhalb des Lumens darzustellen wurde die Differenz zwischen der limitierenden Membran und des Lumens reziprok aufgetragen (A). Die Überexpression von Dx führt zu einer verstärkten Lumenbildung von N-HA Vesikeln. Die Überexpression von Su(dx) hat keinen weiteren Effekt auf die N-HA Lumenbildung (B). Die Expression von N^{K2R}-HA führt zu einer starken Lumenbildung. Die zusätzliche Expression von Dx führt zu keiner Veränderung der N^{K2R}-HA Lumenbildung. Die Überexpression von Su(dx) scheint hingegen zu einer vermehrten Internalisierung von N^{K2R}-HA in das Vesikellumen zu führen (C). Bei allen Genotypen wurden 30 Vesikel mit der stärksten Ausprägung eines Lumens vermessen (n=30 aus 3 Flügelimaginalscheiben). Signifikanztest: One-way ANOVA ($p \geq 0,05$ (n.s.) / $p < 0,01$ (**) / $p < 0,001$ (***)).

N-HA im Vesikellumen. Die Expression von Su(dx) hat keinen weiteren Effekt auf die Lokalisation von N-HA in Vesikeln (Abb. 36 B). Diese Beobachtung könnte dadurch erklärt werden, dass sich der N-HA Rezeptor bereits ohne die zusätzliche Expression von Su(dx) stark im Lumen von Notch-Vesikeln befindet. N^{K2R}-HA akkumuliert größtenteils an der limitierenden Membran der Vesikel. Die Koexpression mit Dx führt zu keiner signifikanten Veränderung dieses Phänotyps. Su(dx) führt hingegen zu einem leichten Anstieg von N^{K2R}-HA im Lumen (Abb. 36 C). Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass Dx die Internalisierung von N-HA in das

Vesikellumen unterdrückt und bestätigen somit die zuvor veröffentlichte Studien, in denen gezeigt wurde, dass Dx zu einer verstärkten Akkumulation von Notch an der limitierenden endosomalen Membran führt (Shimizu et al., 2014; Wilkin et al., 2008). Die Beobachtung, dass Su(dx) zu einer leichten Internalisierung von N^{K2R}-HA in das Lumen von Notch positiven Vesikeln führt, deuten darauf hin, dass dieser Prozess ubiquitinierungs-unabhängig abläuft.

3.11.4 Untersuchung der Beeinflussung der Notch-Aktivierung durch Dx und Su(dx)

Da Dx als positiver und Su(dx) als negativer Regulator des Notch-Signalweges bekannt sind (Übersicht in (Baron, 2012)), sollte überprüft werden, welchen Einfluss die E3-Ligasen auf die Aktivierung des Signalweges durch N-HA und N^{K2R}-HA haben. Um dies zu testen, wurden N-HA oder N^{K2R}-HA mit den E3-Ligasen für 14,5h im posterioren Kompartiment von Flügelimaginalscheiben koexprimiert und die Aktivierung des Notch-Signalweges quantifiziert. Während die Überexpression von Dx eine ektopischen Aktivierung des Signalweges auslöst, führt die Expression von Su(dx) zu einer leichten, aber nicht signifikanten Unterdrückung der endogenen Aktivität (Abb. 37 A-B“ und I). Im Vergleich zu N-HA führt die Koexpression von N-HA und Dx ebenfalls zu einer verstärkten Aktivierung des Signalweges. Die Koexpression mit Su(dx) führt hingegen zu einer Abschwächung der Notch-Aktivität (Abb. 37 C-E“ u. I). Die Effekte der Überexpression von Dx und Su(dx) auf die Aktivität des Signalweges durch den transgenen N-HA Rezeptors sind daher vergleichbar mit den Effekten auf den endogenen Rezeptor.

Im Vergleich zu N^{K2R}-HA führt die Koexpression von N^{K2R}-HA und Dx zu keiner signifikanten Veränderung der Notch-Aktivität. Die Koexpression mit Su(dx) und N^{K2R}-HA führt weiterhin zu einer starken ektopischen Aktivität, die allerdings im Vergleich zur Einzelexpression von N^{K2R}-HA leicht reduziert ist (Abb. 37 F-H“ und I). Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass die Regulation der Aktivierung des Notch-Signalweges durch Su(dx) ebenfalls ubiquitinierungs-unabhängig ablaufen kann.

Zusammengefasst kann die Funktion von Dx als positiver und Su(dx) als negativer Regulator der Notch-Aktivität bestätigt werden. Dieser Effekt lässt sich auch durch die zusätzliche Expression des transgenen N-HA Rezeptors beobachten. Die Beobachtung, dass die ektopische Aktivierung durch N^{K2R}-HA durch die zusätzliche Expression von Dx nicht weiter gesteigert werden kann, könnte darauf zurückzuführen sein, dass sich der N^{K2R}-HA Rezeptor bereits an der limitierenden Membran von Notch-Vesikeln befindet. Das die Koexpression von Su(dx) und N^{K2R}-HA zu einer

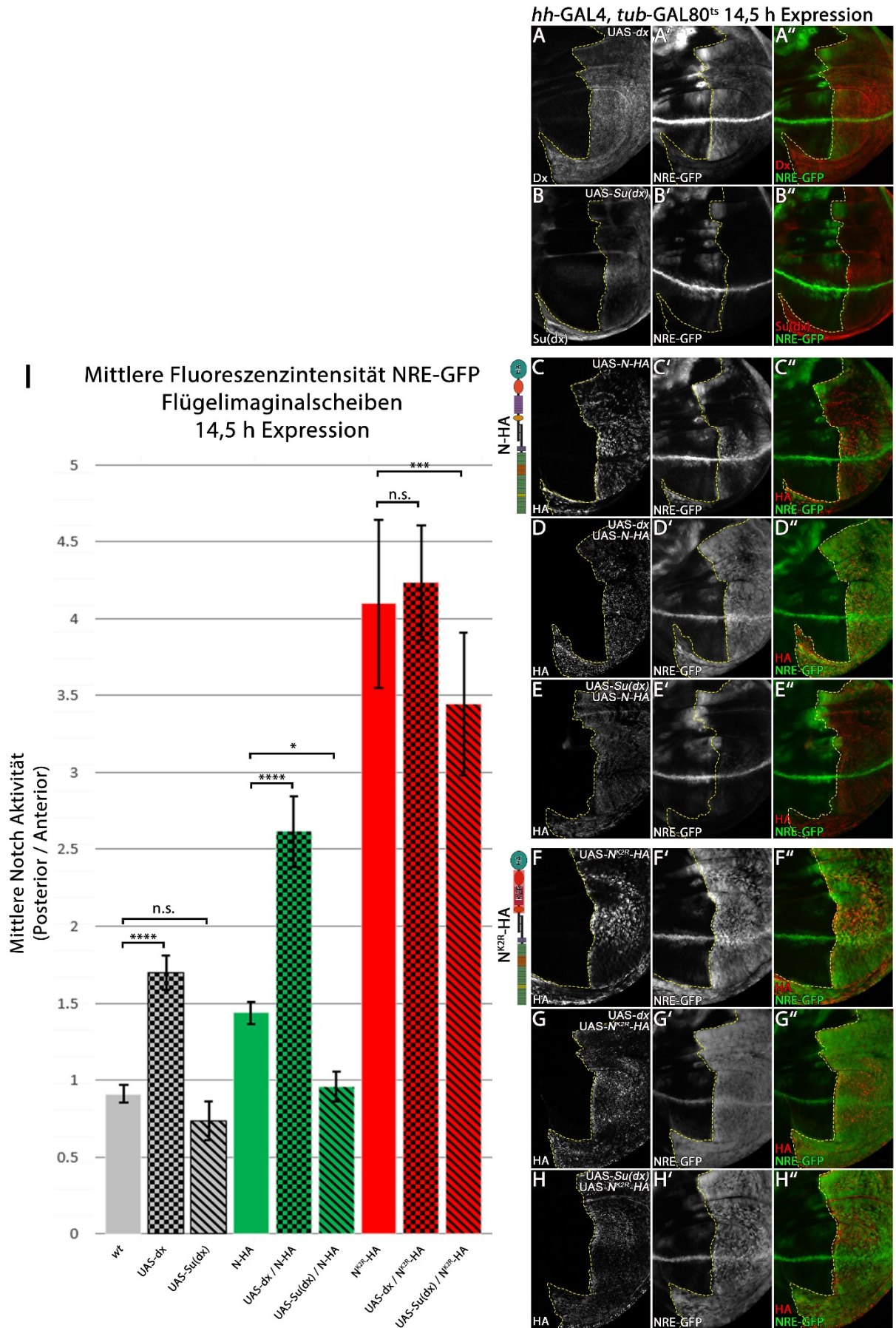


Abb. 37: Untersuchung der Auswirkungen von Dx und Su(dx) auf die Aktivität von N-HA und N^{K2R}-HA. Die Expression der E3-Ligasen sowie der Rezeptoren N-HA und N^{K2R}-HA erfolgte für 14,5h unter Kontrolle des *hh*-GAL4 Treibers mit *tub*-GAL80^{ts}. Dx und Su(dx) wurden sowohl einzeln, als auch in Koexpression mit N-HA oder N^{K2R}-HA analysiert. Die Expression von Dx

Su(dx) wurde mit Dx und Su(dx) Antikörpern detektiert (A u. B). Die Expression von N-HA und N^{K2R}-HA wurde mit einer HA Antikörperfärbung dargestellt (C-H). Die gestrichelte gelbe Linie markiert die *hh*-Expressionsdomäne. Als Marker für die Notch-Aktivität wurde NRE-GFP verwendet. Eine Fluoreszenzintensitätsmessung des NRE-GFP Signals wurde im ventralen Kompartiment der Flügelimaginalscheiben sowohl in der posterioren *hh*-Expressionsdomäne, als auch im anterioren Bereich durchgeführt. Die anterioren Messungen wurde als interne Referenzen der Imaginalscheiben verwendet. Bei der Aktivitätsmessung wurde das posteriore zum anterioren Verhältnis aufgetragen (I). Im Verhältnis zum Wildtyp führt die Expression von Dx zu einer ektopischen Aktivierung des Signalweges (A' u. I). Durch die Expression von Su(dx) kommt es zu einer leichten, aber keiner signifikanten Abschwächung der endogenen Notch-Aktivität (B' u. I). Im Vergleich zu N-HA führt die Koexpression von N-HA und Dx zu einer deutlichen Aktivitätssteigerung (D' u. I). Die Koexpression von N-HA und Su(dx) führt zu einer Abschwächung der Notch-Aktivität (E' u. I). Die starke ektopische Notch-Aktivierung durch N^{K2R}-HA wird durch eine Koexpression von Dx nicht verändert (G' u. I). Die Koexpression von Su(dx) und N^{K2R}-HA führt zu einer leichten messbaren Abschwächung der Notch-Aktivität (H' u. I). Signifikanztest: One-way ANOVA ($p \geq 0,05$ (n.s.) / $p < 0,05$ (*) / $p < 0,001$ (***) / $p < 0,0001$ (***) (wt: n=9 / dx: n=10 / Su(dx) n=6 / N-HA: n=7 / N^{K2R}-HA: n=11 / N-HA dx: n=8 / N-HA Su(dx): n=7 / N^{K2R}-HA dx: n= 13 / N^{K2R}-HA Su(dx) n=9 Flügelimaginalscheiben).

leichten Abschwächung der Notch-Aktivität führt, deutet auf eine ubiquitinierungs-unabhängige Funktion von Su(dx) hin. Dies könnte auf die zuvor gezeigte verstärkte Internalisierung von N^{K2R}-HA in das Lumen von Notch positiven Vesikeln zurückzuführen sein. Die verstärkte Internalisierung und die abgeschwächte ektopische Notch-Aktivität sind zudem weitere Hinweise darauf, dass N^{K2R}-HA von der limitierenden Membran der Vesikel aktiviert wird.

3.12 Ein Dileucinmotiv als mögliches Endozytosesignal

Da gezeigt werden konnte, dass die Endozytose des Notch-Rezeptors ubiquitinierungs-unabhängig reguliert wird, stellt sich die Frage, wie die Endozytose des Rezeptors geregelt wird. Als Signale für die Endozytose und den Transport von Transmembranproteinen in endosomale/lysosomale Kompartimente sind unter anderem Dileucinmotive bekannt (Letourneur and Klausner, 1992; Pond et al., 1995). Auch der *Drosophila* Notch-Rezeptor verfügt über ein intrazelluläres konserviertes Dileucinmotiv (Abb.39 A). Dieses Dileucinmotiv wurde bereits im humanen N1-Rezeptors untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass ein Austausch des Dileucinmotives keinen Effekt auf die Endozytose des Rezeptors hat, aber zu einer verminderten Notch-Aktivierung vom Lysosom führt. Darüber hinaus führt der Austausch des Motives zu einem unterdrückten Transport des Rezeptors vom frühen zum späten Endosom (Zheng et al., 2013).

Um zu überprüfen welchen Effekt das Dileucinmotiv des *Drosophila* Notch-Rezeptors hat, wurde ein Leucin zu Alanin Austausch des Motives (LL2AA) sowohl bei N-HA, als auch N^{K2R}-HA durchgeführt.

3.12.1 Auswirkungen des Dileucinmotives auf die Endozytose von N-HA und N^{K2R}-HA

Um den Einfluss des Dileucinmotives auf die Endozytose der Notch-Rezeptoren zu überprüfen, wurden N^{LL2AA}-HA und N^{K2R-LL2AA}-HA für 14,5h im posterioren Kompartiment von Flügelimaginalscheiben exprimiert. Mit Hilfe einer apikalen Ansicht der Flügelimaginalscheiben wurde überprüft, ob sich die Lokalisation der Rezeptoren an der apikalen Plasmamembran durch den Austausch der Dileucinmotive beeinflussen lässt.

Wie bereits, gezeigt führt die Expression von N-HA und N^{K2R}-HA zu einer Akkumulation der Rezeptoren an der apikalen Membran (Abb. 38 B'/D' Pfeile u. B/D Vergrößerung). Der Austausch des Dileucinmotives bei N-HA führt weiterhin zu einer Lokalisation des Rezeptors an der apikalen Membran und in Vesikeln (Abb. 38 C'). Im Gegensatz zu N-HA führt N^{LL2AA}-HA allerdings zu einer verstärkten Akkumulation des Rezeptors an der subapikalen Membran, was sich durch die deutliche Ausprägung der netzartigen Struktur zeigt (Abb. 38 Vergleich B u. C, Vergrößerung). Der Austausch des Dileucinmotives bei N^{K2R}-HA führt weiterhin zu einer Lokalisation des Rezeptors an der apikalen Membran und in Vesikeln (Abb. 38 E'). Sowohl N^{K2R}-HA als auch N^{K2R-LL2AA}-HA akkumulieren deutlich an der subapikalen Membran (Abb. 38 Vergleich D u. E Vergrößerung). Um die Stärke der Akkumulation der Rezeptoren an der apikalen Membran zu quantifizieren, wurde wie zuvor die Fluoreszenzintensität der apikalen Membran gemessen und im Verhältnis zu der gesamten Fluoreszenzintensität ohne die apikale Membran dargestellt. Sowohl für N^{LL2AA}-HA, als auch N^{K2R-LL2AA}-HA kann im Vergleich zu N-HA und N^{K2R}-HA ein deutlicher Anstieg der Akkumulation an der apikalen Membran gemessen werden (Abb. 38 F). Diese Ergebnisse legen nahe, dass das Dileucinmotiv des *Drosophila* Notch-Rezeptors an der Endozytose von der apikalen Membran beteiligt ist.

A

D. melanogaster Notch : DVASERLHHDIVRLLDEHVP-RSPQMLSMT

H. sapiens Notch1 : DIAQERMHHDIVRLLDEYNLVRSPQLHGAP

hh-GAL4, *tub*-GAL80^{ts} 14,5 h Expression

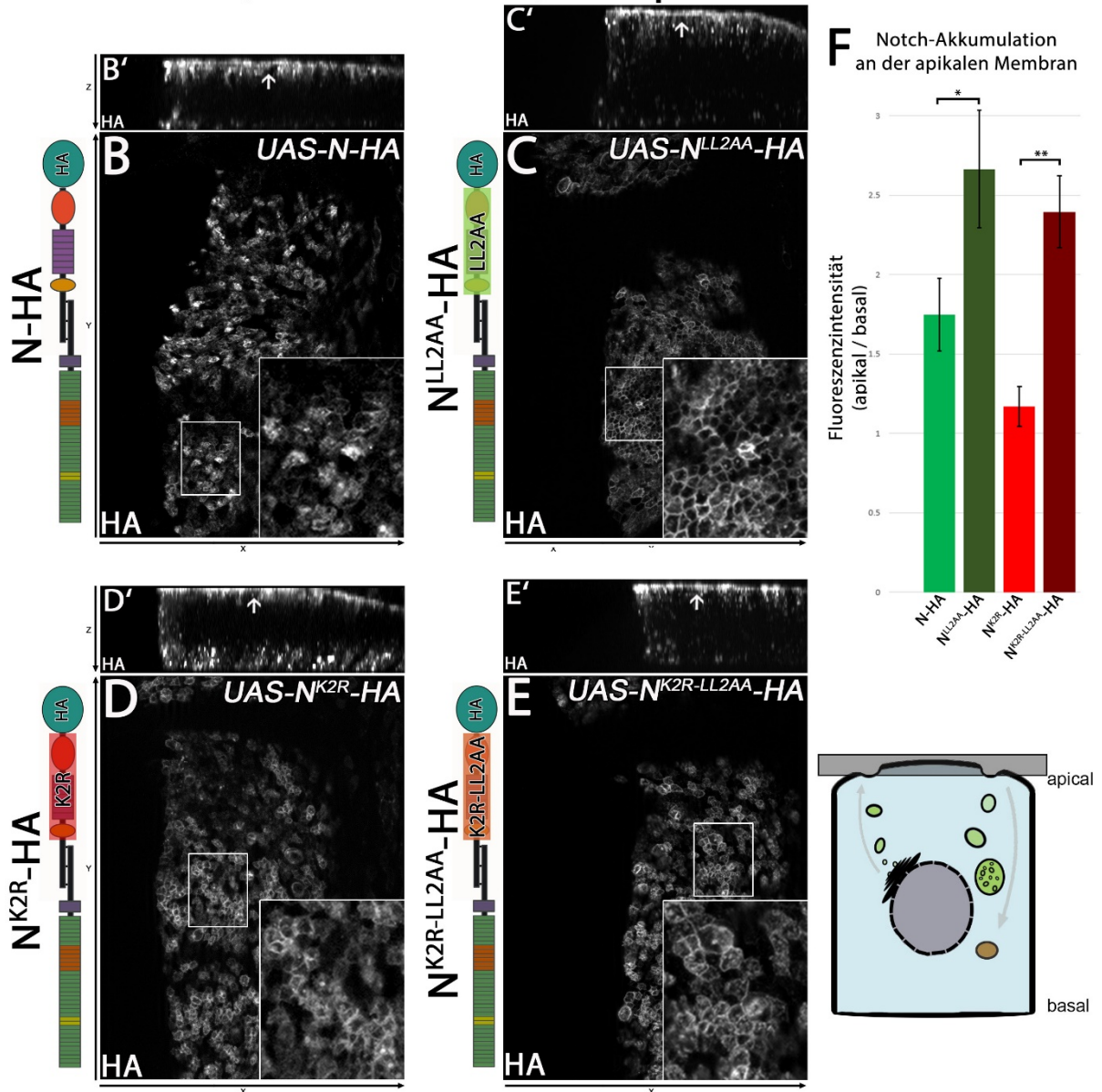


Abb. 38: Analyse der Endozytose von N^{K2R-LL2AA}-HA und N^{LL2AA}-HA. Die Rezeptoren N-HA und N^{K2R}-HA, sowie N^{K2R-LL2AA}-HA und N^{LL2AA}-HA wurden für 14,5h unter Kontrolle des *hh*-GAL4 Treibers mit *tub*-GAL80^{ts} exprimiert. Um die apiko-basale Lokalisation der Rezeptoren darzustellen wurden Z-Stapel der Imaginalscheiben aufgenommen (B'/C'/D'/E'). In der X/Y-Ebene werden apikale Ansichten der Flügelimaginalscheiben gezeigt. Zur Detektion der transgenen Rezeptoren wurde eine HA Antikörperfärbung durchgeführt. Vergrößerte Bereiche sind durch weiße Boxen gekennzeichnet. N-HA lokalisiert an der subapikalen Membran und an der apikalen Oberfläche der Zellen (B, Vergrößerung). N^{K2R}-HA akkumuliert stark an der subapikalen Membran (D, Vergrößerung). Durch die Expression von N^{LL2AA}-HA kommt es zu einer deutlichen Akkumulation des Rezeptors an der subapikalen Membran (C, Vergrößerung). Sowohl N^{K2R}-HA, als auch N^{K2R-LL2AA}-HA zeigen eine deutliche Akkumulation an der subapikalen Membran (D u. E, Vergrößerung). Um die Akkumulation der Rezeptoren an der apikalen Membran zu quantifizieren, wurde die Fluoreszenzintensität der apikalen Membran gemessen und im Verhältnis zur gesamten Fluoreszenzintensität ohne die apikale Membran aufgetragen. Sowohl N^{LL2AA}-HA als auch N^{K2R-LL2AA}-HA zeigen im Vergleich zu N-HA und N^{K2R}-HA einen deutlichen Anstieg des apikalen Signals. (für die Messung wurden von jedem Genotyp: n=3 Flügelimaginalscheiben ausgewertet) (F). Signifikanztest: One-way ANOVA ($p < 0,05$ (*) / $p < 0,01$ (**)).

3.12.2 Untersuchung der endosomalen Lokalisation von N^{LL2AA} -HA und $N^{K2R-LL2AA}$ -HA

Durch den Austausch des Dileucinmotives bei N-HA und N^{K2R} -HA kommt es zu einer verstärkten Akkumulation der Rezeptoren an der apikalen Membran. Dennoch führt der Austausch nicht zu einer Unterbrechung der Vesikelbildung.

Für den human N1-Rezeptor konnte gezeigt werden, dass der Austausch des Dileucinmotives zu einem unterdrückten Transport des Rezeptors in spät-endosomale Kompartimente kommt (Zheng et al., 2013). Da es bei N^{LL2AA} -HA und $N^{K2R-LL2AA}$ -HA weiterhin zu einer Bildung von Vesikeln kommt, sollte untersucht werden, ob es auch bei dem *Drosophila* Notch-Rezeptor zu einer Unterdrückung des Transportes in spät-endosomale Kompartimente kommt.

Dazu wurden N^{LL2AA} -HA und $N^{K2R-LL2AA}$ -HA für 14,5h in posterioren Kompartiment von Flügelimaginalscheiben exprimiert. Um späte Endosomen zu Markieren wurde eine Antikörperfärbung gegen Rab7 durchgeführt (Übersicht im Anhang Abb. 59). Bei N^{LL2AA} -HA kommt es sowohl bei apikalen, als auch basalen Notch positiven Vesikeln zu einer Kolo-kalisation mit Rab7 (Abb. 39 A-B'', Pfeile). Apikale $N^{K2R-LL2AA}$ -HA positive Vesikel kolo-kalisieren ebenfalls deutlich mit Rab7 (Abb. 39 C-C'', Pfeile). Bei basalen $N^{K2R-LL2AA}$ -HA positiven

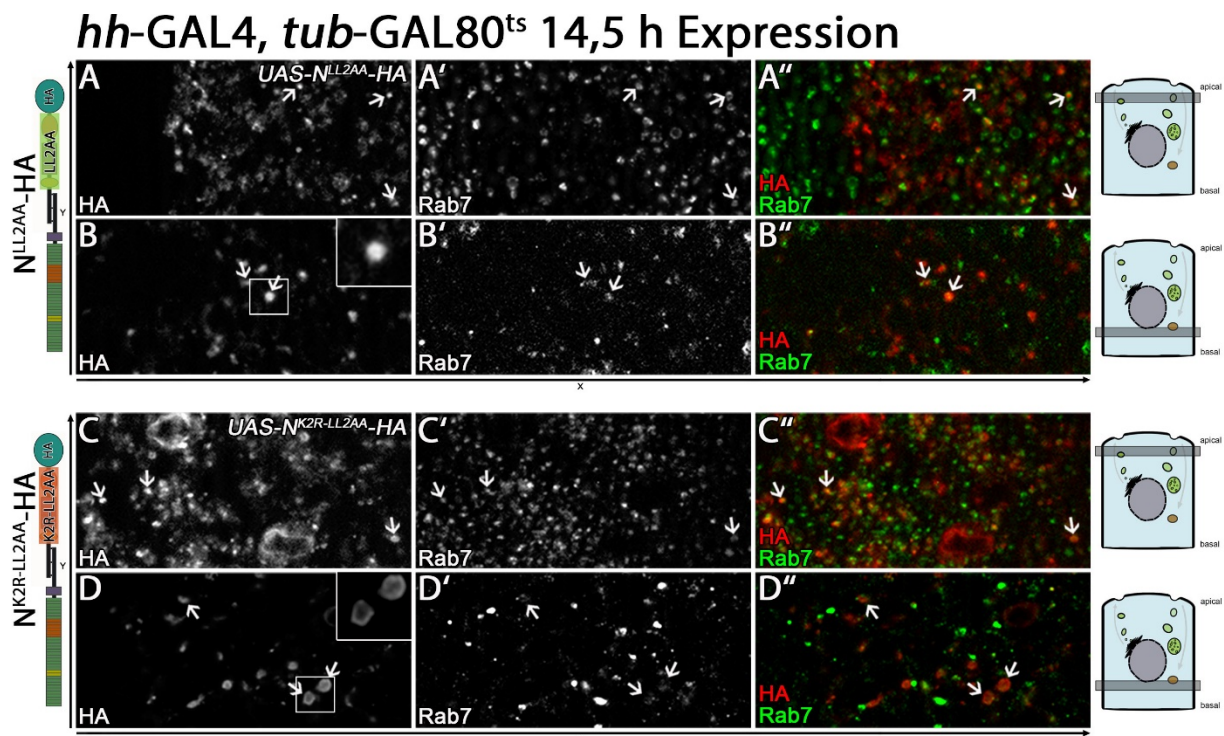


Abb. 39: Untersuchung der endosomalen Lokalisation von N^{LL2AA} -HA und $N^{K2R-LL2AA}$ -HA. Die Rezeptoren N^{LL2AA} -HA und $N^{K2R-LL2AA}$ -HA wurden für 14,5h unter Kontrolle des *hh*-GAL4 Treibers mit *tub*-GAL80^{ts} exprimiert. In der X/Y-Ebene werden apikale, sowie basale Vesikel gezeigt. Zur Detektion der transgenen Rezeptoren wurde eine HA Antikörperfärbung durchgeführt. Als Marker für spätendosomale Kompartimente wurde eine Antikörperfärbung gegen Rab7 durchgeführt. Vergrößerte Bereiche sind durch weiße Boxen gekennzeichnet. Pfeile markieren eine Kolo-kalisation mit Rab7. N^{LL2AA} -HA positive Vesikel zeigen sowohl apikal, als auch basal eine Kolo-kalisation mit Rab7 (A-B'', Pfeile). Apikale $N^{K2R-LL2AA}$ -HA positive Vesikel Kolo-kalisieren ebenfalls mit Rab7 (C-C'', Pfeile). Bei basalen $N^{K2R-LL2AA}$ -HA positiven Vesikeln kommt es weiterhin zu der Ausprägung eines Lumens (D, Vergrößerung). Bei diesen Vesikeln kann eine leichte Kolo-kalisation mit Rab7 beobachtet werden (D-D'', Pfeile).

Vesikeln kommt es weiterhin zu der Ausprägung eines Lumens (Abb. 39 D, Vergrößerung). Einige dieser Vesikel weisen ebenfalls eine leichte Rab7 Färbung auf (Abb. 39 D-D'', Pfeile). Die Ergebnisse zeigen, dass der Austausch des Dileucinmotives im *Drosophila* Notch-Rezeptors nicht zu einer Unterdrückung des Transportes in späte Endosomen führt.

3.12.3 Auswirkungen des Dileucinmotives auf die Aktivierung von N-HA und N^{K2R}-HA

Um zu überprüfen welchen Einfluss der Austausch auf die Aktivierung von N-HA und N^{K2R}-HA in *Drosophila* hat, wurden N^{LL2AA}-HA und N^{K2R-LL2AA}-HA für 14,5h im posterioren Kompartiment von Flügelimaginalscheiben exprimiert und die Aktivität des Notch-Signalweges quantifiziert. Die Expression von N^{LL2AA}-HA führt zu einer vergleichbaren Aktivierung mit N-HA (Abb. 40 B' u. E). Auch die Expression von N^{K2R-LL2AA}-HA führt im Vergleich zu N^{K2R}-HA zu keiner Veränderung der Notch-Aktivität. Bei beiden Rezeptoren kommt es zu einer starken Aktivierung (Abb. 40 D' u. E).

Zusammengefasst zeigt der Austausch des Dileucinmotives im *Drosophila* Notch-Rezeptor deutliche Unterschiede zu dem Austausch im humanen N1-Rezeptor. So kommt es durch N^{LL2AA}-HA und N^{K2R-LL2AA}-HA zu einer deutlich verstärkten Akkumulation an der subapikalen Membran. Diese Beobachtung spricht für eine Funktion des Dileucinmotives als Endozytosesignal. Darüber hinaus kommt es nicht zu einer Unterbrechung des Transports in spätendosomalen Kompartimenten. Da es weiterhin zu einer Vesikelbildung kommt, ist davon auszugehen, dass das Dileucinmotiv zwar starke Effekte auf die Notch-Endozytose hat, aber nicht das einzige Endozytosesignal ist. Die Vesikelbildung von N^{K2R-LL2AA}-HA zeigt darüber hinaus, dass es einen Mechanismus geben muss, der unabhängig von der Ubiquitinierung des Rezeptors und der Funktion des Dileucinmotives eine Endozytose des Notch-Rezeptors auslöst. Der Austausch des Dileucinmotives hat im Gegensatz zum N1-Rezeptor keinen Effekt auf die Aktivität von N-HA und N^{K2R}-HA.

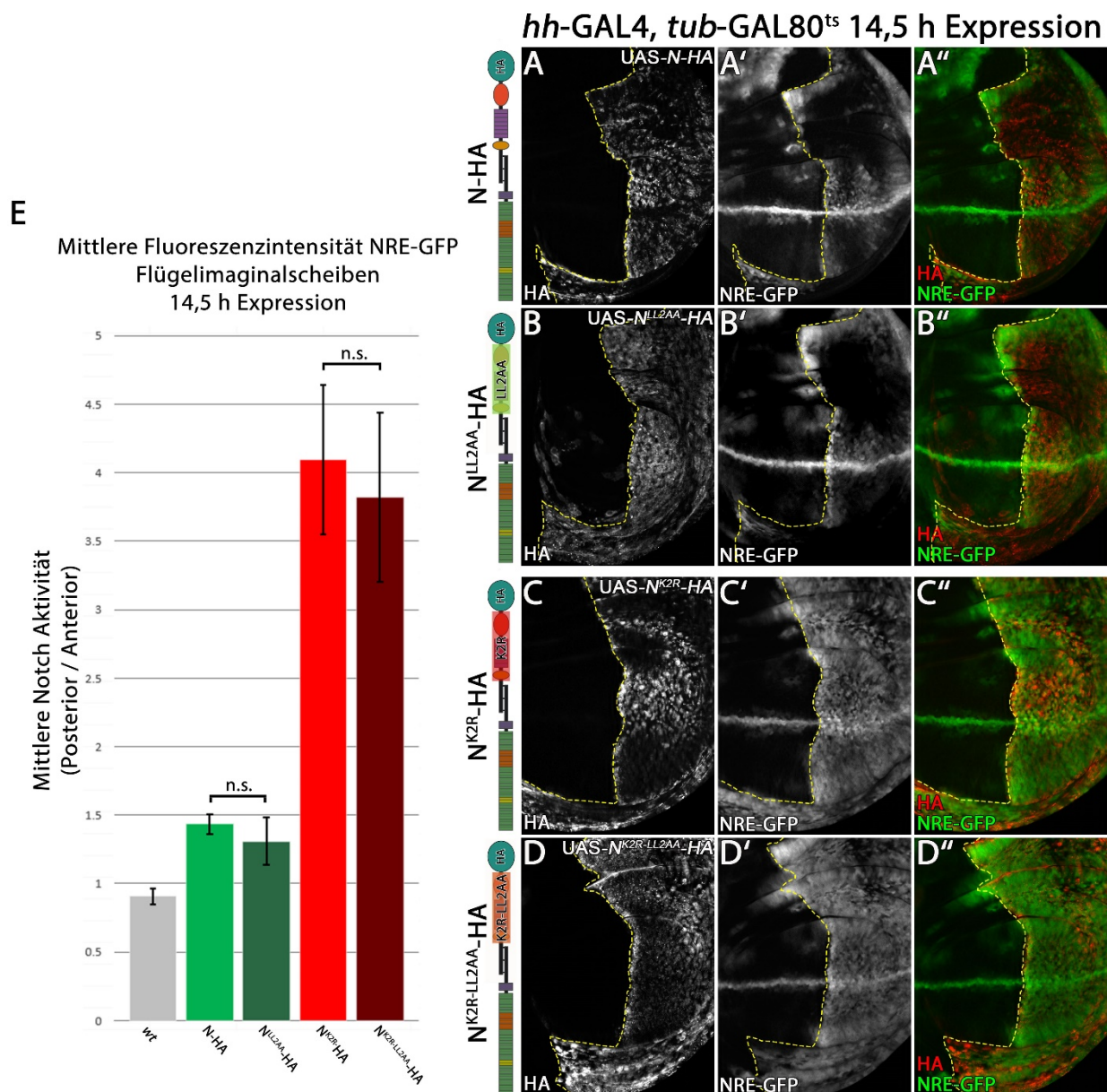


Abb. 40: Untersuchung der Aktivierung von N^{LL2AA}-HA und N^{K2R-LL2AA}-HA in Flügelimaginalscheiben. Die Expression der Rezeptoren erfolgte temperaturabhängig für 14,5h unter Kontrolle des *hh*-Gal4 Treibers. Die Expression wurde mit Hilfe eines gegen HA gerichteten Antikörpers dargestellt (D-I). Die gestrichelte gelbe Linie markiert die Expressionsgrenze der Notch-Rezeptoren. Als Marker für die Notch-Aktivität wurde NRE-GFP verwendet. Eine Fluoreszenzintensitätsmessung des NRE-GFP Signals wurde im ventralen Kompartiment der Flügelimaginalscheiben sowohl in der posterioren *hh*-Expressionsdomäne, als auch im anterioren Bereich durchgeführt. Die anterioren Messungen wurde als interne Referenzen der Imaginalscheiben verwendet. Bei der Aktivitätsmessung wurde das posteriore zum anterioren Verhältnis aufgetragen (E). Durch den Austausch des Dileucinmotives in N-HA kommt es zu keiner signifikanten Beeinflussung der Notch-Aktivität (B' u. E). Die Aktivität von N^{K2R}-HA wird ebenfalls nicht durch den Austausch des Dileucinmotives beeinflusst (D' u. E). Signifikanztest: One-way ANOVA ($p \geq 0,05$ (n.s.)) (wt: n=9 / N-HA: n=7 / N^{K2R}-HA: n=11 / N^{LL2AA}-HA: n=8 / N^{K2R-LL2AA}-HA: n=7 Flügelimaginalscheiben).

4 Diskussion

4.1 Regulation der Aktivierung des N^{K2R}-HA Rezeptors

Die Expression des N^{K2R}-HA Rezeptors löst eine starke ektopische Aktivierung der Notch-Signalweges aus. Diese Aktivierung ist um ein Vielfaches höher als die Aktivierung, die durch einen Rezeptor ausgelöst wird, der über die intrazellulären Lysine verfügt (3.2).

In weiteren Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung durch N^{K2R}-HA unabhängig von der proteolytischen Spaltung durch Kuz, aber abhängig von der Funktion des γ -Sekretase-Komplexes ausgelöst wird (3.4). Darüber hinaus führt die Expression von N^{K2R}-HA zu einer liganden-unabhängigen Aktivierung des Signalweges. Diese Eigenschaft konnte sowohl anhand einer klonalen Analyse mit *DI* und *Ser* mutanten Allelen, sowie in *mib1* mutanten Flügelimaginalscheiben, als auch in Zellkulturexperimenten nachgewiesen werden (3.3).

In einer kürzlich durchgeführten Untersuchung wurde ein Austausch der intrazellulären Lysine bei dem humanen N1-Rezeptor durchgeführt (Zheng and Conner, 2018). In dieser Studie konnte in Zellkultur Experimenten gezeigt werden, dass es durch den Austausch der intrazellulären Lysine zu einer Unterdrückung der Notch-Aktivität kommt. Die Restaktivität ist dabei abhängig von der Funktion des γ -Sekretase-Komplexes. Die Funktion der intrazellulären Lysine bei der Regulation der Aktivierung des Notch-Signalweges scheint daher im humanen N1-Rezeptor und im *Drosophila* Rezeptor unterschiedlich zu sein.

4.1.1 Auswirkungen der endosomalen Lokalisation von N^{K2R}-HA auf die Aktivierung des Signalweges

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es durch die Expression von N-HA und N^{K2R}-HA zu einer basalen Vesikel-Akkumulation in der Flügelimaginalscheibe kommt.

Durch eine nähere Untersuchung konnten N^{K2R}-HA positive Vesikel identifiziert werden, die über ein stark ausgeprägtes Lumen verfügen. Diese Vesikel entstehen nicht bei der Expression des N-HA Rezeptors. Die Akkumulation von N^{K2R}-HA an der limitierenden Membran der Vesikeln scheint daher durch den Austausch der intrazellulären Lysine hervorgerufen zu werden (3.9). In der weiteren Untersuchung dieser Vesikel konnte keine klare Kolokalisation mit dem spät-endosomalen Marker Rab7 festgestellt werden. Mit Hilfe von „Uptake“-Experimenten in S2-Zellen konnte allerdings gezeigt werden, dass die vergrößerten Vesikel mit Lumen durch die

Endozytose des N^{K2R}-HA Rezeptors von der Zellmembran entstehen. In diesen Experimenten konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass es zu einer Kolo-kalisation zwischen Rab7 und den vergrößerten N^{K2R}-HA positiven Vesikeln kommt (3.9.2). Diese Beobachtungen legen nahe, dass die basalen N^{K2R}-HA positiven Vesikel in Flügelimaginalscheiben einen endosomalen Ursprung haben, aber die endosomalen Marker im Verlauf der Reifung verlieren. Die verstärkte Akkumulation des N^{K2R}-HA Rezeptors an der limitierenden Membran von Kompartimenten mit endosomalen Ursprung stellt eine mögliche Erklärung für die starke liganden-unabhängige Aktivierung des Rezeptors dar.

So konnte gezeigt werden, dass der Ausfall von Komponenten der endosomalen Reifung zu einer ektopischen Notch-Aktivierung führt, die vermutlich auf eine fehlerhafte Internalisierung des Notch-Rezeptors in das endosomale Lumen zurückzuführen ist. Beispiele hierfür sind der Ausfall von *lgd* oder der ESCRT-III Komponente *shrub* (Schneider et al., 2013; Troost et al., 2012). Darüber hinaus konnten auch für andere Mutationen in ESCRT-Komponenten wie Vps25 und Tsg101 eine ektopische Aktivierung und eine Akkumulation des Rezeptors in Endosomen festgestellt werden (Moberg et al., 2005; Thompson et al., 2005; Vaccari and Bilder, 2005). Diese Studien zeigen, dass die Funktionalität der ESCRT-Maschinerie wichtig für die Unterdrückung einer ektopischen Aktivierung des Notch-Signalweges am Endosom ist. Da die ESCRT-Maschinerie die Internalisierung von Transmembranproteinen in ILVs von spätendosomalen Kompartimenten auslöst, ist die Unterdrückung einer ektopischen Notch-Aktivität mit hoher Wahrscheinlichkeit auf eine Internalisierung des Notch-Rezeptors und einer damit einhergehenden Isolierung der intrazellulären Domäne vom Zytoplasma zurückzuführen. Die ESCRT-Maschinerie erkennt die Fracht, welche in ILVs verpackt werden soll über gekoppeltes Ubiquitin an den Transmembranproteine (Prag et al., 2007). Da der N^{K2R}-HA Rezeptor über keine intrazellulären Lysine verfügt, sollte es zu keiner lysin-abhängigen Ubiquitinierung des Rezeptors kommen. Es ist daher wahrscheinlich, dass eine unterdrückte Ubiquitinierung von N^{K2R}-HA dazu führt, dass der Rezeptor nicht von der ESCRT-Maschinerie erkannt wird und deshalb nicht in ILVs verpackt wird.

In diesem Zusammenhang ist besonders interessant, dass N^{K2R}-HA unabhängig von Kuz, aber abhängig von der Funktion des γ -Sekretase-Komplexes aktiviert wird. Diese Art der Aktivierung konnte auch in *lgd* Mutanten nachgewiesen werden und ist vermutlich auf ein alternatives „Ectodomain-Shedding“ des Rezeptors am Lysosom zurückzuführen (Schneider et al., 2013). Die Ergebnisse sprechen daher für eine Aktivierung des N^{K2R}-HA Rezeptors am Endosom/Lysosom und unterstützen die Hypothese, dass es durch eine Akkumulation von Notch

an der limitierenden Membran des Endosoms/Lysosoms zu einer ektoxischen ligandenunabhängigen Aktivierung des Signalweges kommt.

In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass die Ubiquitinierung der endosomalen Fracht ebenfalls wichtig für die Rekrutierung der ESCRT-Komponenten ist (MacDonald et al., 2012). Es wäre also denkbar, dass es durch die starke Anreicherung eines Notch-Rezeptors an der limitierenden Membran, der nicht ubiquitiniert werden kann, zu einer Unterdrückung der Rekrutierung der ESCRT-Komponenten kommt. In dieser Arbeit konnte allerdings gezeigt werden, dass der N^{K2R}-HA Rezeptor zwar an der limitierenden Membran akkumuliert, aber der endogene Rezeptor weiterhin in das Lumen dieser Kompartimente transportiert wird (3.9). Diese Beobachtung legt nahe, dass die ESCRT-Maschinerie weiterhin funktional ist und nicht durch die Akkumulation von N^{K2R}-HA unterdrückt wird.

In *lgl* Mutanten konnte gezeigt werden, dass die Ansäuerung des endosomalen Kompartimentes essentiell für die ektoxische Aktivierung des Notch-Signalweges ist (Schneider et al., 2013). Um zu testen, ob die starke Aktivierung des N^{K2R}-HA Rezeptors ebenfalls abhängig von der Ansäuerung ist, wurde in dieser Arbeit die Aktivität der v-ATPase durch die Expression einer RNAi unterdrückt. Durch eine Quantifizierung des NRE-GFP Signals konnte eine leichte Unterdrückung der N^{K2R}-HA Aktivität gemessen werden (3.10). Hierbei ist allerdings zu beachten, dass sowohl der N^{K2R}-HA Rezeptor, als auch die RNAi nur für einen geringen Zeitraum von 14,5h exprimiert wurden. Eine längere Koexpression von N^{K2R}-HA und der RNAi führt weiterhin zu einer starken Aktivierung des Notch-Signalweges. Es kann daher nicht eindeutig gezeigt werden, dass die Ansäuerung des endosomalen Kompartimentes essentiell für die Aktivierung des N^{K2R}-HA Rezeptors ist. Da sowohl der Rezeptor, als auch die RNAi koexprimiert wurden, könnte es zu einer verzögerten Unterdrückung der v-ATPase Funktion kommen. Es ist daher vorstellbar, dass es bereits zu einer Aktivierung des N^{K2R}-HA Rezeptors kommt, bevor die Funktion der v-ATPase unterdrückt wird. Die Unterdrückung der v-ATPase Aktivität mit Hilfe einer RNAi bei gleichzeitiger Expression des Rezeptors ist daher keine optimale Methode um die Auswirkungen der Ansäuerung zu testen. Die leichte Unterdrückung der N^{K2R}-HA Aktivierung bei 14,5h Expression kann aber dennoch als Hinweis auf eine Abhängigkeit der N^{K2R}-HA Aktivität von der Ansäuerung des Endosoms gewertet werden. Um genauere Aussagen treffen zu können, sollte dieses Experiment mit Hilfe einer klonalen Analyse mit v-ATPase Mutanten wiederholt werden.

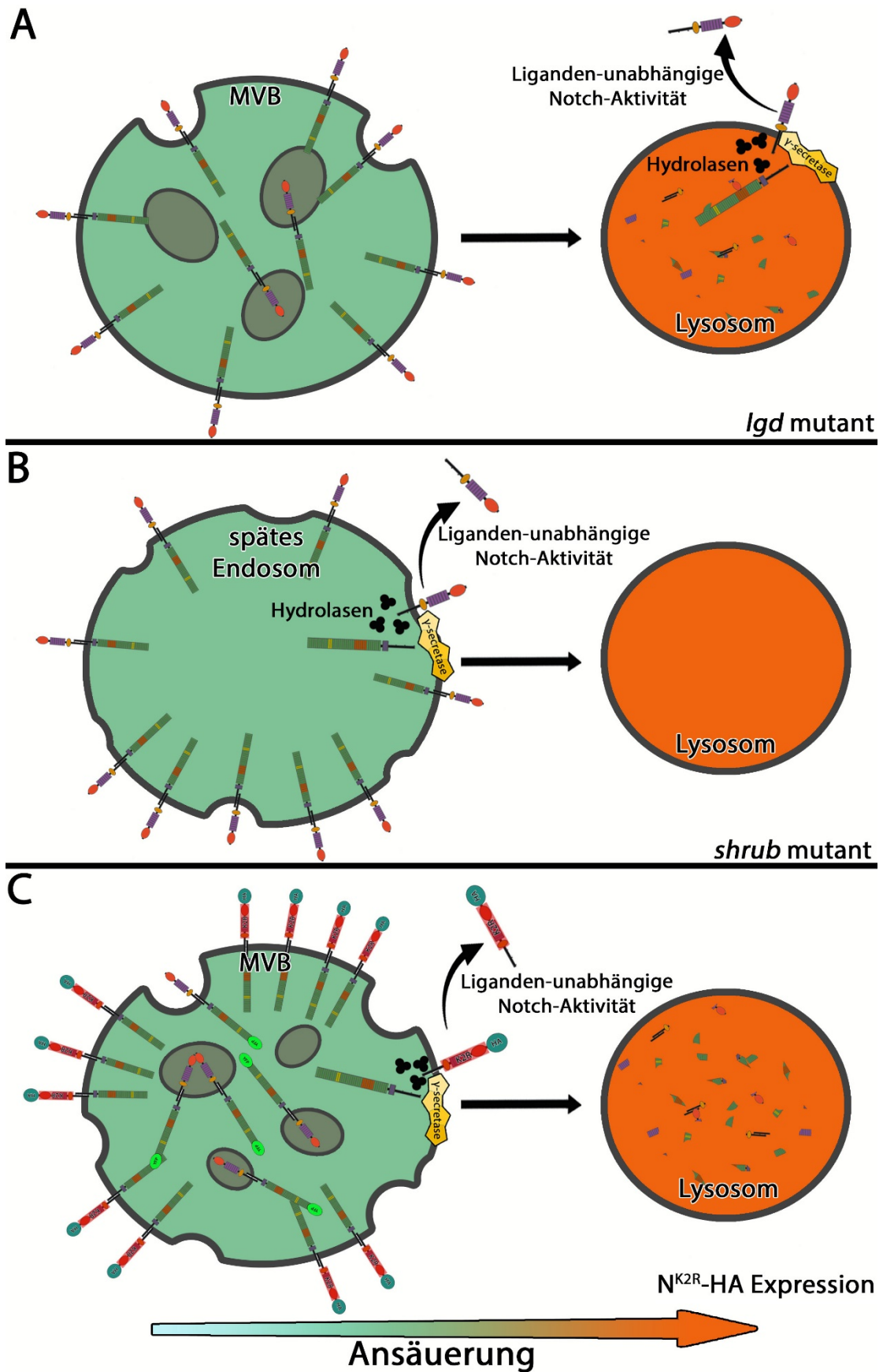


Abb. 41: Modell derer liganden-unabhängigen Aktivierung des Notch-Rezeptors am Endosom/Lysosom. Der Ausfall von *lgd* führt zu einer ektopischen Aktivierung des Notch-Signalweges. Die Aktivierung ist abhängig von der Fusion des späten Endosoms mit dem Lysosom. Der Ausfall von *lgd* kann die Bildung von ILVs nicht unterbrechen, könnte aber zu einer abgeschwächten Bildung von ILVs führen, wodurch es zu einer vermehrten Akkumulation des Notch-Rezeptors an der

limitierenden Membran von Endosomen kommt. Durch die Fusion mit dem Lysosom kommt es durch die sauren Hydrolasen zu einem alternativen „Ectodomain-shedding“ und der anschließenden Spaltung des Rezeptors durch den γ -Sekretase-Komplex. Die Spaltung des Rezeptors führt zu einer Freisetzung der intrazellulären Domäne von der lysosomalen Membran und einer Aktivierung der Notch-Zielgene (A). Durch den Ausfall von *shrub* kommt es zu einer ektopischen Aktivierung des Notch-Rezeptors die unabhängig von der Fusion des Endosoms mit dem Lysosom ist. Vermutlich führt der Ausfall von *shrub* zu einer Unterbrechung der ILV Bildung, die zu einer starken Akkumulation des Notch-Rezeptors an der limitierenden endosomalen Membran führt. Die starke Akkumulation des Notch-Rezeptors könnte zu einer Aktivierung führen, die bereits bei einer geringeren Ansäuerung des Kompartimentes ausgelöst wird (B). Die Expression von N^{K2R}-HA führt ebenfalls zu einer starken Akkumulation des Rezeptors an der limitierenden Membran, unterbricht aber nicht die Internalisierung des endogenen Rezeptors. Vergleichbar mit einem *shrub* Ausfall, kommt es zu einer Aktivierung des N^{K2R}-HA Rezeptors, die unabhängig von der Fusion des Endosoms mit dem Lysosom ist (C). Die Konzentration des Notch-Rezeptors an der limitierenden Membran könnte demzufolge entscheidend für eine Aktivierung am Endosom oder vom Lysosom sein.

In *lgd* Mutanten konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass die ektopische Notch-Aktivierung, im Gegensatz zu *shrub* mutanten Zellen, abhängig von der Fusion des späten Endosoms mit dem Lysosom ist (Schneider et al., 2013). Um zu testen, ob die Aktivität des N^{K2R}-HA Rezeptors abhängig von der Fusion des Endosoms mit dem Lysosom ist, wurden *trpml* mutante Flügelimagnalscheiben verwendet (3.10). Es konnte gezeigt werden, dass die ektopische Aktivierung in *lgd* Mutanten durch den Ausfall von *trpml* unterdrückt werden kann (Unveröffentlichte Daten Thomas Breuer). Der Ausfall von *trpml* hat allerdings keinen Einfluss auf die endogene Notch-Aktivität und auf die Aktivität von N-HA. Diese Beobachtung ist dadurch zu erklären, dass der endogene Rezeptor, sowie der N-HA Rezeptor liganden-abhängig aktiviert werden und die Aktivität der Rezeptoren somit unabhängig von der Fusion des Endosoms mit dem Lysosom ist. Die Expression von N^{K2R}-HA in *trpml* mutanten Imaginatscheiben führt weiterhin zu einer starken ektopischen Aktivierung des Signalweges. Diese Beobachtung legt nahe, dass die ektopische Aktivierung von N^{K2R}-HA unabhängig von der Fusion des Endosoms mit dem Lysosom ausgelöst wird und ist somit vergleichbar mit einer Notch-Aktivierung in *shrub* Mutanten.

Warum es zu unterschiedlichen Mechanismen der ektopischen Aktivierung des Notch-Rezeptors in *lgd* und *shrub* Mutanten kommt, ist bisher nicht im Detail geklärt. Da die Funktion des ESCRT-III Komplexes essentiell für die Bildung von ILVs ist, kann vermutet werden, dass es in *shrub* Mutanten zu einem Ausfall der ILV Bildung kommt. Dieser Effekt konnte bisher allerdings noch nicht gezeigt werden. In *lgd* mutanten Flügelimagnalscheiben kommt es hingegen weiterhin zu einer Bildung von ILVs in vergrößerten MVBs (Schneider et al., 2013). Es ist somit vorstellbar, dass es in *shrub* Mutanten durch eine vollständige Unterbrechung der ILV-Bildung im Vergleich zu *lgd* Mutanten zu einer stärkeren Akkumulation des Notch-Rezeptors an der limitierenden Membran kommt. Die verstärkte Akkumulation von Notch in *shrub* Mutanten könnte zu einer Aktivierung führen, die bereits bei einer geringeren Ansäuerung vom Endosom ausgelöst wird (Abb. 41 B). Da es in *lgd* Mutanten weiterhin zu der Bildung von ILVs kommt, ist zu vermuten, dass weiterhin ein Anteil des Rezeptors in ILVs verpackt wird und die Menge

des Rezeptors an der limitierenden Membran im Vergleich zu *shrub* Mutanten geringer ist. In diesem Fall wäre denkbar, dass es für die ektopische Aktivierung der geringeren Konzentration des Notch-Rezeptors an der limitierenden Membran eine stärkere Ansäuerung des Kompartimentes braucht und daher die Fusion mit dem sauren Lysosom essentiell ist (Abb. 41 A).

Die Unterschiede in der Notch-Aktivierung in *shrub* und *lgd* Mutanten könnten ebenfalls über eine Störung der endosomalen Reifung erklärbar sein. So besteht die Möglichkeit, dass die ILV Bildung erst abgeschlossen werden muss, bevor es zu einer Fusion mit dem sauren Lysosom kommt. In *shrub* Mutanten könnte dieser Mechanismus gestört sein und so zu einer permanenten Ansäuerung des späten Endosoms führen, welche die Aktivierung des Rezeptors vom Endosom auslöst. Für den N^{K2R}-HA Rezeptor konnte eine starke Akkumulation an der limitierenden Membran von Kompartimenten mit endosomalen Ursprung gezeigt werden. Wie bereits beschrieben kommt es auch in diesem Fall zu einer Aktivierung des Signalweges, die unabhängig von der Fusion des Endosoms mit dem Lysosom ausgelöst wird. Da es bei diesen Kompartimenten weiterhin zu einer Internalisierung des endogenen Notch-Rezeptors kommt, ist davon auszugehen, dass die ESCRT-Maschinerie weiterhin funktional ist, aber N^{K2R}-HA nicht erkannt und verpackt wird (Abb. 41 C). Die Experimente mit dem N^{K2R}-HA Rezeptor unterstützen daher eher die Theorie, dass die Menge des Notch-Rezeptors an der limitierenden Membran entscheidend für eine Aktivierung am Endosom oder Lysosom ist.

Um diese Hypothese weiter zu untersuchen, könnte in Folgeexperimenten die Menge des N^{K2R}-HA Rezeptors durch kürzere Expressionszeiten an der limitierenden Membran reduziert werden. Sollte es in diesem Fall zu einer Unterbrechung der Aktivierung in *trpml* Mutanten kommen, aber eine ektopische Aktivierung in wildtypischen Imaginalscheiben weiterhin bestehen, wäre das ein weiterer Beleg dafür, dass die Menge des Notch-Rezeptors an der limitierenden Membran entscheidend für die Aktivierung am Endosom oder am Lysosom ist.

4.1.2 Auswirkungen von Dx und Su(dx) auf die endosomale Lokalisation und die Aktivität des Notch-Rezeptors

Neben der Einleitung der Endozytose des Notch-Rezeptors, wird für Dx und Su(dx) eine weitere Funktion in der Regulation des Notch-Signalweges beschrieben. Es konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von Dx zu einer Akkumulation des Notch-Rezeptors an der limitierenden Membran von Endosomen führt. Im Gegensatz dazu führt die Koexpression von Dx und Su(dx)

zu einer verstärkten Akkumulation des Notch-Rezeptors im Inneren von endosomalen Kompartimenten. Darüber hinaus kommt es durch die Expression von Dx zu einer ektopischen Aktivierung des Notch-Rezeptors am Lysosom. Durch die Koexpression von Dx und Su(dx) kommt es hingegen zu einer Unterdrückung der Dx induzierten Notch-Aktivität (Shimizu et al., 2014; Wilkin et al., 2008). Es wird vermutet, dass die durch Dx ausgelöste verstärkte Akkumulation des Notch-Rezeptors an der limitierenden endosomalen Membran im Zusammenhang mit der ektopischen Aktivierung des Signalweges steht. Die Unterdrückung der Dx induzierten Notch-Aktivität durch Su(dx) lässt sich im Umkehrschluss vermutlich auf die verstärkte Internalisierung des Notch-Rezeptors in das Lumen endosomaler Kompartimente erklären (Shimizu et al., 2014; Wilkin et al., 2008). Da sowohl Dx als auch Su(dx) die Akkumulation des Notch-Rezeptors an der Membran von endosomalen Kompartimenten beeinflussen, stellt sich die Frage nach dem Mechanismus der diese Effekte auslöst.

Die unterschiedliche Funktion von Dx und Su(dx) bei der Regulation der Internalisierung des Notch-Rezeptors in das endosomale Lumen könnte durch verschiedene Formen der Ubiquitinierung des Notch-Rezeptors erklärt werden.

So wurde für Dx eine Monoubiquitinierung des Notch-Rezeptors beschrieben (Hori et al., 2011). Auch für Su(dx) konnte eine Ubiquitinierung des Notch-Rezeptors nachgewiesen werden (Shimizu et al., 2014). Die genaue Form der Ubiquitinierung wurde bisher nicht beschrieben. Durch Untersuchungen an einer weiteren E3-Ligase der Nedd4-Familie (DNedd4) konnte allerdings gezeigt werden, dass DNedd4 eine Notch-Ubiquitinierung auslöst, die zu einem proteasomalen Abbau des Rezeptors führt. Der proteasomale Abbau wird in der Regel durch eine Polyubiquitinierung der Proteine ausgelöst. Diese Beobachtung führt zu der Hypothese, dass DNedd4 den Notch-Rezeptor polyubiquitiniert (Sakata et al., 2004). DNedd4 und Su(dx) sind strukturell sehr ähnlich und lösen vergleichbare Effekt auf den Notch-Rezeptor aus (Sakata et al., 2004; Wilkin et al., 2004). Es ist daher zu vermuten, dass auch Su(dx) eine Polyubiquitinierung des Rezeptors auslöst.

Da die ESCRT-Maschinerie die endosomale Fracht, welche in ILVs verpackt werden soll über die Kopplung von Ubiquitin erkennt, könnte es einen Zusammenhang zwischen verschiedenen Formen der Notch-Ubiquitinierung und der Funktion der ESCRT-Maschinerie geben. Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen der Funktion von Dx und der ESCRT-III Komponente Shrub konnten bereits in einer vorherigen Veröffentlichung gezeigt werden. So führt die Koexpression von Shrub und Dx zu einer Unterdrückung der Dx induzierten ektopischen Notch-Aktivierung.

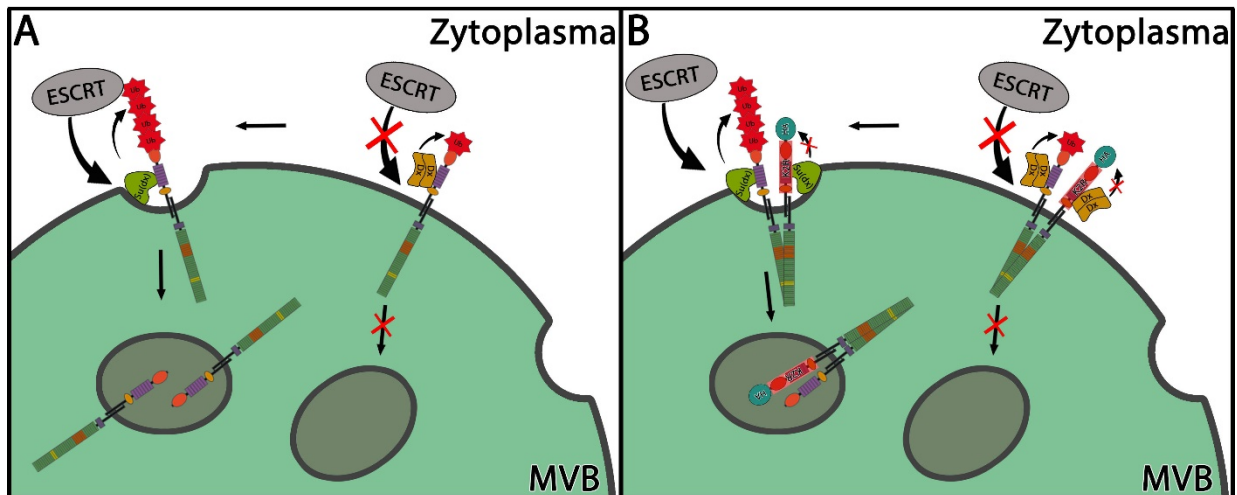


Abb. 42: Modell einer ubiquitinierungs-abhängigen Internalisierung des Notch-Rezeptors in ILVs durch Dx und Su(dx). In diesem Modell führt Su(dx) zu einer Polyubiquitinierung des Notch-Rezeptors. Die Polyubiquitin-Kette kann von der ESCRT-Maschinerie erkannt werden und führt zu einer Internalisierung des Notch-Rezeptors in ILVs. Dx führt zu einer Monoubiquitinierung des Notch-Rezeptors. Monoubiquitinierungen können von der ESCRT-Maschinerie schlechter erkannt werden und führen zu einer Unterdrückung der Internalisierung des Notch-Rezeptors durch die ESCRT-Maschinerie (A). Durch die Koexpression von N^{K2R} -HA und Su(dx) konnte eine vermehrte Internalisierung des N^{K2R} -HA Rezeptors beobachtet werden. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung könnte eine Dimerisierung des endogenen Rezeptors mit dem N^{K2R} -HA Rezeptors sein. Durch die Überexpression von Su(dx) könnte es zu einer starken Polyubiquitinierung des endogenen Rezeptors kommen. Ein Dimer aus dem endogenen und dem N^{K2R} -HA Rezeptors könnte über die Polyubiquitin-Kette des endogenen Rezeptors von der ESCRT-Maschinerie erkannt werden. Auf diese Weise würde der N^{K2R} -HA Rezeptor als sekundäre Fracht in ILVs verpackt werden. Die Koexpression von Dx und N^{K2R} -HA führte weiterhin zu einer starken Akkumulation des N^{K2R} -HA Rezeptors an der limitierenden Membran. Da Dx zu einer Monoubiquitinierung des endogenen Rezeptors führt, kommt es auch durch eine Dimerisierung mit dem N^{K2R} -HA Rezeptors zu keiner Erkennung durch die ESCRT-Maschinerie und einem Verbleib der Rezeptoren an der limitierenden Membran (B).

Umgekehrt führt die Koexpression einer *shrub*-RNAi und Dx zu einer deutlich verstärkten ektopischen Notch-Aktivierung. Dabei wird vermutet, dass Shrub zu einer Internalisierung des polyubiquitinierten Notch-Rezeptors in ILVs führt. Dx fördert in diesem Modell hingegen die Monoubiquitinierung des Rezeptors, der in Folge dessen nicht durch Shrub internalisiert werden kann und eine ektopische Aktivierung auslöst (Hori et al., 2011).

In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass der ESCRT-0 Komplex eine hohe Affinität zu polyubiquitinierten Fracht hat (Ren and Hurley, 2010). In einem Modell, in dem Su(dx) den Notch-Rezeptor polyubiquitiniert und Dx zu einer Monoubiquitinierung des Rezeptors führt, können die Effekte der E3-Ligasen auf die Notch-Internalisierung von der endosomalen Membran und die Beeinflussung der Aktivierung des Notch-Signalweges erklärt werden. Dx würde in diesem Modell eine Monoubiquitinierung auslösen, die nicht von der ESCRT-Maschinerie erkannt werden kann. In Folge dessen würde es zu einer Akkumulation des Rezeptors an der limitierenden Membran kommen und eine ektopische Notch-Aktivierung ausgelöst werden. Su(dx) würde zu einer Polyubiquitinierung des Rezeptors führen. Die Polyubiquitin-Kette würde von der ESCRT-Maschinerie erkannt werden, zu einer Internalisierung des Rezeptors in das endosomale Lumen führen und so eine Unterdrückung der Notch-Aktivierung am Endosom/Lysosom auslösen (Abb. 42 A).

In dieser Arbeit konnte bestätigt werden, dass der Notch-Rezeptor sowohl durch Dx, als auch durch Su(dx) ubiquitiniert wird. Hingegen führt der Austausch der intrazellulären Lysine des Rezeptors zu einer Unterdrückung der Ubiquitinierung durch Dx und Su(dx) (3.11.1). Es ist daher davon auszugehen, dass Dx und Su(dx) den Notch-Rezeptor an den intrazellulären Lysinen ubiquitinieren und es nicht zu Ubiquitinierungen an alternativen Aminosäuren kommt. Eine Beeinflussung des N^{K2R}-HA Rezeptors durch Dx und Su(dx) vermittelte Ubiquitinierungen kann aus diesem Grund ausgeschlossen werden.

Um eine mögliche ubiquitinierungs-unabhängige Funktion von Dx und Su(dx) bei der Regulation der endosomale Lokalisation des Notch-Rezeptors zu testen, wurden in dieser Arbeit die E3-Ligasen und N-HA oder N^{K2R}-HA koexprimiert und die Lokalisation der Rezeptoren an der Vesikelmembran analysiert (3.11.3). Die Expression von N-HA führte zu Vesikeln, bei denen der Notch-Rezeptor sich größtenteils im Lumen befindet. Durch die Koexpression von N-HA und Dx konnten vereinzelt Vesikel beobachtet werden, bei denen N-HA sich an der limitierenden Membran befindet und weniger stark im Lumen vertreten ist. Darüber hinaus führt die Koexpression zu einer verstärkten Notch-Aktivität. Die Koexpression von N-HA und Su(dx) führt zu Vesikeln bei denen sich N-HA weiterhin im Lumen der Vesikel befindet. Es kommt allerdings zu einer Unterdrückung der N-HA Aktivität (3.11.4). Durch diese Experimente kann bestätigt werden, dass Dx tendenziell zu einer vermehrten Akkumulation des Rezeptors an der limitierenden Membran führt und eine verstärkte Aktivierung des Notch-Signalweges auslöst. Das Su(dx) zu einer vermehrten Akkumulation des Rezeptors im Lumen der Vesikel führt, ist anhand dieses Experimentes nicht zu erkennen, da sich der N-HA Rezeptor bereits ohne die Su(dx) Expression im Lumen der Vesikel befindet. Dennoch kommt es zu einer Unterdrückung der N-HA Aktivität, die für eine verstärkte Internalisierung des Rezeptors spricht. Die Effekte der E3-Ligasen auf N-HA lässt sich daher größtenteils mit dem beschriebenen Modell vergleichen.

Die Expression von Dx zeigte keine Veränderung der Lokalisation von N^{K2R}-HA an der limitierenden Vesikelmembran und führt darüber hinaus ebenfalls zu keiner Veränderung der ektopischen Aktivierung durch N^{K2R}-HA. Hingegen konnte gezeigt werden, dass es durch die Expression von Su(dx) zu N^{K2R}-HA positiven Vesikeln kommt, die über eine verstärkte Lokalisation des Rezeptors im Lumen verfügen. Des Weiteren kommt es zu einer leichten Abschwächung der ektopischen Aktivierung des Signalweges. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass Su(dx) die Internalisierung des Notch-Rezeptors über einen ubiquitinierungs-unabhängigen Mechanismus in das Lumen von Endosomen steuern könnte. Es muss allerdings beachtet

werden, dass die Unterdrückung der Aktivität eher gering ist und bei den Vesikeln weiterhin ein Lumen zu erkennen ist, das lediglich schwächer ausgeprägt ist. Die Effekte von Su(dx) auf den N^{K2R}-HA Rezeptor sind daher eher gering und sprechen gegen einen starken ubiquitinierungs-unabhängigen Mechanismus.

Eine mögliche Erklärung für den beobachteten Effekt könnten Abweichungen bei der Messung des Fluoreszenzsignals der Vesikel sein. Eine besser geeignete Methode um die Konzentration des Rezeptors an der limitierenden Membran zu analysieren, wären Immunogold-Färbungen des Rezeptors und anschließende elektronenmikroskopische Analysen.

Abweichungen in der Fluoreszenzintensitätsmessung erklären allerdings nicht die unterdrückte Aktivierung des N^{K2R}-HA Rezeptors. Hier ist zu beachten, dass die Expression von Su(dx) ebenfalls zu einer leichten Unterdrückung der endogenen Notch-Aktivität führt. Da die Einflüsse der Aktivierung des endogenen und des transgenen Rezeptors nicht unterschieden werden können, könnte der Effekt einer abgeschwächten N^{K2R}-HA Aktivität auf die Unterdrückung der Aktivität des endogenen Rezeptors zurückzuführen sein. Allerdings fällt die Unterdrückung der endogenen Notch-Aktivität durch Su(dx) im Vergleich zu der Unterdrückung der N^{K2R}-HA Aktivität deutlich geringer aus (3.11.4).

Eine weitere Erklärung für den beobachteten Effekt könnte eine Interaktion zwischen dem transgenen und dem endogenen Rezeptor sein. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Expression von transgenen Notch-Rezeptoren zu einer verstärkten Akkumulation des endogenen Rezeptors in Vesikeln führt. Hingegen konnte dieser Effekt durch die Expression des Transmembranproteins Smo nicht beobachtet werden (3.7). Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass es zu einer spezifischen Interaktion zwischen dem endogenen Rezeptor und dem transgenen Rezeptor kommt und die Beobachtungen nicht auf einen unspezifischen Effekt durch die Überexpression von Transmembranproteinen zurückzuführen sind.

In vorherigen Veröffentlichungen konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass sowohl der *Drosophila* Notch, als auch der humane N1-Rezeptor über die EGF-Wiederholungen Homodimere bilden können (Kelly et al., 2010; Sakamoto et al., 2005; Vooijs et al., 2004). Es ist daher sehr wahrscheinlich, dass es zu einer Dimerisierung zwischen dem endogenen Rezeptor und den transgenen Konstrukten kommt. In diesem Zusammenhang wäre vorstellbar, dass der endogene Notch-Rezeptor mit dem N^{K2R}-HA Rezeptor Dimere an der limitierenden endosomalen Membran bildet. Der endogene Notch-Rezeptor könnte in diesem Fall durch Su(dx) polyubiquitiniert und von der ESCRT-Maschinerie erkannt werden. Durch die Dimerisierung könnte der N^{K2R}-HA Rezeptor als sekundäre Fracht in ILVs verpackt werden und von der limitierenden Membran entfernt werden. Somit wäre erklärbar, dass es zu einer leichten

Internalisierung des N^{K2R}-HA Rezeptors kommt und in Folge dessen die Aktivität unterdrückt wird (Abb. 42 B). Ein möglicher Zusammenhang zwischen der Rezeptordimerisierung und der Funktion von Su(dx) sollte allerdings in Folgeexperimenten näher untersucht werden.

Bei dem gezeigten Modell handelt es sich zudem um eine stark vereinfachte Darstellung, die sich ausschließlich auf Dx und Su(dx) beschränkt. In weiteren Experimenten sollten daher ebenfalls die Funktionen von Krz und Dnedd4 auf die Aktivität und die Lokalisation von N^{K2R}-HA untersucht werden. Für beide Proteine konnte ebenfalls ein Einfluss auf die Notch-Ubiquitinierung nachgewiesen werden (Mukherjee et al., 2005; Sakata et al., 2004; Wilkin et al., 2004). Zudem sollten in weiteren Experimenten die Auswirkungen eines Dx und Su(dx) Ausfalls auf die Lokalisation und die Aktivität von N^{K2R}-HA geprüft werden.

Die physiologische Funktion einer Rezeptordimerisierung wurde bisher noch nicht *in vivo* gezeigt. Es wäre daher auch interessant zu untersuchen, welche Funktion die Rezeptordimerisierung im Notch-Signalweg einnimmt.

4.1.3 Auswirkungen von N^{ΔEGF(11-12)}-HA und N^{ΔEGF(11-12)-K2R}-HA auf die Aktivität des Notch-Signalweges

Um eine liganden-abhängige Aktivierung von N-HA und N^{K2R}-HA zu unterdrücken wurden in dieser Arbeit die Konstrukte N^{ΔEGF(11-12)}-HA und N^{ΔEGF(11-12)-K2R}-HA hergestellt (3.3). Da N-HA zu einer liganden-abhängigen und N^{K2R}-HA zu einer starken liganden-unabhängigen Aktivierung führt, wäre zu erwarten, dass die liganden-abhängige Aktivierung von N-HA durch die Deletion der EGF-Wiederholungen unterdrückt wird. Hingegen sollte die liganden-unabhängige Aktivität von N^{K2R}-HA nicht durch die Deletion beeinflusst werden. Entgegen den Erwartungen führt die Expression von N^{ΔEGF(11-12)}-HA zwar zu keiner deutlichen Aktivierung des Signalweges mehr, unterdrückt allerdings die endogene Notch-Aktivität. Darüber hinaus kommt es durch die Expression von N^{ΔEGF(11-12)-K2R}-HA zu keiner starken ektopischen Aktivierung des Signalweges mehr. Bei beiden Rezeptoren konnte eine nicht-zellautonome Aktivierung von einem Zelldurchmesser an der Grenze der Expressionsdomäne festgestellt werden. Für diese Beobachtung gibt es zwei mögliche Erklärungen. Zum einen besteht die Möglichkeit, dass es durch die Deletion der EGF-Wiederholungen 11 und 12 zu einer Unterdrückung der *trans*-Interaktion kommt, aber die *cis*-Interaktion zwischen dem Rezeptor und den Liganden weiterhin besteht. Es konnte bisher nicht aufgeklärt werden, ob sowohl die *trans*-Interaktion, als auch die *cis*-Interaktion über die EGF-Wiederholungen 11 und 12 vermittelt werden, oder ob die *cis*-Interaktion über andere EGF-Wiederholungen des Rezeptors ausgelöst wird (Übersicht in

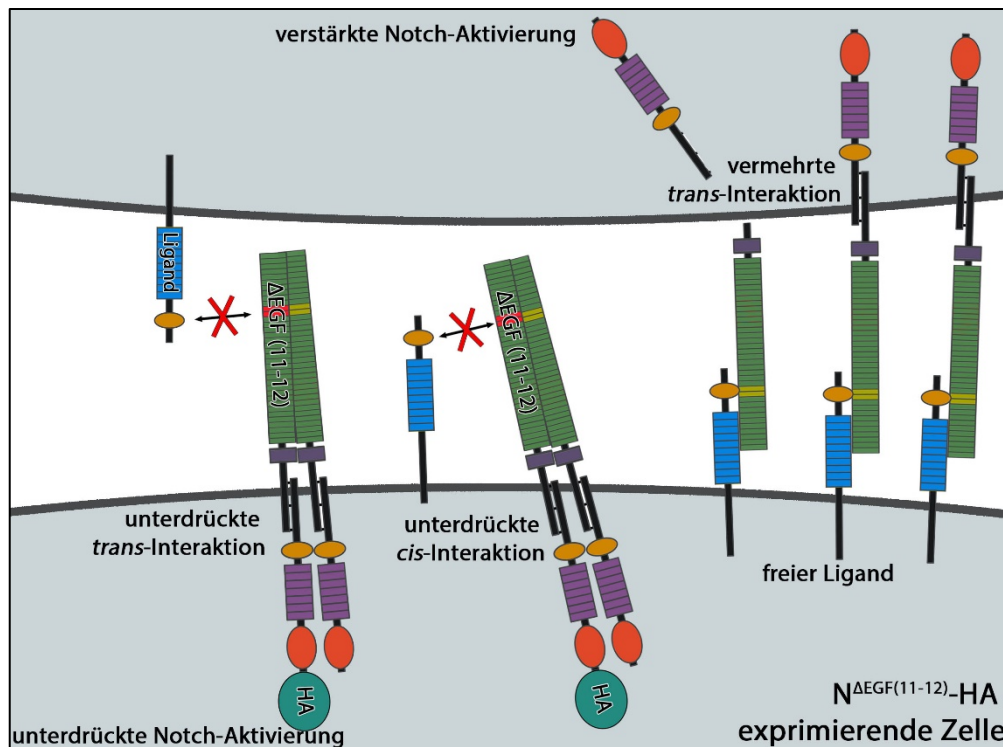


Abb. 43: Modell der Auswirkungen des N^{ΔEGF(11-12)}-HA Rezeptors auf die Aktivität des Notch-Signalweges. Die EGF-Wiederholungen 11 und 12 werden für die Interaktion mit den Liganden benötigt. Durch die Expression des N^{ΔEGF(11-12)}-HA Rezeptors kommt es zu einer Unterdrückung der endogenen Notch-Aktivität. Außerhalb der Expressionsgrenze kommt es zu einer nicht-zellautonomen Aktivierung des Notch-Signalweges. Eine Dimerisierung des endogenen mit dem N^{ΔEGF(11-12)}-HA Rezeptor könnte zu einem Rezeptorkomplex führen, bei dem sowohl die *cis*-, als auch die *trans*-Interaktion mit den Liganden unterdrückt wird. Durch eine Unterdrückung der *cis*-Interaktion könnte mehr Ligand zur Verfügung stehen, der mit dem endogenen Notch-Rezeptor außerhalb der Expressionsdomäne in *trans* binden könnte und in diesen Zellen eine verstärkte Notch-Aktivität auslöst. Gleichzeitig könnte eine unterdrückte *trans*-Interaktion zwischen den Liganden außerhalb der Expressionsdomäne und dem Rezeptorkomplex innerhalb der Expressionsdomäne zu einer unterdrückten Notch-Aktivierung führen.

(Baron, 2017)). Sollte es weiterhin zu einer *cis*-Interaktion zwischen den Liganden und den EGF-Deletionskonstrukten kommen, so könnte die Unterdrückung der Notch-Aktivität in der Expressionsdomäne durch eine *cis*-Inhibition des Signalweges erklärt werden. Dieses Modell liefert aber keine Erklärung für die ektopische Aktivierung außerhalb der Expressionsdomäne.

In einem Modell, in dem sowohl die *trans*-, als auch die *cis*-Interaktion unterdrückt wird, könnten die Beobachtung durch eine Rezeptordimerisierung erklärt werden. Sollte es zu einer Interaktion zwischen dem endogenen und den EGF-mutanten Rezeptoren kommen, so wäre denkbar, dass ein solcher Komplex nicht mehr mit den Liganden interagieren kann. In Folge dessen würde die *cis*-Interaktion zwischen den Rezeptoren und den Liganden in der Expressionsdomäne unterdrückt werden. Gleichzeitig würde die *trans*-Interaktion zwischen den Liganden der benachbarten Zellen außerhalb der Expressionsdomäne und dem Rezeptorkomplex innerhalb der Expressionsdomäne ebenfalls unterdrückt werden. Durch die Unterdrückung der *cis*-Interaktion wäre denkbar, dass mehr Liganden zur Verfügung stünden um den Rezeptor außerhalb der

Expressionsdomäne zu aktivieren. Eine unterdrückte *trans*-Interaktion zwischen dem Rezeptorkomplex in der Expressionsdomäne und den Liganden der benachbarten Zellen könnte zudem eine Unterdrückung der endogenen Notch-Aktivität erklären (Abb. 43). Beide Modelle erklären allerdings nicht warum es ebenfalls zu einer Unterdrückung der starken liganden-unabhängigen Aktivierung des N^{K2R}-HA Rezeptors kommt.

Anhand von Zellkulturexperimenten konnte festgestellt werden, dass die generelle Aktivierung der EGF-Mutanten abgeschwächt ist. Besonders die Aktivität des N^{ΔEGF(11-12)-K2R}-HA Rezeptors ist im Vergleich zu N^{K2R}-HA deutlich reduziert und könnte die Unterdrückung der ektopischen Aktivierung in Flügelimaginalscheiben erklären. Es ist vorstellbar, dass es durch die Deletion der EGF-Wiederholungen zu einer strukturellen Instabilität der Konstrukte kommt. Für die Analyse der liganden-unabhängigen Aktivierung des N^{K2R}-HA Rezeptors eignen sich diese Konstrukte daher nicht.

Es konnte gezeigt werden, dass die Expression eines Notch-Konstruktes das über keine EGF-Wiederholungen verfügt (N^{ΔEGF}) nur zu einer schwachen Unterdrückung der endogenen Notch-Aktivität führt. Durch die Expression in *lgd* mutanten Imaginalscheiben konnte im Gegensatz eine verstärkte ektopische Aktivierung festgestellt werden (Schneider et al., 2013). Das N^{ΔEGF}-Konstrukt lässt sich daher liganden-unabhängig, aber nicht liganden-abhängig aktivieren. Um die liganden-unabhängige Aktivierung von N^{K2R}-HA in zukünftigen Experimenten detaillierter zu untersuchen, wäre es daher hilfreich Konstrukte herzustellen, bei denen die gesamten EGF-Wiederholungen der Rezeptoren deletiert sind.

4.1.4 Untersuchung des Abbaus der intrazellulären Domäne des Notch-Rezeptors im Zellkern

Anhand eines Western Blots konnte gezeigt werden, dass es im Vergleich zu N-HA zu einer verstärkten Akkumulation der intrazellulären Domäne des N^{K2R}-HA Rezeptors kommt (3.2). Um die Auswirkungen der intrazellulären Domäne zu testen, wurden in dieser Arbeit die Konstrukte NICD-HA und NICD^{K2R}-HA hergestellt (3.6). Beide Konstrukte lokalisierten ausschließlich im Zellkern. In Zusammenarbeit mit Marvin Lyga (Lyga, 2016) konnte gezeigt werden, dass es im Vergleich zu NICD-HA zu einer längeren Halbwertszeit von NICD^{K2R}-HA im Zellkern kommt (3.6.1). Diese Beobachtungen legen nahe, dass der Abbau von NICD^{K2R}-HA im Zellkern verzögert ist. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass NICD^{K2R}-HA im Vergleich zu NICD-HA eine stärkere Notch-Aktivierung auslöst. Der Unterschied der Aktivierung scheint allerdings

im Vergleich zu den „full length“ Rezeptoren geringer auszufallen. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass die ektopische Aktivierung von N^{K2R}-HA auf zwei Effekte zurückzuführen ist. Zum einen scheint N^{K2R}-HA verstärkt an der limitierenden endosomalen Membran aktiviert zu werden, was zu einem vermehrten Eintritt von NICD^{K2R}-HA in den Zellkern führt und eine starke Aktivierung der Zielgene auslöst. Zum anderen scheint der verzögerte Abbau von NICD^{K2R}-HA im Zellkern die Aktivierung der Zielgene weiter zu verstärken.

In vorherigen Veröffentlichungen konnte gezeigt werden, dass die Regulation des Abbaus von NICD im Zellkern abhängig von der PEST-Domäne ist (Fryer et al., 2004; Gupta-Rossi et al., 2001; Oberg et al., 2001). Dabei kommt es zu Hyperphosphorylierungen an Serinen der PEST-Domäne durch CDK8. In Folge dessen kommt es zu einer Ubiquitinierung von NICD durch das Protein Fbw7. Die Kombination aus der Hyperphosphorylierung und der anschließenden Ubiquitinierung durch Fbw7 löst einen proteasomalen Abbau der intrazellulären Domäne des Notch-Rezeptors aus. Die Untersuchungen des proteasomalen Abbaus der intrazellulären Domäne des Notch-Rezeptors wurden hauptsächlich anhand von Zellkulturexperimenten in Säugerzellen durchgeführt.

Der verzögerte Abbau von NICD^{K2R}-HA deutet darauf hin, dass die Ubiquitinierung von NICD auch in *Drosophila* für den proteasomalen Abbau benötigt wird. Der Abbaufekt des NICD^{K2R}-HA Rezeptors wurde im Verlauf der Masterarbeit von Marvin Lyga näher untersucht (Lyga, 2016). Dabei konnten Hinweise auf eine Beteiligung der *Drosophila* Orthologe Archipelago (Ortholog zu humanem Fbw7) und CDK8 auf einen Abbau der NICD aufgezeigt werden. Um den Abbaufekt im Zellkern zu unterdrücken, sollte im Verlauf der Bachelorarbeit von Denise Isenburg (Isenburg, 2018) ein Rezeptor hergestellt werden, bei dem das letzte Arginin am C-Terminus in der Nähe der PEST-Domäne des N^{K2R}-HA Rezeptors in ein Lysin zurückgetauscht wird. Durch die Nähe zur PEST-Domäne wurde vermutet, dass es sich hierbei um das Lysin handeln, das entscheidend für die Ubiquitinierung und den anschließenden proteasomalen Abbau der intrazellulären Domäne ist. Die Herstellung des Rezeptors war allerdings nicht erfolgreich. Es konnte daher nicht getestet werden, ob der Abbaufekt durch den Rücktausch des Lysins unterdrückt werden kann.

Um in Folgeexperimenten sowohl die Beeinflussung einer liganden-abhängigen Aktivierung des N^{K2R}-HA Rezeptors, sowie eine Beeinflussung des Abbaufektes von NICD^{K2R}-HA im Zellkern zu unterdrücken, wäre es vorstellbar einen N^{K2R}-HA Rezeptor herzustellen, der über keine EGF-Wiederholungen verfügt und bei dem das C-terminale Lysin zurückgetauscht wird.

Mit Hilfe eines solchen Rezeptors könnte vermutlich ausschließlich die ektopische liganden-unabhängige Aktivierung von der limitierenden Membran des Endosoms untersucht werden.

4.2 Regulation der Endozytose des Notch-Rezeptors

Die Endozytose des Notch-Rezeptors kann clathrin-abhängig und unabhängig erfolgen. Dabei konnte gezeigt werden, dass die clathrin-abhängige Endozytose des Notch-Rezeptors durch die Ubiquitinligase Dx eingeleitet wird (Shimizu et al., 2014). Umgekehrt zeigt der Ausfall von *dx* eine verminderte Internalisierung des Notch-Rezeptors von der apikalen Membran (Yamada et al., 2011). *Su(dx)* führt hingegen zu einer Notch-Endozytose, die über GPI und Cholesterol angereicherte Membrandomänen gewährleistet wird. Diese Form der Notch-Endozytose ist clathrin-unabhängig (Shimizu et al., 2014).

In weiteren Studien konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von *Su(dx)* mit nichtfunktionaler HECT-Domäne weiterhin zu einer verstärkten Endozytose des Notch-Rezeptors führt (Shimizu et al., 2014; Wilkin et al., 2004). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Deletion der RING-Domäne von Dx zwar zu einer Unterdrückung der Funktion führt, aber durch einen Austausch gegen die Dimerisierungsdomäne GST gerettet werden kann. Dieses Ergebnis spricht dafür, dass nicht die Ubiquitinierung des Notch-Rezeptors, sondern die Oligomerisierung von Dx wichtig für die Funktion ist (Matsuno et al., 2002).

Anhand eines „pulse-chase“ Assays konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass N^{K2R} -HA nicht nur lysin-unabhängig sekretiert und zur apikalen Membran transportiert wird, sondern vergleichbar mit N-HA dem endosomalen Transportweg zugeführt wird (3.5). Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass Notch auch ohne die intrazellulären Lysine und die Ubiquitinierung durch Dx und *Su(dx)* endozytiert und transportiert werden kann. Eine ubiquitinierungs-unabhängige Endozytose scheint auch im N1-Rezeptor konserviert zu sei (Zheng and Conner, 2018).

Durch die Überexpression von Dx konnte in dieser Arbeit bestätigt werden, dass Dx zu einer Endozytose des endogenen Notch-Rezeptors von der apikalen Membran führt (Hori et al., 2004). Bei *Su(dx)* konnte hingegen keine verstärkte Endozytose des endogenen Notch-Rezeptors beobachtet werden. Selbst durch eine konstitutive Überexpression von *Su(dx)* auf 29°C konnten keine Effekte auf die apikale Lokalisation des endogenen Notch-Rezeptors beobachtet werden (3.11.2). Im Gegensatz dazu konnte in einer vorherigen Veröffentlichung gezeigt werden, dass die GAL4 induzierte Überexpression von *Su(dx)* auf 29°C in Zellklonen in der

Flügelimaginalscheibe zu einer leicht verstärkten Vesikel-Akkumulation des endogenen Notch-Rezeptors führt. Die Expression auf 25°C zeigte hingegen keine Effekte (Wilkin et al., 2004). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass homozygot mutante *Su(dx)* Zellklone zwar Auswirkungen im Follikelepithel haben, aber keine veränderte Lokalisation des Notch-Rezeptors in der Flügelimaginalscheibe zeigen (Wilkin et al., 2004). Eine deutliche Beeinflussung der Notch-Endozytose durch *Su(dx)* konnte bisher nur anhand von Zellkulturexperimenten beobachtet werden (Shimizu et al., 2014). Demzufolge scheint *Su(dx)* im Vergleich zu *Dx* bei der Endozytose des endogenen Notch-Rezeptors von der apikalen Membran der Flügelimaginalscheibe eine untergeordnete Rolle einzunehmen.

4.2.1 Auswirkungen von *Dx* und *Su(dx)* auf die Endozytose von N-HA und N^{K2R}-HA

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es durch die Expression der transgenen Rezeptoren für 14,5h Stunden sowohl bei N-HA als auch bei N^{K2R}-HA zu einer deutlichen Akkumulation der Rezeptoren an der apikalen Membran kommt. Der N^{K2R}-HA Rezeptor kann dabei stärker an der subapikalen Membran beobachtet werden. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass der Austausch der Lysine möglicherweise einen leichten Effekt auf die Endozytose von der subapikalen Membran hat, aber nicht zu einer Unterbrechung der Endozytose führt. Durch die Messungen des Verhältnisses des apikalen zum basalen Fluoreszenzsignals konnte darüber hinaus eine stärkere apikale Lokalisation bei dem N-HA Rezeptors beobachtet werden (3.11.2). Dieser Effekt ist vermutlich auf die starke basale Vesikelakkumulation des N^{K2R}-HA Rezeptors zurückzuführen.

Um die Effekte von *Dx* und *Su(dx)* auf den N^{K2R}-HA Rezeptor zu untersuchen wurden die Rezeptoren N-HA und N^{K2R}-HA mit *Dx* und *Su(dx)* koexprimiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Expression von *Dx* zu einer deutlichen Reduzierung der Lokalisation an der apikalen Membran und einer vermehrten Bildung von N-HA positiven Vesikeln führt. Dieser Effekt lässt sich auch durch die Überexpression von *Su(dx)* beobachten, ist allerdings schwächer ausgeprägt. Darüber hinaus führt die Überexpression von *Dx* ebenfalls bei N^{K2R}-HA zu einer deutlich reduzierten Lokalisation an der apikalen Membran. Ein ähnlicher Effekt konnte auch durch die Überexpression von *Su(dx)* gezeigt werden, ist aber auch in diesem Fall schwächer ausgeprägt (3.11.2). Die Ergebnisse zeigen, dass sowohl *Dx*, als auch *Su(dx)* fähig sind den N^{K2R}-HA Rezeptor von der apikalen Membran zu endozytieren. Diese Beobachtungen legen nahe, dass die Ubiquitinierung des Notch-Rezeptors durch *Dx* und *Su(dx)* nicht essentiell für die Endozytose

des Rezeptors von der apikalen Membran ist. Dx und Su(dx) scheinen demzufolge einen ubiquitinierungs-unabhängigen Mechanismus der Notch-Endozytose auszulösen. Darüber hinaus zeigen die Ergebnisse, dass die Überexpression von Su(dx) zwar keinen identifizierbaren Einfluss auf die Endozytose des endogenen Rezeptors hat, aber durch die zusätzliche Expression der transgenen Rezeptoren zu einer verstärkten Endozytose und Vesikelbildung führt.

Ähnliche Beobachtungen konnten ebenfalls in einer vorherigen Veröffentlichung gemacht werden (Wilkin et al., 2004). Auch in diesem Fall führt die gleichzeitige Überexpression von Su(dx) und Notch zu einer deutlich vermehrten Bildung von Notch-positiven Vesikeln.

Es scheint daher weniger die Menge des Su(dx) Proteins entscheidend für die Einleitung der Endozytose zu sein, sondern die Menge des Notch-Rezeptors. Es ist vorstellbar, dass speziell Su(dx) einen Mechanismus der Endozytose auslöst, der auf hohe Konzentrationen des Notch-Rezeptors an der apikalen Membran reagiert. Dx scheint hingegen zu einer generellen, konzentrations-unabhängigen Endozytose des Notch-Rezeptors zu führen.

Die Auswirkungen der Su(dx) vermittelten Notch-Endozytose sollten daher näher untersucht werden. Um die Fragestellung einer möglichen konzentrations-abhängigen Endozytose durch Su(dx) detaillierter zu untersuchen, wäre es denkbar, die Genkopien des Notch-Rezeptors bei gleichzeitiger Überexpression von Su(dx) zu erhöhen. Dies könnte mit Hilfe von N-BAC Konstrukten durchgeführt werden.

4.2.2 Modell einer ubiquitinierungs-unabhängigen Notch-Endozytose durch Dx und Su(dx)

Da sowohl Dx, als auch Su(dx) eine ubiquitinierungs-unabhängige Endozytose des N^{K2R}-HA Rezeptors auslösen, stellt sich die Frage, durch welchen alternativen Mechanismus die Einleitung der Endozytose des Notch-Rezeptors durch die Ubiquitinligasen reguliert wird. Die clathrin-abhängige Endozytose von Transmembranproteinen lässt sich über verschiedene Wege einleiten. Eine Möglichkeit ergibt sich aus der Ubiquitinierung der Transmembranproteine. In diesem Fall wird Ubiquitin über ein in der Membran verankertes Adapterprotein erkannt und löst die Assemblierung von Clathrin aus. Ein gut untersuchtes Adapterprotein mit UIMs (ubiquitin interating motive), das an der clathrin-abhängigen Endozytose beteiligt ist, ist Epsin. Das Clathrin umhüllte Vesikel wird anschließend über die GTPase Dynamin von der Zelloberfläche abgeschnürt. Alternative Möglichkeiten ein Transmembranprotein über die clathrin-abhängige Endozytose zu internalisieren bestehen in der direkten Interaktion von Adapterproteinen mit konservierten Endozytosesignalen innerhalb der Transmembranproteine. Ein beschriebenes

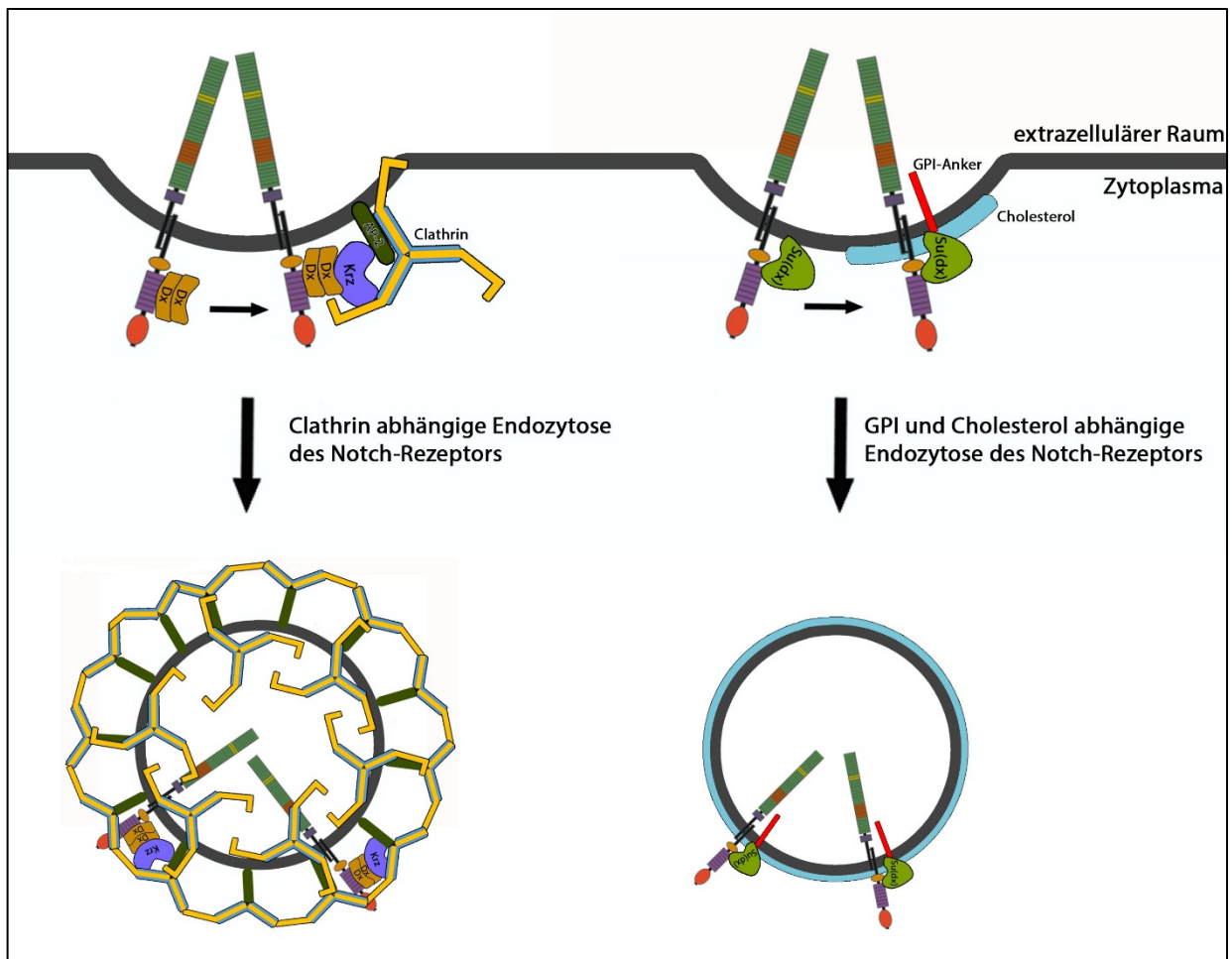


Abb. 44: Modell einer ubiquitinierungs-unabhängigen Einleitung der Notch-Endozytose durch Dx und Su(dx). Dx interagiert direkt mit den intrazellulären Ankyrin-Wiederholungen des Notch-Rezeptors. Für die Aufrechterhaltung der Funktion von Dx wird eine Dimerisierung des Proteins benötigt. Der Dx Interaktionspartner Krz verfügt sowohl über eine AP-2, als auch über eine Clathrin-Bindestelle. Ein Komplex aus Notch, Dx und Krz könnte daher zu einer clathrin-abhängigen, aber ubiquitinierungs-unabhängigen Endozytose des Notch-Rezeptors führen. Su(dx) führt zu einer clathrin-unabhängigen Notch-Endozytose, die über GPI und Cholesterin angereicherte Membrandomänen eingeleitet wird. Su(dx) interagiert über die WW-Domänen direkt mit dem Notch-Rezeptor und verfügt über eine Phospholipid-bindende C2-Domäne. Su(dx) könnte daher die Funktion eines Adapterproteins zwischen dem Notch-Rezeptor und der Cholesterin und GPI angereicherten Membrandomäne einnehmen und auf diese Weise eine ubiquitinierungs-unabhängige Endozytose des Notch-Rezeptors auslösen.

Adapterprotein das solche Signale erkennt ist AP-2 (Übersicht in (Benmerah and Lamaze, 2007)). In diesem Zusammenhang ist besonders interessant, dass die Funktion von Dx zwar abhängig von der RING-Domäne ist, aber durch den Austausch gegen die Dimerisierungsdomäne GST aufrechterhalten werden kann (Matsuno et al., 2002). Die Oligomerisierung von Dx ist daher entscheidend für die Funktion als positiver Regulator des Notch-Signalweges. Darüber hinaus interagiert Dx direkt mit den intrazellulären Ankyrin-Wiederholungen des Notch-Rezeptors (Matsuno et al., 1995). Des Weiteren ist das β -Arrestin Krz als Bindungspartner von Dx bekannt und führt bei einem Ausfall zu einer verstärkten Akkumulation des Notch-Rezeptors an der apikalen Membran, die mit einem Ausfall von Dx vergleichbar ist (Mukherjee et al., 2005; Yamada et al., 2011). Es ist daher sehr wahrscheinlich, dass eine Interaktion zwischen Notch-Dx-Krz für die Endozytose des Notch-Rezeptors benötigt

wird. Krz verfügt darüber hinaus sowohl über eine Clathrin, als auch eine AP-2 Bindestelle (Mukherjee et al., 2005).

Da die Dx vermittelte Notch-Endozytose clathrin-abhängig induziert wird (Shimizu et al., 2014), ist es vorstellbar, dass es über eine mögliche Interaktion zwischen Krz und dem Adapterprotein AP-2 zu einer ubiquitinierungs-unabhängigen Rekrutierung von Clathrin kommt. Darüber hinaus konnte in *Drosophila* gezeigt werden, dass die konstitutive Endozytose des Notch-Rezeptors AP-2 abhängig ist (Windler and Bilder, 2010). Alternativ wäre vorstellbar, dass Krz direkt mit Clathrin interagiert und so eine clathrin-abhängige, aber ubiquitinierungs-unabhängige Endozytose des Notch-Rezeptors ausgelöst wird. Da die Dimerisierung von Dx entscheidend für die Aufrechterhaltung der Funktion ist, könnte Dx als Dimer an die Ankyrin-Wiederholungen des Notch-Rezeptors binden. Durch die Interaktion von Krz mit Dx und AP-2 mit Krz entstünde ein Komplex der eine clathrin-abhängige Endozytose ermöglichen könnte (Abb. 44).

Insbesondere eine Beteiligung von AP-2 an der Dx induzierten Notch-Endozytose müsste in weiteren Experimenten untersucht werden. Möglich wäre hierbei eine klonale Analyse mit Hilfe eines AP-2 mutanten Allels. Sollte die verstärkte Notch-Endozytose durch die Überexpression von Dx in AP-2 mutanten Zellklonen unterdrückt werden, wäre eine Beteiligung von AP-2 an der Dx induzierten Notch-Endozytose sehr wahrscheinlich.

Für eine ubiquitinierungs-unabhängige Einleitung der Notch-Endozytose durch Su(dx) gibt es deutlich weniger Anhaltspunkte in der Literatur. Su(dx) interagiert über die WW-Domänen direkt mit dem Notch-Rezeptor. Darüber hinaus verfügt Su(dx) über eine Phospholipid-bindende N-terminale C2-Domäne und ist an der apikalen Membran lokalisiert (Wilkin et al., 2004). Es ist daher vorstellbar, dass Su(dx) selbst eine Funktion als Adapterprotein hat und zur Einleitung der Endozytose des Notch-Rezeptors führt. Es konnte gezeigt werden, dass die durch Su(dx) ausgelöste Endozytose des Notch-Rezeptors clathrin-unabhängig ist, aber über GPI-Proteine und Cholesterol angereicherte Membrandomänen ausgeführt wird (Shimizu et al., 2014). Wie dieser Prozess im Detail abläuft wurde bisher nicht näher untersucht. Vorstellbar wäre, dass Su(dx) direkt mit GPI und Cholesterol angereicherten Membrandomänen interagiert und der Notch-Rezeptor auf diese Weise der Endozytose zugeführt wird (Abb. 44). Die durch Su(dx) vermittelte Endozytose des Notch-Rezeptors über GPI und Cholesterol angereicherte Membrandomänen wurde bisher ausschließlich anhand von Zellkulturexperimenten nachgewiesen. Ob diese Form der Endozytose auch *in vivo* aktiv ist, sollte daher näher untersucht werden.

4.2.3 Ein Dileucinmotiv als alternatives Endozytosesignal

Der *Drosophila* Notch-Rezeptors verfügt über ein stark konserviertes Dileucinmotiv in der intrazellulären Domäne des Rezeptors. Die Eigenschaften des Dileucinmotives wurden bereits anhand des humanen N1-Rezeptors in Zellkulturexperimenten untersucht (Zheng et al., 2013). Dazu wurde ein Konstrukt hergestellt, bei dem die Leucine des Motives gegen Alanine ausgetauscht wurden. Mit Hilfe des Konstruktes konnte gezeigt werden, dass ein Austausch des Dileucinmotives keinen Effekt auf die Endozytose des N1-Rezeptors hat, aber zu einer verminderten Notch-Aktivität am Lysosom führt. Darüber hinaus führt der Austausch des Motives zu einem unterdrückten Transport des Rezeptors vom frühen zum späten Endosom. Um zu testen, welchen Einfluss das Dileucinmotiv auf den *Drosophila* Notch-Rezeptor hat, wurde in dieser Arbeit ebenfalls ein Konstrukt hergestellt, bei dem die Leucine des Motives durch Alanine ersetzt wurden (3.12).

Dabei konnten deutliche Unterschiede im Vergleich zu dem humanen N1-Rezeptor festgestellt werden. Der Austausch des Dileucinmotives führt zu einer verstärkten Akkumulation des Notch-Rezeptors an der subapikalen Membran. Dieser Effekt konnte nicht nur bei N-HA beobachtet werden, sondern wirkt sich auch auf den N^{K2R}-HA aus. Die Akkumulation von N-HA und N^{K2R}-HA an der apikalen Membran wird durch den Austausch des Dileucinmotives angehoben (3.12.1). Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass es durch den Austausch des Motives zu einer abgeschwächten Endozytose der Rezeptoren von der apikalen Membran kommt. Das Dileucinmotiv des *Drosophila* Notch-Rezeptors scheint daher direkt an der Endozytose beteiligt zu sein. Diese Beobachtung unterscheidet sich von der Funktion des N1 Dileucinmotives, welches keinen Einfluss auf die Notch-Endozytose hat.

Interessant ist hierbei, dass besonders das Adapterprotein AP-2 ein bekannter Interaktionspartner von Dileucinmotiven ist (Übersicht in (Benmerah and Lamaze, 2007)). Es besteht daher die Möglichkeit, dass AP-2 direkt an das Dileucinmotiv des Notch-Rezeptors bindet und auf diese Weise die clathrin-abhängige Endozytose ausgelöst wird (Abb. 44). In diesem Fall stellt sich die Frage, wie Dx an diesem Prozess beteiligt ist. Denkbar wäre, dass die clathrin-abhängige Endozytose des Notch-Rezeptors über mehrere Wege eingeleitet wird. So könnte Notch zum einen über eine direkte Bindung mit AP-2 endozytiert werden, oder alternativ über einen Komplex aus Notch-Dx-Krz und AP-2. Auffällig ist in diesem Zusammenhang, dass es auch durch den Austausch des Dileucinmotives weiterhin zur Bildung N^{LL2AA}-HA positiver Vesikel kommt. Dieser Effekt tritt auch bei N^{K2R-LL2AA}-HA auf (3.12.2). Es scheint daher einen Mechanismus der Notch-Endozytose zu geben, der unabhängig von dem Dileucinmotiv und der

Tyrosin Endozytosesignal: YXXØ	Y: Tyrosin X: variabel Ø: sperrige hydrophobe Seitenkette
<p><i>D. melanogaster Notch</i> : PSSQHNQQAFYQYLLTPSSQHSGG----HTPQH-LVQT</p> <p><i>H. sapiens Notch1</i> : PSSLVPPVTAAQFLTPPSQHSYSSPVDNTPSHQLQVP</p>	

Abb. 45: Der *Drosophila* Notch-Rezeptor verfügt über ein C-terminales Tyrosinmotiv. Bei Tyrosinmotiven handelt es sich um häufig beschriebene Endozytosesignale die zu einer Clathrin-abhängigen Endozytose von Transmembranproteinen führen. Der Aufbau eines Tyrosinmotives setzt sich aus einem Tyrosin, zwei variablen Aminosäuren und einer Aminosäure mit hydrophober sperriger Seitenkette zusammen. Das *Drosophila* Tyrosinmotiv ist nicht im humanen N1-Rezeptor konserviert.

Ubiquitinierung des Notch-Rezeptors funktioniert. Diese Endozytose könnte über den Komplex aus Notch-Dx-Krz und AP-2 ausgelöst werden.

Die Ergebnisse aus dieser Arbeit zusammen mit vorherigen Veröffentlichungen zeigen, dass Notch über verschiedene Wege endozytiert werden kann (Shimizu et al., 2014; Windler and Bilder, 2010). Für die Dx und Su(dx) induzierte Endozytose konnte in *Drosophila* eine Temperaturabhängigkeit nachgewiesen werden (Shimizu et al., 2014). Eine mögliche Endozytose über die direkte Bindung von AP-2 an das Dileucinmotiv des Rezeptors würde eine weitere Form der Notch-Endozytose darstellen. Es wäre vorstellbar, dass diese Form für eine basale Endozytose des Rezeptors sorgt. Die über Dx und Su(dx) eingeleitete Endozytose könnte im Gegensatz dazu temperaturbedingte Schwankungen der Notch-Endozytose und der Notch-Aktivierung ausgleichen.

Ob es sich tatsächlich um eine weitere Form der Notch-Endozytose handelt muss allerdings durch weitere Untersuchungen bestätigt werden. Das Dileucinmotiv könnte darüber hinaus als vorgeschaltetes Signal für die Dx und Su(dx) induzierte Notch-Endozytose wichtig sein. Es müsste in weiteren Experimenten getestet werden, ob sich die Endozytose der Dileucinmutanten Rezeptoren durch die Überexpression von Dx und Su(dx) beeinflussen lässt. Sollten Dx und Su(dx) keinen Einfluss auf die Endozytose von N^{LL2AA}-HA und N^{K2R-LL2AA}-HA haben, so wird das Dileucinmotiv sehr wahrscheinlich für die Funktion der Dx und Su(dx) induzierten Endozytose benötigt. Sollte die Überexpression von Dx und Su(dx) allerdings zu einer verstärkten Endozytose von N^{LL2AA}-HA und N^{K2R-LL2AA}-HA führen, so kann davon ausgegangen werden, dass das Dileucinmotiv nicht für die Dx und Su(dx) induzierte Notch-Endozytose benötigt wird. In diesem Fall stellt das Dileucinmotiv des Notch-Rezeptors ein Dx und Su(dx) unabhängiges Endozytosesignal dar.

Wie bereits erwähnt, führt der Austausch des Dileucinmotives im *Drosophila* Notch-Rezeptors nicht zu einer kompletten Unterbrechung der Notch-Endozytose. Die entstehenden N^{LL2AA}-HA Vesikel kolokalisieren mit dem spät-endosomalen Marker Rab7. Auch bei N^{K2R-LL2AA}-HA kommt es zu einer Kolokalisation mit Rab7. Zudem konnte gezeigt werden, dass es bei basalen

Vesikeln weiterhin zu der Ausprägung eines Lumens kommt (3.12.2). Die Ergebnisse zeigen, dass es im Gegensatz zum humanen N1-Rezeptor durch den Austausch des Dileucinmotives im *Drosophila* Notch-Rezeptor zu keiner Unterbrechung des Transportes des Rezeptors in spät-endosomale Kompartimente kommt. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass der Austausch des Dileucinmotives keinen Effekt auf die Aktivierung von N-HA und N^{K2R}-HA hat (3.12.3). Die Beobachtungen zeigen, dass Funktionen des Dileucinmotives im *Drosophila* Notch und im humanen N1-Rezeptor grundsätzlich unterschiedlich und nicht miteinander vergleichbar sind. Während das Dileucinmotiv im humanen N1-Rezeptor an dem Transport des Rezeptors zum Lysosom beteiligt ist (Zheng et al., 2013), scheint es im *Drosophila* Notch-Rezeptor die Funktion eines Endozytosesignals einzunehmen.

Neben Dileucinmotiven gibt es auch weitere Endozytosesignale. Gut beschriebene Endozytosesignale die ebenfalls die clathrin-abhängige Endozytose einleiten, sind Tyrosinbasierte Motive. Der Aufbau dieser Motive setzt sich aus einem Tyrosin, zwei darauf folgenden variablen Aminosäuren und einer Aminosäure mit hydrophober sperriger Seitenkette zusammen (Übersicht in (Traub and Bonifacino, 2013)).

Interessanterweise verfügt der *Drosophila* Notch-Rezeptor neben dem Dileucinmotive über ein solches Tyrosinmotiv am C-Terminus der intrazellulären Domäne. Das Motiv ist nicht im humanen N1-Rezeptor konserviert, unterscheidet sich allerdings nur durch ein Phenylalanin anstelle des Tyrosins (Abb. 45). Die Aminosäuren Phenylalanin und Tyrosin sind sehr ähnlich aufgebaut und unterscheiden sich nur durch eine OH-Gruppe. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass ein Austausch des Tyrosins gegen ein Phenylalanin innerhalb des Motives keine starke Unterdrückung der Internalisierung von Transmembranproteinen hat (Übersicht in (Traub and Bonifacino, 2013)). Es ist also vorstellbar, dass das Motiv im N1-Rezeptor trotz des Phenylalanins eine Funktion als Endozytosesignal einnimmt. Besonders da das Dileucinmotiv keinen Einfluss auf die Endozytose des N1-Rezeptors hat und der Rezeptor darüber hinaus lysinunabhängig endozytiert wird (Zheng and Conner, 2018; Zheng et al., 2013), könnte es sich hierbei um ein grundlegendes Endozytosesignal handeln.

Um zu testen, ob das Tyrosinmotiv einen Einfluss auf die Endozytose des *Drosophila* Notch-Rezeptors hat, wäre es möglich ein Deletionskonstrukt herzustellen. Die Kombination aus einem Austausch der intrazellulären Lysine, des Dileucinmotives und des Tyrosinmotives könnte Aufschluss darüber geben, ob es zu einer kompletten Unterbrechung der Notch-Endozytose kommt. In diesem Fall könnte von einem Einfluss des Tyrosinmotives auf die Notch-Endozytose ausgegangen werden.

5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die Funktion der Ubiquitinierung des Notch-Rezeptors getestet. Dazu wurde ein transgener Rezeptor hergestellt, bei dem alle 27 intrazellulären Lysine durch die strukturell ähnliche Aminosäure Arginin ausgetauscht wurden (N^{K2R}-HA).

Um zu testen, welchen Einfluss der Austausch der Lysine auf die Aktivität des Rezeptors hat, wurde eine Analyse mit Mutanten verschiedener Komponenten des Notch-Signalweges durchgeführt. Mit Hilfe dieser Analyse konnte gezeigt werden, dass N^{K2R}-HA ligandenunabhängig aktiviert wird. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass diese Aktivierung unabhängig von der Funktion der Metalloprotease Kuz, aber abhängig von der Aktivität der γ -Sekretase erzeugt wird.

Lokalisationsstudien in der Flügelimaginalscheibe zeigten, dass der Austausch der Lysine keinen Einfluss auf die Sekretion und den Transport des Rezeptors an die apikale Membran hat. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass N^{K2R}-HA über den endosomalen Weg transportiert wird und im Gegensatz zu N-HA an der limitierenden Membran von Kompartimenten mit endosomalem Ursprung akkumuliert. Die weitere Analyse zeigte Hinweise darauf, dass diese Lokalisation zu einer Aktivierung des Rezeptors führt, die unabhängig von der Fusion des Endosoms mit dem Lysosom ausgelöst wird. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass es durch den Austausch der Lysine zu einem verzögerten Abbau der intrazellulären Domäne im Zellkern kommt, der zu der starken ektopischen Aktivierung des Signalweges beiträgt.

In weiteren Experimenten konnte gezeigt werden, dass die E3-Ligasen Dx und Su(dx) eine ubiquitinierungs-unabhängige Endozytose des N^{K2R}-HA Rezeptors auslösen. Zudem konnten Hinweise darauf erzielt werden, dass Su(dx) zu einer vermehrten Internalisierung von N^{K2R}-HA in das endosomale Lumen führt und eine leichte Unterdrückung der ektopischen Aktivierung auslöst.

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Mutation eines konservierten intrazellulären Dileucinmotiv zu einer reduzierten Endozytose des Notch-Rezeptors von der apikalen Membran führt. Der Austausch des Dileucinmotives im N^{K2R}-HA Rezeptors führte ebenfalls zu einer reduzierten, aber keiner vollständigen Unterdrückung der Endozytose. Diese Beobachtungen deuten auf einen weiteren Mechanismus der Notch-Endozytose hin, der unabhängig von der Ubiquitinierung des Rezeptors und des Dileucinmotives ausgelöst wird.

6 Summary

In this thesis, the function of Notch receptor ubiquitination was analysed. For this purpose, a transgenic Notch receptor was generated in which all 27 lysines of the intracellular domain were replaced by the structurally similar amino acid arginine (N^{K2R}-HA).

To test the impact of lysine replacement on receptor activity, several mutants of Notch signalling pathway components involved in activating the receptor were analysed. The results suggest that N^{K2R}-HA is activated in a ligand independent manner. Moreover, it was shown that N^{K2R}-HA signalling activity does not depend on the metalloprotease Kuz, but requires γ -secretase activity.

Localisation studies in wing imaginal discs showed that a replacement of lysines does not affect secretion and transport of the receptor to the apical membrane. N^{K2R}-HA is transported via the endosomal pathway, but in contrast to N-HA remains at the limiting membrane of compartments with an endosomal origin. Further experiments indicated that N^{K2R}-HA is activated at the limiting membrane independent of endosome/lysosome fusion. In addition, the replacement of intracellular lysines results in a delayed degradation of NICD in the nucleus, which contributes to the strong activation of the signalling pathway. It was further shown that the E3-ligases Dx and Su(dx) induce ubiquitination independent endocytosis of N^{K2R}-HA. Moreover, there is evidence that Su(dx) expression leads to increased N^{K2R}-HA internalisation into the endosomal lumen and triggers mild suppression of ectopic activation.

Mutation of a conserved intracellular dileucine motif resulted in a reduced internalisation of N-HA from the apical membrane. Replacement of this motif in N^{K2R}-HA also showed a reduced, but not complete, suppression of endocytosis. These data suggest an alternative mechanism of Notch endocytosis, independent of receptor ubiquitination and the dileucine motif.

7 Material und Methoden

7.1 Material

7.1.1 Geräte und Arbeitsmaterialien

Software:

Microsoft Windows 8.1 Professional
Microsoft Office 2016
Adobe Photoshop CS6
ImageJ Version: 2.0.0-rc-61/1.51n
Huygens Professional Version: 16.10.0p3
Zeiss ZEN (blue edition), Version: 1.1.2.0
Zeiss ZEN (black edition) Version: 2.3 SP1
Zeiss AxioVision, Version: Rel. 4.8/4.1
GelAnalyzer 2010, Version: 2010a
Adobe Acrobat Reader DC
Chromas Lite, Version: 2.1.1
Serial Cloner, Version: 2.6.1
GraphPad Prism 6

Internetdatenbanken:

NCBI Pubmed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>)
FlyBase (<https://flybase.org>)
Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>)
Bloomington Drosophila Stock Center (<https://bdsc.indiana.edu>)
Vienna Drosophila Resource Center (<https://stockcenter.vdrc.at/control/main>)
DSHB (<http://dshb.biology.uiowa.edu>)
DGRC (<https://dgrc.bio.indiana.edu/Home>)
NEB Tm Calculators (<https://tmcalculator.neb.com/#!/main>)

Geräte:

Autoklaven:

VE-150, Systec
DE-23, Systec

Gel / Western Blot Dokumentationskammer:

Transilluminator, Peqlab
LAS-4000, Fujifilm

Gelelektrophorese /Western Blot Systeme:

Agarose-Gele: Eigenbau der der Werkstatt der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf
SDS-Gele: Mini-PROTEAN Tetra Vertical Electrophoresis Cell, Bio Rad
Western Blot: Trans-Blot Turbo, Bio Rad

Inkubatoren:

Function Line B6, Heraeus
Hera Therm, Thermo Scientific
Wasserbad, GFL 1083
Thermocell Cooling&Heating Block, Bioer
Mixing Block MB-102, Bioer

Mikroskope und Binoculare:

Zeiss Axio Imager Z1 mit ApoTome und AxioCam MRm
Zeiss Axio Plan 2 mit ApoTome und AxioCam MRm
Zeiss Elyra PS (SR-SIM)
Olympus BH2
Leica MZ 16

PCR-Thermocycler:

peqSTAR, Peqlab

Spektralphotometer:

NanoDrop 2000c, Peqlab

Schüttler:

SM30, Edmund Bühler GmbH

Rollinkubator:

CAT RM5

Taumler:

Heidolph Polymax 2040

Rotator:

Elmi Intelli-Mixer RM2L

Zentrifugen:

Ultrazentrifuge, Beckman Coulter Avanti J-26 XP

Tischzentrifuge, Heraeus Biofuge pico

Tischzentrifuge, Heraeus Fresco 21

Arbeitsmaterialien:

Gasperlen:

Glass Beads (425-600 μm), Sigma-Aldrich

Transfermembran:

Roti-PVDF, Roth

Blottingpapiere:

Rotilabo (0,35 mm), Roth

7.1.2 Chemikalien, Kits und Enzyme

Chemikalien:

Sofern nicht anders vermerkt, wurden sämtliche Chemikalien von den Herstellern Sigma Aldrich, Merck und Roth bezogen

DNA Größenstandart: Gene Ruler 1kb, Fermentas

DNA-Ladepuffer: 6x MassRuler DNA Loading Dye, Fermentas

DNA-Farbstoff: Hoechst 33258, Sigma Aldrich

Gamma-Sekretase Inhibitor: DAPT (D5942), Merck

Kuz Inhibitor: Batimastat (BB-94) (ab142087), Abcam

Ziegenserum: Normal Goat Serum (NGS), Jackson Immuno Research

Midi-Präparationskit:	Nucleobond, Macherey Nagel
Gel-Extraktionskit:	Gel DNA Recovery Kit, Zymoclean
Luciferase-Kit:	Dual-Glo Luciferase Assay System, Promega
Protease Inhibitor:	Protease Inhibitor Cocktail (P8340), Sigma-Aldrich
Proteasom Inhibitor:	MG-132, Merck
Transfektionsreagenz:	Effectene Transfection Reagent, Qiagen
ECL-Reagenz:	WesternBright Sirius HRP substrate, Advansta
Agarose HA-Beads:	Anti-HA Agarose (1862389), Thermo Scientific
Transfermembran:	Roti-PVDF, Roth
Acrylamid-, Bisacrylamid:	Rotiphorese Gel30 (37,5:1), Roth
Katalysatoren:	APS (10%), Merck TEMED, Merck

Restriktionsendonukleasen:

Die verwendeten Restriktionsenzyme wurden von dem Hersteller New England Biolabs (NEB) bezogen.

Exonuklease:	T5 Exonuklease, Biozym
DNA-Polymerasen:	Q5 High-Fidelity DNA Polymerase, NEB Pfu DNA Polymerase, Promega Phusion High Fidelity DNA Polymerase, NEB
DNA-Ligasen:	T4 DNA Ligase, NEB Taq DNA Ligase, NEB
RNase	Ribonuclease A, Serva

7.1.3 Puffer und Lösungen:

1x PBS (phosphate-buffered saline):	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ 2 mM KH ₂ PO ₄
0,3% PBT:	1x PBS 0,3% Triton-X-100
4% PFA:	1x PBS 4% Paraformaldehyd
5% NGS:	5% Normal Goat Serum in 0,3% PBT
1x TAE	40 mM Tris-HCl 1 mM EDTA →pH 8
4x Laemmli-Puffer:	250 mM Tris-HCl 8% SDS 40% Glycerol 8% Betamercaptoethanol 0,02% Bromphenolblau
4x Trenngelbuffer:	1,5 M Tris-HCl 10% SDS →pH 8,8
4x Sammelgelbuffer:	0,5 M Tris-HCl 10% SDS →pH 6,8
10x SDS-Elektrophorese-Puffer:	0,26 M Tris-HCl 1,92 M Glycin 1% SDS →pH 8,3
10x Transferpuffer:	250 mM Tris-HCl

	1,5 M Glycerin →pH 8,3
WB Blockierlösung:	5% Milchpulver in 1x PBS
WB Färbelösung:	2% Milchpulver in 1x PBS
S1-Puffer:	12,5 ml Tris-HCl (1 M) 5 ml EDTA (0,5 M) Auf 250 ml mit dH ₂ O auffüllen
S2-Puffer:	10 ml NaOH (5 M) 25 ml SDS (aus 10% Lösung) Auf 250 ml mit dH ₂ O auffüllen
S3-Puffer:	68,71 g Kaliumacetat (2,8 M) 150 ml dH ₂ O →pH 5,1 (mit 100% Essigsäure einstellen) Auf 250 ml mit dH ₂ O auffüllen
Notch-Lysispuffer:	20 mM HEPES (pH 7,6) 150 mM NaCl 1 mM EDTA 1% Triton X-100
Notch-Ubiquitinierungspuffer:	50 mM Tris-HCl 125 mM NaCl 5% Glycerol 0,2% NP-40 1,5 mM MgCl ₂ 1 mM DTT 1 mM EDTA 5 mM N-Ethylmaleimide 1x Protease Inhibitor Cocktail 1x MG132 Proteasom Inhibitor →pH 7,5

Stripping-Puffer:	20 ml SDS (10%) 12,5 ml Tris-HCl (0,5 M, pH 6,8) 800 µl β-Mercaptoethanol 67,5 ml dH ₂ O (Volumen: 100 ml)
Gibson-Assembly 5x ISO-Puffer	3ml 1M Tris-HCL pH 7,5 150 µl 2M MgCl ₂ 60 µl 100mM dGTP 60 µl 100mM dATP 60 µl 100mM dTTP 60 µl 100mM dCTP 300 µl 1M DTT 1,5 g PEG-8000 300 µl 100mM NAD dH ₂ O auf 6 ml auffüllen
Gibson-Assembly Enzym Mastermix	320 µl Gibson-Assembly 5x ISO-Puffer 0,64 µl 10 U/µl T5 Exonuklease 20 µl 2 U/µl Phusion [®] High-Fidelity DNA-Polymerase 160 µl 40 U/µl Taq DNA Ligase 1,2 ml dH ₂ O
Kupfersulfat Stammlösung:	100 mM CuSO ₄ in dH ₂ O
Antibiotika Stammlösungen:	Ampicillin (100 mg/ml in dH ₂ O), Sigma Penicillin (10,000 Units/ml), Invitrogen Streptomycin (10,000 µg/ml), Invitrogen

7.1.4 Medien

LB-Medium:	10 g Bactotrypton 5 g Hefeextrakt 10g NaCl Auf 1 Liter mit dH ₂ O auffüllen →pH 7
LB-Agar Platten:	LB-Medium 1,5% Agarose
Zellkultur Serum:	FBS Premium (P30-1502), Pan Biotech
Zellkultur Medium:	450 ml Schneider's Drosophila Medium (P04-915000), Pan Biotech 50 ml FBS 5 ml Penicillin/Streptomycin (aus Stammlösung)
<i>D. melanogaster</i> Nährmedium:	100 g Agar 1424 g Maisschrot 190 g Sojamehl 336 g Trockenhefe 800 g Rübensirup 900 g Malzextrakt 300 ml Nipaginlösung in Etanol (10% Gew/Vol) 90 ml Probionsäure 19,5 l dH ₂ O (Volumen: 20 Liter)
Mikroskopie Einbettungsmedium:	Vectashield, Vector Laboratories

7.1.5 Antikörper

Tab 1: Primäre Antikörper. Die Aufgelisteten Antikörper wurden entweder für immunhistochemische Färbungen an Flügelimaginalscheiben, S2 Zellen, oder für Western Blots (WB) verwendet.

Antigen	Organismus	Verdünnung	Bezugsquelle
NECD	Maus	1:100	DSHB (C458.2H)
Wg	Maus	1:250	DSHB (4D4)

β -Gal	Kaninchen	1:5000	Cappel
HA	Ratte	1:500 (WB 1:2000)	Roche (3F10)
HA	Kaninchen	1:2000 (WB 1:5000)	Cell Signaling Technology (C29F4)
Rab7	Kaninchen	1:3000	(Tanaka and Nakamura, 2008)
Rab7	Maus	1:250	DSHB (Rab7-s)
Rab5	Maus	1:500	Abcam (ab91261)
Dx	Ratte	1:50	(Busseau et al., 1994; Hori et al., 2004)
Su(dx)	Kaninchen	1:500	SK289
alpha-Catenin	Maus	WB 1:2000	DSHB (DCAT-1)
Flag	Maus	WB 1:2000	Sigma (M2)
c-Myc	Kaninchen	1:500	Santa Cruz (A-14)
Calnexin99	Maus	1:100	DSHB (6-2-1)
Golgin84	Maus	1:100	DSHB (12-1)

Tab 2: Sekundäre Antikörper. Die aufgelisteten Antikörper wurden entweder für immunhistochemische Färbungen an Flügelimaginalscheiben, S2 Zellen, oder für Western Blots (WB) verwendet.

Antigen + Farbstoff	Organismus	Verdünnung	Bezugsquelle
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
Ratte Alexa-488	Ziege	1:500	Invitrogen
Ratte Alexa-568	Ziege	1:500	Invitrogen
Ratte Alexa-647	Ziege	1:500	Invitrogen
Ratte HRP	Ziege	WB 1:5000	Jackson Immuno Research
Maus HRP	Ziege	WB 1:5000	Jackson Immuno Research
Maus IRDye 800CW	Ziege	WB 1:5000	Abcam (ab216772)
Kaninchen IRDye 680RD	Ziege	WB 1:5000	Abcam (ab216777)

7.1.6 Bakterienstämme:

Bei den verwendeten Stämmen handelt es sich um chemisch kompetente Bakterien

DH5α Genotyp: *fhuA2 (argF-lacZ)U169 phoA glnV44 80 (lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17*

TOP10 Genotyp: F- *mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15Δ lacX74 recA1 araD139 Δ(araleu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG*

7.1.7 *D. melanogaster* Zellen

D. melanogaster Schneider Zellen S2R+

7.1.8 Fliegenstämme

Tab 3: Fliegenstämme

Genotyp	Anmerkung
Für Transgenese verwendete Stämme	
<i>y w M(eGFP.vas.int.Dm)ZH-2A ; M(3xP3-RFP.attP)ZH-51C</i>	Chromosom 2R (Bischof et al., 2007)
<i>y w M(eGFP.vas.int.Dm)ZH-2A ; M(3xP3-RFP.attP)ZH-86Fb</i>	Chromosom 3R (Bischof et al., 2007)
Für Balancierung verwendete Stämme	
<i>w ; If/CyO^{wg-lacZ} ; TM6B/MKRS</i>	Multibalancer
<i>w ; If/SM6a-TM6B</i>	Compound Balancer
Transgene Fliegenstämme	
<i>w ; UAS-N-HA/CyO^{wg-lacZ} ; TM6B/MKRS</i>	Chromosom 2R
<i>w ; If/CyO^{wg-lacZ} ; UAS-N-HA/TM6B</i>	Chromosom 3R
<i>w ; UAS-N^{K2R}-HA/CyO^{wg-lacZ} ; TM6B/MKRS</i>	Chromosom 2R
<i>w ; If/CyO^{wg-lacZ} ; UAS-N^{K2R}-HA/TM6B</i>	Chromosom 3R
<i>w ; UAS-N^{ΔEGF(11-12)}-HA/CyO^{wg-lacZ} ; TM6B/MKRS</i>	Chromosom 2R
<i>w ; If/CyO^{wg-lacZ} ; UAS-N^{ΔEGF(11-12)}-HA/TM6B</i>	Chromosom 3R
<i>w ; UAS-N^{ΔEGF(11-12)-K2R}-HA/CyO^{wg-lacZ} ; TM6B/MKRS</i>	Chromosom 2R
<i>w ; If/CyO^{wg-lacZ} ; UAS-N^{ΔEGF(11-12)-K2R}-HA/TM6B</i>	Chromosom 3R

<i>w ; If/CyO^{wg-lacZ} ; UAS-N^{LL2AA}-HA/TM6B</i>	Chromosom 3R
<i>w ; If/CyO^{wg-lacZ} ; UAS-N^{K2R-LL2AA}-HA/TM6B</i>	Chromosom 3R
<i>w ; If/CyO^{wg-lacZ} ; UAS-NICD-HA/TM6B</i>	Chromosom 3R
<i>w ; If/CyO^{wg-lacZ} ; UAS-NICD^{K2R}-HA/TM6B</i>	Chromosom 3R
Verwendete UAS Konstrukte, RNAi Linien und Allele	
<i>w ; UAS-dx (II)</i>	Martin Baron
<i>w ; UAS-Su(dx) (II)</i>	Martin Baron
<i>w ; UAS-vhaA-RNAi (III)</i>	VDRRC#17102
<i>w ; UAS-GFP</i>	(Yeh et al., 1995)
<i>w ; UAS-mRFP</i>	Bloomington
<i>w ; kuz^{ES24} FRT40A/CyO^{wg-lacZ} ; TM6B/MKRS</i>	(Klein, 2002)
<i>DI^{rev10} Ser^{Rx82} e FRT82B/TM6B</i>	(Micchelli et al., 1997)
<i>N^{55E11} FRT19A/FM6</i>	(Lehmann et al., 1983)
<i>w ; mib1^{EY09780}/TM6B</i>	(Le Borgne et al., 2005)
<i>w ; trpm1^l/TM6B</i>	(Kwon et al., 2008)
<i>w ; trpm1^l NRE-GFP/TM6B</i>	Rekombiniert
<i>Psn^{C1} FRT2A/TM6B</i>	(Struhl and Greenwald, 1999)
<i>w ; π-myc FRT40A/CyO^{wg-lacZ}</i>	(Xu and Rubin, 1993)
Verwendete Gal4 Treiber Linien	
<i>hh-Gal4</i>	(Tanimoto et al., 2000)
<i>ci-Gal4</i>	(Crocker et al., 2006)
<i>ptc-Gal4</i>	(Speicher et al., 1994)
<i>ptc-Gal4 UAS-GFP</i>	
<i>hh-Gal4 tubGAL80^{ts}</i>	Rekombiniert mit Bl#7018 (Tobias Troost)
<i>tub-Gal4</i>	
<i>w ; ptc-Gal4 UAS-GFP/CyO^{wg-lacZ} ; Gbe+Su(H)-lacZ/TM6B</i>	
<i>w ; NRE-GFP ; hh-Gal4 tub-GAL80^{ts}/SM6a-TM6B</i>	
<i>w ; Rab1-YFP ; hh-Gal4 tub-GAL80^{ts}/SM6a-TM6B</i>	
<i>w ; ci-Gal4 tub-GAL80^{ts}/CyO^{wg-lacZ} ; NRE-GFP/TM6B</i>	
<i>w ; ci-Gal4 tub-GAL80^{ts}/CyO^{wg-lacZ} ; trpm1^l NRE-GFP/TM6B</i>	
<i>w ; If/CyO^{wg-lacZ} ; tub-Gal4 tub-GAL80^{ts}/TM6B</i>	
Verwendete Reportergerkonstrukte und Marker	
<i>NRE-GFP (II)</i>	(Housden et al., 2012)

<i>NRE-GFP (III)</i>	(Housden et al., 2012)
<i>Gbe+Su(H)-lacZ (III)</i>	(Furriols and Bray, 2001)
<i>Gbe+Su(H)-nlsGFP (III)</i>	Dissertation Markus Schneider
<i>N-YFP (X)</i>	(Lowe et al., 2014; Lye et al., 2014)
<i>tub-Rab5-CFP tub-Rab7-YFP (III)</i>	(Marois et al., 2006)
<i>Rab1-YFP (II)</i>	(Dunst et al., 2015)
Für klonale Analysen verwendete Fliegenstämme	
<i>hsFLP UAS-RFP ; arm-lacZ FRT40A tub-GAL80ts/ CyO^{wg-lacZ} ; hh-Gal4 Gbe+Su(H)-nlsGFP/TM6B</i>	
<i>w ; ptc-Gal4 UAS-Flp NRE-GFP/CyO^{wg-lacZ} ; FRT82B RFP/TM6B</i>	
<i>w ; kuz^{ES24} FRT40A /CyO^{wg-lacZ} ; MKRS/TM6B</i>	
<i>w ; kuz^{ES24} FRT40A ; UAS-N-HA/SM6a-TM6B</i>	
<i>w ; kuz^{ES24} FRT40A ; UAS-N^{K2R}-HA/SM6a-TM6B</i>	
<i>DI^{rev10} Ser^{Rx82} e FRT82B/TM6B</i>	
<i>w ; UAS-N-HA/CyO^{wg-lacZ} ; DI^{rev10} Ser^{Rx82} e FRT82B/TM6B</i>	
<i>w ; UAS-N^{K2R}-HA/CyO^{wg-lacZ} ; DI^{rev10} Ser^{Rx82} e FRT82B/TM6B</i>	
<i>N55E11 FRT19A/FM6</i>	
<i>N55E11 FRT19A/FM6 ; UAS-N-HA/TM6B</i>	
<i>N55E11 FRT19A/FM6 ; UAS-N^{K2R}-HA/TM6B</i>	
<i>w ; π-myc FRT40A ; UAS-N-HA/SM6a-TM6B</i>	
<i>w ; π-myc FRT40A ; UAS-N^{K2R}-HA/SM6a-TM6B</i>	
Weitere Effektorstämme	
<i>w ; Rab1-YFP/CyO^{wg-lacZ} ; UAS-N-HA/TM6B</i>	
<i>w ; Rab1-YFP/CyO^{wg-lacZ} ; UAS-N^{K2R}-HA/TM6B</i>	
<i>w ; UAS-dx/CyO^{wg-lacZ} ; UAS-N-HA/TM6B</i>	
<i>w ; UAS-dx/CyO^{wg-lacZ} ; UAS-N^{K2R}-HA/TM6B</i>	
<i>w ; UAS-Su(dx)/CyO^{wg-lacZ} ; UAS-N-HA/TM6B</i>	
<i>w ; UAS-Su(dx)/CyO^{wg-lacZ} ; UAS-N^{K2R}-HA/TM6B</i>	
<i>w ; UAS-N-HA/CyO^{wg-lacZ} ; Psn^{C1} FRT2A/TM6B</i>	
<i>w ; UAS-N^{K2R}-HA/CyO^{wg-lacZ} ; Psn^{C1} FRT2A/TM6B</i>	
<i>w ; UAS-vhaA-RNAi/CyO^{wg-lacZ} ; UAS-N-HA/TM6B</i>	

<i>w ; UAS-vhaA-RNAi/CyO^{wg-lacZ} ; UAS-N^{K2R}-HA/TM6B</i>	
<i>w ; UAS-N-HA/CyO^{wg-lacZ} ; NRE-GFP/TM6B</i>	
<i>w ; UAS-N^{K2R}-HA/CyO^{wg-lacZ} ; NRE-GFP/TM6B</i>	

7.1.9 Primer (Oligonukleotide)

Tab 4: Auflistung der verwendeten Oligonukleotide zur Generierung und Sequenzierung von Notch-Konstrukten

Bezeichnung	Sequenz 5'→3'	Verwendung
<i>P01</i>	CTGAAATCTGCCAAGAAG	Sequenzierung <i>pUAST attB</i>
<i>P02</i>	GTGTATTTTAGATTCCAACCT	Sequenzierung <i>pUAST attB</i>
<i>N-RFP 3</i>	ATGGAGCCACCTGCACCGCTTT	Sequenzierung Notch
<i>N-RFP 5</i>	CTTCTATTGCCAGTGTACGA	Sequenzierung Notch
<i>N-RFP 7</i>	ATACGGGCACCAGTTGCGAG	Sequenzierung Notch
<i>N-RFP 9</i>	GAGTGCAGCAGCAATCCCTG	Sequenzierung Notch
<i>N-RFP 10</i>	GCAAACCTGGGCTATACGG GT	Sequenzierung Notch
<i>N-RFP 12</i>	TCCGAATATGTGGATTGGTG	Sequenzierung Notch
<i>N-RFP 14</i>	CGACATCAACGAGTGCCTAA	Sequenzierung Notch
<i>N-RFP 16</i>	ATTCCGATTGCAATACGTAT	Sequenzierung Notch
<i>N-RFP 18</i>	CTTTACGCACGCCGTTGAGG	Sequenzierung Notch
<i>N-RFP 21</i>	GGTGTATTTTCAGATATTGCT	Sequenzierung Notch
<i>N-RFP 23</i>	ACAGAAGGCGGCCAAGAAGG	Sequenzierung Notch
<i>N-RFP 25</i>	GAGCCGGCAATGGAAATAGC	Sequenzierung Notch
<i>N-RFP 26</i>	ATACAAAGTTCAATGTCCGG	Sequenzierung Notch
<i>N-cDNA Fusion for</i>	CTCTGTCCGAGCAAATGGAAAG GCAAACGC	Herstellung <i>pUAST-attB-N-HA</i>
<i>N-cDNA rev (XhoI)</i>	CCGCACCGGCGTCCAATAATCTC TTG	Herstellung <i>pUAST-attB-N-HA</i>
<i>N-FLAG-HA EcoRI for</i>	AAAGAATTCCCAGAATGGTGGA ACGTGCCGAG	Herstellung <i>pUAST-attB-N-HA</i>
<i>N-FLAG-HA Fusion rev</i>	GCGTTTGCCTTTCCATTTGCTCG GACAGAG	Herstellung <i>pUAST-attB-N-HA</i>
<i>G N-K2R ICD N-HA for</i>	CACCGGCGGCGGTTATGTC	Herstellung <i>pUAST-attB-N^{K2R}-HA</i>
<i>G N-HA TM N-K2R ICD rev</i>	GATCACGTCGACGTCGCGAC	Herstellung <i>pUAST-attB-N^{K2R}-HA</i>
<i>N-ECD ab BglII</i>	CTCTAGAACTAGTGGATCCCCCG	Herstellung <i>pUAST-attB-N^{K2R}-</i>

<i>BS for</i>	GGCTGCAGGCGTGCCGAGATCT CATCGG	<i>HA</i>
<i>N-K2R NICD BS rev</i>	GCCCCCCTCGAGGTCGACGGT ATCGATAAGCGATCCTCTAGAG GTACCTCAAGCG	Herstellung <i>pUAST-attB-N^{K2R}- HA</i>
<i>QC K2R (1) for</i>	CTTGAGTACGCAAAGACGCCGG GCACATGGCGTC	Herstellung <i>pUAST-attB-N^{K2R}- HA</i>
<i>QC K2R (1) rev</i>	GACGCCATGTGCCCGCGTCTTT GCGTACTCAAG	Herstellung <i>pUAST-attB-N^{K2R}- HA</i>
<i>QC dileucine LL2AA for</i>	TCACGATATTGTCAGGGCCGCC GACGAGCATGTGCCGC	Herstellung <i>pUAST-attB- N^{LL2AA}-HA</i> und <i>pUAST-attB- N^{K2R-LL2AA}-HA</i>
<i>QC dileucine LL2AA rev</i>	GCGGCACATGCTCGTCGGCGGC CCTGACAATATCGTGA	Herstellung <i>pUAST-attB- N^{LL2AA}-HA</i> und <i>pUAST-attB- N^{K2R-LL2AA}-HA</i>
<i>EGF1112 frag1 for</i>	GCACATGCGTTACACAACCTCAA TGGC	Herstellung <i>pUAST-attB- N^{ΔEGF(11-12)}-HA</i> und <i>pUAST- attB-N^{ΔEGF(11-12)-K2R}-HA</i>
<i>EGF1112 frag1 rev</i>	GGGATTCGATTGGCATTCTGTC TGTCGATTGAACAATCCACGCC TTGTAGCC	Herstellung <i>pUAST-attB- N^{ΔEGF(11-12)}-HA</i> und <i>pUAST- attB-N^{ΔEGF(11-12)-K2R}-HA</i>
<i>EGF1112 frag2 for</i>	CCACCGGCTACAAGGGCGTGGA TTGTTCAATCGACATTGACGAAT GCCAATCGAATCC	Herstellung <i>pUAST-attB- N^{ΔEGF(11-12)}-HA</i> und <i>pUAST- attB-N^{ΔEGF(11-12)-K2R}-HA</i>
<i>EGF1112 frag2 rev</i>	CAACGCTTGCCCGTGTATCCTGG	Herstellung <i>pUAST-attB- N^{ΔEGF(11-12)}-HA</i> und <i>pUAST- attB-N^{ΔEGF(11-12)-K2R}-HA</i>
<i>NICD-HA ATG EcoRI for</i>	AAAGAATTCATGCGCAAGCGCC GCCGCCAGCA	Herstellung <i>pUAST-attB- NICD-HA</i>
<i>NICD-HA rev</i>	CTCTTGGCGGCATCTGCTCG	Herstellung <i>pUAST-attB- NICD-HA</i>
<i>NICD^{K2R}-HA ATG EcoRI for</i>	AAAGAATTCATGCGCCGCCGCC GCCGCCAGCA	Herstellung <i>pUAST-attB- NICD^{K2R}-HA</i>
<i>NICD^{K2R}-HA rev</i>	CTGCGGGCGGCATCTGCTCG	Herstellung <i>pUAST-attB- NICD^{K2R}-HA</i>

7.1.10 Vektoren

pBlueSkript KS+:

Der pBlueSkript KS+ Vektor wurde in dieser Arbeit für Zwischenklonierungen und mutagenese-PCRs bei der Herstellung von Notch-Konstrukten verwendet.

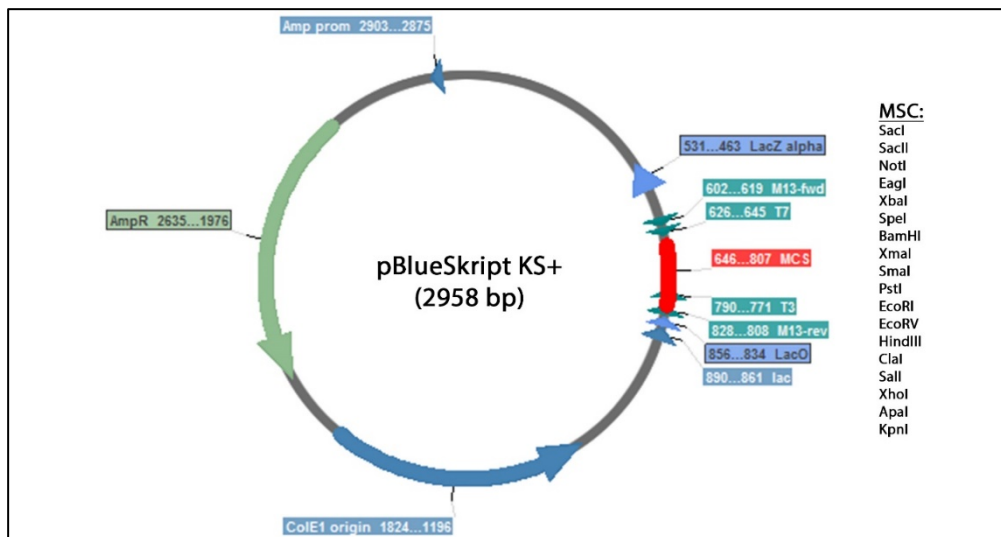


Abb. 46: Schematische Darstellung des pBlueSkript KS+ Vektors. Der pBlueSkript KS+ Vektor verfügt über ein lac-Operon mit dem eine blau-weiß Selektion von Bakterienkolonien ermöglicht wird. Eine Replikation des Vektors in Bakterien wird über das ORI (origen of replicarion) ColE1 reguliert. Eine Selektion von pBlueSkript KS+ positiven Bakterien wird über eine Ampicillin-Resistenz ermöglicht. Die Integration von Fragmenten wird über die MCS (muple cloning site) ermöglicht.

pUAST-attB:

Der pUAST-attB Vektor wurde in dieser Arbeit für die Herstellung von Notch-Konstrukten und die Integration der Konstrukte in das Genom von *D. melanogaster* verwendet. Über ein minimales *white* Gen können transformante Fliegen selektiert werden. Eine vorgeschaltete UAS-Sequenz ermöglicht die Expression der Konstrukte unter Kontrolle des GAL4/UAS-Systems.

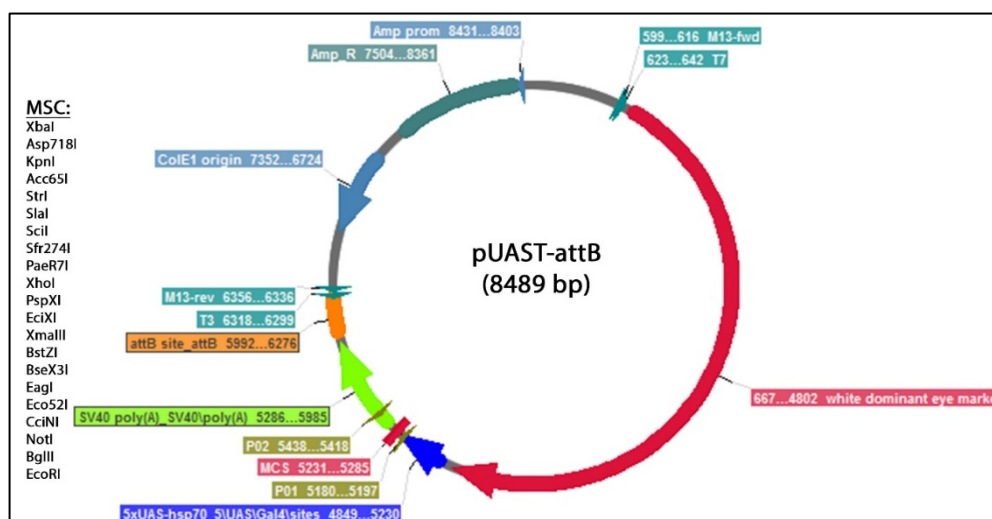


Abb. 47: Schematische Darstellung des pUAST-attB Vektors. Der pUAST-attB Vektor verfügt über eine attB Sequenz mit der eine Integration in das Genom von *D. melanogaster* ermöglicht wird. Eine Selektion von transgenen Fliegen wird über ein minimales *white* Gen ermöglicht. Konstrukte die in *D. melanogaster* exprimiert werden sollen werden über die MCS integriert. Eine vorgeschaltete UAS-Sequenz ermöglicht die Expression unter Kontrolle des Gal4/UAS-Systems. Eine Replikation des Vektors in Bakterien wird über das ORI (origen of replicarion) ColE1 reguliert. Eine Selektion von pUAST-attB positiven Bakterien wird über eine Ampicillin-Resistenz ermöglicht.

7.2 Methoden

7.2.1 Molekularbiologische Methoden

7.2.1.1 Plasmid-Minipräparation

Plasmid Minipräparationen wurden nach dem TENS Protokoll durchgeführt.

- Animpfen von 3ml LB-Medium mit einer Bakterienkolonie
- Inkubation der Kultur bei 37°C üN (über Nacht)
- Überführen von 1,5 ml üN Kultur in 2 ml Reaktionsgefäße
- 5 min. Zentrifugation bei 13000 rpm (rounds per minute) (Tischzentrifuge)
- Verwerfen des Überstandes
- Lösen des Bakterienpellets in 300 µl S1-Puffer
- Zugabe von 300 µl S2-Puffer und Inkubation für 5 min. bei Raumtemperatur
- Zugabe von 300 µl S3-Puffer und Inkubation für 5 min. auf Eis
- Zentrifugation der Proben bei 13000 rpm für 20 min.
- Vorlage von 500 µl Isopropanol in 1,5 ml Reaktionsgefäße
- Zugabe von 750 µl des Überstandes der zuvor zentrifugierten Lösung
- Zentrifugation der Proben bei 13000 rpm für 30 min.
- Verwerfen des Überstandes
- Zugabe von 500 µl 70% Ethanol und Zentrifugation bei 13000 rpm für 15 min.
- Verwerfen des Überstandes und trocknen des Pellets.
- Resuspendieren des Pellets in 20 µl dH₂O

7.2.1.2 Plasmid Midi-Präparation

Für die Midi-Präparation wurden 100 ml LB-Medium mit 50 µl einer üN-Kultur angeimpft. Die Midi-Präparation wurde mit Hilfe des NucleoBond® Xtra Midi-Kits von Macherey-Nagel nach Herstellerangaben durchgeführt. Das Pellet wurde in 50 µl dH₂O resuspendiert und bei -20°C eingefroren.

7.2.1.3 Gelextraktion

Für die Isolierung von DNA mittels Gelextraktion wurden die gewünschten DNA-Fragmente aus dem Agarosegel ausgeschnitten. Die in dem Gelfragment enthaltene DNA wurde mit Hilfe des Zymoclean Gel DNA Recovery Kits von Zymo Research nach Herstellerangaben isoliert und in 12 µl Elutionspuffer eluiert.

7.2.1.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

PCR mittel Q5 DNA-Polymerase:

Wenn nicht anders vermerkt wurden alle Standard-PCRs und SOEing-PCRs mit Hilfe der Q5 DNA-Polymerase des Herstellers NEB durchgeführt.

Tab 5: Q5 Polymerase PCR Ansatz

Komponente	Volumen
5x Q5 Reaction Buffer	10 μ l
10 mM dNTPs	1 μ l
10 μ M Forward Primer	1 μ l
10 μ M Reverse Primer	1 μ l
50 ng Template DNA	X μ l
Q5 High-Fidelity DNA Polymerase	0,5 μ l
dH ₂ O	auffüllen auf 50 μ l

Tab 6: Q5 Polymerase PCR Programm

Wiederholung	Schritt	Temperatur (°C)	Zeit (sek.)
1x	Initiale Denaturierung	98	30
35x	Denaturierung	98	10
	Annealing	NEB TM Calculator	30
	Elongation	72	30/kb
1x	Finale Elongation	72	120
1x	Pause	8	∞

Mutagenese PCR:

Mutagenese PCRs und das Primerdesign wurden nach dem Protokoll QuikChange II Site-Directed Mutagenesis von Agilent Technologies durchgeführt.

Tab 7: Mutagenese PCR Ansatz

Komponente	Volumen
10x Reaction Buffer	5 μ l
10 mM dNTPs	1 μ l
10 μ M Forward Primer	1 μ l
10 μ M Reverse Primer	1 μ l
50 ng Template DNA	X μ l
Pfu HF DNA polymerase	1 μ l
dH ₂ O	auffüllen auf 50 μ l

Tab 8: Mutagenese PCR Programm

Wiederholung	Schritt	Temperatur (°C)	Zeit (sek.)
1x	Initiale Denaturierung	95	30
18x	Denaturierung	95	30
	Annealing	55	30
	Elongation	68	60/kb
1x	Pause	8	∞

7.2.1.5 Gibson Assembly

Beim Gibson Assembly handelt es sich um eine Methode, bei der DNA-Fragmente mit komplementären Überhängen zueinander nahtlos miteinander fusioniert werden können. Durch die Aktivität einer 5' Exonuclease werden die Überhänge der DNA-Fragmente am 5' Ende abgebaut. Auf diese Weise entstehen einzelsträngige, komplementäre Überhänge die aneinander binden. Die Einzelstränge werden anschließend durch die Aktivität einer Polymerase und einer Ligase aufgefüllt und verbunden. Die Reaktion findet unter isothermalen Bedingungen in einem Reaktionsansatz statt (Gibson et al., 2010; Gibson et al., 2009).

Die DNA-Fragmente die mittels Gibson Assembly fusioniert werden sollten wurden mittels PCR amplifiziert und verfügen über Überhänge von 16 bis 45 bp (Basenpaare). Nach der Herstellung der linearen DNA-Fragmente mit komplementären Überhängen zueinander, wurden die folgenden Schritte durchgeführt:

- Auftauen eines 15 µl Assembly-Mix auf Eis
- Zugabe von 5 µl DNA Mix der zu fusionierenden Fragmente
- Inkubation auf 50°C für 60 min.
- Abkühlen des Reaktionsansatzes für 3 min auf Raumtemperatur
- Inkubation des Reaktionsansatzes für 3 min. auf Eis
- Transformation von 2-5 µl des Reaktionsansatzes mit chemisch kompetenten TOP10 Bakterien

Zusammensetzung des DNA Mix:

Vektorrückgrad: 12 ng pro 1000 bp

Die weiteren DNA-Fragmente werden entweder in einem 4:1, oder 8:1 Verhältnis eingesetzt

4:1 für Fragmente die im Verhältnis 1/2-1/4 zum Vektorrückgrad stehen

8:1 für Fragmente die im Verhältnis <1/4 zum Vektorrückgrad stehen

Beispielrechnung zu Ermittlung der Menge der Inserts (Verhältnis 8:1):

Größe des Vektorrückgrads (kbp) x 12 = Masse Vektorrückgrad (ng)

$$Masse\ Insert\ (ng) = \frac{Masse\ Vektorrückgrad\ (ng) \times Größe\ Insert\ (kbp)}{Größe\ Vektorrückgrad\ (kbp) \times 8}$$

7.2.1.6 Ligation

Ligationen wurden mit Hilfe der T4 DNA Ligase von NEB durchgeführt.

Tab 9:Ligationsansatz

Komponente	Volumen
Vecktorrückgrad (100 ng)	X µl
Insert (3:1)	X µl
10x T4 DNA Ligasepuffer	1,5 µl
T4 DNA Ligase	1 µl
dH ₂ O	auffüllen auf 15 µl

Das Insert für die Ligation wird im Verhältnis 3:1 zum Vektorrückgrad eingesetzt und nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Masse des Inserts (ng)} = \frac{\text{Masse des Vektorrückgrads (ng)} \times \text{Insertgröße (kb)}}{\text{Größe des Vektorrückgrads (kb)}} \times 3:1$$

$$\text{Volumen des Inserts (}\mu\text{l)} = \frac{\text{Masse des Inserts (ng)}}{\text{DNA Konzentration des Inserts } \left(\frac{\text{ng}}{\mu\text{l}}\right)}$$

Der Ligationsansatz wurde entweder für 60 min. bei Raumtemperatur, oder über Nacht bei 18°C inkubiert und anschließend mit chemisch kompetenten DH5α Bakterien transformiert.

7.2.1.7 Transformation chemisch kompetenter Bakterien

Die Transformation chemisch kompetenter DH5α und TOP10 Bakterien wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

- Auftauen der Zellen auf Eis
- Zugabe des zu transformierenden Vektors zu den Bakterien
- Inkubation des Transformationsansatzes für 30 min. auf Eis
- Inkubation des Transformationsansatzes für 90 sek. auf 42°C (Hitzeschock)
- Inkubation des Transformationsansatzes für 3 min. auf Eis
- Zugabe von 1 ml LB-Medium
- Inkubation des Transformationsansatzes für 60 min. bei 37°C (unter schütteln)
- Zentrifugation des Transformationsansatzes für 20 sek. bei 8000 rpm.
- Verwerfen des Überstandes
- Resuspension der Bakterien in 100 µl LB-Medium
- Auftragen der resuspendierten Bakterien auf LB-Agar Platten (Ampicillin)
- Inkubation der Platten bei 37°C über Nacht

7.2.1.8 Restriktionsspaltung

DNA Restriktionsspaltungen wurden mittels Restriktionsendonukleasen von der Firma New England Biolabs durchgeführt.

Tab 10: Restriktionsansatz

Komponente	Volumen
DNA (1µg)	X µl
10x NEB Puffer	5 µl
Restriktionsendonuklease	1 µl (10 U)
dH ₂ O	auffüllen auf 50 µl

Der Restriktionsansatz wurde für 60 min. auf 37°C inkubiert und anschließend mittels einer Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt.

7.2.1.9 Sequenzierung

Sanger DNA-Sequenzierungen wurden durch die Firma Seqlab (Microsynth) durchgeführt. Die DNA und die verwendeten Primer wurden nach folgendem Schema vorbereitet und an Seqlab gesendet:

7.2.2 Herstellung transgener Notch-Konstrukte

Die Konstrukte *pUAS-attB-N-HA* und *pUAS-attB-N^{K2R}-HA* wurden aus den vorherigen Konstrukten *pUAS-attB-N^{TM-N1}-HA* und *pUAS-attB-N^{TM-N1-K2R}-HA* erzeugt (Masterarbeit Schnute, 2013). Bei den Konstrukten *N^{TM-N1}-HA* und *N^{TM-N1-K2R}-HA* wurde anstelle der Sequenz der *Drosophila* Notch-Transmembrandomäne die Transmembrandomäne des N1-Rezeptors verwendet. Bei den Konstrukten *N-HA* und *N^{K2R}-HA* wurde die Sequenz der N1-Transmembrandomäne gegen die Sequenz der Transmembrandomäne des *Drosophila* Notch-Rezeptors ausgetauscht.

Die Sequenz aller hergestellten Konstrukte wurde mittels DNA-Sequenzierung verifiziert.

Herstellung von *pUAS-attB-N-HA*:

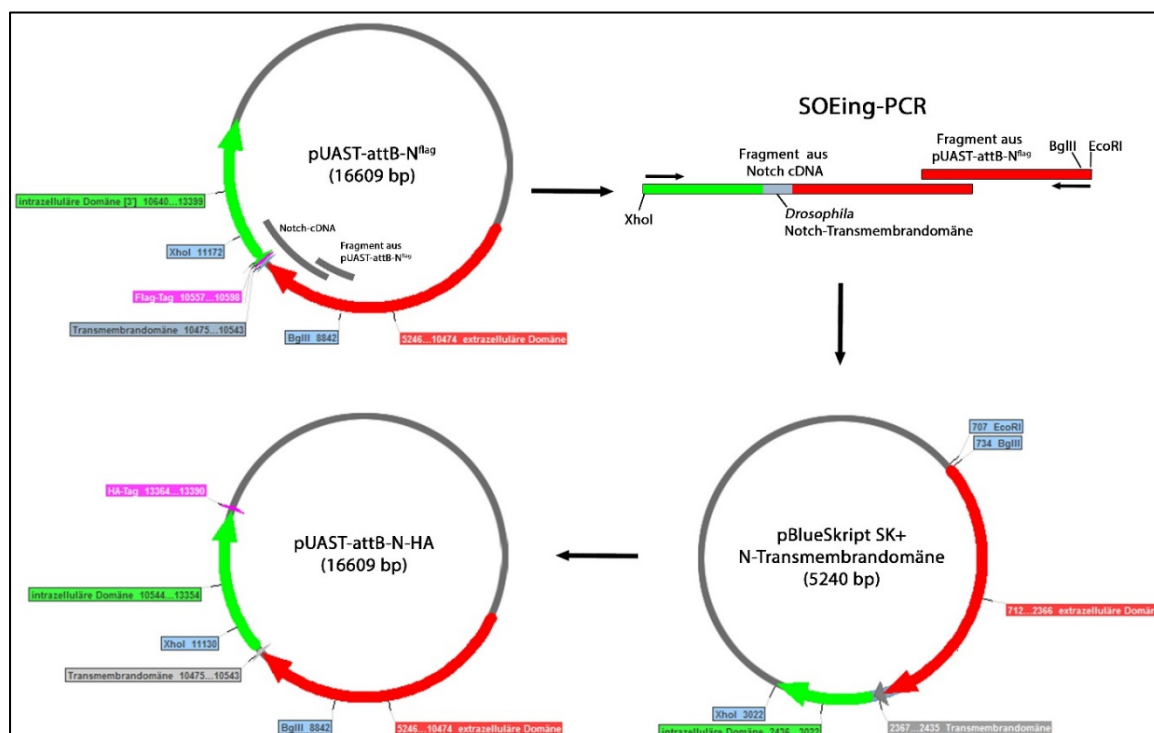


Abb. 48: Schematische Darstellung der Herstellung des Vektors *pUAS-attB-N-HA*.

Um die Transmembrandomäne des N^{TM-N1}-HA Konstruktes durch die *Drosophila* Notch-Transmembrandomäne auszutauschen, wurde eine unvollständige Notch cDNA (DGRC FBcl0173433) und der Vektor *pUAS-attB-N^{flag}* (Gaby Altmann 2006) verwendet.

Der Sequenzabschnitt zwischen den Restriktionsschnittstellen BglII und XhoI umfasst die Transmembrandomäne. Dieser Teil wurde mit Hilfe von zwei PCR-Fragmenten aus der cDNA (Primer: *N-cDNA Fusion for* und *N-cDNA rev (XhoI)*) und dem *pUAS-attB-N^{flag}* Vektor (Primer: *N-FLAG-HA EcoRI for* und *N-FLAG-HA Fusion rev*) amplifiziert. Die Fragmente verfügen über Überhänge mit komplementären Sequenzen. Am 5' Ende wurde neben der BglII Schnittstelle eine zusätzliche EcoRI Schnittstelle angefügt. Die PCR-Fragmente wurden mit Hilfe einer SOEing (splicing by overlap extension) -PCR fusioniert (Primer: *N-FLAG-HA EcoRI for* und *N-cDNA rev (XhoI)*) und über die Schnittstellen EcoRI und XhoI mit dem *pBlueSkript KS+* Vektor ligiert (*pBlueSkript KS+ N-Transmembrandomäne*).

Um anschließend die amplifizierte Sequenz mit der *Drosophila* Notch-Transmembrandomäne gegen die N1-Transmembrandomäne des *pUAS-attB-N^{TM-N1}-HA* Vektors auszutauschen, wurden die Vektoren *pBlueSkript-N-Transmembrandomäne* und *pUAS-attB-N^{TM-N1}-HA* mit den Restriktionsenzymen BglII und XhoI geschnitten. Anschließend wurde das Vektorrückgrad von *pUAS-attB-N^{TM-N1}-HA* mit dem Insert aus *pBlueSkript-N-Transmembrandomäne* ligiert.

Der auf diese Weise hergestellte Vektor verfügt über die *Drosophila* Notch-Transmembrandomäne und wird als *pUAS-attB-N-HA* bezeichnet.

Herstellung von *pUAS-attB-N^{K2R}-HA*:

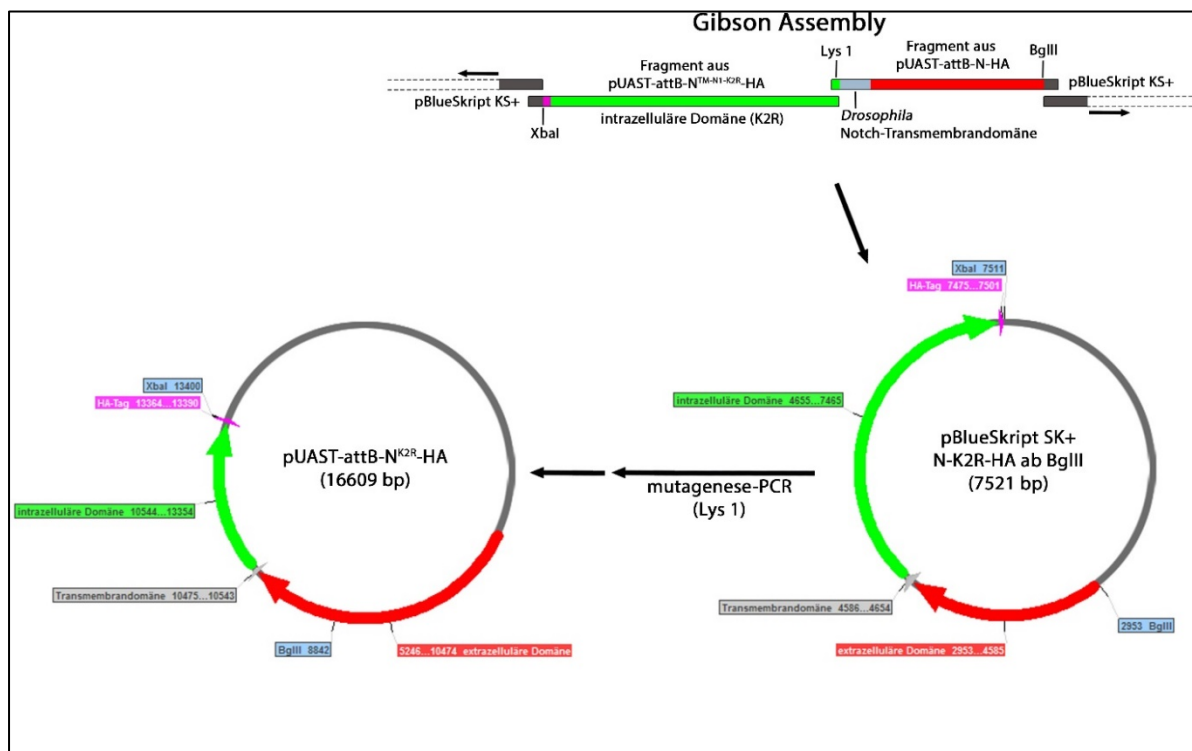


Abb. 49: Schematische Darstellung der Herstellung des *pUAS-attB-N^{K2R}-HA* Vektors.

Für die Herstellung des *pUAST-attB-N^{K2R}-HA* Vektors wurde der bereits hergestellte *pUAST-attB-N-HA* Vektor und der *pUAST-attB-N^{TM-N1-K2R}-HA* verwendet (Masterarbeit Schnute, 2013). Das Konstrukt wurde mit Hilfe von Gibson Assembly hergestellt.

Die Sequenz der extrazellulären Domäne ab der BglII Restriktionsschnittstelle einschließlich der Transmembrandomäne wurden aus dem *pUAST-attB-N-HA* Vektor amplifiziert und mit Überhängen zu dem *pBlueSkript KS+* und zu der Sequenz der intrazellulären Domäne des *pUAST-attB-N^{TM-N1-K2R}-HA* versehen (Primer: *N-ECD ab BglII BS for* und *G N-HA TM N-K2R ICD rev*).

Die Sequenz der intrazellulären Domäne mit den Lysinaustauschen wurde aus dem *pUAST-attB-N^{TM-N1-K2R}-HA* amplifiziert und mit Überhängen zu dem amplifizierten Fragment aus *pUAST-attB-N-HA* und zu dem *pBlueSkript KS+* Vektor versehen (Primer: *G N-K2R ICD N-HA for* und *N-K2R NICD BS rev*).

Der *pBlueSkript KS+* Vektor wurde mit den Restriktionsenzymen BamHI und KpnI geschnitten und somit linearisiert.

Die drei Fragmente mit überlappenden Sequenzen wurden mittels Gibson Assembly fusioniert. Der entstandene Vektor verfügt über die Sequenz der extrazellulären Domäne, der *Drosophila* Notch-Transmembrandomäne und der intrazellulären Domäne mit den Lysinaustauschen (*pBlueSkript SK+ N-K2R-HA ab BglII*).

Bei dem entstandenen Fragment war allerdings weiterhin ein Lysin nahe der Transmembrandomäne aus dem *pUAST-attB-N-HA* Fragment vorhanden. Die DNA-Sequenz des Lysins wurde im *pBlueSkript KS+ N-K2R-HA ab BglII* Vektor mittels Mutagenese-PCR gegen die Sequenz eines Arginins ausgetauscht (Primer: *QC K2R (1) for* und *QC K2R (1) rev*).

Um das hergestellte Fragment im *pUAST-attB-N^{TM-N1-K2R}-HA* Vektor zu ersetzen, wurde sowohl der *pBlueSkript KS+ N-K2R-HA ab BglII* Vektor, als auch der *pUAST-attB-N^{TM-N1-K2R}-HA* Vektor mit den Restriktionsenzymen BglII und XbaI geschnitten. Das Vektorrückgrad von *pUAST-attB-N^{TM-N1-K2R}-HA* wurde anschließend mit dem Insert aus *pBlueSkript KS+ N-K2R-HA ab BglII* ligiert. Der auf diese Weise hergestellte Vektor verfügt über die Sequenz des vollständigen Notch-Rezeptor mit der *Drosophila* Notch-Transmembrandomäne und den intrazellulären Lysinaustauschen (*pUAST-attB-N^{K2R}-HA*).

Herstellung von *pUAST-attB-N^{LL2AA}-HA* und *pUAST-attB-N^{K2R-LL2AA}-HA*:

Für die Herstellung der Vektoren *pUAST-attB-N^{LL2AA}-HA* und *pUAST-attB-N^{K2R-LL2AA}-HA* wurde eine Mutagenese-PCR durchgeführt.

Da die Mutagenese-PCR auf Grund der geringeren Größe mit Hilfe des *pBlueSkript KS+* Vektors durchgeführt werden sollte, wurde der Vektor *pUAST-attB-N-HA* mit den Restriktionsenzymen BglII und XbaI geschnitten. Anschließend wurde der bereits hergestellte Vektor *pBlueSkript KS+ N-K2R-HA ab BglII* ebenfalls mit BglII und XbaI geschnitten und das Insert des *pBlueSkript*

KS+ N-K2R-HA ab BglII Vektors durch das geschnittene N-HA Insert ausgetauscht. Der so entstandene Vektor *pBlueSkript KS+ N-HA ab BglII* und der Vektor *pBlueSkript KS+ N-K2R-HA ab BglII* wurden für die mutagenese PCR verwendet (Primer: *QC dileucine LL2AA for* und *QC dileucine LL2AA rev*).

Die hergestellten Vektoren *pBlueSkript KS+ N-LL2AA-HA ab BglII* und *pBlueSkript KS+ N-LL2AA-K2R-HA ab BglII* wurden mittels *BglII* und *XbaI* geschnitten und die Inserts in den Vektoren *pUAST-attB-N-HA* und *pUAST-attB-N^{K2R}-HA* ausgetauscht.

Herstellung von *pUAST-attB-N^{ΔEGF(11-12)}-HA* und *pUAST-attB-N^{ΔEGF(11-12)-K2R}-HA*:

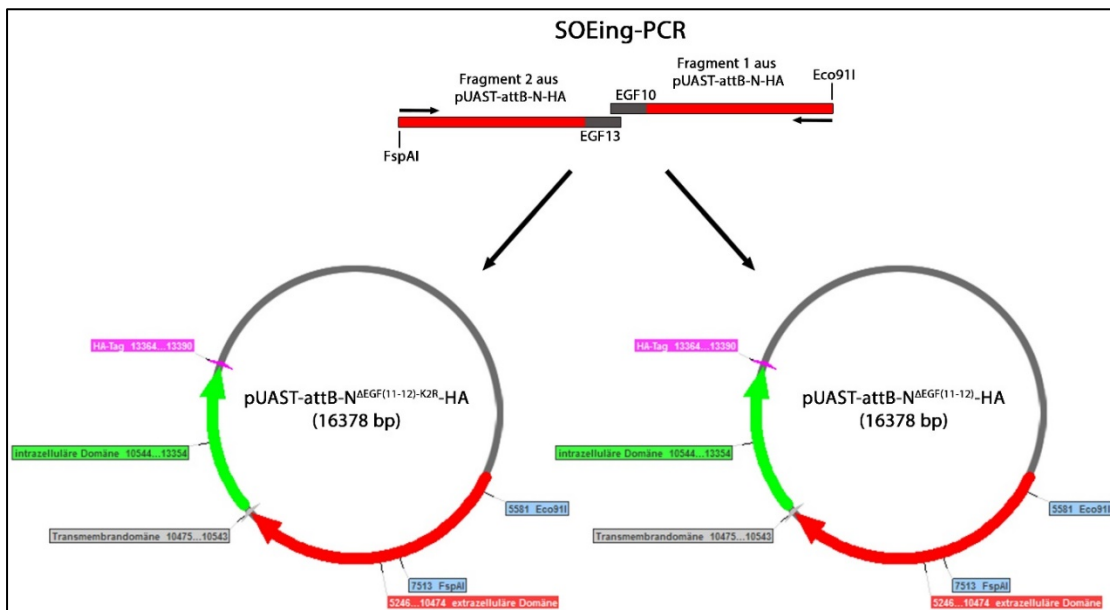


Abb. 50: Schematische Darstellung der Herstellung der Vektoren *pUAST-attB-N^{ΔEGF(11-12)}-HA* und *pUAST-attB-N^{ΔEGF(11-12)-K2R}-HA*.

Für die Herstellung der Vektoren *pUAST-attB-N^{ΔEGF(11-12)}-HA* und *pUAST-attB-N^{ΔEGF(11-12)-K2R}-HA* wurde eine SOEing-PCR durchgeführt. Als Template wurde der Vektor *pUAST-attB-N-HA* verwendet. Aus diesem Vektor wurden zwei Fragmente amplifiziert. Das erste Fragment wurde von der *Eco91I* Restriktionsschnittstelle bis einschließlich der Sequenz der EGF-Wiederholung 10 amplifiziert (Primer: *EGF1112 frag1 for* und *EGF1112 frag1 rev*). Das zweite Fragment wurde von der *FspAI* Restriktionsschnittstelle bis einschließlich der Sequenz der EGF-Wiederholung 13 amplifiziert (Primer: *EGF1112 frag2 for* und *EGF1112 frag2 rev*). Beide Fragmente wurden mit komplementären Überhängen zu der Sequenz der EGF-Wiederholungen 10 und 13 versehen. Mit Hilfe einer SOEing-PCR wurden beide Fragmente anschließend fusioniert (Primer: *EGF1112 frag1 for* und *EGF1112 frag2 rev*).

Das auf diese Weise hergestellte PCR-Produkt, sowie die Vektoren *pUAST-attB-N-HA* und *pUAST-attB-N^{K2R}-HA* wurden mit den Restriktionsenzymen *Eco91I* und *FspAI* geschnitten. Das PCR-Produkt wurde anschließend mit dem Vektorrückgrad von *pUAST-attB-N-HA* und *pUAST-attB-N^{K2R}-HA* ligiert.

Herstellung von *pUAST-attB-NICD-HA* und *pUAST-attB-NICD^{K2R}-HA*:

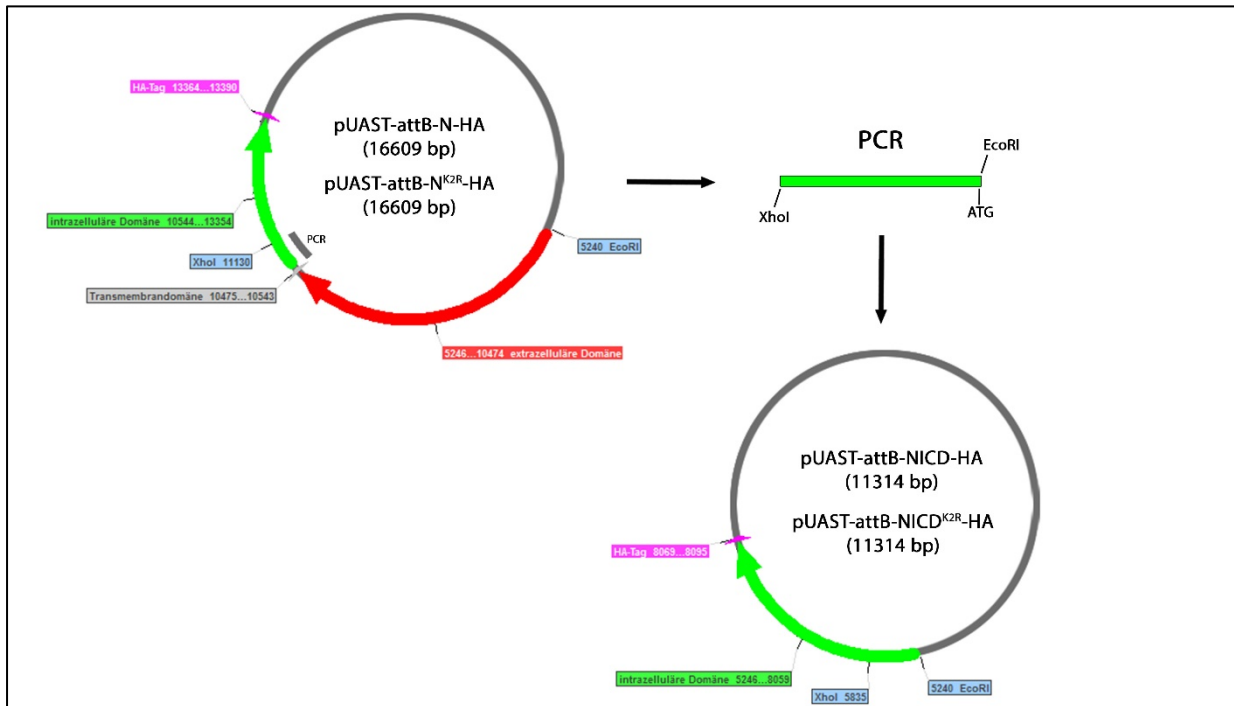


Abb. 51: Schematische Darstellung der Herstellung der Vektoren *pUAST-attB-NICD-HA* und *pUAST-attB-NICD^{K2R}-HA*

Um die Vektoren *pUAST-attB-NICD-HA* und *pUAST-attB-NICD^{K2R}-HA* herzustellen wurde die intrazellulären Domänen aus *pUAST-attB-N-HA* und *pUAST-attB-N^{K2R}-HA* bis zur XhoI Restriktionsschnittstelle amplifiziert und mit einem ATG Startcodon und einer EcoRI Restriktionsschnittstelle versehen (Primer NICD-HA: *NICD-HA ATG EcoRI for* und *NICD-HA rev* / Primer NICD^{K2R}-HA: *NICD^{K2R}-HA ATG EcoRI for* und *NICD^{K2R}-HA rev*). Die Vektoren *pUAST-attB-N-HA* und *pUAST-attB-N^{K2R}-HA* und die PCR-Produkte wurden anschließend mittels EcoRI und XhoI geschnitten. Das Vektorrückgrad wurde mit den PCR-Produkten ligiert.

7.2.3 Immunhistochemische Färbung von Flügelimaginalscheiben

Um eine Antikörperfärbung an Flügelimaginalscheiben durchzuführen wurden *D. melanogaster* Larven des dritten Larvenstadiums in kaltem PBS frei präpariert. Die Larven wurden in zwei Hälften geteilt. Die vordere Hälfte wurde umgestülpt und der Darm sowie das Fettgewebe entfernt. Die Larvenhälften wurden in Siebchen in 24er-Multiwellplatten überführt. Die immunhistochemische Färbung wurde anschließend nach folgendem Protokoll durchgeführt (Klein, 2008):

- Fixierung der Larvenhälften in 4% Paraformaldehyd für 30 min.
- 3x 10 min. waschen in 0,3% PBT

- 30 min. Blockieren (Blockierlösung: 5% NGS in 0,3% PBT)
- 90 min. Inkubation mit primären Antikörpern in 500 µl Blockierlösung
- 3x 15 min. waschen in 0,3% PBT
- 60 min. Inkubation mit sekundären Antikörpern in 500 µl Blockierlösung
- 1x 10 min. waschen in 0,3% PBT
- 4 min. Inkubation mit Hoechst-33258 (1:100 Gebrauchslösung) in 500 µl 0,3% PBT (Stammlösung: 5mg/ml in dH₂O Gebrauchslösung: 50µg/ml in dH₂O)
- 2x 10 min. waschen in 0,3% PBT
- Lagerung in PBS auf 4°C

Die anschließende Freipräparation der Imaginalscheiben erfolgte in kaltem PBS. Die Flügelimaginalscheiben wurden auf einen Objektträger überführt und in Vectashield eingebettet.

7.2.4 Immunhistochemische Färbung von Western Blots

Die immunhistochemische Färbung von Western Blots wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

- Überführen der Membran in ein 50 ml Falcon-Reaktionsgefäß
- Blockieren der Membran für 1h in 5 ml Blockierlösung (5% Milchpulver in PBS)
- Verwerfen der Blockierlösung und Zugabe des primären Antikörpers in 5 ml Färbelösung (2% Milchpulver in PBS)
- Inkubation auf 4°C über Nacht (unter Rotation)
- 3x waschen der Membran in PBT (0,1% Tween20 in PBS) für 20 min.
- Zugabe des sekundären Antikörpers in 5 ml Färbelösung (2% Milchpulver in PBS)
- Inkubation für 1h bei Raumtemperatur (unter Rotation)
- 3x waschen der Membran in PBT (0,1% Tween20 in PBS) für 20 min.
- Lagerung der Membran in PBS

Bei einer weiteren Färbung der Membran wurden die zuvor verwendeten Antikörper durch „Stripping“ von der Membran gelöst. Dieser Vorgang wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

- Aufwärmen des Stripping-Puffers auf 50°C in einer geschlossenen Glasschale unter dem Abzug
- Überführen der Membran in die Glasschale und Inkubation für 45 min. bei 50°C
- Waschen der Membran unter fließendem Wasser für 30 min.
- Überführen der Membran in ein 50 ml Falcon-Reaktionsgefäß

- 5x waschen der Membran in PBT (0,1% Tween20 in PBS) für 10 min.
- Erneutes blockieren der Membran für 1h in 5 ml Blockierlösung (5% Milchpulver in PBS)
- Anschließend kann eine Färbung mit weiteren Antikörpern nach dem Standardprotokoll durchgeführt werden.

7.2.5 Immunhistochemische Färbung von S2 Zellen

Immunhistochemische-Färbungen von S2 Zellen wurden nach folgendem Protokoll durchgeführt:

- Präparation von poly-l-Lysin beschichteten Deckgläschen:
 - o Überführen von 3 ml poly-l-Lysin Lösung (0,01% in dH₂O) 6er-Multiwellplatten
 - o Überführen einzelner Deckgläschen in die poly-l-Lysin Lösung
 - o Inkubation für 10 min. bei Raumtemperatur (unter schütteln)
 - o Entfernen der poly-l-Lysin-Lösung und Zugabe von dH₂O
 - o Überführen der einzelnen Deckgläschen in 100% Ethanol
 - o Trocknen der Deckgläschen bei 37°C
- Lösen der Zellen in Schneidersmedium durch vorsichtiges Pipettieren)
- Übertragen von 500 µl Zellsuspension auf poly-l-Lysin beschichtete Deckgläschen.
- Inkubation für 30 min. bei Raumtemperatur
- 1x kurzes waschen in PBS
- Fixierung der Zellen in 1 ml 4% Paraformaldehyd für 30 min. bei Raumtemperatur
- 2x kurzes waschen in PBS
- Permeabilisierung der Zellen durch Zugabe von 1 ml 0,2% PBT für 15 min. bei Raumtemperatur
- 2x kurzes waschen in PBS
- 1h Blockieren der Zellen in 1 ml Blockierlösung (0,1% NGS in PBS)
- 2h Inkubation mit primären Antikörpern in 50µl Blockierlösung
- 2x kurzes waschen in PBS
- 30 min. Inkubation mit sekundären Antikörpern in 50 µl Blockierlösung
- 2x kurzes waschen in PBS

Die mit Zellen besetzten Deckgläschen wurden anschließend in Vectashield auf einem Objektträger eingedeckelt.

7.2.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese zur Auftrennung von Proteinen

Die Polyacrylamid-Gelelektrophoresen wurden unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt. Dazu wurden die Lysate mit 4x Lämmli-Puffer auf 95°C für 10 min. inkubiert und anschließend in einem Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Für das Sammelgel wurde eine Acrylamid Konzentration von 5% und für das Trenngel von 8% verwendet.

Komponente	8% Trenngel	5% Sammelgel
Rotiphorese Gel 30 (37,5:1)	2,66 ml	0,5 ml
4x Trenngel- bzw. Sammelgelpuffer	2,5 ml	0,75 ml
H ₂ O	4,68 ml	1,688 ml
10% APS	134 µl	60 µl
TEMED	10 µl	3 µl

7.2.7 Western Blot mittels Semy-Dry-Blotverfahren

Um aufgetrennte Proteine aus einem Polyacrylamid-Gel auf eine Trägermembran zu transferieren wurden Western Blots nach dem Semy-Dry Verfahren durchgeführt.

Dazu wurden Filterpapiere mit Transferpuffer getränkt und auf der Anodenplatte platziert. Als Trägermembran wurde eine PVDF Membran verwendet, die für 5 min. in Methanol inkubiert wurde. Anschließend wurde die Trägermembran auf den Filterpapieren platziert. Auf die Trägermembran wurde das Polyacrylamid-Gel gelegt und mit weiteren Filterpapieren abgedeckt. Anschließend wurde die Apparatur mit dem Kathodendeckel geschlossen. Der Transfer wurde für 60 min. bei einer konstanten Stromstärke von 0,2 Ampere durchgeführt.

7.2.8 S2 Zellkultur

Drosophila S2 Schneiderzellen wurden in einem 25°C Inkubator in 100 mm Zellkulturschalen gehalten. Als Kulturmedium wurde Schneider's Medium des Herstellers Pan Biotech mit Penicillin/Streptomycin und FBS verwendet. Eine Passagierung der Zellen fand alle 2-3 Tage bei einer Konfluenz von 50-200% statt. Die Passagierung der Zellen wurde wie folgt unter einer Sterilbank durchgeführt:

- Aufwärmen des Schneiders-Medium auf 25°C
- Vorbereitung von 2-3 100mm Zellkulturschalen mit 10 ml Schneiders-Medium
- Absaugen von altem Schneiders-Medium von den zu passagierenden Zellen.
- Zugabe von 10 ml frischem Schneiders-Medium und ablösen der Zellen durch

vorsichtiges Pipettieren

- Überführen der Zellen in ein 15 ml Falcon-Reaktionsgefäß.
- Mehrmaliges Invertieren der Zellen
- Überführen von 0,5 ml der Zellsuspension zu den vorbereiteten Zellkulturschalen
- Mehrmaliges schwenken der Zellkulturschalen
- Lagerung der Zellen im 25°C Inkubator

7.2.9 Transfektion von S2 Zellen

Die Transfektion von S2 Zellen wurde mit der Transfektionsreagenz Effectene der Firma Quiagen durchgeführt. S2 Zellen wurden bei einer Konfluenz von 50% transfiziert. Wenn nicht anders angegeben, erfolgte die Transfektion in 12er-Multiwellplatten. Je nach Experiment wurde die Konzentration der DNA variiert.

Die Verwendung von Effectene erfolgte nach Herstellerangaben.

Tab 11: Transfektionsansatz

Komponente	Volumen
DNA (0,3 µg)	X µl
Enhancer	2,4 µl
Buffer EC	75 µl
Effectene	6 µl
Schneider's Medium	auffüllen auf 800 µl

Die Transfektion der Zellen wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

- Ansetzen des DNA-Mastermix
- Zugabe des EC Puffers
- Zugabe des Enhancers
- Vortexen für 1 sek. und Inkubation für 2-5 min. bei Raumtemperatur
- Zugabe von Effectene
- Vortexen für 10 sek. und Inkubation für 5-10 min. bei Raumtemperatur
- Zugabe von Schneider's Medium
- Tröpfchenweise Zugabe des Transfektionsansatzes zu den Zellen
- Inkubation der Zellen für 2 Tage auf 25°C

7.2.10 Luciferase-Assay zur Quantifizierung der Notch-Aktivität in S2 Zellen

Bei einem Luciferase-Assay handelt es sich um eine Methode, bei der mit Hilfe von Chemilumineszenz die Aktivität von Reporterkonstrukten quantifiziert werden kann. Dabei führt die Umsetzung eines Substrats durch die Aktivität der Luciferase zu einer Chemilumineszenz die gemessen werden kann. Zur Quantifizierung der Notch-Aktivität wurde das Dual-Glo Luciferase-System der Firma Promega verwendet. Mit Hilfe dieses Systems lässt sich die Aktivität von zwei verschiedenen Luciferase-Varianten messen.

Als Reporter für die Notch-Aktivität wurde das Konstrukt NRE-Fluc verwendet (Expression der Firefly Luciferase unter Kontrolle von NRE) (Bray et al., 2005). Für die Messung der Transfektionseffizienz wurde das Konstrukt act-Rluc verwendet (Expression der Renilla Luciferase unter Kontrolle des *actin*-Promotors) Die Messung der Luciferaseaktivität wurde mit dem SynergyMx Platerader der Firma BioTek Instruments durchgeführt. Für den Luciferase-Assays wurde folgender Transfektionsansatz verwendet:

Tab 12: Luciferase-Assay Transfektionsansatz

Komponente	Volumen
pUAST-attB-N-HA oder pUAST-attB-N ^{K2R} -HA (10 ng/μl)	2 μl
pMT-GAL4 (10 ng/μl)	2 μl
NRE-Fluc (100 ng/μl)	1 μl
Act-Rluc (100 ng/μl)	1 μl
Enhancer	2,4 μl
Buffer EC	75 μl
Effectene	6 μl
Schneidersmedium	auffüllen auf 800 μl

Nach Zugabe des Transfektionsansatzes wurden die Zellen für 24h auf 25°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde 20 μl frisches Schneider's Medium in 96er-Microwellplatten vorgelegt. Anschließend wurden 80 μl der transfizierten Zellen zugegeben und für weitere 24h auf 25°C inkubiert. Um die Expression der Konstrukte zu starten folgte nach der Inkubation die Zugabe von 20μl (5mM) CuSO₄ und eine weitere Inkubation für 24h.

Der Luciferase-Assay wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

- Auftauen des Dual-Glo Puffers und Zugabe von 50% PBS
- Entfernen des Schneidersmediums aus der 96er-Multiwellplatte
- Zugabe von 50 μl (50%) Dual-Glo Puffers pro Well

- 10 min. Inkubation bei Raumtemperatur (unter schütteln)
- Messung der Firefly Luciferase-Aktivität
- Auftauen des Stop&Glo Puffers und Zugabe von 50% PBS
- Zugabe des Stop&Glo Substartes (1 µl pro 200 µl 50% Puffer)
- Zugabe von 50 µl (50%) Stop&Glo Puffers pro Well
- 5 min. Inkubation bei Raumtemperatur (unter schütteln)
- Messung der Renilla Luciferase-Aktivität

Für den Luciferase-Assay wurde eine Dreifachmessung von jeder Probe durchgeführt. Die Aktivität der Firefly Luciferase wurde anschließend auf die Aktivität der Renilla Luciferase normalisiert.

7.2.11 Notch Uptake-Assay in S2 Zellen

Für den Uptake-Assay wurde folgender Transfektionsansatz verwendet:

Tab 13: Notch Uptake-Assay Transfektionsansatz

Komponente	Volumen
pUAST-attB-N-HA oder pUAST-attB-N ^{K2R} -HA (100 µg/µl)	1 µl
pMT-GAL4 (100 µg/µl)	1 µl
Enhancer	2,4 µl
Buffer EC	75 µl
Effectene	6 µl
Schneider's Medium	auffüllen auf 800 µl

Nach Zugabe des Transfektionsansatzes wurden die Zellen für 48h auf 25°C inkubiert. Um die Expression der Konstrukte zu starten, folgte nach der Inkubation die Zugabe von 10 µl CuSO₄ (Stammlösung: 100 mM) und eine weitere Inkubation für 24h auf 25°C.

Der Uptake-Assay wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

- Lösen der Zellen in Schneider's Medium (durch vorsichtiges Pipettieren)
- Übertragen von 500 µl Zellsuspension auf poly-l-Lysin beschichtete Deckgläschen (siehe 7.2.5)
- Inkubation für 30 min. bei Raumtemperatur
- Überführen der Wellplatte auf Eis
- 1x kurzes waschen in vorgekühltem Schneider's Medium (4°C)

- Zugabe des NECD-Antikörpers (DSHB C458.2H) 1:100 in 50 μ l vorgekühltem Schneider's Medium (4°C)
- 15 min. Inkubation auf Eis
- Entfernen des Antikörpers und waschen mit 1 ml Schneider's Medium (4°C)
- Zugabe von 1 ml vorgewärmtem Schneider's Medium (25°C)
- Inkubation der Zellen auf 25°C
- Fixierung der Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten in 1 ml 4% Paraformaldehyd für 30 min. bei Raumtemperatur
- Die nachfolgende Färbung mit weiteren primären und sekundären Antikörpern wurde nach dem Standardprotokoll durchgeführt (siehe 7.2.5)

7.2.12 Ubiquitinierungs-Assay

Für den Ubiquitinierungs-Assay wurden S2 Zellen in 6er-Mikrowellplatten mit dem folgenden Transfektionsansatz transfiziert:

Tab 14: Transfektionsansatz für den Ubiquitinierungs-Assay

Komponente	Volumen
pUAST-attB-N-HA/ pUAST-attB-N ^{K2R} -HA (100 ng/ μ l)	5 μ l
pMT-Gal4 (100 ng/ μ l)	5 μ l
pMT-Ubi-Flag / pMT-Ubi-Flag ^{mono} (100 ng/ μ l)	1 μ l
pMT-Dx ^{V5} / pMT-Su(dx) ^{V5} / pMT (Leervektor) (100 ng/ μ l)	5 μ l
Enhancer	12 μ l
Buffer EC	144 μ l
Effectene	8 μ l
Schneidersmedium	auffüllen auf 600 μ l

Der Assay wurde mit folgenden Transfektionskombinationen durchgeführt:

Kombination	Transfektionsansatz
1	pUAST-attB-N-HA / pMT-GAL4 /pMT-Ubi-Flag / pMT-Su(dx) ^{V5}
2	pUAST-attB-N-HA / pMT-GAL4 /pMT-Ubi-Flag ^{mono} / pMT-Dx ^{V5}
3	pUAST-attB-N ^{K2R} -HA / pMT-Gal4 /pMT-Ubi-Flag / pMT-Su(dx) ^{V5}
4	pUAST-attB-N ^{K2R} -HA / pMT-Gal4 /pMT-Ubi-Flag ^{mono} / pMT-Dx ^{V5}

Nach Zugabe des Transfektionsansatzes wurden die Zellen für 48h auf 25°C inkubiert. Um die Expression der Konstrukte zu starten, folgte nach der Inkubation die Zugabe von 20 µl CuSO₄ (Stammlösung: 100 mM) und eine weitere Inkubation für 24h auf 18°C.

Nach der Expression der Konstrukte wurden die Zellen nach folgenden Protokollen behandelt:

Dx abhängige Ubiquitinierung (Kombination: 2/4):

- Entfernen des Schneider's Mediums und Zugabe von 150 µl Notch-Ubiquitinierungspuffer
- Lyse der Zellen auf Eis (unter schütteln)

Su(dx) abhängige Ubiquitinierung (Kombination: 1/3):

- Zugabe von 50 µM MG132, 10 mM NH₄Cl und 200µM Chloroquine
- Inkubation der Zellen für 1h auf 18°C
- Inkubation der Zellen für 15 min. auf 29°C
- Entfernen des Schneider's Medium und Zugabe von 150 µl Notch-Ubiquitinierungspuffer
- Lyse der Zellen auf Eis (unter schütteln)

Pull-down:

- Überführen des Zelllysates in 1,5 ml Reaktionsgefäße
- Zentrifugation bei 13000g für 10 min auf 4°C
- Überführen des Überstandes in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß auf Eis
- 2x waschen der Agarose HA-Beads (30 µl pro Probe) mit Notch-Ubiquitinierungspuffer
- Entfernen des Notch-Ubiquitinierungspuffer von den Beads bis auf 30 µl
- Überführen von 30 µl Beads zu dem Zelllysat-Überstand
- Inkubation der Proben für 60 min. bei 4°C (unter Rotation)
- Zentrifugation der Proben bei 13000g für 10 sek.
- Verwerfen des Überstandes und 2x waschen der Beads in Notch-Ubiquitinierungspuffer
- Zentrifugation der Proben bei 13000g für 10 sek.
- Verwerfen des Überstandes bis auf 30 µl
- Zugabe von 4x Laemmli-Puffer
- Inkubation der Proben bei 70°C für 10 min.
- Einfrieren der Proben bei -80°C

Die Proben wurden anschließend mittels SDS-PAGE (siehe 7.2.6) aufgetrennt und mit Hilfe eines Western Blots auf eine PVDF-Membran übertragen (siehe 7.2.7). Die immunhistochemische Färbung der Proteine erfolgte nach dem Standardprotokoll (7.2.4). Folgende Antikörper wurden für die Detektion verwendet:

Primäre Antikörper	Sekundäre Antikörper
HA (Kaninchen)	Kaninchen IRDye 680RD (Ziege)
Flag (Maus)	Maus IRDye 800CW (Ziege)

7.2.13 Isolierung von Notch-Proteinen aus *Drosophila* Larven

Um die Proteine von transgenen Notch-Konstrukten mittels eines Western Blot zu detektieren, wurden N-HA und N^{K2R}-HA unter Kontrolle des *tub*-Gal4 Treibers für 24h exprimiert und jeweils 30 Larven des dritten Larvenstadiums präpariert.

Die Präparation der Larven wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

- Teilen der Larven in zwei Hälften und umstülpen der vorderen Hälfte in kaltem PBS
- Entfernen des Darms, sowie des Fettgewebes
- Überführung der vorderen Larvenhälften in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß in PBS auf Eis

- Entfernen von PBS und Zugabe von 150 µl vorgekühltem Notch-Lysispuffer (4°C)
- Zugabe von Protease Inhibitor Cocktail (1:200)
- Zugabe einer Spatelspitze Glasperlen
- Mörsern der Larvenhälften auf Eis
- Zentrifugation der Proben bei 13000g für 10 min. bei 4°C (durch die Zentrifugation bildet sich ein Fettdeckel an der Oberfläche des Lysates. Am Grund des Reaktionsgefäßes befinden sich die Glasperlen und die Kutikula.)
- Vorsichtiges absaugen des Lysates zwischen dem Fettdeckel und der Kutikula
- Überführen des Lysates in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß auf Eis.
- Zentrifugation der Proben bei 13000g für 10 min. bei 4°C
- Vorsichtiges absaugen des Lysates unterhalb des Fettdeckels
- Überführen des Lysates in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß auf Eis.
- Den Zentrifugationsschritt solange wiederholen bis kein Fettdeckel mehr entsteht.
- Ermitteln des Lysatvolumens und Zugabe von 4 x Laemmli-Puffer
- Inkubation der Proben bei 95°C für 10 min.
- Einfrieren der Proben bei -70°C

Anschließend wurden 50 µl der Proben mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit Hilfe eines Western Blots auf eine PVDF-Membran übertragen. Die Immunhistochemische-Färbung der Proteine erfolgte nach dem Standardprotokoll (7.2.4). Folgende Antikörper wurden für die Detektion verwendet:

Primäre Antikörper	Sekundäre Antikörper
HA (Ratte)	Ratte HRP (Ziege)

Die Detektion erfolgte mittels Chemilumineszenz durch die Zugabe der ECL-Lösung Sirius von der Firma Advansta und wurde nach Herstellerangaben durchgeführt.

Anschließend wurden die Antikörper durch „Stripping“ von der Membran gelöst. Das Membranstripping erfolgte nach dem Standardprotokoll (siehe 7.2.4). Um eine Ladekontrolle zu erhalten, wurde die Membran anschließend mit dem alpha-Catenin Antikörper gefärbt:

Primäre Antikörper	Sekundäre Antikörper
alpha-Catenin (Maus)	Maus HRP (Ziege)

Die Bandenstärke des Western Blots wurden mit Hilfe der Software GelAnalyzer 2010 gemessen. Die gemessenen Werte der HA-Färbung wurden auf die Werte der alpha-Catenin Ladekontrolle normalisiert.

7.2.14 Mikroskopie

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Flügelimaginalscheiben:

Wenn nicht anders beschrieben, wurden die Fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen von Flügelimaginalscheiben mit dem Zeiss Axio Imager Z1 mit ApoTome aufgenommen.

SIM (structured illumination microscopy) -Aufnahmen von Flügelimaginalscheiben wurden mit dem Zeiss Elyra PS (SR-SIM) Mikroskops aufgenommen. Die Prozessierung der SIM-Daten erfolgte mit der Software ZEN nach automatisierten Einstellungen.

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von S2 Zellen:

Fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen von S2 Zellen wurden mit dem Zeiss Axio Plan 2 ohne ApoTome aufgenommen. Anschließend wurde eine Deconvolution der Daten durchgeführt. Die Prozessierung erfolgte mit der Huygens Professional Software nach automatisierten Einstellungen.

7.2.14.1 Fluoreszenzintensitätsmessungen

Für Fluoreszenzintensitätsmessungen wurde die Software ImageJ verwendet.

Fluoreszenzintensitätsmessungen der NRE-GFP Aktivität an Flügelimaginalscheiben:

Für die Messungen der Fluoreszenzintensität des NRE-GFP Reportergenkonstruktes wurden Flügelimaginalscheiben des späten dritten Larvenstadiums nach dem Standard-Protokoll präpariert und immunhistochemisch gefärbt (siehe 7.2.3). Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurden mit dem Zeiss Axio Imager Z1 mit ApoTome durchgeführt.

Die Fluoreszenzintensität von NRE-GFP wurde anschließend im ventralen Flügelfeld sowohl anterior, als auch posterior gemessen. Gemessen wurde dabei eine Fläche von $2843 \mu\text{m}^2$. Die Messung der posterioren Fluoreszenzintensität wurde für jede Flügelimaginalscheibe auf die anteriore Messung normalisiert.

Fluoreszenzintensitätsmessungen der Akkumulation transgener Notch-Rezeptoren an der apikalen Membran von Flügelimaginalscheiben:

Für die Messungen der Fluoreszenzintensität der Akkumulation transgener Notch-Rezeptoren an

der apikalen Membran von Flügelimaginalscheiben wurden Flügelimaginalscheiben des späten dritten Larvenstadiums nach dem Standard-Protokoll präpariert und immunhistochemisch mit einem HA Antikörper gefärbt (siehe 7.2.3). Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurden mit dem Zeiss Axio Imager Z1 mit ApoTome durchgeführt. Es wurden Z-Stapel mit einer Schichtdicke von 1 μm aufgenommen.

Die Messungen erfolgten in einer Fläche von 2267 μm^2 . Gemessen wurde die Fluoreszenzintensität der Ebene mit dem stärksten apikalen Membran-Signal. Anschließend wurden die apikalen Ebenen aus dem Z-Stapel entfernt und eine MIP (Maximum Intensity Projection) des Z-Stapels erzeugt.

Die Fluoreszenzintensität der erzeugten MIP wurde ebenfalls gemessen. Anschließend wurde das Verhältnis der Fluoreszenzintensität der anterioren Messung zu der Messung der MIP ermittelt.

Fluoreszenzintensitätsmessungen des Lumens von Notch-Vesikeln:

Für die Messungen der Fluoreszenzintensität des Lumens von Notch-Vesikeln wurden Flügelimaginalscheiben des späten dritten Larvenstadiums nach dem Standard-Protokoll präpariert und immunhistochemisch mit einem HA Antikörper gefärbt (7.2.3). Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurden mit dem Zeiss Axio Imager Z1 mit ApoTome durchgeführt. Es wurden Z-Stapel mit einer Schichtdicke von 1 μm aufgenommen.

Für die Messungen wurden basale Vesikel mit der stärksten Ausprägung eines Lumens verwendet. Durch die ausgewählten Vesikel wurde eine Messlinie mit der Dicke von 258 μm gelegt. Das Fluoreszenzintensitätsprofil wurde mit Hilfe der „Plot Profil“ Funktion von ImageJ dargestellt. Durch die Lumenbildung der Vesikel entsteht eine Differenz der Fluoreszenzintensität des Lumens und der limitierenden Membran der Vesikel. Anhand des Fluoreszenzintensitätsprofils wurde der niedrigste Wert innerhalb des Lumens und der höchste Wert außerhalb des Lumens ermittelt. Die Differenz dieser Werte wurde erhoben und reziprok anhand eines Box-Plots dargestellt.

7.2.15 Signifikanztest

Wenn nicht anders beschrieben, wurde als Signifikanztest ein One-way ANOVA mit Sidak's multiple comparisons Test durchgeführt. Die Signifikanztests wurden mit Hilfe der Software GraphPad Prism 6 erhoben.

7.2.16 Drosophila Methoden

7.2.16.1 Fliegenhaltung

Die Haltung von Fliegenstämmen erfolgt in zylindrischen Kunststoffröhrchen die mit Futterbrei gefüllt und durch einen Schaumstoffstopfen verschlossen sind. Die Lagerung der Fliegenstämme fand bei Raumtemperatur oder 18°C statt.

Je nach Experiment wurden die Fliegen bei unterschiedlichen Temperaturen gelagert. Um Kreuzungen anzusetzen wurden frisch geschlüpfte Jungfrauen gesammelt und mit Männchen in einem Röhrchen verpaart.

7.2.16.2 Herstellung transgener Fliegen

Um transgene Fliegen zu erzeugen wurde ein Integrationssystem verwendet bei dem eine gerichtete Integration von DNA-Konstrukten in das *D. melanogaster* Genom ermöglicht wird (Bischof et al., 2007).

Die Integration in das Genom von *D. melanogaster* wird durch die phiC-31 vermittelte Insertion in attP-Integrationsstellen („landing sites“) ermöglicht. Jedes Chromosom in *Drosophila* verfügt über mehrere Integrationsstellen. Bei den Integrationsstellen handelt es sich ebenfalls um Transgene die über ein M-Element (*Mariner*(M) Transposon, M(3xP3RFP attP)) in das Genom integriert wurden.

Die Integration wird durch die Expression der phiC-31 Integrase unter Kontrolle des *vasa*-Promotors in der Keimbahn ausgelöst. Bei der phiC-31 Integrase handelt es sich ebenfalls um ein Transgen, welches stabil auf dem X-Chromosom integriert wurde (*y w* Hintergrund). Ein Injektionsstamm verfügt aus diesem Grund über die X-Chromosomale phiC-31 Integrase und der gewünschten attP-Integrationsstelle auf einem weiteren Chromosom. Die Integration der Transgene wird über einen Vektor ermöglicht, der über eine attB Sequenz und ein *white* (*w*⁺) Selektionsmarker verfügt. Durch die phiC-31 Integrase kommt es zu einer Insertion der attB Sequenz des Vektors in die attP Sequenz der Integrationsstelle. Auf diese Weise wird der Vektor in das Fliegen-genom integriert. Die Selektion von Transformanten wird über den im Vektor enthaltenen Selektionsmarker *w*⁺ ermöglicht. Transgene Fliegen können somit in der Folgegeneration über rote Augen identifiziert werden.

Um die Integration auszulösen erfolgte eine Injektion der Plasmid-DNA in das posteriore Ende von 30 Minuten alten Embryonen.

Die in dieser Arbeit verwendeten Konstrukte wurden entweder in die Integrationsstelle attP86Fb (III-Chromosom rechts) oder attP51C (II-Chromosom rechts) integriert.

Tab 15: Injektionsmix

Komponente	Volumen
Plasmid-DNA (500 ng/ μ l)	X μ l
Phenolrot	2 μ l
dH ₂ O	auffüllen auf 30 μ l

7.2.16.3 Das GAL4/UAS-System

Um in *D. melanogaster* eine Expression von Transgenen unter Kontrolle verschiedener Promotoren zu ermöglichen, wurde in dieser Arbeit auf das aus der Hefe stammende GAL4/UAS-System zurückgegriffen (Brand and Perrimon, 1993; Phelps and Brand, 1998).

Das System wurde in *Drosophila* adaptiert und basiert auf zwei Transgenen, die sich aus einer Aktivator- und einer Effektor Komponente zusammensetzen. Bei der Aktivator Komponente handelt es sich um den Transkriptionsfaktor GAL4, der unter der Kontrolle verschiedener Promotoren exprimiert werden kann. Fliegen die den Transkriptionsfaktor unter der Kontrolle verschiedener Promotoren exprimieren, werden als GAL4 Treiberlinien bezeichnet (z.B. *ptc-GAL4* Treiber).

Bei der zweiten Komponente handelt es sich um eine UAS (upstream activating sequence) Sequenz. Der Transkriptionsfaktor GAL4 bindet an die UAS Sequenz und löst die Expression des „downstream“ gelegenen Gens aus. In *Drosophila* wird die UAS Sequenz „upstream“ der Transgene verwendet (z.B. UAS-GFP). Fliegen die über ein Transgen mit vorgeschalteter UAS Sequenz verfügen, werden als Effektoren bezeichnet. Durch die Kombination eines GAL4 Treibers und eines Effektors wird die Expression des Transgens ausgelöst.

In *Drosophila* werden die beiden Transgene häufig in unterschiedlichen Stämmen etabliert. Durch eine Kreuzung der beiden Stämme wird eine Expression des Transgens in der Folgegeneration ausgelöst (Abb. 52 A).

Durch eine Erweiterung des GAL4 Systems kann die Expression der Transgene ebenfalls temporär reguliert werden. Diese Eigenschaft wird durch eine temperatursensitive Variante des Repressors GAL80 (GAL80^{ts}) ermöglicht (McGuire et al., 2003).

Bei einer Temperatur von 18°C verhindert der Repressor die durch den Transkriptionsfaktor GAL4 ausgelöste Expression des Transgens. Bei einer Temperatur von 29°C kommt es zu einer Inaktivierung des Repressors, wodurch die GAL4 vermittelte Expression des Transgens ausgelöst wird (Abb. 52 B).

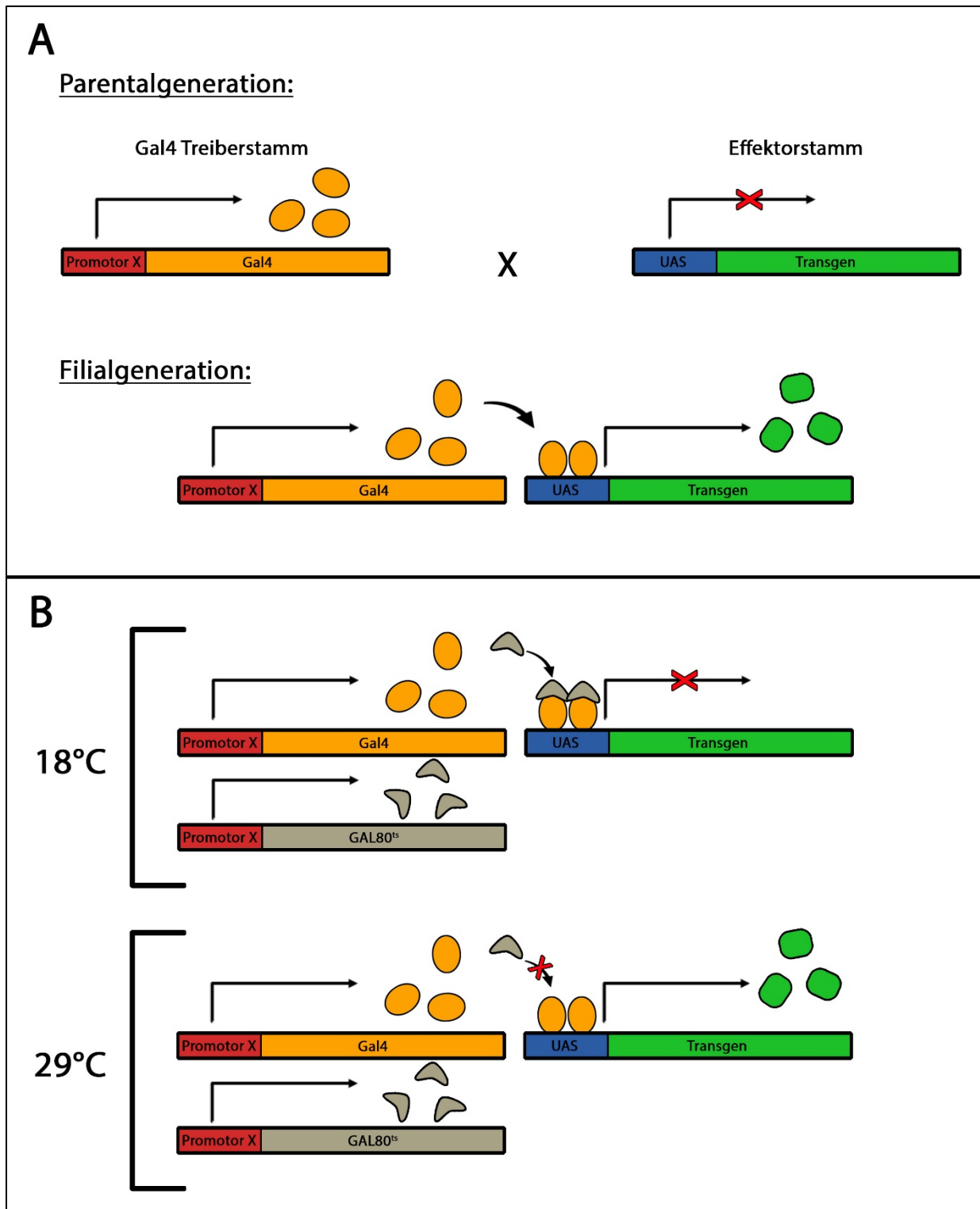


Abb. 52: Schematische Darstellung des GAL4/UAS-Systems (A) und des mit GAL80^{ts} erweiterten Systems (B)

7.2.16.4 Klonale Analyse mittels Flp/FRT System

Mit Hilfe des Flp/FRT-Systems lassen sich in *Drosophila* gewebespezifische Zellklone erzeugen. So können z.B. homozygote Zellklone von embryonal letalen Mutationen analysiert werden. Das Flp/FRT-System stammt aus der Hefe und wurde in *Drosophila* adaptiert.

Durch die Aktivität der Flippase (Flp) wird eine mitotische Rekombination zwischen den spezifischen Erkennungssequenzen FRT (flippase recombinase target) ausgelöst. In *Drosophila* führt dieses System zu Rekombinationsereignissen zwischen homologen Chromosomenarmen die über FRT Sequenzen verfügen (Golic and Lindquist, 1989).

Durch die Verwendung von Markern auf den Chromosomenarmen mit FRT Sequenzen lassen sich die Zellklone im Gewebe identifizieren. Verfügt ein Chromosom über eine Mutation und eine FRT Sequenz und der homologe Chromosomenarm über einen Marker und eine FRT Sequenz, so lassen sich homozygote Klone für die Mutation durch das Fehlen des Markers identifizieren. Darüber hinaus können ebenfalls Klone identifiziert werden, die über eine doppelte Kopie des Markers verfügen (twin Klone) (Abb. 53 A).

Eine Erweiterung des Flp/FRT-Systems ermöglicht zusätzlich die GAL4 vermittelte Expression von Transgenen in Zellklonen und wird als MARCM (Mosaic Analysis with a Repressible Cell Marker) System bezeichnet (Lee and Luo, 1999). Durch das MARCM System werden Zellklone mit UAS-GFP markiert. Unter Verwendung des Repressor GAL80 wird die Expression der Transgene außerhalb homozygoter Zellklone unterdrücken (Abb. 53 B). In dieser Arbeit wurde bei der Generierung von *kuz* Klonen eine abgewandelte Form des MARCM-Systems verwendet. Homozygote Zellklone wurden unter Kontrolle des *hs*-Promotors durch einen Hitzeschock für 70 min. bei 37°C induziert und negativ mit *arm-lacZ* markiert. Die Expression der Transgene (Notch-Konstrukte) erfolgte unter Kontrolle des *hh*-GAL4 Treibers und wurde außerhalb homozygoter Zellklone durch die Aktivität des Repressors GAL80 unterdrückt. Durch die Verwendung des *hh*-GAL4 Treibers wurden die Transgene ausschließlich im posterioren Kompartiment der Flügelimaginalscheiben exprimiert und mit UAS-RFP markiert. In anterioren Zellklonen findet aus diesem Grund keine Expression der Transgene statt. Diese Klone können als Kontrolle verwendet werden.

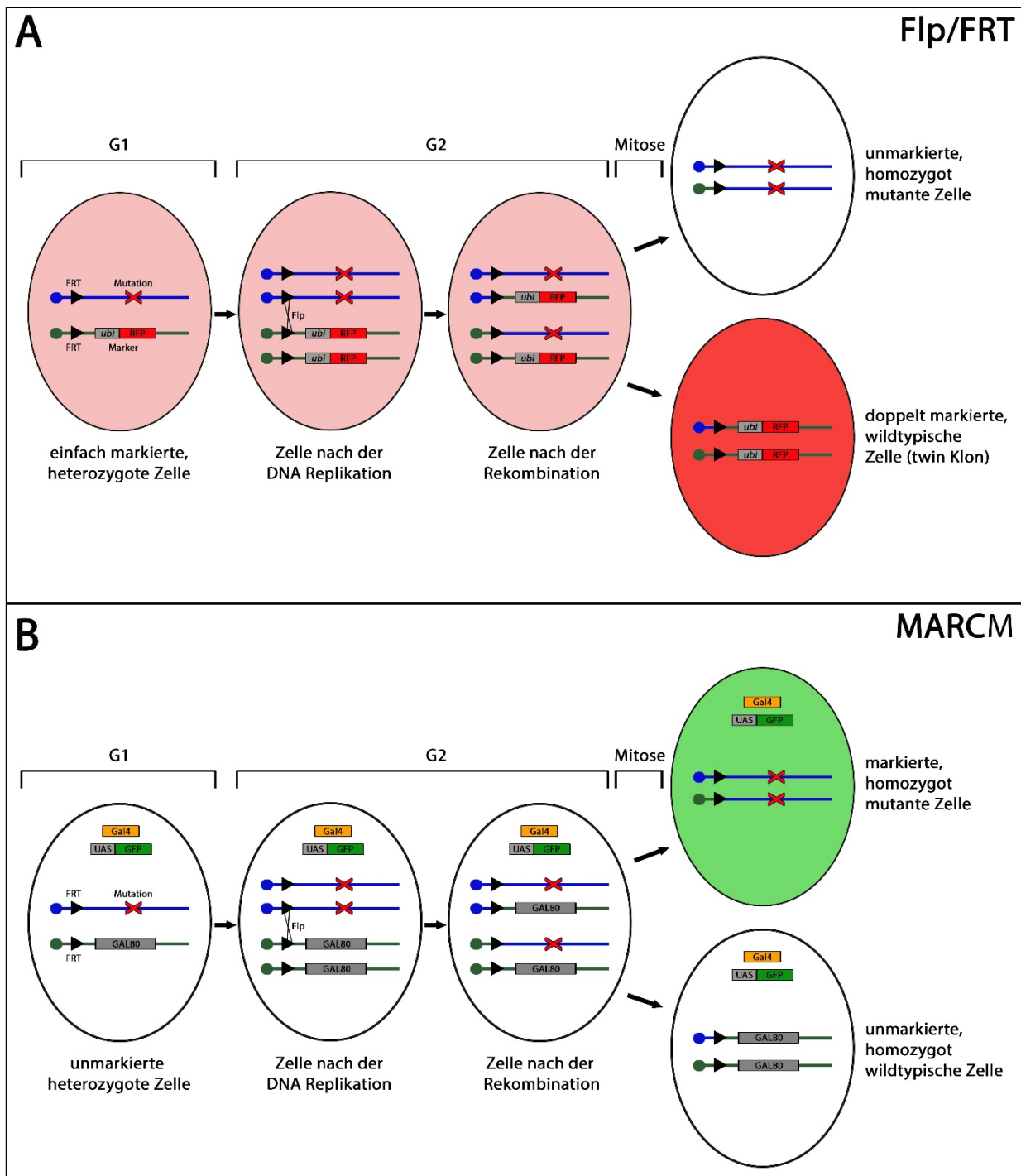


Abb. 53: Schematische Darstellung des Flp/FRT-Systems (A) und des MARCM-Systems (B)

7.2.16.5 Das Reportergenkonstrukt Gbe+Su(H)-lacZ

Mit Hilfe des Reportergenkonstruktes Gbe+Su(H)-lacZ kann die Aktivität des Notch-Signalweges im Gewebe von *Drosophila* nachgewiesen werden (Furriols and Bray, 2001). Im Gegensatz zu dem Zielgen *wg* kann die Notch-Aktivität mit dem Reportergenkonstrukt Gbe+Su(H)-lacZ auch außerhalb der D/V Grenze in der Flügelimaginalscheibe detektiert

werden. In dieser Arbeit wurden darüber hinaus die Konstrukte NRE-GFP (Housden et al., 2012) und Gbe+Su(H)-GFP_{nls} (als NRE-nlsGFP bezeichnet) (Schneider, 2012) verwendet. Alle verwendeten Konstrukte funktionieren nach dem gleichen Prinzip. Die Funktion wird daher anhand des Gbe+Su(H)-lacZ Konstruktes erklärt.

Das Konstrukt verfügt über drei Kopien von Gbe (Grainyhead binding element), zwei Kopien von Su(H) Bindestellen und einer nachgeschalteten lacZ Transkriptionseinheit. Bei Grh (Grainyhead) handelt es sich um einen in der Flügelimaginalscheibe ubiquitär exprimierten Transkriptionsfaktor, der durch Bindung an Gbe die Expression nachgeschalteter Gene auslöst (Uv et al., 1997). Su(H) bildet mit weiteren Faktoren in Abwesenheit von NICD eine transkriptionsreprimierenden Komplex, der ebenfalls die Aktivität des Transkriptionsfaktors Gry unterdrückt. In Anwesenheit von NICD bilden Su(H) und NICD einen transkriptionsaktivierenden Komplex der zur Expression der nachgeschalteten Gene führt. Die Kombination aus Gbe und Su(H) führt in Anwesenheit von NICD zu einer starken Expression der lacZ Transkriptionseinheit.

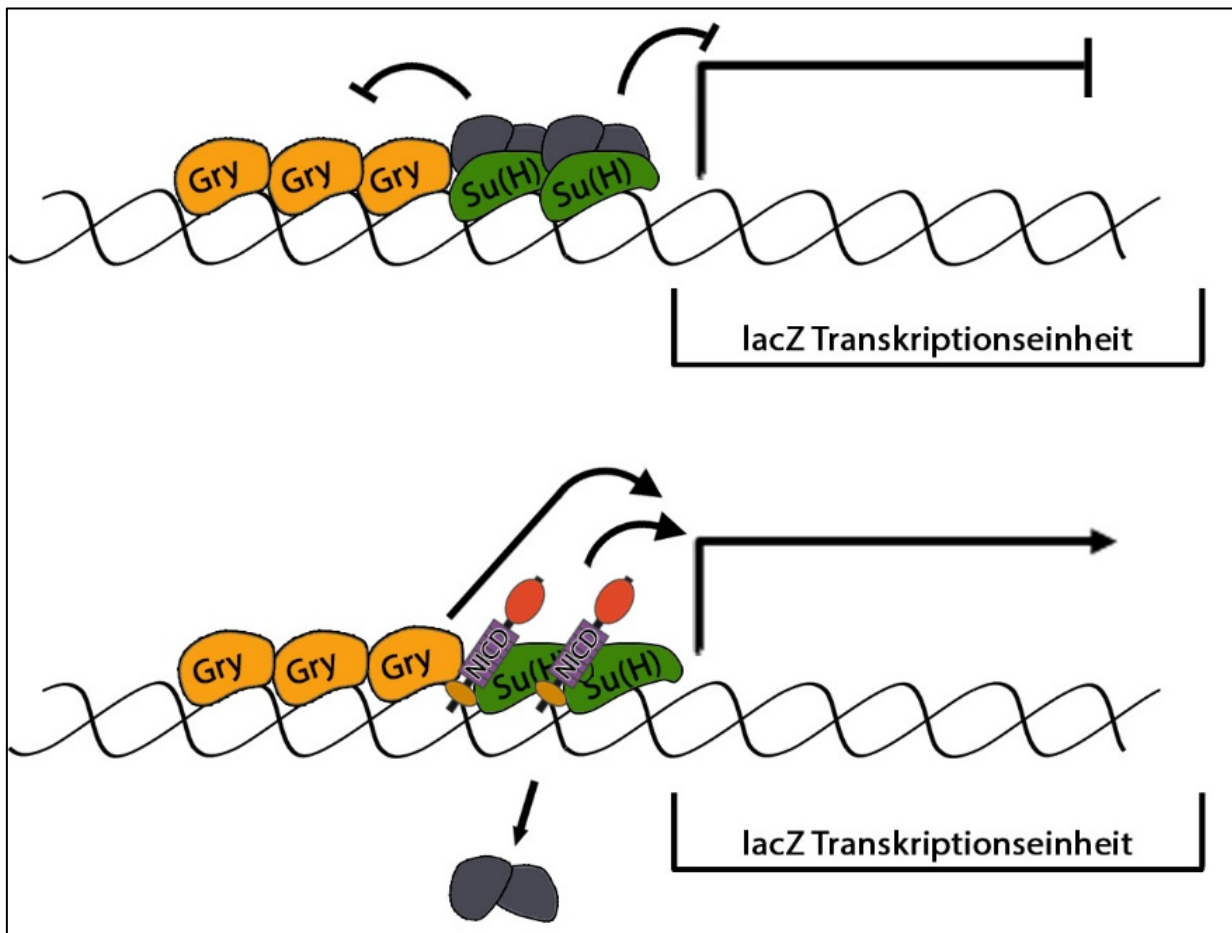


Abb. 54: Schematische Darstellung des Reportergenkonstruktes Gbe+Su(H)-lacZ

8 Literaturverzeichnis

Aravind, L. (2001). The WWE domain: a common interaction module in protein ubiquitination and ADP ribosylation. *Trends Biochem Sci* 26, 273-275.

Aster, J.C., Pear, W.S., and Blacklow, S.C. (2017). The Varied Roles of Notch in Cancer. *Annu Rev Pathol* 12, 245-275.

Aster, J.C., Simms, W.B., Zavala-Ruiz, Z., Patriub, V., North, C.L., and Blacklow, S.C. (1999). The folding and structural integrity of the first LIN-12 module of human Notch1 are calcium-dependent. *Biochemistry* 38, 4736-4742.

Balderhaar, H.J., and Ungermann, C. (2013). CORVET and HOPS tethering complexes - coordinators of endosome and lysosome fusion. *J Cell Sci* 126, 1307-1316.

Baron, M. (2012). Endocytic routes to Notch activation. *Semin Cell Dev Biol* 23, 437-442.

Baron, M. (2017). Combining genetic and biophysical approaches to probe the structure and function relationships of the notch receptor. *Mol Membr Biol* 34, 33-49.

Becam, I., Fiuza, U.M., Arias, A.M., and Milan, M. (2010). A role of receptor Notch in ligand cis-inhibition in *Drosophila*. *Curr Biol* 20, 554-560.

Benmerah, A., and Lamaze, C. (2007). Clathrin-coated pits: vive la difference? *Traffic* 8, 970-982.

Bischof, J., Maeda, R.K., Hediger, M., Karch, F., and Basler, K. (2007). An optimized transgenesis system for *Drosophila* using germ-line-specific phiC31 integrases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 3312-3317.

Blaumueller, C.M., Qi, H., Zagouras, P., and Artavanis-Tsakonas, S. (1997). Intracellular cleavage of Notch leads to a heterodimeric receptor on the plasma membrane. *Cell* 90, 281-291.

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

Bray, S., Musisi, H., and Bienz, M. (2005). Bre1 is required for Notch signaling and histone modification. *Dev Cell* 8, 279-286.

Bray, S.J. (2006). Notch signalling: a simple pathway becomes complex. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 678-689.

Bray, S.J. (2016). Notch signalling in context. *Nat Rev Mol Cell Biol* 17, 722-735.

- Busseau, I., Diederich, R.J., Xu, T., and Artavanis-Tsakonas, S. (1994). A member of the Notch group of interacting loci, *deltex* encodes a cytoplasmic basic protein. *Genetics* *136*, 585-596.
- Cadwell, K., and Coscoy, L. (2005). Ubiquitination on nonlysine residues by a viral E3 ubiquitin ligase. *Science* *309*, 127-130.
- Carvalho, A.F., Pinto, M.P., Grou, C.P., Alencastre, I.S., Fransen, M., Sa-Miranda, C., and Azevedo, J.E. (2007). Ubiquitination of mammalian Pex5p, the peroxisomal import receptor. *J Biol Chem* *282*, 31267-31272.
- Chastagner, P., Israel, A., and Brou, C. (2006). Itch/AIP4 mediates Deltex degradation through the formation of K29-linked polyubiquitin chains. *EMBO Rep* *7*, 1147-1153.
- Chastagner, P., Israel, A., and Brou, C. (2008). AIP4/Itch regulates Notch receptor degradation in the absence of ligand. *PLoS One* *3*, e2735.
- Chastagner, P., Rubinstein, E., and Brou, C. (2017). Ligand-activated Notch undergoes DTX4-mediated ubiquitylation and bilateral endocytosis before ADAM10 processing. *Sci Signal* *10*.
- Childress, J.L., Acar, M., Tao, C., and Halder, G. (2006). Lethal giant discs, a novel C2-domain protein, restricts notch activation during endocytosis. *Curr Biol* *16*, 2228-2233.
- Ciechanover, A., and Ben-Saadon, R. (2004). N-terminal ubiquitination: more protein substrates join in. *Trends Cell Biol* *14*, 103-106.
- Cornell, M., Evans, D.A., Mann, R., Fostier, M., Flaszka, M., Monthatong, M., Artavanis-Tsakonas, S., and Baron, M. (1999). The *Drosophila melanogaster* Suppressor of *deltex* gene, a regulator of the Notch receptor signaling pathway, is an E3 class ubiquitin ligase. *Genetics* *152*, 567-576.
- Cotter, K., Stransky, L., McGuire, C., and Forgac, M. (2015). Recent Insights into the Structure, Regulation, and Function of the V-ATPases. *Trends Biochem Sci* *40*, 611-622.
- Croker, J.A., Ziegenhorn, S.L., and Holmgren, R.A. (2006). Regulation of the *Drosophila* transcription factor, *Cubitus interruptus*, by two conserved domains. *Dev Biol* *291*, 368-381.
- del Alamo, D., Rouault, H., and Schweisguth, F. (2011). Mechanism and significance of cis-inhibition in Notch signalling. *Curr Biol* *21*, R40-47.
- DeStrooper, B., Annaert, W., Cupers, P., Saftig, P., Craessaerts, K., Mumm, J.S., and Schroeter, E.H., Schrijvers, V., Wolfe, M.S., Ray, W.J., et al (1999). A presenilin-1-dependent g-secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain. *Nature* *398*, 518-522.
- Diederich, R.J., Matsuno, K., Hing, H., and Artavanis-Tsakonas, S. (1994). Cytosolic interaction between *deltex* and Notch ankyrin repeats implicates *deltex* in the Notch signaling pathway. *Development* *120*, 473-481.

Dunst, S., Kazimiers, T., von Zadow, F., Jambor, H., Sagner, A., Brankatschk, B., Mahmoud, A., Spann, S., Tomancak, P., Eaton, S., *et al.* (2015). Endogenously tagged rab proteins: a resource to study membrane trafficking in *Drosophila*. *Dev Cell* *33*, 351-365.

Fehon, R.G., Kooh, P.J., Rebay, I., Regan, C.L., Xu, T., Muskavitch, M.A., and Artavanis-Tsakonas, S. (1990). Molecular interactions between the protein products of the neurogenic loci Notch and Delta, two EGF-homologous genes in *Drosophila*. *Cell* *61*, 523-534.

Fleming, R.J., Gu, Y., and Hukriede, N.A. (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*, 2973-2981.

Fostier, M., Evans, D.A., Artavanis-Tsakonas, S., and Baron, M. (1998). Genetic characterization of the *Drosophila melanogaster* Suppressor of deltex gene: A regulator of notch signaling. *Genetics* *150*, 1477-1485.

Fryer, C.J., White, J.B., and Jones, K.A. (2004). Mastermind recruits CycC:CDK8 to phosphorylate the Notch ICD and coordinate activation with turnover. *Mol Cell* *16*, 509-520.

Furriols, M., and Bray, S. (2000). Dissecting the mechanisms of suppressor of hairless function. *Dev Biol* *227*, 520-532.

Furriols, M., and Bray, S. (2001). A model Notch response element detects Suppressor of Hairless-dependent molecular switch. *Curr Biol* *11*, 60-64.

Gallagher, C.M., and Knoblich, J.A. (2006). The conserved c2 domain protein lethal (2) giant discs regulates protein trafficking in *Drosophila*. *Dev Cell* *11*, 641-653.

Ganoth, D., Leshinsky, E., Eytan, E., and Hershko, A. (1988). A multicomponent system that degrades proteins conjugated to ubiquitin. Resolution of factors and evidence for ATP-dependent complex formation. *J Biol Chem* *263*, 12412-12419.

Gibson, D.G., Glass, J.I., Lartigue, C., Noskov, V.N., Chuang, R.Y., Algire, M.A., Benders, G.A., Montague, M.G., Ma, L., Moodie, M.M., *et al.* (2010). Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome. *Science* *329*, 52-56.

Gibson, D.G., Young, L., Chuang, R.Y., Venter, J.C., Hutchison, C.A., 3rd, and Smith, H.O. (2009). Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nature methods* *6*, 343-345.

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

Gupta-Rossi, N., Le Bail, O., Gonen, H., Brou, C., Logeat, F., Six, E., Ciechanover, A., and Israel, A. (2001). Functional interaction between SEL-10, an F-box protein, and the nuclear form of activated Notch1 receptor. *J Biol Chem* *276*, 34371-34378.

- Hori, K., Fostier, M., Ito, M., Fuwa, T.J., Go, M.J., Okano, H., Baron, M., and Matsuno, K. (2004). *Drosophila* *deltex* mediates suppressor of Hairless-independent and late-endosomal activation of Notch signaling. *Development* *131*, 5527-5537.
- Hori, K., Sen, A., Kirchhausen, T., and Artavanis-Tsakonas, S. (2011). Synergy between the ESCRT-III complex and Deltex defines a ligand-independent Notch signal. *J Cell Biol* *195*, 1005-1015.
- Hough, R., Pratt, G., and Rechsteiner, M. (1986). Ubiquitin-lysozyme conjugates. Identification and characterization of an ATP-dependent protease from rabbit reticulocyte lysates. *J Biol Chem* *261*, 2400-2408.
- Housden, B.E., Millen, K., and Bray, S.J. (2012). *Drosophila* Reporter Vectors Compatible with PhiC31 Integrase Transgenesis Techniques and Their Use to Generate New Notch Reporter Fly Lines. *G3 (Bethesda)* *2*, 79-82.
- Huotari, J., and Helenius, A. (2011). Endosome maturation. *EMBO J* *30*, 3481-3500.
- Hurley, J.H. (2015). ESCRTs are everywhere. *EMBO J* *34*, 2398-2407.
- Isenburg, D. (2018). Analyse verschiedener Shrub-Mutanten in Bezug auf die Rekrutierung zum Endosom und deren Polymerisation sowie Herstellung unterschiedlicher Notch-Varianten mit Mutationen in der PEST-Domane. In Institut für Genetik (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf).
- Ishikura, S., Weissman, A.M., and Bonifacino, J.S. (2010). Serine residues in the cytosolic tail of the T-cell antigen receptor alpha-chain mediate ubiquitination and endoplasmic reticulum-associated degradation of the unassembled protein. *J Biol Chem* *285*, 23916-23924.
- Jaekel, R., and Klein, T. (2006). The *Drosophila* Notch Inhibitor and Tumor Suppressor Gene *lethal (2) giant discs* Encodes a Conserved Regulator of Endosomal Trafficking. *Developmental Cell* *11*, 655-669.
- Jekely, G., and Rorth, P. (2003). Hrs mediates downregulation of multiple signalling receptors in *Drosophila*. *EMBO Rep* *4*, 1163-1168.
- Kelly, D.F., Lake, R.J., Middelkoop, T.C., Fan, H.Y., Artavanis-Tsakonas, S., and Walz, T. (2010). Molecular structure and dimeric organization of the Notch extracellular domain as revealed by electron microscopy. *PLoS One* *5*, e10532.
- Kidd, S., Lieber, T., and Young, M.W. (1998). Ligand-induced cleavage and regulation of nuclear entry of Notch in *Drosophila melanogaster* embryos. *Genes Dev* *12*, 3728-3740.
- Kim, J., Irvine, K.D., and Carroll, S.B. (1995). Cell recognition, signal induction, and symmetrical gene activation at the dorsal-ventral boundary of the developing *Drosophila* wing. *Cell* *82*, 795-802.

- Kishi, N., Tang, Z., Maeda, Y., Hirai, A., Mo, R., Ito, M., Suzuki, S., Nakao, K., Kinoshita, T., Kadesch, T., *et al.* (2001). Murine homologs of *deltex* define a novel gene family involved in vertebrate Notch signaling and neurogenesis. *Int J Dev Neurosci* *19*, 21-35.
- Klein, T. (2001). Wing disc development in the fly: the early stages. *Curr Opin Genet Dev* *11*, 470-475.
- Klein, T. (2002). *kuzbanian* is required cell autonomously during Notch signalling in the *Drosophila* wing. *Dev Genes Evol* *212*, 251-255.
- Klein, T. (2008). Immunolabeling of imaginal discs. *Methods Mol Biol* *420*, 253-263.
- Kovall, R.A., and Blacklow, S.C. (2010). Mechanistic insights into Notch receptor signaling from structural and biochemical studies. *Curr Top Dev Biol* *92*, 31-71.
- Kwon, Y., Shim, H.S., Wang, X., and Montell, C. (2008). Control of thermotactic behavior via coupling of a TRP channel to a phospholipase C signaling cascade. *Nat Neurosci* *11*, 871-873.
- Le Borgne, R., Remaud, S., Hamel, S., and Schweisguth, F. (2005). Two distinct E3 ubiquitin ligases have complementary functions in the regulation of delta and serrate signaling in *Drosophila*. *PLoS Biol* *3*, e96.
- Lecourtois, M., and Schweisguth, F. (1998). Indirect evidence for Delta-dependent intracellular processing of notch in *Drosophila* embryos. *Curr Biol* *8*, 771-774.
- Lee, T., and Luo, L. (1999). Mosaic analysis with a repressible cell marker for studies of gene function in neuronal morphogenesis. *Neuron* *22*, 451-461.
- Lehar, S.M., and Bevan, M.J. (2006). T cells develop normally in the absence of both *Deltex1* and *Deltex2*. *Mol Cell Biol* *26*, 7358-7371.
- Lehmann, R., Jimenez, F., Dietrich, U., and Campos-Ortega, J.A. (1983). On the phenotype and development of mutants of early neurogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Wilehm Roux Arch Dev Biol* *192*, 62-74.
- Lei, L., Xu, A., Panin, V.M., and Irvine, K.D. (2003). An O-fucose site in the ligand binding domain inhibits Notch activation. *Development* *130*, 6411-6421.
- Letourneur, F., and Klausner, R.D. (1992). A novel di-leucine motif and a tyrosine-based motif independently mediate lysosomal targeting and endocytosis of CD3 chains. *Cell* *69*, 1143-1157.
- Levental, I., Grzybek, M., and Simons, K. (2010). Greasing their way: lipid modifications determine protein association with membrane rafts. *Biochemistry* *49*, 6305-6316.
- Li, S., Chen, Y., Shi, Q., Yue, T., Wang, B., and Jiang, J. (2012). Hedgehog-regulated ubiquitination controls smoothed trafficking and cell surface expression in *Drosophila*. *PLoS*

Biol 10, e1001239.

Lowe, N., Rees, J.S., Roote, J., Ryder, E., Armean, I.M., Johnson, G., Drummond, E., Spriggs, H., Drummond, J., Magbanua, J.P., *et al.* (2014). Analysis of the expression patterns, subcellular localisations and interaction partners of *Drosophila* proteins using a pigP protein trap library. *Development* 141, 3994-4005.

Luca, V.C., Jude, K.M., Pierce, N.W., Nachury, M.V., Fischer, S., and Garcia, K.C. (2015). Structural biology. Structural basis for Notch1 engagement of Delta-like 4. *Science* 347, 847-853.

Lye, C.M., Naylor, H.W., and Sanson, B. (2014). Subcellular localisations of the CPTI collection of YFP-tagged proteins in *Drosophila* embryos. *Development* 141, 4006-4017.

Lyga, M. (2016). Analysis of the function and the degradation of the Intracellular Domain of Notch (NICD) and a lysine free NICDK2R in the the wing imaginal disc of *Drosophila melanogaster*. In Institut für Genetik (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf).

MacDonald, C., Buchkovich, N.J., Stringer, D.K., Emr, S.D., and Piper, R.C. (2012). Cargo ubiquitination is essential for multivesicular body intraluminal vesicle formation. *EMBO Rep* 13, 331-338.

Maillard, I., Weng, A.P., Carpenter, A.C., Rodriguez, C.G., Sai, H., Xu, L., Allman, D., Aster, J.C., and Pear, W.S. (2004). Mastermind critically regulates Notch-mediated lymphoid cell fate decisions. *Blood* 104, 1696-1702.

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

Matsuno, K., Diederich, R.J., Go, M.J., Blaumueller, C.M., and Artavanis-Tsakonas, S. (1995). Deltex acts as a positive regulator of Notch signaling through interactions with the Notch ankyrin repeats. *Development* 121, 2633-2644.

Matsuno, K., Eastman, D., Mitsiades, T., Quinn, A.M., Carcanciu, M.L., Ordentlich, P., Kadesch, T., and Artavanis-Tsakonas, S. (1998). Human deltex is a conserved regulator of Notch signalling. *Nat Genet* 19, 74-78.

Matsuno, K., Ito, M., Hori, K., Miyashita, F., Suzuki, S., Kishi, N., Artavanis-Tsakonas, S., and Okano, H. (2002). Involvement of a proline-rich motif and RING-H2 finger of Deltex in the regulation of Notch signaling. *Development* 129, 1049-1059.

Mazaleyrat, S.L., Fostier, M., Wilkin, M.B., Aslam, H., Evans, D.A., Cornell, M., and Baron, M. (2003). Down-regulation of Notch target gene expression by Suppressor of deltex. *Dev Biol* 255, 363-372.

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

- McMillan, B.J., Tibbe, C., Drabek, A.A., Seegar, T.C.M., Blacklow, S.C., and Klein, T. (2017). Structural Basis for Regulation of ESCRT-III Complexes by Lgd. *Cell reports* *19*, 1750-1757.
- Meloty-Kapella, L., Shergill, B., Kuon, J., Botvinick, E., and Weinmaster, G. (2012). Notch ligand endocytosis generates mechanical pulling force dependent on dynamin, epsins, and actin. *Dev Cell* *22*, 1299-1312.
- Metzger, M.B., Hristova, V.A., and Weissman, A.M. (2012). HECT and RING finger families of E3 ubiquitin ligases at a glance. *J Cell Sci* *125*, 531-537.
- Micchelli, C.A., and Blair, S.S. (1999). Dorsoventral lineage restriction in wing imaginal discs requires Notch. *Nature* *401*, 473-476.
- Micchelli, C.A., Rulifson, E.J., and Blair, S.S. (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*, 1485-1495.
- Miller, A.C., Lyons, E.L., and Herman, T.G. (2009). cis-Inhibition of Notch by endogenous Delta biases the outcome of lateral inhibition. *Curr Biol* *19*, 1378-1383.
- Moberg, K.H., Schelble, S., Burdick, S.K., and Hariharan, I.K. (2005). Mutations in erupted, the *Drosophila* ortholog of mammalian tumor susceptibility gene 101, elicit non-cell-autonomous overgrowth. *Dev Cell* *9*, 699-710.
- Morel, V., and Schweisguth, F. (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*, 377-388.
- Moretti, J., and Brou, C. (2013). Ubiquitinations in the notch signaling pathway. *International journal of molecular sciences* *14*, 6359-6381.
- Mukherjee, A., Veraksa, A., Bauer, A., Rosse, C., Camonis, J., and Artavanis-Tsakonas, S. (2005). Regulation of Notch signalling by non-visual beta-arrestin. *Nat Cell Biol* *7*, 1191-1201.
- Mumm, J.S., Schroeter, E.H., Saxena, M.T., Griesemer, A., Tian, X., Pan, D.J., Ray, W.J., and Kopan, R. (2000). A ligand-induced extracellular cleavage regulates gamma-secretase-like proteolytic activation of Notch1. *Mol Cell* *5*, 197-206.
- Nam, Y., Sliz, P., Song, L., Aster, J.C., and Blacklow, S.C. (2006). Structural basis for cooperativity in recruitment of MAML coactivators to Notch transcription complexes. *Cell* *124*, 973-983.
- Nichols, J.T., Miyamoto, A., Olsen, S.L., D'Souza, B., Yao, C., and Weinmaster, G. (2007). DSL ligand endocytosis physically dissociates Notch1 heterodimers before activating proteolysis can occur. *J Cell Biol* *176*, 445-458.

Oberg, C., Li, J., Pauley, A., Wolf, E., Gurney, M., and Lendahl, U. (2001). The Notch intracellular domain is ubiquitinated and negatively regulated by the mammalian Sel-10 homolog. *J Biol Chem* 276, 35847-35853.

Okajima, T., and Irvine, K.D. (2002). Regulation of notch signaling by o-linked fucose. *Cell* 111, 893-904.

Palmer, W.H., and Deng, W.M. (2015). Ligand-Independent Mechanisms of Notch Activity. *Trends Cell Biol* 25, 697-707.

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

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

Parks, A.L., Stout, J.R., Shepard, S.B., Klueg, K.M., Dos Santos, A.A., Parody, T.R., Vaskova, M., and Muskavitch, M.A. (2006). Structure-function analysis of delta trafficking, receptor binding and signaling in *Drosophila*. *Genetics* 174, 1947-1961.

Phelps, C.B., and Brand, A.H. (1998). Ectopic gene expression in *Drosophila* using GAL4 system. *Methods* 14, 367-379.

Pitsouli, C., and Delidakis, C. (2005). The interplay between DSL proteins and ubiquitin ligases in Notch signaling. *Development* 132, 4041-4050.

Pond, L., Kuhn, L.A., Teyton, L., Schutze, M.P., Tainer, J.A., Jackson, M.R., and Peterson, P.A. (1995). A role for acidic residues in di-leucine motif-based targeting to the endocytic pathway. *J Biol Chem* 270, 19989-19997.

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

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

Rebay, I., Fleming, R.J., Fehon, R.G., Cherbas, L., Cherbas, P., and Artavanis-Tsakonas, S. (1991). Specific EGF repeats of Notch mediate interactions with Delta and Serrate: implications for Notch as a multifunctional receptor. *Cell* 67, 687-699.

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

Riedel, F., Gillingham, A.K., Rosa-Ferreira, C., Galindo, A., and Munro, S. (2016). An antibody

toolkit for the study of membrane traffic in *Drosophila melanogaster*. *Biol Open* 5, 987-992.

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

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

Sakamoto, K., Chao, W.S., Katsube, K., and Yamaguchi, A. (2005). Distinct roles of EGF repeats for the Notch signaling system. *Exp Cell Res* 302, 281-291.

Sakata, T., Sakaguchi, H., Tsuda, L., Higashitani, A., Aigaki, T., Matsuno, K., and Hayashi, S. (2004). *Drosophila* Nedd4 regulates endocytosis of notch and suppresses its ligand-independent activation. *Curr Biol* 14, 2228-2236.

Sasamura, T., Sasaki, N., Miyashita, F., Nakao, S., Ishikawa, H.O., Ito, M., Kitagawa, M., Harigaya, K., Spana, E., Bilder, D., *et al.* (2003). neurotic, a novel maternal neurogenic gene, encodes an O-fucosyltransferase that is essential for Notch-Delta interactions. *Development* 130, 4785-4795.

Satoh, A., Tokunaga, F., Kawamura, S., and Ozaki, K. (1997). In situ inhibition of vesicle transport and protein processing in the dominant negative Rab1 mutant of *Drosophila*. *J Cell Sci* 110 (Pt 23), 2943-2953.

Schmidt, O., and Teis, D. (2012). The ESCRT machinery. *Curr Biol* 22, R116-120.

Schneider, M. (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*. In Institut für Genetik (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf).

Schneider, M., Troost, T., Grawe, F., Martinez-Arias, A., and Klein, T. (2013). Activation of Notch in *lgd* mutant cells requires the fusion of late endosomes with the lysosome. *J Cell Sci* 126, 645-656.

Schnute, B., Troost, T., and Klein, T. (2018). Endocytic Trafficking of the Notch Receptor. *Adv Exp Med Biol* 1066, 99-122.

Schoneberg, J., Lee, I.H., Iwasa, J.H., and Hurley, J.H. (2017). Reverse-topology membrane scission by the ESCRT proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* 18, 5-17.

Seugnet, L., Simpson, P., and Haenlin, M. (1997). Requirement for dynamin during Notch signaling in *Drosophila* neurogenesis. *Dev Biol* 192, 585-598.

Shi, S., and Stanley, P. (2003). Protein O-fucosyltransferase 1 is an essential component of Notch

signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 5234-5239.

Shimizu, H., Woodcock, S.A., Wilkin, M.B., Trubenova, B., Monk, N.A., and Baron, M. (2014). Compensatory flux changes within an endocytic trafficking network maintain thermal robustness of Notch signaling. *Cell* 157, 1160-1174.

Shimizu, K., Chiba, S., Kumano, K., Hosoya, N., Takahashi, T., Kanda, Y., Hamada, Y., Yazaki, Y., and Hirai, H. (1999). Mouse jagged1 physically interacts with notch2 and other notch receptors. Assessment by quantitative methods. *J Biol Chem* 274, 32961-32969.

Shimizu, Y., Okuda-Shimizu, Y., and Hendershot, L.M. (2010). Ubiquitylation of an ERAD substrate occurs on multiple types of amino acids. *Mol Cell* 40, 917-926.

Simpson, P. (1990). Lateral inhibition and the development of the sensory bristles of the adult peripheral nervous system of *Drosophila*. *Development* 109, 509-519.

Speicher, S.A., Thomas, U., Hinz, U., and Knust, E. (1994). The Serrate locus of *Drosophila* and its role in morphogenesis of the wing imaginal discs: control of cell proliferation. *Development* 120, 535-544.

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

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

Swatek, K.N., and Komander, D. (2016). Ubiquitin modifications. *Cell Res* 26, 399-422.

Tait, S.W., de Vries, E., Maas, C., Keller, A.M., D'Santos, C.S., and Borst, J. (2007). Apoptosis induction by Bid requires unconventional ubiquitination and degradation of its N-terminal fragment. *J Cell Biol* 179, 1453-1466.

Tanaka, T., and Nakamura, A. (2008). The endocytic pathway acts downstream of Oskar in *Drosophila* germ plasm assembly. *Development* 135, 1107-1117.

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

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

Traub, L.M., and Bonifacino, J.S. (2013). Cargo recognition in clathrin-mediated endocytosis. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 5, a016790.

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

125, 763-776.

Uv, A.E., Harrison, E.J., and Bray, S.J. (1997). Tissue-specific splicing and functions of the *Drosophila* transcription factor Grainyhead. *Mol Cell Biol* 17, 6727-6735.

Vaccari, T., and Bilder, D. (2005). The *Drosophila* tumor suppressor vps25 prevents nonautonomous overproliferation by regulating notch trafficking. *Dev Cell* 9, 687-698.

Vaccari, T., Lu, H., Kanwar, R., Fortini, M.E., and Bilder, D. (2008). Endosomal entry regulates Notch receptor activation in *Drosophila melanogaster*. *J Cell Biol* 180, 755-762.

Venkatachalam, K., Long, A.A., Elsaesser, R., Nikolaeva, D., Broadie, K., and Montell, C. (2008). Motor deficit in a *Drosophila* model of mucopolysaccharidosis type IV due to defective clearance of apoptotic cells. *Cell* 135, 838-851.

Venkatachalam, K., Wong, C.O., and Zhu, M.X. (2015). The role of TRPMLs in endolysosomal trafficking and function. *Cell calcium* 58, 48-56.

Vooijs, M., Schroeter, E.H., Pan, Y., Blandford, M., and Kopan, R. (2004). Ectodomain shedding and intramembrane cleavage of mammalian Notch proteins is not regulated through oligomerization. *J Biol Chem* 279, 50864-50873.

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

Wang, X., Herr, R.A., Chua, W.J., Lybarger, L., Wiertz, E.J., and Hansen, T.H. (2007). Ubiquitination of serine, threonine, or lysine residues on the cytoplasmic tail can induce ERAD of MHC-I by viral E3 ligase mK3. *J Cell Biol* 177, 613-624.

Wesley, C.S., and Saez, L. (2000). Analysis of notch lacking the carboxyl terminus identified in *Drosophila* embryos. *J Cell Biol* 149, 683-696.

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

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

Williams, C., van den Berg, M., Sprenger, R.R., and Distel, B. (2007). A conserved cysteine is essential for Pex4p-dependent ubiquitination of the peroxisomal import receptor Pex5p. *J Biol Chem* 282, 22534-22543.

Wilson, J.J., and Kovall, R.A. (2006). Crystal structure of the CSL-Notch-Mastermind ternary

complex bound to DNA. *Cell* 124, 985-996.

Windler, S.L., and Bilder, D. (2010). Endocytic internalization routes required for delta/notch signaling. *Curr Biol* 20, 538-543.

Wollert, T., and Hurley, J.H. (2010). Molecular mechanism of multivesicular body biogenesis by ESCRT complexes. *Nature* 464, 864-869.

Wong, C.O., Li, R., Montell, C., and Venkatachalam, K. (2012). *Drosophila* TRPML is required for TORC1 activation. *Curr Biol* 22, 1616-1621.

Xu, T., and Artavanis-Tsakonas, S. (1990). *deltex*, a locus interacting with the neurogenic genes, Notch, Delta and mastermind in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 126, 665-677.

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

Yamada, K., Fuwa, T.J., Ayukawa, T., Tanaka, T., Nakamura, A., Wilkin, M.B., Baron, M., and Matsuno, K. (2011). Roles of *Drosophila* *deltex* in Notch receptor endocytic trafficking and activation. *Genes Cells* 16, 261-272.

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

Yeh, E., Gustafson, K., and Boulianne, G.L. (1995). Green fluorescent protein as a vital marker and reporter of gene expression in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 7036-7040.

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

Zheng, L., and Conner, S.D. (2018). PI5P4K γ functions in DTX1-mediated Notch signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115, E1983-E1990.

Zheng, L., Saunders, C.A., Sorensen, E.B., Waxmonsky, N.C., and Conner, S.D. (2013). Notch signaling from the endosome requires a conserved dileucine motif. *Mol Biol Cell* 24, 297-307.

Zweifel, M.E., Leahy, D.J., and Barrick, D. (2005). Structure and Notch receptor binding of the tandem WWE domain of *Deltex*. *Structure* 13, 1599-1611.

9 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
A/P	anterior-posterior
arm	armadillo
CHMP	charged multi-vesicular body protein
<i>ci</i>	<i>cubitus interruptus</i>
C-Terminus	Carboxyl-Terminus
CyO	Curly of Oster – Balancer für das 2. Chromosom
D/V	dorso-ventral
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DI	Delta
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
Dx	Deltex
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EE	early endosome
EEV	early endosomal vesicles
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESCRT	endosomal sorting complex required for transport
Flp	Flippase
Fluc	Firefly luciferase
FRT	flippase recombinase target
g	Gramm
Gbe	Grainyhead binding element
GFP	grün fluoreszierendes Protein
Grh	Grainyhead
h	Stunde
HA	Hämagglutinin
HECT	homologous to the E6AP carboxyl terminus
HF	high fidelity

hh	hedgehog
HOPS	homotypic fusion and protein sorting
hs	Hitzeschock
If	Irregular facets – Marker für das 2. Chromosom
ILV	intraluminale Vesikel
ISO	isothermal
K	Lysin
K2R	Lysin
kB	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
Krz	Kurtz
Kuz	Kuzbanian
l	Liter
LB	lysogeny broth
M	Molar
Mam	Mastermind
MARCM	Mosaic Analysis with a Repressible Cell Marker
ME	maturing endosome
<i>mib</i>	<i>mindbomb</i>
min	Minuten
MIP	Maximum Intensity Projection
MKRS	Marker für das 3. Chromosom
MVB	multivesicular body
N	Notch
n.s.	nicht significant
NECD	extrazelluläre Domäne des Notch Rezeptors
Neur	Neuralized
NEXT	Notch extracellular truncation
NGS	normal goat serum - Normales Ziegenserum
NICD	intrazelluläre Domäne des Notch Rezeptors
nM	nanomolar
NRE	Notch responsive element
N-Terminus	Amino-Terminus
p	Plasmid

Page	polyacrylamide gel electrophoresis
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl. polymerase chain reaction)
PFA	Paraformaldehyd
Psn	Presenilin
<i>ptc</i>	<i>patched</i>
R	Arginin
Rab	Ras-related in brain
RING	really interesting new gene
S2	Schneider 2
SDS	Natriumdodecylsulfat, engl. sodium dodecyl sulfate
sek	Sekunde
Ser	Serrate
SIM	Structured Illumination Microscopy
SM6a-TM6b	Compound-Balancer
Smo	Smoothened
SOP	sensory organ precursor
Su(dx)	Supressor of Deltex
Su(H)	Supressor of Hairless
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TM6b	Balancer für das 3. Chromosom
Trpml	transient receptor potential-mucolipin
tub	Tubulin
U	Unit
UAS	upstream activating sequence
Ubi	Ubiquitin
UIMs	ubiquitin interacting motive
Vps	vacuolar protein-sorting
w	white
Wg/wg	Wingless, <i>wingless</i>
wt	Wildtyp
x g/rpm	x-faches der Erdbeschleunigung/ revolutions per minute
β-Gal	β-Galactosidase
Δ	Deletion

10 Anhang

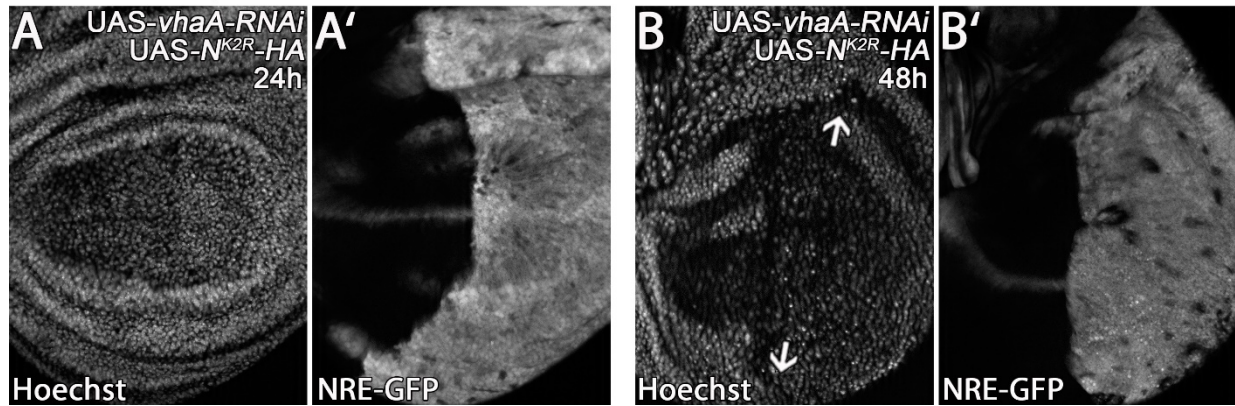
***hh*-GAL4, *tub*-GAL80^{ts}**

Abb. 55: Auswirkungen der *vhaA*-RNAi auf die Aktivität des N^{K2R}-HA Rezeptors in Flügelimaginalscheiben. N^{K2R}-HA und die *vhaA*-RNAi wurden unter Kontrolle des *hh*-GAL4 Treibers mit *tub*-GAL80^{ts} für 24h (A-A') und für 48h (B-B') koexprimiert. Als Marker für die Notch-Aktivität wurde NRE-GFP verwendet. Die Zellkerne wurden durch eine Hoechstfärbung dargestellt. Die Koexpression von N^{K2R}-HA und der *vhaA*-RNAi führt sowohl bei 24h, als auch bei 48h weiterhin zu einer starken Notch-Aktivierung (A' u. B'). Die Expression für 48h löst eine deutliche Überproliferation der Imaginalscheibe aus (B Pfeile).

hh-GAL4, *tub*-GAL80^{ts} konstitutive Expression

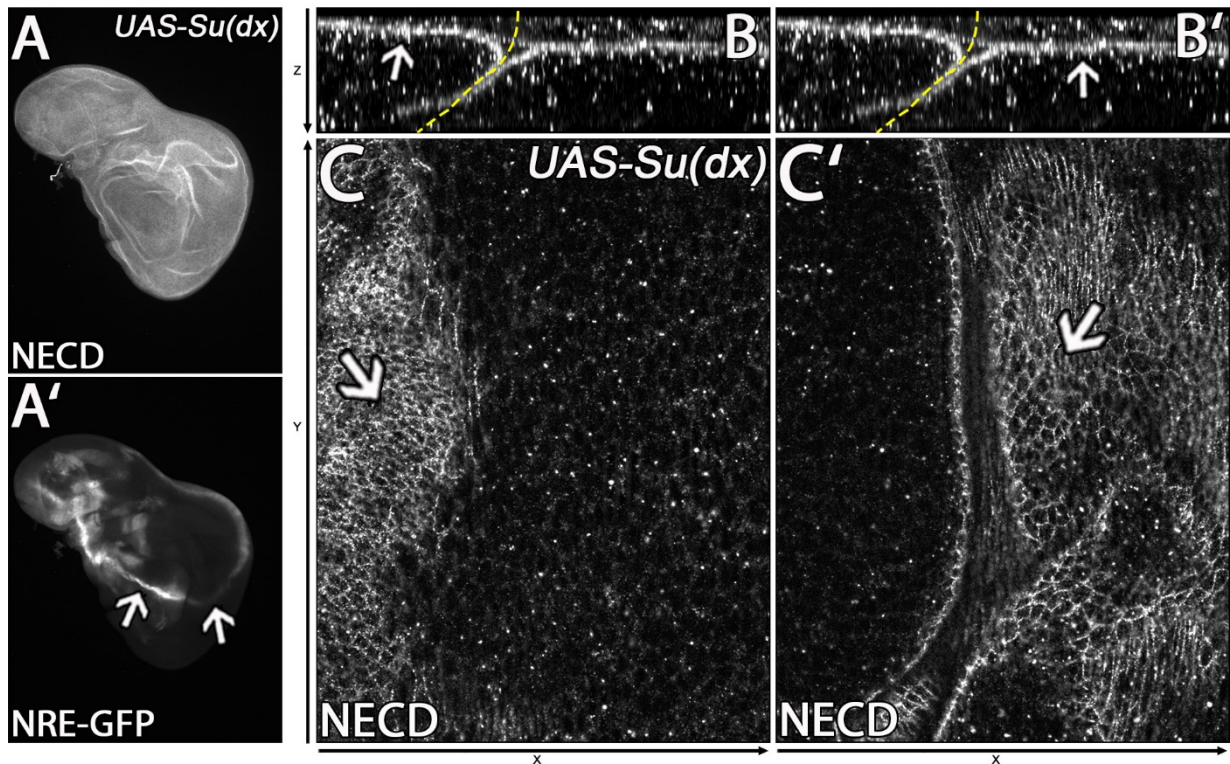
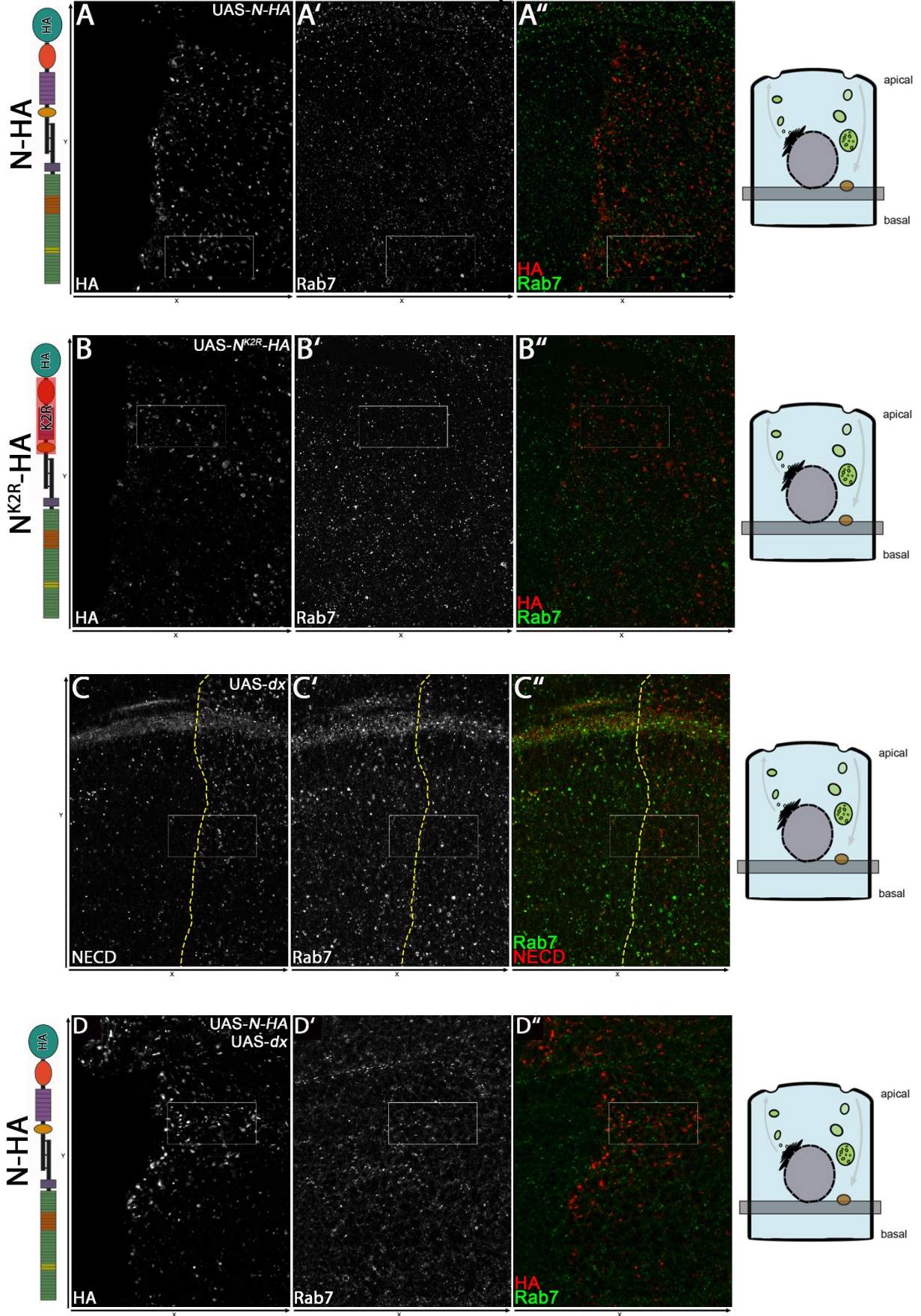


Abb. 56: Konstitutive Expression der Ubiquitinligase Su(dx). Die Expression von Su(dx) erfolgte konstitutiv unter Kontrolle des *hh*-GAL4 Treibers bei 29°C. Um den endogenen Notch-Rezeptor zu detektieren wurde eine Antikörperfärbung gegen NECD durchgeführt. Als Marker für die Notch-Aktivität wurde NRE-GFP verwendet. Durch die Expression von Su(dx) kommt es zu einer deutlichen Abschwächung der Notch-Aktivität (A' Pfeile). Die Membranakkumulation des endogenen Rezeptors wird hingegen nicht durch die Überexpression von Su(dx) nicht beeinflusst (Vergleich C (anterior) / C' (posterior) u. B (anterior) / B' (posterior) Pfeile).

hh-GAL4, tub-GAL80^{ts} 14,5 h Expression



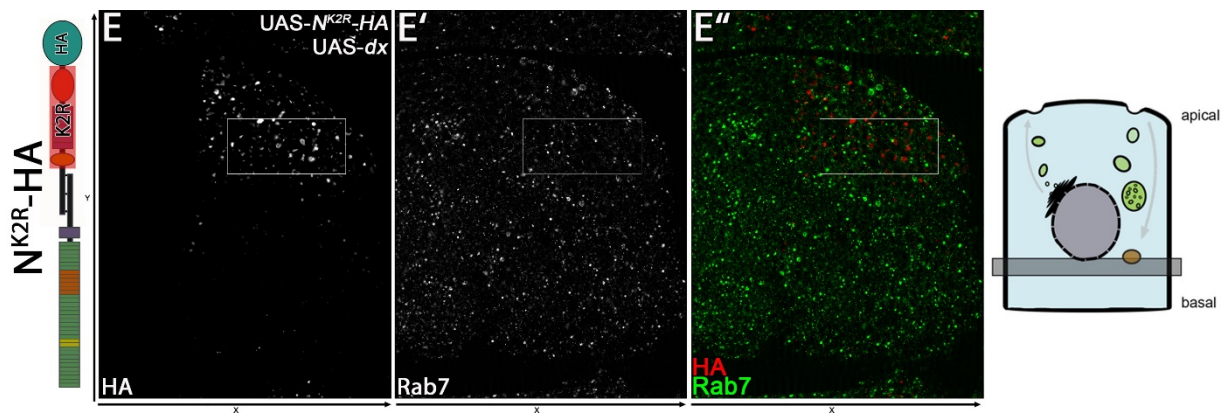


Abb. 57: Auswirkungen der Dx Überexpression auf die endosomale Lokalisation von N-HA und N^{K2R}-HA (Übersicht). Die Rezeptoren N-HA und N^{K2R}-HA, sowie die E3-Ligase Dx wurden für 14,5h unter Kontrolle des *hh*-GAL4 Treibers mit *tub-GAL80^{ts}* exprimiert. In der X/Y-Ebene werden basale Ansichten der Flügelimaginalscheiben gezeigt. Zur Detektion der transgenen Rezeptoren wurde eine HA Antikörperfärbung durchgeführt. Zur Detektion des endogenen Rezeptors wurde eine NECD Antikörperfärbung durchgeführt. Als Marker für spätendosomale Kompartimente wurde eine Antikörperfärbung gegen Rab7 durchgeführt. Die gestrichelte gelbe Linie markiert die Grenze der *hh*-Expressionsdomäne. Ausschnitte die im Ergebnisteil verwendet werden sind durch weiße Boxen gekennzeichnet.

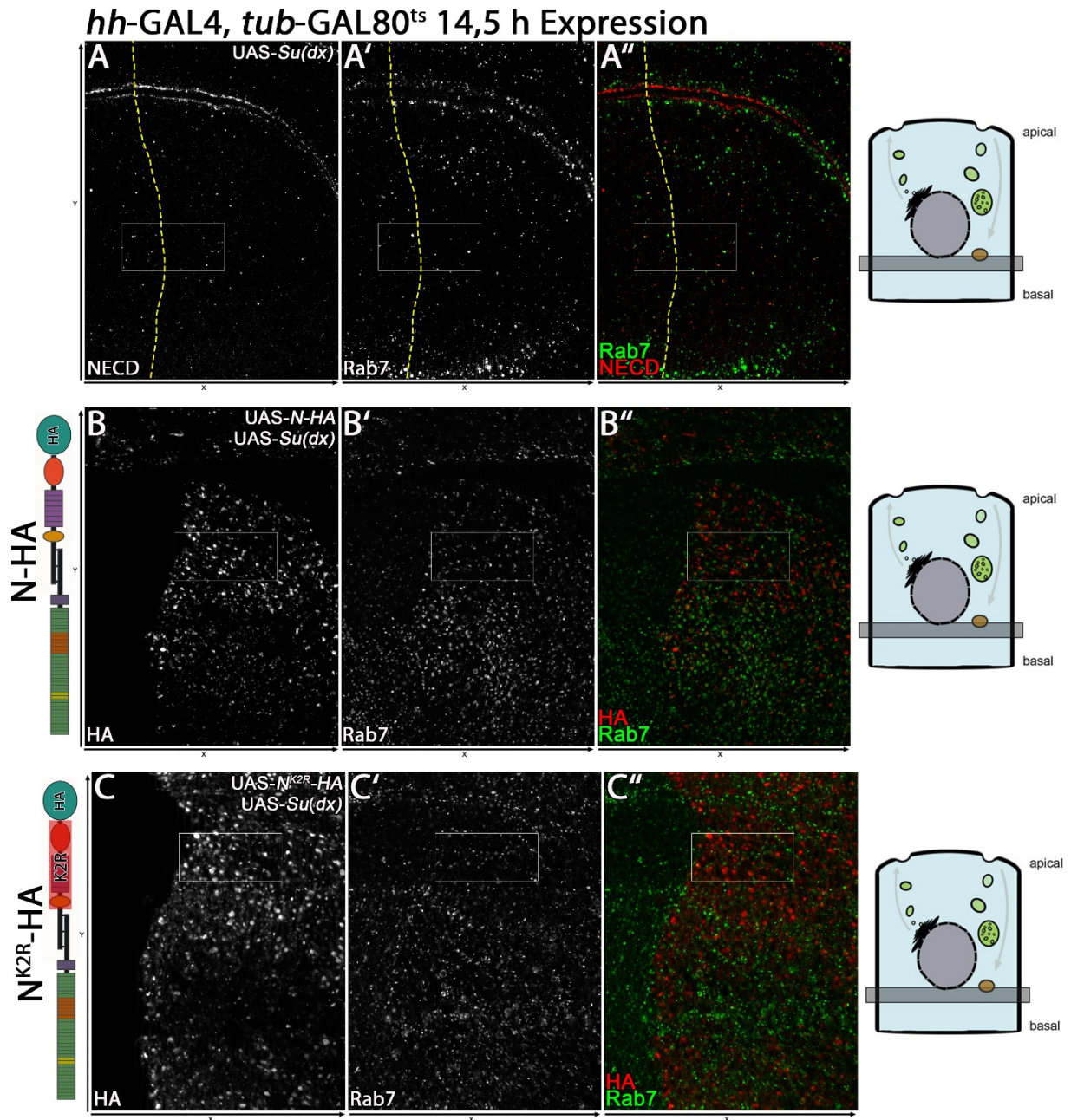


Abb. 58: Auswirkungen der *Su(dx)* Überexpression auf die endosomale Lokalisation von N-HA und N^{K2R}-HA (Übersicht). Die Rezeptoren N-HA und N^{K2R}-HA, sowie die E3-Ligase *Su(dx)* wurden für 14,5h unter Kontrolle des *hh*-Gal4 Treibers mit *tub*-GAL80^{ts} exprimiert. In der X/Y-Ebene werden basale Ansichten der Flügelimaginalscheiben gezeigt. Zur Detektion der transgenen Rezeptoren wurde eine HA Antikörperfärbung durchgeführt. Zur Detektion des endogenen Rezeptors wurde eine NECD Antikörperfärbung durchgeführt. Als Marker für spätendosomale Kompartimente wurde eine Antikörperfärbung gegen Rab7 durchgeführt. Die gestrichelte gelbe Linie markiert die Grenze der *hh*-Expressionsdomäne. Ausschnitte die im Ergebnisteil verwendet werden sind durch weiße Boxen gekennzeichnet.

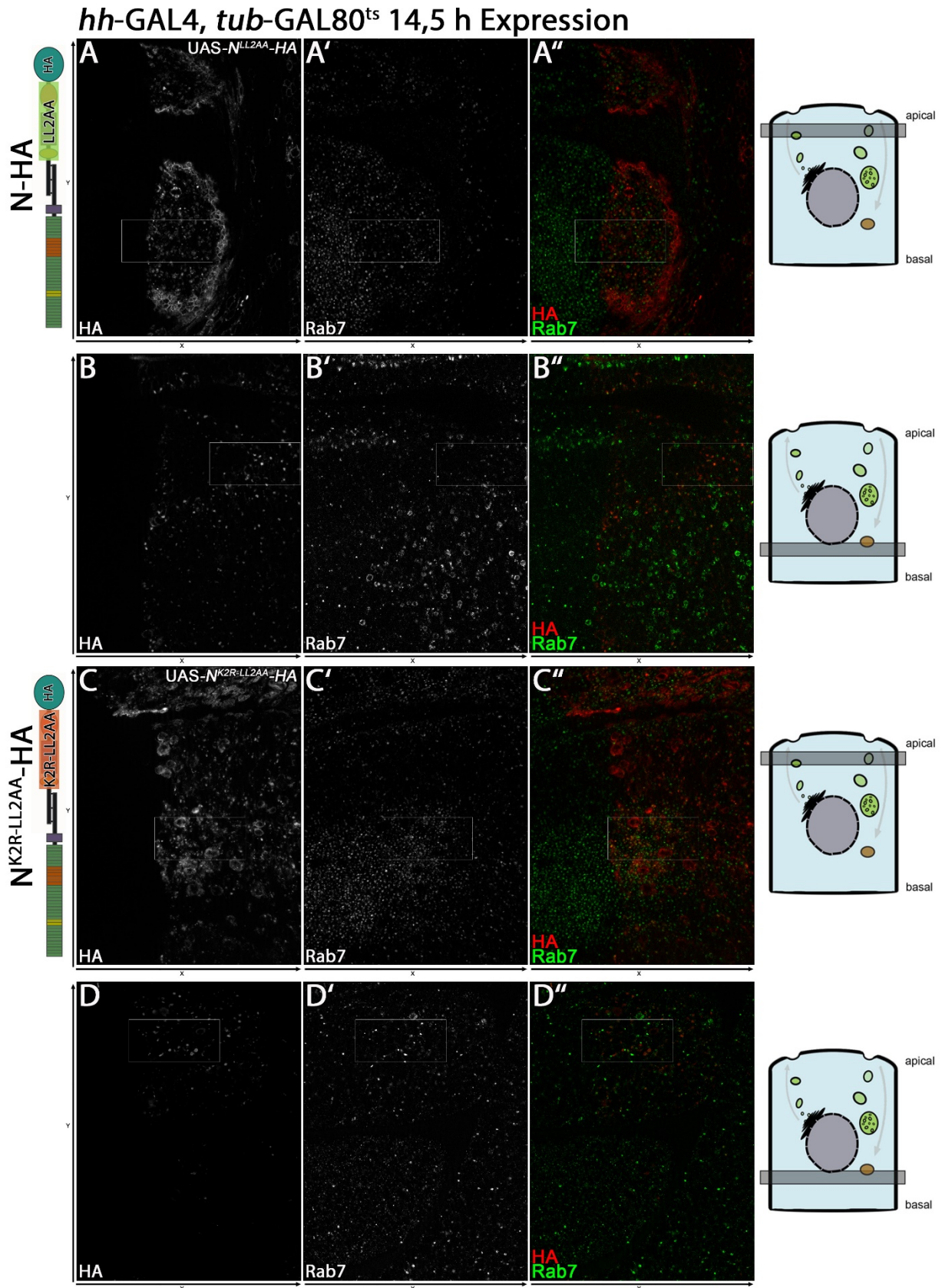


Abb. 59: Untersuchung der endosomalen Lokalisation von N^{LL2AA}-HA und N^{K2R-LL2AA}-HA (Übersicht). Die Rezeptoren N^{LL2AA}-HA und N^{K2R-LL2AA}-HA wurden für 14,5h unter Kontrolle des *hh*-GAL4 Treibers mit *tub*-GAL80^{ts} exprimiert. In der X/Y-Ebene werden apikale, sowie basale Vesikel gezeigt. Zur Detektion der transgenen Rezeptoren wurde eine HA Antikörperfärbung durchgeführt. Als Marker für spätendosomale Kompartimente wurde eine Antikörperfärbung gegen Rab7 durchgeführt. Ausschnitte die im Ergebnisteil verwendet werden sind durch weiße Boxen gekennzeichnet.

11 Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Thomas Klein für die Übergabe des interessanten Projektes, die gute Betreuung und vor allem für den stetigen Austausch und die Diskussion über neue Projekte bedanken.

Bei Herrn Prof. Dr. Hermann Aberle bedanke ich mich für die Übernahme des Koreferats und anregende Diskussionen im Notch-Club.

Ich danke Herrn Dr. Martin Baron und Hideyuki Shimizu für den herzlichen Empfang in Manchester und die Möglichkeit viele neue Methoden zu erlernen.

Ein großer Dank gilt allen ehemaligen und aktuellen Kollegen der AG Klein, die immer für eine gute Atmosphäre gesorgt haben und bei Problemen immer ansprechbar waren.

Bei Sylvia Tannebaum bedanke ich mich für die Injektionen von zahlreichen widerspenstigen Konstrukten. Sie hat es geschafft jeder Fliege ein rotes Auge zu verpassen!!!

Vielen Dank an Gisela, Jessica, Stefan, Elke, Mehmet und Monika für die Hilfe und einen nie endenden Nachschub an Fliegenbrei.

Ebenfalls möchte ich mich bei meinen Bachelor- und Masterstudenten Bastian, Marvin, Anna, Denise und Sven für die Unterstützung bedanken.

Mein Dank gilt natürlich auch den Herrschaften des Tea-Clubs für die Momente feinsten Bergamotten-Aromas.

Christine, manchmal braucht es auch drei Wörter – KÄSEKUCHEN MIT KIRSCHEN

Vielen Dank für die Unterstützung!!

Ein besonderer Dank gilt Tobi und Nadja für das Korrekturlesen und natürlich auch für die tolle gemeinsame Zeit in der AG Klein

Ich muss mich ganz herzlich bei Sandra und meinem Vater bedanken, die mich während der letzten Wochen mehr als Unterstützt haben. DANKE!!!

12 Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist. Darüber hinaus versichere ich, dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät zur Prüfung vorgelegen hat.

Düsseldorf, November 2019

Björn Schnute

