Analyse der Lysine in der intrazellulären Domäne des DSL-Liganden Serrate

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Ekaterina Seib
aus Lebjaschje

Düsseldorf, September 2020

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. Jun.-Prof. Dr. Mathias Beller

Tag der mündlichen Prüfung: 16.11.2020

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung ... 1
1.1 Der Notch-Signalweg ... 1
1.1.1 Die DSL-Liganden ... 3
1.2 Ubiquitinierung der DSL-Liganden durch die E3-Ligasen Mib1 und Neur ... 3
1.2.1 Die Interaktionsmotive für Mib1 und Neur in den ICDs der DSL-Liganden ... 6
1.3 Die endozytotische Regulation des Notch-Signalwegs ... 7
1.3.1 Die Rolle der Endozytose der DSL-Liganden im Notch-Signalweg ... 9
1.4 Die Rolle des Notch-Signalwegs bei der Flügelentwicklung von *Drosophila* ... 11
1.4.1 Die *Cis*-Inhibition des Notch-Signalwegs durch die DSL-Liganden ... 13
1.5 Ziele der Arbeit ... 15
2 Material und Methoden ... 16
2.1 Drosophila Methoden ... 16
2.1.1 Verwendete Fliegenstämme ... 16
2.1.2 Kultivierung von *Drosophila* ... 19
2.1.2a Anzucht und Haltung von *Drosophila* ... 19
2.1.2b Kreuzen von *Drosophila* ... 19
2.1.3 GAL4/UAS-GAL80-Expressionssystem ... 19
2.1.4 Klonale Analyse mithilfe des FLP/FRT- und des MARCM-Systems ... 20
2.1.5 Das Reportergen Gbe+Su(H)-*lacZ* ... 23
2.1.6 RNA-Interferenz ... 24
2.1.7 Antikörperfärbung an den Flügelimaginalscheiben von *Drosophila* ... 25
2.1.8 Oberflächenfärbung an den Flügelimaginalscheiben von *Drosophila* ... 26
2.2 Molekularbiologische und biochemische Methoden ... 27
2.2.1 Klonierungstrategie zur Herstellung der Ser-Rs- und SerK2R-Ks-Varianten. ... 27
2.2.2 Isolierung der genomischen DNA aus *Drosophila* ... 30
2.2.3 Isolierung der genomischen DNA aus einer Fliege ... 31
2.2.4 Polymerase Ketten Reaktion (PCR) ... 31
2.2.5 Ortspezifische Mutagenese (SDM, site directed mutagenesis) ... 34
2.2.6 Restriktionsspaltung ... 35
2.2.7 Gelelektrophorese ... 36
2.2.8 DNA-Gelextraktion ... 37
2.2.9 Ligation ... 37
2.2.10 Transformation chemisch-kompetenter Bakterien-Zellen ... 37

2.2.11 Plasmid DNA-Mini-Präparation ... 38
2.2.12 Plasmid-DNA-Midi-Präparation ... 38
2.2.13 Sequenzierung ... 38
2.3 Zellkultur der S2-Zellen von *Drosophila* ... 39
2.3.1 Kultivierung der S2-Zellen ... 39
2.3.2 Passagieren der S2-Zellen ... 39
2.3.3 Transfektion der S2-Zellen ... 40
2.3.4 Beschichtung der Deckgläschen mit Poly-L-Lysin (0,01%) ... 40
2.3.5 Überführen der Zellen auf die beschichteten Deckgläser ... 41
2.3.6 Beschichtung der Deckgläschen mit Poly-L-Lysin mit anschließender UV-Bestrahlung ... 41
2.3.7 Antikörper Färbung an den S2-Zellen ... 41
2.3.8 Antikörper-„Uptake“-Assay ... 42
2.4 Proteinbiochemische Methoden ... 42
2.4.1 Extraktion von Proteinen aus *Drosophila* L3-Larven ... 42
2.4.1 Herstellung der Proteinlysate aus den S2-Zellen für die Co-IP ... 43
2.4.2 Co-Immunopräzipitation via HA-gekoppelter Agarose ... 43
2.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot ... 45
2.4.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese zur Auftrennung von Proteinen ... 46
2.4.5 Western Blot mittels Semy-Dry-Blotverfahren ... 46
2.4.1 Immunhistochemische Färbung von Western Blots ... 47
2.4.1 „Strippen“ der PVDF Membran ... 47
2.5 Geräte und Software ... 47
3 Ergebnisse ... 49
3.1 Testsystem für die Aktivierung des Notch-Signalwegs ... 49
3.2 Analyse der K-freien ICD von Ser ... 51
3.2.1 Ser mit einer K-freien ICD ist inaktiv und wirkt dominant negativ ... 51
3.2.2 Der Verlust der Ks in der ICD führt zur Störung der Endozytose und der Degradation von Ser 54
3.2.3 Die transgenen Ser-Liganden beeinflussen die Lokalisation des endogenen N-Rezeptors 59
3.2.4 Die K-freie ICD von Ser interagiert mit Mib1 ... 62
3.2.5 Ubiquitin-interagierende Motive von Lqf werden für die Ser-Aktivität benötigt ... 64
3.3 Die Rolle einzelner Ks in der ICD für die Aktivität von Ser ... 69
3.3.1 Der Austausch von K1362 beeinträchtigt die Aktivität von Ser ... 70
3.3.2 Es werden mindestens fünf Ks in der ICD für die volle Ser-Aktivität benötigt ... 75
3.3.3 K1370 kann den Verlust eines der konservierten Ks kompensieren ... 80

3.4 Analyse der Expression von Neur auf die Aktivität von Ser ... 82
3.4.1 Neur kann Ser Mib1-und Ks-unabhängig aktivieren ... 83
3.4.2 Die Neur-vermittelte Aktivierung von Ser wird durch die Ks in der ICD gesteigert ... 88
3.4.3 Neur induziert die Endozytose und Degradation von Ser unabhängig von Ks in der ICD ... 90
3.5 Die putativen N- und C-Boxen in der ICD sind nicht essentiell für die Ser-Aktivität ... 95
4 Diskussion ... 100
4.1 Die Rolle der Ks in der ICD für die Aktivität, die Endozytose und Degradation von Ser ... 100
4.1.1 Die Ks in der ICD und Ubiquitinierung sind essentiell für die Aktivität von Ser ... 100
4.1.2 Die Endozytose und Degradation von Ser sind abhängig von den Ks in der ICD ... 102
4.1.3 Die transgenen Ser-Liganden verändern die Lokalisation des N-Rezeptors ... 104
4.1.4 Die Identifizierung essentieller Ks in der ICD von Ser ... 107
4.1.5 Vergleich der Wirkungsweise von SerK2R-HA und Ser^{R1362}-HA ... 109
4.2 Die putativen Mib1-Bindemotive sind nicht essentiell für die Ser-Aktivität ... 113
4.3 Neur aktiviert Ser K- und Mib1-unabhängig ... 115
4.3.1 Neur kann die Endozytose und Degradation von Ser K-unabhängig einleiten ... 116
5 Zusammenfassung ... 118
6 Summary ... 119
7 Literaturverzeichnis ... 120
8 Abkürzungsverzeichnis ... 125
9 Anhang ... 127
10 Danksagung ... 142
11 Eidesstattliche Erklärung ... 143

1 Einleitung

Für eine normale Entwicklung eines multizellulären Organismus ist die Zell-Zell-Kommunikation unentbehrlich. Sie ermöglicht eine zeitlich und räumlich koordinierte Zuteilung verschiedener Zellschicksale und somit die Ausbildung komplexer Strukturen. Fehlende Zell-Zell-Kommunikation kann dramatische Auswirkungen auf die Entwicklung und Aufrechterhaltung eines Lebewesens haben. Im Laufe der Evolution sind Signaltransduktionswege entstanden, die den Informationsaustausch zwischen den Zellen vermitteln und Prozesse wie Proliferation, Apoptose und Zelldifferenzierung kontrollieren. Für die kontaktabhängige Kommunikation zwischen benachbarten Zellen ist unter anderem der Notch-Signalweg verantwortlich.

1.1 Der Notch-Signalweg

Der Notch-Signalweg ist in allen Metazoen hoch konserviert. Eine Deregulation des Notch-Signalwegs führt zu Anomalien in der Entwicklung bis hin zum Tod. Zahlreiche Krankheiten sind mit einer Deregulation des Notch-Signalwegs assoziiert (Übersicht in [1]).

Die kanonische Aktivierung des Notch-Signalwegs erfolgt infolge einer direkten Interaktion zwischen dem Notch-Rezeptor (N) der Signal-empfangenden Zelle mit einem DSL-Liganden (**D**elta und **S**errate in *Drosophila*, **L**ag-2 in *C. elegans*) der benachbarten, Signal-sendenden Zelle [2-4]. Der N-Rezeptor wird im rauen endoplasmatischen Retikulum synthetisiert und durch eine Furin-ähnliche Konvertase prozessiert (S1-Schnitt), wodurch ein Heterodimer entsteht, das an die Zelloberfläche gebracht wird [5]. Sowohl der N-Rezeptor als auch die DSL-Liganden sind sog. Typ-I-Transmembranproteine, die in den extrazellulären Domänen (ECD-**e**xtra**c**ellular **d**omain) über EGF-ähnliche Wiederholungen (EGF-like repeats, **e**pidermal **g**rowth **f**actor) verfügen. Diese EGF-ähnlichen Wiederholungen vermitteln die Interaktion zwischen dem N-Rezeptor und den Liganden [6, 7]. Hierbei ist eine Interaktion zwischen dem Rezeptor einer Zelle und dem Liganden der benachbarten Zelle (*in trans*), sowie mit dem Liganden derselben Zelle (in *cis*) möglich (Abbildung 1, ①, ⑧) (Übersichten in [2-4]). Während eine Interaktion *in trans* in einer Aktivierung des Notch-Signalwegs resultiert, kommt es bei der Interaktion *in cis* zu einer Unterdrückung der Notch-Aktivität (*Cis*-Inhibition) (Übersicht in [8]).

Eine *Trans*-Aktivierung des Notch-Signalwegs benötigt die Endozytose sowohl des N-Rezeptors als auch der Liganden [9, 10]. Die Endozytose der Liganden wird durch die E3-Ubiquitin-Ligasen Mind bomb1 (Mib1) und Neuralized (Neur) reguliert (Abbildung 1, ②) (Übersicht in [10, 11]). Als Folge der Liganden-Endozytose wird der N-Rezeptor zweimal proteolytisch gespalten (Übersichten in [2-4, 12] und [13, 14]). Die erste proteolytische Spaltung (S2-Schnitt) wird durch die Metalloprotease der ADAM (**a** **d**isintegrin **a**nd **m**etalloprotease)-Familie, Kuzbanian (Kuz) in *Drosophila*, ausgeführt (Abbildung 1, ③) ([15] und Übersicht in [16]). Darauf wird die extrazelluläre Domäne des N-Rezeptors (NECD-**N**otch **e**xtra**c**ellular **d**omain) in die Signal-

sendende Zelle *trans*-endozytiert und dort degradiert (Abbildung 1, ④) [13, 14]. Dies führt zur Entstehung eines in der Membran verankerten Fragmentes (NEXT-**N**otch **ex**tracellular **t**runcation*)*, das von dem γ-Sekretase Komplex erkannt und an der S3-Schnittstelle gespalten wird (Abbildung 1, ⑤) [17]. Durch den S3-Schnitt in der Transmembrandomäne wird die intrazelluläre Domäne des Rezeptors (NICD-**N**otch **i**ntra**c**ellular **d**omain) freigesetzt und in den Zellkern transloziert (Abbildung 1, ⑥). Dort initiiert die NICD mit einem Transkriptionsfaktor der CSL-Familie (**C**BF1 in Vertebraten, **S**u(H) in *Drosophila*, **L**ag1 in *C. elegans*), mit Mastermind (MAM) und weiteren Ko-Faktoren, die Expression der Notch-Zielgenen (Übersicht in [2]). Zu den Zielgenen des Notch-Signalwegs zählen unter anderem *wingless* (*wg*) und *Enhancer of split (E(spl))* in *Drosophila* und *Hes* und *Hey* in Säuger (Abbildung 1, ⑦).

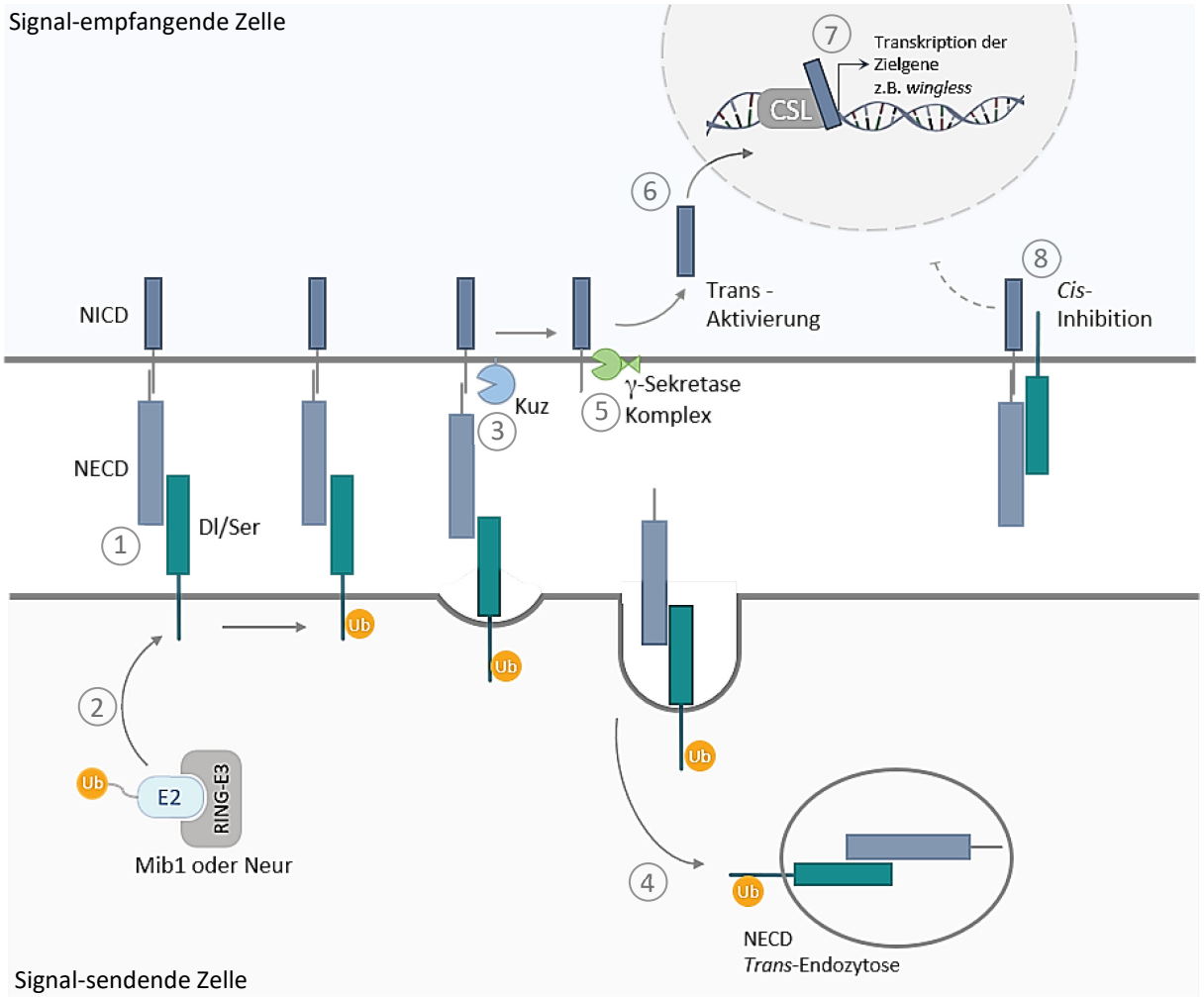


Abbildung 1: Übersicht über die Hauptkomponenten des Notch-Signalwegs. Der N-Rezeptor liegt als Heterodimer vor und wird nach der Bindung an einen der Liganden der benachbarten Zelle aktiviert ①. Die Liganden werden durch die E3-Ubiquitin-Ligasen Mib1 oder Neur ubiquitiniert, was anschließend zur Liganden-Endozytose führt ②. Die Liganden-Endozytose resultiert in zwei proteolytischen Spaltungen des N-Rezeptors. Dabei wird der N-Rezeptor zuerst durch die Metalloprotease Kuz geschnitten ③. Die abgespaltene NECD wird zusammen mit dem Liganden in die Signal-sendende Zelle *trans*-endozytiert ④. Nach der *Trans*-Endozytose von NECD entsteht ein in der Membran-verankertes Fragment, das von dem γ-Sekretase-Komplex gespalten wird ⑤. Durch diesen Schnitt wird die NICD freigesetzt und in den Zellkern transportiert ⑥. Im Zellkern agiert die NICD zusammen mit weiteren Ko-Aktivatoren wie z.B. Su(H) und MAM als Transkriptionsfaktor und leitet die Expression der Notch-Zielgene ein ⑦.
Eine Rezeptor-Ligand-Bindung innerhalb derselben Zelle resultiert in der *Cis*-Inhibition ⑧.

1.1.1 Die DSL-Liganden

In *Drosophila* sind zwei DSL-Liganden, Delta (Dl) und Serrate (Ser), bekannt. Dl hat drei Säuger Orthologe: Delta-like1 (Dll1), Delta-like3 (Dll3), Delta-like4 (Dll4), während Ser zwei Säuger Orthologe namens Jagged1 (Jag1) und Jagged2 (Jag2) hat (Übersicht in [29]). Dl und Ser zeigen partiell überlappende Expressionen und Funktionen. Es gibt jedoch Prozesse, in denen nur einer der beiden Liganden aktiv ist. So ist z.B. Ser verantwortlich für die Beinsegmentierung und Gelenkspezifikation [30, 31], während Dl für die Differenzierung der neuronalen Vorläuferzellen benötigt wird. Die Flügelentwicklung wiederum benötigt beide Liganden [20, 32, 33], wobei Ser wichtiger ist [34].

Alle DSL-Liganden besitzen in ihrer ECD eine DSL-Domäne, eine N-terminale Region (MNNL) und mehrere EGF-ähnliche Wiederholungen. Die DSL und die N-terminale Domäne werden zusammen mit den zwei ersten EGF-ähnlichen Wiederholungen für die Bindung an den Rezeptor benötigt. Die Anzahl der EGF-ähnlichen Wiederholungen variiert unter den unterschiedlichen Liganden. Insgesamt sind aber die ECDs der DSL-Liganden unter unterschiedlichen Orthologen und Paralogen gut konserviert. Im Gegensatz zu den ECDs weisen die Aminosäuresequenzen der ICDs weniger Homologien auf (Übersichten in [29], [6]), (Robert Jaekel, Dissertation 2006). Sie besitzen konservierte Lysine (Ks), die als Substrate für die Ubiquitinierung dienen können (Übersicht in [35]). In zahlreichen Experimenten wurde die Abhängigkeit der Liganden-Aktivität von der Ubiquitinierung ihrer ICDs demonstriert (Übersicht in [11]). Untersuchungen in Zellkultur zeigten, dass ein Dll1-Ligand mit einer K-freien ICD (Dll1K2R) nicht ubiquitiniert wird und den Notch-Signalweg nicht aktivieren kann [36]. Darüber hinaus besitzt die ICD von Dll1 ein stark konserviertes K613, das für die Ubiquitinierung und die Aktivität von Dll1 wichtig ist [37]. Eine *Drosophila* Dl-Variante ohne Ks in der ICD (DlK2R) wird ebenfalls nicht ubiquitiniert. Der DlK2R-Ligand wirkt stark *cis*-inhibitorisch und weist eine stark reduzierte Aktivität auf [28]. Im Gegensatz zu Dl und Dl-likes ist bislang wenig über die Rolle der Ks in der ICD von Ser bekannt. Es wurden zwei konservierte Ks beschrieben, die für die Funktion von Ser wichtig sind [25]. Die restlichen Ks wurden hingegen noch nicht untersucht.

1.2 Ubiquitinierung der DSL-Liganden durch die E3-Ligasen Mib1 und Neur

Wie zuvor erwähnt, verfügen die DSL-Liganden über intrazelluläre Ks, die durch die E3-Ubiquitin-Ligasen (E3s) Mib1 und Neur ubiquitiniert werden können. Die Ubiquitinierung stellt eine posttranslationale Modifikation von Proteinen dar, bei der das Polypeptid Ubiquitin an Ks eines Substratproteins kovalent gebunden wird. Abhängig von der Art der Ubiquitin-Kopplung sind unterschiedliche Regulationen des Zielproteins möglich. Dabei kann es zwischen einer Mono- und einer Poly-Ubiquitinierung unterschieden werden. Bei der Mono-Ubiquitinierung wird ein einzelnes Ubiquitin an Ks des Substratproteins gebunden, während bei der Poly-Ubiquitinierung eine Ubiquitin-Kette gekoppelt wird. Mono-Ubiquitinierungen dienen der Regulation von nicht-

degradativen Prozessen, wie die Einleitung der Endozytose und der Transport von Transmembranproteinen. Mit Hilfe der Poly-Ubiquitinierungen werden der proteasomale Abbau der Zielproteine, sowie die nicht-degradativen Prozesse reguliert [38, 39]. So werden die DSL-Liganden durch die Ubiquitinierung ihrer ICD für die Endozytose markiert, was für die Aktivierung des Notch-Signalwegs essentiell ist.

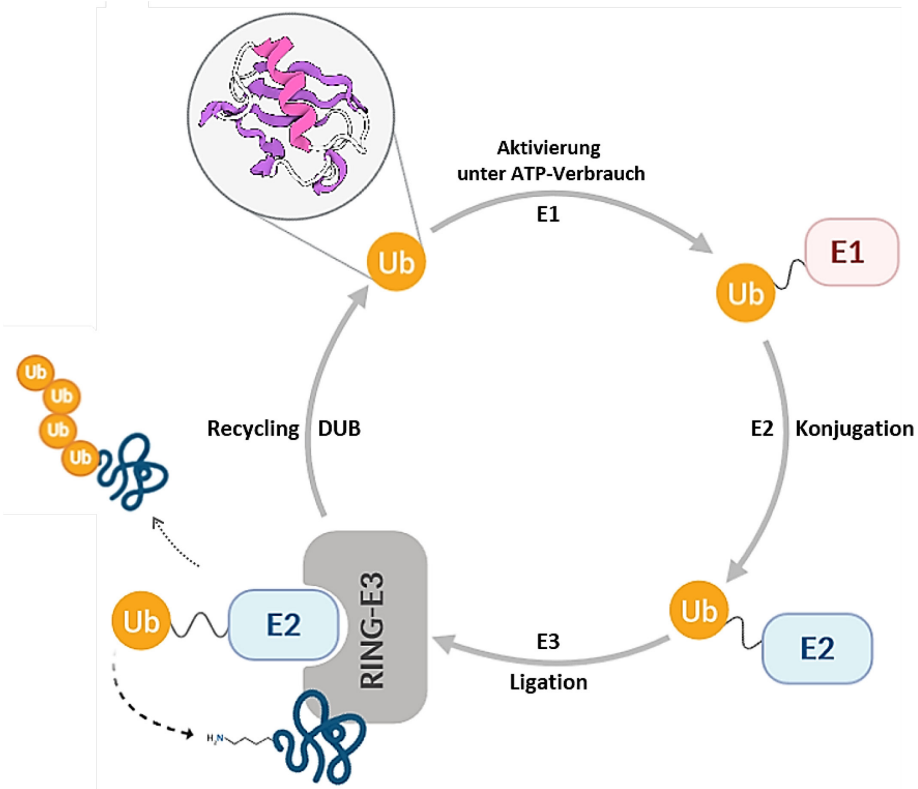


Abbildung 2: Mechanismus der Ubiquitinierungsreaktion mithilfe von RING-E3-Ubiquitin-Ligasen. Das Ubiquitin wird von einem vorher ubiquitiniertem Substratprotein oder aus einem Vorläufermolekül abgeschnitten. Diese beiden Reaktionen werden durch Deubiquitinasen (DUB) katalysiert. Das reife Ubiquitin wird dann durch ein E1-Enzym unter ATP-Verbrauch aktiviert, mittels eines E2-Enzyms konjugiert und schließlich an das Substratprotein ligiert. Die Ligation des Ubiquitins erfolgt an einem Lysinrest des Substratproteins und wird durch E3-Ubiquitin-Ligasen katalysiert. Im Falle der RING-E3-Ligasen binden die E3s das Substrat und übertragen das Ubiquitin vom E2 direkt auf das Substratprotein. (Nach [39]).

Der Prozess der Ubiquitinierung umfasst drei generelle Schritte. Zuerst wird Ubiquitin durch das E1-Enzym unter ATP-Verbrauch aktiviert. Danach wird das aktivierte Ubiquitin auf das E2-Enzym übertragen. Anschließend katalysieren die E3s den Transfer des Ubiquitins an den Lysinrest des Substratproteins (Übersichten in [38, 40]). Somit wird ein wichtiger regulatorischer Schritt der Ubiquitinierungsreaktion durch die E3s vorgegeben, die die Substratauswahl und die Wahl der (Poly-) Ubiquitin-Kette bestimmen (Abbildung 2). Nach der Endozytose und Sortierung im endosomalen Transportweg werden die Substratproteine durch Deubiquitinasen (DUB) deubiquitiniert und das freigesetzte Ubiquitin wird für einen weiteren Ubiquitinierungszyklus wiederverwendet (Abbildung 2). Zurzeit sind vier Hauptklassen von E3s, basierend auf ihren funktionalen und strukturellen Eigenschaften, bekannt: RING (really interesting new gene), U-

box, HECT (homologous to E6AP C-terminus), und RBR (RING-between-RING) -E3-Ligasen. Die RING-E3s katalysieren den direkten Transfer des Ubiquitins vom E2 –Ubiquitin-Komplex auf das Substrat (Übersichten in [39, 40]).

In *Drosophila* ubiquitinieren zwei RING-E3s, Mib1 und Neur, die Liganden Dl und Ser und regulieren diverse durch den Notch-Signalweg vermittelten Prozesse. Dabei kontrolliert Mib1 unter anderem die Spezifizierung des Flügelrandes, die Beinsegmentierung, die Determination der Flügelvenen [41, 42], sowie die Augenentwicklung [42]. In der Flügelimaginalscheibe ist Mib1 ubiquitär exprimiert [41], weshalb die meiste Aktivierung des Notch-Signalwegs innerhalb der Flügelimaginalscheibe von Mib1 abhängig ist. Ein Ausfall von *mib1* resultiert in verkleinerten Flügelimaginalscheiben mit fehlender Aktivierung des Notch-Signalwegs an der (d/v) -Grenze und puppaler Letalität des Organismus [28, 41, 42]. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Endozytose von Ser in *mib1*-mutanten Zellen gestört ist, was zu einer Akkumulation des Liganden an der apikalen Membran führt [41, 43]. Obwohl für Dl die Endozytose noch beobachtet wird [43], ist die Aktivität des Liganden deutlich reduziert [28].

Neur spielt während der embryonalen Entwicklung eine wichtige Rolle in allen drei Keimblättern. Daher resultiert ein *neur*-Ausfall in embryonaler Letalität [44]. Außerdem reguliert Neur die Entwicklung des zentralen und peripheres Nervensystems im Embryo sowie in Imago, inklusive der Musterbildung bei der Makrochaeten-Entwicklung in den Flügelimaginalscheiben und Spezifizierung der Photorezeptoren in den Augenimaginalscheiben [45, 46]. Im Gegensatz zu Mib1 ist die Neur-Expression in der Flügelimaginalscheibe auf sensorischen Vorläuferzellen beschränkt [45, 47]. Neur ist jedoch in der Lage die Funktion von Mib1 in den Flügelimaginalscheiben zu übernehmen. Eine ektopische Expression von Neur im *mib1*-mutanten Hintergrund führt zur Wiederherstellung der endogenen Wg-Expression entlang der d/v-Grenze [28, 41]. Darüber hinaus zeigten Untersuchungen von DlK2R, dass Neur Dl unabhängig von den Ks und von Mib1 aktivieren kann [28].

Beide E3s weisen bis auf eine C-terminale RING-Domäne wenige strukturelle Ähnlichkeiten auf (Übersichten in [11, 38, 41]). Mib1 besitzt eine N-terminale Region, die sog. MZM und REP-Domänen beinhaltet (Abbildung 3, A). Die beiden Domänen sind für die Interaktion mit dem Liganden erforderlich [48]. An die MZM-REP-Domäne folgen acht Ankyrin-Motive, gefolgt von drei RING-Domänen (Abbildung 3, A). Hierbei wird nur die dritte RING-Domäne für die Ligase-Aktivität benötigt (Übersicht in [49]). Im Gegensatz zu Mib1 enthält Neur eine einzige C-terminale RING-Domäne, die die Ubiquitinierungsreaktion katalysiert [46, 50, 51]. Des Weiteren enthält Neur NHR1- und NHR2-Domänen (**N**euralized **H**omology **R**epeat 1 und 2) (Abbildung 3, A), die für Neur spezifisch sind (Übersicht in [52]). Dabei vermittelt die NHR1-Domäne die Interaktionen mit den DSL-Liganden und ist für die Lokalisation von Neur an der apikalen Membran verantwortlich [53-55]. Die NHR2-Domäne ist für die Bindung an den Liganden nicht essentiell, scheint aber für die volle Funktion von Neur wichtig zu sein [55]. Neur ist ein peripheres Membranprotein [45, 50,

56] an dessen N-Terminus sich ein Phosphatidylinositol (PIP_2)-Bindemotiv befindet (Abbildung 3, A). Mutationen in diesem Bindemotiv (sog. $Neur^{5Q}$) führen zu einer Fehllokalisation von Neur im Zytoplasma und zu Defekten in der Endozytose von Dl in S2-Zellen [57].

1.2.1 Die Interaktionsmotive für Mib1 und Neur in den ICDs der DSL-Liganden

Ein Vergleich der Aminosäuresequenz der Dl-ICDs verschiedener Insektenspezies offenbarte vier konservierte Regionen (ICD1-ICD4), die für die Ubiquitinierung und Aktivität des Liganden wichtig sind [58]. Es wurde demonstriert, dass Mib1 an die ICD2 bindet, während Neur an die ICD1 bindet und K742 in der ICD3 ubiquitiniert [58]. Die zu den ICD2 und ICD3 analogen Bereiche wurden später in der ICD von Jag1 als Bindungsboxen für humanes MIB1 anhand der Kristallstruktur beschrieben [48]. Hierbei wird die näher am N-Terminus liegende Bindungsbox (=ICD2), als N-Box bezeichnet, während die C-Box (=ICD3) sich C-terminaler in der ICD befindet ((Abbildung 3, B) und [48, 58]). In *vivo* Analysen der ICD von Jag1 deuten darauf hin, dass sowohl die N- als auch die C-Box für die Interaktion mit MIB1 und für die Aktivität des Liganden benötigt werden. Dabei vermittelt die N-Box die Interaktion mit der MZM-Domäne, während die C-Box an die REP-Domäne von MIB1 bindet [48]. Die Aminosäuresequenzen der beiden Boxen zeigen Homologien mit den Aminosäuresequenzen der ICD von anderen Liganden der DSL-Familie. Basierend auf diesen Sequenzhomologien wurden die N- und C-Boxen in den ICDs von Jag2, Dl und Ser vorhergesagt. In den ICDs von Dll1 und Dll4 wurde hingegen nur die N-Box und keine C-Box vorhergesagt ([48], (Abbildung 3, B)). Untersuchungen von *Drosophila* Dl verdeutlichen, dass die N-Box für die Aktivität des Liganden essentiell ist, während die C-Box nicht wichtig ist [58], (N. Vüllings, unveröffentlichte Daten). Auch in der ICD von Dll1 scheint die N-Box essentiell zu sein (AG Klein und AG Gossler, unveröffentlichte Daten). In der ICD von Ser wurde neben den vorhergesagten N- und C-Boxen eine weitere hoch konservierte Region (Ser–„int“) beschrieben, die unter zahlreichen Insektenspezies identisch ist [25]. Eine Deletion dieser Domäne führt zu einem komplett inaktiven Liganden. Die Ser-„int“-Region beinhaltet außerdem ein Teil der vermeintlichen N-Box und das vorhergesagte Neur-Bindemotiv (NBM) von Ser [25, 48, 59], (Abbildung 3, B). Ein solches NBM in der ICD von Dl wird für die Aktivierung des Liganden durch Neur benötigt [28]. Im Gegensatz zu Jag1 und Dl wurde die Rolle der vorhergesagten N- und C-Boxen, sowie des NBM in der ICD von Ser *in vivo* noch nicht untersucht.

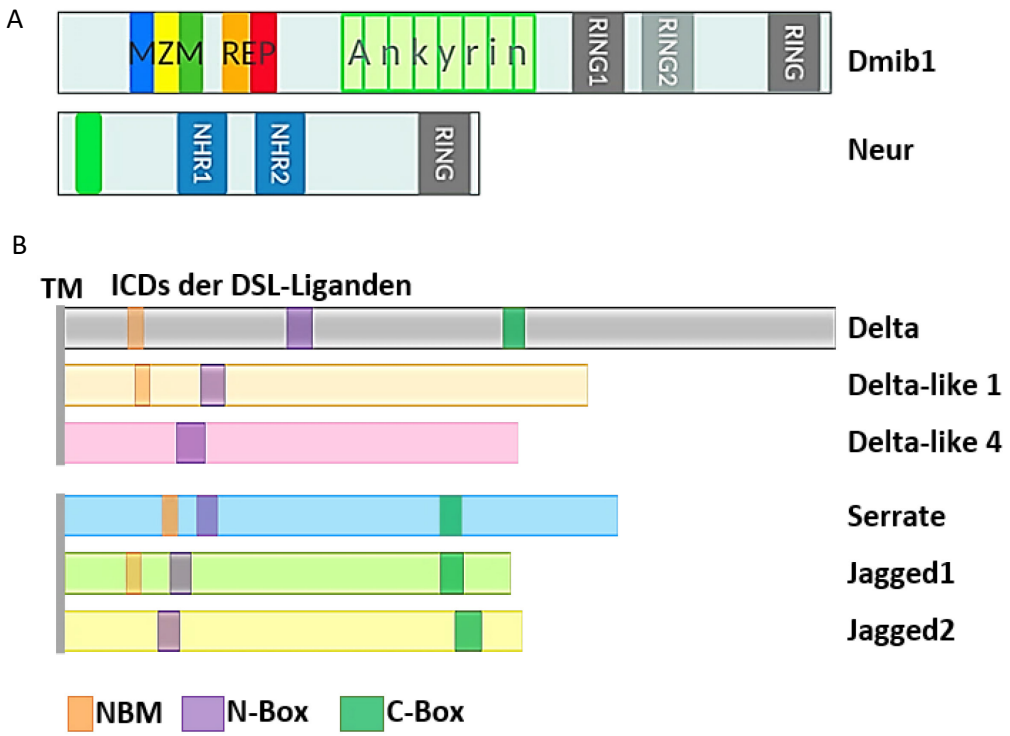


Abbildung 3: Schematische Darstellungen der RING-E3s Mib1 und Neur (A) sowie der ICDs von den DSL-Liganden (B). Zwei E3s, Mib1 und Neur, ubiquitinieren die Liganden in *Drosophila* und regulieren dadurch die Aktivität der Liganden. Mib1 besitzt am N-Terminus sog. MZM und REP-Domänen, die für die Bindung an den Liganden verantwortlich sind. Anschließend folgen acht Ankyrin-Wiederholungen und drei RING-Domänen. Die dritte RING-Domäne katalysiert die Ubiquitinierungsreaktion. Neur besitzt am N-Terminus ein PIP_2-Bindemotiv (gekennzeichnet durch ein grünes Rechteck). Danach folgen die NHR1- und NHR2-Domänen. Die NHR1-Domäne vermittelt die Interaktion mit den Liganden, während die NHR2-Domäne für die volle Funktion von Neur wichtig ist. Am C-Terminus besitzt Neur die katalytische RING-Domäne. Ser und Dl sind zwei DSL-Liganden in *Drosophila*. Während Dl drei Säuger-Orthologe Dll1, Dll3 und Dll4 hat, besitzt Ser zwei Orthologe, Jag1 und Jag2. Die Aminosäuresequenzen der ICDs von den DSL-Liganden weisen weniger Homologien auf. Die ICDs von Dl und Jag1 besitzen eine N- und eine C-Box für die Interaktion mit den MZM- und REP-Domänen von Mib1/MIB1. Basierend auf dem Aminosäuresequenzenvergleich wurde bei Dll1, Dll4, Ser und Jag2 eine N-Box identifiziert, während bei Ser und Jag2 zusätzlich noch eine C-Box vorhergesagt wurde. Die ICD von Dl besitzt außerdem ein NBM, während die ICDs von Dll1, Ser und Jag1 ein putatives NBM aufweisen (TM= Transmembrandomäne).

1.3 Die endozytotische Regulation des Notch-Signalwegs

Die Endozytose und der anschließende endosomale Transportweg spielen eine wichtige Rolle in der Regulation des Notch-Signalwegs. Während die Endozytose für eine produktive Signaltransduktion des Notch-Signalweges erforderlich ist, ist der endosomale Transportweg unter anderem dafür wichtig, um die Rezeptoren zu entfernen, die nicht durch Liganden aktiviert wurden. Wie andere Transmembranproteine wird der N-Rezeptor konstitutiv endozytiert und durchläuft einzelne Stationen des endosomalen Transportweges (Übersicht in [60]).

Bei der Endozytose wird die Plasmamembran mit der Fracht eingestülpt und anschließend als Vesikel in das Zytoplasma abgeschnürt (Abbildung 4, ①). Sie findet vermehrt in den Phosphatidylinositol(4,5)-bisphosphat (PIP_2) angereicherten Bereichen statt. Zahlreiche endozytotische Proteine sind in der Lage mit diesem Lipid zu interagieren [61, 62]. Generell kann zwischen einer Clathrin-abhängigen und -unabhängigen Endozytose unterschieden werden [63].

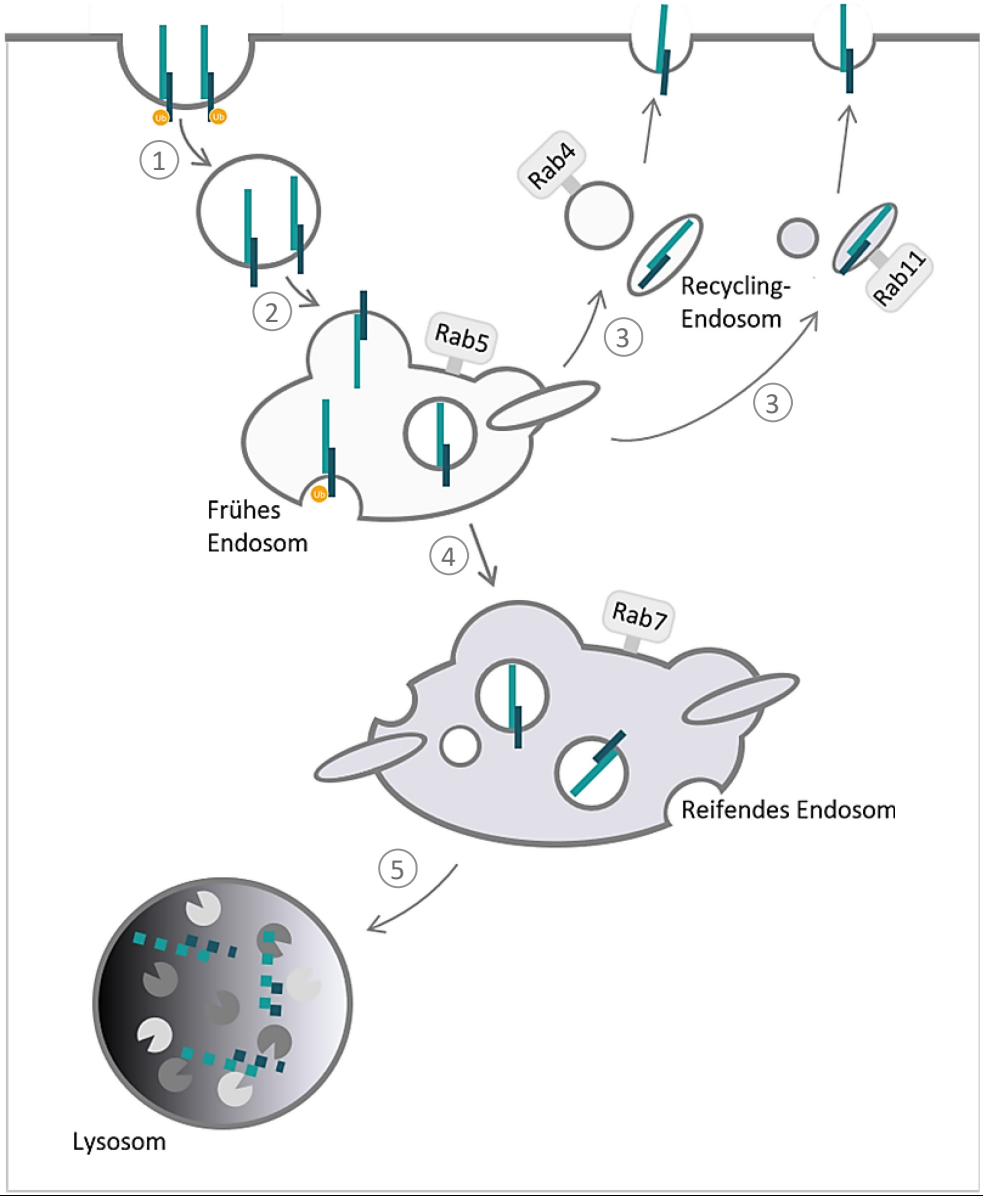


Abbildung 4: Übersicht über den endosomalen Transportweg. Nach der Endozytose der Transmembranproteine werden die frühen Vesikel abgeschnürt ①. Diese fusionieren zusammen zu oder mit einem frühen Endosom, das mit der GTPase Rab5 assoziiert ist ②. Im frühen Endosom werden die Transmembranproteine neu sortiert und entweder über Recycling an die Plasmamembran zurückgebracht ③ oder zum Abbau im Lysosom in den reifenden Endosomen weiter transportiert ④. Während die Recycling-Endosomen mit den GTPasen Rab4 und Rab11 markiert sind ③, sind die reifenden Endosomen mit Rab7 assoziiert ④. Während der endosomalen Reifung wird das Innere des Endosoms angesäuert und es bilden sich intraluminale Vesikel aus. Anschließend fusioniert das reifende Endosom mit dem Lysosom, in dem der Abbau der Transmembranproteine mithilfe von sauren Hydrolasen stattfindet ⑤.

Bei der Clathrin-abhängigen Endozytose bilden Clathrin-Gerüstproteine eine Hülle um die Einstülpung der Plasmamembran und stabilisieren diese dadurch (Übersichten in [64, 65]). Die Clathrin-ummantelte Membraneinstülpung wird dann als ein Clathrin-ummanteltes Vesikel (CCV- **c**lathrin **c**oated **v**esicle) mit Hilfe der GTPase Dynamin von der Plasmamembran abgeschnürt (Übersichten in [65, 66]). Nach der Abschnürung der CCVs dissoziiert das Clathringerüst und die Clathrin-Moleküle werden für weitere Zyklen der Endozytose wiederverwendet (Übersicht in [65]). Die auf diese Weise entstandenen frühen endosomalen Vesikel (EEV- **e**arly **e**ndosomal

vesicles) fusionieren entweder miteinander zum einen frühen Endosom (EE- **e**arly **e**ndosome) oder mit einem bereits vorhandenen frühen Endosom [67] (Abbildung 4, ②). Diese Fusion wird durch Rab5, eine GTPase der Rab-Familie (**Ra**s-related in **b**rain), und weitere Ko-Faktoren reguliert (Übersicht in [68]). In den frühen Endosomen werden die Membranproteine umsortiert. Deswegen werden die frühen Endosomen auch als sortierende Endosomen bezeichnet (Übersichten in [67, 68]). Nach der Sortierung im frühen Endosom wird der Großteil der Transmembranproteine zurück an die Plasmamembran gebracht. Das Recycling wird durch die GTPasen Rab4 und Rab11 reguliert (Abbildung 4, ③). Sind die Transmembranproteine durch Ubiquitin zum Abbau markiert, verbleiben diese in den frühen Endosomen, die zu reifen Endosomen heranreifen (Übersichten in [51, 69]). Während der Reifung des Endosoms findet ein Austausch von Rab5- zu Rab7-GTPase (sog. Rab-Switch) statt. Des Weiteren werden durch die Einstülpung der endosomalen Membran intraluminale Vesikel (ILVs) gebildet (Übersichten in [51, 69]) (Abbildung 4, ④). Die mit Rab7 assoziierten reifenden Endosomen transportieren ihre Fracht für die Degradation zum Lysosom. Anschließend findet eine Fusion des reifenden Endosoms mit dem Lysosom statt, in dem der Abbau der Transmembranproteine durch saure Hydrolasen erfolgt (Abbildung 4, ⑤). Im Laufe der endosomalen Reifung werden die Kompartimente kontinuierlich angesäuert, so dass zum Schluss, im Lysosom, ein für die sauren Hydrolasen optimales Milieu vorliegt (Übersicht in [70]).

1.3.1 Die Rolle der Endozytose der DSL-Liganden im Notch-Signalweg

Bereits in den 90-iger Jahren des letzten Jahrhunderts wurde bei den Untersuchungen von Dynamin-Mutanten in *Drosophila* die Notwendigkeit der Endozytose für die Aktivierung des Notch-Signalwegs festgestellt [9, 71]. Dabei ist die Endozytose des Liganden genauso wichtig, wie die Rezeptor-Endozytose. So zeigten Analysen in *Drosophila*, dass das endozytotische Adaptorprotein Epsin (*lqf*-**liq**uid **f**acets) für die *Trans*-Aktivierung des Notch-Signalwegs absolut notwendig ist [72]. Lqf leitet die Clathrin-vermittelte Endozytose des Liganden ein (Abbildung 5). Ein kompletter Ausfall von *lqf* in *Drosophila* führt zur embryonalen Letalität [73]. *lqf*-homozygot mutante Zellklone sind nicht in der Lage zu signalisieren, während der Empfang des Signals nicht gestört ist [72, 74]. Hierbei lokalisiert Ser vermehrt an der apikalen Plasmamembran, wobei die Endozytose des Liganden nicht komplett blockiert ist [43]. Dies deutet darauf hin, dass nur ein bestimmter Anteil von Ser durch die Lqf-vermittelte Endozytose internalisiert wird. Dieser Anteil ist jedoch für die Aktivierung des Notch-Signalwegs erforderlich [72]. Lqf ist in der Lage mit einer Reihe endozytotischer Faktoren (genetisch) zu interagieren [73, 75-77]. Es besitzt eine N-terminale ENTH (**E**psin **N**-**T**erminal **H**omology)-Domäne [78], zwei Ubiquitin interagierende Motive (UIM1+2-**U**biquitin **I**nteracting **M**otifs) [79], (Abbildung 5, ②), sowie Interaktionsmotive für Clathrin und den endozytotischen Adaptorprotein-Komplex 2 [76]. Die ENTH-Domäne bindet an PIP_2 und durch die Inserierung in der Plasmamembran kann sie die Einstülpung der Membran

einleiten [80]. Die UIMs ermöglichen eine Interaktion von Lqf mit den ubiquitinierten Substratproteinen. Laut einem simplen Modell [74] bindet Lqf die ubiquitinierte ICD des Liganden über seine UIMs (Abbildung 5, ②). Anschließend werden weitere endozytotische Faktoren, wie Clathrin und Dynamin, rekrutiert (Abbildung 5, ③) und die Endozytose des Liganden mitsamt der NECD initiiert (Abbildung 5, ④, ⑤). Eine weitere Untersuchung zeigte, dass neben der Funktion von Epsin, Clathrin und Dynamin, die Polymerisation vom Aktin des Zytoskeletts für die Endozytose des Liganden benötigt wird [12].

Um die Notwendigkeit der Liganden-Endozytose für die Aktivierung des Notch-Signalwegs zu erklären, wurden zwei sich gegenseitig nicht ausschließende Haupttheorien postuliert (Übersicht in [81]). Laut der sog. „Recycling-Theorie“ wird die Endozytose des Liganden und die anschließende Passage durch die EEs dafür benötigt, den neu synthetisierten inaktiven Liganden zu aktivieren (Übersichten in [10, 11]). Nach der Ubiquitinierung des Liganden durch Mib1 oder Neur wird dessen Endozytose eingeleitet. Der endozytierte Ligand unterliegt einer bisher unbekannten Modifikation und wird dann in einem aktivierten Zustand zurück an die Plasmamembran, eventuell in bestimmte sub-Domänen, gebracht (Übersichten in [11, 81]). Eine weitere Theorie, die sog. „Zugkraft-Theorie“ besagt, dass die Endozytose des Liganden dafür benötigt wird, eine Zugkraft auf den N-Rezeptor auszuüben. Infolge dieser Zugkraft unterliegt der Rezeptor einer Konformationsänderung, wodurch die S2-Schnittstelle für die ADAM-Metalloprotease zugänglich wird (Übersichten in [11, 81]).

Studien in der Zellkultur und in sensorischen Vorläuferzellen von *Drosophila* brachten Hinweise für das Recycling des Liganden [82, 83]. Ein Ausfall von *Rab11*, einer der Hauptregulatoren des Recycling-Wegs, beeinträchtigt dagegen die Aktivität von Dl in der Keimbahn und in den Augen von *Drosophila* nicht [75, 84]. Auch in der Flügelimaginalscheibe hat eine Herunterregulation beider Hauptregulatoren des Recycling-Wegs, Rab4 und Rab11, keinen Effekt auf die Aktivität der Liganden (Bachelorarbeit E. Seib, 2012). Untersuchungen in *Drosophila*, in Säugerzellkulturen und Strukturanalysen des N-Rezeptors lieferten zahlreiche Hinweise für das Zugkraft-Modell (Übersichten in [11, 85]). Es wurde in Imaginalscheiben und in Säugerzellkultur gezeigt, dass die ECD des N-Rezeptors zusammen mit dem Liganden in die Signal-sendende Zelle *trans*-endozytiert wird [13, 14, 36, 86, 87]. Ein Verlust der Liganden-Endozytose führt zu einer fehlenden *Trans*-Endozytose von NECD in *Drosophila* und in Säugerzellkultur [13, 14]. Resultate der Strukturanalysen des N-Rezeptors deuten darauf hin, dass dieser zuerst in einer Protease-resistenten Weise vorliegt [88]. Die infolge der Liganden-Endozytose ausgelöste Zugkraft wird benötigt, um strukturelle Veränderungen des N-Rezeptors zu ermöglichen. Dadurch wird die proteolytische Spaltung und als Folge die Ablösung der NECD („Ectodomain Shedding“) ermöglicht (Übersichten in [11, 85, 89]).

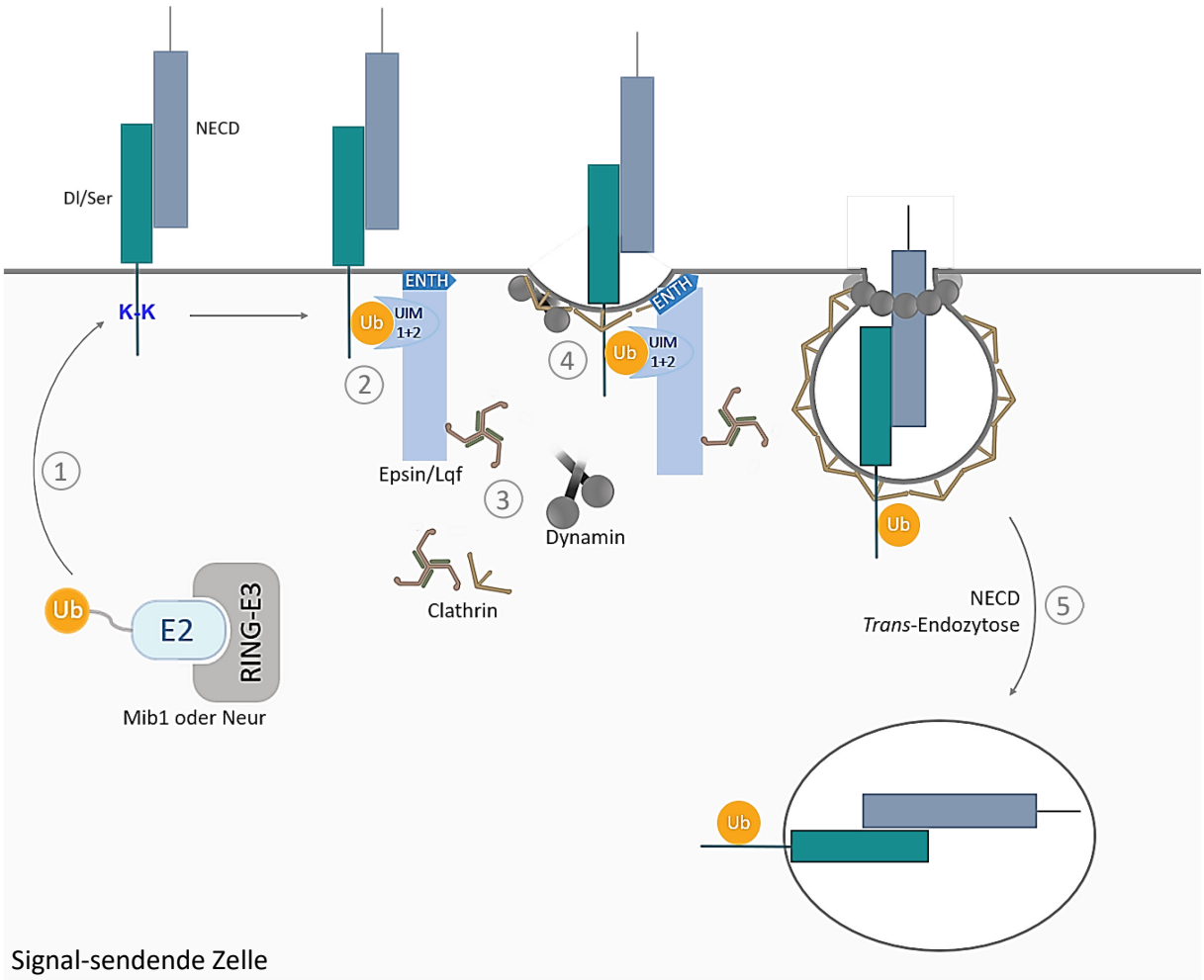


Abbildung 5: Vereinfachte Darstellung der Lqf-vermittelten Endozytose der DSL-Liganden. Die RING-E3s, Mib1 oder Neur, ubiquitinieren die ICD des DSL-Liganden an den Ks ①. Das Adaptorprotein Lqf interagiert über die ENTH-Domäne mit der Plasmamembran und ist in der Lage über die Ubiquitin-interagierenden Motive (UIM1+2) an den ubiquitinierten Liganden zu binden ②. Anschließend werden weitere endozytotische Faktoren, wie Clathrin und Dynamin, zur Plasmamembran rekrutiert ③ und die Invagination der Membran durch Lqf eingeleitet ④. Der Ligand wird mitsamt der NECD in die Signal-sendende Zelle internalisiert ⑤. Die *Trans*-Endozytose resultiert in einer *Trans*-Aktivierung des Notch-Signalwegs in der benachbarten Zelle.

1.4 Die Rolle des Notch-Signalwegs bei der Flügelentwicklung von *Drosophila*

Wie bei den meisten anderen Körperstrukturen der Imago von *Drosophila* beginnt die Flügelentwicklung bereits in den larvalen Stadien. Dabei wird der Flügel in Form einer Flügelimaginalscheibe angelegt (Abbildung 6, B, C). Die Imaginalscheiben sind als undifferenzierte einschichtige Epithelien organisiert. Sie proliferieren während der larvalen Phasen und differenzieren sich während der puppalen Phase zu den entsprechenden dreidimensionalen Strukturen der Imago. Während der Flügelentwicklung ermöglichen Prozesse der Musterbildung die Etablierung der anterior-posterioren (a/p)- und dorso-ventralen (d/v) -Achsen des zukünftigen Flügels mit Hilfe von Kompartimentgrenzen (Abbildung 6, B, C). Bei den Kompartimenten handelt es sich um Gruppen von Zellen, die eine funktionale Einheit bilden und bestimmte Grenzen nicht überschreiten.

Während der Entwicklung der Flügelimaginalscheibe reguliert der Notch-Signalweg die Expression verschiedener Gene an der d/v-Kompartimentgrenze, die für die Etablierung, Wachstum und Musterbildung des Flügelprimordiums essentiell sind. Hierbei ist die Expression von *wingless* (wg) und *vestigial* (vg) von großer Bedeutung (Übersicht in [90]). In Flügelimaginalscheiben des späten dritten Larvenstadiums wird *wg* in einem zwei Zellreihen-Muster auf beiden Seiten der d/v-Grenze symmetrisch exprimiert (Abbildung 6, B). Diese symmetrische Wg-Expression entsteht durch die Aktivität zweier regulatorischer Schleifen (Dl/Ser loop und Dl/Ser/Wg loop) zu unterschiedlichen Zeitpunkten [21, 91, 92].

In den anfänglichen Stadien der Flügelentwicklung ist die Dl/Ser-Schleife aktiv und führt schließlich zur Etablierung der Wg-Expressionsdomäne. Anfänglich aktiviert das Selektor-Protein des dorsalen Zellschicksals Apterous die Expression von Ser und Fringe (Fng) in den dorsalen Zellen [18, 19, 93]. Der N-Rezeptor ist zu diesem Zeitpunkt ubiquitär exprimiert, während Dl ein höheres Expressionsniveau im ventralen Kompartiment aufzuweisen scheint [20, 21]. Fng ist eine N-acetylglucosaminyltransferase, die die ECD des N-Rezeptors modifiziert. Durch die Glykosylierung der NECD wird der Rezeptor affiner zu Dl, was dazu führt, dass die Aktivierung des Notch-Signalwegs durch Dl verstärkt und durch Ser dagegen unterdrückt wird [34, 92, 93]. Auf diese Weise aktivieren die dorsalen Ser und Fng exprimierenden Grenzzellen den Notch-Signalweg in den ventralen Grenzzellen, in denen unmodifizierte N-Rezeptoren vorliegen. Gleichzeitig signalisieren die ventralen Dl exprimierenden Grenzzellen bevorzugt zu den dorsalen Grenzzellen, da diese den glykosylierten N-Rezeptor aufweisen. Die Aktivierung des Notch-Signalweges in den Grenzzellen führt unter anderem zur *wg*-Expression. Untersuchungen zeigten, dass bei dieser früheren asymmetrischen Phase nur ein Ligand benötigt wird. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Ser dabei eine wichtigere Rolle spielt [34].

Nachdem die Wg-Expressionsdomäne etabliert wurde, wird eine zweite regulatorische Schleife (Dl/Ser/Wg loop) induziert (Abbildung 6, A). Hierbei wird in den späteren Entwicklungsphasen durch die Aktivität des Notch-Signalweges die Expression von *cut* (ct) in den Grenzzellen induziert (Abbildung 6, A). Die Expression von *ct* hemmt die Expression der Liganden in den Grenzzellen [24]. Gleichzeitig wird *wg* in den Grenzzellen weiterhin exprimiert. Wg wird von den Grenzzellen sekretiert und diffundiert in die angrenzenden Zellen, wo es die Expression der Liganden induziert (Abbildung 6, A, B). Auf diese Weise sorgt die Dl/Ser/Wg-Schleife für die Aufrechterhaltung der Wg-Expression entlang d/v-Grenze und der Liganden-Expression in den angrenzenden Zellen [23, 34].

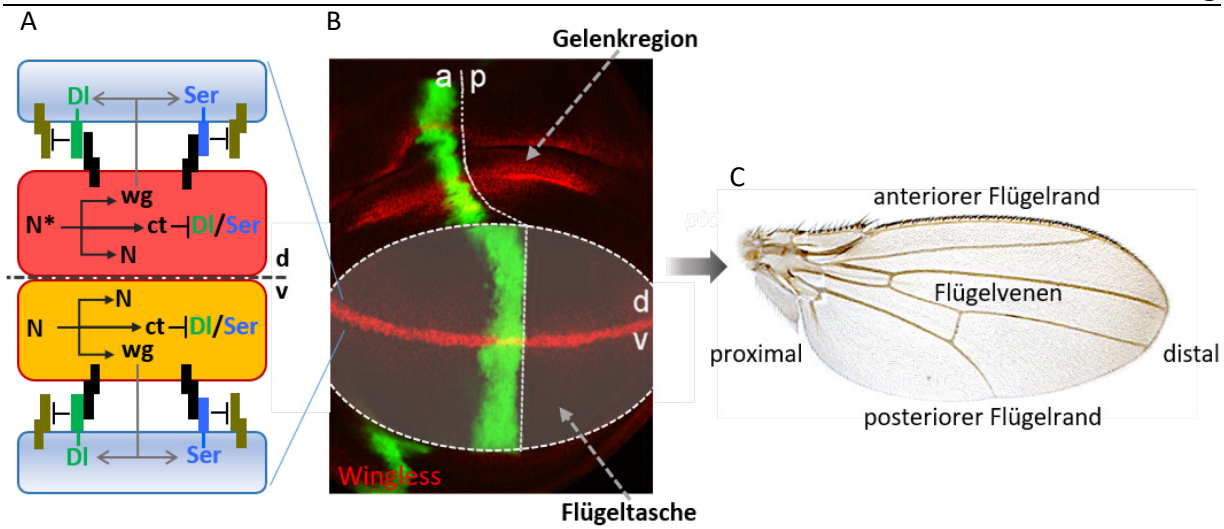


Abbildung 6: Beteiligung des Notch-Signalwegs bei der Flügelentwicklung von *Drosophila*. Modell für die Regulation der Notch-Aktivität entlang der d/v-Grenze in der späten L3-Flügelimaginalscheibe (A). Der adulte Flügel (C) entsteht aus einer Flügelimaginalscheibe (B). Während der Flügelentwicklung reguliert der Notch-Signalweg an der d/v-Grenze die Expression essentieller Gene, die für die Etablierung, das Wachstum und die Musterbildung des Flügelprimordiums wichtig sind. Eines dieser Gene ist wingless (wg). Wg wird in der späten L3-Flügelimaginalscheibe in einem schmalen Streifen entlang der d/v-Grenze exprimiert. Bereits in der Flügelimaginalscheibe werden durch die Musterbildungsprozesse die a/p und d/v-Achsen des zukünftigen Flügels festgelegt (B).
Die schematische Darstellung in A zeigt die wildtypische Situation in einer späten L3-Flügelimaginalscheibe, bei der der Notch-Signalweg die Expression von wg und ct entlang der d/v-Grenze induziert. Die Expression von ct führt zur Repression der Liganden-Expression in den Grenzzellen, während Wg die Expression der Liganden in den angrenzenden Zellen stimuliert.

1.4.1 Die *Cis*-Inhibition des Notch-Signalwegs durch die DSL-Liganden

Wie in 1.1 erwähnt, wird infolge der *Cis*-Inhibition die Notch-Aktivität in einer zellautonomen Weise unterdrückt. Sie wird durch die Bindung des Rezeptors und des Liganden derselben Zelle ausgelöst und ist abhängig von deren Konzentrationen (Abbildung 7)(Übersicht in [8]).

Hinweise auf die *Cis*-Inhibition brachten Überexpressionsstudien und Analysen des Mosaikgewebes mit *Dl-, Ser*-doppelmutanten Zellklonen (Übersicht in [8]). Hierbei wurde beobachtet, dass bei einer Überexpression der Liganden in wildtypischen Zellen der Flügelimaginalscheiben der Notch-Signalweg in den benachbarten, nicht exprimierenden Zellen ektopisch aktiviert wird. In überexprimierenden Zellen selbst kommt es hingegen zu keiner Aktivierung des Notch-Signalwegs. Darüber hinaus führt eine Überexpression der Liganden an der d/v-Grenze zu einer zellautonomen Unterdrückung der endogenen Notch-Aktivität [18-22]. Auf endogenem Niveau wurde der Effekt der *Cis*-Inhibition mit Hilfe von *Dl-, Ser*-doppelmutanten Zellklonen an der d/v-Grenze der Flügelimaginalscheiben demonstriert. Die Untersuchungen zeigten, dass bei einem Ausfall beider Liganden die mutanten Zellen an der Klongrenze zu wildtypischen Zellen den Notch-Signalweg ektopisch aktivieren. Dieser Effekt kommt dadurch zustande, dass *Dl-, Ser*-mutante Zellen keine Liganden besitzen. Sie exprimieren aber die N-Rezeptoren, die innerhalb der Zellklone durch die Liganden nicht mehr *cis*-inhibiert werden. Deswegen können diese freien N-Rezeptoren durch die Liganden der benachbarten wildtypischen

Zellen aktiviert werden [23, 24]. Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass das Verhältnis der Konzentrationen von Liganden und Rezeptor das Ergebnis der *Trans*-Aktivierung beeinflusst und eine hohe Liganden-Konzentration die Notch-Aktivität zellautonom unterdrückt [22, 25]. Der genaue Mechanismus der *Cis*-Inhibition ist bislang nicht vollständig verstanden. Es wurde jedoch in mehreren Untersuchungen demonstriert, dass die ECDs des Rezeptors und des Liganden an der *Cis*-Inhibition beteiligt sind (Übersicht in [8, 26]). In der ECD von Ser wurde die sechste EGF-ähnliche Wiederholung beschrieben bei der Liganden-vermittelten *Cis*-Inhibition mitzuwirken. Eine Deletion von EGF6 resultiert in einem Liganden, der keine *cis*-inhibitorische, jedoch eine transaktivierende Eigenschaft besitzt [27]. Des Weiteren gibt es Hinweise darauf, dass für die *Cis*-Inhibition eine direkte Interaktion zwischen den EGF-Wiederholungen des Rezeptors und der DSL-Domäne der Liganden notwendig ist (Übersicht in [8]). Vor kurzem wurde gezeigt, dass die ICD von *Drosophila* Dl ebenfalls die *cis*-inhibitorischen Eigenschaften eines Liganden beeinflusst. Eine Dl-Variante ohne Lysine in der ICD wirkt stärker *cis*-inhibitorisch als ein wildtypischer Dl-Ligand [28].

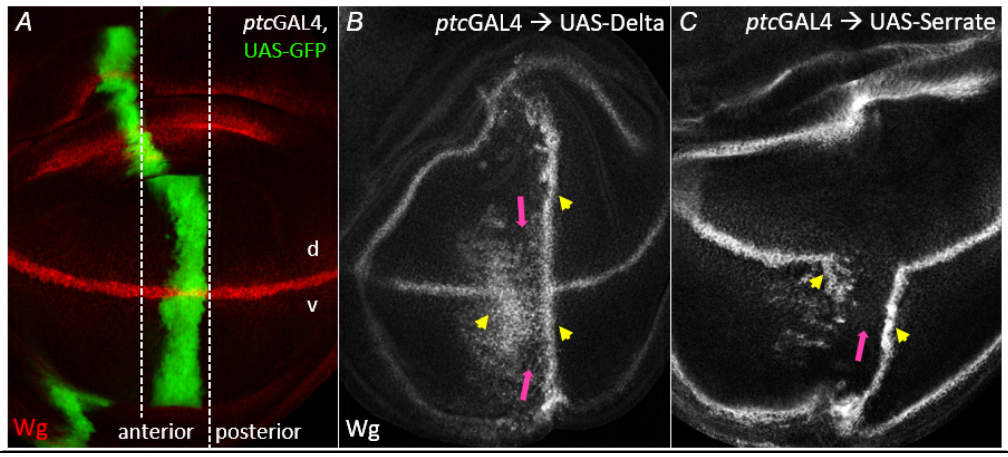


Abbildung 7: Effekt der *Cis*-Inhibition durch DSL-Liganden. Eine Interaktion zwischen dem Rezeptor und dem Liganden in *trans* führt zu einer Aktivierung des Notch-Signalwegs und zur Expression der Zielgene, wie z.B. *wg.* Hingegen resultiert eine Bindung zwischen dem Rezeptor und dem Liganden innerhalb derselben Zelle in der *Cis*-Inhibition, die die Notch-Aktivität zellautonom reprimiert. Die *Cis*-Inhibition kann infolge einer hohen Liganden-Konzentration auftreten. Die Liganden Dl und Ser wurden in der *patched*-Expressionsdomäne in der Flügelimaginalscheibe überexprimiert (A, visualisiert durch die GFP-Fluoreszenz). Bedingt durch das Expressionsmuster von *patched (ptc)*, weisen die Zellen an der a/p-Grenze die höchste Liganden-Konzentration auf (A). Die überexprimierten Liganden, Dl und Ser, wirken *cis*-inhibitorisch, was zu einer fehlenden Wg-Expression innerhalb der *ptc*-Domäne führt (B, C; rosafarbene Pfeile). Die an die *ptc*-Domäne angrenzenden Zellen besitzen keine ektopische Expression der Liganden und sind in der Lage den Notch-Signalweg ektopisch zu *trans*-aktivieren (B, C; gelbe Pfeilköpfe).

1.5 Ziele der Arbeit

Endozytose der DSL-Liganden wird für die Aktivierung des Notch-Signalwegs benötigt. Diese wird durch die Ubiquitinierung an Lysinen (K) der intrazellulären Domäne (ICD) des Liganden ausgelöst [11, 43].

In dieser Arbeit sollte die Rolle der Ser-Ubiquitinierung und insbesondere der Ks in der ICD untersucht werden. Hierfür wird ein Ser-Ligand (SerK2R) analysiert, bei dem alle intrazellulären Ks gegen Arginine (R) ausgetauscht sind. Dabei wird untersucht, wie sich die K-freie ICD auf die Aktivität, die Endozytose und die Degradation von Ser auswirkt.

Des Weiteren sollen intrazelluläre Ks identifiziert werden, die für die Aktivität und eventuell für die Endozytose von Ser essentiell sind. Zu diesem Zweck werden Ser-R- und SerK2R-K-Varianten hergestellt und analysiert. Bei diesen Varianten werden die Ks an konservierten Positionen entweder in der Ser-ICD gegen Rs ausgetauscht oder in die K-freie SerK2R-ICD wieder eingeführt.

Neur und Mib1 sind E3-Ubiquitin-Ligasen in *Drosophila*, die DSL-Liganden ubiquitinieren. Vorangegangene Experimente demonstrierten, dass Neur die Aktivierung von Dl in einer Mib1- und K-unabhängigen Weise vermittelt [28]. Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, ob Neur den Ser-Liganden Mib1- und K-unabhängig aktivieren kann. Darüber hinaus soll herausgefunden werden, welche Domänen von Neur für die Ser-Aktivierung benötigt werden. Für diese Fragestellungen werden transgene Ser-Liganden mit Neur und mit unterschiedlichen Neur-Varianten ko-exprimiert.

MIB1 enthält zwei konservierte Domänen, die die Interaktion mit bestimmten Motiven, sog. N- und C-Boxen, in der Jag1-ICD vermitteln [48]. Basierend auf Sequenzhomologien konnten in der ICD von Ser die N- und C-Boxen vorhergesagt werden. Dabei scheint die N-Box von Ser sich von den N-Boxen restlicher DSL-Liganden stärker zu unterscheiden, während die C-Box den C-Boxen anderer Liganden ähnelt [48]. Aus diesem Grund wird im Rahmen dieser Arbeit überprüft, ob die vermeintlichen N- und/oder C-Boxen in der ICD von Ser für die Mib1-vermittelte Aktivierung des Liganden *in vivo* benötigt werden.

2 Material und Methoden

2.1 *Drosophila* Methoden

2.1.1 Verwendete Fliegenstämme

Genotyp	Referenz
w^{-}; If/CyO; MKRS/TM6B	Stammsammlung AG Klein
w; If; +/SM6A-TM6B	Stammsammlung AG Klein
w^{-}; If/CyO$^{wg\text{-}lacZ}$; *mib1*^{EY09780}/TM6B	Stammsammlung AG Klein
w^{-}; If/CyO$^{wg\text{-}lacZ}$; *mib1*^{2}/TM6B	Stammsammlung AG Klein
w^{-}; If/CyO$^{wg\text{-}lacZ}$; UAS-Neur7/TM6B	Stammsammlung AG Klein
w^{-}; If/CyO$^{wg\text{-}lacZ}$; UAS-Neur-myc/TM6B	Stammsammlung AG Klein
w^{-}; If/CyO$^{wg\text{-}lacZ}$; UAS-NeurΔR-GFP/TM6B	Lai, Deblandre et al, 2001
w^{-}; If/CyO$^{wg\text{-}lacZ}$; UAS-NeurΔNHR1-V5/TM6B	Commisso, Boulianne, 2007
w^{-}; If/CyO$^{wg\text{-}lacZ}$; UAS-NeurΔNHR2-V5/TM6B	Liu, Bonner et al, 2012
w^{-}; If/CyO$^{wg\text{-}lacZ}$; UAS-Neur5Q-V5/TM6B	Stammsammlung AG Klein
w^{-}; If/CyO$^{wg\text{-}lacZ}$; UAS-N/TM6B	Stammsammlung AG Klein
w^{-}; If/CyO$^{wg\text{-}lacZ}$; *mib1*^{EY09780}, UAS-Neur-myc/TM6B	Stammsammlung AG Klein
w^{-}; If/CyO$^{wg\text{-}lacZ}$; *mib1*^{EY09780}, UAS-NeurΔRF-GFP/TM6B	diese Arbeit
w^{-}; If/CyO$^{wg\text{-}lacZ}$; *mib1*^{EY09780}, UAS-NeurΔNHR1-V5/TM6B	diese Arbeit
w^{-}; If/CyO$^{wg\text{-}lacZ}$; *mib1*^{EY09780}, UAS-NeurΔNHR2-V5/TM6B	diese Arbeit
w^{-}; If/CyO$^{wg\text{-}lacZ}$; *mib1*^{EY09780}, UAS-Neur5Q-V5/TM6B	diese Arbeit
w^{-}; If/CyO$^{wg\text{-}lacZ}$; *Dl*^{RevF10}*, e*, Ser*^{RX82}*, FRT82B*/TM6B	Stammsammlung AG Klein
w^{-}; If/CyO$^{wg\text{-}lacZ}$; FRT82B/TM6B	Stammsammlung AG Klein
w^{-}; If/CyO$^{wg\text{-}lacZ}$; *lqf*^{1227}, FRT2A/TM6B	Wang, Struhl, 2004
w^{-}; If/CyO$^{wg\text{-}lacZ}$; *lqf*^{L71}, FRT80B/TM6B	Stammsammlung AG Klein
w-; UAS-SerK2R-HA, UAS-Neur^{7}; MKRS/TM6B	Stammsammlung AG Klein
w^{-}; Lqf-FL-GFP/CyO$^{wg\text{-}lacZ}$; MKRS/TM6B	diese Arbeit; J.Fischer
w^{-}; Lqf-FL-GFP/CyO$^{wg\text{-}lacZ}$; *lqf*^{1227}, FRT2A/TM6B	diese Arbeit
w^{-}; *ptc*GAL4, Lqf-FL-GFP; MKRS/TM6B	diese Arbeit
w^{-}; Gbe+Su(H)-*lacZ*; *ptc*GAL4, Lqf-FL-GFP; *lqf*^{1227}, FRT2A/TM6B	diese Arbeit
w^{-}; Lqf-UIM1$^{EEE/AAA}$-ΔUIM2-GFP/CyO$^{wg\text{-}lacZ}$; MKRS/TM6B	diese Arbeit; J.Fischer
w^{-}; Lqf-UIM1$^{EEE/AAA}$-ΔUIM2-GFP/CyO$^{wg\text{-}lacZ}$; *lqf*^{1227}, FRT2A/TM6B	diese Arbeit
w^{-}; *ptc*GAL4, Lqf-UIM1$^{EEE/AAA}$-ΔUIM2-GFP/CyO$^{wg\text{-}lacZ}$; MKRS/TM6B	diese Arbeit
w^{-}; *ptc*GAL4, Lqf-UIM1$^{EEE/AAA}$-ΔUIM2-GFP/CyO$^{wg\text{-}lacZ}$; *lqf*^{1227}, FRT2A/TM6B	diese Arbeit
w^{-}; Gbe+Su(H)-lacZ; *ptc*GAL4, Lqf-UIM1$^{EEE/AAA}$-ΔUIM2-GFP/CyO$^{wg\text{-}lacZ}$; *lqf*^{1227}, FRT2A/TM6B	diese Arbeit; J.Fischer
w^{-}; Lqf-UIM1$^{EEE/AAA}$-GFP/CyO$^{wg\text{-}lacZ}$; MKRS/TM6B	diese Arbeit; J.Fischer
w^{-}; Lqf-UIM1$^{EEE/AAA}$-GFP/CyO$^{wg\text{-}lacZ}$; *lqf*^{1227}, FRT2A/TM6B	diese Arbeit
w^{-}; *ptc*GAL4, Lqf-UIM1$^{EEE/AAA}$-GFP/CyO$^{wg\text{-}lacZ}$; MKRS/TM6B	Bachelorarbeit S. Akgün
w^{-}; *ptc*GAL4, Lqf-UIM1$^{EEE/AAA}$-GFP/CyO$^{wg\text{-}lacZ}$; *lqf*^{1227}, FRT2A/TM6B	diese Arbeit
w^{-}; Lqf-ΔUIM2-GFP/CyO$^{wg\text{-}lacZ}$; MKRS/TM6B	diese Arbeit
w^{-}; Lqf-ΔUIM2-GFP/CyO$^{wg\text{-}lacZ}$; *lqf*^{1227}, FRT2A/TM6B	diese Arbeit; J.Fischer
w^{-}; *ptc*GAL4, Lqf-ΔUIM2-GFP/CyO$^{wg\text{-}lacZ}$; MKRS/TM6B	Bachelorarbeit S. Akgün
w^{-}; *ptc*GAL4, Lqf-ΔUIM2-GFP/CyO$^{wg\text{-}lacZ}$; *lqf*^{1227}, FRT2A/TM6B	diese Arbeit
w^{-}; UAS-Dl-HA/CyO$^{wg\text{-}lacZ}$; *lqf*^{L71}, FRT80B/TM6B	diese Arbeit

w-; UAS-DlK2R-HA/CyO$^{wg\text{-}lacZ}$; *lqf*^{L71}, FRT80B/TM6B	diese Arbeit
w-; UAS-Ser-HA/CyO$^{wg\text{-}lacZ}$; *lqf*^{L71}, FRT80B/TM6B	diese Arbeit
w-; *ptc*GAL4, UAS-GFP; Gbe+Su(H)-*lacZ*	Stammsammlung AG Klein
w-; *ptc*GAL4, UAS-GFP; *mib1*^{EY09780}, Gbe+Su(H)-*lacZ*/TM6B	Stammsammlung AG Klein
w-; *ptc*GAL4, UAS-GFP; *mib1*^{2}, Gbe+Su(H)-*lacZ*/TM6B	Stammsammlung AG Klein
w-; *en*GAL4, *tub*GAL80^{ts}; Gbe+Su(H)-*lacZ*	diese Arbeit
N-YFP; *en*GAL4, *tub*GAL80^{ts};	diese Arbeit
w-; UAS-SerK2R-HA/CyO$^{wg\text{-}lacZ}$; MKRS/TM6B	Stammsammlung AG Klein
w-; UAS-SerK2R-HA/CyO$^{wg\text{-}lacZ}$; UAS-N/TM6B	diese Arbeit
w-; UAS-SerK2R-HA/CyO$^{wg\text{-}lacZ}$; UAS-Neur-myc/TM6B	diese Arbeit
w-; UAS-SerK2R-HA/CyO$^{wg\text{-}lacZ}$; UAS-NeurΔRF-GFP/TM6B	diese Arbeit
w-; UAS-SerK2R-HA/CyO$^{wg\text{-}lacZ}$; *mib1*^{EY09780}/TM6B	Stammsammlung AG Klein
w-; UAS-SerK2R-HA/CyO$^{wg\text{-}lacZ}$; *mib1*^{EY09780}, UAS-Neur-myc/TM6B	Stammsammlung AG Klein
w-; UAS-SerK2R-HA/CyO$^{wg\text{-}lacZ}$; *mib1*^{EY09780}, UAS-NeurΔRF-GFP/TM6B	diese Arbeit
w-; UAS-SerK2R-HA/CyO$^{wg\text{-}lacZ}$; *mib1*^{EY09780}, UAS-NeurΔNHR1-V5/TM6B	diese Arbeit
w-; UAS-SerK2R-HA/CyO$^{wg\text{-}lacZ}$; *mib1*^{EY09780}, UAS-NeurΔNHR2-V5/TM6B	diese Arbeit
w-; UAS-SerK2R-HA/CyO$^{wg\text{-}lacZ}$; *mib1*^{EY09780}, UAS-Neur5Q-V5/TM6B	diese Arbeit
w-; UAS-SerK2R-HA/CyO^{Tb}; *Dl*^{RevF10}, *e**, *Ser*^{RX82}, FRT82B/TM6B	diese Arbeit
w-; UAS-SerK2R-HA/CyO$^{wg\text{-}lacZ}$; FRT82B/TM6B	diese Arbeit
w-; UAS-SerK2R^{K1276,1294,1362,1381,1385}-HA/CyO$^{wg\text{-}lacZ}$; MKRS/TM6B (UAS-SerK2R-5K-HA)	diese Arbeit
w-; UAS-SerK2R^{K1294,1362,1370,1381,1385}-HA/CyO$^{wg\text{-}lacZ}$; MKRS/TM6B	diese Arbeit
w-; UAS-SerK2R^{K1276,1294,1362,1370,1381}-HA/CyO$^{wg\text{-}lacZ}$; MKRS/TM6B	diese Arbeit
w-; UAS-SerK2R-5K-HA; UAS-N/TM6B	diese Arbeit
w-; UAS-SerK2R-5K-HA; UAS-Neur-myc/TM6B	diese Arbeit
w-; UAS-SerK2R-5K-HA; FRT82B/TM6B	diese Arbeit
w-; UAS-SerK2R-5K-HA; *mib1*^{EY09780}/TM6B	diese Arbeit
w-; UAS-SerK2R-5K-HA; *mib1*^{EY09780}, UAS-N/TM6B	diese Arbeit
w-; UAS-SerK2R-5K-HA; *mib1*^{EY09780}, UAS-Neur-myc/TM6B	diese Arbeit
w-; UAS-SerK2R-5K-HA; *mib1*^{EY09780}, UAS-NeurΔRF-GFP/TM6B	diese Arbeit
w-; UAS-SerK2R-5K-HA; *mib1*^{EY09780}, UAS-NeurΔNHR1-V5/TM6B	diese Arbeit
w-; UAS-SerK2R-5K-HA; *Dl*^{RevF10}, *e**, *Ser*^{RX82}, FRT82B/TM6B	diese Arbeit
w-; UAS-SerK2R-5K-HA; FRT82B/TM6B	diese Arbeit
w-; UAS-SerK2R^{K1276}-HA/CyO$^{wg\text{-}lacZ}$; MKRS/TM6B	diese Arbeit
w-; UAS-SerK2R^{K1294}-HA/CyO$^{wg\text{-}lacZ}$; MKRS/TM6B	diese Arbeit
w-; UAS-SerK2R^{K1294}-HA; *mib1*^{EY09780}, UAS-Neur-myc/TM6B	diese Arbeit
w-; UAS-SerK2R^{K1362}-HA/CyO$^{wg\text{-}lacZ}$; MKRS/TM6B	diese Arbeit
w-; UAS-SerK2R^{K1362}-HA; *mib1*^{EY09780}, UAS-Neur-myc/TM6B	diese Arbeit
w-; UAS-SerK2R^{K1381}-HA/CyO$^{wg\text{-}lacZ}$; MKRS/TM6B	diese Arbeit
w-; UAS-SerK2R^{K1385}-HA/CyO$^{wg\text{-}lacZ}$; MKRS/TM6B	diese Arbeit
w-; UAS-SerK2R^{K1276,1294}-HA/CyO$^{wg\text{-}lacZ}$; MKRS/TM6B	diese Arbeit
w-; UAS-SerK2R^{K1276,1294,1362}-HA/CyO$^{wg\text{-}lacZ}$; MKRS/TM6B	diese Arbeit
w-; UAS-SerK2R^{K1276,1294,1385}-HA/CyO$^{wg\text{-}lacZ}$; MKRS/TM6B	diese Arbeit
w-; UAS-SerK2R^{K1362,1381,1385}-HA/CyO$^{wg\text{-}lacZ}$; MKRS/TM6B	diese Arbeit
w-; UAS-SerK2R^{K1362,1381,1385}-HA/CyO$^{wg\text{-}lacZ}$; *mib1*^{EY09780}, UAS-Neur-myc/TM6B	diese Arbeit
w-; UAS-SerK2R^{K1276,1294,1381,1385}-HA/CyO$^{wg\text{-}lacZ}$; MKRS/TM6B	diese Arbeit

w-; UAS-SerK2R^{K1294,1362,1381,1385}-HA/CyO$^{wg\text{-}lacZ}$; MKRS/TM6B	diese Arbeit
w-; UAS-SerK2R^{K1362,1381,1385}-HA/CyO$^{wg\text{-}lacZ}$; UAS-N/TM6B	diese Arbeit
w-; UAS-SerK2R^{K1362,1381,1385}-HA/CyO$^{wg\text{-}lacZ}$; UAS-Neur-myc/TM6B	diese Arbeit
w-; UAS-SerK2R^{K1362,1381,1385}-HA/CyO$^{wg\text{-}lacZ}$; *mib1*^{EY09780}, UAS-Neur-myc/TM6B	diese Arbeit
w-; UAS- SerK2R^{K1276,1294}-HA /CyO$^{wg\text{-}lacZ}$; UAS-N/TM6B	diese Arbeit
w-; UAS- SerK2R^{K1276,1294,1362}-HA/CyO$^{wg\text{-}lacZ}$; UAS-N/TM6B	diese Arbeit
w-; UAS-Ser-HA/CyO$^{wg\text{-}lacZ}$; MKRS/TM6B	Stammsammlung AG Klein
w-; UAS-Ser-HA/CyO$^{wg\text{-}lacZ}$; UAS-N/TM6B	Stammsammlung AG Klein
w-; UAS-Ser-HA/CyO$^{wg\text{-}lacZ}$; UAS-Neur-myc	Stammsammlung AG Klein
w-; UAS-Ser-HA/CyO$^{wg\text{-}lacZ}$; UAS-NeurΔR-GFP/TM6B	diese Arbeit
w-; UAS-Ser-HA/CyO$^{wg\text{-}lacZ}$; *mib1*^{EY09780}, UAS-Neur-myc/TM6B	Stammsammlung AG Klein
w-; UAS-Ser-HA/CyO$^{wg\text{-}lacZ}$; *mib1*^{EY09780}, UAS-NeurΔRF-GFP/TM6B	diese Arbeit
w-; UAS-Ser-HA/CyO$^{wg\text{-}lacZ}$; *mib1*^{EY09780}, UAS-NeurΔNHR1-V5/TM6B	diese Arbeit
w-; UAS-Ser-HA/CyO$^{wg\text{-}lacZ}$; *mib1*^{EY09780}, UAS-NeurΔNHR2-V5/TM6B	diese Arbeit
w-; UAS-Ser-HA/CyO$^{wg\text{-}lacZ}$; *mib1*^{EY09780}, UAS-Neur5Q-V5/TM6B	diese Arbeit
w-; UAS-Ser-HA/CyO$^{wg\text{-}lacZ}$; *mib1*^{EY09780}/TM6B	Stammsammlung AG Klein
w-; UAS-Ser-HA/CyO^{Tb}; *Dl*^{RevF10}, *e**, *Ser*^{RX82}, FRT82B/TM6B	diese Arbeit
w-; UAS-Ser-HA; FRT82B/TM6B	diese Arbeit
w-; UAS-Ser^{R1276,1294,1362,1381,1385}-HA/CyO$^{wg\text{-}lacZ}$; MKRS/TM6B (Ser-5R-HA)	diese Arbeit
w-; UAS-Ser-5R-HA/CyO$^{wg\text{-}lacZ}$; UAS-N/TM6B	diese Arbeit
w-; UAS-Ser-5R-HA/CyO$^{wg\text{-}lacZ}$; UAS-Neur-myc/TM6B	diese Arbeit
w-; UAS-Ser-5R-HA/CyO$^{wg\text{-}lacZ}$; UAS-NeurΔRF-GFP/TM6B	diese Arbeit
w-; UAS-Ser-5R-HA/CyO$^{wg\text{-}lacZ}$; *mib1*^{EY09780}/TM6B	diese Arbeit
w-; UAS-Ser-5R-HA/CyO$^{wg\text{-}lacZ}$; *mib1*^{EY09780}, UAS-Neur-myc/TM6B	diese Arbeit
w-; UAS-Ser^{R1276}-HA/CyO$^{wg\text{-}lacZ}$; MKRS/TM6B	diese Arbeit
w-; UAS-Ser^{R1294}-HA/CyO$^{wg\text{-}lacZ}$; MKRS/TM6B	diese Arbeit
w-; UAS-Ser^{R1362}-HA/CyO$^{wg\text{-}lacZ}$; MKRS/TM6B	diese Arbeit
w-; UAS-Ser^{R1362}-HA/CyO$^{wg\text{-}lacZ}$; *mib1*^{EY09780}, UAS-Neur-myc/TM6B	diese Arbeit
w-; UAS-Ser^{R1381}-HA/CyO$^{wg\text{-}lacZ}$; MKRS/TM6B	diese Arbeit
w-; UAS-Ser^{R1385}-HA/CyO$^{wg\text{-}lacZ}$; MKRS/TM6B	diese Arbeit
w-; UAS-Ser^{R1276,1294}-HA/CyO$^{wg\text{-}lacZ}$; MKRS/TM6B	diese Arbeit
w-; UAS-Ser^{R1362,1381,1385}-HA/CyO$^{wg\text{-}lacZ}$; MKRS/TM6B (	diese Arbeit
w-; UAS-Ser^{R1276,1362,1381,1385}-HA/CyO$^{wg\text{-}lacZ}$; MKRS/TM6B	diese Arbeit
w-; UAS-Ser^{R1294,1362,1381,1385}-HA/CyO$^{wg\text{-}lacZ}$; MKRS/TM6B	diese Arbeit
w-; UAS-Ser^{R1276,1294,1381,1385}-HA/CyO$^{wg\text{-}lacZ}$; MKRS/TM6B	diese Arbeit
w-; UAS-Ser^{R1276,1294}-HA/CyO$^{wg\text{-}lacZ}$; UAS-N/TM6B	diese Arbeit
w-; UAS-Ser^{R1276,1294}-HA/CyO$^{wg\text{-}lacZ}$; UAS-Neur-myc/TM6B	diese Arbeit
w-; UAS-Ser^{R1276,1294}-HA/CyO$^{wg\text{-}lacZ}$; *mib1*^{EY09780}, UAS-Neur-myc/TM6B	diese Arbeit
w-; UAS-Ser-EKSN2Ala-HA/CyO$^{wg\text{-}lacZ}$; MKRS/TM6B	diese Arbeit
w-; UAS-Ser-NLQ2Ala-HA/CyO$^{wg\text{-}lacZ}$; MKRS/TM6B	diese Arbeit
w-; UAS-Ser-NEEN2Ala-HA/CyO$^{wg\text{-}lacZ}$; MKRS/TM6B	diese Arbeit
w-; UAS-Ser-NEEN2Ala-HA/CyO$^{wg\text{-}lacZ}$; *mib1*^{EY09780}, UAS-Neur-myc/TM6B	diese Arbeit
w-; UAS-Ser$^{\Delta int}$/CyO$^{wg\text{-}lacZ}$; MKRS/TM6B	Glittenberg et al., 2006
w-; UAS-Ser$^{\Delta int}$/CyO$^{wg\text{-}lacZ}$; *mib1*^{EY09780}, UAS-Neur-myc/TM6B	diese Arbeit

w⁻; UAS-SerΔICD-HA/CyO$^{wg\text{-}lacZ}$; MKRS/TM6B	diese Arbeit
w⁻; UAS-SerΔICD-HA/CyO$^{wg\text{-}lacZ}$; UAS-N/TM6B	diese Arbeit
w⁻; UAS-Ser-NB2Ala-HA/CyO$^{wg\text{-}lacZ}$; MKRS/TM6B	diese Arbeit
w⁻; UAS-Ser-NB2Ala+K-HA/CyO$^{wg\text{-}lacZ}$; MKRS/TM6B	diese Arbeit
w⁻; UAS-Ser-CB2Ala-HA/CyO$^{wg\text{-}lacZ}$; MKRS/TM6B	diese Arbeit
w⁻; UAS-Ser-CB2Ala+K-HA/CyO$^{wg\text{-}lacZ}$; MKRS/TM6B	diese Arbeit
w⁻; UAS-Ser-N&CB2Ala+K-HA/CyO$^{wg\text{-}lacZ}$; MKRS/TM6B	diese Arbeit

2.1.2 Kultivierung von *Drosophila*

Drosophila Nährmedium (Volumen 20l)

100 g Agar
1424 g Maisschrot
190 g Sojamehl
336 g Trockenhefe
800 g Rübensirup
900 g Malzextrakt
300 ml Nipaginlösung in Ethanol (10% Gew/Vol)
90 ml Propionsäure
19,5 l dH2O

2.1.2a Anzucht und Haltung von *Drosophila*

Die Fliegen wurden in durchsichtigen Röhrchen mit Nährmedium auf 18°C gehalten. Für die Aufrechterhaltung der Stämme wurden die Fliegen alle drei Wochen in ein frisches Futterröhrchen umgesetzt. Für die Vermehrung der Fliegen wurden diese auf 25°C gehalten und einmal pro Woche umgesetzt.

2.1.2b Kreuzen von *Drosophila*

Für die Kreuzungen wurden Männchen und unbefruchtete Weibchen des gewünschten Genotyps verpaart. Üblicherweise wurde ein Männchen mit jeweils fünf Weibchen verpaart. Die Kreuzungen wurden bei 25°C gehalten und nach drei bis vier Tagen umgesetzt. Bei einer Haltungstemperatur von 25°C schlüpfen die ersten Nachkommen nach 10 Tagen.

2.1.3 GAL4/UAS-GAL80-Expressionssystem

Das Expressionssystem GAL4/UAS-GAL80 dient einer gezielten räumlich und zeitlich gesteuerten Expression der Transgene in *Drosophila* [94]. Das System stammt ursprünglich aus der Hefe und umfasst zwei Hauptkomponenten, ein Transkriptionsfaktor GAL4 und dessen Bindungssequenz UAS (**U**pstream **A**ctivating **S**equence). Für eine gerichtete Expression in *Drosophila* wird GAL4 unter Kontrolle eines bekannten endogenen Promotors oder Enhancers in einem zeitlich und räumlich spezifischen Muster in einem Fliegenstamm (auch Treiberstamm genannt) exprimiert. Ein weiterer Fliegenstamm (der sogenannte Effektorstamm) enthält ein Transgen, das hinter der UAS-Sequenz nachgeschaltet ist. Für eine kontrollierte Überexpression werden der Treiber- und der Effektorstamm miteinander gekreuzt. Die Nachkommen dieser Kreuzung besitzen sowohl das GAL4 als auch die UAS-Sequenz. Dadurch wird das zu untersuchende Gen in einem bestimmten Gewebe und in den

bestimmten Entwicklungsstadien exprimiert (Abbildung 8, A). Mithilfe einer weiteren Komponente, GAL80, kann der Zeitpunkt der Aktivierung der ektopischen Expression genau reguliert werden. Für diesen Zweck wird eine temperatursensitive Form vom GAL80 ($GAL80^{ts}$) unter die Kontrolle eines ubiquitären Promoters (z.B. *tubulin*) gestellt. GAL80 ist ein ebenfalls aus der Hefe stammendes Protein, das im aktiven Zustand (bei einer Haltungstemperatur von 18°C) an die Transaktivierungsdomäne von GAL4 bindet und dessen Aktivität reprimieren kann. Durch eine Temperaturerhöhung auf 29°C wird $GAL80^{ts}$ inaktiviert und die GAL4-Repression durch GAL80 aufgehoben. Dies führt dazu, dass die Expression des gewünschten Gens zu einem bestimmten Zeitpunkt initiiert wird (Abbildung 8, B).

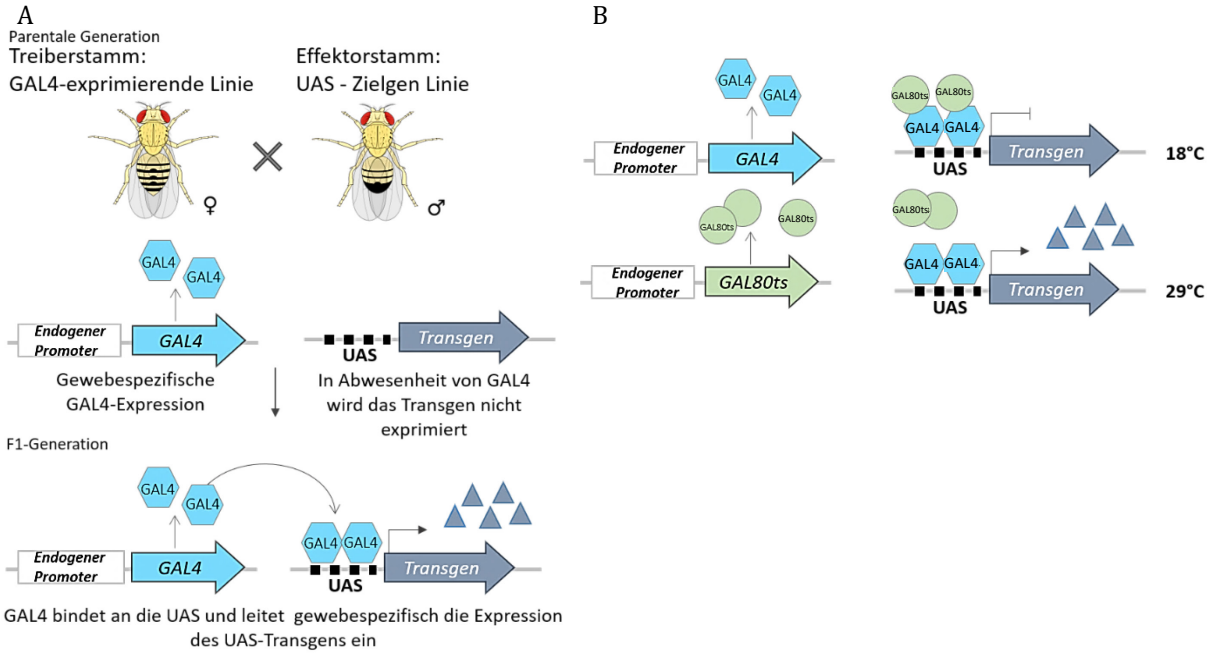


Abbildung 8: Schematische Darstellung des GAL4/UAS Systems für eine ektopische Genexpression *in vivo*. (A) Nach der Kreuzung des Treiberstamms mit dem Effektorstamm entstehen Nachkommen, die sowohl den Transkriptionsfaktor GAL4 als auch das gewünschte UAS-Transgen tragen, wodurch das Transgen in einem zeitlich und räumlich bestimmten Muster exprimiert wird. (B) Zusätzlich zu GAL4 kann eine Temperatur-sensitive Form von GAL80 exprimiert werden. Bei einer Haltungstemperatur von 18°C ist GAL80 aktiv und reprimiert GAL4 und dementsprechend die ektopische Expression des UAS-Transgens. Wird die Haltungstemperatur auf 29°C erhöht, wird GAL80 inaktiviert und die GAL4-Repression aufgehoben. GAL4 ist dann in der Lage an die UAS zu binden und die Expression des UAS-Transgens einzuleiten. Durch den Einsatz von $GAL80^{ts}$ wird die Initiation der ektopischen Expression zeitlich kontrolliert.

2.1.4 Klonale Analyse mithilfe des FLP/FRT- und des MARCM-Systems

Homozygote Mutationen in zahlreichen essentiellen Genen, wie bspw. in *Epsin* führen zu einer frühen Letalität des Organismus. Dadurch ist eine Untersuchung der Auswirkungen dieser Mutationen in Homozygose nicht möglich. Um solche Mutationen untersuchen zu können, wurde das FLP/FRT-System (**Fli**ppase/**F**lippase **R**ecognition **T**arget) entwickelt. Mithilfe des FLP/FRT-Systems können homozygot mutante Zellklone in einem heterozygot mutanten Organismus induziert werden [95]. Das FLP/FRT-System stammt ursprünglich aus der Hefe und setzt sich aus zwei Hauptkomponenten, FLP und FRT-Sequenz, zusammen. FLP ist eine sequenzspezifische Rekombinase, die die mitotische Rekombination an bestimmten Erkennungssequenzen, FRT, vermittelt. Meistens wird die FLP unter

der Kontrolle eines Hitzeschock-induzierbaren Promoters (hier *hsFLP1.22*) oder unter der Kontrolle eines gewebespezifischen Promoters (hier *ptc*) exprimiert. Dies führt dazu, dass ein Hitzeschock (bei 37°C) eine ubiquitäre Expression der FLP initiiert. Beim Einsatz eines gewebespezifischen Promoters wird die FLP im gewünschten Gewebe und zu bestimmten Entwicklungsphasen exprimiert. Die FRT-Sequenzen wurden auf jedes der Hauptchromosome über die P-Elemente in die proximale Position, nahe dem Zentromer, ins *Drosophila* Genom integriert. Für die klonale Analyse wird ein Fliegenstamm erzeugt, der auf einem Chromosomenarm die gewünschte Mutation distal zu einer FRT-Sequenz besitzt. Dieser Stamm wird mit einem anderen Stamm gekreuzt, der die FLP-Rekombinase sowie die gleiche FRT-Sequenz gefolgt von einem Markergen (z.B. UAS-GFP) trägt. In den Nachkommen dieser Kreuzung vermittelt die exprimierte FLP einen Chromosomenaustausch zwischen den FRT-Sequenzen. Durch diese mitotische Rekombination entstehen Zellen, die die gewünschte Mutation homozygot tragen. Die restlichen Zellen im Gewebe besitzen entweder je eine Kopie des Markergens und des mutanten Allels oder zwei Kopien des Markergens (Zwillingsklone) und sind wildtypisch (Abbildung 9). Dadurch ermöglicht das FLP/FRT-System eine Erzeugung von wildtypischen sowie heterozygot- und homozygot mutanten Zellen innerhalb eines Gewebes. Die homozygot mutanten Zellen sind dabei durch das Fehlen des Markergens, die heterozygoten Zellen durch eine Kopie und die wildtypischen durch zwei Kopien des Markergens erkennbar (Abbildung 9).

Durch eine Kombination des FLP/FRT-Systems mit dem UAS/GAL4-GAL80-System wurde die MARCM-Methode (Mosaic Analysis with a Repressible Cell Marker) entwickelt [96]. Durch MARCM können homozygot mutante Zellklone positiv markiert und gleichzeitig gewünschte Transgene in diesen Zellklonen exprimiert werden. Für die klonale Analyse werden zwei Fliegenstämme gekreuzt. Dabei trägt ein Fliegenstamm auf einem Chromosom die zu untersuchende Mutation distal von einer FRT-Sequenz und auf einem anderen Chromosom ein UAS-Konstrukt vom Interesse. Der zweite Fliegenstamm besitzt die FLP, einen GAL4-Treiber mit dem UAS-Markergen und die gleiche FRT-Sequenz gefolgt von GAL80. Die Nachkommen dieser Kreuzung besitzen die FLP und den GAL4-Treiber mit dem UAS-Markergen auf einem Chromosom. Auf dem anderen Chromosom liegen die zu untersuchende Mutation und die FRT-Sequenz vor, sowie das GAL80 mit derselben FRT-Sequenz, die auf dem homologen Chromosom lokalisiert ist. In dieser Situation reprimiert das GAL80-Protein die Aktivität des GAL4-Proteins, so dass die Expression eines Markergens (z.B. UAS-GFP) nicht erfolgen kann (Abbildung 10). Zur Induktion von Klonen wird die FLP exprimiert, worauf die mitotische Rekombination und somit ein Austausch zwischen den homologen Chromosomenarmen stattfindet. Dies führt zum Verlust der GAL80-Expression in einer der Tochterzellen. Das zuvor reprimierte GAL4 kann nun die Transkription der hinter der UAS-Sequenz nachgeschalteten Gene induzieren. Dies führt dazu, dass das Markergen und das gewünschte Transgen in den homozygot mutanten Zellen exprimiert werden (Abbildung 10).

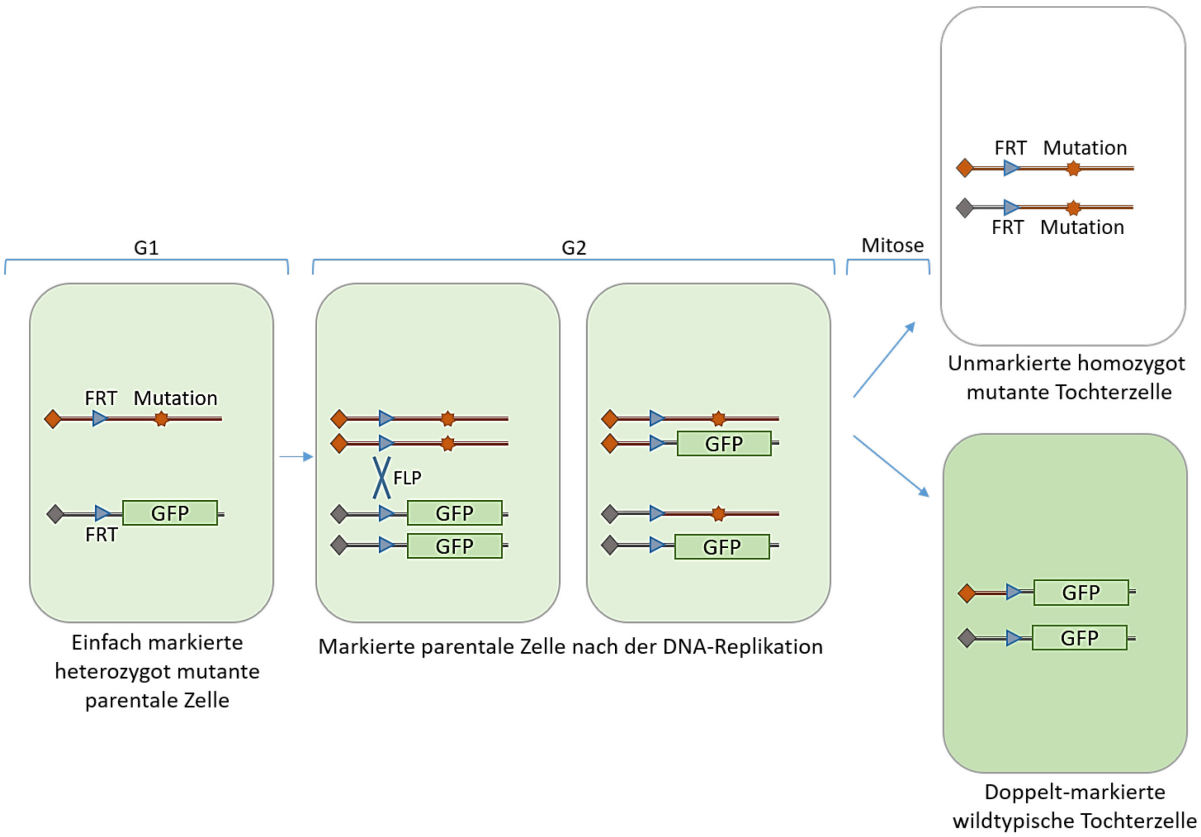


Abbildung 9: Klonale Analyse mittels des FLP/FRT-Systems. Mithilfe der FLP/FRT-Methode wird ein Mosaikgewebe erzeugt, das sowohl homozygot als auch heterozygot mutante sowie wildtypische Zellklone enthält. Dabei werden die homozygot mutanten Zellen anhand der fehlenden Expression eines Markers sichtbar, während die heterozygot mutanten und wildtypischen Zellen je eine Kopie des Markers besitzen.

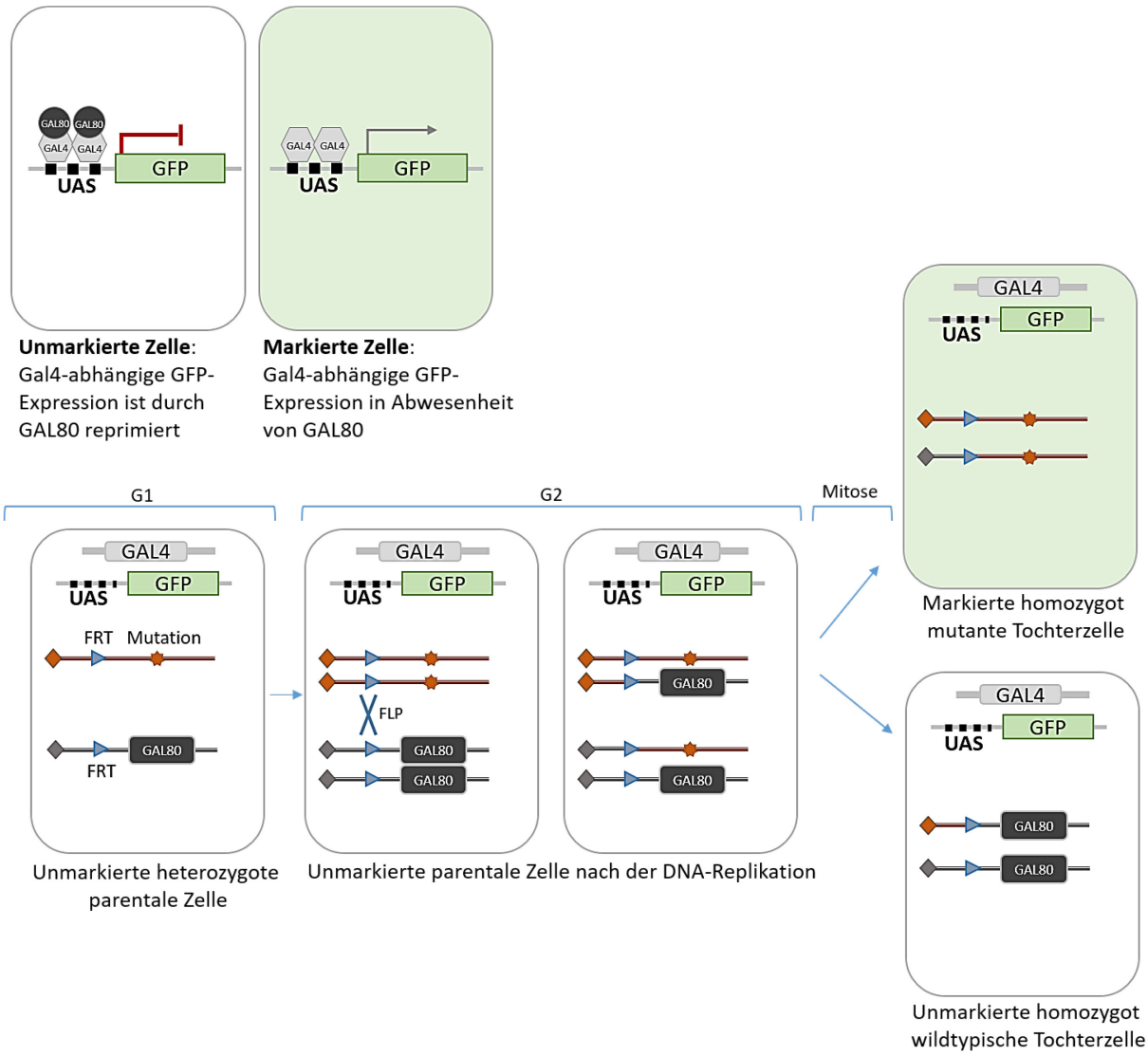


Abbildung 10*:* Klonale Analyse mittels des MARCM-Systems. Bei dem MARCM-System exprimieren die homozygot mutanten Zellen ein Markergen und ein zusätzliches UAS-Transgen gleichzeitig. Die Markergen- und UAS-Transgen- Expression wird durch den GAL80-Verlust infolge einer FLP-vermittelten mitotischen Rekombination ermöglicht.

2.1.5 Das Reportergen Gbe+Su(H)-*lacZ*

Das Reportergenkonstrukt Gbe+Su(H)-*lacZ* ist ein synthetisches Konstrukt zur Detektion einer bereits sehr schwachen Aktivierung des Notch-Signalweges in *Drosophila*. Es beinhaltet drei Grainyhead (Grh)-Bindestellen Gbe (**G**rainyhead **b**inding **e**lement) und zwei Bindestellen für Suppressor of Hairless (Su(H)) gefolgt von dem *lacZ*-Gen unter Kontrolle des *hsp70*-Promotors [97]. Grainyhead und Su(H) sind Transkriptionsfaktoren, die in der Flügelimaginalscheibe ubiquitär exprimiert werden. Su (H) ist in der Lage als Aktivator oder als Repressor zu agieren, abhängig von einer Interaktion mit der intrazellulären Domäne von Notch (NICD). In Abwesenheit der NICD interagiert Su(H) mit Co-Repressoren und unterdrückt dadurch die Expression der Notch-Zielgene (Abbildung 11, A). Fand eine Aktivierung des Notch-Signalwegs statt, transloziert die NICD in den Zellkern, verdrängt dort die Co-Repressoren und bindet an Su(H). In einem Komplex mit der NICD agiert Su (H) zusammen mit weiteren Co-Aktivatoren (z.B. Grh) als Aktivator und die *lacZ*-Expression wird initiiert (Abbildung 11,

B). Um die Aktivierung des Notch-Signalweges nachzuweisen wird eine Antikörperfärbung gegen ß-Galaktosidase durchgeführt.

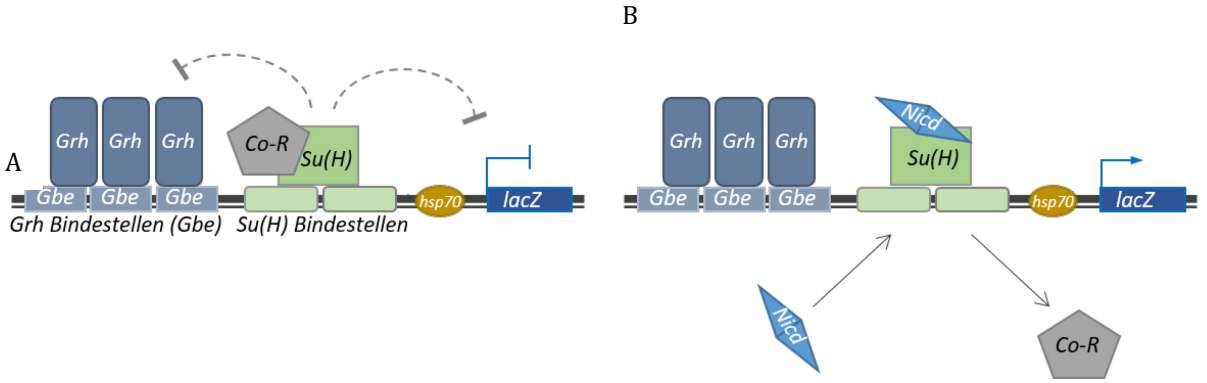


Abbildung 11: Das Reportergen Gbe+Su(H)-*lacZ* zum Nachweis der Notch-Aktivität. Das Konstrukt Gbe+Su(H)-*lacZ* besitzt drei Bindestellen (Gbe) für den Transkriptionsfaktor Grainyhead (Grh), Bindedomäne für Suppressor of Hairless (Su(H)) und ein nachgeschaltetes *lacZ*-Gen mit dem *hsp70*-Minimalpromoter. (A) In der Abwesenheit der intrazellulären Domäne von Notch (NICD) inhibiert Su(H) mit weiteren Co-Repressoren (Co-R) die Transkription des *lacZ*-Gens (B) Wird der Notch-Signalweg aktiviert, transloziert die NICD in den Zellkern. Einmal im Zellkern verdrängt die NICD die Co-R und interagiert mit dem Su(H), wodurch es zu einem Aktivator wird. In diesem Zustand, als Aktivator, wirkt Su(H) mit Grh zusammen und leitet die Expression des *lacZ*-Gens ein.

2.1.6 RNA-Interferenz

Die RNA-Interferenz (RNAi) ist ein Prozess, der in der Natur der Stilllegung von Genen und als antiviraler Schutzmechanismus dient. In *Drosophila* bietet die RNAi eine Möglichkeit gewünschte Gene gezielt herunter zu regulieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die RNAi-Konstrukte mithilfe des GAL4/UAS-Systems überexprimiert (Abbildung 12). Hierfür wurde ein RNAi-Konstrukt generiert und hinter eine UAS-Sequenz kloniert. Das RNAi-Konstrukt besitzt die zu dem Zielgen homologe Sequenz, die von langen invertierten Wiederholungen flankiert ist. Die gewebe- und phasenspezifische Expression von GAL4 führt zu einer Transkription der RNAi-Konstrukte. Nach der Transkription eines RNAi-Konstruktes entstehen hpRNA (**h**air**p**in). Die doppelsträngigen hpRNAs werden durch das Enzym Dicer in kurze RNA-Fragmente, siRNAs (**s**mall **i**nterfering), gespalten. Dicer kommt natürlicherweise in *Drosophila* vor, eine zusätzliche Expression von Dicer kann jedoch die Effizienz der RNAi steigern. Die zu der endogenen mRNA komplementäre siRNA (antisense) bildet zusammen mit zellulären Proteinen den RISC (**R**NA **I**nduced **S**ilencing **C**omplex) -Komplex. Der RISC-Komplex bindet an die Ziel-mRNA und leitet ihre Spaltung ein. Die gespaltene mRNA wird dann durch Nukleasen abgebaut, so dass keine mRNA für die Proteinsynthese mehr vorhanden ist (Abbildung 12).

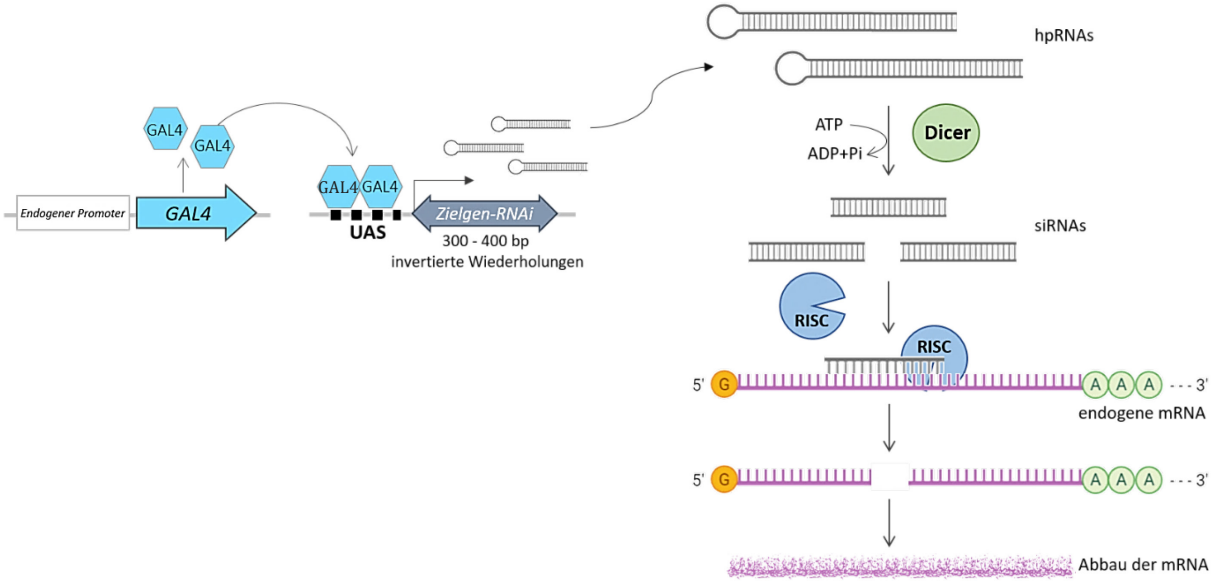


Abbildung 12: Mechanismus der RNA-Interferenz. Mithilfe des GAL4-UAS-Systems wird das Zielgen-RNAi-Konstrukt als hpRNA transkribiert. Die hpRNAs werden durch das Enzym Dicer zu siRNAs gespalten. Die siRNAs sind kurze 19-21 Nukleotid RNA Doppelstränge, die zusammen mit zellulären Proteinen den RISC-Komplex bilden. Dieser bindet an die endogene Ziel-mRNA und leitet deren Abbau ein.

2.1.7 Antikörperfärbung an den Flügelimaginalscheiben von *Drosophila*

Reagenzien:

1 x PBS (phosphate-buffered saline):	137 mM NaCl; 2, 7 mM KCl; 10 mM Na_2HPO_4; 2 mM KH_2PO_4
0,3% PBT (PBS + Triton-X-100):	500 ml 1x PBS; 1,5 ml Triton-X-100
4% PFA (Paraformaldehyd):	4 g Paraformaldehyd in 80 ml ddH_2O lösen; 3 Tropfen NaOH hinzufügen; 5 ml 20x PBS versetzen; auf 100 ml mit ddH_2O auffüllen; auf pH 7,2 mit NaOH einstellen.
NGS (Normal Goat Serum) von Dianova:	5% NGS in 0,3% PBT

Vectashield (Einbettungsmedium) von Vector

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Antikörper und DNA-Farbstoffe mit Angaben zu der Herkunft sowie der eingesetzten Konzentration.

Bezeichnung	Hergestellt im Tier	Konzentration	Firma
primäre Antikörper			
anti Wingless	Maus	1:50	DSHB (4D4)
anti Notch-extra	Maus	1:100	DSHB (C458.2H)
anti β-Galaktosidase	Kaninchen	1:1500	Cappel Research Products
anti DE-Cadherin	Ratte	1:50	DSHB
anti Discs-Large	Maus	1:200	DSHB
anti-HA	Ratte	1:500	Roche (3F10)
anti-HA	Kaninchen	1:1500	Cell Signaling Tech. (C29F4).
anti-Delta	Maus	1:100	DSHB
anti-Serrate	Ratte	1:500-1:1500	Geschenk von K. Irvine
anti-Serrate	Kaninchen	1:500-1:1500	AG T. Klein
anti-V5	Maus	1:500-1:1000	Invitrogen, R961-25
anti-V5	Kaninchen	1:1000-1:2000	Sigma-Aldrich

sekundäre Antikörper			
Alexa 488	Ziege	1:500	Invitrogen
Alexa 568	Ziege	1:500	Invitrogen
Alexa 647	Ziege	1:500	Invitrogen
Kernfärbung			
Hoechst 33258		1:10.000	Sigma Aldrich

Für die Antikörperfärbung wurden die Larven des L3-Stadiums im kalten PBS umgestülpt und die Imaginalscheiben vom restlichen Gewebe (Darm, Fett etc.) freigelegt. Dabei wurde darauf geachtet die Imaginalscheiben von der Larve nicht zu entfernen. Nach der Präparation wurden die Proben für 30 Minuten in 4% PFA fixiert. Der Fixierschritt dient dem Vernetzen der Proteine im Gewebe, wodurch es im aktuellen Zustand konserviert wird. Nach dem Fixierschritt wurden die Proben dreimal mit 0,3% PBT je 10 Minuten gewaschen. Das in 0,3%-igem PBT enthaltene Triton ist ein Detergens, das die Zellmembran permeabilisiert und somit die Bindestelle für den Antikörper zugänglich macht. Nach dem Waschen wurden die Proben in 5%-igem NGS für 30 Minuten (optional ü. N. bei 4°C) inkubiert. Der Blockierschritt diente dazu möglichst alle Antikörperbindestellen abzusättigen. Dadurch sollte unspezifisches Binden der Antikörper verhindert werden. Nach dem Blockierschritt wurden die Proben mit dem primären Antikörper in 5% NGS für 120 Minuten (optional ü. N. bei 4°C) geschüttelt. Der primäre Antikörper erkennt und bindet an das Epitop des Zielproteins. Anschließend wurden die nicht gebundenen Antikörper mit 0,3% PBT dreimal je 15 Minuten ausgewaschen. Nach diesem Waschschritt wurden die Proben mit dem zweiten Antikörper, der in 5% NGS verdünnt wurde, für 120 Minuten inkubiert. Der sekundäre Antikörper erkennt und bindet die konstante Region des primären Antikörpers über seine flexible Region. Die konstante Region des zweiten Antikörpers ist mit einem Fluorophor assoziiert. Der Fluorophor dient der Detektion des Zielproteins unter dem Fluoreszenzmikroskop. Nach der 120-minutigen Inkubation wurden die nicht gebundenen Antikörper für 10 Minuten mit 0,3%-igen PBT ausgewaschen. Zum Schluss erfolgte eine 10-minutige Inkubation der Proben in Hoechst-Lösung und ein zweifacher Waschritt für je 10 Minuten mit 0,3%-igen PBT. Das Hoechst interkaliert in die DNA und macht die Zellkerne sichtbar. Nach der Färbung wurden die Imaginalscheiben von den Larvenresten abpräpariert und in Vectashield eingebettet.

2.1.8 Oberflächenfärbung an den Flügelimaginalscheiben von *Drosophila*

Reagenzien:

Schneider´s-Medium der Firma „PAN-Biotech“

4% Paraformaldehyd in PBS

0,3% Triton in PBS

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die extrazelluläre Domäne des Notch-Rezeptors an den Flügelimaginalscheiben gefärbt. Hierfür wurden die L3-Larven in eiskaltem Schneider´s-Medium, ohne Serum und ohne Antibiotikum, präpariert. Der erste Antikörper, der gegen die extrazelluläre Domäne des Proteins gerichtet ist, wurde im Schneider´s-Medium verdünnt. Dabei sollte eine dreifache Menge des Antikörpers, im Vergleich zu einer normalen Antikörperfärbung, eingesetzt werden. Danach

wurden die präparierten Larven mit dem ersten Antikörper im Schneider´s-Medium für 30-60 Minuten bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Antikörper mit eiskaltem PBS dreimal kurz ausgewaschen und das Gewebe für 30 Minuten bei 4°C fixiert. Nach der Fixierung wurden die Proben mit 0,3% -igem PBT 3x10 Minuten bei RT gewaschen. Durch das Waschen mit PBT wurde die Zellmembran permeabilisiert. Anschließend folgte eine normale Antikörper-Färbung.

2.2 Molekularbiologische und biochemische Methoden

2.2.1 Klonierungstrategie zur Herstellung der Ser-Rs- und SerK2R-Ks-Varianten.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden diverse Varianten mit mutierten intrazellulären Ks von Serrate hergestellt. Zuerst wurde eine Serrate-Variante synthetisiert, in der alle intrazellulären Ks durch Arginine (R) ersetzt wurden (sog. SerK2R, generiert von S. Kim, AG Klein). Um die Rolle der Ks in der Ser-ICD für die Aktivierung des Notch-Signalweges zu analysieren, wurden Aminosäuresequenzen der ICDs von Serrate in verschiedenen Insektenspezies verglichen und fünf hochkonservierte Ks sowie ein weiteres weniger konserviertes K an den Positionen 1276, 1294, 1362, 1370, 1381 und 1385 identifiziert ((3.3) und (Abbildung 13)). Für die Herstellung verschiedener Ser-Rs- und SerK2R-Ks-Varianten wurden zwei Strategien angewendet: zum einen wurden in die wildtypische ICD von Ser mithilfe einer ortspezifischen Mutagenese (2.2.5) Mutationen an oben erwähnten Positionen eingeführt, die in einem Aminosäureaustausch von K nach R resultieren (Abbildung 14). Parallel wurden in die K-freie ICD von SerK2R Mutationen eingeführt, die zu einem R zu K Austausch führen. Die Positionen der Austausche sind in Abbildung 13 am Beispiel der Ser-ICD dargestellt. Die ICD von SerK2R wurde analog dazu behandelt. Die Mutationen an den angegebenen Positionen wurden einzeln oder in verschiedenen Kombinationen eingeführt. Um das zu modifizierende Plasmid möglichst klein zu halten, wurden die cDNAs von Ser-HA und SerK2R-HA zunächst in den pBlueScript-Vektor (pBSc) umkloniert (Abbildung 14, A). Im pBSc wurden die intrazellulären Domänen von Ser-HA und SerK2R-HA mithilfe der SDM wie oben beschrieben modifiziert. Die dafür verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 4 aufgelistet. Nach der Mutagenese wurden die Konstrukte sequenziert und über die Schnittstellen AatII + XhoI für Ser-ICD und AatII/AvrII + NotI-HF für SerK2R-ICD je in die Zielvektoren Ser-HA-pUAST-attB und SerK2R-HA-pUAST-attB umkloniert (Abbildung 14, B). In der Tabelle 2 sind alle hergestellten Varianten mit den Angaben zu den Vektoren und dem Vorhandensein von transgenen Fliegen aufgelistet.

```
                                                >TM
                                                |
ctg ata gga gtg cta tgc ggt gtc ttt ata gtc ctg gtg gga ttc tcg gtg ttc atc agt ctt tac tgg aaa
L   I   G   V   L   C   G   V   F   I   V   L   V   G   F   S   V   F   I   S   L   Y   W   K

cag cgt ctg gct tat cgc acc agt tcg gga atg aac tta act ccc tcc ctg gat gca ctg cgt cac gag gag
Q   R   L   A   Y   R   T   S   S   G   M   N   L   T   P   S   L   D   A   L   R   H   E   E

     >K1276                                                                  >K1294
     |                                                                       |
gag aag tcg aat aat ctg cag aac gag gag aat ctg cga agg tat aca aat ccg ctg aag ggc agc acc agt
E   K   S   N   N   L   Q   N   E   E   N   L   R   R   Y   T   N   P   L   K   G   S   T   S

tcc cta aga gcg gcc acc ggc atg gaa cta agc ctc aat ccc gct ccg gaa tta gcc gcc tcg gcg gcg agt
S   L   R   A   A   T   G   M   E   L   S   L   N   P   A   P   E   L   A   A   S   A   A   S

                                  >ICD
                                  |
agt tcc gcc ttg cac aga tcg cag cca cta ttc ccg cca tgc gat ttc gag cgt gag ctg gac tcc agt acg
S   S   A   L   H   R   S   Q   P   L   F   P   P   C   D   F   E   R   E   L   D   S   S   T

                                                          >K1362                          >K1370
                                                          |                               |
ggc ctg aag cag gcg cac aag cgg agc tca cag att ctg ctg cac aaa acc caa aac tcg gac atg cgg aag
G   L   K   Q   A   H   K   R   S   S   Q   I   L   L   H   K   T   Q   N   S   D   M   R   K

                                          >K1381          >K1385
                                          |               |
aac act gtg ggc tcg ctg gac agt ccg cgt aag gac ttt ggc aag cgg tcg atc aac tgc aag tcc atg cca
N   T   V   G   S   L   D   S   P   R   K   D   F   G   K   R   S   I   N   C   K   S   M   P

                                                                                      >HA
                                                                                      |
ccc tct tcg ggc gac gag ggc tcc gat gtc ctt gcc acc act gtg atg gtt gcc tac cca tac gac gtt cca
P   S   S   G   D   E   G   S   D   V   L   A   T   T   V   M   V   A   Y   P   Y   D   V   P

gac tac gct taa
D   Y   A   *
```

Abbildung 13: Darstellung der DNA-Sequenz mit der zugehörigen Aminosäuresequenz der Transmembran- und ICD-Domänen von Serrate. In blau sind Ks markiert und nummeriert, die mithilfe einer ortspezifischen Mutagenese in Rs umgetauscht wurden. In der K-freien ICD von SerK2R wurden wiederum an diesen Positionen Rs durch Ks ersetzt.
Abkürzungen: TM-Transmembrandomäne; ICD-Intrazelluläre Domäne; K-Lysin; HA-Hämagglutinin diente als Markierung.

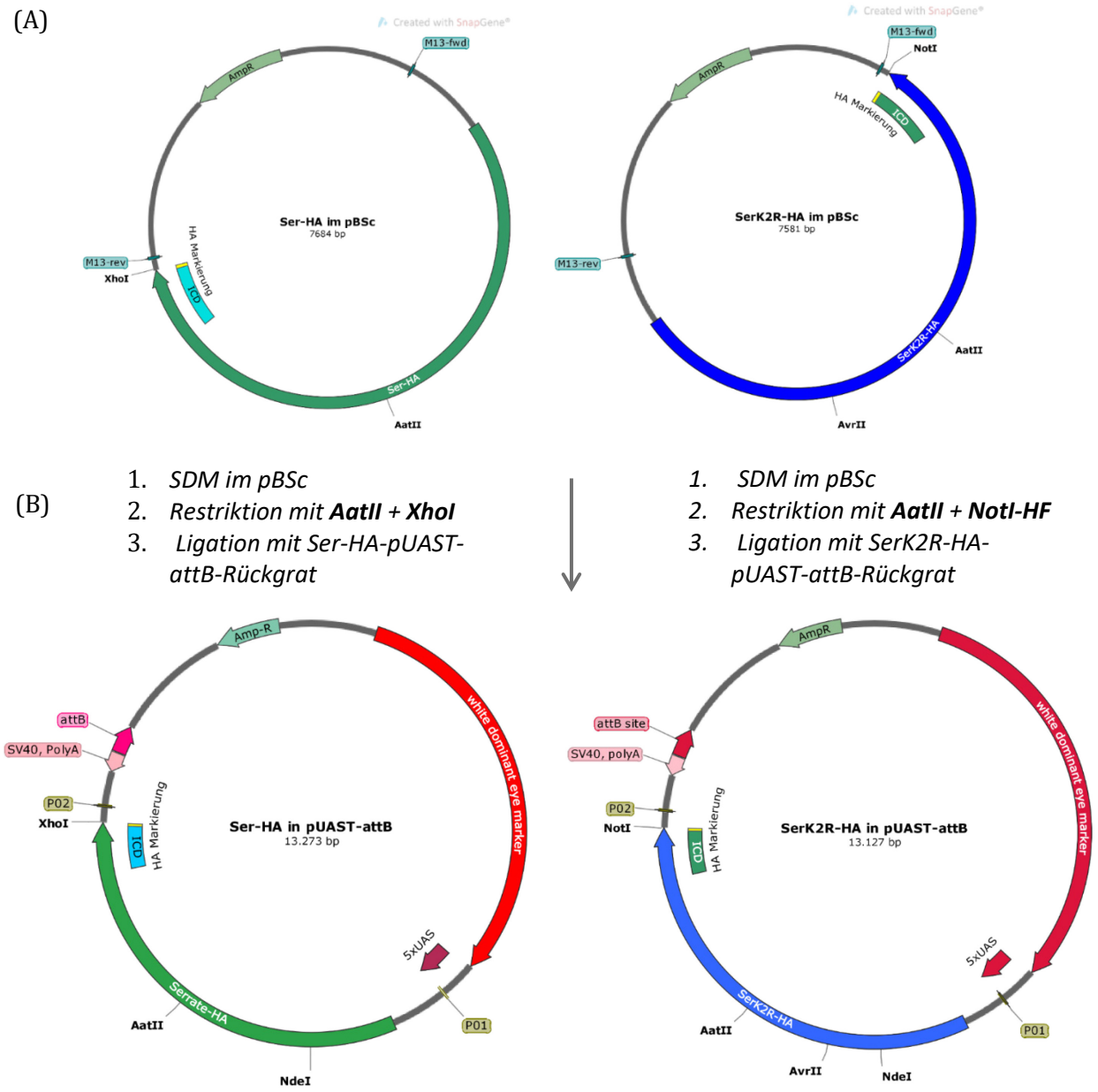


Abbildung 14: Schematische Darstellung der verwendeten Plasmide mit der Klonierungsstrategie für die Herstellung verschiedener Ser-R- und SerK2R-Ks-Varianten. (A) Zuerst wurden die cDNAs von Ser-HA und SerK2R-HA in den Vektor pBSc kloniert. An dem pBSc wurde die SDM durchgeführt. (B) Anschließend wurden die verifizierten ICDs in die Expressionsvektoren pUAST-attB umkloniert. Hierbei ist wichtig zu beachten, dass das Ser-HA-Insert über die Schnittstellen für AatII und XhoI in den Ser-HA-pUAST-attB umkloniert wurde, während SerK2R-HA-Insert über die Schnittstellen für AatII/AvrII und NotI in den SerK2R-HA-pUAST-attB umkloniert wurde.

Tabelle 2: Auflistung aller in dieser Arbeit hergestellten Ser-Rs- sowie SerK2R-Ks-Varianten mit den Angaben zu den Vektoren und den transgenen Fliegen.

Arginin in der **Ser-ICD** an der Position:	im pBSC	im pUAST-attB	transgene Fliegen (in 51C)
R1276	✓	✓	✓
R1294	✓	✓	✓
R1362	✓	✓	✓
R1370	✓		
R1381	✓	✓	✓
R1385	✓	✓	✓
R1276,1294 (Ser-2R)	✓	✓	✓
R1381,1385	✓	✓	
R1276,1294,1362	✓	✓	✓
R1362,1381,1385 (Ser-3R)	✓	✓	✓
R1276,1294,1362,1381	✓	✓	✓
R1276,1294,1362,1385	✓	✓	✓
R1276,1362,1381,1385	✓	✓	✓
R1294,1362,1381,1385	✓	✓	✓
R1276,1294,1381,1385	✓	✓	✓
R1276,1294,1362,1381,1385	✓	✓	✓

Lysin in der **SerK2R-ICD** an der Position:	im pBSC	im pUAST-attB	transgene Fliegen (in 51C)
K1276		✓	✓
K1294		✓	✓
K1362	✓	✓	✓
K1370	✓	✓	
K1381	✓	✓	✓
K1385	✓	✓	✓
K1276,1294(K2R-2K)	✓	✓	✓
K1276,1381	✓		
K1294, 1381	✓		
K1362,1381	✓		
K1276,1294,1362	✓	✓	✓
K1276,1294,1381	✓	✓	
K1276,1294,1385	✓	✓	
K1362,1381,1385 (K2R-3K)	✓	✓	✓
K1276,1294,1362,1381	✓	✓	✓
K1276,1294,1362,1385	✓	✓	✓
K1276,1362,1381,1385	✓	✓	✓
K1294,1362,1381,1385	✓	✓	✓
K1276,1294,1381,1385	✓	✓	✓
K1276,1294,1362,1381,1385	✓	✓	✓
K1294,1362,1370,1381,1385	✓	✓	✓
K1276,1294,1362, 1370,1385	✓	✓	✓
K1276,1294,1362, 1370, 1381,1385	✓	✓	

2.2.2 Isolierung der genomischen DNA aus *Drosophila*

Reagenzien:

Puffer A:	100 mM Tris pH 7,5; 100 mM EDTA; 100 mM NaCl; 0,5% SDS
LiCl/KAc-Lösung:	1Teil 5 M KAc/2,5 Teile 6 M LiCl
70% Ethanol	
Isopropanol	
TE-Puffer pH 8,0:	10 mM Tris, 1 mM EDTA
RNAse A	0,1 mg/ml

Alle Schritte der DNA-Isolierung erfolgten auf Eis, falls nicht anders vermerkt. Zuerst wurden 30-50 tiefgefrorenen Fliegen mit 200 µL Puffer A versetzt und mit einem Biovortexer für 2-4 Minuten zermörsert. Weitere 200 µl des Puffers A wurden dazu pipettiert und die Fliegen für weitere 2-3 Minuten homogenisieren. Diese Probe wurde dann für 30 Minuten bei 65°C inkubiert und anschließend 800 µl der LiCl/KAc-Lösung hinzugefügt und für 30 Minuten auf Eis gestellt. Während dieser 30-minutigen Inkubation wurden die denaturierten Proteine gefällt. Danach wurden die Proben für 15 Minuten bei 16,2 x g und RT zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde 1 ml des Überstandes mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze in ein neues Reaktionsgefäß überführt und nach Zugabe von 600 µl Isopropanol für 15 Minuten bei RT und 16,2 x g gefällt. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und verworfen. Die pelletierte DNA wurde mit 200-500 µl des 70%-igen Ethanols für 10 Minuten bei RT und 16,2 x g gewaschen. Nach dem Waschen wurde das Ethanol komplett abgenommen und die DNA vollständig getrocknet. Die trockene DNA wurde danach in 50 µl TE-Puffer

oder dH_2O resuspendiert und bei 4°C gelagert. Anschließend wurde eine RNAse-Behandlung durchgeführt. Hierfür wurde 0,1 mg/ml RNAse A zu der DNA pipettiert und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert.

2.2.3 Isolierung der genomischen DNA aus einer Fliege

Reagenzien:

Squishing buffer: 10 mM Tris; 1 mM EDTA; 25 mM NaCl; 200 µg/ml frisch zugefügte Proteinase K.

Eine eingefrorene Fliege (besser ein Weibchen) wurde mit der gelben Pipettenspitze, die 50µl des „squishing buffers" enthielt, zerdrückt. Daraufhin wurde der Puffer auf die Fliege gegeben und für 20-30 Minuten bei 20-30°C inkubiert. Zum Schluss wurde die Proteinase K für 1-2 Minuten bei 95°C inaktiviert.

2.2.4 Polymerase Ketten Reaktion (PCR)

Oligonukleotide: alle verwendeten Primer wurden bei der Firma Biolegio BV, Nijmegen bestellt. Die Bezeichnung sowie die Sequenzen der verwendeten Oligonukleotiden sind in der Tabelle 4 aufgelistet. Das verwendete PCR-Programm sowie der Reaktionsansatz sind in der Tabelle 3 aufgelistet.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden eine Standard-PCR durchgeführt. Sie diente der Genotypisierung der transgenen Fliegen.

Tabelle 3: Allgemeines PCR-Programm und allgemeiner Reaktionsansatz, die im Rahmen dieser Arbeit für eine Standard-PCR verwendet wurden.

Schritt	Temperatur (C°)	Dauer	Zyklen
Denaturierung	98	30 Sek	1
Denaturierung	98	5-10 Sek.	25-35
Annealing	50-72	10-30 Sek.	
Extension	72	20-30 Sek/kb	
Finale extension	72	2 Minuten	1
Komponente für 1xPCR	∑ 25µl	∑ 50µl	Finale Konzentration
5X Q5 Reaction Buffer [87]	5 µl	10 µl	1X
10 mM dNTPs (Thermo scientific)	0,5 µl	1 µl	200 µM
10 µM Forward Primer	1,25 µl	2,5 µl	0,5 µM
10 µM Reverse Primer	1,25 µl	2,5 µl	0,5 µM
Template DNA	variabel	variabel	30-50 ng
Q5 High-Fidelity DNA Polym. [87]	0,25 µl	0,5 µl	0,02 U/µl
Nuklease-freies Wasser	auf 25 µl	auf 50 µl	

Mithilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion lassen sich gewünschte DNA-Abschnitte vervielfältigen. Sie umfasst drei generelle Schritte, die in zyklischer Reihenfolge ablaufen. Im ersten Schritt wird die doppelsträngige Matrizen-DNA auf 94-96°C erhitzt, dabei denaturiert sie und wird in zwei komplementäre Einzelstränge aufgetrennt. Im nächsten Schritt (sog. Primer-Annealing) lagern sich kurze Oligonukleotide (Primer) sequenzspezifisch an die einzelsträngige komplementäre DNA an. Die Auswahl der Annealing-Temperatur hängt vom Schmelzpunkt der verwendeten Primer ab. Im dritten

Schritt (sog. Extension) erfolgt die Synthese der komplementären DNA-Sequenzen durch eine DNA-Polymerase am 3´-OH-Ende des Primers. Die Synthese der neuen DNA findet beim Temperaturoptimum der Polymerase statt, d.h. bei einer hitzestabilen Polymerase bei einer Temperatur von ca. 72 °C (Tabelle 3).

Tabelle 4: Auflistung der Primersequenzen, die im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden.

Primername	Sequenz 5´→3´	Verwendung
Ser_K1276R_for:	GCGTCACGAGGAGGAGCGGTCGAATAATCTGCAG	Mutagenese der ICD von Ser zum Herstellen von: Ser-5R-HA; Ser^{R1276}-HA; Ser^{R1294}-HA; Ser^{R1362}-HA; Ser^{R1370}-HA; Ser^{R1381}-HA; Ser^{R1385}-HA, sowie diverser Ser-Rs-Varianten
Ser_K1276R_rev	CTGCAGATTATTCGACCGCTCCTCCTCGTGACGC	
Ser_K1294R_for	GTATACAAATCCGCTGCGGGGCAGCACCAGTTCC	
Ser_K1294R_rev	GGAACTGGTGCTGCCCCGCAGCGGATTTGTATAC	
Ser_K1362R_for	CACAGATTCTGCTGCACCGAACCCAAAACTCGGAC	
Ser_K1362R_rev	GTCCGAGTTTTGGGTTCGGTGCAGCAGAATCTGTG	
Ser-K1381R_for:	GACAGTCCGCGTCGGGACTTTGGCAAG	
Ser-K1381R_rev:	CTTGCCAAAGTCCCGACGCGGACTGTC	
Ser-K1385R_for:	GTAAGGACTTTGGCCGGCGGTCGATCAACTG	
Ser-K1385R_rev:	CAGTTGATCGACCGCCGGCCAAAGTCCTTAC	
Ser_K1381, 1385R_for	CTGGACAGTCCGCGTAGGGACTTTGGCAGGCGGTCGATCAACTG	
Ser_K1370_R_for	CAAAACTCGGACATGCGGCGCAACACTGTGGGCTCGC	
Ser_K1370R_rev	GCGAGCCCACAGTGTTGCGCCGCATGTCCGAGTTTTG	
Ser_K1381, 1385R_rev	CAGTTGATCGACCGCCTGCCAAAGTCCCTACGCGGACTGTCCAG	
SerK2R_R1362K_for	GCTCACAGATTCTGCTGCACAAAACCCAAAACTCGGACATGCG	Mutagenese der ICD von SerK2R zum Herstellen von: SerK2R-5K-HA; $SerK2R^{K1362}$-HA; $SerK2R^{K1370}$-HA; $SerK2R^{K1381}$-HA; $SerK2R^{K1385}$-HA, sowie diverser SerK2R-Ks Varianten
SerK2R_R1362K_rev	CGCATGTCCGAGTTTTGGGTTTTGTGCAGCAGAATCTGTGAGC	
SerK2R_R1381K_for	CTGGACAGTCCGCGTAAGGACTTTGGCCGGCG	
SerK2R_R1381K_rev	CGCCGGCCAAAGTCCTTACGCGGACTGTCCAG	
SerK2R_R1385K_for	CGTCGGGACTTTGGCAAGCGGTCGATCAACTG	
SerK2R_R1385K_rev	CAGTTGATCGACCGCTTGCCAAAGTCCCGACG	
SerK2R_R1370K_for	CAAAACTCGGACATGCGGAAGAACACTGTGGGCTCGC	
SerK2R_R1370K_rev	GCGAGCCCACAGTGTTCTTCCGCATGTCCGAGTTTTG	
Ser N-box 2Ala+K_for	GAGGAGAATCTGCGAAGGGCTGCAGCTGCGGCGAAGGCCAGCACCAGTTCCCTAAGAG	Herstellen von SerNB2Ala+K-HA und SerN+CB2Ala+K-HA. Die Aminosäuren der N-Box mit Ausnahme von K1294 werden zu Alaninen umgetauscht.
Ser N-box 2 Ala+K_rev:	CTCTTAGGGAACTGGTGCTGGCCTTCGCCGCAGCTGCAGCCCTTCGCAGATTCTCCTC	
Ser N-box 2 Ala_for:	GAGGAGAATCTGCGAAGGGCTGCAGCTGCGGCGGCGGCCAGCACCAGTTCCCTAAGA	Herstellen von SerNB2Ala-HA und SerN+CB2Ala-HA. Alle Aminosäuren der N-Box werden zu Alaninen umgetauscht.
Ser N-box 2 Ala_rev:	TCTTAGGGAACTGGTGCTGGCCGCCGCCGCAGCTGCAGCCCTTCGCAGATTCTCCTC	
Ser C-box 2 Ala+K_for:	CTCACAGATTCTGCTGCACAAAGCCGCAGCCGCGGCCATGCGGAAGAACACTGTGG	Herstellen von SerCB2Ala+K-HA und SerN+CB2Ala+K-HA. Die

Ser C-box 2 Ala+K_rev:	ACAGTGTTCTTCCGCATGGCCGCGGCTGCGGCTTTGT GCAGCAGAATCTGTGAGCTCC	Aminosäuren der C-Box mit Ausnahme von K1362 werden zu Alaninen umgetauscht.
Ser C-box 2 Ala _for:	CTCACAGATTCTGCTGCACGCAGCCGCAGCCGCGGCC ATGCGGAAGAACACTGTGG	Herstellen von SerCB2Ala-HA und SerN+CB2Ala-HA. Alle Aminosäuren der N-Box werden zu Alaninen umgetauscht.
Ser C-box 2 Ala_rev:	ACAGTGTTCTTCCGCATGGCCGCGGCTGCGGCGCTGT GCAGCAGAATCTGTGAGCTCC	
Ser-EKSN2Ala_for	GGATGCACTGCGTCACGAGGAGGCGGCGGCGGCTAAT CTGCAGAACGAGGAGAA	Austausch der konservierten Aminosäuren durch Alanine. Zum Herstellen von SerEKSN2Ala-HA
Ser-EKSN2Ala_rev	TTCTCCTCGTTCTGCAGATTAGCCGCCGCCGCCTCCTC GTGACGCAGTGCATCC	
Ser-NEEN2Ala_for	GGAGAAGTCGAATAATCTGCAGGCCGCGGCGGCTCTG CGAAGGTATACAAATCCGCTG	Neuralized-Bindungsbox wird durch Alanine ausgetauscht. Zum Herstellen von SerNEEN2Ala-HA
Ser-NEEN2Ala_rev	CAGCGGATTTGTATACCTTCGCAGAGCCGCCGCGGCC TGCAGATTATTCGACTTCTCC	
SerNLQ2Ala_for	CACGAGGAGGAGAAGTCGAATGCTGCCGCAAACGAGG AGAATCTGCGA	Austausch der konservierten Aminosäuren durch Alanine. Zum Herstellen von SerNLQ2Ala-HA
Ser-NLQ2Ala_rev	TCGCAGATTCTCCTCGTTTGCGGCAGCATTCGACTTC TCCTCCTCGTG	
Ser-Del-ICD_for	CTCGGTGTTCATCAGTCTTTACTGGTACCCATACGAC GTTCCAGACTACGCTTAA	Herstellung von Ser-Variante ohne ICD: Ser-ΔICD-HA
Ser-Del-ICD_rev	TTAAGCGTAGTCTGGAACGTCGTATGGGTACCAGTAA AGACTGATGAACACCGAG	
SerK2R-/Ser-ICD_for	CGGGCACCAATGATACCGTTGAAC	Single fly-PCR, zum Sequenzieren des Konstruktes in der Fliege
SerK2R-/Ser-ICD_rev	GCCTAAGCGTAGTCTGGAACGTCG	
ser2793rev	CCACATGGCATTTGCAGA	Sequenzieren von Ser-ECD
Ser1061for	GAGGAAACATCATACTCG	Sequenzieren von Ser-ICD
Ser1655for	ACATGCACACTCAAGACG	Sequenzieren von Ser-ICD
Ser2120for	AGCAGTACTGCTCTTCTGGC	Sequenzieren von Ser-ICD
Ser2793for	TCTGCAAATGCCATGTGG	Sequenzieren von Ser-ICD
Ser3902for	GAACTAACTGTGTCGTCC	Sequenzieren von Ser-ICD
PO1 (for)	CTGAAATCTGCCAAGAAG	Sequenzieren des Inserts im pUAST-attB-Vektor
P02 (rev)	GTGTATTTTAGATTCCAACCT	

2.2.5 Ortspezifische Mutagenese (SDM, **s**ite **d**irected **m**utagenesis)

Die ortsspezifische oder gezielte Mutagenese ist eine Methode, mit der DNA für molekularbiologische und genetische Untersuchungen modifiziert werden kann. Sie ermöglicht ein kontrolliertes Einführen von kleineren Deletionen, Insertionen oder Substitutionen, die für funktionelle Analysen eines Proteins sehr hilfreich sein können. Die Vorgehensweise und einzelne Schritte der SDM sind in Abbildung 1 dargestellt. Zuerst wird ein methyliertes Ausgangsplasmid mit der zu mutierenden Position benötigt. Für ein gezieltes Einfügen einer gewünschten Mutation, wird ein spezielles Primerpaar generiert, das die Mutation an der gewünschten Position enthält. Beim Design der Primer sollten folgende Kriterien erfüllt sein: die Primerlänge sollte zwischen 25 und 45 Basen liegen; die Schmelztemperatur größer oder gleich 78°C sein, während der CG-Gehalt mindestens 40% betragen soll. Die gewünschte Mutation sollte in der Mitte des Primers liegen. Mit Hilfe der Webseite http://bioinformatics.org/primerx können passende Primer ausgesucht werden. Die mutagenen Primer wurden dann in der Thermocycling-Reaktion verwendet, in der ein neues mutiertes Plasmid durch eine DNA-Polymerase synthetisiert wird. Das verwendete Reaktionsprogramm und der Reaktionsansatz sind in der Tabelle 5 dargestellt. Nach der Synthese wurde der Reaktionsansatz auf 37°C abgekühlt und direkt mit 1 µl DpnI für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Das Restriktionsenzym DpnI erkennt das methylierte, nicht mutierte Ausgangsplasmid und baut dieses ab. Somit bleiben nur die neu synthetisierten unmethylierten Plasmide, die die gewünschte Mutation besitzen (Abbildung 1). Anschließend wurden 5-10µl Reaktionsansatzes in *E.coli*-Zellen transformiert und von den gewachsenen Kolonien Mini-Kulturen angeimpft.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die SDM verwendet, um bestimmte Ks im Serrate-Konstrukt durch Rs zu ersetzen und diese Lysine im SerK2R-Konstrukt wiedereinzuführen. Des Weiteren wurden mithilfe der SDM Ser-Varianten mit mutierten N- und C-Boxen und konservierter Region in der ICD generiert. Die Sequenzen der für die SDM verwendeten Primer sind in der Tabelle 4 aufgelistet.

Tabelle 5: Der Reaktionsansatz und das Programm, die in dieser Arbeit für die SDM verwendet wurden.

Schritt	Temperatur (C°)	Dauer	Zyklen
Denaturierung	95	30 Sek	1
Denaturierung	95	30 Sek.	16
Annealing	55	1 Min.	
Extension	68-72	16 Min.	
Finale Extension	68-72	16 Min.	1
1 x Reaktionsansatz			
10x *Pfu*-Polymerase Puffer mit $MgSO_4$		5 µl	
dNTP-Mix (10 mM)		1 µl	
Vorwärtsprimer (100 pmol/µl)		2 µl	
Rückwärtsprimer (100 pmol/µl)		2 µl	
Template DNA (50 ng/µl)		1 µl	
Pfu-DNA-Polymerase (2,5 U/µl)		0,5 µl	
Nuklease freies Wasser		auf 50µl	

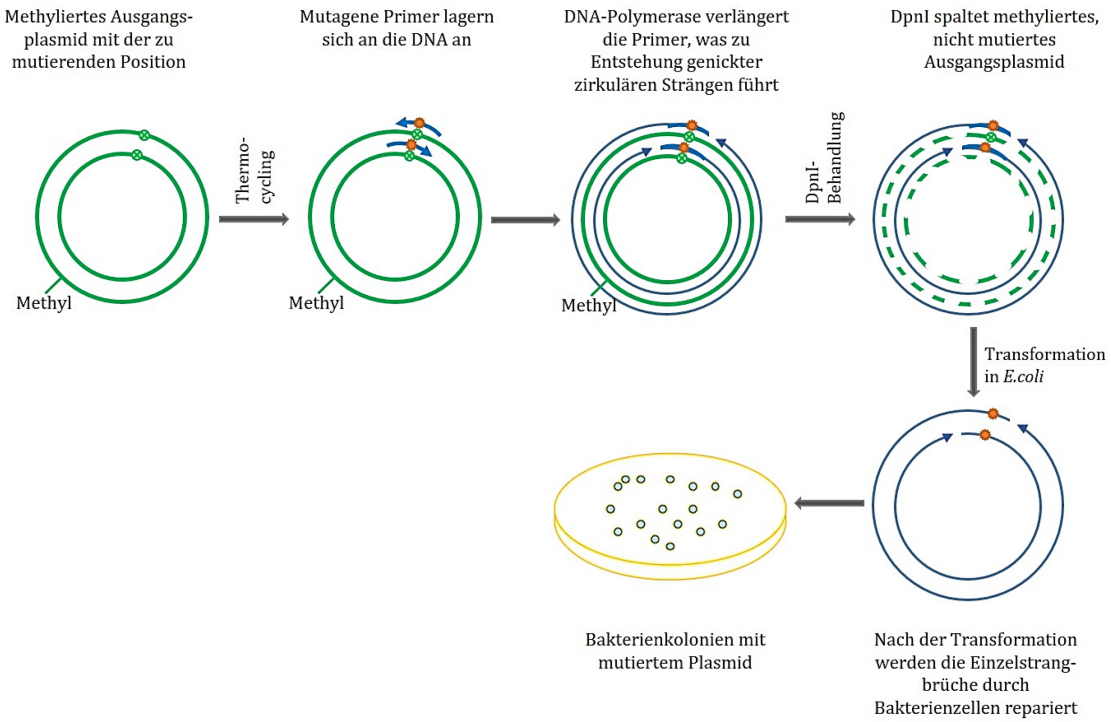


Abbildung 15: Strategie der ortspezifischen Mutagenese (SDM). Mithilfe eines speziellen mutagenem Primerpaars wurde eine Mutation an der gewünschten Position im methylierten Ausgangsplasmid generiert. Anschließend wurden die Proben mit dem Restriktionsenzym DpnI behandelt, das die methylierte nicht modifizierte DNA erkennt und spaltet. Dadurch bleiben nur modifizierte Plasmide mit der gewünschten Mutation erhalten. Diese wurden dann in die Bakterienzellen transformiert und eine anschließende DNA-Isolierung durchgeführt.

2.2.6 Restriktionsspaltung

Um die Transgene in die gewünschten Expressionsvektoren umzuklonieren, wurden die Insert-DNA und die Vektor-DNA mit bestimmten Restriktionsenzymen gespalten. Dadurch entstehen komplementäre Enden, die während der Ligation zusammengefügt werden können. Für die Überprüfung der erfolgreichen Ligation wurde eine analytische Restriktionsspaltung durchgeführt. Sowohl für die analytische als auch für die präparative Restriktionsspaltung wurden alle Komponenten zusammen pipettiert und anschließend bei einer enzymspezifischen Temperatur inkubiert (Tabelle 6). Dabei betrug die Inkubationszeit bei der analytischen Spaltung eine Stunde und bei der präparativen Spaltung 3 Stunden (optional ü. Nacht). Bei der Auswahl von mehreren Restriktionsenzymen wurde darauf geachtet, dass diese im gleichen Puffer optimal spalten können. Die enzymatische Aktivität sollte dabei mindestens 75% betragen.

Die in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsenzyme, deren Erkennungssequenzen sowie der Reaktionsansatz sind in der Tabelle 6 aufgelistet. Alle verwendeten Enzyme wurden bei der Firma „New England Biolabs“ bestellt.

Tabelle 6: Auflistung der verwendeten Restriktionsenzyme mit den Angaben zu den Erkennungssequenzen und der Verwendung.

Enzym	Erkennungssequenz 5´→3´	Zum Herstellen/Umklonieren von
AatII	GACGT^{v}C	Ser-Rs-HA-Varianten
AvrII	C^{v}CTAGG	SerK2R-Ks-HA-Varianten
EcoRI-HF	G^{v}AATTC	Ser-Rs-HA-Varianten
NotI-HF	GC^{v}GGCCGC	SerK2R-K-HA-Varianten
XhoI	CTC^{v}GAG	Ser-R-HA-Varianten
1x Reaktionsansatz		
Substanz	analytisch	präparativ
Enzym I	0,25 µl	1 µl
Enzym II	0,25 µl	1 µl
10xPuffer	1,5 µl	2 µl
DNA	0,5-1 µg	4-8 µg
ddH_2O	auf 15 µl	auf 20 µl

2.2.7 Gelelektrophorese

Reagenzien:

Herstellung eines 0, 8%-igen Agarosegels:

3,2 g Agarose wurden mit 1xTAE-Puffe auf 400 ml aufgefüllt, dann aufgekocht bis sich keine Schlieren mehr bildeten. Anschließend wurde 0,7 mg/ml Ethidiumbromid-Lösung hinzugefügt.

Herstellung eines 50xTris-Acetat-EDTA (TAE)-Puffers:

242g Tris; 57,1 mL Essigsäure; 100 mL des 0,5M EDTA (pH 8,0). Alle Komponenten wurden zusammengemischt. Anschließend der pH-Wert auf 8,3 eingestellt.

Ladepuffer:

6x DNA Loading Dye von Fermentas:

10 mM Tris-HCL (pH 7,6); 0,03% Bromphenolblau; 0,03% Xylencyanol; 10% Glycerol.

1kb DNA-Längenstandard: GeneRulerTM 1kb DNA Ladder von Fermentas.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 0,8 bis 1,2%-ige Agarosegele verwendet. Die Gleichstromspannung betrug zwischen 80 und 120 Volt. Die Größe der aufgetrennten DNA-Fragmente wurde mittels des 1kb-Längenstandards bestimmt.

Gelelektrophorese ist eine Methode, um geladene Moleküle in einem elektrischen Feld nach ihrer Größe aufzutrennen. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte in einem TAE-Agarosegel. Zuvor wurden die Proben mit 6xDNA Loading Dye vermischt, was für ein schnelles Absinken der Proben in die Taschen sorgte und eine farbige Lauffront erzeugte. Da die DNA ein negativ geladenes Phosphatrückgrat besitzt, werden die DNA-Fragmente im elektrischen Feld zum Pluspol transportiert. Dabei hängt die Laufgeschwindigkeit im Gel von der Größe der DNA-Fragmente ab. Kleinere DNA-Fragmente bewegen sich schneller durch die Poren des Gels und liegen deswegen bei der anschließenden Detektion näher am Pluspol als größere DNA- Fragmente. Die Detektion der DNA-Moleküle wurde durch die Zugabe vom Ethidium-Bromid in die Agaroselösung ermöglicht. Es interkalierte zwischen die Basenpaare und fluoreszierte durch Anregung im UV-Bereich (ca. 300 nm).

Mit Hilfe eines Transluminators wurden die Gele unter UV-Licht sichtbar gemacht und abfotografiert. Optional wurden die gewünschten Banden aus dem Gel ausgeschnitten und extrahiert.

2.2.8 DNA-Gelextraktion

Die Gelextraktion der DNA-Fragmente erfolgte mit Hilfe des „Zymoclean Gel DNA Recovery"-Kits von der Firma Zymoclean und wurde laut der Herstellerangaben durchgeführt.

2.2.9 Ligation

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die T4-DNA-Ligase der Firma „New England BioLabs" verwendet. Nach einer erfolgreichen Restriktionsspaltung liegen das Insert und der Vektor in einer linearisierten Form vor, sie besitzen korrespondierende Enden und können miteinander ligiert werden. Dabei katalysieren die DNA-Ligasen mit ATP als Kofaktor die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen einer freien 5´-Phosphat-Gruppe und einer freien Hydroxy-Gruppe zweier doppelsträngiger DNA-Fragmente.

Für eine Ligation wurden alle Komponenten zusammengemischt und eine Stunde bei RT oder über Nacht bei 18°C inkubiert. Die Menge des einzusetzenden Inserts wurde mit folgender Formel berechnet: $Masse_{Insert}\,(ng) = \frac{Masse_{Vektor}\,(ng) x\, Länge_{Insert}(bp)}{Länge_{Vektor}(bp)} x\, \frac{Insert}{Vektor}$

Tabelle 7: Der verwendete Ligationsansatz für die Ligase von „New England BioLabs".

Substanz	Menge
T4-DNA-Ligase (20,000 U) von NEB	1 µL
10x T4-DNA-Ligase-Puffer	2 µL
Vektor-DNA	variabel (50 ng-100 ng)
Insert-DNA	variabel (ermittelt mit der Formel)
ddH_2O	auf 20 µL auffüllen

2.2.10 Transformation chemisch-kompetenter Bakterien-Zellen

Reagenzien:

LB-Medium: 10 g Bactotrypton; 5 g Hefeextrakt; 10g NaCl. Auf 1 Liter mit dH2O auffüllen, p. H 7

Bakterien:

DH5-α von Invitrogen, Stamm: F- φ80*lac*ZΔM15 Δ(*lac*ZYA-*arg*F)U169 *rec*A1 *end*A1 *hsd*R17(rk-, mk+)*pho*A *sup*E44 *thi*-1 *gyr*A96 *rel*A1 λ-

TOP10 von Invitrogen, Stamm: F- *mcrA* Δ(*mrr-hsd*RMS-*mcr*BC) Φ80*lacZ*ΔM15 Δ*lacX*74 *rec*A1 *ara*D139 Δ(*araleu*)7697 *gal*U *gal*K *rps*L (StrR) *end*A1 *nup*G

Für die Transformation wurden die gefrorenen chemisch kompetenten Bakterien-Zellen auf Eis langsam aufgetaut. Nach dem vollständigen Auftauen der Zellen, wurden 8 µL-10 µL des Ligationsansatzes oder 50 ng eines re-transformierten Plasmides auf die Zellen pipettiert und für 5-10 Minuten auf Eis inkubiert. Im nächsten Schritt wurden die Bakterien einem Hitzeschock ausgesetzt, in dem diese bei 42°C für 45-60 Sekunden inkubiert wurden. Das führt dazu, dass die in der umgebenden Lösung vorhandene DNA in die Zelle eingeschleust wird. Nach dem Hitzeschock folgte

eine 2-minütige Inkubation der Bakterien auf Eis mit anschließender Zugabe von 600 µL-1000 µL LB-Medium ohne Antibiotikum. Danach wurden die Bakterien bei 37°C für eine Stunde geschüttelt. Nach dem Schütteln wurden die Bakterien bei 5000 x g für eine Minute abzentrifugiert, der Überstand bis auf 40-70 µL verworfen und das Bakterienpellet damit resuspendiert. Diese Bakteriensuspension wurde anschließend auf einer Antibiotika-haltigen Agarplatte ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.11 Plasmid DNA-Mini-Präparation

Reagenzien:

Resuspensionspuffer (S1):	1M Tris-HCl; 0,5M EDTA; 20µg RNAse A; pH8
Lysispuffer (S2):	1M NaOH; 10% SDS
Neutralisationspuffer (S3):	2,8M KAc, pH 5.1
Isopropanol	
70%-iges Ethanol	
ddH_2O	

Nach der Transformation (2.2.10) wurden Mini-Kulturen in einem Volumen von 2 mL mit einzelnen Bakterienkolonien von der LB-Medium haltigen Platte angeimpft und über Nacht bei 37°C unter Selektionsdruck geschüttelt. Am nächsten Tag wurden die Kulturen durch Zentrifugation bei 16,2 x g für eine Minute geerntet und die Plasmid-DNA aus den Zellen isoliert. Hierfür wurden die pelletierten Bakterienzellen zunächst in 330 µL kaltem S1 Puffer resuspendiert. Als nächstes wurden 330 µL vom S2 Puffer dazugegeben, 5- bis 8-mal invertiert und für 3 bis 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. In diesem Schritt wird die alkalische Lyse ausgelöst, die dafür sorgt, dass die Bakterienzellen lysieren und Proteine denaturiert werden. Durch Zugabe von 330 µL S3 Puffer wurde die alkalische Lyse anschließend gestoppt und der S2 Puffer neutralisiert. Die Proben wurden 6- bis 8-mal invertiert und für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für mind. 20 Minuten bei 16,2 x g. Dabei wurden die Zellbestandteile und Proteine pelletiert und die DNA befand sich im klarem Überstand. Nach der Zentrifugation wurden ca. 900 µL des Überstandes in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Um die DNA zu fällen, wurden 550 µL Isopropanol zu den Proben pipettiert und für weitere 30 Minuten zentrifugiert. Danach wurde das Isopropanol verworfen und die gefällte DNA mit 500 µl 70%-iges Ethanol für 10 Minuten bei 16,2 x g gewaschen. Anschließend wurde das Ethanol abpipettiert und die DNA vollständig getrocknet. Zum Schluss wurde die trockene DNA in 20-30 µL dH_2O für mind. 10 Minuten gelöst.

2.2.12 Plasmid-DNA-Midi-Präparation

Die Midi-Präparation der Plasmid-DNA erfolgte mit dem „NucleoBond® plasmid purification“ Kit der Firma „Macherey-Nagel“.

2.2.13 Sequenzierung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Proben bei der Firma Seqlab (Göttingen) nach Sanger sequenziert. Hierfür wurde die zu sequenzierende DNA (80 ng/µl) zusammen mit dem gewünschten Primer (30 pmol) in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß pipettiert und auf ein Gesamtvolumen von 15 µl mit

dH_2O aufgefüllt. Bei jeder Sequenzierung wurde das „Extended Hotshot“ Verfahren gewählt. Die Sequenzen wurden mit der Software SerialCloner2-5 analysiert. Die für die Sequenzierung verwendeten Primer sind in der Tabelle 4aufgelistet.

2.3 Zellkultur der S2-Zellen von *Drosophila*

2.3.1 Kultivierung der S2-Zellen

Die S2 (Schneiderszellen) von *Drosophila* sind semi-adhärent und brauchen kein CO_2 zum Wachsen. Die S2-Zellen wurden in einem 25°C Inkubator in 100 mm Zellkulturschalen gehalten. Eine Passagierung der Zellen erfolgte alle 2-3 Tage bei einer Konfluenz von 50-200%. Die Passagierung der Zellen wurde unter einer Sterilbank durchgeführt.

2.3.2 Passagieren der S2-Zellen

Reagenzien: Schneider´s Medium, von Pan Biotech
Serum, FBS Premium (Fetal Bovine Serum, South Africa origin)
Antibiotikum: Penicillin (10,000 Units/ml)/Streptomycin (10,000 µg/ml)

2.3.2a Ansetzen des Schneider´s Mediums

Zuerst wurde das Serum unter sterilen Bedingungen in je 50 ml-Falcons aliquotiert. Das Serum war hierbei bereits steril filtriert. Für die Experimente, bei denen eine Immunantwort oder Ähnliches analysiert werden, sollte das Medium hitzeinaktiviert werden. Für alle anderen Fragestellungen ist keine Hitzeinaktivierung notwendig. Im Zweifelsfall wurde in einem Vergleichsexperiment ermittelt, ob eine Hitzeinaktivierung des Serums notwendig ist. Das aliquotierte Serum kann über längere Zeiträume bei einer Temperatur von -20°C gelagert werden.
Um das S2-Medium anzusetzen, wurden 50 ml des Schneider´s-Mediums aus der Flasche abgenommen und 50 ml FBS dazu gegeben. Anschließend wurden 3 ml Pen/Stp-Antibiotikum hinzugefügt.

2.3.2b Passagieren der S2-Zellen

Materialien: 50 mL FalconTube; 15 ml Falcon Tube
100mm Zellkulturschalen (behandelt mit Poly-L-Lysine)
Serologische Pipetten je eine für 10 ml und 25 ml

Zuerst wurde das Schneider´s-Medium (mit FBS und Pen/Stp) auf 25°C erwärmt. Danach wurden 8 ml des Mediums in 100 mm Zellkulturschalen vorgelegt. Anschließend wurde das alte Medium mit den toten Zellen durch einfaches Umschütten in das 50 mL Falcon überführt. Darauf wurden 10 mL frisches S2-Medium auf die Zellen pipettieren. Die S2-Zellen sind semi-adhärent und konnten durch das Auf- und Ab- Pipettieren vom Boden der Schale abgelöst werden. Die Zellsuspension wurde vorsichtig in ein neues 15 mL Falcon überführt und vorsichtig mehrmals invertiert. Anschließend wurden 2 mL der Zellsuspension zu den vorbereiteten Zellkulturschalen langsam getröpfelt und die Schalen geschwenkt. Zum Schluss wurde die Zellkulturschale unter dem Mikroskop kontrolliert, um festzustellen ob genug Zellen überführt wurden. Die Inkubation der Zellen erfolgte bei 25°C.

2.3.3 Transfektion der S2-Zellen

Reagenzien: Kupfersulfat Stammlösung, 100 mM CuSO4 in dH_2O;
Transfektionsreagenz „TransIT-Insect Transfection Reagent“ der Firma Mirus
Schneider´s Mediums (ohne FCS)

Für die Expression der gewünschten Konstrukte wurden diese im pUAST-attB-Vektor mit dem pMT-GAL4-Plasmid ko-transfiziert. Bei dem pMT-Gal4-Plasmid ist die *gal4*-Sequenz hinter einem induzierbaren Metallothionein-Promoter nachgeschaltet, der nach der Zugabe von Kupfersulfat oder Cadmium Chlorid induziert werden kann. Somit wird durch die Zugabe von Kupfersulfat die Gal4-Expression eingeleitet.

Die Transfektion der Zellen erfolgte bei einer Konfluenz von ca. 50%, dabei wurde zunächst ein Transfektionsmix mit der Plasmid-DNA hergestellt. Nach der Transfektion wurden die Zellen für 48 Stunden (alternativ für 24 Stunden, abhängig vom Konstrukt) bei 25°C inkubiert. Nach 48 (24) Stunden erfolgte ein Medium-Wechsel und die Zugabe von Kupfersulfat (1:100), wodurch die Expression der UAS-Konstrukte gestartet wurde. Nach der Kupfersulfat-Zugabe wurden die Zellen entweder bei 18°C oder bei 25°C für weitere 24 Stunden inkubieren. Die Temperatur und Dauer der Expression waren abhängig von dem jeweiligen UAS-Konstrukt.

Herstellung eines Transfektionsmixes (Mengenangaben für ein Well einer 6 x Well-Platte):

Zuerst wurde das TransIT-Insect Transfection Reagent auf RT erwärmt (Dieser Schritt ist sehr wichtig!) und gut gevortext. In ein steriles Eppendorf Gefäß wurden 250 µl des Schneider´s Mediums (ohne FCS) vorgelegt und 2,5 µl der Plasmid-DNA (Konz. 1 µg/µl) hinzugefügt. Darauf wurden die Proben gut gemischt und 5µl des TransIT Reagents dazu pipettiert. Anschließend wurde der Transfektionsmix gut durchmischt und für 15-30 Minuten bei RT inkubiert und zum Schluss auf die Zellen pipettiert. Ein vorheriger Medium-Wechsel war nicht nötig.

2.3.4 Beschichtung der Deckgläschen mit Poly-L-Lysin (0,01%)

Reagenzien: 0,01%-Poly-L-Lysin-Lösung
Ethanol (absolut)
dH_2O

Für die Antikörperfärbungen wurden die S2-Zellen zuerst auf Deckgläschen überführt. Damit die Zellen adhärieren können, sollten die Deckgläschen mit Poly-L-Lysin beschichtet werden. Hierfür wurde eine 0,01%-Poly-L-Lysin-Lösung verwendet. Die Poly-L-Lysin- Lösung kann mehrmals verwendet werden.

Um die Deckgläschen zu beschichten, wurde in eine 6xWell-Platte in je ein Well die Poly-L-Lysin-Lösung, dH_2O und Ethanol (absolut) vorgelegt. Danach wurden die Deckgläschen ins erste Well (mit der Poly-Lysin-Lösung) gelegt und für mind. zehn Minuten bei RT geschüttelt. Danach wurde die Poly-L-Lysin-Lösung abpipettiert und recycelt. Währenddessen wurden alle Deckgläschen in das Well mit dH_2O überführt, kurz gewaschen und anschließend in das Well mit Ethanol gelegt und kurz durchgespült. Zum Schluss wurden die Deckgläschen einzeln aus dem Ethanol-Well entnommen und

abgeflammt, bis diese vollständig trocken waren. Alternativ können diese bei 37°C getrocknet werden. Die beschichteten Deckgläser wurden nach dem Trocknen in eine 12xWell-Platte, je ein Deckglas pro Well, überführt und für weitere Experimente verwendet.

2.3.5 Überführen der Zellen auf die beschichteten Deckgläser

Die Zellen wurden durch Auf-und Ab-pipettieren vom Boden der Platte gelöst. Anschließend wurden 250 µl der Zellsuspension vorsichtig auf die Deckgläschen pipettiert. Danach sollten die Zellen für mind. 30 Min stehen, damit sie absinken und adhärieren können. Die Zellen wurden im Anschluss je nach Experiment entsprechend behandelt.

2.3.6 Beschichtung der Deckgläschen mit Poly-L-Lysin mit anschließender UV-Bestrahlung

Reagenzien: 0,01%-Poly-L-Lysin-Lösung
steriles PBS

Für den Antikörper-Uptake-Assay wurden die Zellen direkt auf die beschichteten Deckgläser ausgesät. Dafür wurden die Deckgläschen unter sterilen Bedingungen mit Poly-L-Lysin beschichtet und anschließend mit UV-Licht bestrahlt. Hierfür wurden die Deckgläschen in die 12x- oder 24xWell Platte vorgelegt, je ein Deckglas pro Well. Die 0,01%-ige Poly-L-Lysin-Lösung wurde auf die Deckgläschen pipettiert, so dass diese vollständig bedeckt waren (ca. 500 µL pro Well). Danach wurden die Well-Platten für 15 Minuten bei RT geschüttelt, die Poly-L-Lysin-Lösung abgenommen und recycelt und die Deckgläser drei Mal mit sterilem PBS kurz gewaschen. Zum Schluss wurden die Platten unter UV-Licht für 10-15 Minuten mit offenem Deckel inkubiert und die Zellen ausgesät.

2.3.7 Antikörper Färbung an den S2-Zellen

Reagenzien:
1 x PBS (phosphate-buffered saline)
0,2% - Triton X-100 in PBS
0,3% - Tween20 in PBS
4% PFA (Paraformaldehyd):
Blockierlösung: 0,1% Tween-20; 10% NGS; 0,3 M Glycine in PBS
Färbelösung: 0,1%Tween-20; 1,5%-NGS in PBS
DAPI (von Serva) Stammlösung: 100µg/ml in 0,18M Tris, pH7.4
Vectashield (Einbettungsmedium) von Vector Laboratories

Verwendete Antikörper	Herkunft	Verdünnung	Firma
Ser-ECD	Ratte	1:1500	K.Irvine
Rab7	Maus	1:100	DSHB
V5	Kaninchen	1:500	Sigma-Aldrich
Alexa 488	Ziege	1:500	Invitrogen
Alexa 568	Ziege	1:500	Invitrogen
Alexa 647	Ziege	1:500	Invitrogen

Für die Antikörperfärbung wurden die Zellen zuerst mit kaltem PBS gewaschen. Anschließend wurden diese für 30 Minuten bei RT mit PFA fixiert. Nach der Fixierung folgten drei Waschschritte für je 5 Minuten mit PBS. Anschließend erfolgte die Permeabilisierung der Zellmembran. Hierfür wurden die Zellen in 0,2% Triton X-100 in PBS für 15 Minuten oder in 0,3% -Tween 20 in PBS für 10 Minuten bei RT inkubiert. Nach der Permeabilisierung folgte der Blockierschritt, bei dem die Zellen für mind. 30 Minuten (optional ü. N.) bei 4°C in der Blockierlösung inkubiert wurden. Danach wurden die Zellen mit dem ersten Antikörper, der in der Färbelösung verdünnt wurde, bei 4°C über Nacht inkubiert. Nach der Inkubation mit dem ersten Antikörper wurden die Proben zweimal für je 5 Minuten mit PBS gewaschen. Anschließend folgte die Inkubation mit dem zweiten Antikörper für eine Stunde bei RT. Die sekundären Antikörper wurden vorher mit der Färbelösung verdünnt. Darauf wurden die Zellen für 5 Minuten mit PBS gewaschen und 10 Minuten mit DAPI (verdünnt in PBS) die Zellkerne gefärbt. Nach der DAPI-Färbung wurden die Proben zweimal für je 5 Minuten mit PBS gewaschen. Danach erfolgte die Einbettung mit Vectashield.

2.3.8 Antikörper-„Uptake“-Assay

Die Well-Platte mit den Zellen wurde auf Eis oder auf 4° C gestellt und die Zellen mit 1 ml eiskalten Schneider´s Medium einmal gewaschen. Parallel wurde der erste Antikörper im eiskalten Schneider´s Medium verdünnt. Danach wurde das Medium von den Zellen vorsichtig entfernt und 250 µl des ersten Antikörpers direkt auf das Deckglas vorsichtig pipettiert. Die Proben wurden für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließen wurde der erste Antikörper entfernt und die Zellen einmal mit 1 ml eiskaltem Schneiders Medium vorsichtig gewaschen. Nach dem Waschschritt wurde 1 ml vom warmen (25°C) Schneiders Medium auf die Zellen gegeben und für unterschiedliche Zeitintervalle bei 25°C inkubiert. Nach der Inkubation bei 25°C wurden die Zellen mit kaltem PBS schnell gewaschen und in 1 ml PFA für 30 Minuten bei RT fixiert. Nach der Fixierung folgte eine normale Antikörper-Färbung (2.3.7).

2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.4.1 Extraktion von Proteinen aus *Drosophila* L3-Larven

Reagenzien und Materialien:

Lysispuffer: 10% Glycerol, 50 mM HEPES (pH 7,5), 150 mM NaCl, 0,5% Triton X-100, 1,5 mM $MgCl_2$

1 x PBS (phosphate-buffered saline)

Protease Inhibitor Cocktails (PIC) von Sigma-Aldrich

Galsperlen und Handmörser

Alle Schritte der Proteinextraktion erfolgten auf Eis oder auf 4°C. Zuerst wurden Glasperlen mit Lysispuffer (200 µl Lysispuffer + 1:100 PIC) in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß vorgelegt. Die L3-Larven wurden präpariert, dabei sollte das Fett- und Darmgewebe gründlich entfernt werden. Die präparierten Larven wurden in das Reaktionsgefäß mit den Glasperlen überführt. Dabei wurde darauf geachtet, dass kein (oder nur ganz wenig) PBS ins Gefäß gelangt. Wenn alle Larven überführt wurden, wurde die Masse mit dem Handmörser ca. eine Minute lang sehr gut

homogenisiert. Nach der Homogenisierung wurden die Proben in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Danach wurden die Proben langsam auf Eis aufgetaut. Als Nächstes wurden die Glasperlen und die Zellbestandteile bei 6000x g für 20 Sekunden pelletiert. Der Überstand wurde vorsichtig mit einer 10-µl-Pipettenspitze abgenommen und in ein neues Eppendorf Gefäß überführt. Die überführte Probe wurde mit Lysispuffer vermischt mit PIC auf 500 µl aufgefüllt. Anschließend sollten die Proteinlysate dreimal für je 10 Minuten bei max. Geschwindigkeiten zentrifugiert werden. Nach jedem Zentrifugationsschritt wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Hierbei war wichtig darauf zu achten, dass die obere Fettschicht nicht miteingezogen wird. Nach dem dritten Zentrifugationsschritt konnten die Proteinlysate für weitere Experimente verwendet oder im Kühlschrank gelagert werden.

2.4.1 Herstellung der Proteinlysate aus den S2-Zellen für die Co-IP

Reagenzien:
Lysisbuffer nach [98]: 50 mM Tris-HCl, pH 7,4; 150 mM NaCl; 1% NP-40; 0,25% Sodium Deoxycholate
PBS
Protease Inhibitor Cocktails (PIC) von Sigma-Aldrich

Für die Co-IP wurden die S2-Zellen in 6 x Well-Platten ausgesät und mit Mirus TransIT-Reagenz transfiziert. Hierbei wurden folgende Bedingungen genommen: die Zellen wurden 24 Stunden nach dem Aussäen transfiziert. Es wurden je 1,5 µg-2,5 µg DNA pro Plasmid transfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion erfolgte ein Medium-Wechsel und Kupfersulfat-Zugabe. Anschließend wurde die Isolierung der Proteine durchgeführt.
Alle Schritte der Protein-Isolierung erfolgten auf Eis und mit eiskalten Lösungen. Die Zellen wurden einmal mit eiskaltem PBS gewaschen. Danach wurden 150 µl des Lysispuffers mit frisch zugefügtem PIC auf die Zellen pipettiert. Die 6 x Well-Platte wurde darauf 15 Min. bei 4°C inkubiert, dabei gelegentlich geschwenkt. Bei diesem Inkubationsschritt wurden die Zellen lysiert. Darauf wurden die Zelllysate in beschriftete 1,5-ml Reaktionsgefäße überführt. Es erfolgte eine Zentrifugation bei max. Geschwindigkeit (16000 x g) bei 4°C für 10 Min, um die Zellbestandteile abzuzentrifugieren. Während des Zentrifugation-Schrittes wurden neue Reaktionsgefäße beschriftet, hierbei wurde je ein Gefäß für den Input und für die IP vorbereitet. Nach dem Zentrifugieren wurden die Proteinlysate in die entsprechenden Gefäße überführt. Die Proteinlysate können temporär im Kühlschrank (bei 4°C) gelagert werden.

2.4.2 Co-Immunopräzipitation via HA-gekoppelter Agarose

Reagenzien:

Lysisbuffer nach G.Palardy and A.Chitnis, 2015: 50 mM Tris-HCl, pH 7,4; 150 mM NaCl; 1% NP-40; 0,25% Sodium Deoxycholate
PBS
Pierce Anti-HA Agarose von ThermoScientific #26181
Protease Inhibitor Cocktails (PIC) von Sigma-Aldrich

Co-Immunopräzipitation (Co-IP) ist eine molekularbiologische Methode, um Protein-Protein-Interaktionen *in vitro* nachzuweisen. Hierbei wird ein bestimmtes Protein mitsamt Interaktionspartner aus einem Proteingemisch isoliert. Diese können anschließend im Western Blot detektiert werden (Abbildung 16).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Co-IP durchgeführt, um die Bindung zwischen *Drosophila* Mib1 und der K-freien ICD von SerK2R-HA nachzuweisen. Die HA-gekoppelte Agarose ist schon mit dem anti HA-Antikörper konjugiert, so dass ein HA markiertes Protein direkt über die HA-gekoppelte Agarose isoliert werden kann. Die HA-gekoppelte Agarose sollte bei 4°C in senkrechter Position gelagert werden. Sie darf nicht eingefroren und nicht gevortext werden.

Für die Co-IP von UAS-SerK2R-HA mit UAS-HisMyc-Dmib1DeltaR wurden folgende Bedingungen genommen: 24-48 Stunden nach dem Aussäen wurden die Zellen mithilfe von Mirus TransIT mit 1,5 µg-2,5 µg DNA pro Plasmid transfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion erfolgte ein Medium-Wechsel mit anschließender Kupfersulfat-Zugabe. Durch die Zugabe von Kupfersulfat wurde die Expression der Konstrukte gestartet, die UAS-Konstrukte wurden dann für weitere 24 Stunden bei 25°C exprimiert.

Für die Co-IP wurden zuerst die Proteinlysate vorbereitet und auf Eis gelagert. Parallel wurde die HA-gekoppelte Agarose vorbereitet. Der Hersteller empfiehlt ein Volumen zwischen 20-100 µl pro Probe einzusetzen, die genaue Menge sollte in einem Testversuch ermittelt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden 20-30 µl pro Probe eingesetzt. Um die HA-gekoppelte Agarose genauer pipettieren zu können, wurde die Spitze der Pipetten abgeschnitten. Als erstes wurde die HA-gekoppelte Agarose durch Auf- und Ab-pipettieren gut gemischt (nicht (!) vortexen). Darauf wurde die gewünschte Menge der HA-gekoppelten Agarose in die Reaktionsgefäße überführt und für 10-20 Sekunden bei 12000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig entfernt, ohne dass die HA-gekoppelte Agarose mit aufgesaugt wurde. Danach wurde der Lysispuffer (Volumen 1:1; ohne PIC) auf die HA-gekoppelte Agarose pipettiert und mehrmals invertiert. Anschließend wurde die HA-gekoppelte Agarose für 10-15 Sekunden bei 12000 x g pelletiert und der Lysispuffer vollständig entfernt. Auf die auf diese Weise vorbereitete HA-gekoppelte Agarose wurden die Proteinlysate geben, die Reaktionsgefäße mit Parafilm umwickelt und bei 4°C mind. 1 Stunde (optional ü. Nacht) über Kopf rotiert. Nach dem Rotieren wurden die Proben bei 12000 x g für 10 Sekunden abzentrifugiert und der Überstand für die Analyse der Bindungseffizienz in neue Gefäße überführt (optional). Daraufhin erfolgten drei Waschschritte bei 4°C im Lysispuffer mit frisch zugefügtem PIC. Hierfür wurden 300 µl des Lysispuffers auf die HA-gekoppelte Agarose gegeben und mehrmals invertiert. Die Proben wurden bei 12000 x g für 10 Sekunden pelletiert und der Überstand verworfen. Dabei wurde darauf geachtet, dass die HA-gekoppelte Agarose nicht aufgesaugt wird. Zum Schluss wurde der Überstand möglichst komplett (z. B mit einer Insulinspritze) abgenommen und mit ca. 30 µl des 4 x Lämmli Puffers vermischt und für 10 Minuten bei 70°C-95°C aufgekocht. Die Proben wurden bei -70°C eingefroren.

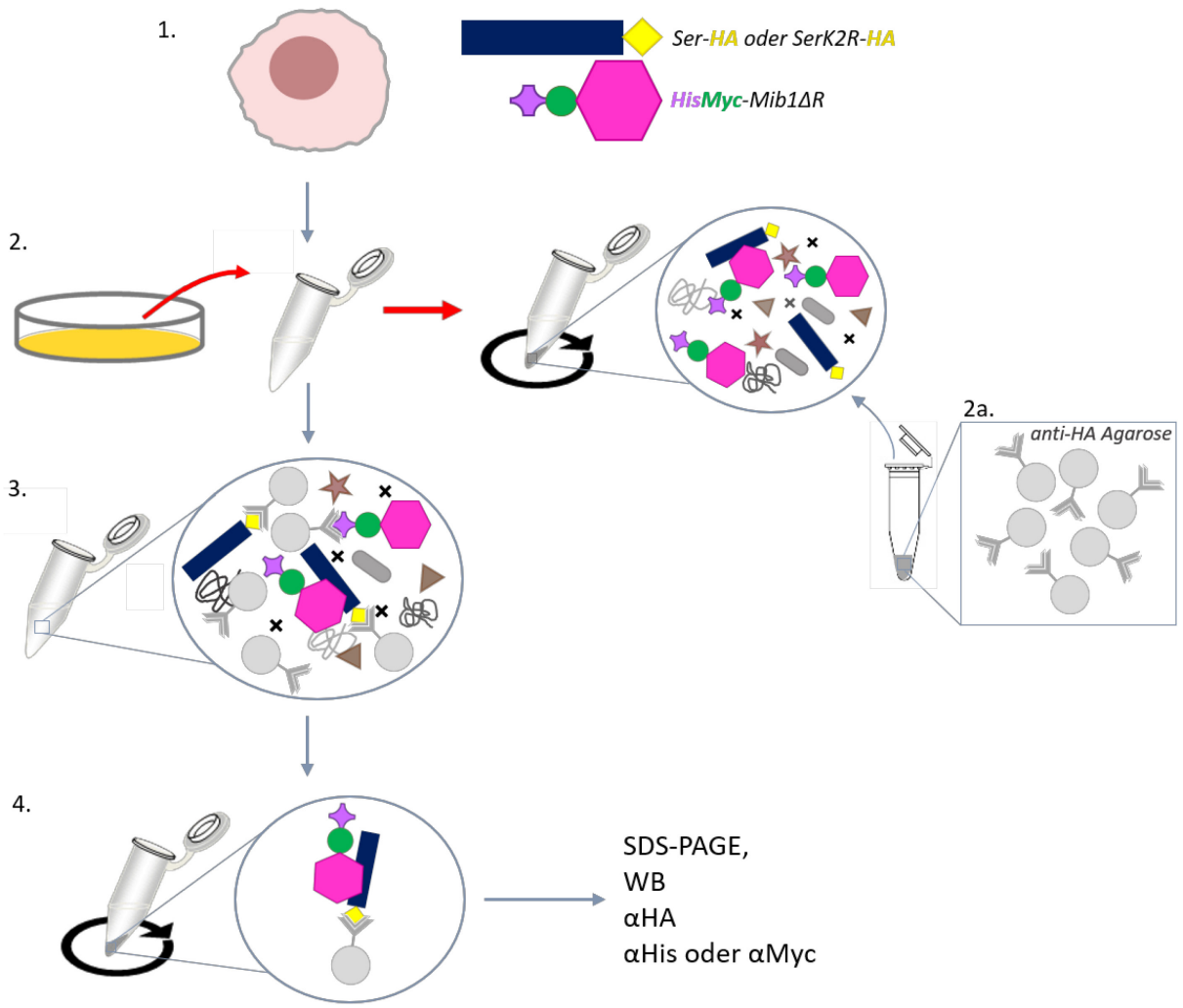


Abbildung 16: Strategie der Co-Immunopräzipitation von SerK2R-HA mit HisMyc-Mib1ΔR. Die Konstrukte UAS-Ser-HA, UAS-SerK2R-HA und UAS-HisMyc-Mib1ΔR wurden mit dem pMT-Gal4 für 24 Stunden bei 25°C in den S2-Zellen exprimiert (1). Danach erfolgte die Zelllyse mit anschließender Zentrifugation, um Proteinlysate herzustellen (2). Parallel dazu wurde die anti-HA-gekoppelte Agarose vorbereitet (2a) und anschließend mit den Proteinlysaten vermischt und für zwei Stunden inkubiert (3). Dann wurden die Proben gewaschen (4) und eine SDS-PAGE sowie ein Western blot (WB) durchgeführt. Um die Liganden zu detektieren, wurde eine Antikörperfärbung gegen HA durchgeführt. Für die Detektion von Mib1 als möglicher Bindungspartner wurde entweder anti-His oder anti-Myc gefärbt.

2.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot

Reagenzien:

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 Trenngelpuffer:	1,5 M Tris-HCl 10% SDS →pH 8,8

4x Sammelgelpuffer:	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

2.4.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese zur Auftrennung von Proteinen

Die mit dem 4 x Lämmli – Puffer aufgekochten Proben wurden für ca. 10 Minuten bei 10000 x g und RT abzentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurden die Proteine aufs Gel aufgetragen. Für die Größenbestimmung der gewünschten Proteine wurde 5 µl des Längenstandards ebenfalls aufs Gel aufgetragen. Die Proben wurden zuerst bei 60 Volt konstanter Spannung im Sammelgel laufen gelassen. Dabei wurden alle Proteine auf eine Laufhöhe gebracht, bevor sie im Trenngel nach der Größe aufgetrennt wurden. Als die Proteine das Trenngel erreichten, wurde die Spannung auf 120 Volt hochgestellt. Für die Detektion von Ser und Mib1 wurden die Proteine solange aufgetrennt bis die 55 kDa große Bande in der Lauffront aus dem Gel auslief. Anschließend wurden die Proteine auf die Membran transferiert.

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_2O	4,68 ml	1,688 ml
10% APS	134 µl	60 µl
TEMED	10µl	3µl

2.4.5 Western Blot mittels Semy-Dry-Blotverfahren

Zuerst wurde die PVDF Membran im Methanol für ca. 10-15 Minuten equilibriert. In dieser Zeit wurden acht watmann Papiere pro Membran im Transferpuffer getränkt. Nach dem Equilibrieren der Membran wurde diese mit VE-Wasser kurz abgespült, in den Transferpuffer zu den watmann Papieren dazu gelegt und mit Transfepuffer benetzt. Danach wurde das SDS-Gel aus der Gelkammer vorsichtig herausgenommen und ebenfalls mit dem Transferpuffer gut durchgespült. Anschließend wurden vier im Puffer durchtränkte watmann Papiere auf die Anodenplatte platziert, darauf wurde vorsichtig die Membran positioniert und glattgestrichen. Auf die Membran wurde das SDS-Gel gelegt und möglichst alle Luftblasen zwischen der Membran und dem Gel entfernt. Es wurden weitere vier im Puffer durchtränkte watmann papiere auf das Gel positioniert und die restlichen Luftblasen entfernt. Dabei wurde darauf geachtet, dass weder die Membran noch das Gel sich verschieben. Die Apparatur wurde mit dem Kathodendeckel geschlossen. Der Transfer wurde für 30 Minuten bei einer konstanten Stromstärke von 1,0 Ampere und bei einer Spannung von 25 Volt durchgeführt.

2.4.1 Immunhistochemische Färbung von Western Blots.

Reagenzien:

WB Blockierlösung:	5% Milchpulver in 1x PBS
WB Färbelösung:	2% Milchpulver in 1x PBS
Waschpuffer 0,1%-PBT	0,1% Tween20 in PBS

Tabelle 8: Auflistung der verwendeten Antikörper mit den Angaben zur Herkunft und Verdünnung, die im Rahmen dieser Arbeit für den Western Blot verwendet wurden.

Bezeichnung	Hergestellt im Tier	Verdünnung	Firma
primäre Antikörper			
anti-HA	Ratte	1:2500	Roche (3F10)
anti-penta-His	Maus	1:3000	Qiagen
anti-Myc	Maus	1:2000	DSHB
sekundäre Antikörper			
anti-Ratte-HRP	Ziege	1:5000	Dianova
Anti-Maus-HRP	Ziege	1:5000	Dianova

Nach dem Protein-Transfer wurde die Membran für mindestens eine Stunde in einer 5%-igen Milchpulverlösung bei RT inkubiert. Nach diesem Blockierschritt wurden die ersten Antikörper in einer 2%-igen Milchpulverlösung verdünnt, auf die Membran pipettieren und über Nacht bei 4°C rotiert. Anschließend wurde die Membran dreimal für je 20 Minuten bei RT mit 0,1%-PBT unter Rotieren gewaschen. Danach wurde der sekundäre Antikörper in einer 2% Milchpulverlösung verdünnt, auf die Membran pipettiert und für eine Stunde bei RT inkubiert. Daraufhin wurde die Membran dreimal für je 20 Minuten bei RT mit 0,1%-PBT gewaschen. Es erfolgte die Detektion der Proteine oder die Membran wurde optional in PBS bei 4°C gelagert.

2.4.1 „Strippen“ der PVDF Membran

Lösung zum „Strippen“ der Membran (wiederverwendbar): 100mM NaOH; 2% SDS; 0,5% DTT

Die Membran wurde in ein Glasgefäß gelegt und mit der „Stripping“-Lösung beschichtet und das Glasgefäß mit dem Parafilm abgedichtet. Danach wurde die Membran 1,5 Stunden bei 55°C (optional für eine Stunde bei 65°C) inkubiert. Anschließend wurde die „Stripping“-Lösung recycelt und die Membran mit PBS kurz gewaschen. Zum Schluss wurde die Membran in einer 5%-igen Milchpulver-Lösung für mind. eine Stunde inkubiert und gefärbt.

2.5 Geräte und Software

Geldokumentation	QUANTUM-System von peqlab
Konzentrations-bestimmung	NanoDrop™ 2000c; Spectralphotometer von peqlab
Gel/Western Blot Dokumentationskammer	LAS-4000 von Fujifilm
Gelelektrophorese/ Western Blot Systeme	SDS-Gele: Mini-PROTEAN Tetra Vertical Electrophoesis Cell von Bio Rad WB: Western Blot: Trans-Blot Turbo von Bio Rad
Mikroskopie	Axio Imager Z1 mit Apotome und AxioCam MR3 von Carl Zeiss AG

Thermocycler	Professional Thermo Cycler Gradient von Biometra
Zentrifugen:	Ultrazentrifuge Avanti J-26 XP von Beckman Coulter Tischzentrifuge von Heraeus Biofuge pico Tischzentrifuge von Heraeus Fresco 21
Software und Internetdatenbanken	Windows 10 Home von Microsoft Office Professional Plus 2016 von Microsoft Axio Vision Rel. 4.8 und Rel.4.9 von Carl Zeiss AG Photoshop CS6 von Adobe CLC Sequence Viewer 8 von Qiagen Bioinformatics Serial Cloner 2.6.1 von SerialBasics SnapGene® Viewer 5.0.2 von SnapGene® EndNote™ X8.2 von Thomson Reuters NCBI http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ FlyBase https://flybase.org

3 Ergebnisse

In den Flügelimaginalscheiben von *Drosophila* führt ein Ausfall der E3-Ligase Dmib1 zu fehlender Aktivierung des Notch-Signalwegs und zu einer Akkumulation von Ser an der apikalen Membran infolge einer gestörten Endozytose [41, 42]. Im Gegensatz zu Ser ist die Endozytose von Dl nicht gestört. Obwohl Dl noch endozytiert wird, ist die Aktivität des Liganden deutlich reduziert. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass neben der Endozytose die Ubiquitinierung des Liganden wichtig ist [43]. Untersuchungen der Liganden mit K-freien ICDs zeigten, dass die intrazellulären Ks für die Aktivität der Liganden essentiell sind. So wird ein Säuger Dll1K2R in der Zellkultur zwar noch endozytiert, kann jedoch den Notch-Signalweg nicht mehr aktivieren [36]. Ein DlK2R-Ligand in *Drosophila* zeigt in den Überexpressionsstudien eine reduzierte Aktivität und eine starke *cis*-inhibitorische Eigenschaft [28].

Im Gegensatz zu Dl und Dl-likes ist bisher über die Rolle der Ser-Ubiquitinierung und insbesondere über die Rolle einzelner Ks in der ICD wenig bekannt. In einer vorigen Publikation wurde gezeigt, dass eine konservierte Region in der ICD (sog. Ser-„int“) für die Endozytose und die Aktivität von Ser benötigt wird. Diese konservierte Region beinhaltet zwei Ks, deren Austausch gegen Alanine zu einem inaktiven Liganden führt [25]. Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Arbeit die Rolle der Ubiquitinierung und insbesondere der Ks für die Ser-vermittelte Aktivierung des Notch-Signalwegs analysiert.

3.1 Testsystem für die Aktivierung des Notch-Signalwegs

Die hergestellten transgenen Ser-Liganden (siehe 2.2.1) wurde mithilfe des GAL4/UAS-(GAL80) -Systems in der Flügelimaginalscheibe des dritten Larvenstadiums von *Drosophila* exprimiert. Die Expression erfolgte hauptsächlich unter der Kontrolle des *patched*-Promoters (*ptc*GAL4). Patched wird in einem Streifen entlang der anterior-posterioren (a/p)-Grenze in einem nach posterior aufsteigenden Gradienten exprimiert (Abbildung 17, A, A´). Dadurch wird an der a/p-Grenze ein scharfer Übergang zwischen exprimierenden Zellen und nicht exprimierenden Zellen erzeugt (Abbildung 17, A´). Diese Situation ähnelt der wildtypischen Situation an der (d/v) -Grenze der Flügelimaginalscheibe. Hierbei erfolgt die Aktivierung des Notch-Signalwegs entlang zweier klar abgegrenzter Liganden-exprimierenden und Liganden-freien Zellreihen (Abbildung 6). Ein weiterer Vorteil des *ptc*-Treibers besteht darin, dass die *ptc*-Expressionsdomäne senkrecht zu der d/v-Grenze verläuft (Abbildung 17, A´). Dadurch ist es möglich, die Auswirkungen der ektopischen Expression auf die endogene Aktivität des Notch-Signalwegs, wie z.B. *Cis*-Inhibition, zu untersuchen.

Zum Nachweis der Aktivität des Notch-Signalwegs werden die Expressionen des direkten Zielgens *wg* und des Reportergenkonstruktes Gbe+Su(H)-*lacZ* untersucht. In der wildtypischen Flügelimaginalscheibe wird *wg* in Abhängigkeit von Notch innerhalb der Flügeltasche entlang der d/v-Grenze in einem zwei Zellreihen breiten Muster exprimiert (Abbildung 17, B). Gbe+Su(H)

wird in einem schmalen Streifen entlang der d/v-Grenze und in streifenartigen Domänen im Notum exprimiert (Abbildung 17, C).

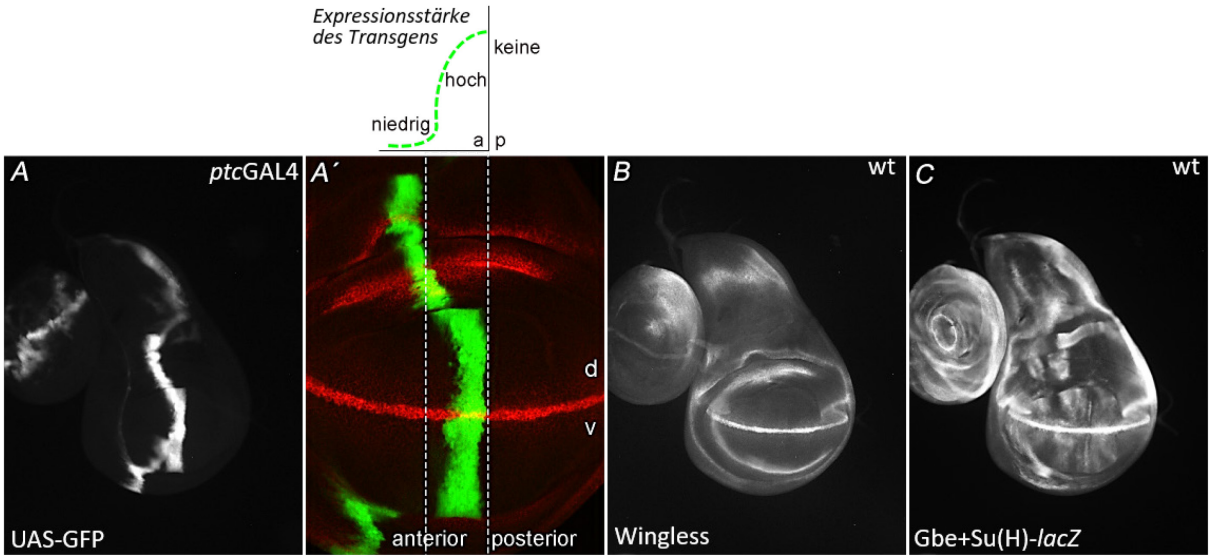


Abbildung 17: Übersicht über die Expressionsmuster des verwendeten Treibers und der Aktivitätsmarker des Notch-Signalwegs. Die UAS-Transgene wurden unter der Kontrolle des *patched* - Promoters in den Flügelimaginalscheiben des dritten Larvenstadiums exprimiert. *Patched* wird in einem Streifen entlang der a/p-Grenze mit zunehmender Stärke von anterior nach posterior exprimiert (A). Dadurch zeigen die Zellen am posterioren Ende der *ptc*-Domäne die höchste Expressionsrate, während die an die *ptc*-Domäne angrenzenden Zellen keine Transgen-Expression aufweisen (A´). So entsteht eine scharfe Grenze zwischen den Transgen exprimierenden und nicht exprimierenden Zellen (A´). Als Aktivitätsmarker des Notch-Signalwegs werden die Expressionen des Notch-Zielgens *wingless* (B) und des Reportergenkonstruktes Gbe+Su(H)-*lacZ* verwendet (C). Die Flügelimaginalscheiben sind in A, B, C 100-fach und in A´ 250-fach vergrößert dargestellt.

3.2 Analyse der K-freien ICD von Ser

Um die Rolle der Ubiquitinierung und der Ks für die Ser-vermittelte Aktivierung des Notch-Signalwegs zu analysieren, wurde ein SerK2R-Ligand hergestellt. Bei diesem Liganden wurden alle zehn Ks in der ICD gegen strukturell ähnliche Arginine (R) ausgetauscht (Hergestellt von S. Kim, AG Klein). Da R dem K strukturell ähnelt, sollte dieser Austausch keine größeren strukturellen Veränderungen der ICD hervorrufen. Als Kontrollen dienen das wildtypische Ser-HA und SerΔICD-HA. Bei der Variante SerΔICD-HA wurde die komplette ICD deletiert. Daher sollte dieser Ligand völlig funktionslos und zu keiner Aktivierung des Notch-Signalwegs fähig sein. Alle hergestellten Liganden sind UAS-Konstrukte (Abbildung 18). Sie sind mit einem C-terminalen HA-Tag markiert und in dieselbe Stelle ins Genom (*attP*-site 51C) von *Drosophila* inseriert. Die Insertion aller Konstrukte in die „landing site" sollte die Positionseffekte neutralisieren. Dadurch werden die Transgene auf ungefähr dem gleichen Level exprimiert und können direkt miteinander verglichen werden.

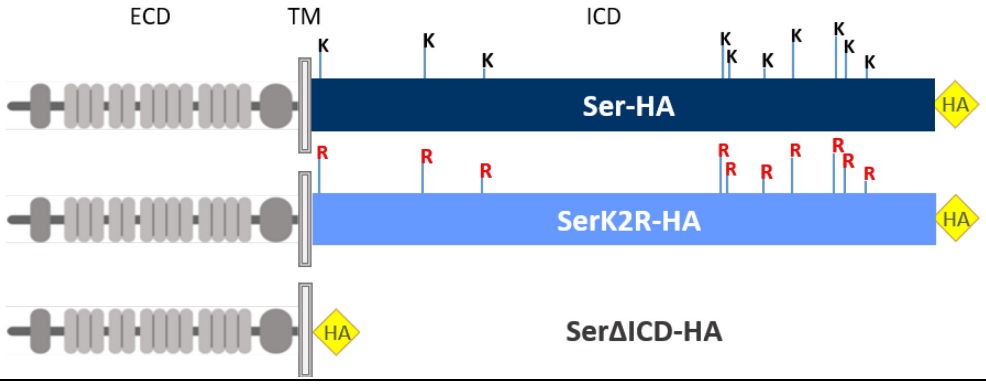


Abbildung 18: Schematische Darstellung der Ser-HA, SerK2R-HA und SerΔICD-HA-Konstrukte. Bei Ser-HA handelt es sich um ein wildtypisches Ser, während in der ICD von SerK2R-HA alle Ks gegen Rs ausgetauscht wurden. Bei dem Konstrukt SerΔICD-HA wurde die ICD vollständig deletiert. Alle transgenen Liganden tragen eine C-terminale HA-Markierung und wurden in die *attP*-site 51C inseriert. Diese Darstellung ist nicht maßstabgetreu, die ICDs sind deutlich größer dargestellt.

3.2.1 Ser mit einer K-freien ICD ist inaktiv und wirkt dominant negativ

Die transgenen Liganden Ser-HA, SerK2R-HA und SerΔICD-HA wurden zuerst mit *ptc*Gal4 (Abbildung 19, A) kontinuierlich exprimiert. Die alleinige Expression von Ser-HA resultiert in einer Überproliferation (Abbildung 19, C) und einer ektopischen Aktivierung des Notch-Signalwegs im ventralen Kompartiment der Flügelimaginalscheibe. Die ektopische Aktivierung erfolgt nur im ventralen Kompartiment, weil in den dorsalen Zellen die Glykosylierung des N-Rezeptors durch Fng die Aktivierung des Notch-Signalwegs durch Ser verhindert. Die ektopische Aktivierung des Notch-Signalwegs findet hierbei in den nicht exprimierenden Zellen statt, die an die *ptc*-Domäne angrenzen (Abbildung 19, C´-C´´´; gelbe Pfeile). In den überexprimierenden Zellen innerhalb der *ptc*-Domäne hingegen führt eine hohe Liganden-Konzentration zur *Cis*-Inhibition. Infolge der *Cis*-Inhibition werden sowohl die ektopische als auch die endogene Wg-Expression in diesen Zellen unterbunden (Abbildung 19, C´, C´´; rosafarbene Pfeile).

Erwartungsgemäß resultiert die Expression von SerΔICD-HA in keiner ektopischen Wg-Expression. Die Expression von SerΔICD-HA führt darüber hinaus zu einer Unterbrechung der endogenen Wg-Expression entlang der d/v-Grenze (Abbildung 19, G´´; grüner Pfeil). Im Gegensatz zum *cis*-inhibitorischen Effekt von Ser-HA ist diese Unterbrechung nicht zellautonom und geht über die *ptc*-Domäne hinaus. Somit fehlt die Wg-Expression auch in den Zellen, die kein SerΔICD-HA exprimieren. (Abbildung 19, G´-G´´´; weiße Klammer und grüne Pfeile). Diese Beobachtung deutet auf eine dominant negative Wirkung von SerΔICD-HA hin.

Die Expression von SerK2R-HA führt zu einem dramatischeren Phänotyp. Hierbei ist die Unterbrechung der endogenen Wg-Expression entlang der d/v-Grenze deutlich größer, als bei der SerΔICD-HA-Expression (Abbildung 19, E´-E´´´; weiße Klammer und grüne Pfeile). Außerdem resultiert die SerK2R-HA-Expression in einer Narbenbildung und veränderter Morphologie des gesamten Flügelfeldes (Abbildung 19, E; orangefarbener Pfeil). Dabei wird der äußere Ring der Notch-unabhängigen Wg-Expression zusammengeschnürt (Abbildung 19, E´´; orangefarbener Pfeilkopf). Diese Resultate zeigen, dass SerK2R-HA stark dominant negativ agiert.

Um die möglichen *cis*-inhibitorischen Eigenschaften von Ser-HA, SerΔICD-HA und SerK2R-HA zu unterdrücken, wurden diese Liganden mit UAS-N ko-exprimiert. Die alleinige Expression von UAS-N führt zu einer leichten ektopischen Aktivierung der Wg-Expression nach dorsal und ventral von der d/v-Grenze innerhalb der *ptc*-Domäne. Demzufolge induziert die Überexpression des Rezeptors eine leichte zellautonome Aktivierung des Notch-Signalwegs (Abbildung 19, B-B´´; hellblaue Pfeile).

Die Ko-Expression mit Ser-HA resultiert in einer starken zellautonomen ektopischen Aktivierung des Notch-Signalwegs, auch im dorsalen Kompartiment (Abbildung 19, D-D´´; hellblaue Pfeile).

Bei der Ko-Expression von UAS-N mit SerΔICD-HA wird die endogene Wg-Expression nicht unterbunden. Es kann eine leichte ektopische Aktivierung des Notch-Signalwegs dorsal und ventral von der d/v-Grenze detektiert werden. Diese ist zellautonom und vergleichbar mit der alleinigen Expression von UAS-N (Abbildung 19, H-H´´; hellblaue Pfeile).

Durch die Ko-Expression von SerK2R-HA mit UAS-N wird der dominant negative Effekt des Liganden unterdrückt, so dass keine Narbe mehr entsteht. Die endogene Wg-Expression bleibt weiterhin unterbrochen (Abbildung 19, F´, F´´; weiße eckige Klammer), allerdings in einer zellautonomen Weise (Abbildung 19, F und F´´; weiße Pfeile).

Zusammenfassend, kann Ser-HA den Notch-Signalweg effektiv *trans*-aktivieren und *cis*-inhibieren, während ein Ligand ohne ICD nicht funktional ist und leicht dominant negativ wirkt. SerK2R-HA ist ebenfalls nicht in der Lage den Notch-Signalweg zu aktivieren und zeigt einen deutlich stärkeren dominant negativen Effekt als SerΔICD-HA. Demnach ist ein Ser-Ligand ohne Ks in der ICD genauso inaktiv, wie ein Ser-Ligand ohne ICD.

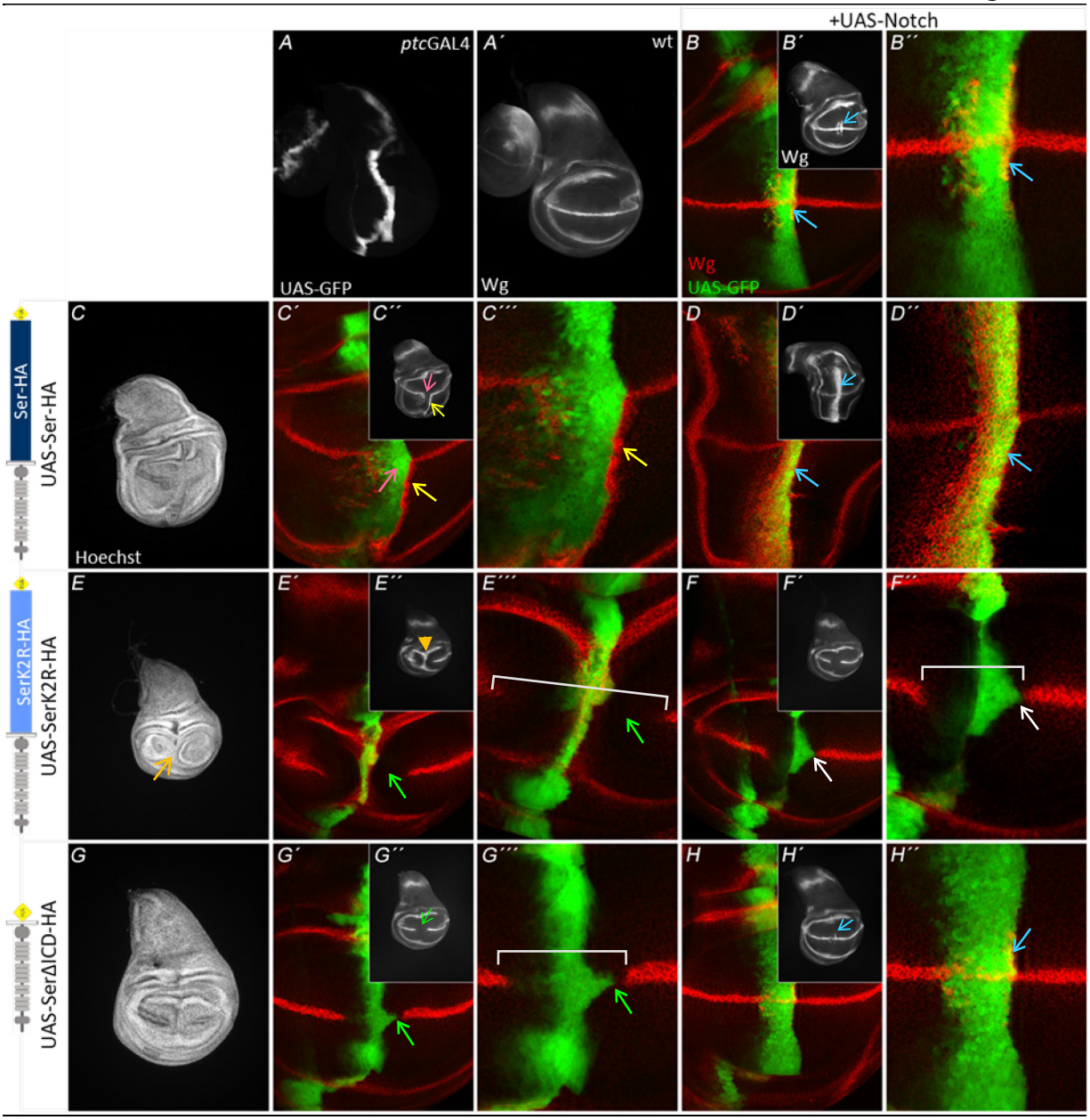


Abbildung 19: Übersicht der Expressionen von Ser-HA; SerK2R-HA und SerΔICD-HA sowie deren Ko-Expression mit UAS-Notch. Alle Transgene wurden mit dem *ptc*Gal4 exprimiert (A, visualisiert durch GFP) und die Wg-Expression analysiert (B). Die alleinige Expression von Ser-HA resultiert in der ventralen Überproliferation (C) und in der ektopischen Aktivierung des Notch-Signalwegs in den ventralen an die *ptc*-Domäne angrenzenden Zellen (C´-C´´´, gelbe Pfeile). Darüber hinaus wirkt Ser-HA *cis*-inhibitorisch, was zu einer zellautonomen Unterdrückung der endogenen Wg-Expression führt (C´; rosafarbene Pfeile). SerK2R-HA agiert in einer dominant negativen Weise und führt zu einer breiten nicht zellautonomen Unterbrechung der endogenen Wg-Expression (E´-E´´´; grüner Pfeil und weiße Klammer). Außerdem verursacht die SerK2R-HA-Expression eine Narbenbildung, was eine Deformation der Flügeltasche bewirkt (E; orangefarbener Pfeil). Die alleinige Expression von SerΔICD-HA resultiert ebenfalls in einer nicht zellautonomen Unterbrechung der endogenen Wg-Expression (G-G´´´; grüne Pfeile und weiße Klammer). Die alleinige Expression des N-Rezeptors mit *ptc*GAL4 führt zu einer leichten ektopischen Wg-Expression innerhalb der *ptc*-Domäne nach dorsal und ventral (B-B´´; hellblauer Pfeil). Die Ko-Expression von Ser-HA mit UAS-N unterdrückt die Ser-HA-vermittelte *Cis*-Inhibition und induziert eine starke ektopische Wg-Expression, auch im dorsalen Kompartiment, in einer zellautonomen Weise (D, D´´; hellblaue Pfeile). Durch die Ko-Expression von SerK2R-HA mit UAS-N wird die starke dominant negative Wirkung des Liganden unterdrückt. Es kommt zu einer zellautonomen Unterbrechung der endogenen Wg-Expression (F-F´´; weiße Pfeile und weiße Klammer). Bei der Ko-Expression von SerΔICD-HA mit UAS-N wird eine leichte zellautonome ektopische Aktivierung an der d/v-Grenze detektiert (H-H´´; hellblaue Pfeile).
Die Flügelimaginalscheiben sind in A, A´, B´-H´ bei 100-facher in B-H bei 250-facher Vergrößerung dargestellt. In den Bildern B´´-H´´ sind Ausschnitte aus B-H gezeigt.

Wie oben beschrieben, verursacht die kontinuierliche Expression der Konstrukte SerK2R-HA und SerΔICD-HA mit *ptc*GAL4 eine Narbenbildung (Abbildung 19; E, G) und verändert dadurch stark die Morphologie des gesamten Flügelfeldes. Dies erschwert eine genaue Analyse der Auswirkung der Expression dieser Konstrukte auf die Aktivierung des Notch-Signalwegs. Um einer Narbenbildung und Veränderung der Gesamtmorphologie der Scheibe vorzubeugen, werden die Konstrukte mit *engrailed*GAL4 zusammen mit einer temperatursensitiven Variante von GAL80 ($GAL80^{ts}$) exprimiert. GAL80 reprimiert im aktiven Zustand die GAL4-vermittelte Expression der Transgene. Die temperatursensitive Variante von GAL80 ist bei 18°C aktiv und bei 29°C inaktiv. Wird die Haltungstemperatur der Tiere auf 29°C erhöht, wird die GAL4-Repression durch GAL80 aufgehoben und die Transgen-Expression gestartet (Abbildung 8). Auf diese Weise wird die Expression der Transgene zeitlich kontrolliert. Die Ergebnisse der temporären Expression von SerK2R-HA und SerΔICD-HA bestätigen die oben beschriebenen Ergebnisse von den kontinuierlichen Expressionen (Zusammenfassung in der Abbildung 50).

3.2.2 Der Verlust der Ks in der ICD führt zur Störung der Endozytose und der Degradation von Ser

Die oben beschriebenen Ergebnisse demonstrieren, dass SerK2R-HA nicht in der Lage ist den Notch-Signalweg ektopisch zu aktivieren. Darüber hinaus reprimiert die Expression von SerK2R-HA die endogene Notch-Aktivität. Da die Ubiquitinierung als ein Signal für die Endozytose dient und die intrazellulären Ks für die Ubiquitinierung notwendig sind, stellt sich die Frage, ob SerK2R-HA endozytiert werden kann. Hierfür wurde die subzelluläre Lokalisation von Ser-HA, SerK2R-HA und SerΔICD-HA mithilfe einer Antikörperfärbung gegen HA in Flügelimaginalscheiben analysiert. Parallel dazu wurde ein Antikörper-„Uptake"-Assay in S2-Zellen (Abbildung 21) durchgeführt. In beiden Fällen diente eine Rab7-Antikörperfärbung dazu, die reifenden Endosomen zu markieren. In den Flügelimaginalscheiben diente außerdem Neurexin-4 (NRX-IV::GFP) als Zellpolaritätsmarker, der in den septate Junctions lokalisiert und die basolaterale Domäne markiert (Abbildung 20, E).

In den Flügelimaginalscheiben lokalisiert Ser-HA sowohl an der apikalen Membran (Abbildung 20, A´, blaue Pfeilköpfe) als auch auf Rab7-positiven Endosomen, was auf eine Endozytose von Ser-HA hindeutet (Abbildung 20, A, A´ und B-B´´, gelbe Pfeilköpfe). Im Gegensatz zu Ser-HA akkumuliert SerK2R-HA apikal von NRX-IV::GFP (Abbildung 20, C, C´, blaue Pfeilköpfe). Zusätzlich zu der apikalen SerK2R-HA-Lokalisation wird eine kleinere Fraktion an der basalen Membran beobachtet (Abbildung 20, C´, blaue Pfeilköpfe), HA-positive Vesikel sind hingegen nicht zu sehen (Abbildung 20, C, C´ und D, D´). All dies spricht dafür, dass SerK2R-HA nicht endozytiert werden kann. Andererseits wäre es möglich, dass SerK2R-HA weniger oder langsamer endozytiert wird. So könnte das Verhältnis zwischen dem membranassoziierten und dem vesikulären HA-Signal zu groß sein, um das vesikuläre HA-Signal detektieren zu können. Um diese Möglichkeit zu

überprüfen, werden Ser-HA und SerK2R-HA in einem *trpml*-mutanten Hintergrund exprimiert. Trpml (transient receptor potential-mucolipin) wird für die Fusion des späten Endosoms mit dem Lysosom benötigt [99]. Beim Verlust der *trpml*-Funktion wird diese Fusion unterdrückt und es kommt zu keinem lysosomalen Abbau der Liganden. Werden die Liganden endozytiert, so sollten sie in späten Endosomen detektierbar sein. Bei der Ser-HA-Expression im *trpml*-mutanten Hintergrund können vergrößerte HA- und NECD-positive Vesikel detektiert werden (Abbildung 51, A, A´, B, B´, gelbe Pfeilköpfe). SerK2R-HA dagegen lokalisiert ausschließlich an der Zellmembran (Abbildung 51, C, C´, D, D´) und wird somit nicht endozytiert.

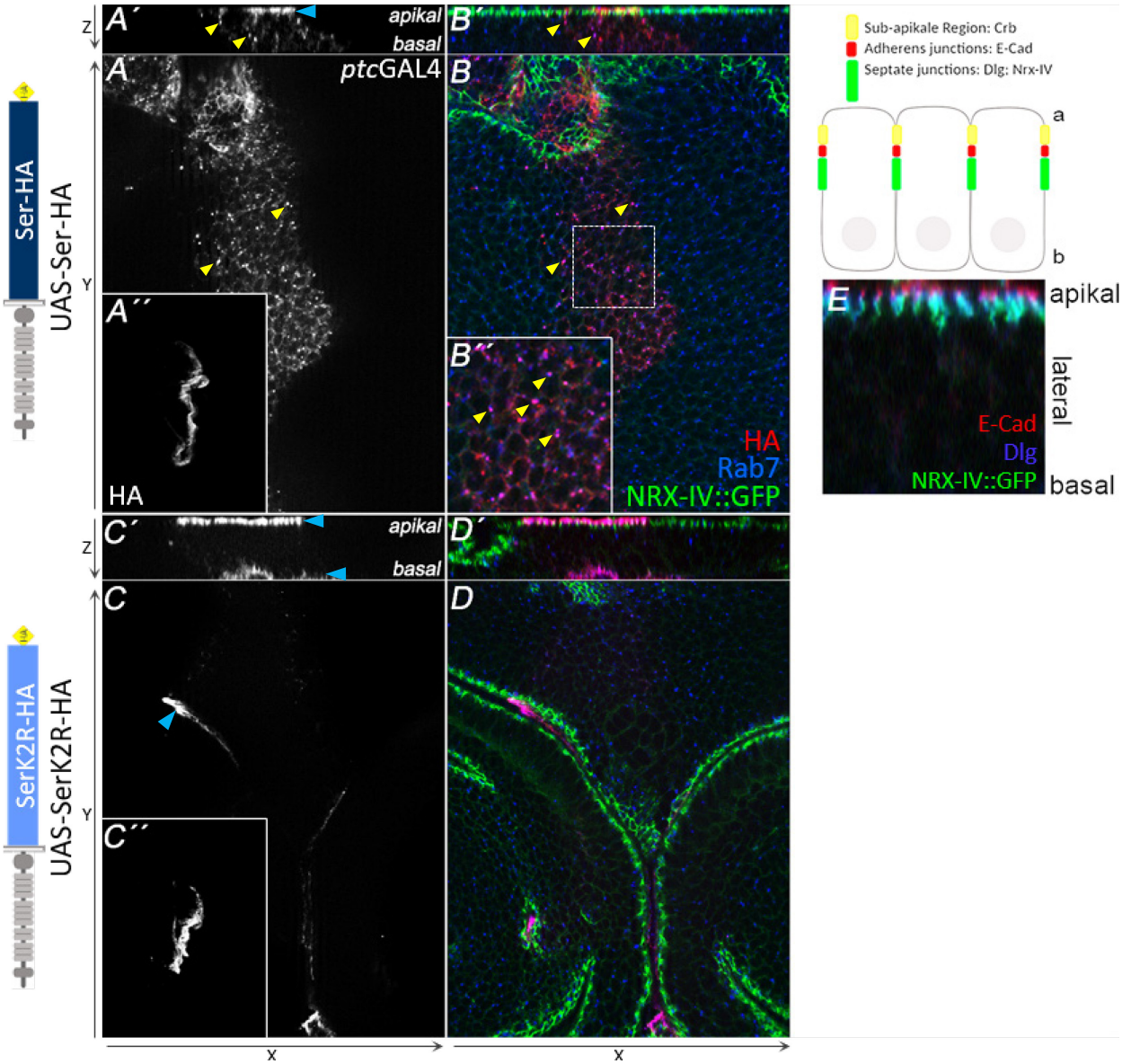


Abbildung 20: Analyse der subzellulären Lokalisation von Ser-HA und SerK2R-HA. Die Untersuchung der subzellulären Lokalisation der Liganden erfolgte mithilfe des Zellpolaritätsmarkers NRX-IV::GFP. NRX-IV lokalisiert in der Region der septate Junctions und markiert die basolaterale Domäne (C). Für die Darstellung der apiko-basalen Lokalisation beider Liganden wurden Z-Stapel der Flügelimaginalscheiben aufgenommen (A´-D´). In der X/Y-Ebene sind Liganden auf der Höhe der lateralen Region dargestellt (A-D). Die transgenen Liganden wurden mittels *ptc*GAL4 exprimiert (A´´, C´´). Ser-HA lokalisiert dabei sowohl an der apikalen Membran, als auch in den vesikulären Strukturen (A´, gelbe Pfeilköpfe), die mit Rab7-positiven Endosomen ko-lokalisieren (B-B´´, gelbe Pfeilköpfe). SerK2R-HA lokalisiert an der apikalen und partiell an der basalen Membran (C´, blaue Pfeilköpfe). Es sind dabei keine HA-positiven Vesikel zu beobachten (D, D´). Die Flügelimaginalscheiben sind in A´´ und C´´ 100-fach und in A-D 630-fach vergrößert dargestellt. B´´ zeigt einen vergrößerten Ausschnitt aus B.

Bei der Analyse der subzellulären Lokalisation von SerΔICD-HA kann kein HA-Signal detektiert werden (nicht gezeigt). Was damit erklärt werden kann, dass entweder das HA-Epitop durch die Faltung des verkürzten Proteins für den Antikörper nicht mehr zugänglich ist oder, dass SerΔICD-HA für eine Detektion nicht ausreichend vorhanden ist.

Für den Antikörper-„Uptake"-Assay (Abbildung 21) in den S2-Zellen, wurden UAS-Ser-HA und UAS-SerK2R-HA unter Kontrolle des pMT-Gal4-Treibers exprimiert. Parallel zur alleinigen Transfektion von Ser-HA und SerK2R-HA wurden die Liganden mit dem UAS-V5-Dmib1 ko-transfiziert, weil Mib1 die Endozytose von Ser in S2-Zellen einleiten kann [100]. Nach einer 24-stündigen Expression der UAS-Konstrukte bei 25°C wurden die Zellen mit einem αSer-ECD-Antikörper bei 4°C inkubiert. Dieser bindet an die extrazelluläre Domäne von Ser. Durch die Inkubation der Proben bei 4°C sollte die Endozytose unterbunden werden. Auf diese Weise werden nur die Liganden durch den αSer-ECD-Antikörper gebunden, die sich auf der Zelloberfläche befinden. Danach wurde der nicht gebundene Antikörper ausgewaschen und die Zellen bei 25°C inkubiert. Durch diese Temperaturerhöhung sollte die Endozytose wieder ausgelöst und die Liganden mitsamt dem gebundenen αSer-ECD-Antikörper internalisiert werden. Anschließend wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und mit dem zweiten Antikörper gefärbt (Abbildung 21). Um die reifenden Endosomen und Dmib1 zu detektieren, wurde eine Antikörperfärbung gegen Rab7 und V5 durchgeführt. Für einen zeitlichen Verlauf der Liganden-Endozytose wurden die Zellen für verschiedene Zeitintervalle bei 25°C inkubiert und danach fixiert und gefärbt.

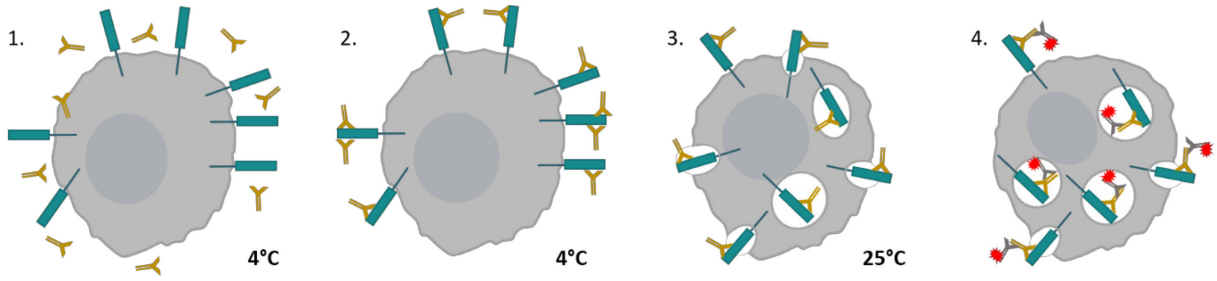


Abbildung 21: Vorgehensweise bei dem Antikörper „Uptake" Assay in S2-Zellen. Die UAS-Konstrukte wurden unter Kontrolle des pMT-Gal4-Treibers exprimiert. Nach der Liganden-Expression wurden die S2-Zellen mit dem ersten Antikörper bei 4°C inkubiert. Dieser Antikörper ist gegen die extrazelluläre Domäne des Liganden gerichtet (1). Danach wurden die Zellen gewaschen, um den nicht gebundenen Antikörper zu entfernen (2). Anschließend wurden die Zellen bei 25°C inkubiert, um die Endozytose der Liganden und des gebundenen Antikörpers einzuleiten (3). Nach einer bestimmten Zeit wurden die Zellen fixiert, die Zellmembran permeabilisiert und mit dem zweiten Antikörper gefärbt (4).

Als Zeitpunkte wurden 0, 30, 60, 120 und 180 Minuten nach der Initiierung der Endozytose ausgewählt. Zum Zeitpunkt 0 lokalisieren Ser-HA und SerK2R-HA sowohl bei alleiniger Expression als auch bei Ko-Expression mit V5-Dmib1 an der Zellmembran (Abbildung 22; A, A´, B, B´´, C, C´, D, D´´). Dies zeigt, dass bei 4°C keine Endozytose stattfindet. Dabei ist eine gleichmäßige Verteilung des Ser-Signals entlang der gesamten Zellmembran bei alleinigen Expressionen von

Ser-HA und SerK2R-HA zu beobachten (Abbildung 22, A, A´, C, C´, hellblaue Pfeilköpfe). Ähnlich dazu scheint das Ser-Signal bei Ko-Expression von SerK2R-HA mit V5-Dmib1 gleichmäßig entlang der Zellmembran verteilt zu sein (Abbildung 22, D, D´´). Bei der Ko-Expression von Ser-HA mit V5-Dmib1 dagegen wird eine punktartige Verteilung des Liganden entlang der Zellmembran beobachtet (Abbildung 22, B, B´´, grüne Pfeilköpfe). Bei alleiniger Expression verbleiben sowohl Ser-HA als auch SerK2R-HA über einen längeren Zeitraum an der Zellmembran. So wird nach 60- und sogar 180-minütiger Endozytose ein membranständiges Ser-Signal für beide Liganden beobachtet (Abbildung 22, I, I´ und K, K´ und Abbildung 53, A, C, E, G). Dabei werden vereinzelt Ser-ECD- und Rab7-positive Endosomen beobachtet, wobei das stärkste Ser-Signal an der Zellmembran zu beobachten ist (Abbildung 22, E, I, K, gelbe Pfeilköpfe und Abbildung 53, A´, E´, G´). Eine zusätzliche Expression von V5-Dmib1 führt bereits nach 30 Minuten zu einer effizienten Internalisierung von Ser-HA (Abbildung 22, F, F´´, gelbe Pfeilköpfe und J, J´´, lilafarbene Pfeilköpfe). Das endozytierte Ser-HA ko-lokalisiert dabei mit den Rab7-positiven Endosomen (Abbildung 22, F, F´´, gelbe Pfeilköpfe und J, J´´, lilafarbene Pfeilköpfe). Zu späteren Zeitpunkten kann außerdem beobachtet werden, dass das Ser-HA sich innerhalb der Rab7-positiven Endosomen befindet. Dies deutet darauf hin, dass der Ligand möglicherweise in die reifenden Endosomen für den späteren Abbau inkorporiert (Abbildung 22, J, J´´, lilafarbene Pfeilköpfe). Im Gegensatz zu Ser-HA verbleibt SerK2R-HA bei einer Ko-Expression mit V5-Dmib1 nach 60- und sogar 180-minütiger Endozytose an der Zellmembran und wird nicht internalisiert (Abbildung 22, H, H´´ und L, L´´ und Abbildung 53, D-D´´, H-H´´).

Die Ergebnisse des Antikörper-„Uptake"-Assays zeigen deutlich, dass Dmib1 in der Lage ist die Endozytose von Ser-HA in S2-Zellen effizient einzuleiten. Dmib1 ist dagegen zu keinem Zeitpunkt fähig die Endozytose von SerK2R-HA auszulösen. Diese Beobachtungen korrelieren mit den Ergebnissen in Flügelimaginalscheiben, bei denen Ser-HA endozytiert und SerK2R-HA nicht endozytiert wird.

Aufgrund der gestörten Endozytose von SerK2R-HA wäre zu erwarten, dass auch dessen Proteinabbau gestört ist. Aus diesem Grund wurde in der Zusammenarbeit mit S. Akgün (Bachelorarbeit, 2017) ein Pulse-Chase Experiment zur Analyse der Degradationszeit von Ser-HA und SerK2R-HA durchgeführt. Bei dem Pulse-Chase Experiment wird das temperatursensitive $GAL80^{ts}$ verwendet. In der ersten Phase (Pulse) sollten die Tiere bei 29°C gehalten werden. Unter diesen Bedingungen ist $GAL80^{ts}$ inaktiv und die Gal4-vermittelte Expression der Transgene kann erfolgen. Somit werden in der Pulse-Phase die gewünschten Proteine synthetisiert. Nach einer bestimmten Expressionsdauer wird die Haltungstemperatur auf 18°C gesenkt. Bei dieser Temperatur ist $GAL80^{ts}$ aktiv und reprimiert die Neusynthese der transgenen Liganden. In dieser Phase (Chase) werden die bereits vorhandenen Proteine abgebaut und keine neuen mehr synthetisiert.

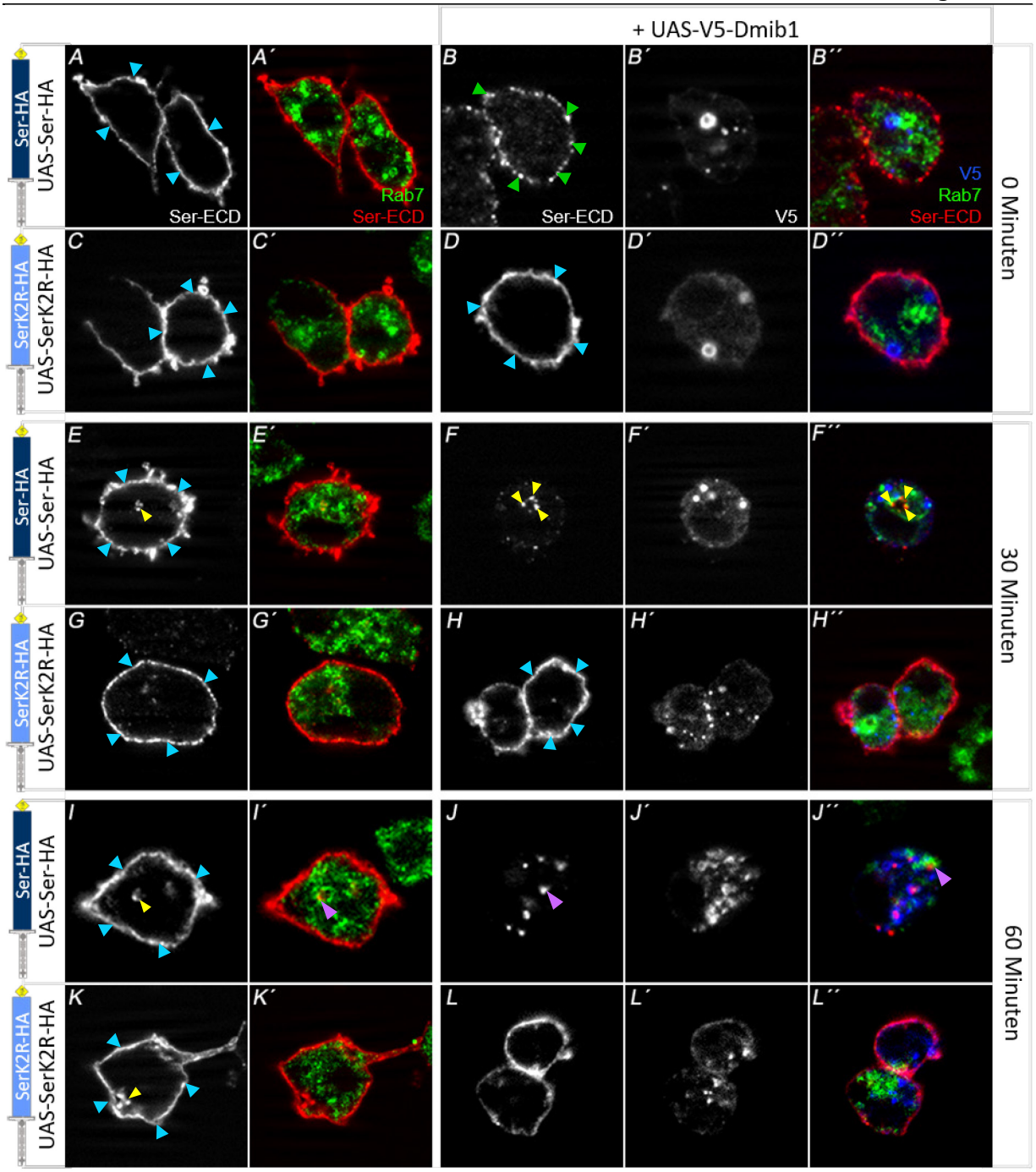


Abbildung 22: Antikörper-„Uptake"-Assay zur Analyse der Endozytose von Ser-HA und SerK2R-HA in S2-Zellen. Die Konstrukte UAS-Ser-HA, UAS-SerK2R-HA und UAS-V5-Dmib1 wurden mit dem pMT-Gal4 für 24 Stunden bei 25°C exprimiert. Anschließend wurden die S2- Zellen mit einem αSer-ECD-Antikörper bei 4°C inkubiert. Nach dem Entfernen des ersten Antikörpers folgte eine Inkubation für 0, 30 oder 60 Minuten bei 25°C, um die Endozytose der Liganden und des gebundenen Antikörpers einzuleiten. Darauf folgten eine Fixierung, Permeabilisierung der Zellen und eine Antikörperfärbung mit dem zweiten Antikörper. Zum Zeitpunkt 0 lokalisieren sowohl Ser-HA als auch SerK2R-HA an der Plasmamembran (A, A´, B, B´´, C, C´, D, D´´). Dabei scheinen die Liganden nach alleinigen Expressionen gleichmäßig entlang der Zellmembran verteilt zu sein. Bei Ko-Expression der Liganden mit V5-Dmib1 bleibt SerK2R-HA weiterhin gleichmäßig verteilt (A, A´, C, C´, D, D´´, hellblaue Pfeilköpfe), Ser-HA zeigt eine punktartige Verteilung entlang der Plasmamembran (B, grüne Pfeilköpfe). Bei den alleinigen Expressionen von Ser-HA und SerK2R-HA nach 30- und sogar 60-minütiger Endozytose verbleiben beide Liganden an der Zellmembran (E, E´, G, G´, I, I´, K, K´, hellblaue Pfeilköpfe). Eine Ko-Expression von Ser-HA mit V5-Dmib1 bewirkt eine effiziente Internalisation von Ser, das auf den Rab7-positivien Endosomen lokalisiert (F, F´´, gelbe Pfeile). Zu den späteren Zeitpunkten wird das Ser-Signal innerhalb der Rab7-positiven Endosomen detektiert (J, J´´, lilafarbene Pfeile). Eine Ko-Expression von SerK2R-HA mit V5-Dmib1 beeinflusst nicht die Lokalisation von SerK2R-HA, auch nicht nach 60-minütiger Endozytose (H, H´´, L, L´´).

Um den Abbau von Ser-HA und SerK2R-HA zu untersuchen, wurden zunächst verschiedene Expressionszeitpunkte (Pulse-Phasen) getestet und 16 Stunden als optimale Dauer der Expression ausgewählt (S. Akgün, Bachelorarbeit 2017). Nach einer 16-stündigen Expression der transgenen Liganden folgten die Chase-Phasen für je 2 bis 72 Stunden. Nach der jeweiligen Chase-Phase erfolgte eine Antikörperfärbung gegen HA, um die transgenen Liganden zu detektieren. Auf diese Weise konnte festgestellt werden, dass Ser-HA nach 24 Stunden komplett degradiert wird, während SerK2R-HA nach 72 Stunden noch detektierbar ist (Abbildung 23, vgl. D mit I und J) (in Zusammenarbeit mit S. Akgün, Bachelorarbeit 2017). Die Ergebnisse des Pulse-Chase-Experimentes demonstrieren, dass die Degradation von SerK2R-HA deutlich verlangsamt ist.

*ci*GAL4, *tub*GAL80^{ts}; 16 Stunden Pulse

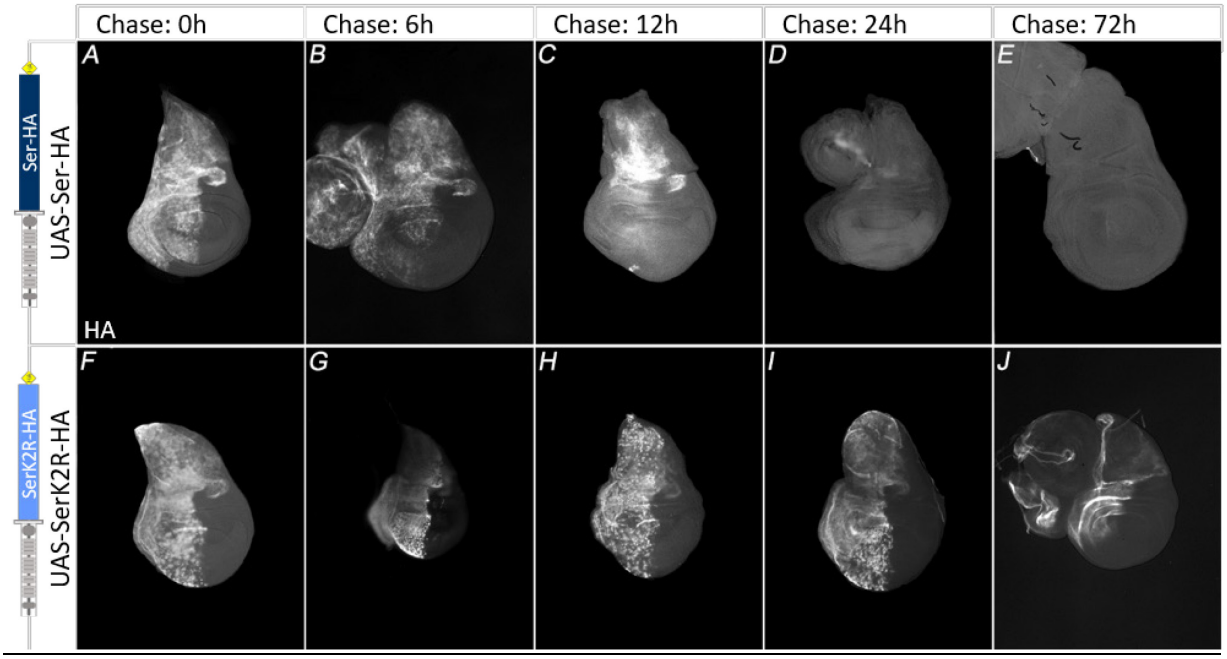


Abbildung 23: Pulse-Chase Experiment zur Analyse der Degradationszeit von Ser-HA und SerK2R-HA. Die Expression von Ser-HA und SerK2R-HA erfolgte unter Kontrolle des *ci*Gal4-Treibers mit dem *tub*GAL80^{ts}. Die transgenen Liganden wurden zuerst für 16 Stunden bei 29°C in der Pulse-Phase exprimiert. Anschließend folgten die Chase-Phasen, bei denen keine Neusynthese mehr stattfinden sollte und die vorhandenen Liganden abgebaut werden. Nach einer 16-stündigen Expression erfolgten verschiedene Chase-Zeitpunkte, zu denen die Flügelimaginalscheibe präpariert und mit dem HA-Antikörper gefärbt werden. Zum Zeitpunkt 0 können beide Liganden in der ganzen *ci*-Expressionsdomäne detektiert werden (A und F). Nach einer 12-stündigen Degradation ist ca. die Hälfte des Ser-HA-Signals nicht mehr detektierbar (C). Das SerK2R-HA-Signal hingegen ist auch nach 24-stündiger Degradation vergleichbar mit der Situation zum Zeitpunkt 0 (vgl. F mit I). Während Ser-HA nach 24-stündiger Degradation nicht mehr zu detektieren ist (D), wird eine deutliche Reduktion des SerK2R-HA-Signals erst nach einer 72-stündigen Chase-Phase beobachtet (J). Alle Flügelimaginalscheiben sind 100-fach vergrößert dargestellt. Diese Ergebnisse wurden in Zusammenarbeit mit S. Akgün (Bachelorarbeit, 2017) generiert.

3.2.3 Die transgenen Ser-Liganden beeinflussen die Lokalisation des endogenen N-Rezeptors

Die Beobachtung der gestörten Endozytose von SerK2R-HA, führte zu der Frage, ob die Lokalisation des endogenen Notch-Rezeptors durch die Expression dieses Liganden beeinträchtigt wird. Glittenberg et al. 2006 beschrieben, dass die kontinuierliche Expression von Ser zu einer Entfernung des endogenen N-Rezeptors von der apikalen Membran führt. Im

Gegensatz akkumuliert der Rezeptor an der apikalen Membran bei der Expression eines nicht inaktiven Ser$^{\Delta int}$-Liganden [100]. Aus diesem Grund sollte im Rahmen dieser Arbeit analysiert werden, welchen Einfluss die Expression des dominant negativen SerK2R-HA auf die Lokalisation des N-Rezeptors hat. Die Detektion des N-Rezeptors erfolgte hierbei entweder mithilfe einer Antikörperfärbung gegen die NECD oder durch die Verwendung von Notch-YFP und Ni-GFP4Cherry5. Bei N-YFP handelt es sich um ein „protein-trap" des endogenen Notch-Rezeptors, hierbei befindet sich das YFP in der ECD des Rezeptors. Dieser Rezeptor ist funktional [101, 102]. Das Ni-GFP4Cherry5 ist ein genomisches BAC-Konstrukt, das zusätzlich zum endogenen Notch vorliegt. Dieser N-Rezeptor trägt eine GFP und Cherry-Markierung in der intrazellulären Domäne. Die Besonderheit dieses Konstruktes ist, dass Cherry für die Reifung länger benötigt als GFP. Dadurch werden die membranständigen Rezeptoren anhand der GFP- und die endozytierten anhand der Cherry-Fluoreszenz sichtbar [103]. Die Ergebnisse der Expressionen mit Ni-GFP4Cherry5 sind im Anhang dargestellt (Abbildung 58).

Eine kontinuierliche Expression von Ser-HA führt zu einer Entfernung des N-Rezeptors von der apikalen Membran, ähnlich wie in der Publikation (Abbildung 24, B, B´, gelbe Klammer und Abbildung 58, A, A´) [25]. Dabei kann eine Ko-Lokalisation bei den HA- und Notch-positiven Vesikeln beobachtet werden (Abbildung 24, A´-C´, gelbe Pfeilköpfe). Bei der Expression von SerK2R-HA wird hingegen eine Akkumulation des N-Rezeptors an der apikalen Membran beobachtet (Abbildung 24, E, E´ und Abbildung 58, B, B´, B´´, blaue Klammer). Dabei scheint die Verteilung des N-Rezeptors entlang der apikalen Membran verändert zu sein. Es werden Bereiche beobachtet, in denen der Rezeptor konzentrierter vorliegt (Abbildung 24, E´´, F´´ und Abbildung 58, B´´, blaue Pfeile), was auf eine beeinträchtigte Endozytose des Rezeptors hindeuten könnte. Gleichzeitig werden zahlreiche N-positive Vesikel detektiert (Abbildung 24, E´, gelbe Pfeilköpfe). Somit ist die Endozytose des N-Rezeptors nicht komplett unterdrückt. Außerdem wäre es möglich, dass es infolge der Expression von SerK2R-HA zu einer Hochregulation der endogenen *Notch*-Expression kommt. In diesem Fall wäre eine Akkumulation des N-Rezeptors aufgrund der höheren Expressionsrate und nicht aufgrund der beeinträchtigten Endozytose zu erklären. Bei der Expression von SerΔ-ICD-HA konnte ebenfalls eine Akkumulation an der apikalen Membran beobachtet werden (Abbildung 58, C, C´, blaue Klammer).

Zusammengefasst, führt die Expression von Ser-HA zur Entfernung des N-Rezeptors von der apikalen Membran, während bei einer SerK2R-HA-Expression dieser an der apikalen Membran akkumuliert.

Eine kontinuierliche Expression von SerK2R-HA mit *ptc*GAL4 verursacht eine Narbenbildung und stärkere Veränderung der Scheibenmorphologie, was die Analyse der subzellulären Lokalisation erschwert. Aus diesem Grund wurden Ser-HA und SerK2R-HA mit *en*GAL4, *tub*GAL80^{ts} für 24 Stunden exprimiert und die Lokalisation des endogenen N-Rezeptors untersucht. Hierbei hat eine 24-stündige Ser-HA-Expression noch keinen Einfluss auf die Lokalisation des Rezeptors

(Abbildung 52, B, B´, C, C´), während eine SerK2R-HA-Expression dessen Akkumulation an der apikalen Membran bewirkt (Abbildung 52, E-E´´, F-F´´). Somit scheinen die transgenen Ser-Liganden die Konzentration des endogenen N-Rezeptors an der apikalen Membran in einer Konzentration-abhängigen Weise zu beeinflussen.

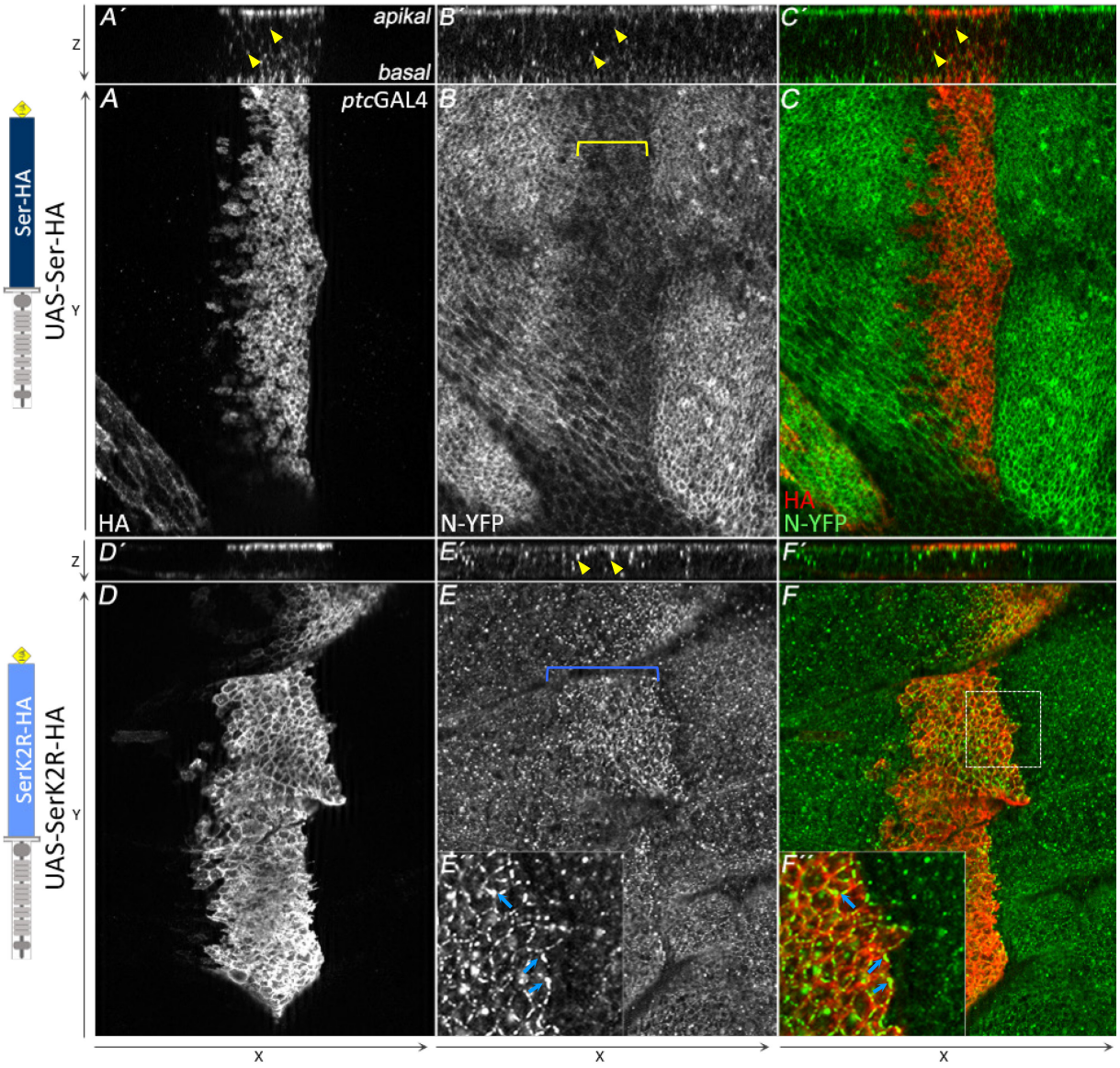


Abbildung 24: Subzelluläre Lokalisation des endogenen N-Rezeptors bei Expression von Ser-HA oder SerK2R-HA. Die transgenen Liganden wurden mit *ptc*GAL4 exprimiert und anschließend eine anti-HA Antikörperfärbung durchgeführt. Die Detektion des Rezeptors erfolgte mithilfe von N-YFP. Für die Darstellung der apiko-basalen Lokalisation der Liganden und des N-Rezeptors wurden Z-Stapel der Flügelimaginalscheiben aufgenommen. In der X/Y-Ebene sind die Liganden und der endogene N-Rezeptor auf der Höhe der apikalen Region gezeigt. Ser-HA lokalisiert an der apikalen Membran und in vesikulären Strukturen (A, A´, gelbe Pfeilköpfe). Die Expression von Ser-HA führt zum Entfernen des N-Rezeptors von der apikalen Membran (B, gelbe Klammer). Es können dabei zahlreiche N-YFP-positive Vesikel beobachtet werden, einige davon ko-lokalisieren mit Ser-HA (A´, B´, C´, gelbe Pfeilköpfe). SerK2R-HA lokalisiert hauptsächlich an der apikalen Membran. Es kann außerdem ein schwächeres HA-Signal an der basalen Membran detektiert werden (D, D´). Die Expression von SerK2R-HA bewirkt eine Akkumulation von N-YFP an der apikalen Membran (E, blaue Klammer). Dabei scheint der Rezeptor in einigen Bereichen an der Membran konzentrierter vorzuliegen (E´´, blaue Pfeile). Neben dem starken apikalen Signal sind zahlreiche N-YFP-positive Vesikel sichtbar (E´, gelbe Pfeilköpfe). Die Flügelimaginalscheiben sind in A-F 630-fach vergrößert dargestellt. Die Bilder E´´, F´´ zeigen je einen vergrößerten Ausschnitt aus E und F.

3.2.4 Die K-freie ICD von Ser interagiert mit Mib1

Wie oben gezeigt, ist die Endozytose und Degradation von SerK2R-HA gestört. Da Mib1 die Liganden ubiquitiniert und ihre anschließende Endozytose einleitet, stellte sich die Frage, ob SerK2R-HA in der Lage ist mit Mib1 zu interagieren. Zum einen könnte die fehlende Endozytose damit erklärt werden, dass ähnlich, wie bei DlK2R, die K-freie ICD von SerK2R-HA nicht ubiquitiniert werden kann [28]. Zum anderen wäre nicht ausgeschlossen, dass es durch einen Austausch aller Ks gegen Rs zu einer stärkeren strukturellen Veränderung der ICD kommt, wodurch die Bindung von SerK2R-HA und Mib1 nicht mehr möglich wäre. Um diese Möglichkeit auszuschließen, sollte eine Co-Immunopräzipitation (Co-IP) von SerK2R-HA mit Dmib1 durchgeführt werden (Abbildung 16). Dafür wurde eine Mib1-Variante (Mib1ΔR) verwendet, die keine RING-Domäne besitzt. Mib1ΔR ist nicht in der Lage zu ubiquitinieren, so dass die Liganden verzögert abgebaut werden, was die Präzipitation ermöglichen sollte. Mib1ΔR ist am N-terminus mit His und Myc markiert, um es als Interaktionspartner nachweisen zu können (UAS-HisMyc-Mib1ΔR). Für die Co-IP wurden die UAS-Konstrukte Ser-HA, SerK2R-HA und HisMyc-Mib1ΔR mit pMT-Gal4 in S2-Zellen für 24 Stunden bei 25°C exprimiert. Die Co-IP erfolgte mittels anti-HA gekoppelter Agarose. Dadurch sollten alle mit Ser-HA/SerK2R-HA im Komplex vorliegenden Proteine präzipitiert werden (Abbildung 16). Nach der SDS-PAGE und dem Western Blot erfolgte eine anti-His-Färbung, um HisMyc-Dmib1ΔR als Interaktionspartner nachzuweisen. Im Anschluss wurde die Membran gestrippt und mit dem anti-HA-Antikörper gefärbt, um die Liganden sichtbar zu machen. Ser-HA/SerK2R-HA haben eine vorhergesagte Größe von ca. 152 kDa, während Mib1ΔR ca. 125 kDa groß sein sollte. Nach der anti-HA-Färbung können sowohl für Ser-HA als auch für SerK2R-HA je drei Banden detektiert werden (Abbildung 25, WB:HA, Linien 4, 5, 6, 7, 9, 10). Dabei entspricht die mittlere Bande der erwarteten Größe von ca. 150 kDa. Bei der Ko-Expression von Ser-HA oder SerK2R-HA mit HisMyc-Dmib1ΔR wird je eine Bande mithilfe des anti-His-Antikörpers bei ca. 130 kDa detektiert (Abbildung 25, Linien 9 und 10). Dabei ist die Bande nach der Co-IP von SerK2R-HA mit HisMyc-Dmib1ΔR deutlich schwächer, als nach der Co-IP von Ser-HA mit HisMyc-Dmib1ΔR (Abbildung 25, vgl. Linie 10 mit 9). Dieses Experiment wurde mehrmals (n=5) durchgeführt und jedes Mal eine viel schwächere His-Bande nach der IP von SerK2R-HA mit HisMyc-Dmib1ΔR beobachtet. Demnach zeigen diese Ergebnisse, dass SerK2R-HA in der Lage ist mit HisMyc-Dmib1ΔR zu interagieren (Abbildung 25, Linie 9, markiert mit rotem Stern). Hierbei scheint SerK2R-HA eine geringere Bindung an HisMyc-Dmib1ΔR als Ser-HA aufzuweisen. Es ist allerdings zu beachten, dass die Co-IP als Methode für eine quantitative Analyse weniger geeignet ist.

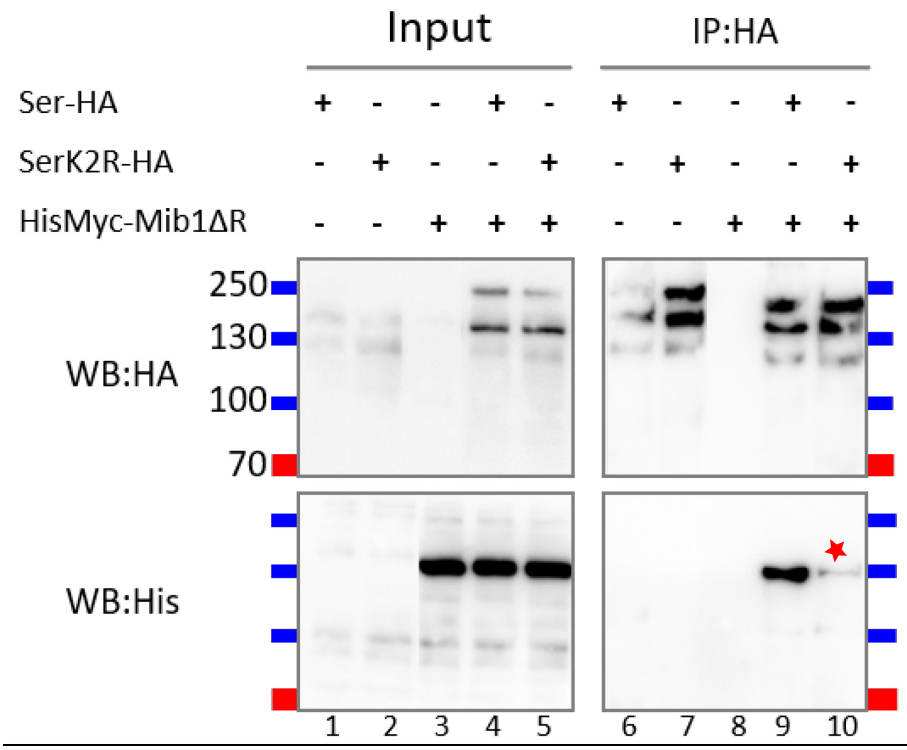


Abbildung 25: Co-Immunopräzipitation von Ser-HA und SerK2R-HA mit HisMyc-Dmib1ΔR. Die Konstrukte Ser-HA, SerK2R-HA und HisMyc-Mib1ΔR wurden jeweils einzeln und in Kombinationen in S2-Zellen exprimiert. Für den Input wurden 15µl der Proteinlysate aufgetragen. Die Immunopräzipitation erfolgte mithilfe der anti-HA gekoppelten Agarose. Um Proteine zu detektieren, wurden die Membranen mit anti-HA und anti-His-Antikörpern gefärbt. Dabei wurde für Ser-HA und SerK2R-HA eine Größe von ca. 152 kDa und für HisMyc-Mib1ΔR von 125 kDa erwartet. Sowohl für Ser-HA als auch für SerK2R-HA können drei Banden detektiert werden. Dabei entspricht die mittlere Bande der erwarteten Größe (WB:HA; Linien 4, 5, 6, 7, 9,10). Nach der anti-His-Färbung im Input werden neben den spezifischen Banden (WB:His, Linien 3, 4, 5) schwache unspezifischen Banden detektiert (WB:His, Linien 1 und 2). Es wird eine deutliche Bande mit dem anti-His Antikörper detektiert, nach der Präzipitation von Ser-HA mit HisMyc-Mib1ΔR (WB:His, Linie 9), während nach der Co-IP von SerK2R-HA mit HisMyc-Mib1ΔR eine viel schwächere Bande zu sehen ist (WB:His, Linie 10, markiert mit rotem Stern). Diese beiden Banden entsprechen der erwarteten Größe für HisMyc-Mib1ΔR von ca. 125 kDa.

3.2.5 Ubiquitin-interagierende Motive von Lqf werden für die Ser-Aktivität benötigt

Die vorherigen Resultate demonstrieren, dass ein Ligand ohne Ks in der ICD komplett funktionslos ist. Ks werden für die Ubiquitinierung und anschließende Endozytose des Liganden benötigt. Dabei resultiert nur die Lqf-vermittelte Endozytose in einer effektiven Aktivierung des Notch-Signalweges [72]. Das Adaptorprotein Lqf besitzt zwei Ubiquitin-interagierende Motive (UIM; **U**biquitin **I**nteracting **M**otifs), die eine Interaktion mit dem ubiquitinierten Liganden vermitteln können [74]. Aus diesem Grund sollte untersucht werden, ob die UIMs und folglich die Ubiquitinierung für die Ser-vermittelte Aktivierung des Notch-Signalwegs benötigt werden.

Ein kompletter Ausfall von *lqf* verursacht eine Unterbrechung der endogenen Wg-Expression an der d/v-Grenze ([72] und (Abbildung 26, A´-A´´, weiße Pfeile)), während die *lqf*-mutanten Zellen, die an die wildtypischen Zellen angrenzen, die Wg-Expression einschalten ([72] und (Abbildung 26, A´´, gelbe Pfeile)). Demnach sind *lqf*-mutante Zellen nicht in der Lage das aktivierende Signal zu senden, während der Empfang des Signals aus benachbarten wildtypischen Zellen nicht gestört ist. Wang und Struhl 2005 zeigten, dass die Endozytose vom endogenen Ser in *lqf*-mutanten Zellen leicht beeinträchtigt ist [43]. Im Rahmen dieser Arbeit konnten allerdings keine deutlichen Veränderungen der Endozytose vom endogenen Ser in den *lqf*-mutanten Zellklonen detektiert werden (Abbildung 26, B, gelbe Pfeilköpfe; in Zusammenarbeit mit T. Troost, unveröffentlichte Daten, AG Klein).

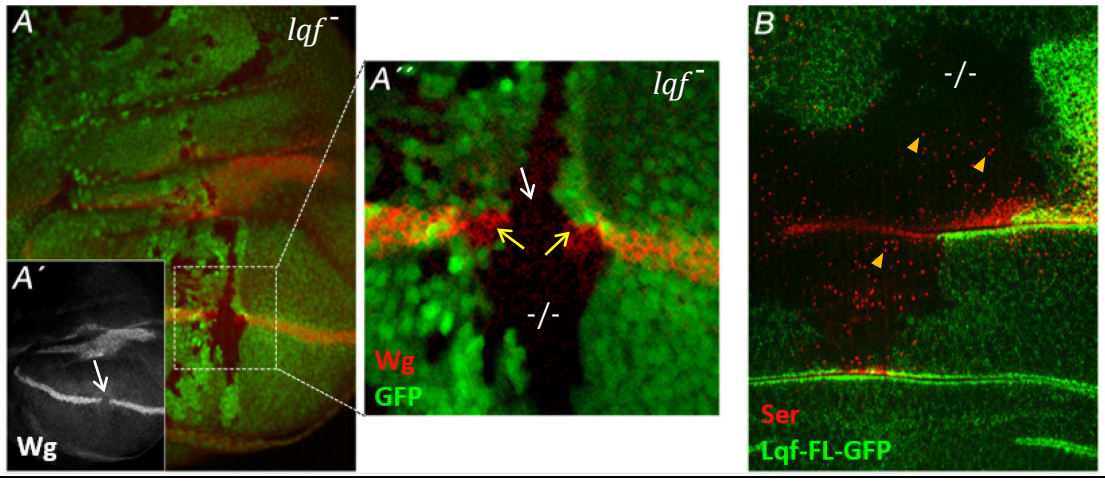


Abbildung 26: Induktion homozygot mutanter Zellklone für *lqf* in der Flügelimaginalscheibe. Die homozygot mutanten *lqf*-Zellen sind durch eine fehlende GFP-Fluoreszenz markiert (A´´, B; -/-). Ein kompletter Verlust von *lqf* führt zu einer nicht zellautonomen Unterbrechung der endogenen Wg-Expression (A-A´´, weiße Pfeile). Dabei exprimieren die *lqf*-mutanten Zellen Wg, die an die wildtypischen Zellen angrenzen (A´´, gelbe Pfeile). In den *lqf*-mutanten Zellklonen (B, -/-, markiert durch fehlendes GFP-Signal) kann eine vesikuläre Lokalisation des endogenen Ser-Liganden beobachtet werden (B, gelbe Pfeilköpfe). Die Flügelimaginalscheiben sind in A und A´ 250-fach vergrößert und in B 630-fach vergrößert dargestellt. A´´ zeigt einen vergrößerten Ausschnitt aus A. Die in B gezeigten Ergebnisse wurden von T. Troost generiert.

Um die Rolle der UIMs von Lqf für die Ser-Aktivität zu analysieren, wurden zuerst Lqf-Rettungskonstrukte: Lqf-FL-GFP, Lqf-UIM1$^{EEE-AAA}$-GFP, Lqf-ΔUIM2-GFP und Lqf-UIM1$^{EEE-AAA}$-ΔUIM2-GFP in die *attP* site 22A inseriert. Die Plasmide mit den Rettungskonstrukten wurden in der AG von J. Fischer generiert [74] und zur Verfügung gestellt. Um die Rettungskonstrukte auf

einem endogenen Level exprimieren zu können, wurde zuerst ein 16 kb großes Fragment genomischer Region von *lqf* am 3´-Ende mit einer GFP-Sequenz fusioniert. Anschließend wurden die erwähnten Deletionskonstrukte hergestellt und in den sog. pCaSper4-attB-Expressionsvektor kloniert [74]. Das Rettungskonstrukt Lqf-FL-GFP besitzt die vollständige genomische Region von *lqf* mit einer C-terminalen GFP-Markierung (Abbildung 27). Es rettet bereits in einer Kopie die homozygot mutante Situation für *lqf* vollständig. Hierbei wird eine wildtypische Wg-Expression an der d/v-Grenze in den Flügelimaginalscheiben beobachtet ((Abbildung 28, A) und [74]). Eine Antikörperfärbung gegen Ser zeigte, dass endogenes Ser in diesem genetischen Hintergrund endozytiert wird (Abbildung 28, E, gelbe Pfeilköpfe). Die adulten Fliegen sehen wildtypisch aus ((nicht gezeigt) und [74]). In dem Konstrukt Lqf-UIM1$^{EEE-AAA}$-GFP wurden drei konservierte Glutaminsäuren im UIM1 durch Alanine ausgetauscht (Abbildung 27). Für diese drei Glutaminsäuren wurde gezeigt, dass sie für die Interaktion mit Ubiquitin notwendig sind [79]. Daher sollten diese Mutationen die Bindung mit dem Ubiquitin verhindern. Bei dem Rettungskonstrukt Lqf-ΔUIM2-GFP wurde das zweite UIM komplett deletiert. Das Konstrukt Lqf-UIM1$^{EEE-AAA}$-ΔUIM2-GFP beinhaltet sowohl die Mutationen im UIM1 als auch die Deletion von UIM2 (Abbildung 27). Demnach fehlt dieser Lqf-Variante die Funktion der beiden Ubiquitin-interagierenden Motive [74].

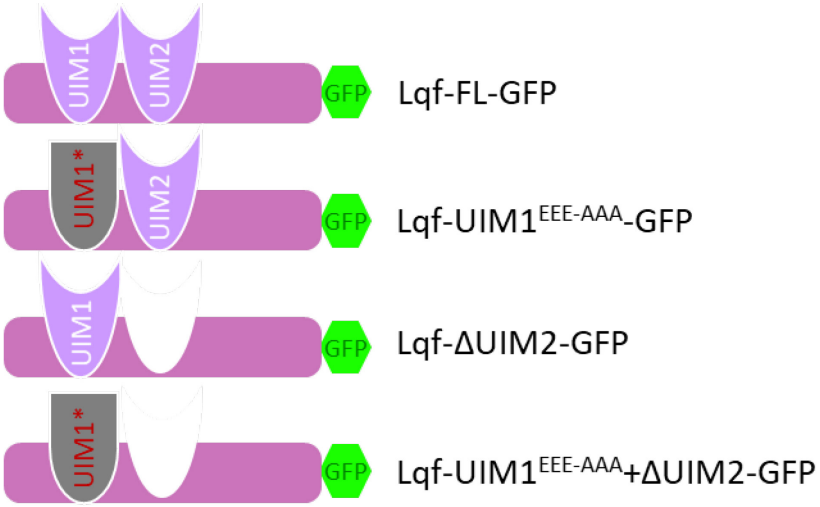


Abbildung 27: Schematische Darstellung der Lqf-Rettungskonstrukte. Alle Rettungskonstrukte wurden in die *attP*-site 22A integriert. Für diese Rettungskonstrukte wurde 16kb der genomischen Region von *lqf* in ein pCaSper4-attB-Vektor kloniert. Lqf-FL-GFP beinhaltet die vollständige Sequenz von *lqf* in voller Länge und trägt eine C-terminale GFP-Markierung. Bei dem Konstrukt Lqf-UIM1$^{EEE-AAA}$-GFP wurden drei konservierten Glutaminsäuren im UIM1 durch Alanine ersetzt. Dadurch sollte die Bindung an Ubiquitin nicht mehr möglich sein. Bei dem Rettungskonstrukt Lqf-ΔUIM2-GFP wurde das UIM2 deletiert, während Lqf-UIM1$^{EEE-AAA}$+ΔUIM2-GFP die Mutation im UIM1 und die Deletion des zweiten UIMs besaß. Dadurch fehlen dieser Lqf-Variante die Funktionen beider Ubiquitin-interagierenden Motive.

Durch die Expression von Lqf-UIM1$^{EEE-AAA}$-GFP oder Lqf-ΔUIM2-GFP kann der *lqf*-mutante Hintergrund gerettet werden. Dabei sehen die Gesamtmorphologie der Flügelimaginalscheiben und die Wg-Expression wildtypisch aus (Abbildung 28, B und C). Wie bereits in Xie et al. 2012 gezeigt, sehen die geschlüpften Fliegen nach der Rettung mit Lqf-ΔUIM2-GFP wildtypisch aus

((Abbildung 57, C) und [74]). Nach der Rettung mit Lqf-UIM1$^{EEE-AAA}$-GFP wurden dagegen im Rahmen dieser Arbeit Fliegen mit defekten Flügeln (Abbildung 57, B) und zum Teil kleineren Augen (nicht gezeigt) beobachtet. Die Flügel besitzen dabei unregelmäßige Venen und größere Bereiche ohne Ränder (Abbildung 57, B, schwarze Pfeile). In der Publikation dagegen sind wildtypische Fliegen beschrieben [74]. Demnach scheint UIM1 eine wichtigere Rolle zu spielen.

Ein Verlust beider UIMs führt zu einer partiellen Rettung des *lqf*-mutanten Hintergrundes. Diese Tiere sterben als „pharate Adults" und zeigen typische Notch-abhängige Defekte, wie z.B. kleinere bis gar keine Augen oder viel kleinere bis gar keine Flügel [28, 74]. Wie bereits in [28, 74] beschrieben, sind die Flügelimaginalscheiben der L3-Larven deutlich kleiner und zeigen keine Aktivierung des Notch-Signalwegs entlang der d/v- Grenze ((Abbildung 28, D) und [28, 74]). In allen Fällen scheint die Endozytose vom endogenen Ser nicht gestört zu sein. Wobei keine Quantifizierung durchgeführt wurde und nur eine qualitative Aussage gemacht werden kann (Abbildung 28, F-H, gelbe Pfeilköpfe; H, H´ gezeigt von T. Troost).

Es wurde bereits gezeigt, dass Ser nicht in der Lage ist in den *lqf*-mutanten Zellen den Notch-Signalweg ektopisch zu aktivieren [72]. Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit getestet werden, ob Ser eines der beiden UIMs bevorzugt benötigt, um den Notch-Signalweg ektopisch aktivieren zu können. Hierfür wurden die oben beschriebenen Lqf-Rettungskonstrukte mit *ptc*GAL4 rekombiniert. Dadurch ist es möglich UAS-Konstrukte im *lqf*-mutanten und durch die Lqf-Varianten geretteten Hintergrund zu exprimieren. Ser-HA induziert eine ektopische Aktivierung des Notch-Signalwegs im *lqf*-mutanten Hintergrund, der durch Lqf-FL-GFP gerettet wurde (Abbildung 28, I, I´, gelbe Pfeile). Hierbei scheint die ektopische Wg-Expression etwas schwächer zu sein als bei der Ser-HA-Expression im wildtypischen Hintergrund. Möglicherweise ist eine Kopie des Lqf-FL-GFP-Rettungskonstruktes nicht ausreichend, um bei einer Liganden-Überexpression die Lqf-Funktion vollständig zu erfüllen. Des Weiteren wirkt Ser-HA *cis*-inhibitorisch und unterdrückt die endogene Wg-Expression an der d/v-Grenze (Abbildung 28, I, rosafarbener Pfeil). Ser-HA lokalisiert in diesem genetischen Hintergrund in Vesikeln (Abbildung 28, M, gelbe Pfeilköpfe). Die Expression von Ser-HA im *lqf*-mutanten Hintergrund gerettet durch entweder Lqf-UIM1$^{EEE-AAA}$ -GFP oder Lqf-ΔUIM2-GFP führt zu keiner ektopischen Aktivierung des Notch-Signalwegs (Abbildung 28, vgl. I, I´ mit J, J´ und K, K´). Es kommt zu einer Unterbrechung der endogenen Wg-Expression entlang der d/v-Grenze (Abbildung 28, J und K, rosafarbene Pfeile) und einer erhöhter *Cis*-Inhibition im *ptc*-Streifen, die anhand einer größeren Unterbrechung der endogenen Wg-Expression und einer fehlenden Gbe+Su(H)-Expression sichtbar wird (Abbildung 28, J, J´ und K, K´, rosafarbene Pfeile). Dies führt zu einer Narbenbildung und Deformation des Flügelfeldes. Nach dem Funktionsverlust beider UIMs ist das ektopisch exprimierte Ser-HA nicht in der Lage den Notch-Signalweg zu aktivieren (Abbildung 28, vgl. D und I, I´ mit L, L´). Diese Ergebnisse zeigen, dass für die Aktivität von Ser-HA beide UIMs gleichermaßen benötigt werden, da ein Verlust von UIM1 oder UIM2 zu einer fehlenden Aktivierung des Notch-Signalwegs führt.

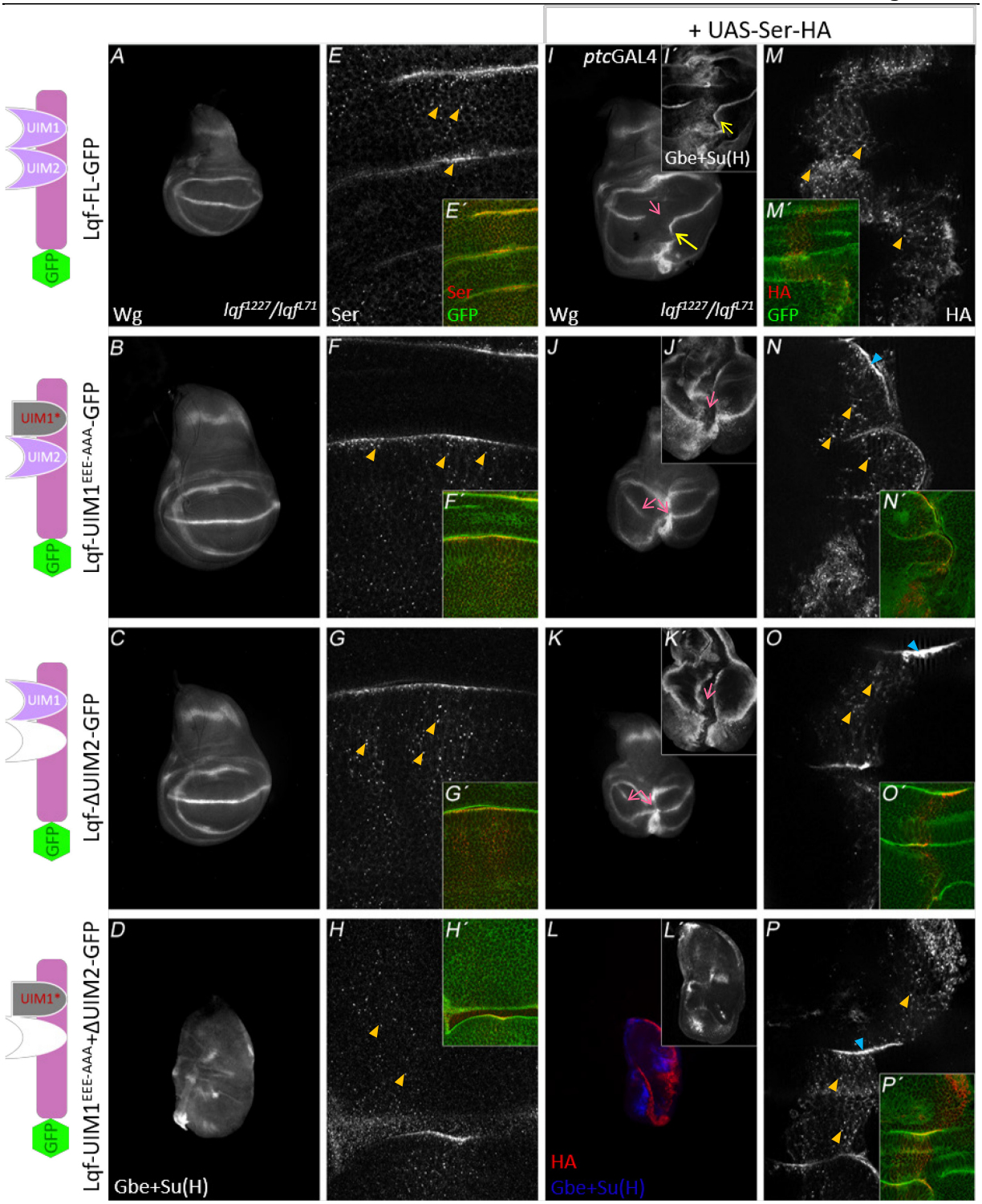


Abbildung 28: Rolle der Ubiquitin-interagierenden Motive von Lqf für die Aktivität von Ser. Die Rettungskonstrukte Lqf-FL-GFP, Lqf-UIM1$^{EEE-AAA}$-GFP, Lqf-ΔUIM2-GFP und Lqf-UIM1$^{EEE-AAA}$+ΔUIM2-GFP wurden im *lqf*-mutanten Hintergrund exprimiert. Dabei retten Lqf-FL-GFP, Lqf-UIM1$^{EEE-AAA}$-GFP und Lqf-ΔUIM2-GFP die *lqf*-mutante Situation und führen zu einer wildtypischen Wg-Expression in den Flügelimaginalscheiben (A, B, C). Lqf-UIM1$^{EEE-AAA}$+ΔUIM2-GFP rettet die embryonale Letalität von *lqf*, hierbei sind die Flügelimaginalscheiben deutlich kleiner und weisen keine Notch-Aktivität in der Flügeltasche auf (D). Es kann in allen genetischen Hintergründen eine vesikuläre Lokalisation von endogenem Ser beobachtet werden (E-H, gelbe Pfeilköpfe). Ser-HA wurde mit *ptc*GAL4 im *lqf*-mutanten Hintergrund exprimiert, der durch die beschriebenen Lqf-Varianten gerettet wurde. Bei der Ser-HA-Expression im Hintergrund gerettet durch eine Kopie Lqf-FL-GFP wird eine ventrale ektopische Aktivierung des Notch-Signalwegs induziert (I, I´, gelbe Pfeile). Bei der Expression von Ser-HA im Hintergrund gerettet durch Lqf-UIM1$^{EEE-AAA}$-GFP oder Lqf-ΔUIM2-GFP wird keine ektopische Aktivierung des Notch-Signalwegs beobachtet. Darüber hinaus kommt es zu einer Unterdrückung der endogenen Notch-Aktivität infolge einer verstärkten *Cis*-Inhibition (J, J´, K, K´, rosafarbene Pfeile). Bei der Rettung mit Lqf-UIM1$^{EEE-AAA}$+ΔUIM2-GFP

ist Ser-HA ebenfalls nicht in der Lage den Notch-Signalweg zu aktivieren (L, L´). In allen vier genetischen Hintergründen kann eine vesikuläre Ser-HA-Lokalisation detektiert werden (M, M´-P, P´, gelbe Pfeilköpfe). Hierbei wird bei den Rettungen mit Lqf-UIM1$^{EEE-AAA}$-GFP, Lqf-ΔUIM2-GFP und Lqf-UIM1$^{EEE-AAA}$+ΔUIM2-GFP zusätzlich ein verstärktes HA-Signal an der Membran beobachtet (M, M´-P, P´, hellblaue Pfeilköpfe). Die Flügelimaginalscheiben sind in A-C und I-K 100-fach; in D, L und I´-L´ 250-fach; in E, E´-H, H´ und M, M´-P, P´ 630-fach vergrößert.

Interessanterweise können Unterschiede zwischen den Rettungsexperimenten ohne und mit ektopisch exprimiertem Ser-HA festgestellt werden. So ist in den Rettungsexperimenten ohne Ser-HA-Expression nur eines der beiden UIMs für die Aktivität der endogenen Liganden ausreichend. Bei einer Überexpression von Ser-HA hingegen werden beide UIMs benötigt, um eine ektopische Aktivierung des Notch-Signalwegs zu induzieren. Diese Beobachtung könnte darauf zurück zu führen sein, dass durch die Überexpression von Ser-HA die möglichen negativen Auswirkungen des Verlustes von einem UIM nicht mehr kompensiert werden können. Dabei wird eine vesikuläre Lokalisation für Ser-HA nach der Rettung durch alle drei Konstrukte beobachtet (Abbildung 28, N, O und P, gelbe Pfeilköpfe). Gleichzeitig wird aber auch ein verstärktes HA-Signal an der Zellmembran beobachtet (Abbildung 28, N, O, P, hellblaue Pfeilköpfe), was auf eine beeinträchtigte Endozytose hindeuten könnte. Es wurde keine quantitative Analyse durchgeführt. Daher ist nicht auszuschließen, dass ein Verlust der Lqf-UIMs zu einer Reduktion der Liganden-Endozytose führt. Möglicherweise wird beim Ausfall eines oder beider UIMs nur eine bestimmte Fraktion der Liganden nicht mehr endozytiert, die in diesem Experiment nicht identifiziert werden können. Zusammenfassend bestätigen diese Ergebnisse die bereits früher beschriebenen Daten, dass Ser auch Lqf-unabhängig endozytiert wird [43] und dass die Ser-vermittelte Aktivierung des Notch-Signalwegs Lqf benötigt [43, 72].

3.3 Die Rolle einzelner Ks in der ICD für die Aktivität von Ser

Die oben beschriebenen Ergebnisse verdeutlichen, dass die intrazellulären Ks von Ser und die Ubiquitin-interagierenden Motive von Lqf für die volle Aktivität des Liganden notwendig sind. Aus diesem Grund wurde die Rolle einzelner Ks in der Ser-ICD untersucht. Zu diesem Zweck wurde zuerst ein Aminosäuresequenzenvergleich der Ser-ICDs aus verschiedenen Arthropoden-Spezies erstellt, um konservierte Ks zu identifizieren (Abbildung 29). Die ICD von *Drosophila melanogaster (D. melanogaster)* Ser enthält zehn Ks, fünf davon (K1276, K1294, K1362, K1381, K1385) scheinen besonders stark und ein weiteres K1370 weniger stark konserviert zu sein (Abbildung 29, markiert durch roten und schwarzen Rahmen). Um die Rolle dieser fünf am stärksten konservierten Ks für die Ser-Funktion zu analysieren, wurden diese in der wildtypischen ICD von Ser-HA einzeln oder in unterschiedlichen Kombinationen gegen Rs (K zu R) ausgetauscht (siehe 2.2.1). Als Pendant dazu wurden in die K-freie ICD von SerK2R-HA die entsprechenden Ks (R zu K) wieder eingeführt. Die Wiedereinführung der Ks erfolgte ebenfalls einzeln oder in Kombinationen (siehe 2.2.1). Die hergestellten Konstrukte wurden, wie Ser-HA und SerK2R-HA, mit einem C-terminalen HA-Tag markiert und in die *attP*-site 51C inseriert. Anschließend wurden diese mit *ptc*GAL4 exprimiert und die Auswirkungen auf die Aktivierung des Notch-Signalwegs analysiert. Um zu untersuchen, ob ein K zu R- bzw. R zu K- Austausch die subzelluläre Lokalisation des jeweiligen Liganden beeinflusst, wurde bei der Auswahl der Konstrukte zusätzlich eine Antikörperfärbung gegen HA durchgeführt und Z-Stapel aufgenommen.

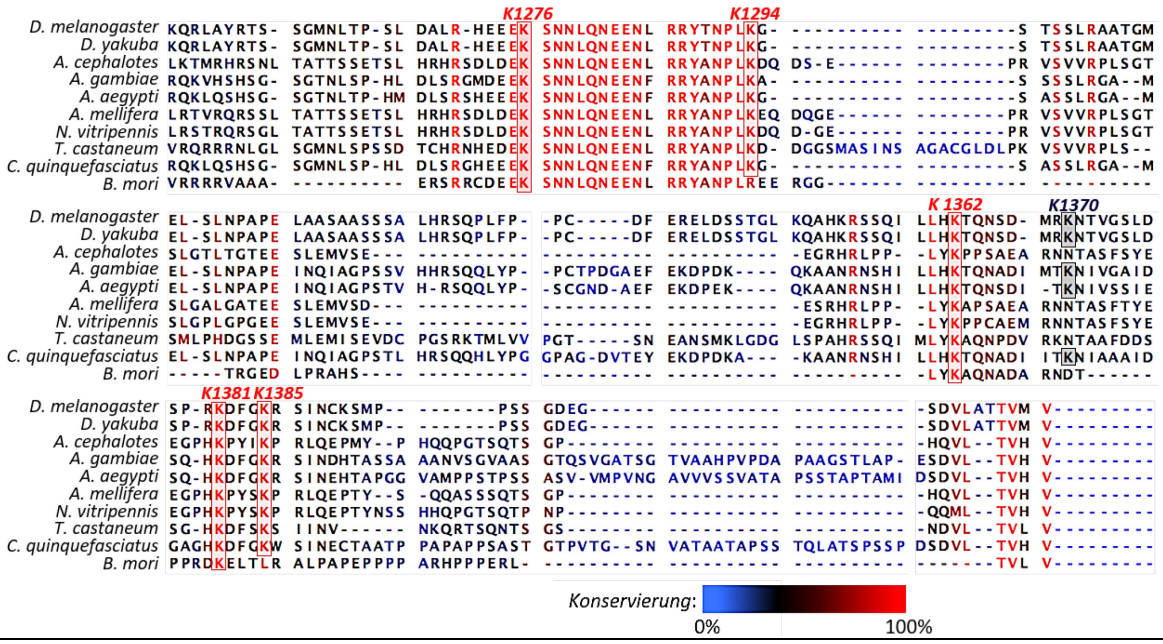


Abbildung 29: Aminosäuresequenzenvergleich der intrazellulären Domänen von Ser aus unterschiedlichen Insektenspezies. Die am stärksten konservierten Ks sind mit einem roten Rahmen markiert und oben nummeriert. Die Nummer entspricht der Position des K in der ganzen Aminosäuresequenz von Ser aus *Drosophila melanogaster*. Die Aminosäuren sind im Ein-Buchstaben-Code abgekürzt. Die Farbe der jeweiligen Aminosäuren entspricht dem Grad der Konservierung, dabei sind die am stärksten konservierten Aminosäuren in Rot dargestellt.

3.3.1 Der Austausch von K1362 beeinträchtigt die Aktivität von Ser

Um die Rolle jedes einzelnen der fünf konservierten Ks zu analysieren, wurden die Ser-Varianten Ser^{R1276}-HA, Ser^{R1294}-HA, Ser^{R1362}-HA, Ser^{R1381}-HA und Ser^{R1385}-HA generiert und analysiert. Ser^{R1276}-HA, Ser^{R1294}-HA, Ser^{R1381}-HA und Ser^{R1385}-HA sind in der Lage den Notch-Signalweg ektopisch zu aktivieren, vergleichbar mit Ser-HA (Abbildung 30, vgl. C, C´ mit D, E, G, H, gelbe Pfeile). Dabei wirken Ser^{R1381}-HA und Ser^{R1385}-HA etwas stärker *cis*-inhibitorisch als Ser-HA (Abbildung 30, vgl. C´ mit G´, H´, rosafarbene Pfeile). Ser^{R1276}-HA, Ser^{R1294}-HA, Ser^{R1381}-HA und Ser^{R1385}-HA lokalisieren sowohl an der apikalen Membran (Abbildung 30, D´´, G´´, hellblaue Pfeilköpfe) als auch in Vesikeln (Abbildung 30, D´´, G´´, gelbe Pfeilköpfe). In dieser Arbeit ist die subzelluläre Lokalisation von Ser^{R1276}-HA und Ser^{R1381}-HA repräsentativ für alle oben beschriebenen Konstrukte dargestellt. Interessanterweise ist Ser^{R1362}-HA nicht in der Lage den Notch-Signalweg zu aktivieren, sondern verursacht eine Unterbrechung der endogenen Wg-Expression (Abbildung 30, F, F´, rosafarbene Pfeile). Diese Unterbrechung geht nicht über die *ptc*-Domäne hinaus und ist somit zellautonom (Abbildung 30, F, rosafarbener Pfeil). Dieser Effekt könnte mit einer starken *cis*-inhibitorischen Eigenschaft ohne *Trans*-Aktivierung von Ser^{R1362}-HA erklärt werden. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass Ks 1276, 1294, 1381, 1385 in der Ser-ICD für die Aktivierung des Notch-Signalwegs einzeln nicht essentiell sind. K1362 dagegen wird benötigt. Ähnlich wie SerK2R-HA, lokalisiert Ser^{R1362}-HA ausschließlich an der apikalen Membran und in keinen Vesikeln (Abbildung 31, A´´, hellblauer Pfeilköpf). Um die mögliche *cis*-inhibitorische Wirkung von Ser^{R1362}-HA zu unterdrücken, wurde eine Ko-Expression mit UAS-N durchgeführt. Diese Ko-Expression resultiert in einer starken ektopischen zellautonomen Aktivierung der Wg-Expression entlang der gesamten *ptc*-Domäne (Abbildung 31, vgl. A, A´ mit B, B´, hellblaue Pfeile). Aus diesem Ergebnis kann abgeleitet werden, dass Ser^{R1362}-HA eine starke *cis*-inhibitorische und keine *trans*-aktivierende Eigenschaft besitzt. Um zu testen, ob Ser^{R1362}-HA, ähnlich wie SerK2R-HA, einen Einfluss auf die Lokalisation des endogenen N-Rezeptors hat, wurde dieser Ligand mit Ni-GFP4Cherry5 ko-exprimiert. Dabei kann eine Akkumulation des N-Rezeptors an der apikalen Membran beobachtet werden, ähnlich wie bei der SerK2R-HA-Expression (Abbildung 58, vgl. B-B´´ mit D-D´´). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass Ser^{R1362}-HA die Endozytose des endogenen N-Rezeptors beeinträchtigt.

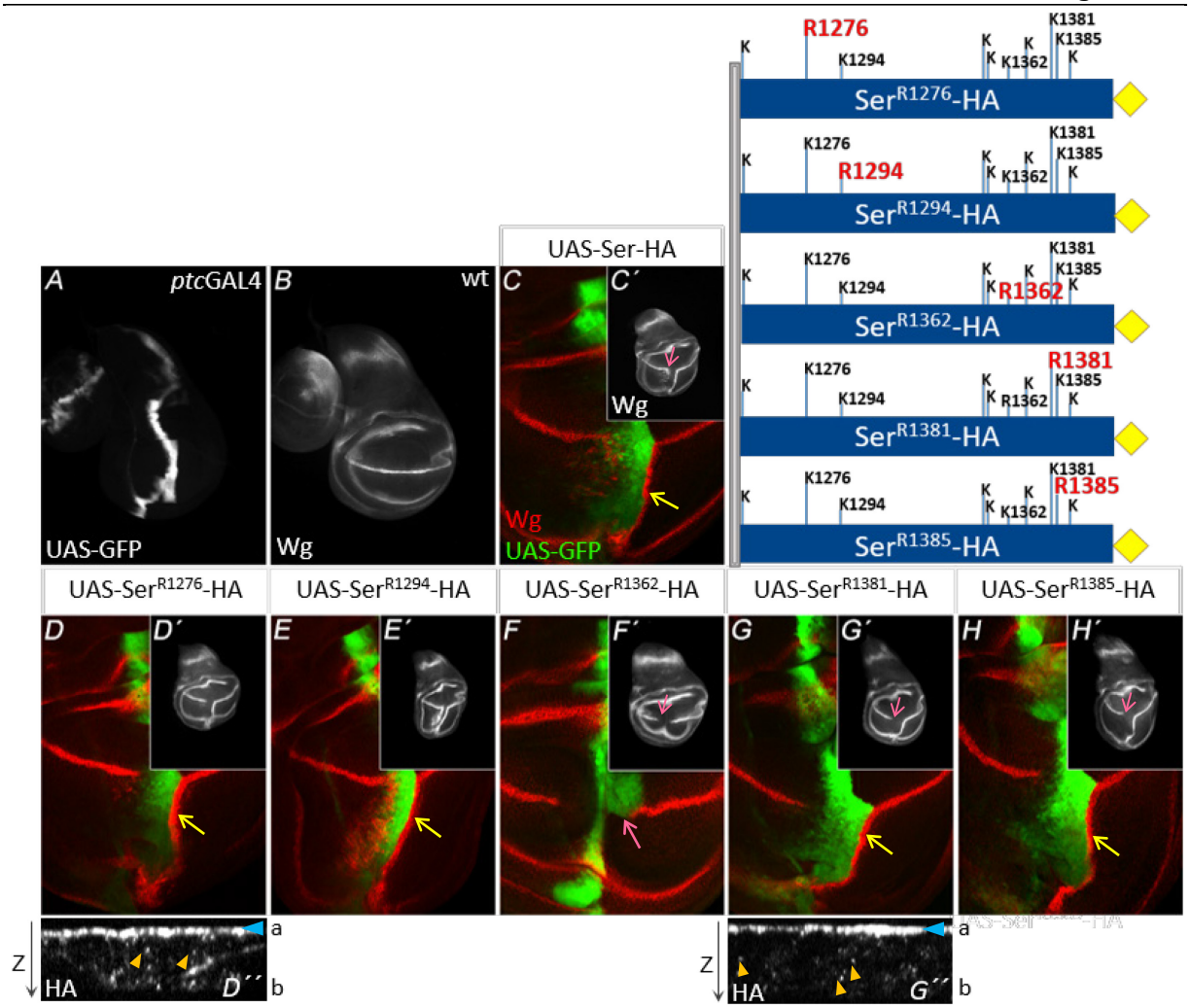


Abbildung 30: Übersicht der Expressionen von Ser-R-Varianten mit einzelnen K zu R- Austauschen in der ICD. Die Konstrukte wurden mit *ptc*GAL4 exprimiert (A). Die Aktivierung des Notch-Signalwegs wurde mithilfe der Wg-Expression nachgewiesen (B). Die Expression von Ser-HA führt zu einer ektopischen ventralen Aktivierung des Notch-Signalwegs (C, gelber Pfeil). Innerhalb der *ptc*-Domäne wirkt Ser-HA *cis*-inhibitorisch und unterdrückt die endogene Wg-Expression an der d/v-Grenze (C´, rosafarbener Pfeil). Ähnlich wie Ser-HA, aktivieren Ser^{R1276}-HA; Ser^{R1294}-HA; Ser^{R1381}-HA und Ser^{R1385}-HA ektopisch den Notch-Signalweg im ventralen Kompartiment (vgl. C, C´ mit D, D´, E, E´, G, G´, H, H´, gelbe Pfeile). Dabei scheinen Ser^{R1381}-HA und Ser^{R1385}-HA etwas stärker *cis*-inhibitorisch zu wirken, als Ser-HA (vgl. C´ mit G´ und H´, rosafarbene Pfeile). Die Expression von Ser^{R1362}-HA führt zu keiner ektopischen Aktivierung und zu einer Unterbrechung der endogenen Wg-Expression in einer zellautonomen Weise (F, F´, rosafarbene Pfeile). Die Analyse der subzellulären Lokalisation der Liganden zeigt, dass sowohl Ser^{R1276}-HA als auch Ser^{R1381}-HA an der apikalen Membran und in den Vesikeln lokalisieren (D´´ und G´´, gelbe Pfeilköpfe). Die Flügelimaginalscheiben sind in A, B, C´-H´ 100-fach vergrößert und in C-H 250-fach vergrößert dargestellt. Die Abbildungen D´´ und G´´ zeigen je einen vergrößerten Ausschnitt aus der Schnittansicht des Z-Stapels.

Da einzelne Austausche von Ks 1276, 1294, 1381, 1385 zu Rs keinen Einfluss auf die Aktivität von Ser hatten, sollte untersucht werden, ob ein gleichzeitiger Austausch von zwei Ks die Funktion von Ser beeinflussen kann. So wurde im Jahr 2006 gezeigt, dass ein Austausch zweier Ks gegen Alanine zu einem komplett inaktiven Ser-Liganden führt [25]. Diese zwei Ks entsprechen den Positionen 1276 und 1294 der fünf konservierten Ks in der Ser-ICD (Abbildung 29). Auf struktureller Ebene unterscheiden sich Alanine von Ks stärker als Rs. Aus diesem Grund wurden Ks 1276 und 1294 im Rahmen dieser Arbeit durch Rs ersetzt (Ser^{R1276,1294}-HA) und analysiert. Die

Expression von Ser^{R1276,1294}-HA resultiert in einer ektopischen Aktivierung des Notch-Signalwegs, die etwas schwächer als bei der Ser-HA-Expression ist (vgl. Abbildung 30, C, C´ und Abbildung 31, C, C´, gelbe Pfeile). Gleichzeitig zeigt Ser^{R1276,1294}-HA einen stärkeren *cis*-inhibitorischen Effekt als Ser-HA (vgl. Abbildung 30, C, C´ und Abbildung 31, C, rosafarbener Pfeil). Der *cis*-inhibitorische Effekt von Ser^{R1276,1294}-HA kann durch die Ko-Expression mit UAS-N unterdrückt werden, was in einer starken ektopischen zellautonomen Aktivierung des Notch-Signalwegs resultiert (Abbildung 31, D, D´, blaue Pfeile). Dabei lokalisiert Ser^{R1276,1294}-HA, ähnlich wie Ser-HA, an der apikalen Membran (Abbildung 31, C´´, hellblauer Pfeilköpf) und in den Vesikeln (Abbildung 31, C´´, gelbe Pfeilköpfe). Daher scheint der Effekt, der in Glittenberg et al. 2006 beschrieben ist, durch einen Ks-Austausch gegen Alanine zustande zu kommen. Ein Austausch dieser Ks gegen Rs hat einen geringeren Einfluss und zeigt, dass Ks 1276 und 1294 für die Ser-Aktivität nicht essentiell sind. Außerdem deutet dies auf eine mögliche Struktur in der Ser-ICD hin.

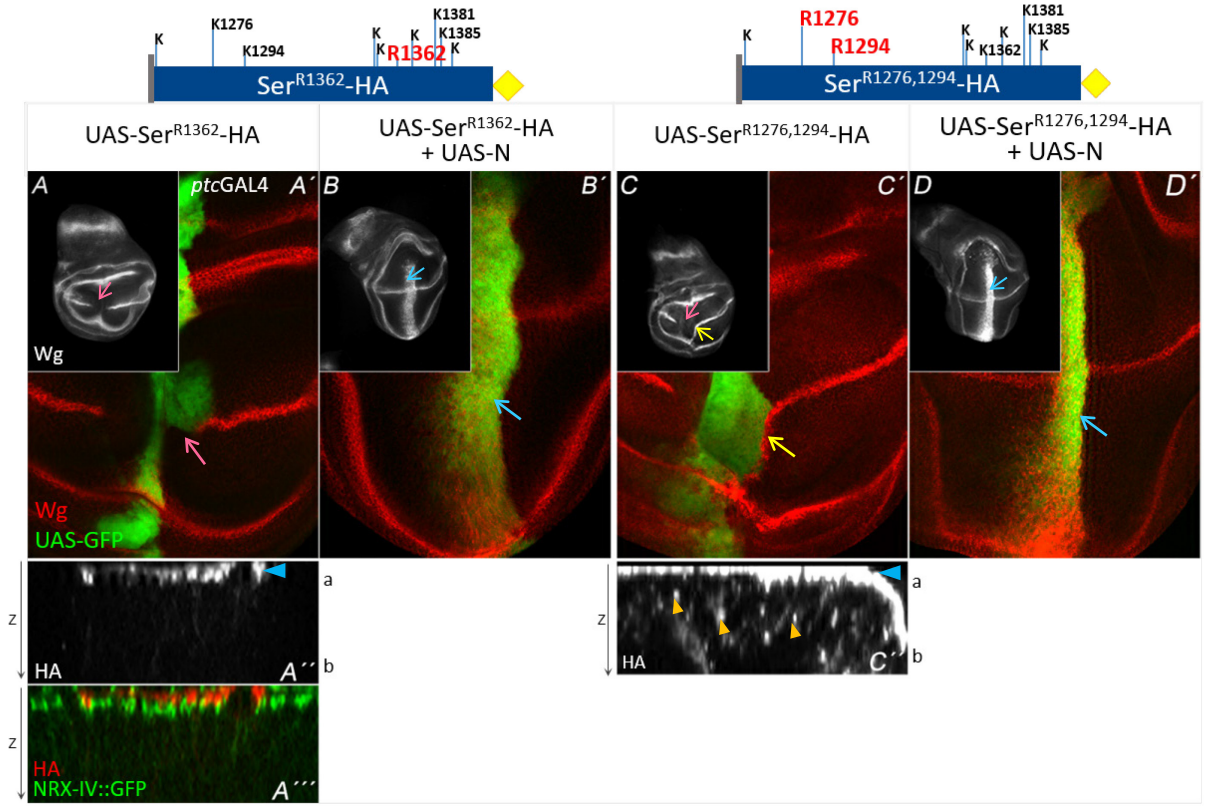


Abbildung 31: Expression von Ser^{R1362}-HA und Ser^{R1276,1294}-HA, sowie deren Ko-Expression mit UAS-N. Bei den Konstrukten Ser^{R1362}-HA und Ser^{R1276,1294}-HA wurden an den jeweiligen Positionen Ks durch Rs ausgetauscht. Die transgenen Liganden wurden mit *ptc*GAL4 exprimiert. Ser^{R1362}-HA wirkt stark *cis*-inhibitorisch und führt zu einer zellautonomen Unterbrechung der endogenen Wg-Expression (A, A´, rosafarbene Pfeile). Der Ligand lokalisiert dabei fast ausschließlich an der apikalen Membran (A´´, A´´´, hellblaue Pfeilköpf). Nach der Ko-Expression von Ser^{R1362}-HA mit UAS-N kann der *cis*-inhibitorische Effekt des Liganden unterdrückt werden und es kommt zu einer starken zellautonomen Aktivierung des Notch-Signalwegs (B, B´, blaue Pfeile). Ser^{R1276,1294}-HA ist in der Lage den Notch-Signalweg im ventralen Kompartiment zu aktivieren (C, C´, gelbe Pfeile). Es weist eine verstärkte *Cis*-Inhibition auf (C, rosafarbener Pfeil), die durch die Ko-Expression mit UAS-N unterdrückt werden kann, was zu einer starken ektopischen Aktivierung von Notch in der gesamten *ptc*-Domäne führt (D, D´, blaue Pfeile). Ser^{R1276,1294}-HA lokalisiert sowohl an der apikalen Membran (C´´, hellblaue Pfeilköpf) als auch in Vesikeln (C´´, gelbe Pfeilköpfe). Die Flügelimaginalscheiben sind in A-D 100-fach und in A´- D´ 250-fach vergrößert dargestellt. In A´´, A´´´ und C´´ sind vergrößerte Ausschnitte aus der Schnittansicht des Z-Stapels dargestellt.

Da ein gleichzeitiger Austausch von zwei konservierten Ks sich nur geringfügig auf die Aktivität von Ser auswirkte, sollte als Nächstes untersucht werden, ob ein Austausch von fünf konservierten Ks gleichzeitig die Ser-Funktion beeinflussen kann. Hierfür wurde $Ser^{R1276,1294,1362,1381,1385}$-HA (Ser-5R-HA) generiert. Ser-5R-HA agiert wie SerK2R-HA dominant negativ und verursacht eine Narbenbildung mit einer nicht zellautonomen Unterdrückung der endogenen Notch-Aktivität an der d/v-Grenze (Abbildung 54, vgl. C, C´ mit D, D´). Ähnlich wie bei SerK2R-HA, wird der dominant negative Effekt von Ser-5R-HA durch die Ko-Expression mit UAS-N unterdrückt, es findet aber weiterhin keine ektopische Aktivierung des Notch-Signalwegs statt (Abbildung 54, E-E´´´). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die fünf konservierten Ks gemeinsam agieren und zur Aktivierung des Notch-Signalwegs beitragen. Es wäre aber auch möglich, dass ein gleichzeitiger Austausch von vier oder drei Ks zu einem SerK2R-HA-Phänotyp führt. Daher wurden folgende Ser-4R-Varianten hergestellt: $Ser^{R1294,1362,1381,1385}$-HA ($Ser^{KRRRR}$-HA), $Ser^{R1276,1362,1381,1385}$-HA ($Ser^{RKRRR}$-HA); $Ser^{R1276,1294,1381,1385}$-HA ($Ser^{RRKRR}$-HA); $Ser^{R1276,1294,1362,1385}$-HA ($Ser^{RRRKR}$-HA) und $Ser^{R1276,1294,1362,1381}$-HA ($Ser^{RRRRK}$-HA). Alle exprimierten Ser-4R-Varianten sind nicht in der Lage den Notch-Signalweg zu aktivieren und wirken, wie SerK2R-HA, in einer dominant negativen Weise (Abbildung 32, vgl. C, C´ mit D-H und D´-H´, grüne Pfeile). Dabei lokalisieren Ser^{KRRRR}-HA und Ser^{RRRKR}-HA an der apikalen und partiell an der basalen Membran. Es sind sehr wenige bis gar keine Vesikel zu sehen (Abbildung 32, D´´, G´´, hellblaue Pfeile). Die restlichen Ser-4Rs lokalisieren in einer ähnlichen Weise und weisen kaum vesikuläre Strukturen auf (nicht gezeigt).

Die Ergebnisse der K zu R-Austausche zeigen also, dass Ks 1276, 1294, 1381, 1385 für die Ser-Aktivität einzeln nicht essentiell sind, während K1362 benötigt wird. Ein gleichzeitiger Austausch von Ks 1276 und 1294 verstärkt die *cis*-inhibitorische Eigenschaft des Liganden, welcher jedoch weiterhin in der Lage ist den Notch-Signalweg ektopisch zu aktivieren. Bei einem gleichzeitigen Austausch von vier oder fünf konservierten Ks, wirken alle transgenen Liganden in einer dominant negativen Weise, selbst die Ser^{RRKRR}-Variante, in der K1362 noch vorhanden ist. Diese Ergebnisse legen nahe, dass K1362 für die Funktion von Ser essentiell ist. Es kann jedoch nur in Verbindung mit weiteren konservierten Ks zu einer effizienten Aktivierung des Notch-Signalwegs beitragen. Es wäre nicht ausgeschlossen, dass bereits ein Austausch von drei Ks gleichzeitig zu einem SerK2R-ähnlichen Phänotyp führt. Diese Möglichkeit wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht überprüft.

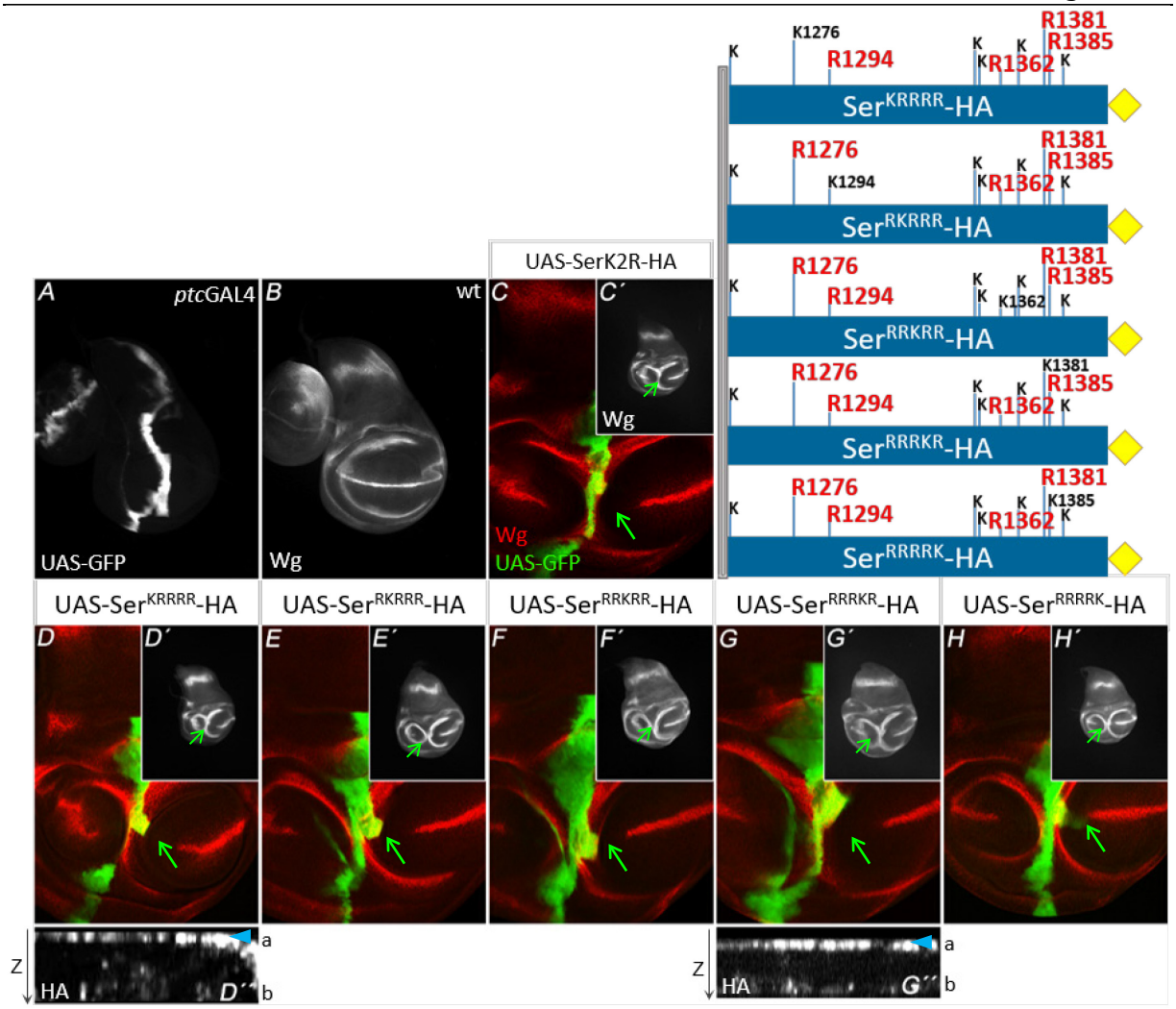


Abbildung 32: Übersicht der Expressionen von Ser-4R-Varianten mit vier gleichzeitigen K zu R-Austauschen in der Ser-ICD. Ser^{R1294,1362,1381,1385}-HA (Ser^{KRRRR}-HA), Ser^{R1276,1362,1381,1385}-HA (Ser^{RKRRR}-HA), Ser^{R1276,1294,1381,1385}-HA (Ser^{RRKRR}-HA), Ser^{R1276,1294,1362,1385}-HA (Ser^{RRRKR}-HA) und Ser^{R1276,1294,1362,1381}-HA (Ser^{RRRRK}-HA) wurden mit *ptc*GAL4 exprimiert (A). Als Aktivitätsmarker für die Aktivierung des Notch-Signalwegs wurde die Wg-Expression untersucht (B). SerK2R-HA agiert in einer dominant negativen Weise und führt zu einer nicht zellautonomen Unterbrechung der endogenen Wg-Expression (C, C´, grüner Pfeil). Ähnlich dazu wirken alle Ser-4R-Varianten dominant negativ und verursachen eine Unterbrechung der endogenen Wg-Expression in einer nicht zellautonomen Weise (vgl. C, C´ mit D, D´-H, H´, grüne Pfeile). Dabei lokalisieren Ser^{KRRRR}-HA und Ser^{RRRKR}-HA hauptsächlich an der apikalen Membran und partiell an der basalen Membran (D´´ und G´´, hellblaue Pfeile). Es sind kaum HA-Vesikel zu sehen (D´´ und G´´). Die Flügelimaginalscheiben sind in A, B, C´-H´100-fach, in C-H 250-fach vergrößert dargestellt. Die Bilder D´´ und G´´ zeigen je Ausschnitt aus der Schnittansicht des Z-Stapels.

3.3.2 Es werden mindestens fünf Ks in der ICD für die volle Ser-Aktivität benötigt

Die vorherigen Resultate zeigen die Abhängigkeit der Ser-Funktion von den intrazellulären Ks. Dabei scheint nur K1362 einzeln essentiell zu sein. Aus diesem Grund sollte getestet werden, ob die Wiedereinführung einzelner konservierten Ks in die SerK2R-ICD zu einem aktiven Liganden führen kann. Hierfür wurden Ks an den entsprechenden Positionen in die SerK2R-ICD wieder eingeführt und SerK2R^{K1276}-HA, SerK2R^{K1294}-HA, SerK2R^{K1362}-HA, SerK2R^{K1381}-HA sowie SerK2R^{K1385}-HA generiert (SerK2R-K). Die Expression aller SerK2R-K-Varianten führt zu einem SerK2R-ähnlichen Phänotyp mit einer nicht zellautonomen Unterbrechung der endogenen Wg-Expression infolge der dominant negativen Wirkung des Liganden (Abbildung 33, vgl. C, C´ mit D, D´-H, H´, grüne Pfeile). Alle SerK2R-K-Varianten lokalisieren an der apikalen Membran. In dieser Arbeit ist die Lokalisation von SerK2R^{K1276}-HA und SerK2R^{K1381}-HA repräsentativ dargestellt (Abbildung 33, D´´, G´´, hellblaue Pfeile).

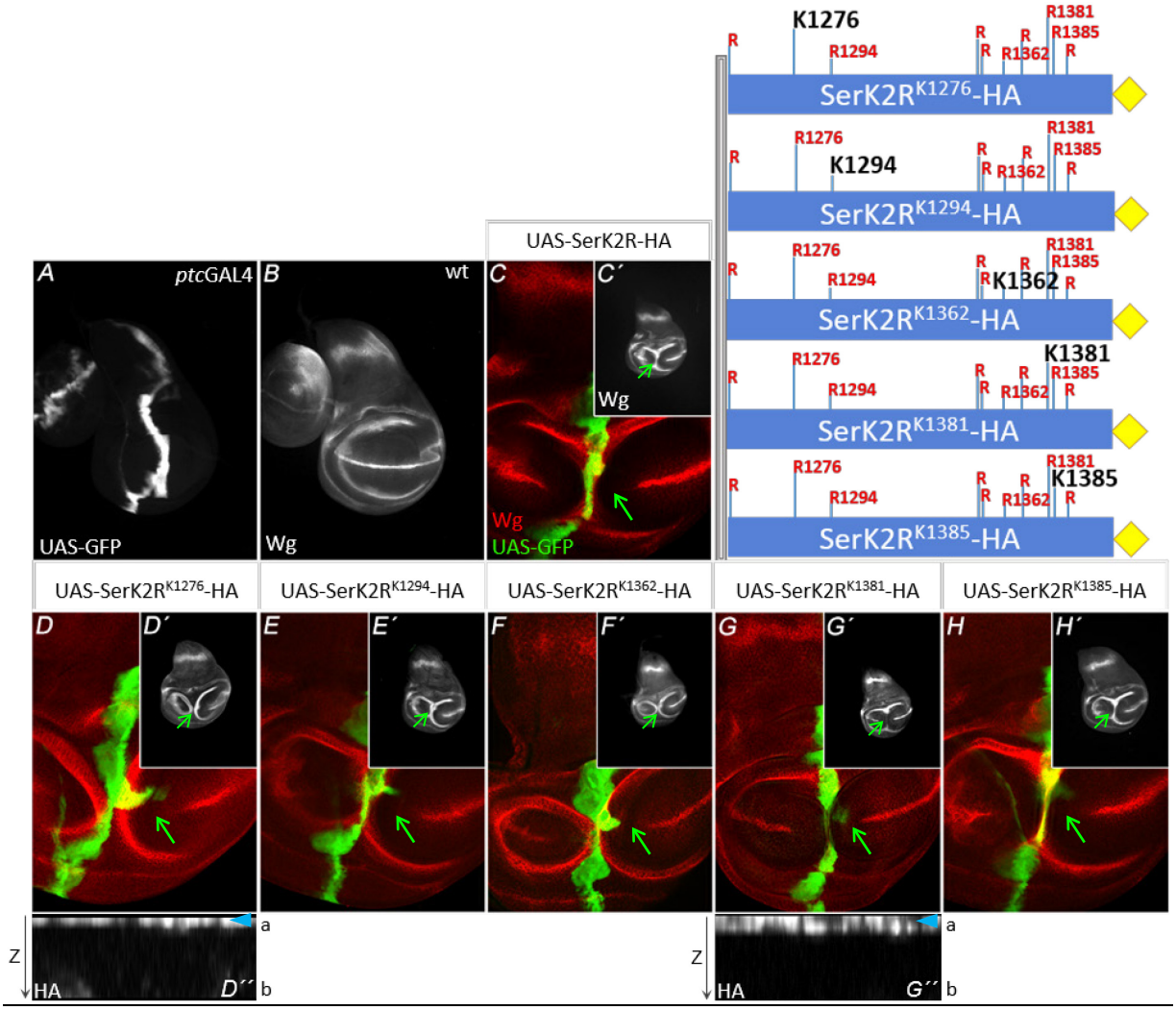


Abbildung 33: Übersicht der Expressionen von den SerK2R-K-Varianten, bei denen eines der fünf konservierten Ks in die SerK2R-ICD wieder eingeführt wurden. Alle SerK2R-Ks wurden mit *ptc*GAL4 exprimiert (A). Wie SerK2R-HA wirken SerK2R^{K1276}-HA, SerK2R^{K1294}-HA, SerK2R^{K1362}-HA, SerK2R^{K1381}-HA und SerK2R^{K1385}-HA dominant negativ und verursachen eine nicht zellautonome Unterbrechung der endogenen Wg-Expression (vgl. B mit C, C´-H, H´, grüne Pfeile). SerK2R^{K1276}-HA und SerK2R^{K1381}-HA lokalisieren ausschließlich an der apikalen Membran (D´´ und G´´, hellblaue Pfeilköpfe). In A, B, C´-H´ sind die Flügelimaginalscheiben 100-fach und in C-H 250-fach vergrößert dargestellt. Bilder D´´ und G´´ zeigen je einen vergrößerten Ausschnitt aus der Schnittansicht des Z-Stapels.

Demnach ist keines der fünf Ks einzeln ausreichend, um dem inaktiven SerK2R-Konstrukt eine Aktivierungsfähigkeit zu verleihen. Gleichzeitig scheint die Endozytose aller SerK2R-K-Varianten gestört zu sein, ähnlich wie bei SerK2R-HA.

Aus diesem Grund sollte im Anschluss untersucht werden, ob das Wiedereinführen von zwei oder drei Ks gleichzeitig für die Aktivität des SerK2R-Liganden ausreicht. Hierfür wurden Konstrukte SerK2R^{K1276,1294}-HA (Soya Kim, unveröffentlichte Daten AG Klein), SerK2R^{K1276,1294,1362}-HA (SerK2R^{KKKRR}-HA), SerK2R^{K1362,1381,1385}-HA (SerK2R^{RRKKK}-HA) und SerK2R^{K1276,1294,1385}-HA (SerK2R^{KKRRK}-HA) generiert und analysiert. All diese transgenen Liganden sind nicht in der Lage den Notch-Signalweg zu aktivieren (Abbildung 56), was darauf hindeutet, dass auch drei konservierte Ks für die Funktion von Ser nicht ausreichend sind. Daher wurden vier der fünf Ks in die ICD von SerK2R-HA eingeführt und folgende SerK2R-4K-Varianten hergestellt: SerK2R^{K1294,1362,1381,1385}-HA (SerK2R^{RKKKK}-HA), SerK2R^{K1276,1362,1381,1385}-HA (SerK2R^{KRKKK}-HA), SerK2R^{K1276,1294,1381,1385}-HA (SerK2R^{KKRKK}-HA), SerK2R^{K1276,1294,1362,1381}-HA (SerK2R^{KKKKR}-HA), SerK2R^{K1276,1294,1362,1385}-HA (SerK2R^{KKKRK}-HA). Bei der Expression von SerK2R^{RKKKK}-HA wird eine sehr schwache ektopische Wg-Expression im ventralen Kompartiment beobachtet (Abbildung 34, D, D´, gelber Pfeil). Die endogene Wg-Expression ist in diesen Flügelimaginalscheiben weiterhin unterbrochen, allerdings in einer zellautonomen Weise. Auch bei der Expression von SerK2R^{KRKKK}-HA und SerK2R^{KKKRK}-HA wird kein dominant negativer Effekt mehr beobachtet, da es diesmal zu einer zellautonomen Unterbrechung der endogenen Wg-Expression kommt (Abbildung 34, E und G, rosafarbene Pfeile). Die Beobachtung, dass die Wg-Expression bei diesen Genotypen zellautonom unterbrochen wird, lässt vermuten, dass SerK2R^{RKKKK}-HA und SerK2R^{KRKKK}-HA *cis*-inhibitorisch und nicht mehr dominant negativ wirken. Die exprimierten SerK2R^{KKRKK}-HA und SerK2R^{KKKKR}-HA zeigen dagegen einen SerK2R-ähnlichen Phänotyp und wirken dominant negativ (Abbildung 34, F, F´ und H, H´, hellgrüne Pfeile). Die Varianten SerK2R^{RKKKK}-HA und SerK2R^{KKKRK}-HA lokalisieren hauptsächlich an der apikalen Zellmembran (Abbildung 34, D´´ und G´´, hellblaue Pfeilköpfe). Die restlichen Konstrukte zeigen eine ähnliche Lokalisation (nicht gezeigt).

Zusammenfassend führt die Wiedereinführung von vier Ks in die SerK2R-ICD zu keinem aktiven Liganden. Aus diesem Grund wurden alle fünf konservierten Ks in die SerK2R-ICD zurückgebracht und SerK2R^{K1276,1294,1362,1381,1385}-HA (SerK2R-5K-HA) generiert. Ähnlich wie Ser-HA kann SerK2R-5K-HA den Notch-Signalweg ektopisch aktivieren und *cis*-inhibieren (Abbildung 35, vgl. A, A´ mit E, E´, gelbe und rosafarbene Pfeile). Durch die Ko-Expression mit UAS-N kann der *cis*-inhibitorische Effekt von SerK2R-5K-HA unterdrückt werden und es kommt zu einer starken ektopischen Aktivierung des Notch-Signalwegs in der gesamten *ptc*-Domäne (Abbildung 35, F, F´, hellblaue Pfeile). Dabei lokalisiert SerK2R-5K-HA an der Zellmembran (Abbildung 35, E´´, hellblaue Pfeilköpfe) sowie in den Vesikeln (Abbildung 35, E´´, gelbe Pfeilköpfe).

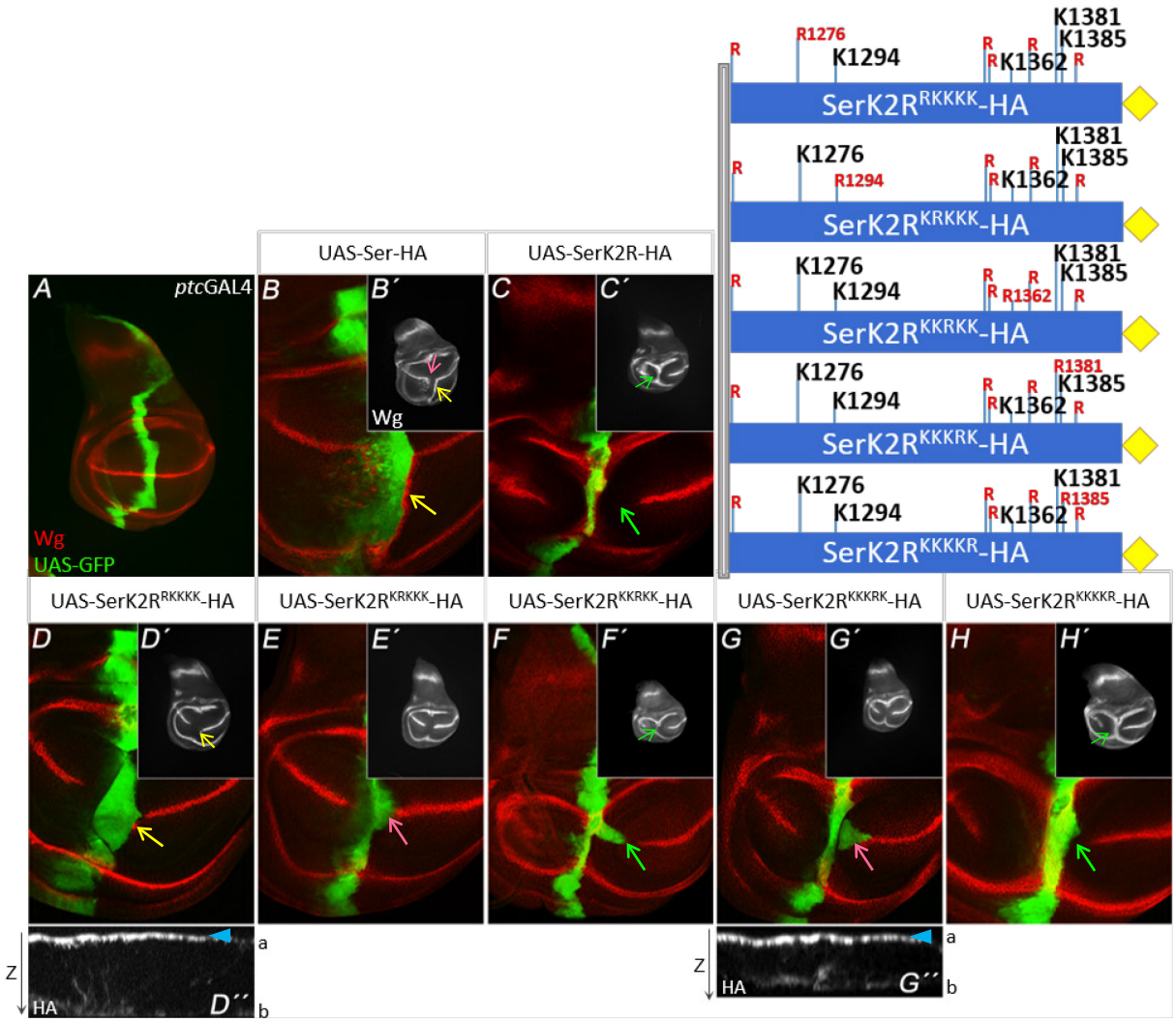


Abbildung 34: Übersicht der Expressionen von SerK2R-4K-Varianten, bei denen vier der fünf konservierten Ks in die SerK2R-ICD wieder eingeführten wurden. Die Konstrukte SerK2R^{K1294,1362,1381,1385}-HA (SerK2R^{RKKKK}-HA), SerK2R^{K1276,1362,1381,1385}-HA (SerK2R^{KRKKK}-HA), SerK2R^{K1276,1294,1381,1385}-HA (SerK2R^{KKRKK}-HA), SerK2R^{K1276,1294,1362,1385}-HA (SerK2R^{KKKRK}-HA) und SerK2R^{K1276,1294,1362,1381}-HA (SerK2R^{KKKKR}-HA) wurden mit *ptc*GAL4 exprimiert und die Wg-Expression als Aktivitätsmarker für die Notch-Aktivierung analysiert (A). Die Expression von Ser-HA führt zu einer ektopischen Wg-Expression im ventralen Kompartiment (B, B´, gelber Pfeil), während SerK2R-HA dominant negativ agiert und eine nicht zellautonome Unterbrechung der endogenen Wg-Expression verursacht (C, C´, grüner Pfeil). Bei der Expression von SerK2R^{RKKKK}-HA wird eine sehr schwache ektopische Wg-Expression nach ventral detektiert (D, D´, gelbe Pfeile). Die endogene Wg-Expression ist hierbei in einer zellautonomen Weise unterbrochen (D, D´, rosafarbener Pfeil). Ähnlich dazu bewirken SerK2R^{KRKKK}-HA und SerK2R^{KKKRK}-HA eine zellautonome Unterbrechung der endogenen Wg-Expression (E, E´, G, G´, rosafarbene Pfeile). Ähnlich wie SerK2R-HA, agieren SerK2R^{KKRKK}-HA und SerK2R^{KKKKR}-HA dominant negativ und induzieren eine nicht zellautonome Unterbrechung der endogenen Wg-Expression (vgl. F, F´ und H, H´ mit C, C´, grüne Pfeile). SerK2R^{RKKKK}-HA und SerK2R^{KKKRK}-HA lokalisieren hauptsächlich an der apikalen Zellmembran (D´´ und G´´, hellblaue Pfeilköpfe). Die Flügelimaginalscheiben sind in A, B, C´-H´100-fach, in C-H 250-fach vergrößert dargestellt. Die Bilder D´´ und G´´ zeigen je Ausschnitt aus der Schnittansicht des Z-Stapels in der 630-er Vergrößerung.

Wie in der Einleitung erwähnt, induzieren in den späteren Stadien der Flügelentwicklung die Liganden Dl und Ser die Aktivierung des Notch-Signalwegs entlang der d/v-Grenze, worauf die Expression von *wg* eingeschaltet wird. Wg aktiviert seinerseits die Expression der Liganden in den benachbarten Zellen (Abbildung 6). Durch diese Dl/Ser/Wg-Schleife werden die *wg*-

Expression in den Grenzzellen und die Liganden-Expression in den angrenzenden Zellen aufrechterhalten. Daher wäre es möglich, dass eine leichte ektopische Aktivierung des Notch-Signalwegs indirekt zu einer Hochregulation der endogenen Liganden führen kann. Diese wiederum könnten zur ektopischen Aktivierung des Notch-Signalwegs beitragen, was zu einer ektopischen *wg*-Expression führen könnte. Aus diesem Grund sollte ausgeschlossen werden, dass die bei der SerK2R-5K-HA-Expression beobachtete ektopische Wg-Expression indirekt durch die endogenen Liganden induziert wird. Hierfür wurde SerK2R-5K-HA mithilfe des MARCM-Systems in den *Dl* und *Ser* doppelmutanten Zellen exprimiert. Ein Ausfall beider Liganden resultiert in einer nicht zellautonomen Unterbrechung der Wg-Expression an der d/v-Grenze ((Abbildung 35, I, I´, weiße Pfeile und weiße Klammer) und [24]). Dabei schalten die *Dl, Ser*-mutanten Zellen die Wg-Expression ein, wenn sie an die wildtypischen Zellen angrenzen. Diese Beobachtung lässt sich dadurch erklären, dass die *Dl, Ser*-mutanten Zellen keine Liganden exprimieren, die N-Rezeptoren aber noch besitzen. Daher kommt es innerhalb der Klone zu freien N-Rezeptoren, die nicht durch die Liganden *cis*-inhibiert werden. Diese Rezeptoren können durch die Liganden der benachbarten wildtypischen Zellen transaktiviert werden [23, 24] . Umgekehrt verhält es sich, wenn Ser-HA in einem wildtypischen Zellklon überexprimiert wird. Der ektopisch exprimierte Ligand kann die N-Rezeptoren in einem Zelldurchmesser außerhalb der Zellklone *trans*-aktivieren (Abbildung 35, D, D´, gelber Pfeil). Innerhalb der Zellklone kommt es infolge einer hohen Liganden-Konzentration zur *Cis*-Inhibition und somit zu einer Unterdrückung der Wg-Expression (Abbildung 35, D, D´, rosafarbener Pfeil). Der gleiche Effekt wird beobachtet, wenn Ser-HA in *Dl, Ser*-mutanten Zellklonen exprimiert wird (Abbildung 35, C, C´). Diese Ergebnisse zeigen, dass Ser-HA auch in Abwesenheit von den endogenen Liganden sowohl *trans*-aktivierend als auch *cis*-inhibierend wirken kann (Abbildung 35, C, C´ gelbe und rosafarbene Pfeile). Dieselbe Situation kann auch beobachtet werden, wenn SerK2R-5K-HA exprimiert wird. Es wird eine *Trans*-Aktivierung des Notch-Signalwegs in einem Zelldurchmesser außerhalb der Zellklone (Abbildung 35, G, G´ und H, H´, gelbe Pfeile) sowie eine Unterdrückung der Notch-Aktivität innerhalb der Zellklone beobachtet (Abbildung 35, G, G´ und H, H´, rosafarbene Pfeile). Diese Beobachtungen legen nahe, dass die Ks 1276, 1294, 1362, 1381, 1385 in der Ser-ICD für die volle Funktion des Liganden notwendig und ausreichend sind. Somit werden mindestens fünf Ks in der ICD von Ser für eine effektive Signaltransduktion des Notch-Signalwegs benötigt.

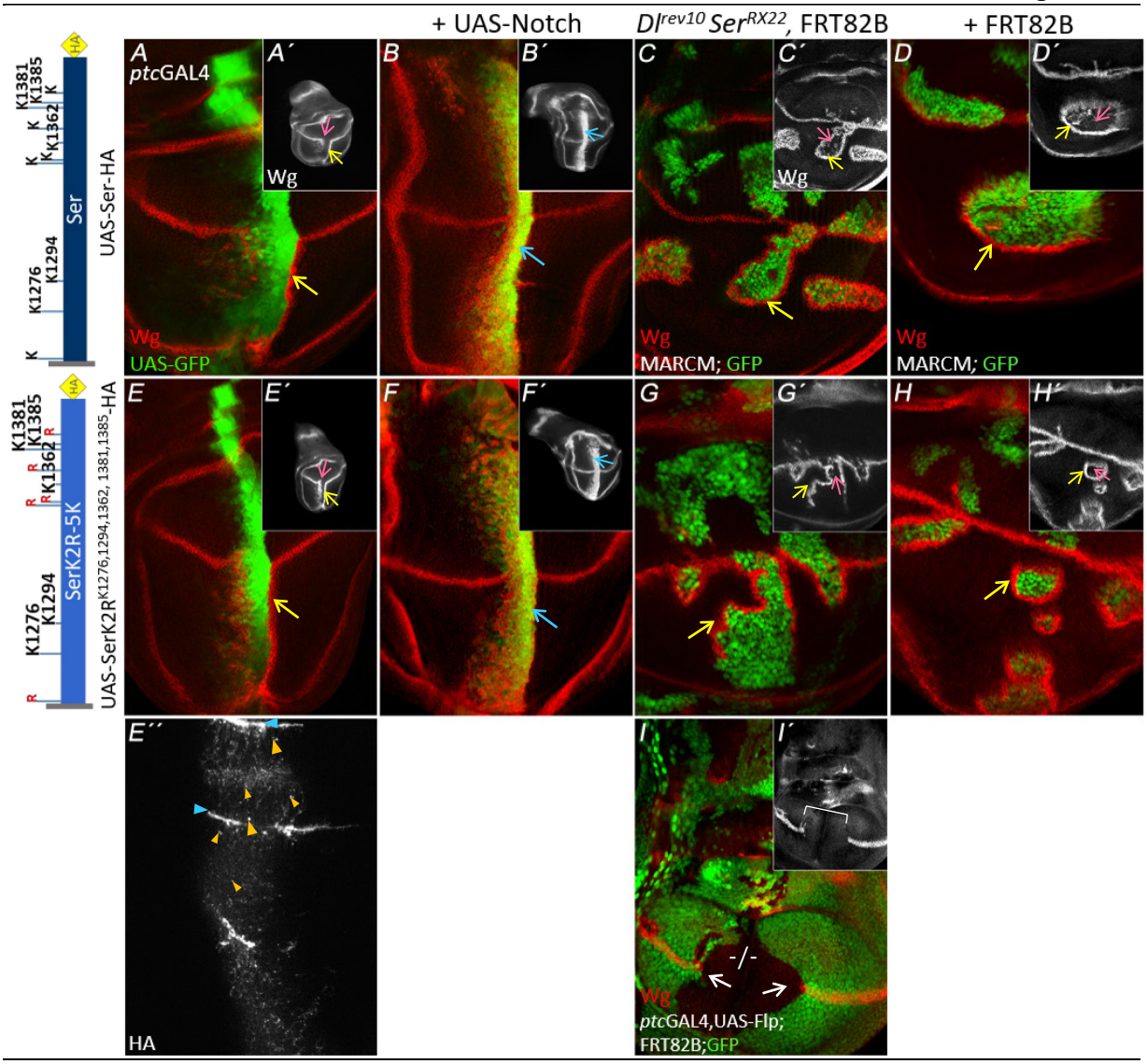


Abbildung 35: Übersicht der Expressionen von SerK2R^{K1276,1294,1362,1381,1385}-HA (SerK2R-5K-HA). Bei SerK2R-5K-HA wurden alle fünf am stärksten konservierten Ks in die SerK2R-ICD wieder eingeführt. Die Expressionen von Ser-HA und SerK2R-5K-HA resultieren in einer ektopischen Aktivierung des Notch-Signalwegs im ventralen Kompartiment (A, A´ und E´, E, gelbe Pfeile). SerK2R-5K-HA lokalisiert an der apikalen Membran (E´´, hellblaue Pfeilköpfe) und in den Vesikeln (E´´, gelbe Pfeilköpfe). Die Ko-Expression von Ser-HA und SerK2R-5K-HA mit UAS-N führt zu einer starken zellautonomen ektopischen Wg-Expression in der gesamten *ptc*-Domäne (B, B´ und F,F´, hellblauen Pfeile). Um zu analysieren, ob SerK2R-5K-HA in Abwesenheit von den endogenen Dl- und Ser-Liganden *trans*-aktivieren kann, wurden Ser-HA und SerK2R-5K-HA mittels des MARCM-Systems in *Dl, Ser*-doppelmutanten Zellklonen exprimiert. Die doppelmutanten Zellklone sind dabei durch eine GFP-Fluoreszenz markiert (C, C´, G, G´). Als Kontrolle wurden *Dl, Ser*-doppelmutante Zellklone mit dem FLP-FRT-System generiert. Die mutanten Zellen sind hierbei durch fehlende GFP-Fluoreszenz markiert (I, gekennzeichnet durch -/-). Ein kompletter Verlust beider Liganden resultiert in einer nicht zellautonomen Unterbrechung der endogenen Wg-Expression (I, I, weiße Pfeile und weiße Klammer). Die *Dl, Ser*-doppelmutanten Zellen, die an die wildtypischen Zellen angrenzen, schalten dabei die Wg-Expression ein (I). Ähnlich wie in der wildtypischen Situation, induzieren die in den *Dl, Ser*-doppelmutanten Zellklonen exprimierten Ser-HA und SerK2R-5K-HA eine ektopische Wg-Expression in den benachbarten wildtypischen Zellen (G, G´ und H, H´, gelbe Pfeile). Die ektopische Wg-Expression bei der SerK2R-5K-HA-Expression ist dabei vergleichbar mit der ektopischen Wg-Expression bei der Ser-HA-Expression (vgl. C, C´ und D, D´ mit G, G´ und H, H´ gelbe Pfeile). Aufgrund der *cis*-inhibitorischen Wirkung beider Liganden, findet innerhalb der *Dl, Ser*-mutanten Zellklone keine Aktivierung der Wg-Expression statt (C, C´, D, D´, G, G´, H, H´, rosafarbene Pfeile). Die Flügelimaginalscheiben sind in A´, B´, E´, F´ 100-fach, in A-I und C´, D´, G´-I´ 250-fach und in E´´ 630-fach vergrößert dargestellt.

3.3.3 K1370 kann den Verlust eines der konservierten Ks kompensieren

Die Unfähigkeit aller SerK2R-4K-Varianten das Notch-Signal auszulösen, lässt schlussfolgern, dass vier der fünf konservierten Ks für die volle Funktion von Ser nicht ausreichend sind. Gleichzeitig sind jedoch Ser-Rs, Varianten mit einzelnen K zu R- Austauschen, in der Lage den Notch-Signalweg ektopisch zu aktivieren. Die einzige Ausnahme stellt Ser^{R1362}-HA dar, das zu keiner Aktivierung des Notch-Signalwegs fähig ist. Somit sind bei den Ser-R-Varianten, ähnlich wie bei den SerK2R-4K-Varianten, nur vier der fünf konservierten Ks vorhanden (Zusammengefasst in der Abbildung 55). Dies bedeutete, dass Ser-HA ein weiteres K für die volle Funktion besitzt, welches in den ICDs von SerK2R-4K-Varianten fehlt. Daher wurde im weiteren Verlauf ein K an der Position 1370 ausgesucht, das weniger stark konserviert ist (Abbildung 29). K1370 wurde anschließend in die SerK2R-4K-Varianten wieder eingeführt und dadurch weitere SerK2R-5K-Varianten generiert. Des Weiteren wurden alle fünf konservierten und K1370 in die ICD von SerK2R-HA zurückgebracht und ein SerK2R-6K-HA hergestellt. Im Rahmen dieser Arbeit konnten nur die Varianten $SerK2R^{K1294,1362,1370,1381,1385}$-HA ($SerK2R^{RKKKK}$+K1370-HA) und $SerK2R^{K1276,1294,1362,1370,1381}$-HA ($SerK2R^{KKKKR}$+K1370-HA) analysiert werden. Für die restlichen Konstrukte war die Transgenese ohne Erfolg. Die Expression von $SerK2R^{RKKKK}$+K1370-HA und $SerK2R^{KKKKR}$+K1370-HA resultiert in einer ektopischen Aktivierung des Notch-Signalwegs, die mit der Aktivierung durch Ser-HA vergleichbar ist (Abbildung 36, vgl. B, B´ mit C, C´ und D, D´, gelbe Pfeile). Dabei scheinen die Varianten $SerK2R^{RKKKK}$+K1370-HA und $SerK2R^{KKKKR}$+K1370-HA etwas stärker *cis*-inhibitorisch als Ser-HA zu wirken (Abbildung 36, vgl. B mit C und D, rosafarbene Pfeile). Somit sind auch diese fünf Ks für die Aktivität von Ser ausreichend. Es wäre nicht auszuschließen, dass ein K an einer anderen Position ebenfalls zur Aktivität von Ser beitragen könnte. Diese Möglichkeit wurde aber in dieser Arbeit nicht überprüft, aufgrund eines niedrigeren Konservierung-Grades der restlichen Ks.

Zusammenfassend demonstrieren die Untersuchungen von den eingeführten Rs in die Ser-ICD und wieder eingeführten Ks in die SerK2R-ICD, dass von den fünf konservierten Ks nur K1362 für die volle Ser-Funktion essentiell ist. Gleichzeitig ist es allein nicht ausreichend, um die sonst K-freie ICD zu aktivieren und es werden mindestens fünf Ks für die volle Ser-Aktivität benötigt. Die restlichen vier Ks sind hierbei nicht alle gleichbedeutend. So sind K1381 und K1385 für die Ser-Aktivität wichtiger als K1276 und K1294. Außerdem kann ein weniger stark konserviertes K1370 den Verlust einzelner konservierter Ks kompensieren.

Darüber hinaus kann eine Abhängigkeit der Liganden-Aktivität von der Endozytose der Ser-Varianten festgestellt werden. Dabei können die Liganden, die nicht endozytiert werden, den Notch-Signalweg nicht aktivieren und wirken *cis*-inhibitorisch oder dominant negativ.

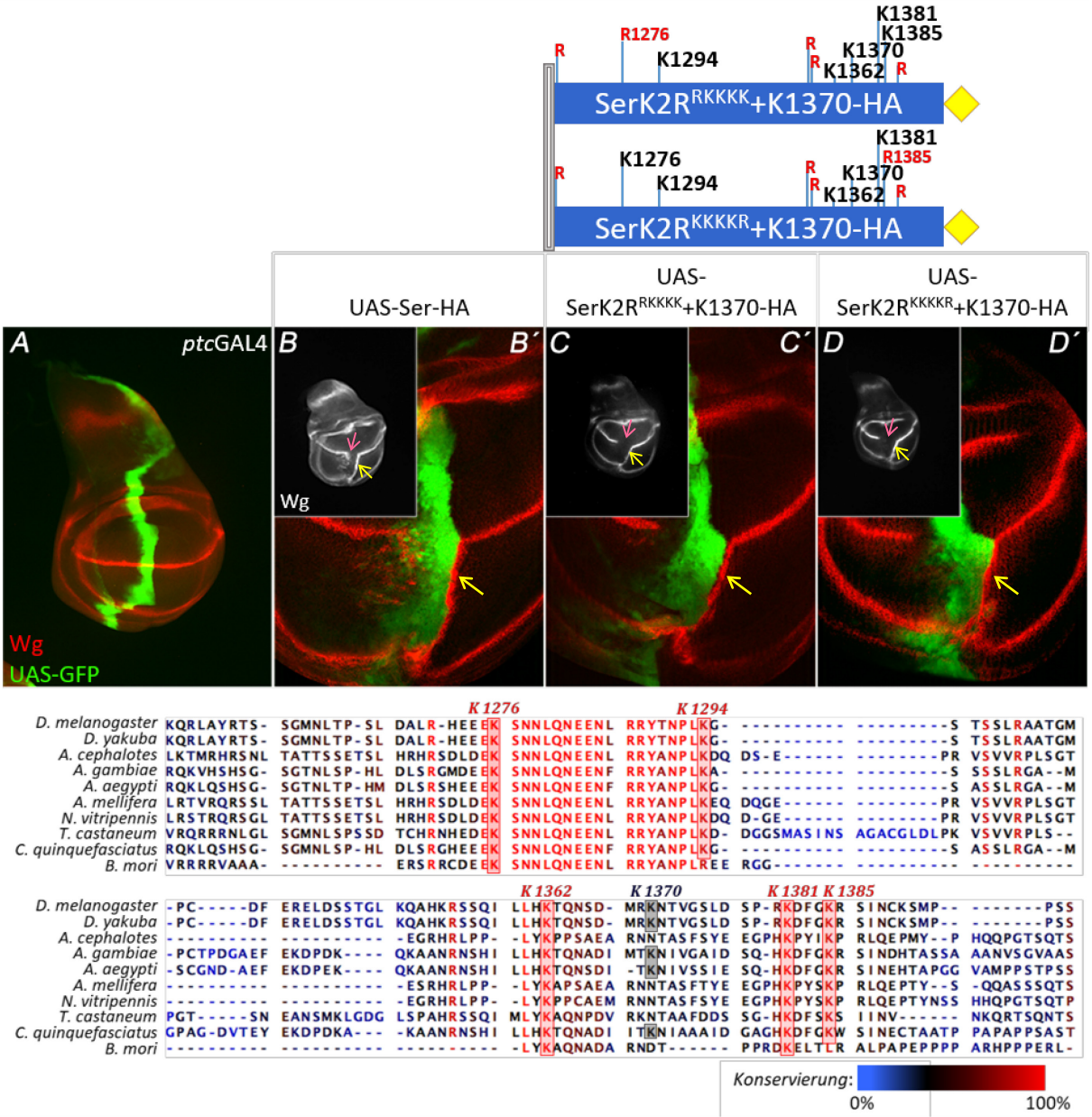


Abbildung 36: Übersicht der Expressionen von SerK2R-4Ks+K1370-Varianten. Bei diesen Konstrukten wurden vier der fünf konservierten Ks und K1370 in die SerK2R-ICD wieder eingeführt. Die transgenen Liganden wurden mit *ptc*GAL4 exprimiert (A). Sowohl SerK2R^{K1294,1362,1370,1381,1385}-HA (SerK2R^{RKKKK}+K1370-HA) als auch SerK2R^{K1276,1294,1362,1370,1381}-HA (SerK2R^{KKKKR}+K1370-HA) sind in der Lage den Notch-Signalweg im ventralen Kompartiment ektopisch zu aktivieren, vergleichbar mit Ser-HA (vgl. B-B´ mit C-C´ und D-D´, gelbe Pfeile). Dabei scheinen diese Varianten etwas stärker *cis*-inhibitorisch als Ser-HA zu wirken (vgl. B mit C und D, rosafarbene Pfeile). Die Flügelimaginalscheiben sind in A-D 100-fach, in B´- D´ 250-fach vergrößert dargestellt.

3.4 Analyse der Expression von Neur auf die Aktivität von Ser

In der Flügelimaginalscheibe ist Mib1 ubiquitär und Neur nur in den Sensorischen Mutterzellen exprimiert [45]. In der vorigen Publikation wurde gezeigt, dass Neur die Mib1-unabhängige Restaktivität von Dl und von DlK2R deutlich steigern kann. Darüber hinaus erfolgt diese Steigerung der Dl-Aktivität durch Neur unabhängig von der RING-Domäne von Neur, sie ist jedoch abhängig von der Bindung an den Liganden [28].

Daher sollte überprüft werden, ob Neur das inaktive SerK2R-HA, ähnlich wie DlK2R, aktivieren kann. Anschließen sollte untersucht werden, welche Domänen von Neur hierfür benötigt werden. Für diese Fragestellung wurde SerK2R-HA mit Neur und mit modifizierten Neur-Varianten ko-exprimiert. Alle Neur-Varianten sind UAS-Konstrukte (Abbildung 37). Dabei beinhaltet Neur-Myc die vollständige Aminosäuresequenz von Neur. Bei den Konstrukten NeurΔNHR1-V5 und NeurΔNHR2-V5 wurden jeweils die NHR1- oder die NHR2-Domänen deletiert. NeurΔNHR1-V5 ist nicht in der Lage an den Liganden zu binden, da die deletierte NHR1-Domäne für die Liganden-Bindung notwendig ist [53]. Während NeurΔNHR2-V5 noch in der Lage ist mit dem Liganden zu interagieren, ist es jedoch nicht völlig funktional [55]. Bei dem Konstrukt NeurΔR-GFP wurde die katalytische RING-Domäne deletiert. Diese Neur-Variante ist nicht mehr in der Lage das Substrat zu ubiquitinieren [46]. Bei dem Konstrukt Neur5Q-V5 wurden Punktmutationen in das PIP_2-Bindemotiv eingeführt, so dass diese Neur-Variante im Zytoplasma, und nicht an der Zellmembran, in S2-Zellen fehllokalisiert [57].

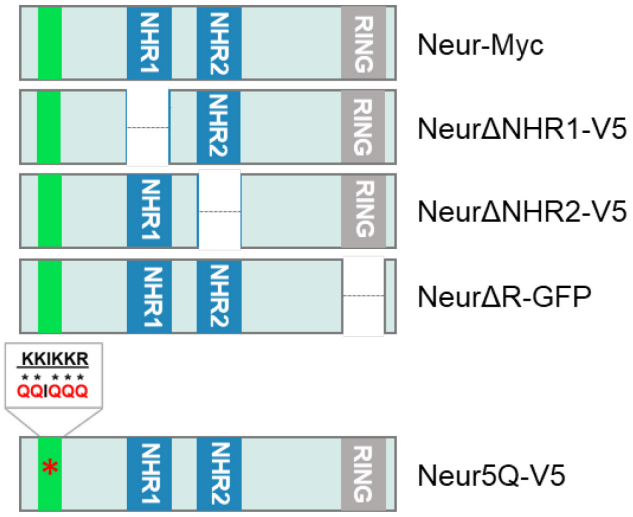


Abbildung 37:Schematische Darstellung der Neur-Varianten. Alle Konstrukte sind UAS-Konstrukte. Dabei handelt es sich bei Neur-Myc um ein vollständiges Myc-markiertes Protein. Bei den Deletionskonstrukten NeurΔNHR1-V5, NeurΔNHR2-V5 und NeurΔR-GFP wurden jeweils die NHR1-, NHR2- oder RING- Domänen deletiert. Das Konstrukt Neur5Q-V5 enthält ein mutiertes PIP_2-Bindemotiv. Die Konstrukte NeurΔNHR1, NeurΔNHR2 und Neur5Q tragen eine V5-Markierung, während NeurΔR mit einem GFP versehen ist. Alle Markierungen befinden sich auf dem C-Terminus der jeweiligen Variante.

Alle Neur-Konstrukte sind mit einem C-terminalen Tag versehen. Das vollständige Neur ist hierbei mit einem Myc-Tag, während NeurΔNHR1-V5, NeurΔNHR2-V5 und Neur5Q-V5 mit einem V5-Tag markiert sind. NeurΔR-GFP trägt eine GFP-Markierung. Alle Neur-Varianten wurden durch

zufällige Insertionen ins Genom der Fliege integriert und können daher durch unterschiedliche Positionseffekte nicht direkt miteinander verglichen werden.

3.4.1 Neur kann Ser Mib1-und Ks-unabhängig aktivieren

Die transgenen Ser-HA und SerK2R-HA-Liganden wurden mittels *ptc*GAL4 mit Neur und den Neur-Varianten kontinuierlich ko-exprimiert. Im wildtypischen Hintergrund hat die alleinige Expression von allen Neur-Varianten keine Auswirkung auf die endogene Notch-Aktivität (Abbildung 38, vgl. A mit B-F und Abbildung 59, vgl. A mit B-F).

Die Ko-Expression von Ser-HA mit Neur-Myc, NeurΔNHR1-V5, NeurΔNHR2-V5 und Neur5Q-V5 resultiert in einer ektopischen Aktivierung des Notch-Signalwegs im ventralen Kompartiment, vergleichbar mit der alleinigen Ser-HA-Expression (Abbildung 38, vgl. G mit H-J und L, gelbe Pfeile und Abbildung 59, vgl. G mit H-J). Eine Ko-Expression von Ser-HA mit NeurΔR-GFP führt hingegen zu einer Suppression, sowohl der ektopischen als auch der endogenen Notch-Aktivität (Abbildung 38, K, rosafarbene Pfeile und Abbildung 59, K).

Interessanterweise induziert eine Ko-Expression von SerK2R-HA mit Neur-Myc eine ektopische Wg-Expression im ventralen Kompartiment (Abbildung 38, vgl. M mit N, gelber Pfeil). Diese ektopische Wg-Expression ist etwas schwächer als nach der Ko-Expression mit Ser-HA (Abbildung 38, vgl. H mit N, gelbe Pfeile), dennoch stellt sie eine deutliche Steigerung der Aktivität des ansonsten dominant negativen SerK2R-HA dar (Abbildung 38, vgl. M mit N und Abbildung 59, vgl. M mit N). Um auszuschließen, dass diese ektopische Wg-Expression durch die endogenen Liganden indirekt induziert wird, wurden SerK2R-HA mit Neur in den *Dl, Ser*-doppelmutanten Klonen exprimiert (Abbildung 60, B, B´). Für diesen Zweck wurden zuerst SerK2R-HA mit UAS-Neur auf einem Chromosom rekombiniert (in Zusammenarbeit mit Jessica Langenbach, Masterarbeit 2015). Bei der Ko-Expression von SerK2R-HA mit Neur in den *Dl, Ser*-mutanten Zellklonen wird eine ektopische Wg-Expression in den wildtypischen an den Klon angrenzenden Zellen beobachtet (Abbildung 60, B, B´, gelbe Pfeile). Innerhalb der mutanten Zellklone kommt es infolge der *Cis*-Inhibition zu einer Unterbrechung der Wg-Expression (Abbildung 60, B, B´, rosafarbene Pfeile). Demzufolge wird die ektopische Aktivierung des Notch-Signalwegs direkt durch die Ko-Expression von SerK2R-HA mit Neur eingeleitet und nicht indirekt durch die endogenen Liganden. Die Ko-Expression von SerK2R-HA mit allen weiteren Neur-Varianten, NeurΔNHR1-V5, NeurΔNHR2-V5, NeurΔR-GFP und Neur5Q-V5, führt zu keiner Aktivierung des Notch-Signalwegs und weist den dominant negativen Effekt von SerK2R-HA auf (Abbildung 38, vgl. M mit O-R, grüne Pfeile und Abbildung 59). Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass für die Aktivierung von SerK2R-HA durch Neur die NHR1-, NHR2 und die RING-Domänen, sowie das PIP_2-Bindemotiv von Neur benötigt werden.

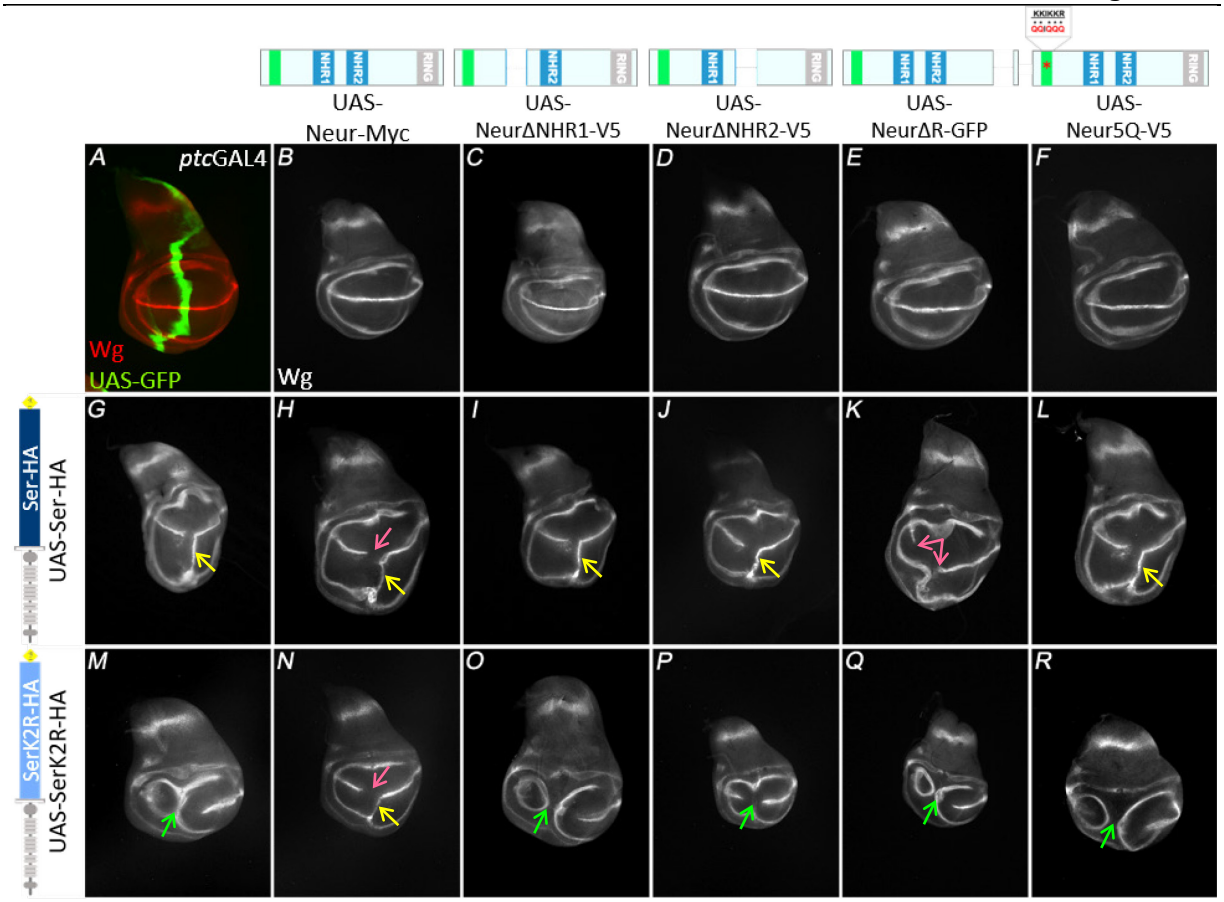


Abbildung 38: Ko-Expressionen von Ser-HA und SerK2R-HA mit Neur-Varianten im wildtypischen Hintergrund. Alle Konstrukte wurden mit *ptc*GAL4 exprimiert (A, visualisiert durch die GFP-Fluoreszenz). Die alleinige Expression von Neur-Myc, NeurΔNHR1-V5, NeurΔNHR2-V5, NeurΔR-GFP sowie Neur5Q-V5 hat keinen Einfluss auf die endogene Wg-Expression (vgl. A mit B-F). Eine Ko-Expression von Ser-HA mit allen Neur-Varianten, mit der Ausnahme von NeurΔR-GFP, resultiert in einer ektopischen ventralen Aktivierung des Notch-Signalwegs (H-J und L, gelbe Pfeile). Ko-Expression von Ser-HA und NeurΔR-GFP führt zu einer Repression sowohl der ektopischen als auch der endogenen Wg-Expression (vgl. A und G mit K, rosafarbene Pfeile). Ko-Expression von SerK2R-HA mit dem Neur-Myc resultiert in einer ektopischen Aktivierung des Notch-Signalwegs im ventralen Kompartiment, die ein wenig schwächer ist als nach der Ko-Expression mit Ser-HA (vgl. H mit N, gelbe Pfeile). Im Gegensatz zur *Trans*-Aktivierung ist die *cis*-inhibitorische Eigenschaft von SerK2R-HA vergleichbar mit der von Ser-HA (vgl. H und N, rosafarbene Pfeile). Nach der Ko-Expression von SerK2R-HA mit allen weiteren Neur-Varianten kann der dominant negative Effekt von SerK2R-HA und keine Aktivierung des Notch-Signalwegs beobachtet werden (vgl. M mit O-R, grüne Pfeile). Die Flügelimaginalscheiben sind in A-R 100-fach vergrößert dargestellt.

Um eine Beeinflussung der zuvor gezeigten Ergebnisse durch die E3-Ubiquitin-Ligase Mib1 auszuschließen, wurden Ser- und SerK2R-HA mit Neur-Varianten anschließend im *mib1*-mutanten Hintergrund ko-exprimiert.

Wie bereits in voriger Publikation beschrieben, sind die *mib1*-mutanten Flügelimaginalscheiben deutlich kleiner als wildtypische und weisen keine Aktivierung des Notch-Signalwegs an der d/v-Grenze auf ([28] und (Abbildung 39, A, A´)). Die alleinigen Expressionen von Ser-HA und SerK2R-HA in *mib1*-mutanten Flügelimaginalscheiben haben keine Auswirkung auf diese fehlende Notch-Aktivität ([28] und (Abbildung 39, vgl. A, A´ mit G, G´, M, M´)). Die Expression von Neur-Myc, NeurΔNHR2-V5 und Neur5Q-V5 im *mib1*-mutanten Hintergrund resultiert in einer Aktivierung des Notch-Signalwegs, die mit Hilfe des sensitiven Gbe+Su(H)-Reporters detektiert wird (Abbildung 39, B, D, F, gelbe Pfeile). Diese Aktivierung ist bei der Expression von Neur-Myc und

NeurΔNHR2-V5 sogar stark genug, um die endogene Wg-Expression an der d/v-Grenze innerhalb der *ptc*-Domäne wiederherzustellen ([28] und (Abbildung 39, B´, D´, gelbe Pfeile)). Im Gegensatz dazu resultiert die Expression von NeurΔNHR1-V5 und NeurΔR-GFP in keiner Aktivierung des Notch-Signalwegs in *mib1*-mutanten Flügelimaginalscheiben (Abbildung 39, C, C´ und E, E´). Da dem Konstrukt NeurΔNHR1-V5 die Liganden-bindende Domäne fehlt, kann es mit den endogenen Liganden nicht interagieren und daher nicht zu einer Aktivierung beitragen. NeurΔR-GFP besitzt keine katalytische RING-Domäne und kann daher den Liganden nicht ubiquitinieren und folglich dessen Endozytose nicht einleiten.

Durch Ko-Expression mit Neur-Myc oder NeurΔNHR2-V5 kann Ser-HA im *mib1*-mutanten Hintergrund den Notch-Signalweg ektopisch aktivieren (Abbildung 39, H, H´ und J, J´). Hierbei ist die ektopische Aktivierung des Notch-Signalwegs sogar stark genug um eine ektopische Wg-Expression zu induzieren (Abbildung 39, H´ und J´, gelbe Pfeile). Während bei der Ko-Expression von Ser-HA mit Neur5Q-V5 eine schwache Aktivierung des Notch-Signalwegs anhand der Gbe+Su(H)-Expression zu sehen ist (Abbildung 39, L, gelber Pfeil), hat eine Ko-Expression mit NeurΔNHR1-V5 oder mit NeurΔR-GFP hingegen keinen Einfluss auf die fehlende Notch-Aktivität an der d/v-Grenze (Abbildung 39, vgl. G, G´ mit I, I´ und K, K´).

Ähnlich wie in der wildtypischen Situation kommt es bei einer Ko-Expression von SerK2R-HA mit Neur-Myc auch im *mib1*-mutanten Hintergrund zur ektopischen Aktivierung des Notch-Signalwegs (Abbildung 39, N, N´ gelbe Pfeile). Diese ektopische Aktivierung ist sogar ausreichend, um eine ektopische Wg-Expression einzuleiten (Abbildung 39, N´, gelber Pfeil). Die Ko-Expression von SerK2R-HA mit den restlichen Neur-Varianten, NeurΔNHR1-V5, NeurΔNHR2-V5, NeurΔR-GFP und Neur5Q-V5, führt dagegen zu keiner Aktivierung des Notch-Signalwegs (Abbildung 39, vgl. M, M´ mit O, O´-R, R´).

Diese Ergebnisse bestätigen die bereits beschriebenen Beobachtungen, dass Neur Mib1 funktionell ersetzen kann [28, 43], wofür die Bindung an den Liganden benötigt wird [28]. Darüber hinaus demonstrieren die Ergebnisse der Ko-Expressionen, dass Neur nicht nur Ser, sondern auch SerK2R-HA aktivieren kann. Somit ist Neur in der Lage das inaktive und dominant negative SerK2R-HA in einen aktiven Liganden zu transformieren. Diese Transformation benötigt sowohl die beiden NHR- sowie die RING-Domänen als auch das PIP_2-Bindemotiv von Neur. Interessanterweise wird für die Aktivierung von Ser-HA keine NHR2-Domäne benötigt, während sie für die Aktivierung von SerK2R-HA notwendig ist. Zusammenfassend, wird für die K-unabhängige Aktivierung von Ser durch Neur die Bindung an den Liganden, eine Assoziation mit der Membran und die E3-Ligase Aktivität von Neur benötigt.

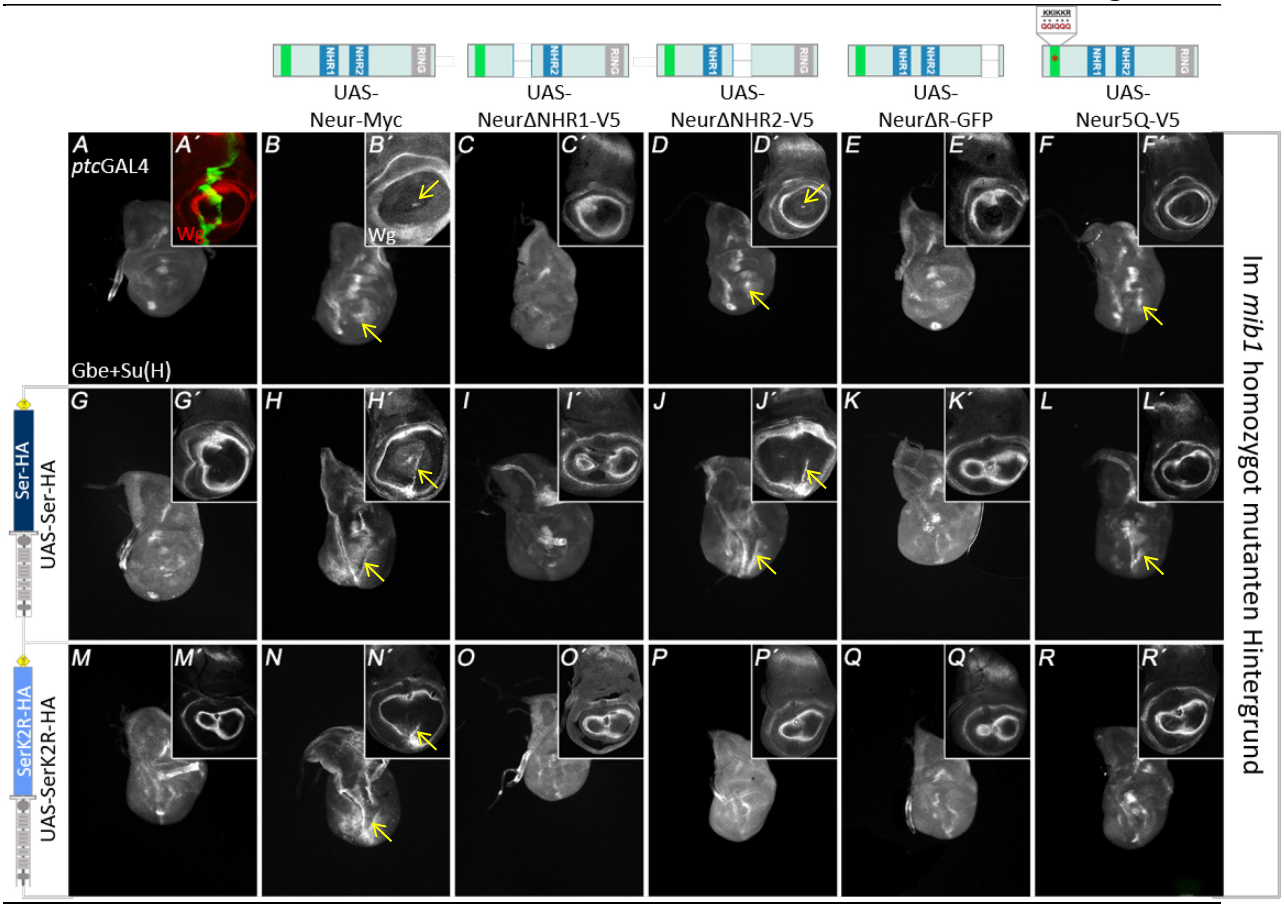


Abbildung 39: Ko-Expressionen von Ser-HA und SerK2R-HA mit Neur-Varianten im *mib1*-mutanten Hintergrund. Die *mib1*-mutanten Flügelimaginalscheiben sind deutlich kleiner als die wildtypischen und zeigen keine Notch-abhängige Wg- und keine Gbe+Su(H)-Expression an der d/v-Grenze (A, A´). Alle transgenen Konstrukte wurden mit *ptc*GAL4 exprimiert (A´). Eine alleinige Expression von Neur-Myc, NeurΔNHR2-V5 und Neur5Q-V5 führt zu einer leichten ektopischen Aktivierung des Notch-Signalwegs, die mit Hilfe des sensitiveren Gbe+Su(H)-Expression sichtbar wird (B, D, F, gelbe Pfeile). Darüber hinaus führt die Expression von Neur-Myc und NeurΔNHR2-V5 zu Wiederherstellung der endogenen Wg-Expression an der d/v-Grenze in der *ptc*-Expressionsdomäne (B´ und D´, gelbe Pfeile). Die alleinige Expression von NeurΔNHR1-V5 und NeurΔR-GFP führt hingegen zu keiner Aktivierung des Notch-Signalwegs in der Flügeltasche (vgl. A mit C, C´ und E, E´). Die alleinige Expression von Ser-HA oder SerK2R-HA zeigt ebenfalls keinen Effekt auf die Aktivierung des Notch-Signalwegs (vgl. A mit G, G´ und M, M´). Ko-Expression von Ser-HA mit Neur-Myc oder NeurΔNHR2-V5 führt zu einer ektopischen Aktivierung des Notch-Signalwegs, die in einer ektopischen Wg-Expression resultiert (H, H´ und J, J´, gelbe Pfeile). Nach Ko-Expression von Ser-HA mit NeurΔNHR1-V5 oder NeurΔR-GFP dagegen wird keine Aktivierung des Notch-Signalwegs detektiert (I, I´ und K, K´). Die Ko-Expression von Ser-HA mit Neur5Q-V5 führt zu einer schwachen Aktivierung, die nur anhand der Gbe+Su(H)-Expression detektiert werden kann (L, L´, gelber Pfeil). Während Ko-Expression von SerK2R-HA mit Neur-Myc eine ektopische Wg-Expression induziert (N, N´, gelbe Pfeile), wird nach den Ko-Expressionen von SerK2R-HA mit NeurΔNHR1-V5, NeurΔNHR2-V5, NeurΔR-GFP oder Neur5Q-V5 keine Aktivierung des Notch-Signalwegs beobachtet (O, O´- R, R´). Die Flügelimaginalscheiben sind in A-R 100-fach und in A´-R´ 250-fach vergrößert dargestellt.

Die Notwendigkeit der RING-Domäne von Neur für die Aktivierung von SerK2R-HA deutet darauf hin, dass eine Neur-vermittelte Ubiquitinierung essentiell ist. Andererseits wäre es möglich, dass die RING-Domäne selbst und nicht die katalytische E3-Ligase Aktivität von Neur benötigt wird. Daher sollte untersucht werden, ob die RING-Domäne per se oder die Ubiquitinierung durch Neur benötigt wird. Um dies zu untersuchen, wurde SerK2R-HA mit Neur im *lqf*-heterozygot mutanten Hintergrund ko-exprimiert. Dabei kann die Abhängigkeit der ektopischen Notch-Aktivierung bei

einer Ko-Expression von SerK2R-HA mit Neur von der Lqf-Funktion festgestellt werden (in Zusammenarbeit mit J. Langenbach, Masterarbeit 2015). So resultiert die Ko-Expression von SerK2R-HA mit Neur im wildtypischen Hintergrund in einer ektopischen Wg-Expression, während in *lqf*-heterozygot mutanter Situation keine ektopische Wg-Expression mehr zu sehen ist (Abbildung 40, vgl. D, D´ mit E, E´, gelbe und rosafarbene Pfeile).

Um eine Abhängigkeit von der Ubiquitinierung für die SerK2R-HA-Aktivierung durch Neur zu untersuchen, wurden diese Transgene im *lqf*-mutanten Hintergrund ko-exprimiert. Zusätzlich wurde das Konstrukt Lqf-UIM1$^{EEE-AAA}$ +ΔUIM2-GFP exprimiert, welches über keine funktionalen Ubiquitin-interagierenden Motive verfügt. Wie zuvor beschrieben ist Lqf-UIM1$^{EEE-AAA}$+ΔUIM2-GFP in der Lage die *lqf*-mutante Situation partiell zu retten (3.2.5). Die Flügelimaginalscheiben zeigen dabei keine Aktivierung des Notch-Signalwegs innerhalb des Flügelfeldes ([28] und (Abbildung 40, C)). Ko-Expression von SerK2R-HA mit Neur in diesem genetischen Hintergrund führt zu keiner Aktivierung des Notch-Signalwegs (Abbildung 40, vgl. C mit F). Hierbei ist zu beachten, dass in diesem genetischen Hintergrund keine HA-Detektion möglich ist (nicht gezeigt). Die Fliegenstämme wurden mehrmals neu etabliert und überprüft. Während bei den Kontrollkreuzungen ein HA-Signal zu beobachten ist, kann im *lqf*-mutanten Hintergrund, der durch Lqf-UIM1$^{EEE-AAA}$ +ΔUIM2-GFP gerettet wurde, kein HA-Signal detektiert werden.

Dennoch deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass die UIMs von Lqf und somit die Ubiquitinierung für die SerK2R-Aktivierung durch Neur benötigt werden. Dies bedeutet, dass Neur die Aktivierung von Ser in einer K-unabhängigen, jedoch Ubiquitin-abhängigen Weise initiieren kann. Dabei werden die Bindung an den Liganden, die katalytische E3-Ligase-Aktivität und die Membranassoziation von Neur benötigt. Die Fähigkeit das inaktive SerK2R-HA in einen aktiven Liganden zu transformieren scheint für Neur spezifisch zu sein, da eine Ko-Expression von SerK2R-HA mit UAS-mib1 oder mit UAS-hMIB1 zu keiner Veränderung des SerK2R-HA-Phänotyps führt (Abbildung 61).

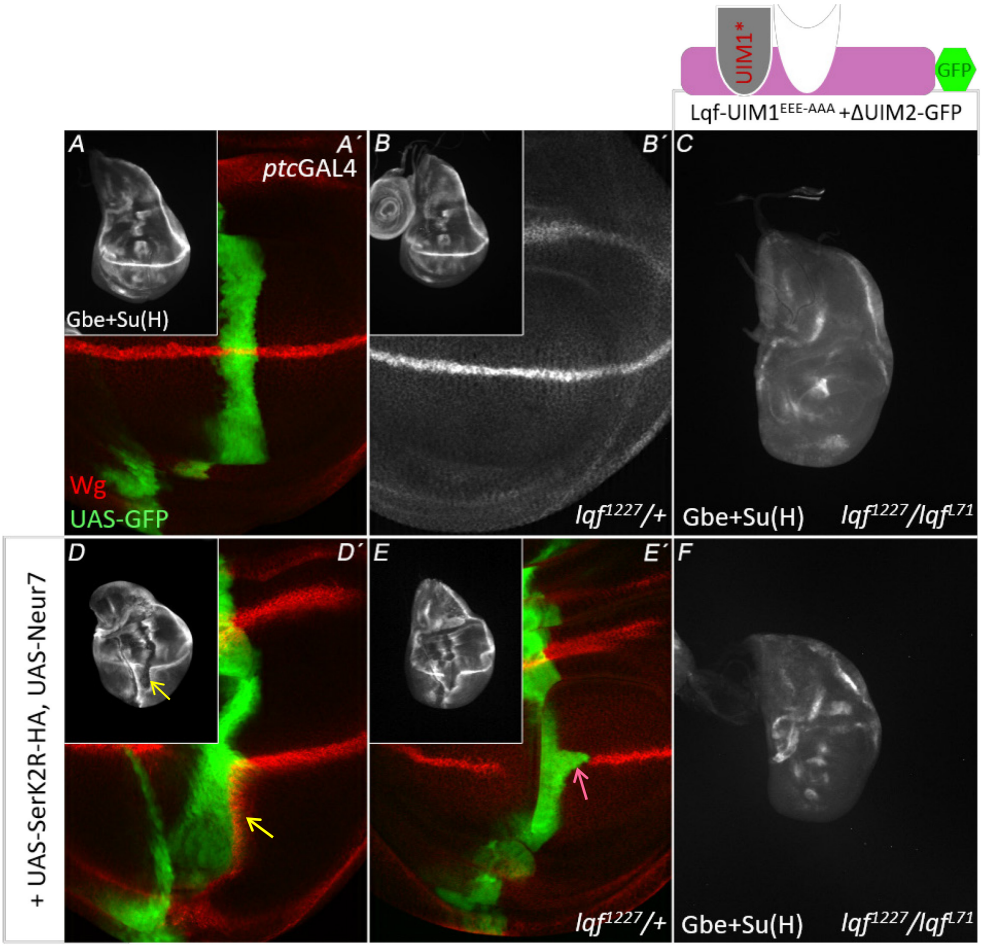


Abbildung 40: Ko-Expression von SerK2R-HA mit Neur im *lqf*-homozygot mutanten Hintergrund, der durch die Expression von Lqf-UIM1$^{EEE-AAA}$ +ΔUIM2-GFP gerettet wurde. Lqf-UIM1$^{EEE-AAA}$ +ΔUIM2-GFP ist eine Lqf-Variante, die über keine funktionalen UIMs verfügt. Ko-Expression von SerK2R-HA mit Neur erfolgte mit *ptc*GAL4 (A). Im wildtypischen Hintergrund führt die Ko-Expression von SerK2R-HA mit Neur zu einer ektopischen Wg-Expression im ventralen Kompartiment (D, D´, gelbe Pfeile). Diese ektopische Wg-Expression fehlt nach Ko-Expression von SerK2R-HA mit Neur im *lqf*-heterozygot mutanten Hintergrund (vgl. D, D´ gelber Pfeil mit E, E´). Ähnlich wie in der Kontrollsituation, kann bei einer Ko-Expression von SerK2R-HA mit Neur im *lqf*-mutanten Hintergrund gerettet durch Lqf-UIM1$^{EEE-AAA}$ +ΔUIM2-GFP, keine Aktivierung des Notch-Signalwegs innerhalb des Flügelfeldes detektiert werden. (vgl. C mit F). Die Flügelimaginalscheiben sind in A-F 100-fach und in A´, B´, D´, F´ 250-fach vergrößert dargestellt. Das in E, E´ dargestellte Ergebnis wurde von J. Langenbach generiert (Masterarbeit, 2015).

3.4.2 Die Neur-vermittelte Aktivierung von Ser wird durch die Ks in der ICD gesteigert

Es wurde gezeigt, dass K742 in der ICD von Dl für die Neur-vermittelte Ubiquitinierung wichtig ist [58]. Von der Position her entspricht K1362 in der ICD von Ser dem K742 von Dl und wird für die Mib1-vermittelte Aktivierung von Ser benötigt. Die Ko-Expression von SerK2R-HA mit Neur-Myc lässt darauf schließen, dass Neur SerK2R-HA aktivieren kann (Abbildung 41, D, D´). Hierbei ist die ektopische Aktivierung des Notch-Signalwegs sogar stark genug, um eine ektopische Wg-Expression zu induzieren (Abbildung 41, D´, gelber Pfeil), sie ist jedoch schwächer als nach der Ko-Expression mit Ser-HA (Abbildung 41, vgl. A, A´ mit D, D´, gelbe Pfeile). Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass die Ks in der Ser-ICD für die effektive Aktivierung durch Neur benötigt werden. Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, ob Neur bestimmte Ks in der

ICD von Ser für die ektopische Aktivierung des-Notch-Signalwegs bevorzugt. Um dies zu testen, wurde Neur-Myc mit einer Auswahl von Ser-R- und SerK2R-K-Varianten im *mib1*-mutanten Hintergrund ko-exprimiert. Es wurden $Ser^{R1276,1294}$-HA (Ser^{RR}-HA) und Ser^{R1362}-HA mit den K zu R-Austauschen in der Ser-ICD sowie $SerK2R^{K1294}$-HA, $SerK2R^{K1362}$-HA, $SerK2R^{K1362,1381,1385}$-HA ($SerK2R^{RRKKK}$-HA) und SerK2R-5K-HA mit wieder eingeführten Ks in der SerK2R-ICD ausgesucht. Ko-Expression von allen getesteten Ser-R- und SerK2R-Varianten mit Neur-Myc im *mib1*-mutanten Hintergrund führt zur ventralen ektopischen Aktivierung des Notch-Signalwegs, die in einer ektopischen Wg-Expression resultiert (Abbildung 41, A´-H´, gelbe Pfeile). Dabei scheint die ektopische Wg-Expression bei $Ser^{R1276,1294}$-HA und Ser^{R1362}-HA etwas schwächer als bei Ko-Expression mit Ser-HA zu sein (Abbildung 41, vgl. A, A´ mit B, B´ und C, C´, gelbe Pfeile). Dies wird daran erkennbar, dass bei Ser-HA die ektopische Wg-Expression auch auf der anterioren Seite der Expressionsdomäne zu beobachten ist (Abbildung 41, A, A´, grüner Pfeilkopf). Um zu testen, ob einzelne wiedereingeführte Ks die Aktivierung von SerK2R-HA durch Neur steigern können, wurden $SerK2R^{K1294}$-HA und $SerK2R^{K1362}$-HA mit Neur-Myc ko-exprimiert. Überraschenderweise scheint K1362 keinen Effekt auf die Aktivität des Liganden zu haben (Abbildung 41, vgl. D, D´ mit F, F´, gelbe Pfeile). Das eingeführte K1294 in der SerK2R-ICD ruft dagegen eine deutliche Steigerung der Aktivität des Liganden hervor. In diesem Fall ist die ektopische Wg-Expression deutlich stärker als bei einer Ko-Expression von Neur mit SerK2R-HA (Abbildung 41, vgl. D´ mit E´, gelbe Pfeile). Auch bei einer Ko-Expression mit $SerK2R^{RRKKK}$-HA wird eine stärkere Wg-Expression beobachtet (Abbildung 41, vgl. D´ mit G´, gelbe Pfeile). Ähnlich wie Ser-HA, scheint SerK2R-5K-HA das stärkste Notch-Signal auszulösen (Abbildung 41, vgl. A, A´ mit H, H´, gelbe Pfeile), da die ektopische Wg-Expression auch auf der anterioren Seite der Expressionsdomäne beobachtet wird (Abbildung 41, vgl. A´ mit H´, grüne Pfeilköpfe).

Die Resultate der Ko-Expressionen legen nahe, dass die Ks in der Ser-ICD die Aktivität des Liganden bei der Ko-Expression mit Neur steigern können. Hierbei sind die Ks nicht alle gleichbedeutend. So steigert K1294 die ektopische Aktivierung des Notch-Signalwegs signifikant, während K1362 keinen Einfluss darauf hat. Es wäre möglich, dass auch weitere Ks die Aktivität des Liganden beeinflussen können. Diese Möglichkeit wurde in dieser Arbeit nicht überprüft. Zusammenfassend, vermittelt Neur die Aktivierung von Ser in einer K-unabhängigen und K-abhängigen Weise. In beiden Fällen wird die Ubiquitinierung benötigt. Dies deutet darauf hin, dass möglicherweise die Ser-ICD oder ein weiterer unbekannter Faktor durch Neur ubiquitiniert wird.

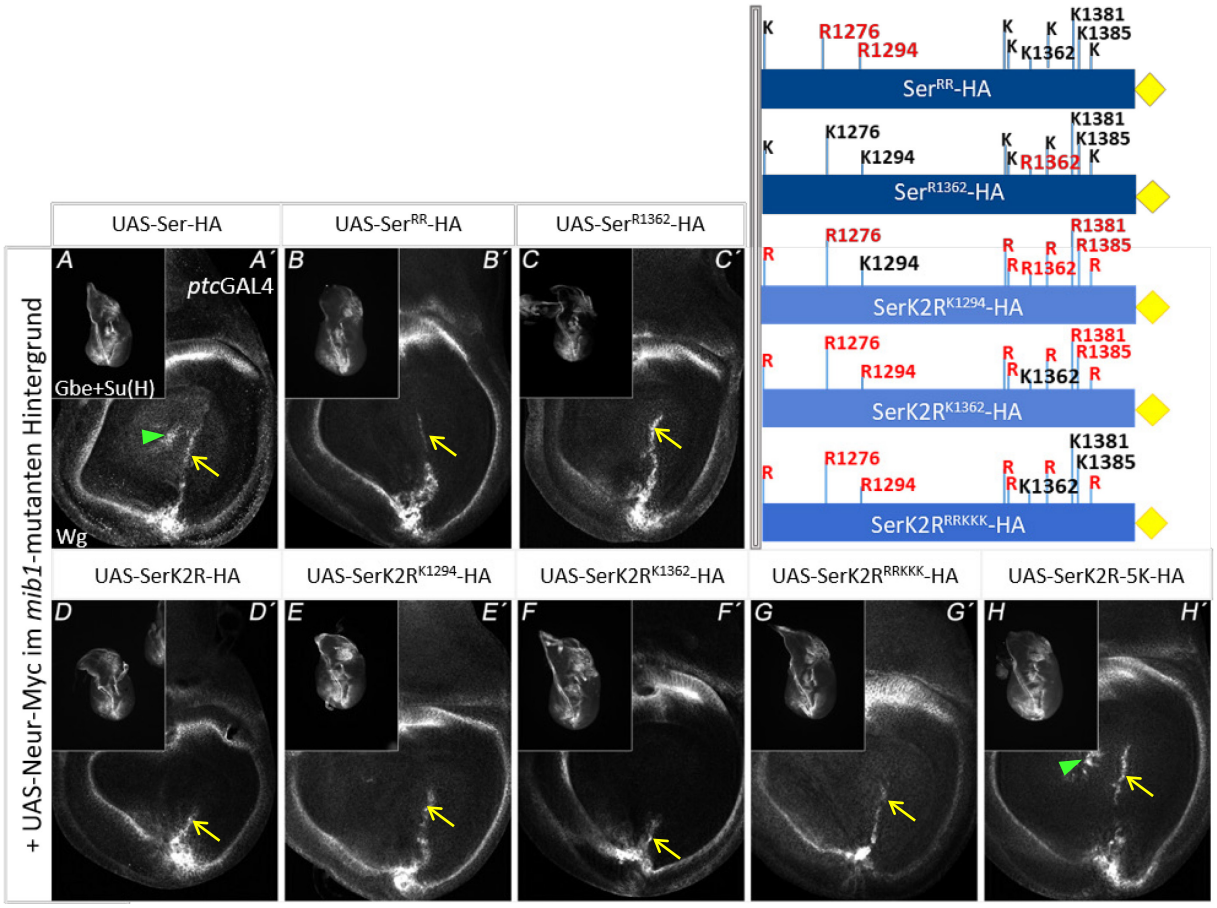


Abbildung 41: Ko-Expression von Ser-R- und SerK2R-K-Varianten mit Neur-Myc im *mib1*-mutanten Hintergrund. Neur-Myc wurde mit den Varianten $Ser^{R1276,1294}$-HA- (Ser^{RR}-HA), Ser^{R1362}-HA, $SerK2R^{K1294}$-HA, $SerK2R^{K1362}$-HA, $SerK2R^{K1362,1381,1385}$-HA ($SerK2R^{RRKKK}$-HA) und SerK2R-5K-HA mittels *ptc*GAL4 ko-exprimiert. Die Ko-Expression von Neur-Myc mit allen transgenen Liganden im *mib1*-mutanten Hintergrund führt zu einer ektopischen Aktivierung des Notch-Signalwegs, die in einer ektopischen Gbe+Su(H)- und Wg-Expression resultiert (A, A´- H, H´, gelbe Pfeile). Hierbei induziert SerK2R-5K-HA die ektopische Aktivierung des Notch-Signalwegs, vergleichbar mit Ser-HA (vgl. A´ mit H´, gelbe Pfeile und grüne Pfeilköpfe). Ser^{RR}-HA, Ser^{R1362}-HA, $SerK2R^{K1294}$-HA und $SerK2R^{RRKKK}$-HA aktivieren dagegen etwas schwächer, als Ser-HA (vgl. A´ mit B´, C´, E´, G´, H´ gelbe Pfeile und grüner Pfeilkopf). Ko-Expression von SerK2R-HA oder $SerK2R^{K1362}$-HA mit Neur resultiert in der schwächsten ektopischen Aktivierung des Notch-Signalwegs (vgl. A´- C´, E´, G´, H´ mit D, D´ und F, F´, gelbe Pfeile). Die Flügelimaginalscheiben sind in A-H 100-fach und in A´-H´ 250-fach vergrößert dargestellt.

3.4.3 Neur induziert die Endozytose und Degradation von Ser unabhängig von Ks in der ICD

Die Tatsache, dass Neur das ansonsten dominant negativ agierende SerK2R-HA in einen aktiven Liganden transformieren kann, warf die Frage nach dem Mechanismus dieser Transformation auf. Es wurde in zahlreichen Experimenten gezeigt, dass eine Neur-Überexpression zu einer verstärkten Endozytose des Liganden führt [46, 53, 55-57]. Da die Endozytose des Liganden für die Aktivierung des Notch-Signalwegs notwendig ist (Übersicht in [81]), wäre es möglich, dass Neur die Endozytose von SerK2R-HA ermöglicht. Um diese Vermutung zu testen, wurde zunächst der in 3.2.2 beschriebene Antikörper-„Uptake“-Assay in S2-Zellen durchgeführt. Anschließend wurde die subzelluläre Lokalisation von Ser-HA und SerK2R-HA nach Ko-Expression mit Neur-

Myc sowie mit Neur5Q-V5 in den Flügelimaginalscheiben analysiert (in Zusammenarbeit mit M. Kerkhoff, Masterarbeit 2018).

Für den Antikörper-„Uptake"-Assay wurden UAS-Ser-HA, UAS-SerK2R-HA und UAS-Neur-V5 mit pMT-GAL4 für 24 Stunden bei 25°C exprimiert. Zum Zeitpunkt 0 können beide Liganden an der Zellmembran detektiert werden (Abbildung 42, A, C). Bei den alleinigen Expressionen beider Liganden sowie bei der Ko-Expression von SerK2R-HA mit Neur-V5 wird eine gleichmäßige Verteilung der Liganden entlang der Zellmembran beobachtet (Abbildung 42, A, C, D, hellblaue Pfeilköpfe). Ko-Expression von Ser-HA mit Neur-V5 hingegen resultiert in einer punktuellen Verteilung des Liganden an der Zellmembran (Abbildung 42, B, grüne Pfeilköpfe). Nach 30-minütiger Endozytose (sowie nach 120-minütiger Endozytose) befinden sich sowohl Ser-HA als auch SerK2R-HA deutlich an der Zellmembran (Abbildung 42, E, G, hellblaue Pfeilköpfe und Abbildung 62, A, A´, C, C´, E, E´, G, G´), während die zusätzliche Expression von Neur-V5 eine effektive Internalisation beider Liganden bewirkt (Abbildung 42, F, F´´ und H, H´´, gelbe Pfeilköpfe). Dabei kann eine Ko-Lokalisation beider Ser-Varianten mit den Rab7-positiven Endosomen beobachtet werden. Neur-V5 scheint ebenfalls auf den Rab7-positiven Endosomen mit Ser-HA oder SerK2R-HA zu ko-lokalisieren (Abbildung 42, F´,F´´ und H´, H´´, gelbe Pfeilköpfe). Hierbei ist zu beachten, dass der anti-V5 Antikörper nicht sehr spezifisch ist und daher keine genauere Aussage über die Lokalisation von Neur-V5 getroffen werden kann.

Zusammenfassend führt die zusätzliche Expression von Neur-V5 zu einer raschen Endozytose von Ser-HA und SerK2R-HA. Die Einzelexpressionen der Liganden führen hingegen zu einem längeren Verbleiben von Ser und SerK2R an der Membran und zu keiner effizienten Endozytose der beiden.

Die Analyse der subzellulären Lokalisation von Ser-HA und SerK2R-HA bei der Ko-Expression mit Neur in Flügelimaginalscheiben wurden von M. Kerkhoff im Rahmen seiner Masterarbeit durchgeführt. Hierfür wurden die Ser-Liganden mit *ptc*GAL4 mit Neur-Myc oder Neur5Q-V5 ko-exprimiert. Danach wurden die Flügelimaginalscheiben gegen HA, Myc und V5 gefärbt und Z-Stapel aufgenommen. Wie oben beschrieben, ist bei dem Konstrukt Neur5Q-V5 das PIP_2-Bindemotiv mutiert. Es lokalisiert im Zytoplasma in S2-Zellen und nicht an der Zellmembran [57]. Das allein exprimierte Neur-Myc lokalisiert größtenteils am apikalen Kortex sowie entlang der lateralen Membran (Abbildung 43, A). Neur5Q-V5 dagegen zeigt eine Fehllokalisation entlang der gesamten Zellmembran, bei der zusätzlich zum apikalen ein basolaterales V5-Signal zu sehen ist (Abbildung 43, B). Wie bereits in 3.2.2 gezeigt, lokalisiert Ser-HA sowohl an der apikalen Membran als auch in den Endosomen (Abbildung 43, C, gelbe Pfeilköpfe), während SerK2R-HA fast ausschließlich an der apikalen Membran detektiert wird (Abbildung 43, D). Bei Ko-Expression von Ser-HA mit Neur-Myc als auch mit Neur5Q-V5 wird der Ligand an der apikalen Membran und in Vesikeln detektiert (Abbildung 43, E, E´ und F, F´, gelbe Pfeile). Bei Ko-Expression von SerK2R-HA mit Neur-Myc kann eine effiziente Internalisation des Liganden festgestellt werden (Abbildung 43, G, gelbe Pfeile). Neur5Q-V5 scheint hingegen keinen Einfluss auf die subzelluläre Lokalisation

von SerK2R-HA zu haben, der Ligand lokalisiert dabei nicht in den Vesikeln, wie bei der alleinigen SerK2R-HA-Expression (Abbildung 43, vgl. D mit H, H´).

Zusammengefasst kann Neur die Endozytose von SerK2R-HA einleiten. Es werden dafür keine Ks in der Ser-ICD benötigt, jedoch das PIP_2-Bindemotiv von Neur.

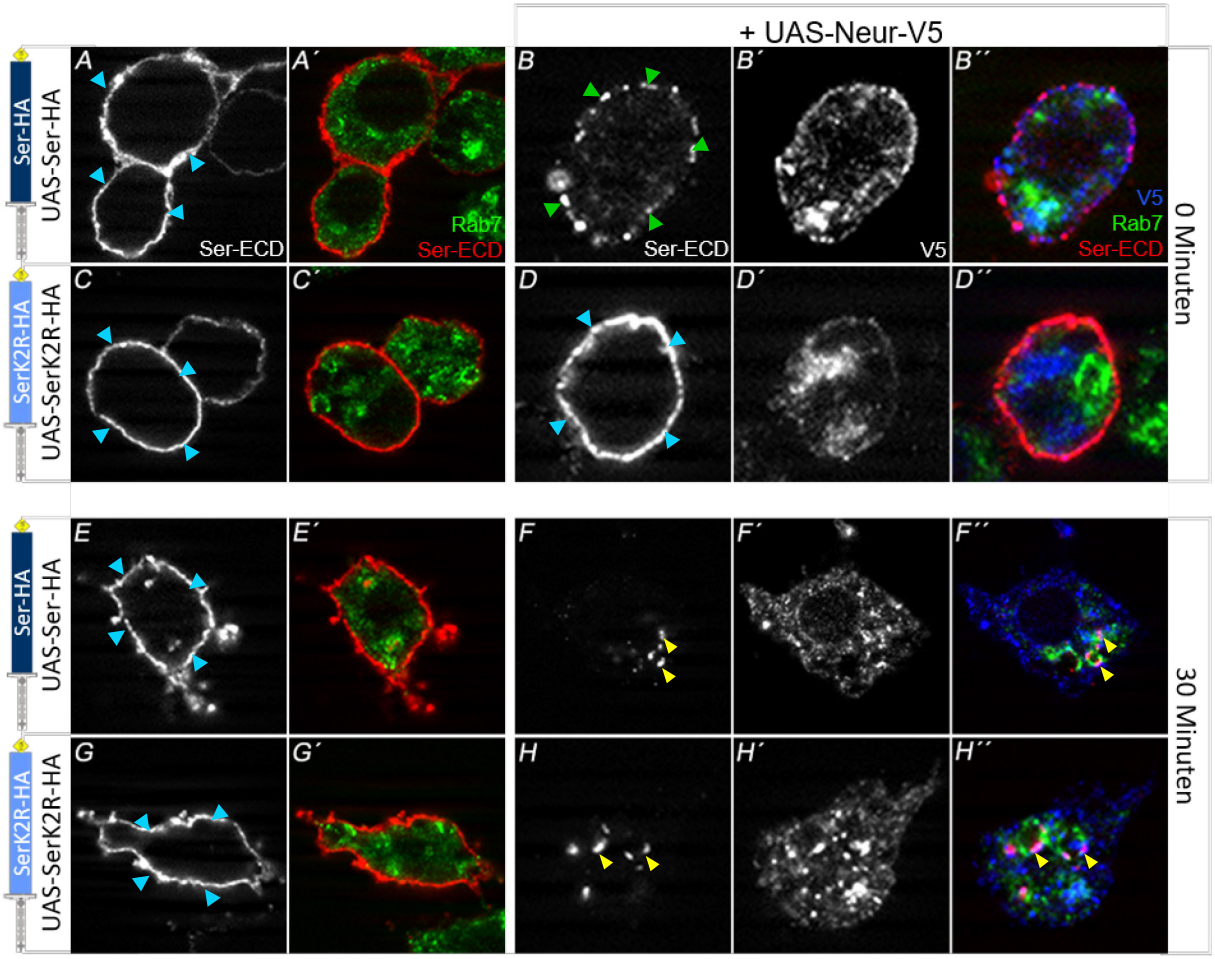


Abbildung 42: Analyse der Endozytose von Ser-HA und SerK2R-HA bei Ko-Expression mit Neur in S2-Zellen. Die Konstrukte Ser-HA, SerK2R-HA und Neur-V5 wurden mit pMT-Gal4 für 24 Stunden bei 25°C exprimiert. Anschließend wurde ein Antikörper-„Uptake"-Assay durchgeführt. Zum Zeitpunkt 0 lokalisieren beide Liganden an der Membran sowohl bei alleiniger Expression als auch bei Ko-Expression mit Neur-V5 (A-D, hellblaue Pfeilköpfe). Hierbei wird bei der Ko-Expression von Ser-HA mit Neur-V5 eine punktuelle Verteilung des Ser-ECD-Signals entlang der Membran beobachtet (B, grüne Pfeilköpfe). Nach einer 30-minütigen Endozytose verbleiben die allein exprimierten Ser-HA und SerK2R-HA an der Membran (E, E´ und G, G´, hellblaue Pfeilköpfe), während nach der Ko-Expression mit Neur-V5 gar kein membranständiges Ser-Signal mehr zu beobachten ist. Hierbei lokalisieren beide Liganden auf den Rab7-positiven Endosomen. Neur-V5 scheint mit diesen Endosomen ebenfalls zu ko-lokalisieren (F, F´´ und H, H´´, gelbe Pfeilköpfe).

Des Weiteren stellte sich die Frage, ob Neur neben der SerK2R-HA-Endozytose auch dessen Abbau einleiten kann. Zur Untersuchung des Abbaus wurde das bereits in 3.2.3 beschriebene Pulse-Chase-Experiment durchgeführt (in Zusammenarbeit mit M. Kerkhoff, Masterarbeit 2018). Hierfür wurden die Konstrukte zuerst in der Pulse-Phase für 16 Stunden bei 29°C exprimiert. Anschließend folgten die Chase-Phasen für je 4 bis 48 Stunden, in der die Degradation der Proteine stattfinden sollte. Mit Hilfe des Pulse-Chase-Experiments wurde gezeigt, dass Ser-HA nach einer 8-stündigen Chase-Phase zum größten Teil abgebaut wird (Abbildung 63, A1-A5). Dabei scheint die zusätzliche Expression von Neur-Myc oder Neur5Q-V5 die Degradationszeit

nicht zu verändern, da auch bei den Ko-Expressionen das meiste HA-Signal nach 8 Stunden nicht mehr vorhanden ist (Abbildung 63, vgl. A1-A5 mit B1-B5 und C1-C5). Allein exprimiertes SerK2R-HA ist nach einer 48-stündigen Chase-Phase noch deutlich an der apikalen Membran zu sehen (Abbildung 63, D1-D7), während das ko-exprimierte Neur-Myc die Abbauzeit des K2R-Liganden von über 48 Stunden auf nur 8 Stunden verkürzt (Abbildung 63, E1-E5). Somit dauert die Degradation von SerK2R-HA bei Ko-Expression mit Neur genauso lange, wie die Ser-HA-Degradation (Abbildung 63, vgl. A1-A5 mit E1-E5). Diese deutet darauf hin, dass Neur nicht nur die Endozytose, sondern auch einen effizienten Abbau von SerK2R-HA vermittelt. Neur5Q-V5 kann dagegen die Degradation von SerK2R-HA nicht beschleunigen. Es wird stets ein HA-Signal nach der 48-stündigen Chase-Phase detektiert (Abbildung 63, F1-F7).

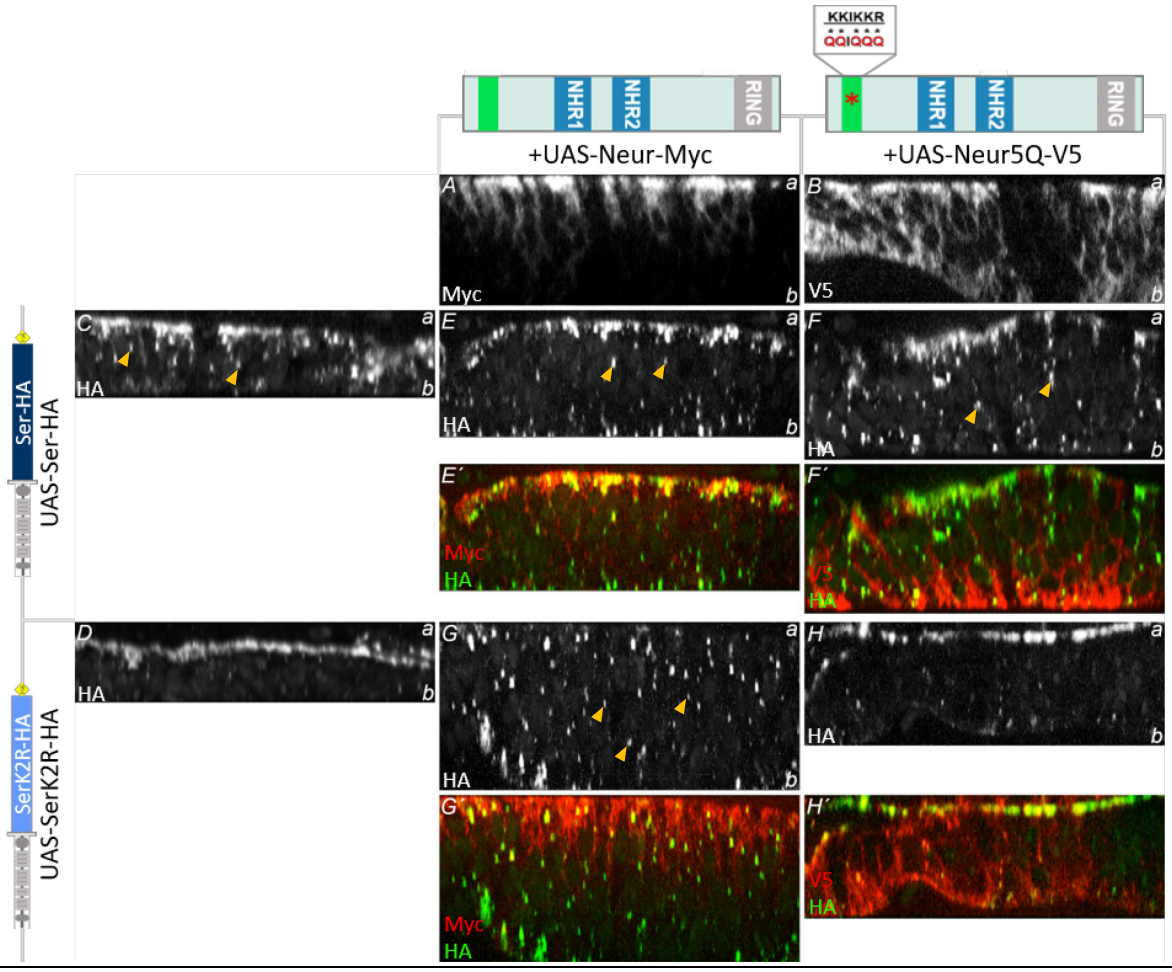


Abbildung 43: Analyse der subzellulären Lokalisation von Ser-HA und SerK2R-HA bei der Ko-Expression mit Neur-Myc und Neur5Q-V5. Hierfür wurden Z-Stapel der Flügelimaginalscheiben aufgenommen. Neur-Myc lokalisiert am apikalen Kortex und entlang der lateralen Membran (A). Die Neur5Q-V5-Variante, mit dem mutierten PIP_2-Bindemotiv, lokalisiert hingegen entlang der gesamten Zellmembran. Zusätzlich zur apikalen Lokalisation wird ein V5-Signal an der basolateralen und basalen Membran detektiert (B). Bei der alleinigen Expression von Ser-HA und bei Ko-expression mit Neur oder Neur5Q-V5 lokalisiert der Ligand an der apikalen Membran und in den vesikulären Strukturen (C, E, E´, F, F´, gelbe Pfeile). SerK2R-HA lokalisiert fast ausschließlich an der apikalen Membran (D), während die Ko-Expression mit Neur-Myc zu einer effizienten Endozytose von SerK2R-HA führt (G, G´, gelbe Pfeile). Bei einer Ko-Expression von SerK2R-HA mit Neur5Q-V5 lokalisiert der Ligand größtenteils an der apikalen Membran (H, H´). Alle Abbildungen zeigen Ausschnitte aus der Schnittansicht der Z-Stapeln bei der 630-iger Vergrößerung. Die Ergebnisse wurden von M. Kerkhoff generiert.

Die Beobachtung, dass Neur die Endozytose von SerK2R-HA einleiten kann, führte zu der Frage, ob sich die Lokalisation des endogenen N-Rezeptors als Folge der SerK2R-HA-Endozytose verändert. Wie in 3.2.3 beschrieben, bewirkt die Ser-HA-Expression eine Entfernung des endogenen N-Rezeptors von der apikalen Membran (Abbildung 24, A, A´- C, C´), während exprimiertes SerK2R-HA eine Akkumulation des Rezeptors an der apikalen Membran verursacht (Abbildung 24, D, D´- F, F´). Allein exprimiertes Neur-Myc hat keinen Einfluss auf die Lokalisation des N-Rezeptors (nicht gezeigt). Ähnlich wie bei der Ser-HA-Expression, wird der Rezeptor bei Ko-Expression von SerK2R-HA mit Neur-Myc von der apikalen Membran entfernt (Abbildung 44, B, gelbe Klammer). Dabei wird eine Ko-Lokalisation von HA- und NECD-positiven Vesikeln beobachtet (Abbildung 44, A´-C´, gelbe Pfeilköpfe). Der Effekt der Entfernung des N-Rezeptors von der apikalen Membran scheint etwas schwächer, als bei Ser-HA, zu sein (vgl. Abbildung 24, B, B´ und Abbildung 44, B,). Zusammenfassend, kann Neur die Endozytose von SerK2R-HA vermitteln, was vermutlich die *Trans*-Endozytose der NECD zur Folge hat. Die *Trans*-Endozytose des Rezeptors könnte in einer *Trans*-Aktivierung des Notch-Signalwegs resultieren.

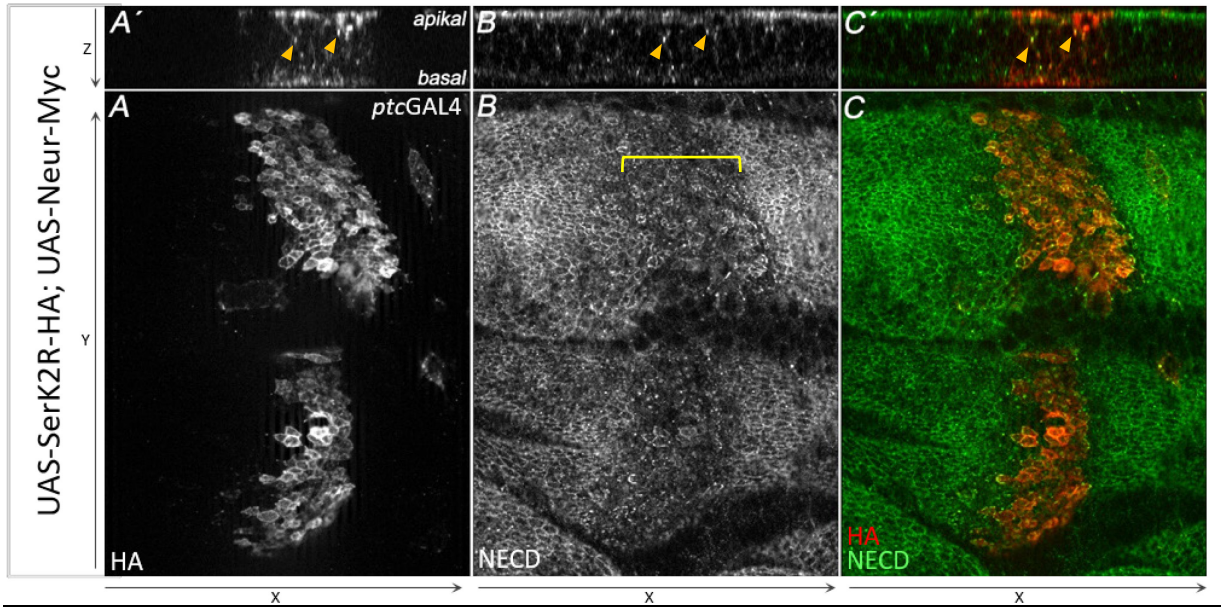


Abbildung 44: Subzelluläre Lokalisation des endogenen N-Rezeptors nach Ko-Expression von SerK2R-HA mit Neur-Myc. Die Transgene wurden mit *ptc*GAL4 exprimiert. Für die Darstellung der apiko-basalen Lokalisation des N-Rezeptors wurden Z-Stapel der Flügelimaginalscheiben aufgenommen. In der X/Y-Ebene sind SerK2R-HA und der endogene N-Rezeptor auf der Höhe der apikalen Region gezeigt. Bei Ko-Expression mit Neur-Myc lokalisierte SerK2R-HA an der apikalen Membran und in Endosomen (A, A´, gelbe Pfeilköpfe). Die Ko-Expression von SerK2R-HA mit Neur-Myc resultiert in einer Entfernung des endogenen N-Rezeptors von der apikalen Membran (B, gelbe Klammer). Dabei ko-lokalisieren die HA- und Notch-positiven Vesikel (A´, B´, C´, gelbe Pfeile). Die Flügelimaginalscheiben sind in A, A´-C, C´ 630-fach vergrößert dargestellt.

3.5 Die putativen N- und C-Boxen in der ICD sind nicht essentiell für die Ser-Aktivität

Es wurde bereits mehrmals demonstriert, dass die Ser-vermittelte Aktivierung des Notch-Signalwegs die Mib1-Funktion benötigt [28, 42, 43]. Die N-terminale Region von MIB1 besitzt zwei Domänen, MZM und REP, die für die Interaktion mit der Jag1-ICD benötigt werden. Die Jag1-ICD beinhaltet wiederum zwei Interaktionsmotive, die sog. N- und C-Box, die jeweils mit der MZM- und REP-Domäne interagieren. Untersuchungen mit Jag1 und MIB1 deuten darauf hin, dass sowohl die N- als auch die C-Box für die Interaktion mit MIB1 benötigt werden [48]. Ähnlich zu Jag1 wurden in der ICD von *Drosophila* Dl solche Interaktionsmotive beschrieben [58]. Basierend auf dem Aminosäuresequenzenvergleich wurden in den weiteren DSL-Liganden mögliche N- und C-Boxen vorhergesagt ([48] und (Abbildung 45 und Abbildung 46, B)). Dabei wurde für Ser eine N-Box vorhergesagt, die sich in ihrer Sequenz deutlich von den restlichen Liganden unterscheidet. Die Aminosäuresequenz der möglichen C-Box von Ser weist hingegen eine stärkere Ähnlichkeit zu den C-Boxen anderer Liganden auf (Abbildung 45 und Abbildung 46, B). Die Experimente mit mutierten N- und C-Boxen von *Drosophila* Dl, deuten auf die Notwendigkeit der N-Box für die Dl-vermittelte Aktivierung des Notch-Signalwegs hin und somit für die genetische Interaktion mit Dmib1. Die C-Box hingegen scheint eine untergeordnete Rolle zu spielen ([58], N. Vüllings, unveröffentlichte Daten). Im Gegensatz dazu ist nicht bekannt, ob die vermeintlichen N- und/oder C-Boxen in der ICD von Ser für die Mib1-vermittelte Aktivierung des Notch-Signalwegs benötigt werden. Um dies zu testen, wurden die Aminosäuren der putativen N- und/oder C- Boxen von Ser durch Alanine (Ala) ersetzt.

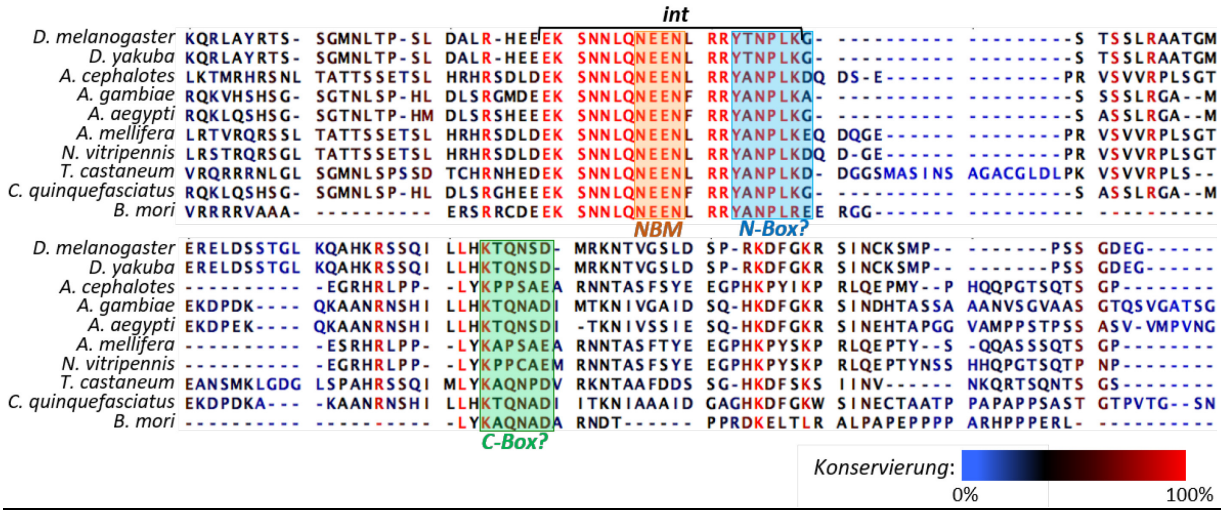


Abbildung 45: Aminosäuresequenzenvergleich der intrazellulären Domäne von Ser aus verschiedenen Insektenspezies. Die putativen N- und C-Box sind jeweils mit einem hellblauen und grünen Rahmen markiert. Das Neur-Bindemotiv (NBM) ist mit einem orangefarbenen Rahmen markiert. Die Aminosäuren sind im Ein-Buchstabe-Code abgekürzt. Die Farbe der jeweiligen Aminosäuren entspricht dem Grad der Konservierung, hierbei sind die am höchsten konservierten Aminosäuren in Rot dargestellt.

Wie in 3.3.1 gezeigt, ist K1362 für die Aktivität von Ser essentiell. Dieses K befindet sich am Anfang der vermeintlichen C-Box. Aus diesem Grund wurden neben den Varianten mit den komplett mutierten Boxen auch Varianten generiert, bei denen die Ks in der entsprechenden Box erhalten wurden (Abbildung 46, D). So wurde bei den Konstrukten Ser-NB2Ala-HA bzw. Ser-CB2Ala-HA alle Aminosäuren der vermeintlichen N- bzw. der C- Box durch Ala ersetzt, während in den Varianten Ser-NB2Ala+K-HA und Ser-CB2Ala+K-HA die Ks nicht mutiert sind. Bei dem transgenen Liganden Ser-N&CB2Ala+K-HA wurden alle Aminosäuren, bis auf die Ks, sowohl in der N- als auch in der C-Box mutiert (Abbildung 46, D). Diese transgenen Liganden tragen einen C-terminalen HA-Tag. Sie wurden in die *attP*-site 51C inseriert und anschließend mit dem *ptc*GAL4 exprimiert.

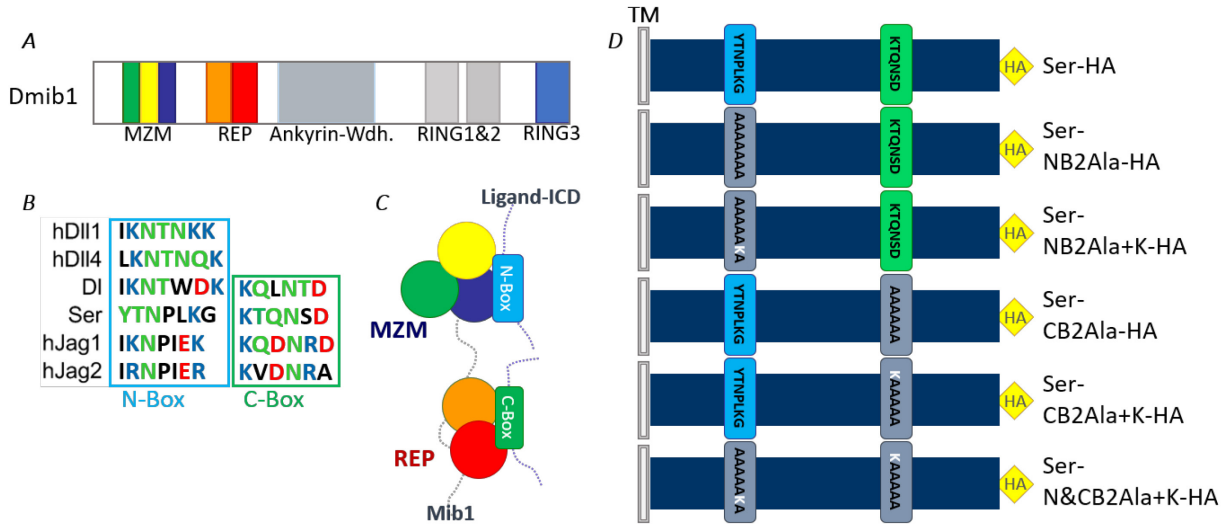


Abbildung 46: Schematische Darstellung von *Drosophila* Mib1 (A). Dmib1 besitzt eine MZM- und eine REP-Domänen, die für die Interaktionen mit DSL-Liganden benötigt werden. Ein Aminosäuresequenzen-vergleich der putativen N- und C-Boxen in den ICDs der DSL-Liganden (B). Dabei wurden die N- und C-Boxen von Jag1 und Dl auf der experimentellen Ebene verifiziert. Die Aminosäuresequenzen der mögliche N-Box von Ser zeigen wenig Homologien mit den Aminosäuresequenzen der möglichen N-Boxen restlicher Liganden (B). Vorgeschlagenes Interaktionsmodel zwischen dem N-terminalen Teil vom Dmib1 und der N- und C-Boxen des DSL-Liganden, basierend auf den Ergebnissen von der Untersuchung an Jag1 (C). Schematische Darstellung der ICDs von hergestellten Ser-Varianten, um die Rolle der möglichen N- und C-Box zu analysieren (D). (C) nach [48].

Ähnlich wie Ser-HA, können Ser-NB2Ala-HA, Ser-NB2Ala+K-HA, Ser-CB2Ala+K-HA und Ser-N&B2Ala+K-HA den Notch-Signalweg im ventralen Kompartiment ektopisch aktivieren (Abbildung 47, vgl. B, B´ mit C, C´-E, E´, gelbe Pfeile und Abbildung 64, vgl. B, B´ mit C, C´, gelbe Pfeile). Hierbei weisen SerCB2Ala+K-HA und SerN&CB2Ala+K-HA eine stärkere *Cis*-Inhibition auf als Ser-HA (Abbildung 47, vgl. B, B´ mit D, D´ und E, E´, rosafarbene Pfeile). Ser-CB2Ala-HA ist im Gegensatz zu den restlichen Ser-Varianten nicht in der Lage ein ektopisches Notch-Signal auszulösen und bewirkt eine zellautonome Unterbrechung der endogenen Wg-Expression an der d/v-Grenze (Abbildung 64, vgl. B, B´ mit D, D´, rosafarbener Pfeil). Bei dieser Ser-Variante wurde auch das K1362 gegen Ala ausgetauscht. Da bereits ein Austausch von K1362 zu R zu einem inaktiven Liganden führt, wäre die fehlende Aktivität von Ser-CB2Ala-HA mit dem Verlust des wichtigen K und nicht mit der Mutation der C-Box zu erklären.

Zusammengefasst deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass sowohl die vorhergesagte N- als auch die C-Box für die Ser-vermittelte Aktivierung des Notch-Signalwegs nicht benötigt werden. Da in den Flügelimaginalscheiben die meiste Aktivierung des Notch-Signalwegs über Mib1 erfolgt [41], ist davon auszugehen, dass diese Bereiche der Ser-ICD für die genetische Interaktion mit Dmib1 ebenso nicht essentiell sind. Aus diesem Grund wurde nach weiteren Motiven in der Ser-ICD gesucht, die die Interaktion mit Mib1 vermitteln könnten.

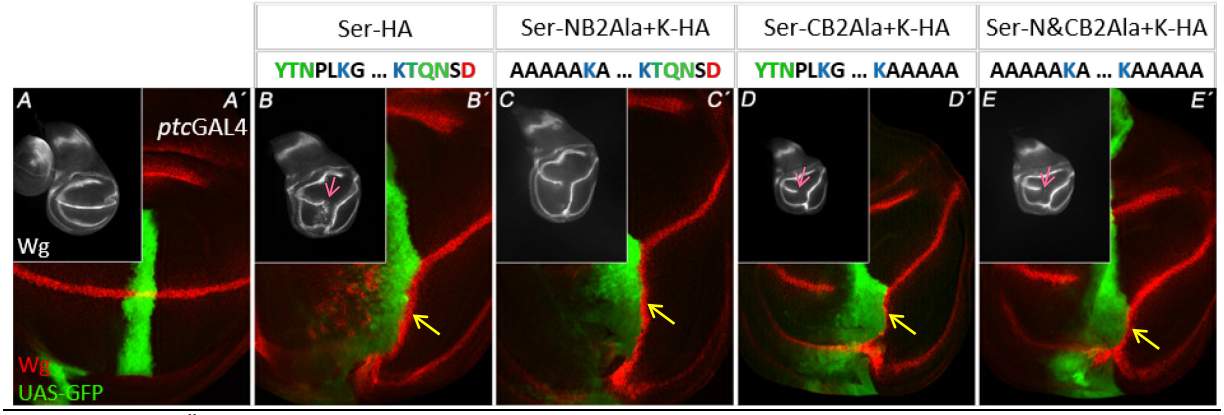


Abbildung 47: Übersicht der Expressionen von Ser-Varianten mit mutierten N- und C-Boxen. Bei den Varianten Ser-NB2Ala+K-HA und Ser-CB2Ala+K-HA wurden die Aminosäuren der N- oder C-Box jeweils gegen Alanine ausgetauscht. Bei Ser-N&CB2Ala+K-HA wurden beide Boxen gleichzeitig mutiert. In allen Fällen wurden die Ks in der jeweiligen Box erhalten. Die Expression dieser Ser-Varianten mit *ptc*GAL4(A´) führt zu einer ektopischen Aktivierung des Notch-Signalwegs, die in einer ektopischen Wg-Expression resultiert (vgl. A, A´ mit B, B´-E, E´, gelbe Pfeile). Ser-CB2Ala+K-HA und Ser-N&CB2Ala+K-HA wirken dabei stärker *cis*-inhibitorisch als Ser-HA (vgl. B, B´ mit D, D´, E, E´, rosafarbene Pfeile). Die Flügelimaginalscheiben sind in A-E 100-fach und in A´-E´ 250-fach vergrößert.

Ein Aminosäuresequenzenvergleich der ICDs von Ser aus verschiedenen Insektenspezies zeigte, dass Ser eine stark konservierte Region besitzt (Abbildung 45, schwarze Klammer). Ein Teil dieser Region wurde bereits von Glittenberg et al. 2006 als sog. „int"-Region beschrieben [25]. Außerdem beinhaltet diese konservierte Region ein Teil der vermeintlichen N-Box (Abbildung 45, hellblaue Box) und das vorhergesagte Neur-Bindemotiv (NBM) von Ser (Abbildung 45, orangefarbene Box) [59]. Des Weiteren besitzt die „int"-Region ein Di-Asparagin-Motiv (-NN-), das im Zebrafisch DlD neben der N-Box für die Interaktion mit dem Mib1 wichtig ist [25]. Eine Deletion der „int"-Region führt zu einem komplett inaktiven Liganden ($Ser^{\Delta int}$) ([25] und (Abbildung 48, B, B´)). Da größere Deletionen die Gesamtstruktur eines Proteins stark verändern könnten, wurde der bei $Ser^{\Delta int}$ deletierte Bereich in kleinere Bereiche aufgeteilt und die entsprechenden Aminosäuren gegen Alanine ausgetauscht. Auf diese Weise wurden die Varianten Ser-EKSN2Ala-HA, Ser-NLQ2Ala-HA, Ser-NEEN2Ala-HA und Ser-EKSNNLQ2Ala-HA generiert. Die generierten Liganden wurden mit einem C-terminalen HA-Tag markiert und in die *attP*-site 51C inseriert. Für das Konstrukt Ser-EKSNNLQ2Ala-HA war die Transgenese nicht erfolgreich.

Wie bereits beschrieben, führt die Expression von $Ser^{\Delta int}$ zu einer zellautonomen Unterbrechung der endogenen Wg-Expression und zu keiner ektopischen Aktivierung des Notch-Signalwegs

([25] und (Abbildung 48, vgl. A, A´ mit B, B´, gelber und rosafarbener Pfeile)). Hierbei ist zu beachten, dass das Konstrukt Ser$^{\Delta int}$ durch zufällige Insertion ins Genom von *Drosophila* integriert wurde [25]. Aus diesem Grund wäre es möglich, dass das Expressionsniveau von Ser$^{\Delta int}$ sich von den restlichen Konstrukten unterscheidet. Sowohl Ser-EKSN2Ala-HA, Ser-NLQ2Ala-HA als auch Ser-NEEN2Ala-HA sind in der Lage den Notch-Signalweg ektopisch zu aktivieren. Hierbei aktivieren Ser-NLQ2Ala-HA und Ser-NEEN2Ala-HA vergleichbar mit Ser-HA (Abbildung 48, vgl. A, A´ mit D, D´ und E, E´, gelbe Pfeile), während Ser-EKSN2Ala-HA deutlich schwächer aktiviert und höchstwahrscheinlich stärker *cis*-inhibitorisch als Ser-HA wirkt (Abbildung 48, vgl. A, A´ mit ´C, C´, gelbe Pfeile). Obwohl bei der Expression von Ser-EKSN2Ala-HA eine deutliche Reduktion der Liganden-Aktivität im Vergleich zu Ser-HA zu beobachten ist, führt die Mutation dieser Aminosäuren zu keinem komplett inaktiven Liganden (Abbildung 48, vgl. B, B´ mit ´C, C´, rosafarbener und gelber Pfeil). Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass Ser-EKSN2Ala-HA weitere wichtige Aminosäuren beinhaltet, die bei Ser$^{\Delta int}$ deletiert wurden. Möglicherweise könnte ein gleichzeitiger Austausch von zusätzlichen weiteren Aminosäuren, wie bei der Ser-EKSNNLQ2Ala-Variante, die genetische Interaktion mit Mib1 unterbinden.

Dennoch legt dieses Ergebnis nahe, dass die Aminosäuren EKSN in der „int"-Region für die genetische Interaktion mit Mib1 eine Rolle spielen, während die Aminosäuren NLQ und NEEN dafür nicht wichtig sind.

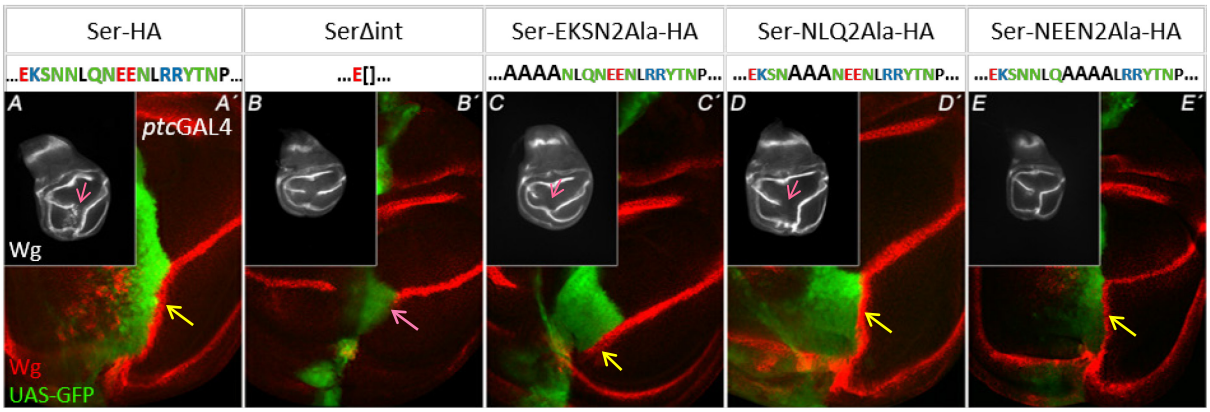


Abbildung 48: Übersicht der Expressionen von Ser-Varianten mit Mutationen in der stark konservierten „int"-Region. Die Konstrukte wurden mit *ptc*GAL4 exprimiert (A´). Die Expressionen von Ser-HA, Ser-NLQ2Ala-HA, Ser-NEEN2Ala-HA führen zu einer ektopischen ventralen Aktivierung des Notch-Signalwegs, die in einer ektopischen Wg-Expression resultiert (A, A´, D, D´, E, E´, gelbe Pfeile). Im Vergleich dazu induziert Ser-EKSN2Ala-HA eine deutlich schwächere ektopische Wg-Expression (vgl. A, A´ mit C, C´, gelbe Pfeile) und wirkt stark *cis*-inhibitorisch (C, rosafarbene Pfeile). Ser$^{\Delta int}$ ist nicht in der Lage die ektopische Aktivierung des Notch-Signalwegs einzuleiten. Darüber hinaus reprimiert Ser$^{\Delta int}$ die endogene Notch-Aktivität (vgl. A, A´ mit B, B´, rosafarbene Pfeile). Die Flügelimaginalscheiben wurden in A-E 100-fach und in A´-E´ 250-fach vergrößert.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der Suche nach den Interaktionsmotiven mit Mib1 in der Ser-ICD, dass keine der getesteten Mutationen in der Ser-ICD zu einem vollständig inaktiven Liganden führt. Die Mutationen der vorhergesagten N- und C-Boxen resultieren in einer leichten Reduktion der Liganden-Aktivität. Bei den Mutationen in der konservierten Ser-„int"-Region ist nur bei der SerEKSN2Ala-Variante ein deutlicher Effekt zu beobachten. Somit sind weitere

Mutationen nötig, oder eventuell Kombinationen aus bereits mutierten Bereichen, um die genetische Interaktion von Ser und Mib1 unterbinden zu können.

In voriger Publikation wurde mit Hilfe einer Co-IP gezeigt, dass Ser$^{\Delta int}$ nicht mehr mit Neur interagieren kann [25]. Wie oben erwähnt, beinhaltet die Ser-„int"-Region das vorhergesagte Bindemotiv für Neur [59], das bei Ser-NEEN2Ala-HA mutiert wurde. Um zu testen, ob das vorhergesagte NBM für eine genetische Interaktion von Ser mit Neur *in vivo* benötigt wird, wurde Ser-NEEN2Ala-HA mit Neur-Myc im *mib1*-mutanten Hintergrund ko-exprimiert. Im Gegensatz zur Ko-Expression mit Ser-HA konnte bei der Ko-Expression von Neur-Myc mit Ser$^{\Delta int}$ oder mit Ser-NEEN2Ala-HA im *mib1*-mutanten Hintergrund keine ektopische Aktivierung des Notch-Signalwegs beobachtet werden (Abbildung 49, vgl. B, B´ mit C, C´ und D, D´, gelber Pfeil). Darüber hinaus kommt es zum Verlust der endogenen Aktivierung des Notch-Signalwegs, die infolge der ektopischen Neur-Expression an der d/v-Grenze wiederhergestellt wurde (Abbildung 49, vgl. A, A´, gelbe Pfeile mit C, C´ und D, D´).

Diese Ergebnisse zeigen, dass das vorhergesagte NBM *in vivo* für die genetische Interaktion von Ser mit Neur essentiell ist. Die Mutation des NBM in der Ser-ICD führte dazu, dass die Wg-Expression an der d/v-Grenze, die durch die Neur-Expression wiederhergestellt wurde, wieder unterdrückt wird. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass die transgenen Liganden dominant über die endogenen Liganden agieren.

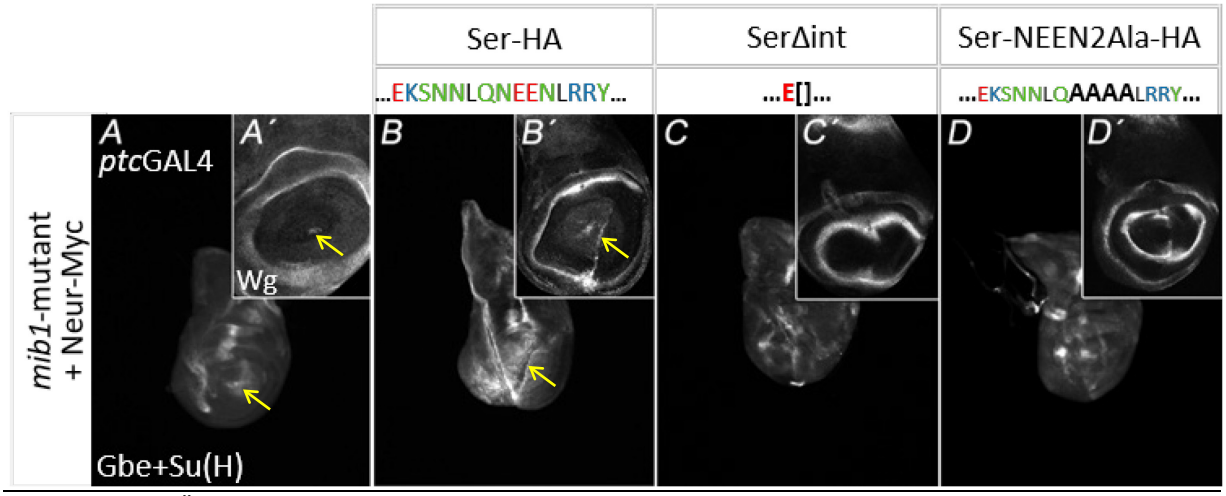


Abbildung 49: Übersicht der Ko-Expressionen von Neur-Myc mit Ser$^{\Delta int}$ und Ser-NEEN2Ala-HA im *mib1*-mutanten Hintergrund. Bei dem transgenen Liganden Ser$^{\Delta int}$ wurde die hoch konservierte Region in der Ser-ICD deletiert, während bei Ser-NEEN2Ala-HA das vorhergesagte Neur-Bindemotiv mutiert ist. Alle Konstrukte wurden mit *ptc*GAL4 exprimiert. Die Expression von Neur-Myc in *mib1*-mutanten Hintergrund führt zur Wiederherstellung der endogenen Notch-Aktivität, die anhand der Expressionen von Gbe+Su(H) und Wg zu sehen ist (A, A´, gelbe Pfeile). Ko-Expression mit Ser-HA resultiert in einer ektopischen Aktivierung des Notch-Signalwegs (B, B´, gelbe Pfeile), während eine Ko-Expression mit Ser$^{\Delta int}$ und Ser-NEEN2Ala-HA zu keiner ektopischen Aktivierung des Notch-Signalwegs führt (vgl. B, B´ mit C, C´ oder D, D´). Die Flügelimaginalscheiben sind in A-D 100-fach und in A´-D´ 250-fach vergrößert.

4 Diskussion

4.1 Die Rolle der Ks in der ICD für die Aktivität, die Endozytose und Degradation von Ser

Der Notch-Signalweg ist in zahlreiche Prozesse während der Entwicklung und Homöostase eines Organismus involviert, so werden u.a. Hämotopoese, Somitogenese, Myogenese sowie Kardiogenese durch die Aktivität des Notch-Signalwegs reguliert. Darüber hinaus gehört dieser Signalweg zu den zehn Signalwegen, die in den meisten Krebsarten dereguliert sind (Übersicht in [104]). Aus diesem Grund bedarf die Aktivierung des Notch-Signalwegs einer strengen regulatorischen Kontrolle. Die Ubiquitinierung der Liganden stellt ein solcher Regulationsmechanismus dar. Dabei werden die Liganden-ICDs an den Ks durch die RING-E3s, Mib1 oder Neur ubiquitiniert und dadurch für die Epsin/Lqf-vermittelte Endozytose markiert (Übersicht in [11]). Studien mit *Drosophila* Dl und Säuger Dll1 demonstrierten, dass die Endozytose des Liganden per se nicht immer in einer effektiven Aktivierung des Notch-Signalwegs resultiert und die Ubiquitinierung der ICD für die volle Funktion des Liganden benötigt wird [28, 36, 37]. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die ICDs von Jag1 und Dl eine Bindung an die E3-Ligase MIB1/Mib1 benötigen, um den Notch-Signalweg effektiv aktivieren zu können [48, 58]. Vor diesem Hintergrund wurde in dieser Arbeit die Rolle der Ubiquitinierung und insbesondere der Ks in der Ser-ICD für die Aktivität des Liganden untersucht.

4.1.1 Die Ks in der ICD und Ubiquitinierung sind essentiell für die Aktivität von Ser

In einer kürzlich veröffentlichten Studie wurde gezeigt, dass eine Dl-Variante ohne Ks in der ICD eine schwache transaktivierende Eigenschaft besitzt. Dies deutet auf eine Ubiquitinierungs-unabhängige Restaktivität von Dl hin [28]. Im Gegensatz zu DlK2R-HA kann eine Ser-Variante ohne Ks in der ICD (SerK2R-HA) den Notch-Signalweg nicht aktivieren. Darüber hinaus wirkt SerK2R-HA dominant negativ und reprimiert die endogene Notch-Aktivität in einer nicht zellautonomen Weise (Abbildung 19). Dabei ähnelt die Wirkungsweise von SerK2R-HA der Wirkungsweise einer Ser-Variante ohne ICD. Somit scheint ein Verlust aller intrazellulären Ks dem Verlust der gesamten ICD von Ser zu entsprechen und in einem funktionslosen Liganden zu resultieren. Die dominant negative Wirkung des Liganden unterscheidet sich von den *cis*-inhibitorischen Eigenschaften eines wildtypischen Ser-Liganden. Hierbei bewirkt die Ser-vermittelte *Cis*-Inhibition eine zellautonome Unterdrückung der endogenen Notch-Aktivität, während die dominant negativ agierenden Ser-Liganden den Notch-Signalweg auch in den benachbarten, nicht exprimierenden Zellen reprimieren (Abbildung 19). Des Weiteren kann die *Cis*-Inhibition durch Ko-Expression mit UAS-N unterdrückt und eine starke ektopische Aktivierung des Notch-Signalwegs induziert werden, während bei den dominant negativen Liganden weiterhin keine Aktivierung des Notch-Signalwegs stattfindet (Abbildung 19). Einen

weiteren Hinweis auf die dominant negative Wirkungsweise von SerK2R-HA lieferte die Analyse von SerK2R$^{\Delta EGF6}$-HA (hergestellt in Zusammenarbeit mit P. Schmidt, AG Klein). Dieses Konstrukt trägt zusätzlich zur K-freien ICD eine Deletion des sechsten EGFs von Ser. Es konnte bereits gezeigt werden, dass eine Deletion von EGF6 in einem nicht *cis*-inhibitorischen Ser-Liganden resultiert [27]. Auch ein Ser-HA-Ligand ohne EGF6 (Ser$^{\Delta EGF6}$-HA) wirkt nicht mehr *cis*-inhibitorisch. Eine Deletion des sechsten EGF bei dem SerK2R-HA-Liganden hingegen hat keinen Einfluss auf die dominant negative Wirkung von SerK2R-HA hat (AG Klein, unveröffentlichte Daten). Folglich unterscheidet sich die Wirkungsweise von SerK2R-HA von einem stark *cis*-inhibitorischen Liganden.

Die Notwendigkeit der intrazellulären Ks für die Ser-Aktivität impliziert, dass die Ubiquitinierung von Ser für eine produktive Signaltransduktion benötigt wird. Diese Vermutung wird anhand der Ergebnisse der Ser-Expression im *mib1*-mutanten Hintergrund unterstützt. Während Dl eine leichte Mib1- und Ubiquitinierungs-unabhängige Restaktivität besitzt [28], ist Ser in Abwesenheit von Mib1 inaktiv ((Abbildung 39) und [28, 43]). Analog dazu wurde bei Untersuchungen des Maus-Myokardiums gezeigt, dass ein Ausfall von *MIB1* in diesem Gewebe in einem Phänotyp resultiert, der dem Jag1-Ausfallphänotyp gleicht [105]. In einer weiteren Publikation wurde die Abhängigkeit der Aktivität der Jag1-ICD von der Bindung an MIB1 demonstriert [48].
Die Notwendigkeit von mindestens einem UIM des Adapterproteins Lqf in Rettungsexperimenten, weist ebenfalls auf die Abhängigkeit von der Ubiquitinierung für die Aktivierung des Notch-Signalwegs hin ((Abbildung 28) und [74]). In den Überexpressionsstudien hingegen scheinen sowohl UIM1 als auch UIM2 von Lqf für die Ser-Aktivität gleichbedeutend zu sein (Abbildung 28). Möglicherweise besitzen die Lqf-Rettungskonstrukte, mit je einem funktionalen UIM eine schwächere Aktivität, die allerdings noch ausreicht, um die Endozytose der endogenen Liganden einzuleiten. Wird die Konzentration der Liganden durch eine zusätzliche Ser-HA-Expression erhöht, reicht die Aktivität dieser Lqf-Rettungskonstrukte für eine produktive Signalweiterleitung nicht mehr aus. Analoge Untersuchungen mit Dl-HA im gleichen genetischen Hintergrund demonstrierten, dass für die Dl-vermittelte ektopische Aktivierung des Notch-Signalwegs UIM1 eine wichtigere Rolle spielt. Hierbei scheint das UIM1 den Verlust vom UIM2 bei der Dl-HA-Expression noch kompensieren zu können und zu einer leichten ektopischen Aktivierung des Notch-Signalwegs beizutragen. Ein Verlust der UIM1-Funktion resultiert hingegen in einer fehlenden Aktivierung des Notch-Signalwegs (M. Kerkhoff, Masterarbeit 2018). Die Beobachtung, dass Dl-HA die UIM1-Funktion bevorzugt benötigt, deutet außerdem darauf hin, dass es sich bei der Ser-HA-Expression um kein Überexpressionsartefakt handelt und die Notwendigkeit von beiden UIMs Ser-spezifisch sein könnte. Zusätzlich deutet dies darauf hin, dass Ser eine wichtigere Rolle bei der Flügelentwicklung als Dl spielt. In einer vorigen Publikation konnte auch gezeigt werden, dass Ser bei der Flügelentwicklung der wichtigere Ligand ist [34].

Außerdem wird sowohl bei der Ser-HA- als auch bei der Dl-HA-Expression im *lqf*-mutanten Hintergrund, der mit nur einer Kopie von Lqf-FL-GFP gerettet wurde, eine schwächere ektopische Aktivierung des Notch-Signalwegs im Vergleich zur wildtypischen Situation beobachtet ((vgl. Abbildung 19 mit Abbildung 28) und (M. Kerkhoff, Masterarbeit 2018)). Diese Resultate legen nahe, dass Lqf als limitierender Faktor bei der Aktivierung des Notch-Signalwegs agiert. Interessanterweise ist die Endozytose der Liganden bei einem kompletten Lqf-Ausfall nicht vollständig unterdrückt ([72] und (Abbildung 26)). Dies deutet darauf hin, dass Lqf nur bei einer bestimmten Fraktion der Liganden die Endozytose vermittelt [72]. Das könnte wiederum bedeuten, dass die Aktivität von Lqf letztendlich die Stärke der Aktivierung des Notch-Signalwegs reguliert. In diesem Zusammenhang wäre interessant zu untersuchen, ob eine zusätzliche Anzahl von *lqf*-Kopien zu einer stärkeren Aktivierung des Notch-Signalwegs führen kann.

Darüber hinaus legen diese Ergebnisse nahe, dass Ser über zwei verschiedene Mechanismen Lqf-abhängig und -unabhängig internalisiert wird. Dabei scheint die Endozytose von Ser in beiden Fällen Ubiquitinierungs-abhängig zu sein. Es wäre daher vorstellbar, dass neben Lqf ein weiteres Adapterprotein existiert, das nur ubiquitiniertes Ser binden und dessen Endozytose einleiten kann. Allerdings resultiert diese Endozytose in keiner produktiven Signalweiterleitung. Diese könnte eher dazu dienen das Gesamtlevel von Ser auf der Zelloberfläche zu regulieren, um bspw. die Liganden von der Zellmembran zu entfernen, die mit dem N-Rezeptor in *cis*-interagieren und diesen inhibieren könnten. Es wäre außerdem denkbar, dass der Ser-Ligand zusammen mit dem N-Rezeptor als „Cis-Paar“ Lqf-unabhängig internalisiert wird, um anschließend separiert und an die Zelloberfläche einzeln wiedergebracht zu werden. Auf der Suche nach einem möglichen Adapterprotein, das die alternative, Lqf-unabhängige Endozytose vermitteln könnte, wäre ein „Proximity Biotinylation“ -Assay mit z. B. APEX2 hilfreich. Hierfür sollten Ser und SerK2R mit APEX2 fusioniert werden. Anschließend wäre eine Expression dieser Konstrukte und der Biotinylierungsassay möglich, um die möglichen Interaktionspartner zu isolieren. Da SerK2R-HA keine Ks in der ICD besitzt und somit nicht ubiquitiniert werden kann, wäre das mögliche Adapterprotein nicht in der Lage mit SerK2R zu interagieren. Daher sollten bei dem Proximity Biotinylation“ -Assay Unterschiede im Interaktom von Ser-HA und SerK2R-HA festzustellen sein.

4.1.2 Die Endozytose und Degradation von Ser sind abhängig von den Ks in der ICD

Es wurde bereits gezeigt, dass bei einem Ausfall von *mib1* Ser an der apikalen Plasmamembran akkumuliert, während die Dl-Endozytose unverändert bleibt [41, 43]. Auch bei einer Herunterregulation von MIB1 in Säugerzellkultur wird keine Endozytose für Jag1 mehr beobachtet [87]. Für DlK2R und Dll1K2R hingegen konnte Endozytose beobachtet werden, obwohl diese nicht ubiquitiniert werden [28, 36].

Die Analyse der Endozytose der transgenen Ser-Liganden in den Flügelimaginalscheiben und in S2-Zellen ergab, dass SerK2R-HA nicht endozytiert wird, während für Ser-HA eine effiziente

Endozytose beobachtet wird (Abbildung 20 und Abbildung 51). Da Mib1 in der Flügelimaginalscheibe ubiquitär exprimiert wird, sollte die meiste Ubiquitinierung und die Endozytose des Liganden in diesem Gewebe durch Mib1 vermittelt werden [41]. Daher weisen die Ergebnisse dieser Untersuchung darauf hin, dass Mib1 nicht in der Lage ist die Endozytose eines Ser-Liganden ohne Ks in der ICD einzuleiten. Auch bei dem Antikörper-„Uptake"-Assay in S2-Zellen wurde die Unfähigkeit von Mib1 die Endozytose von SerK2R-HA einzuleiten bestätigt. So lokalisiert sowohl SerK2R-HA als auch Ser-HA über längere Zeit an der Zellmembran ((Abbildung 22) und (Abbildung 53)), eine Ko-Expression beider Liganden mit Mib1 bewirkt hingegen eine rasche Internalisierung von Ser-HA, jedoch nicht von SerK2R-HA (Abbildung 22). Diese Ergebnisse stimmen mit den publizierten Daten überein, dass Mib1 eine Entfernung von Ser von der Zellmembran in S2-Zellen bewirkt [25] und bestätigen außerdem die bereits früher beschriebene Abhängigkeit der Ser-Endozytose von der Mib1-Funktion [41, 43].

Transmembranproteine, die für den Abbau bestimmt sind, werden nach der Endozytose über den endosomalen/lysosomalen Transportweg degradiert (Übersicht in [70]). Die Ubiquitinierung der Transmembranproteine wird hierbei neben der Endozytose auch für eine effiziente Verpackung dieser Proteine in intraluminalen Vesikel für den anschließenden Abbau im Lysosom benötigt. Da SerK2R-HA keine Ks in der ICD besitzt, wäre zu erwarten, dass die Degradation von SerK2R-HA gestört ist. In Untersuchungen an DlK2R konnte bspw. gezeigt werden, dass der Abbau von DlK2R-HA verlangsamt ist [28]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde mithilfe eines Pulse-Chase-Experimentes für SerK2R-HA ebenfalls eine deutliche Verzögerung der Degradation festgestellt (Abbildung 23; in Zusammenarbeit mit S. Akgün, Bachelorarbeit 2017). Somit, werden die Ks in der ICD von Ser für die Mib1-vermittelte Endozytose und die Degradation des Liganden benötigt.

Wie in 3.5 beschrieben, befinden sich Ks in den putativen Bindeboxen für Mib1. Aus diesem Grund wäre es möglich, dass die Ks in der Ser-ICD bei der Interaktion mit Mib1 eine Rolle spielen. Mit Hilfe einer Co-IP konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass SerK2R-HA in der Lage ist mit Mib1 zu interagieren. Die Interaktion scheint im Vergleich zu Ser-HA allerdings schwächer zu sein (Abbildung 25). Mit Hilfe der schwächeren Bindung von SerK2R-HA an Mib1 könnte die Inaktivität von SerK2R-HA erklärt werden. Denn ein Verlust der Interaktion mit Mib1 würde zu einer ähnlichen Situation führen, wie im *mib1*-mutanten Hintergrund, bei der ein Ser-Ligand funktionslos ist [41, 43]. Um genauere Aussagen über die Affinitäten der transgenen Liganden zu Mib1 zu treffen, sollten allerdings in zukünftigen Experimenten quantitative Methoden, wie MST („Microscale thermophoresis"), verwendet werden. Sollte eine schwächere Bindung von SerK2R-HA an Mib1 bestätigt werden, wäre es außerdem ein Hinweis auf strukturelle Eigenschaften von der Ser-ICD. Nach dem heutigen Wissenstand ist nicht genau bekannt, ob die ICD von Ser eine bestimmte Proteinkonformation aufweist. Im Rahmen dieser Arbeit wurde versucht mit Hilfe der Internetseiten „SWISS-MODEL" und „UniProt" eine mögliche Struktur der Ser-ICD vorherzusagen.

Es konnte allerdings keine besondere Struktur vorhergesagt werden. Dennoch weisen die Ergebnisse dieser Arbeit darauf hin, dass die ICD von Ser eine bestimmte Konformation aufweist, die für die Aktivität von Ser und für die Interaktion mit Mib1 essentiell sein könnte. Daher wäre eine geringere Bindung von SerK2R-HA an Mib1 auf stärkere strukturelle Veränderungen der Ser-ICD infolge der Austausche aller Ks zu Rs zurückzuführen.

4.1.3 Die transgenen Ser-Liganden verändern die Lokalisation des N-Rezeptors

In einer vorigen Publikation wurde gezeigt, dass bei einer ektopischen Expression eines wildtypischen Ser-Liganden der endogene N-Rezeptor von der apikalen Membran entfernt wird [25]. Diese Beobachtung führte zu der Frage, ob die Lokalisation des endogenen N-Rezeptors als Konsequenz der gestörten SerK2R-Endozytose beeinflusst wird. Während die Expression von Ser-HA eine Entfernung des endogenen N-Rezeptors von der apikalen Membran bewirkt, führt die Expression von SerK2R-HA zu einer Anreicherung des N-Rezeptors in einigen Bereichen entlang der apikalen Membran (Abbildung 24). Diese apikale Akkumulation des N-Rezeptors könnte ein Indiz dafür sein, dass der dominant negative SerK2R-Ligand, der nicht endozytiert wird, die Endozytose des Rezeptors beeinträchtigt. Auch bei den Expressionen der inaktiven Ser- ($Ser^{\Delta int}$) und Dl- (Dli1/2) Varianten wird eine Akkumulation des endogenen N-Rezeptors an der apikalen Membran beobachtet [25, 58]. Somit scheinen die Liganden, die nicht in der Lage sind den Notch-Signalweg zu aktivieren, die Endozytose des N-Rezeptors zu beeinträchtigen. Ein Antikörper-„Uptake"-Assay mit einem anti-NECD-Antikörper in den Flügelimaginalscheiben wäre hierbei hilfreich, um die Endozytose des N-Rezeptors bei den Expressionen der transgenen Ser-Liganden genauer zu untersuchen.

Die Beobachtungen, dass der Ligand und der Rezeptor ihre Lokalisation gegenseitig beeinflussen können, sind in mehreren Studien beschrieben. Es wurde bspw. in der Zellkultur gezeigt, dass die Lokalisation von Jag1 in der Zelle vom N-Rezeptor abhängig ist. Hierbei lokalisiert eine Jag1-Variante, die nicht in der Lage ist mit dem N-Rezeptor zu interagieren, vermehrt an der Plasmamembran [87]. Untersuchungen im Zebrafisch demonstrierten, dass die Endozytose des Dl-Orthologs, DlD, vom N-Rezeptor abhängig ist [106]. In einer weiteren Untersuchung demonstrierten Nichols et al. 2007 in Säuger-Zellkultur, dass bei der Expression von Dll1ΔICD die ECD des N-Rezeptors an der apikalen Membran akkumuliert. Die Expression vom wildtypischen Dll1 hingegen führt zu einer *Trans*-Endozytose von NECD [13]. Ein ähnlicher Effekt wurde in dieser Arbeit bei der Expression einer Ser-Variante ohne ICD beobachtet. Hierbei akkumuliert der endogene N-Rezeptor an der apikalen Membran in den Flügelimaginalscheiben (Abbildung 58), ähnlich wie bei der SerK2R-HA-Expression, was auf eine beeinträchtigte Endozytose des endogenen N-Rezeptors hindeutet.

Zusammen deuten diese Resultate darauf hin, dass ein Verlust aller Ks in der Ser-ICD zu einer gestörten Endozytose des Liganden führt, was wiederum eine beeinträchtigte N-Endozytose

sowie eine fehlende *Trans*-Aktivierung des Notch-Signalwegs zur Folge hat. Es wäre denkbar, dass infolge der gestörten Endozytose und Degradation von SerK2R-HA der Ligand an der apikalen Membran stark akkumuliert. Die Akkumulation des Liganden würde zu einer vermehrten Bindung an die endogenen N-Rezeptoren führen. Hierbei sollten die N-Rezeptoren nicht nur in *cis*, sondern auch in *trans* gebunden werden. Diese Vermutung wird durch die Beobachtung einer nicht zellautonomen Unterdrückung der endogenen Notch-Aktivität unterstützt. Die durch SerK2R-HA gebundenen N-Rezeptoren könnten dann nicht mehr endozytiert und nicht aktiviert werden.

Um die Beeinflussung der gegenseitigen Endozytose von Ser/SerK2R und vom N-Rezeptor weiter zu untersuchen, wäre eine Ko-Expression mit Deltex hilfreich. Deltex ist eine E3-Ligase, die den N-Rezeptor ubiquitiniert und dessen Endozytose steigert (Björn Schnute, Dissertation 2019). Es wäre interessant herauszufinden, ob dadurch die Endozytose von SerK2R-HA induziert wird, was für die Beeinflussung der gegenseitigen Endozytose spräche.

Andererseits scheint die vesikuläre Lokalisation des N-Rezeptors bei den Expressionen der transgenen Ser-Liganden nicht signifikant verändert zu sein. Vor diesem Hintergrund wäre nicht ausgeschlossen, dass die ektopische Expression der Liganden eine veränderte Transkriptionsrate von *Notch* zur Folge hat. In diesem Fall wäre die vermehrte Lokalisation des N-Rezeptors an der apikalen Membran nur indirekt beeinflusst. Von daher wäre eine Ko-Expression von Ser-HA und SerK2R-HA mit N-*lacZ* hilfreich, um transkriptionelle Veränderungen von *Notch* zu detektieren.

Die Akkumulation von SerK2R-HA an der apikalen Membran ist vergleichbar mit der apikalen Akkumulation von Ser in *mib1*-mutanten Zellen [41]. Aus diesem Grund wäre es interessant die Lokalisation des endogenen N-Rezeptors in *mib1*-mutanten Zellklonen zu analysieren. Hierbei wäre es denkbar, dass der endogene N-Rezeptor in *mib1*-mutanten Zellen an der apikalen Membran akkumuliert.

Darüber hinaus wäre es interessant zu wissen, ob die beeinträchtigte Endozytose des N-Rezeptors zu dem dominant negativen Effekt von SerK2R-HA führt. Einerseits unterstützen die Ergebnisse der Ko-Expression von Ser-K2R-HA mit UAS-N diese Vermutung, da als Folge der Ko-Expression der dominant negative Effekt von SerK2R-HA unterdrückt wird. Andererseits bleibt die endogene Notch-Aktivität in diesem Fall nach wie vor reprimiert (Abbildung 19). Im Gegensatz zu der nicht zellautonomen Unterdrückung der Notch-Aktivität infolge der SerK2R-HA-Expression, führt eine Herunterregulation des N-Rezeptors mit Hilfe einer RNAi zu einer zellautonomen Unterdrückung der endogenen Notch-Aktivität (nicht gezeigt). Diese Beobachtungen könnten darauf hinweisen, dass SerK2R-HA möglicherweise noch weitere Faktoren beeinträchtigen könnte. Um zwischen diesen Möglichkeiten unterscheiden zu können, wäre ein SerK2R-Ligand hilfreich, der zu keiner Interaktion mit dem N-Rezeptor fähig ist, wie bspw. ein Ligand ohne die DSL-Domäne. Dieser Ligand sollte den Rezeptor weder in *trans* noch in *cis* binden können. Es wurde bereits gezeigt,

dass eine Ser-Variante mit mutierter DSL-Domäne weder *cis*-inhibitorisch noch *trans*-aktivierend wirkt, während es zu einer effizienten Expression und Endozytose des Konstruktes kommt [25]. Auch ein *Drosophila* Dl-Ligand ohne DSL-Domäne wird exprimiert und endozytiert, wirkt aber weder *cis*-inhibitorisch noch *trans*-aktivierend (N. Vüllings, unveröffentlichte Daten). Eine Deletion oder Mutation der DSL-Domäne sollte demnach in einem SerK2R-Liganden resultieren, der nicht an den N-Rezeptor binden kann. Sollte die Expression von SerK2R$^{\Delta DSL}$-HA zu einem SerK2R-HA-ähnlichen Phänotyp führen, wäre der dominant negative Effekt von SerK2R-HA höchstwahrscheinlich nicht als Konsequenz der beeinträchtigten N-Endozytose zu erklären. In diesem Fall käme die dominant negative Wirkung eher als Folge einer Interaktion mit Mib1 oder mit anderen Proteinen z. B. der endozytotischen Maschinerie zustande. So wurde in Zellkulturexperimenten gezeigt, dass MIB1 die Rekrutierung von Dynamin2 via Sorting Nexin 18 (SNX18) moduliert, was für eine effiziente Endozytose von Dll1 und anschließende Aktivierung des Notch-Signalwegs benötigt wird. Hierbei vermittelt ektopisch exprimiertes MIB1 eine Interaktion zwischen Dynamin2 und SNX18 in einer E3-Ligase-Aktivitäts-abhängigen Weise [107]. Um die mögliche Rolle von SNX18 für die Ser-Endozytose zu analysieren, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Herunterregulation von SNX18 mittels RNAi durchgeführt. Die kontinuierliche Expression von SNX18-RNAi hat keine Auswirkung sowohl auf die Aktivierung des Notch–Signalwegs entlang der d/v-Grenze der Flügelimaginalscheibe als auch auf die subzelluläre Lokalisation von endogenem Ser (nicht gezeigt). Bei dieser Untersuchung konnte jedoch die Effizienz der RNAi aufgrund eines fehlenden Antikörpers gegen SNX18 nicht verifiziert werden.

Um auszuschließen, dass die Expression von SerK2R-HA zu einer allgemeinen Beeinträchtigung der Endozytose oder endozytotischer Faktoren führt, wurde bei der SerK2R-HA-Expression eine Antikörperfärbung gegen Crumbs (Crb) durchgeführt. Crb ist ein Transmembranprotein, das für die apiko-basale Zellpolarität essentiell ist. Es wurde gezeigt, dass bei einer gestörten Endozytose die subzelluläre Lokalisation von Crb stark verändert wird [108]. Bei der SerK2R-HA-Expression wurde keine Veränderung der Lokalisation von Crumbs festgestellt (nicht gezeigt), was darauf hindeutete, dass eine SerK2R-HA-Expression keine Auswirkung auf die allgemeine Endozytose hat. Bei diesem Experiment sollte allerdings beachtet werden, dass es für Crb und Notch eine genetische Interaktion gezeigt wurde, bei der Crb an der Lokalisation des Rezeptors an der apikalen Zellmembran eine Rolle spielt [109]. Von diesem Hintergrund sollte der Einfluss der SerK2R-Expression auf die Endozytose eines anderen Proteins analysiert werden, das in keinem direkten Zusammenhang mit dem Notch-Signalweg steht. Dennoch zeigen diese Ergebnisse, dass die SerK2R-HA-Expression keine Auswirkung auf die allgemeine Endozytose hat. Aus diesem Grund wäre es wahrscheinlicher, dass SerK2R-HA-Expression eine Auswirkung auf Mib1 hat. So wurde demonstriert, dass eine ektopische Expression von Dmib1ΔR, einer Mib1-Variante ohne E3-Ligase-Aktivität, eine nicht zellautonome Unterbrechung der endogenen Wg-Expression und

eine Narbenbildung entlang der Expressionsdomäne verursacht ([42] und Bachelorarbeit E. Seib, 2011). Dabei akkumulieren beide endogenen Liganden an der apikalen Membran [42]. Somit führt ein Verlust der E3-Ubiquitin-Ligase-Aktivität von Mib1 zu einem Phänotyp, der dem SerK2R-HA-Phänotyp ähnelt. Die Ähnlichkeit der Phänotypen bei den SerK2R-HA- und DmibΔR-Expressionen könnte ein Hinweis darauf sein, dass SerK2R-HA neben der Lokalisation des N-Rezeptors die Aktivität von Mib1 beeinträchtigt. Die Phänotypen scheinen dabei mit der unterdrückten Ubiquitinierung zusammen zu hängen und nicht damit, dass als Konsequenz der SerK2R-HA-Expression Mib1 austitriert wird und somit nicht ausreichend zur Verfügung steht. Denn eine zusätzliche Expression von UAS-Dmib1 war nicht ausreichend, um die dominant negative Wirkung von SerK2R zu unterdrücken (Abbildung 61). In diesem Zusammenhang wäre eine Detektion der subzellulären Lokalisation von Mib1 bei der Expression von SerK2R-HA hilfreich. Sollte die SerK2R-HA-Expression einen Effekt auf Mib1 haben, wäre eine veränderte subzelluläre Lokalisation von Mib1 vorstellbar.

Da bei der Dmib1ΔR-Expression beide endogene Liganden an der apikalen Membran akkumulieren, wäre es interessant zu untersuchen, ob die Expression von SerK2R-HA die subzelluläre Lokalisation der endogenen Liganden, Dl und Ser, beeinflussen kann. Außerdem konnte eine Beeinflussung der Endozytose vom endogenen N-Rezeptor durch die Expression von einem transgenen N-Rezeptor beobachtet werden (B. Schnute, Dissertation 2019). Es wäre daher vorstellbar, dass die transgenen Ser-Liganden die Endozytose von endogenem Ser beeinflussen.

4.1.4 Die Identifizierung essentieller Ks in der ICD von Ser

Die Ergebnisse der Analyse von SerK2R-HA demonstrieren eine absolute Abhängigkeit von den intrazellulären Ks für die Ser-Aktivität. Die ICD von Ser enthält zehn Ks, fünf davon an den Positionen 1276, 1294,1362, 1381 und 1385 sind stark konserviert (Abbildung 29). Aus diesem Grund stellte sich die Frage, welche dieser Ks für die Funktion von Ser essentiell und ausreichend sind. Um dieser Frage nachzugehen, wurden die fünf konservierten Ks entweder in der ICD von Ser-HA durch Rs ausgetauscht (K zu R-Austausch) oder in die K-freie ICD von SerK2R-HA wieder eingeführt (R zu K-Austausch).

Die Ergebnisse dieser Untersuchung ergaben, dass für die Ser-Aktivität nur K1362 einzeln wichtig ist (Abbildung 30 und Übersicht in Abbildung 55). Gleichzeitig ist keines der fünf konservierten Ks einzeln ausreichend, um die sonst K-freie ICD von SerK2R-HA zu aktivieren (Abbildung 33 und Übersicht in Abbildung 55). Dabei befindet sich das K1294 in der putativen N-Box von Ser und könnte von der Position her dem K613 von Dll1 entsprechen. Es wurde in Zellkultur-Experimenten mit Säuger Dll1 gezeigt, dass K613 für die Ubiquitinierung und die Aktivität des Liganden essentiell ist [37]. Im Gegensatz zu Dll1 ist das entsprechende K in den ICDs von Dl und Jag1 für die ektopische Aktivierung des Notch-Signalwegs nicht essentiell, ähnlich wie bei Ser ((N. Vüllings, unveröffentlichte Daten) und [48]). K742 in der ICD von Dl entspricht dem essentiellen

K1362 von Ser und scheint ebenfalls eine wichtige Rolle für die Aktivität von Dl zu spielen (N. Vüllings, unveröffentlichte Daten).

Außerdem ergab die Analyse der multiplen K zu R-Austausche in der Ser-ICD, dass sobald vier der fünf konservierten Ks fehlen der Ligand nicht mehr aktiv ist. Darüber hinaus wirken alle Ser-4R-Varianten dominant negativ, wie SerK2R-HA. Dabei kann kein Unterschied in Abhängigkeit von fehlenden Ks festgestellt werden. In diesem Fall scheinen alle fünf Ks wichtig zu sein, sobald die restlichen vier mutiert sind (Abbildung 32 und Übersicht in Abbildung 55). Hierbei gilt zu beachten, dass ein SerK2R-HA vergleichbarer Phänotyp bereits bei drei ausgetauschten Ks auftreten könnte. Diese Möglichkeit wurde in dieser Arbeit nicht überprüft. Ein gleichzeitiger Austausch von Ks 1276 und 1294 führt zu einer stärkeren *Cis*-Inhibition des Liganden, der jedoch den Notch-Signalweg noch aktivieren kann (Abbildung 31). Ein Austausch dieser Ks gegen Alanine führt hingegen zu einem inaktiven Liganden [25]. Da Rs den Ks strukturell ähnlicher als Alanine sind, wäre es vorstellbar, dass der in der Publikation beschriebene Funktionsverlust von Ser infolge einer stärkeren strukturellen Veränderung der ICD auftritt.

Die Ergebnisse der Wiedereinführung von mehreren Ks in die SerK2R-ICD legen nahe, dass mindestens fünf Ks für die volle Funktion von Ser erforderlich sind (Abbildung 35 und Übersicht in Abbildung 55). Hierbei konnte beobachtet werden, dass sobald eines der fünf konservierten Ks mutiert ist, ein weiteres weniger stark konserviertes K1370 den Verlust kompensieren kann (Abbildung 36). Untersuchungen der SerK2R-4K-Varianten, mit vier gleichzeitig eingeführten Ks, deuten auf eine gewisse Hierarchie zwischen diesen fünf konservierten Ks hin. In Abhängigkeit von der Kombination der eingeführten und fehlenden Ks wirken die SerK2R-4K-Liganden entweder *cis*-inhibitorisch oder dominant negativ. So scheint ein Verlust von Ks 1362 und 1385 zu einem dominant negativen Effekt zu führen, selbst wenn die restlichen vier konservierten Ks noch vorhanden sind. Im Gegensatz dazu führt ein Verlust der Ks 1276, 1294 oder 1381 zu einer verstärkten *Cis*-Inhibition des Liganden und zu keiner dominant negativen Wirkungsweise (Abbildung 34). Diese Beobachtungen wären damit zu erklären, dass bestimmte Kombinationen aus Ks die Effizienz der Endozytose und der Degradation von Ser beeinflussen können.

Um die Beziehung zwischen der Endozytose und der Aktivität der transgenen Ser-Rs- und SerK2R-Ks-Varianten zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit eine Analyse der subzellulären Lokalisation von einigen Varianten durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Analyse deuten auf eine Abhängigkeit der Aktivität des Ser-Liganden von dessen Endozytose hin. Dabei konnte beobachtet werden, dass alle getesteten Ser-Varianten, die nicht endozytiert werden, keine *trans*-aktivierenden Eigenschaften aufweisen. Die *cis*-inhibitorischen Eigenschaften dieser transgenen Liganden werden hingegen gesteigert. Darüber hinaus zeigen einige Ser-Varianten, die nicht endozytiert werden, einen starken dominant negativen Effekt. Somit scheint sowohl die verstärkte *cis*-

inhibitorische Eigenschaft als auch die dominant negative Wirkungsweise mit der gestörten Endozytose des Ser-Liganden zu korrelieren. Ähnliche Situation wird in der *mib1*-mutanten Situation beobachtet, bei der keine Endozytose und keine Aktivität für Ser beobachtet werden. Ähnlich dazu wurden in Glittenberg et al. 2006 inaktive Ser-Varianten, $Ser^{\Delta int}$, Ser^{*KK} sowie $Ser^{*NNL/NPL}$ beschrieben, für die keine Endozytose beobachtet wurde. Interessanterweise wird eine weitere Ser-Variante Ser^{*LL} ebenfalls nicht endozytiert, sie ist jedoch in der Lage den Notch-Signalweg zu aktivieren [25]. Dies deutet darauf hin, dass nicht immer eine fehlende Endozytose von Ser mit einer fehlenden Aktivität des Liganden einhergeht. Außerdem wäre es möglich, dass die Endozytose bei manchen Ser-Varianten ineffizient oder verzögert und daher nicht detektierbar ist. Um die Korrelation zwischen der Endozytose der Ser-Varianten und der Aktivität des Liganden weiter zu untersuchen, wäre eine Expression der *cis*-inhibitorischen sowie dominant negativen Ser-Varianten im *trpml* mutanten Hintergrund hilfreich. Wie oben beschrieben, wird bei dem Ausfall von *trpml* die Fusion des späten Endosoms mit dem Lysosom unterdrückt [99]. Dadurch kann die Endozytose für den Liganden selbst dann nachgewiesen werden, wenn dieser verzögert oder ineffizient endozytiert wird.

Um zu untersuchen, ob eine bestimmte Kombination der Ks die Degradation von Ser beeinflusst, wäre ein Western Blot mit Proteinlysaten aus Larven mit den Ser-Rs- und SerK2R-Ks-Varianten hilfreich. Des Weiteren könnte ein Pulse-Chase-Experiment mit den SerK2R-4K-Varianten Aufschlüsse darüber geben, wie effizient diese Varianten degradiert werden. Darüber hinaus wäre es interessant, die Ks zu identifizieren, die ubiquitiniert werden. Hierfür wäre eine Analyse einer Auswahl der Ser-R- und SerK2R-K-Varianten mittels Massenspektrometrie hilfreich. Dadurch wäre es eventuell möglich, eine Korrelation zwischen der Aktivität einer Ser-Variante und der Kombination der ubiquitinierten Ks festzustellen. Um ausreichende Mengen an ubiquitinierten Proteinen für die Massenspektrometrie und ähnliche Analysen produzieren zu können, wäre ein *E. coli*-basiertes Selektion- und Expressionssystem hilfreich [110].

4.1.5 Vergleich der Wirkungsweise von SerK2R-HA und Ser^{R1362}-HA

Die Beobachtung, dass von den fünf konservierten Ks nur das K1362 für die Ser-Aktivität einzeln essentiell ist, führte zu der Frage nach der Wirkungsweise des Ser^{R1362}-HA-Liganden. Ähnlich, wie bei dem Verlust aller Ks in der Ser-ICD, führt ein Verlust von K1362 zu einer Unterdrückung der endogenen Notch-Aktivität entlang der d/v-Grenze und zur Ausbildung einer Narbe im Flügelfeld (Abbildung 30). Im Gegensatz zu SerK2R-HA, das nicht zellautonom agiert, reprimiert Ser^{R1362}-HA die endogene Notch-Aktivität strikt zellautonom (Abbildung 50), was auf eine starke *cis*-inhibitorische Wirkung von Ser^{R1362}-HA hindeutet. Dabei wird der starke *cis*-inhibitorische Effekt von Ser^{R1362}-HA durch Ko-Expression mit UAS-N unterdrückt und eine starke ektopische Aktivierung des Notch-Signalwegs festgestellt, ähnlich wie bei Ser-HA (Abbildung 31). Somit resultiert ein Verlust von K1362 in einem stark *cis*-inhibitorischen Ser-Liganden. Um zu

untersuchen, ob der starke *cis*-inhibitorische Effekt von Ser^{R1362}-HA unterdrückt werden kann, wäre eine Expression einer Ser$^{R1362\Delta EGF6}$-HA-Variante sinnvoll. Wie zuvor erwähnt, führt die Deletion von EGF6 zu einem nicht *cis*-inhibitorischen Liganden [27]. Es wäre daher interessant zu untersuchen, ob Ser$^{R1362\Delta EGF6}$-HA weiterhin *cis*-inhibitorisch wirken kann, wenn EGF6 deletiert ist. Das entsprechende Konstrukt wurde bereits durch P. Schmidt im Rahmen seiner Bachelorarbeit hergestellt. Die Transgenese war jedoch bisher nicht erfolgreich.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde außerdem mit Hilfe der temporären Expression von transgenen Liganden die Möglichkeit untersucht, ob Ser^{R1362}-HA bei einer niedrigeren Konzentration zuerst *trans*-aktivierend und erst später aufgrund der hohen Konzentration *cis*-inhibierend wirken kann. Sollte diese Vermutung zutreffend sein, wäre bei einer kurzen Expression von Ser^{R1362}-HA zunächst eine ektopische Aktivierung des Notch-Signalwegs zu erwarten. Es wird hingegen direkt eine zellautonome Unterdrückung der endogenen Notch-Aktivität beobachtet, sobald ein HA-Signal detektierbar ist (Abbildung 50). Somit ist es möglich, dass Ser^{R1362}-HA bereits bei niedriger Liganden-Konzentration stark *cis*-inhibitorisch wirkt.
Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass selbst bei kürzerer Expression die Liganden-Konzentration bereits zu hoch ist. Daher wäre eine Expression von Ser^{R1362}-HA auf endogenem Expressionsniveau sinnvoll. Dadurch wäre es möglich zu bestimmen, ob die *cis*-inhibitorische Eigenschaft eines Liganden nur durch seine Konzentration in der Zelle bestimmt wird oder ob möglicherweise noch weitere Faktoren eine verstärkte *cis*-Inhibitorische Wirkung eines Liganden bewirken können. So werden im Western Blot drei Banden für Ser beobachtet. Hierbei ist eine Bande deutlich größer als erwartet (Abbildung 25). Diese Bande könnte eine modifizierte Ser-Variante darstellen. Es könnte sich z. B. um eine Glykosylierung der ECD von Ser handeln, in der mehrere mögliche Glykosylierungsmotive vorhanden sind [111]. Deswegen könnte ein Glykosylierungsassay zur Aufklärung beitragen, ob es sich bei der detektierten größeren Ser-Bande um die Glykosylierung von Ser handelt. Um zu untersuchen, ob diese mögliche Modifizierung von Ser durch Mib1 vermittelt wird, wäre eine Expression von Ser-HA, SerK2R-HA und Ser^{R1362}-HA in S2-Zellen mit oder ohne zusätzliche Dmib1-Expression hilfreich. Sollte Mib1 zur Modifikation von Ser beitragen, wäre ein verändertes Bandenmuster bei Ko-Expression mit Mib1 für Ser-HA im Western Blot zu erwarten. Sollten den SerK2R-HA- und Ser^{R1362}-HA-Varianten die für die mögliche Modifikation notwendigen Ks fehlen, wäre für diese Varianten keine Veränderung des Bandenmusters zu erwarten. Darüber hinaus könnten die Proben der einzeln exprimierten Liganden und der Ko-Expression mit Mib1 mithilfe von Massenspektrometrie analysiert werden. Dabei wäre wichtig zu beachten, dass Ser in Anwesenheit von Mib1 schnell degradiert wird. Aus diesem Grund sollte die Degradation verhindert werden, um ausreichende Proteinmengen für die Analyse gewinnen zu können.

Interessanterweise wurde bei der Analyse der subzellulären Lokalisation von Ser^{R1362}-HA in

Flügelimaginalscheiben ausschließlich membranständiges HA-Signal detektiert (Abbildung 31). Diese Lokalisation ähnelt der Lokalisation von SerK2R-HA, was darauf hindeutete, dass die Endozytose und der anschließende Abbau von Ser^{R1362}-HA möglicherweise auch gestört sind. Dieses Ergebnis legt nahe, dass Mib1 nicht in der Lage ist die Endozytose von Ser beim Austausch von K1362 einzuleiten. Dies könnte damit erklärt werden, dass ein Autausch von K1362 zur Störung der Interaktion mit Mib1 führt. Um diese Möglichkeit zu testen, wäre eine Co-IP von Ser^{R1362}-HA mit Dmib1 hilfreich. Des Weiteren wären ein Pulse-Chase-Experiment und eine Expression von Ser^{R1362}-HA im *trpml*-mutanten Hintergrund hilfreich. Das Pulse-Chase-Experimentes sollte eine Bestimmung der Degradationsdauer von Ser^{R1362}-HA ermöglichen, während eine Expression im *trpml*-mutanten Hintergrund eine Detektion der endozytierten Ser^{R1362}-HA-Liganden selbst bei einer ineffizienten Endozytose ermöglichen könnte.

Ähnlich wie bei der SerK2R-HA-Expression akkumuliert der endogene N-Rezeptor bei der Ser^{R1362}-HA-Expression an der apikalen Membran (Abbildung 58). Es wäre daher interessant zu wissen, ob beide Liganden auf dieselbe Weise die Akkumulation des N-Rezeptors an der apikalen Membran bewirken. Möglicherweise könnte hierfür ein Pulse-Chase-Experiment mit kurzen Pulse-Phasen hilfreich sein. Eine kurze Pulse-Phase führt dazu, dass nur einzelne Zellen das transgene Konstrukt exprimieren und dadurch eine genauere Detektion der subzellulären Lokalisation des gewünschten Proteins ermöglicht wird (Björn Schnute, Dissertation 2019). Ein weiterer Vorteil einer kurzen Pulse-Phase wäre, dass nur einzelne Zellen den transgenen Liganden exprimieren und dadurch eventuell eine Unterscheidung zwischen der *trans*- und *cis*-Interaktion der transgenen Liganden mit dem Rezeptor möglich wäre. Möglicherweise könnte eine Expression von SerK2R-HA und Ser^{R1362}-HA in der Keimbahn von *Drosophila* hilfreich sein. Dadurch sollte es möglich sein zwischen einzelnen Zellen zu unterscheiden und den Unterschied auf die Rezeptor-Lokalisation zu verdeutlichen. So wurde in der Keimbahn gezeigt, dass der N-Rezeptor in *Dl*-mutanten Zellklonen an der Membran akkumuliert und die *Cis*-Inhibition durch den Liganden dafür benötigt wird, die Liganden-unabhängige Aktivierung von Notch zu unterdrücken [112]. Hierbei wäre jedoch wichtig zu beachten, dass kein endogenes Ser in der Keimbahn exprimiert wird. Daher könnte eine ektopische Ser-Expression in diesem Gewebe zu artifiziellen Effekten führen.

In Glittenberg et al. 2006 wurde eine $Ser^{\Delta T}$-Variante beschrieben, bei der alle Aminosäuren deletiert wurden, die sich nach der konservierten sog. „int"-Region befinden [25]. Durch diese Deletion wurde auch das K1362 aus der Ser-ICD entfernt. $Ser^{\Delta T}$ kann den Notch-Signalweg noch schwach ektopisch aktivieren. Diese ektopische Aktivierung des Notch-Signalweges ist schwächer als die Ser-vermittelte ektopische Aktivierung [25], ist jedoch deutlich stärker als diejenige bei der Expression von Ser^{R1362}-HA. Diese Beobachtungen legen nahe, dass nicht der Verlust von K1362 per se zu einem Funktionsverlust des Ser-Liganden führt, sondern der K zu R-Austausch

innerhalb der sonst wildtypischen Ser-HA-ICD. Des Weiteren deuten die unterschiedlichen Aktivitäten von $Ser^{\Delta T}$ und Ser^{R1362}-HA darauf hin, dass strukturelle Veränderungen in der ICD von Ser die Aktivität des Liganden beeinträchtigen. Auf der anderen Seite wurde $Ser^{\Delta T}$ zufällig ins Genom von *Drosophila* integriert [25] und ein direkter Vergleich von Ser^{R1362}-HA mit $Ser^{\Delta T}$ ist daher nicht möglich.

4.2 Die putativen Mib1-Bindemotive sind nicht essentiell für die Ser-Aktivität

Mit Hilfe der Untersuchungen der ICDs von Dl, Dll1 und Jag1 konnten sog. N- und/oder C-Boxen als Bindemotive für Mib1/MIB1 identifiziert werden ([48, 58], N. Vüllings; AG Klein und AG Gossler, unveröffentlichte Daten). Dabei konnte demonstriert werden, dass die Jag1-ICD sowohl die N- als auch die C-Box für eine vollständige Aktivität benötigt [48]. In den ICDs von Dl und Dll1 scheint hingegen nur die N- Box eine wichtige Rolle zu spielen ([58], N. Vüllings; AG Klein und AG Gossler, unveröffentlichte Daten). Basierend auf dem Aminosäuresequenzenvergleich konnte in der ICD von Ser eine N- und eine C-Box vorhergesagt werden ([48] und (Abbildung 46, B und Abbildung 45)). Hierbei unterscheidet sich die Sequenz der putativen N-Box von Ser deutlich von den N-Boxen anderer DSL-Liganden, während die vorhergesagte C-Box den C-Boxen anderer Liganden sehr ähnlich ist ((Abbildung 46, B und Abbildung 45) und [48]). Um die Rolle der vorhergesagten N- und C-Boxen in der Ser-ICD in *vivo* zu untersuchen, wurden die Aminosäuren der putativen N- und/oder C- Box durch Alanine ersetzt (Abbildung 46, D).

Die Ergebnisse dieser Untersuchung ergaben, dass sowohl die vorhergesagte N- als auch die C-Box für die Ser-Aktivität nicht essentiell sind (Abbildung 47). Wie zuvor erwähnt, ist die meiste Aktivierung des Notch-Signalwegs in der Flügelimaginalscheibe abhängig von Mib1 [42]. Daher kann davon ausgegangen werden, dass diese Bereiche in der Ser-ICD für die genetische Interaktion mit Dmib1 ebenfalls nicht essentiell sind. Vor diesem Hintergrund wurde in der ICD von Ser nach weiteren möglichen Interaktions-Motiven mit Mib1 gesucht. Hierbei wurde mit Hilfe eines Aminosäuresequenzvergleiches eine stark konservierte Region identifiziert (Abbildung 45). Ein Teil dieser Region wurde von Glittenberg et al. 2006 bereits als „int"-Region beschrieben [25]. Darüber hinaus befindet sich ein Teil der vermeintlichen N-Box und das vorhergesagte Neur-Bindemotiv (NBM) von Ser (Abbildung 45) in dieser Region [59]. Eine Deletion der konservierten „int"- Region führt zu einem inaktiven Ser-Liganden ($Ser^{\Delta int}$) [25]. Es wäre jedoch vorstellbar, dass größere Deletionen eine strukturelle Veränderung der Gesamtstruktur eines Proteins bewirken können. Aus diesem Grund wurde die oben beschriebene konservierte Region in kleinere Bereiche aufgeteilt und die entsprechenden Aminosäuren gegen Alanine ausgetauscht um Ser-EKSN2Ala-HA, Ser-NLQ2Ala-HA und Ser-NEEN2Ala-HA zu generieren.

Die Untersuchung der auf diese Weise mutierten Ser-Varianten ergab, dass keine der analysierten Aminosäuren für die Aktivität von Ser und somit für die genetische Interaktion mit Mib1 erforderlich sind. Dabei weist nur die Ser-EKSN2Ala-HA-Variante eine deutliche Reduktion der Liganden-Aktivität auf (Abbildung 48). Im Gegensatz zum inaktiven $Ser^{\Delta int}$ kann Ser-EKSN2Ala-HA den Notch-Signalweg noch ektopisch aktivieren ([25] und (Abbildung 48)). Aus diesem Ergebnis kann abgeleitet werden, dass der EKSN-Bereich in der ICD zur Ser-Aktivität beiträgt, jedoch einzeln nicht essentiell ist. Es ist allerdings wichtig zu beachten, dass $Ser^{\Delta int}$ zufällig ins Genom von *Drosophila* inseriert wurde und von daher mit den mutierten Ser-Varianten nicht direkt verglichen werden kann.

Die Ergebnisse der Suche nach den Bindemotiven für Mib1 in der Ser-ICD indizieren, dass die vorhergesagten N- und C-Boxen sowie weitere einzeln mutierten Bereiche in der ICD für die genetische Interaktion mit Mib1 nicht essentiell sind. Es bedarf also weiterer Mutationen oder Kombinationen aus bereits mutierten Bereichen, um die Motive zu identifizieren, die die genetische Interaktion mit Mib1 vermitteln.

Darüber hinaus konnte mit Hilfe dieser Untersuchung gezeigt werden, dass das vorhergesagte Neur-Bindemotiv für die Mib1-vermittelte Ser-Aktivierung und somit für die genetische Interaktion mit Mib1 nicht benötigt wird. Analog dazu wurde bei den Analysen der Dl-ICD beobachtet, dass Mib1 und Neur unterschiedliche Bereiche in der Liganden-ICD für die Aktivierung des Notch-Signalwegs und somit für die genetische Interaktion benötigen (N. Vüllings, unveröffentlichte Daten, [58]).

4.3 Neur aktiviert Ser K- und Mib1-unabhängig

In der Flügelimaginalscheibe ist die Expression der E3-Ubiquitin-Ligase Neur auf die sensorischen Mutterzellen beschränkt [45]. Neur ist allerdings in der Lage die Funktion von Dmib1 an der d/v-Grenze zu übernehmen ((Abbildung 39) und [28, 41]). Untersuchungen mit einer Dl-Variante ohne Ks in der ICD zeigten, dass Neur Dl K-unabhängig in Abwesenheit von Mib1 aktivieren kann. Um zu untersuchen, ob Neur auch den Ser-Liganden Mib1-unabhängig aktivieren kann, wurden die transgenen Ser-Liganden mit Neur und mit Neur-Varianten ko-exprimiert. Die Ergebnisse der Ko-Expressionen von Ser- HA mit Neur sowie mit den Neur-Varianten legen nahe, dass Neur die Aktivierung von Ser in einer Mib1-unabhängigen Weise vermitteln kann (Abbildung 39).

Darüber hinaus demonstrieren die Ergebnisse der Ko-Expressionen mit SerK2R-HA, dass Neur in der Lage ist den sonst dominant negativen SerK2R-Liganden zu aktivieren und zur ektopischen Aktivierung des Notch-Signalwegs beizutragen. Diese ektopische Aktivierung ist sogar stark genug, um eine ektopische Wg-Expression einzuleiten (Abbildung 38 und Abbildung 39). Sie ist jedoch schwächer als bei der Ko-Expression mit Ser-HA und kann durch die Wiedereinführung der Ks in die SerK2R-ICD gesteigert werden. Hierbei sind nicht alle Ks gleichbedeutend. So steigert K1294 die Aktivität von SerK2R-HA deutlich, während K1362 hierfür unwichtig ist. Anders als bei Ser, wurde das entsprechende K742 in der Dl-ICD als bevorzugtes Ubiquitinierung-Substrat für Neur beschrieben [58]. Die stärkste Aktivität wird bei einer SerK2R-5K-Variante mit fünf konservierten Ks beobachtet (Abbildung 41). Also, scheint die Aktivierung von Ser durch Neur einerseits K-unabhängig zu sein, andererseits sind die Ks für eine effektive Aktivierung wichtig. Hierbei scheinen einige Ks wichtiger zu sein als andere. Um die Rolle einzelner Ks in der Ser-ICD für die Aktivierung durch Neur zu untersuchen, wäre eine Ko-Expression mit den SerK2R-K- und Ser-R-Varianten mit einzelnen Austauschen hilfreich.

Im Gegensatz zu Neur-Myc ist keine der anderen Neur-Varianten in der Lage die K-freie ICD von SerK2R-HA zu aktivieren (Abbildung 39). Dies deutet darauf hin, dass für die Ser-Aktivierung durch Neur die Bindung an Ser, die katalytische RING-Domäne und das PIP_2-Bindemotiv für die Membranassoziation von Neur benötigt werden. Die Notwendigkeit der Bindung von Neur an den Liganden konnte von der Seite des Liganden ebenfalls bestätigt werden. So führte eine Mutation des vorhergesagten NBM zur fehlenden Aktivierung des Notch-Signalwegs im *mib1*-mutanten Hintergrund (Abbildung 49) [59]. Ähnliche Resultate wurden für die DlK2R-HA-vermittelte Aktivierung des Notch-Signalwegs über Neur beschrieben. Hierbei wurde gezeigt, dass ein DlK2R-Ligand mit einem mutierten NBM nicht in der Lage ist den Notch-Signalweg zu aktivieren [28]. Im Gegensatz zu SerK2R-HA wird für die Aktivierung von Ser-HA die NHR2-Domäne nicht benötigt (Abbildung 38 und Abbildung 39). Die genaue Rolle der NHR2-Domäne ist bislang nicht ganz klar. Zusammen mit der NHR1-Domäne ist die NHR2-Domäne ausreichend, jedoch nicht notwendig für die Oligomerisation von Neur [55]. Es wurde außerdem in *vitro* und in Säugerzellkultur gezeigt, dass Neurl1 mit Jag1 bevorzugt via NHR2 interagiert [113].

Die Abhängigkeit der Ser-Aktivierung durch Neur von der RING-Domäne könnte zum einen bedeuten, dass die E3-Ligase-Aktivität und somit die Ubiquitinierung benötigt wird. Alternativ wäre es jedoch möglich, dass die RING-Domäne per se essentiell ist. In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass die RING-Domänen der Oligomerisation von Proteinen dienen können (Übersicht in [40]). Um zwischen diesen Möglichkeiten unterscheiden zu können, wurde SerK2R-HA mit Neur im *lqf*-mutanten Hintergrund ko-exprimiert, der durch das Lqf-Konstrukt ohne funktionale UIMs gerettet wurde. In diesem Experiment konnte keine Aktivierung des Notch-Signalwegs beobachtet werden (Abbildung 40). Diese Beobachtungen legen also nahe, dass bei der Neur-vermittelten Aktivierung von Ser die Ubiquitinierung benötigt wird. Somit ist Neur in der Lage die Aktivierung von Ser in einer K-unabhängigen und einer K-abhängigen Weise zu vermitteln. Die Ubiquitinierung scheint in beiden Fällen notwendig zu sein.

4.3.1 Neur kann die Endozytose und Degradation von Ser K-unabhängig einleiten

Die Tatsache, dass Neur den sonst inaktiven SerK2R-HA-Liganden in einen aktiven transformieren konnte, warf die Frage nach dem Mechanismus dieser Transformation auf. Zahlreiche Publikationen demonstrierten, dass Neur in der Lage ist die Endozytose der DSL-Liganden einzuleiten [41, 46, 51, 53, 56]. Auch in dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Neur die Endozytose von Ser-HA und SerK2R-HA induziert. Hierbei wurde mit Hilfe eines Antikörper-„Uptake"-Assays beobachtet, dass Neur in der Lage ist eine rasche Internalisierung von Ser-HA und SerK2R-HA zu bewirken (Abbildung 42). Dies deutet darauf hin, dass Neur die Endozytose sowohl von Ser-HA als auch von SerK2R-HA vergleichbar effizient vermitteln kann. Diese Beobachtungen wurden mit Hilfe der Ko-Expressionen von Ser-HA oder SerK2R-HA mit Neur in den Flügelimaginalscheiben bestätigt. So zeigte M. Kerkhoff im Rahmen seiner Masterarbeit, dass Neur die Endozytose von SerK2R-HA genauso effizient einleiten kann, wie die Endozytose von Ser-HA (Abbildung 43). Darüber hinaus wurde im Rahmen dieser Untersuchung festgestellt, dass Neur nicht nur die Endozytose, sondern auch die Degradation von Ser in einer PIP_2-Bindemotiv abhängigen und K-unabhängigen Weise ermöglicht ((Abbildung 63) und (M. Kerkhoff, Masterarbeit 2018)). Anschließend konnte gezeigt werden, dass als Folge der SerK2R-Endozytose sich die Lokalisation des endogenen N-Rezeptors verändert. Hierbei wird, ähnlich wie bei der alleinigen Expression von Ser-HA, eine Entfernung des N-Rezeptors von der apikalen Membran beobachtet. Zusätzlich wird eine Ko-Lokalisation bei den HA- und NECD-positiven Vesikeln festgestellt (Abbildung 44). Vermutlich ist Neur in der Lage die *Trans*-Endozytose des N-Rezeptors über SerK2R-HA zu bewirken, was wiederum in der Aktivierung des Notch-Signalwegs resultieren kann (Abbildung 38).

Da SerK2R-HA keine Ks in der ICD besitzt wäre davon auszugehen, dass dieser Ligand, ähnlich zu DlK2R-HA, nicht ubiquitiniert werden kann. Aus diesem Grund stellt sich die Frage nach dem Mechanismus, bei dem Neur in der Lage wäre die Endozytose und den Abbau der K-freien Ser-ICD

zu ermöglichen. Eine mögliche Erklärung wäre, dass Neur die Funktion eines Adapterproteins übernimmt. Hierbei könnte Neur via die NHR1-Domäne an das NEEN-Motiv in der Ser-ICD binden. Es wäre vorstellbar, dass Neur anschließend sich selbst ubiquitiniert. Es wurde bereits demonstriert, dass Neur zur Selbst-Ubiquitinierung in der Lage ist [55]. In diesem Fall könnte Lqf über UIMs mit dem ubiquitinierten Neur interagieren und die Invaginierung der Clathrin-beschichteten Bereiche einleiten. So wurde in *vitro* gezeigt, dass Lqf in der Lage ist die Ausbildung von Clathrin-beschichteten Invaginationen zu vermitteln [80]. Außerdem besitzt Neur am N-terminus ein konserviertes Glycin, das in Säuger-Orthologen auch konserviert ist und als potenzielles Motiv für eine Myristoylierung dienen könnte. Die Myristoylierung ermöglicht schwache Interaktionen mit der Zellmembran oder mit anderen Proteinen (Übersichten in [114]). Diese Interaktionen sind reversibler Natur, wodurch ein Transport und eine Veränderung der Lokalisation der myristoylierten Proteine möglich ist (Übersichten in [114]). Untersuchungen in *vitro* und in Säugerzellkultur demonstrierten, dass Neurl1 myristoyliert wird. Die Myristoylierung wird für die Lokalisation von Neurl1 an der Plasmamembran benötigt, was für die Aktivität von Jag1 essentiell ist [113].

Anderseits wäre nicht ausgeschlossen, dass Neur nicht selbst als Adapterprotein agiert, sondern ein weiteres mögliches Adapter-Protein ubiquitiniert und dadurch die Verbindung zum Lqf ermöglicht. Um diese Möglichkeit auszuschließen, wäre ein NeurK2R-Konstrukt hilfreich. NeurK2R könnte die Ubiquitinierungsreaktion katalysieren, jedoch nicht selbst ubiquitiniert werden. Sollte Neur die Selbst-Ubiquitinierung für die Aktivierung von Ser benötigen, wäre NeurK2R nicht in der Lage im *mib1*-mutanten Hintergrund zu der Aktivierung des Notch-Signalwegs beizutragen.

Ein alternativer Mechanismus wäre, dass Neur in der Lage wäre Lqf zu ubiquitinieren. Es wurde in *vitro* demonstriert, dass Epsin1 – ein Lqf-Ortholog aus der Hefe – am N-terminalen Teil ubiquitiniert wird [115]. Die Autoren dieser Publikation vermuten, dass die Ubiquitinierung des N-terminalen Teils der Dissoziation von Epsin1 von den ubiquitinierten Liganden dient, damit Epsin1 anschließend für weitere Zyklen zur Verfügung stehen kann [115]. Neur könnte in diesem Zusammenhang zum einen die Liganden zum anderen den N-terminalen Teil von Lqf ubiquitinieren. Hierbei ist wichtig zu beachten, dass die Untersuchungen zur Ubiquitinierung des N-terminalen Teils mit Epsin1 aus der Hefe durchgeführt wurden. Es wäre daher nicht auszuschließen, dass in *Drosophila* keine ähnliche Regulation erfolgt. Außerdem wäre ein Aminosäuresequenzenvergleich für Lqf/Epsin aus verschiedenen Organismen hilfreich, um potentielle Ks zu identifizieren, die dem ubiquitinierten K aus der Publikation entsprechen könnten [115].

5 Zusammenfassung

Die Endozytose der DSL-Liganden ist für die Aktivierung des Notch-Signalwegs essentiell und wird in der Regel durch die Ubiquitinierung an Lysinen (Ks) der intrazellulären Domäne (ICD) ausgelöst. In *Drosophila* wird die Ubiquitinierung der Liganden Delta (Dl) und Serrate (Ser) durch die E3-Ubiquitin-Ligasen, Mind bomb1 (Mib1) und Neuralized (Neur), vermittelt [11].

In vorherigen Veröffentlichungen konnte gezeigt werden, dass der Austausch der intrazellulären Ks bei dem Säuger Delta-like 1 (Dll1) und dem *Drosophila* Dl-Liganden zu einer Unterdrückung der Ubiquitinierung führt. Bei Dll1 kommt es durch den Verlust aller Ks zu einer Inaktivität des Liganden, während Dl eine Ubiquitinierungs-unabhängige Restaktivität aufweist [28, 36].
In dieser Arbeit wurde die Funktion der Ubiquitinierung des *Drosophila* Ser-Liganden und insbesondere der intrazellulären Ks untersucht. Hierfür wurde ein transgener Ser-Ligand analysiert, bei dem alle intrazellulären Ks durch strukturell ähnliche Arginine (Rs) ausgetauscht wurden (SerK2R). Die Untersuchungen des K2R-Liganden ergaben, dass die Aktivität sowie die Endozytose und die Degradation von Ser von den Ks in der ICD abhängig sind.
Des Weiteren wurde in dieser Arbeit die Rolle einzelner intrazellulärer Ks untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass der Austausch eines konservierten K an der Position 1362 zu einem inaktiven Ser-Liganden führt. Umgekehrt ist K1362 ausschließlich in Verbindung mit vier weiteren Ks in der Lage eine Aktivierung des Notch-Signalwegs auszulösen.

Zuvor veröffentlichte Experimente demonstrierten, dass Neur die Aktivierung von Dl in einer Mib1- und K-unabhängigen Weise vermitteln kann [28]. Die Ergebnisse dieser Arbeit legen nahe, dass Neur den Ser-Liganden ebenfalls Mib1-unabhängig aktivieren kann. Eine weitere Analyse brachte Hinweise darauf, dass die Ser-Aktivierung durch Neur auf zwei Weisen und zwar 1) K-abhängig und 2) K-unabhängig erfolgt. In beiden Fällen wird die Bindung an den Liganden, die Neur-vermittelte Ubiquitinierung, sowie die Membranassoziation von Neur benötigt. Darüber hinaus wurde mit Hilfe dieser Untersuchung ein funktionales Neur-Bindemotiv in der ICD von Ser *in vivo* bestätigt.

In den ICDs der Liganden Dl und Jagged1 (Jag1 - Säugetier Ser Ortholog) wurden zwei Interaktionsmotive, sog. N- und C-Boxen, für Mib1 und MIB1 (Säugetier Mib1 Ortholog) identifiziert. Während für die Jag1-Aktivität beide Boxen benötigt werden, ist für Dl die N-Box wichtiger ([48, 58] und N. Vüllings, unveröffentlichte Daten). Basierend auf den Sequenzhomologien wurden in der ICD von Ser die N- und C-Boxen vorhergesagt [48]. In dieser Arbeit wurde die Notwendigkeit der vorhergesagten N- und C-Boxen für die Ser-Funktion untersucht. Die Analyse der putativen N- und C-Boxen ergab, dass beide Boxen für die Aktivität des Liganden nicht essentiell sind.

6 Summary

Endocytosis of DSL-ligands is required for the activation of Notch signalling and is usually initiated through ubiquitination of lysines (K) in the intracellular domain (ICD) of the ligands. In *Drosophila*, the E3-ligases, Mind bomb1 (Mib1) and Neuralized (Neur) mediate ubiquitination of the ligands Delta (Dl) as well as Serrate (Ser) [11].
It has been shown that replacement of Ks in the ICD of mammalian Delta-like 1 (Dll1) and *Drosophila* Dl suppresses ubiquitination of the ligands. Whereas this modification interrupts Dll1 mediated Notch signalling, Dl possesses an ubiquitination-independent residual activity [28, 36].
In this thesis, the role of *Drosophila* Ser ubiquitination and in particular the role of its intracellular Ks was investigated. For this purpose, a transgenic Ser-ligand was analyzed in which all Ks of the ICD were replaced by structurally similar arginines (Rs) (SerK2R). These results suggest that Ks in the ICD of Ser are required for the activity, endocytosis and degradation of Ser.
Furthermore, the role of individual intracellular Ks of Ser was investigated. In this study a highly conserved K at the position 1362 was identified. Replacement of K1362 leads to suppression of the Ser mediated Notch signalling. Vice versa, K 1362 alone is not sufficient and requires four additional Ks to activate Ser mediated Notch signalling.

Previous work showed that Neur can activate Dl independently of Mib1 and of Ks in the ICD of Dl [28]. The results of this thesis suggest that Neur is able to activate Ser independent of Mib1. Further experiments demonstrated that activation of Ser by Neur occurs in a K-independent as well as in a K-dependent manner. In both cases, binding to the ligand, Neur-mediated ubiquitination and membrane association of Neur are required. Moreover, the results confirm the putative Neur binding motif *in vivo*.

In previous investigations two Mib1/MIB1-interaction motifs, so-called N- and C-boxes, were identified in the ICD of the DSL-ligands Dl and Jagged1 (Jag1 - mammalian Ortholog of Ser). It has been shown that Jag1 requires both the N- and the C-box for ligand activity. In contrast, Dl requires the N-box ([48, 58] and N. Vüllings, unpublished results). Based on sequence homology, the putative N- and C-boxes were predicted in the ICD of Ser [48]. In this thesis the requirement of the putative N- and C-boxes for the Ser function was examined. The results suggest that both boxes are not essential for Ser mediated Notch signalling.

7 Literaturverzeichnis

1. Siebel, C. and U. Lendahl, Notch Signaling in Development, Tissue Homeostasis, and Disease. Physiol Rev, 2017. 97(4): p. 1235-1294.
2. Bray, S.J., Notch signalling in context. Nat Rev Mol Cell Biol, 2016. 17(11): p. 722-735.
3. Kovall, R.A., et al., The Canonical Notch Signaling Pathway: Structural and Biochemical Insights into Shape, Sugar, and Force. Dev Cell, 2017. 41(3): p. 228-241.
4. Kopan, R. and M.X. Ilagan, The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism. Cell, 2009. 137(2): p. 216-33.
5. Blaumueller, C.M., et al., Intracellular cleavage of Notch leads to a heterodimeric receptor on the plasma membrane. Cell, 1997. 90(2): p. 281-91.
6. Parks, A.L., et al., Structure-function analysis of delta trafficking, receptor binding and signaling in Drosophila. Genetics, 2006. 174(4): p. 1947-61.
7. Rebay, I., et al., Specific EGF repeats of Notch mediate interactions with Delta and Serrate: implications for Notch as a multifunctional receptor. Cell, 1991. 67(4): p. 687-99.
8. del Alamo, D., H. Rouault, and F. Schweisguth, Mechanism and significance of cis-inhibition in Notch signalling. Curr Biol, 2011. 21(1): p. R40-7.
9. Seugnet, L., P. Simpson, and M. Haenlin, Requirement for dynamin during Notch signaling in Drosophila neurogenesis. Dev Biol, 1997. 192(2): p. 585-98.
10. Le Borgne, R., A. Bardin, and F. Schweisguth, The roles of receptor and ligand endocytosis in regulating Notch signaling. Development, 2005. 132(8): p. 1751-62.
11. Weinmaster, G. and J.A. Fischer, Notch ligand ubiquitylation: what is it good for? Dev Cell, 2011. 21(1): p. 134-44.
12. Meloty-Kapella, L., et al., Notch ligand endocytosis generates mechanical pulling force dependent on dynamin, epsins, and actin. Dev Cell, 2012. 22(6): p. 1299-312.
13. Nichols, J.T., et al., DSL ligand endocytosis physically dissociates Notch1 heterodimers before activating proteolysis can occur. J Cell Biol, 2007. 176(4): p. 445-58.
14. Parks, A.L., et al., Ligand endocytosis drives receptor dissociation and activation in the Notch pathway. Development, 2000. 127(7): p. 1373-1385.
15. Mumm, J.S., et al., A ligand-induced extracellular cleavage regulates gamma-secretase-like proteolytic activation of Notch1. Mol Cell, 2000. 5(2): p. 197-206.
16. Zolkiewska, A., ADAM proteases: ligand processing and modulation of the Notch pathway. Cell Mol Life Sci, 2008. 65(13): p. 2056-68.
17. Struhl, G. and I. Greenwald, Presenilin is required for activity and nuclear access of Notch in Drosophila. Nature, 1999. 398(6727): p. 522-5.
18. Couso, J.P., E. Knust, and A. Martinez Arias, Serrate and wingless cooperate to induce vestigial gene expression and wing formation in Drosophila. Curr Biol, 1995. 5(12): p. 1437-48.
19. Diaz-Benjumea, F.J. and S.M. Cohen, Serrate signals through Notch to establish a Wingless-dependent organizer at the dorsal/ventral compartment boundary of the Drosophila wing. Development, 1995. 121(12): p. 4215-25.
20. Doherty, D., et al., Delta is a ventral to dorsal signal complementary to Serrate, another Notch ligand, in Drosophila wing formation. Genes Dev, 1996. 10(4): p. 421-34.
21. de Celis, J.F. and S. Bray, Feed-back mechanisms affecting Notch activation at the dorsoventral boundary in the Drosophila wing. Development, 1997. 124(17): p. 3241-51.
22. Klein, T., K. Brennan, and A.M. Arias, An intrinsic dominant negative activity of serrate that is modulated during wing development in Drosophila. Dev Biol, 1997. 189(1): p. 123-34.
23. Micchelli, C.A. and S.S. Blair, Dorsoventral lineage restriction in wing imaginal discs requires Notch. Nature, 1999. 401(6752): p. 473-6.
24. Micchelli, C.A., E.J. Rulifson, and S.S. Blair, 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, 1997. 124(8): p. 1485-95.

25. Glittenberg, M., et al., Role of conserved intracellular motifs in Serrate signalling, cis-inhibition and endocytosis. Embo j, 2006. 25(20): p. 4697-706.
26. Fleming, R.J., Ligand-Induced Cis-Inhibition of Notch Signaling: The Role of an Extracellular Region of Serrate. Adv Exp Med Biol, 2020. 1227: p. 29-49.
27. Fleming, R.J., et al., An extracellular region of Serrate is essential for ligand-induced cis-inhibition of Notch signaling. Development, 2013. 140(9): p. 2039-49.
28. Berndt, N., et al., Ubiquitylation-independent activation of Notch signalling by Delta. Elife, 2017. 6.
29. D'Souza, B., A. Miyamoto, and G. Weinmaster, The many facets of Notch ligands. Oncogene, 2008. 27(38): p. 5148-67.
30. Bishop, S.A., et al., Composite signalling from Serrate and Delta establishes leg segments in Drosophila through Notch. Development, 1999. 126(13): p. 2993-3003.
31. Rauskolb, C. and K.D. Irvine, Notch-mediated segmentation and growth control of the Drosophila leg. Dev Biol, 1999. 210(2): p. 339-50.
32. Speicher, S.A., et al., The Serrate locus of Drosophila and its role in morphogenesis of the wing imaginal discs: control of cell proliferation. Development, 1994. 120(3): p. 535-44.
33. Kim, J., K.D. Irvine, and S.B. Carroll, Cell recognition, signal induction, and symmetrical gene activation at the dorsal-ventral boundary of the developing Drosophila wing. Cell, 1995. 82(5): p. 795-802.
34. Troost, T. and T. Klein, Sequential Notch signalling at the boundary of fringe expressing and non-expressing cells. PLoS One, 2012. 7(11): p. e49007.
35. Pintar, A., et al., The intracellular region of Notch ligands: does the tail make the difference? Biol Direct, 2007. 2: p. 19.
36. Heuss, S.F., et al., The intracellular region of Notch ligands Dll1 and Dll3 regulates their trafficking and signaling activity. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. 105(32): p. 11212-7.
37. Zhang, L., et al., Delta-like 1-Lysine613 regulates notch signaling. Biochim Biophys Acta, 2011. 1813(12): p. 2036-43.
38. Moretti, J. and C. Brou, Ubiquitinations in the notch signaling pathway. Int J Mol Sci, 2013. 14(3): p. 6359-81.
39. Baloghova, N., T. Lidak, and L. Cermak, Ubiquitin Ligases Involved in the Regulation of Wnt, TGF-beta, and Notch Signaling Pathways and Their Roles in Mouse Development and Homeostasis. Genes (Basel), 2019. 10(10).
40. Deshaies, R.J. and C.A. Joazeiro, RING domain E3 ubiquitin ligases. Annu Rev Biochem, 2009. 78: p. 399-434.
41. Le Borgne, R., et al., Two distinct E3 ubiquitin ligases have complementary functions in the regulation of delta and serrate signaling in Drosophila. PLoS Biol, 2005. 3(4): p. e96.
42. Lai, E.C., et al., The ubiquitin ligase Drosophila Mind bomb promotes Notch signaling by regulating the localization and activity of Serrate and Delta. Development, 2005. 132(10): p. 2319-32.
43. Wang, W. and G. Struhl, Distinct roles for Mind bomb, Neuralized and Epsin in mediating DSL endocytosis and signaling in Drosophila. Development, 2005. 132(12): p. 2883-94.
44. Lehmann, R., et al., On the phenotype and development of mutants of early neurogenesis inDrosophila melanogaster. Wilehm Roux Arch Dev Biol, 1983. 192(2): p. 62-74.
45. Yeh, E., et al., Neuralized functions cell autonomously to regulate Drosophila sense organ development. EMBO J, 2000. 19(17): p. 4827-37.
46. Lai, E.C., et al., Drosophila neuralized is a ubiquitin ligase that promotes the internalization and degradation of delta. Dev Cell, 2001. 1(6): p. 783-94.
47. Boulianne, G.L., et al., The Drosophila neurogenic gene neuralized encodes a novel protein and is expressed in precursors of larval and adult neurons. Embo j, 1991. 10(10): p. 2975-83.
48. McMillan, B.J., et al., A tail of two sites: a bipartite mechanism for recognition of notch ligands by mind bomb E3 ligases. Mol Cell, 2015. 57(5): p. 912-924.
49. Guo, B., B.J. McMillan, and S.C. Blacklow, Structure and function of the Mind bomb E3 ligase in the context of Notch signal transduction. Curr Opin Struct Biol, 2016. 41: p. 38-45.

50. Yeh, E., et al., Neuralized functions as an E3 ubiquitin ligase during Drosophila development. Curr Biol, 2001. 11(21): p. 1675-9.
51. Deblandre, G.A., E.C. Lai, and C. Kintner, Xenopus neuralized is a ubiquitin ligase that interacts with XDelta1 and regulates Notch signaling. Dev Cell, 2001. 1(6): p. 795-806.
52. Liu, S. and G.L. Boulianne, The NHR domains of Neuralized and related proteins: Beyond Notch signalling. Cell Signal, 2017. 29: p. 62-68.
53. Commisso, C. and G.L. Boulianne, The NHR1 domain of Neuralized binds Delta and mediates Delta trafficking and Notch signaling. Mol Biol Cell, 2007. 18(1): p. 1-13.
54. He, F., et al., Structural and functional characterization of the NHR1 domain of the Drosophila neuralized E3 ligase in the notch signaling pathway. J Mol Biol, 2009. 393(2): p. 478-95.
55. Liu, S., et al., Functional analysis of the NHR2 domain indicates that oligomerization of Neuralized regulates ubiquitination and endocytosis of Delta during Notch signaling. Mol Cell Biol, 2012. 32(24): p. 4933-45.
56. Pavlopoulos, E., et al., neuralized Encodes a peripheral membrane protein involved in delta signaling and endocytosis. Dev Cell, 2001. 1(6): p. 807-16.
57. Skwarek, L.C., et al., Neuralized contains a phosphoinositide-binding motif required downstream of ubiquitination for delta endocytosis and notch signaling. Dev Cell, 2007. 13(6): p. 783-95.
58. Daskalaki, A., et al., Distinct intracellular motifs of Delta mediate its ubiquitylation and activation by Mindbomb1 and Neuralized. J Cell Biol, 2011. 195(6): p. 1017-31.
59. Fontana, J.R. and J.W. Posakony, Both inhibition and activation of Notch signaling rely on a conserved Neuralized-binding motif in Bearded proteins and the Notch ligand Delta. Dev Biol, 2009. 333(2): p. 373-85.
60. Schnute, B., T. Troost, and T. Klein, Endocytic Trafficking of the Notch Receptor. Adv Exp Med Biol, 2018. 1066: p. 99-122.
61. Di Paolo, G. and P. De Camilli, Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. Nature, 2006. 443(7112): p. 651-7.
62. Poccia, D. and B. Larijani, Phosphatidylinositol metabolism and membrane fusion. Biochem J, 2009. 418(2): p. 233-46.
63. Doherty, G.J. and H.T. McMahon, Mechanisms of endocytosis. Annu Rev Biochem, 2009. 78: p. 857-902.
64. Kaksonen, M. and A. Roux, Mechanisms of clathrin-mediated endocytosis. Nat Rev Mol Cell Biol, 2018. 19(5): p. 313-326.
65. Mettlen, M., et al., Regulation of Clathrin-Mediated Endocytosis. Annu Rev Biochem, 2018. 87: p. 871-896.
66. Sundborger, A.C. and J.E. Hinshaw, Regulating dynamin dynamics during endocytosis. F1000Prime Rep, 2014. 6: p. 85.
67. Jovic, M., et al., The early endosome: a busy sorting station for proteins at the crossroads. Histol Histopathol, 2010. 25(1): p. 99-112.
68. Wandinger-Ness, A. and M. Zerial, Rab proteins and the compartmentalization of the endosomal system. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2014. 6(11): p. a022616.
69. Cullen, P.J. and F. Steinberg, To degrade or not to degrade: mechanisms and significance of endocytic recycling. Nat Rev Mol Cell Biol, 2018. 19(11): p. 679-696.
70. Huotari, J. and A. Helenius, Endosome maturation. Embo j, 2011. 30(17): p. 3481-500.
71. Poodry, C.A., shibire, a neurogenic mutant of Drosophila. Dev Biol, 1990. 138(2): p. 464-72.
72. Wang, W. and G. Struhl, Drosophila Epsin mediates a select endocytic pathway that DSL ligands must enter to activate Notch. Development, 2004. 131(21): p. 5367-80.
73. Cadavid, A.L., A. Ginzel, and J.A. Fischer, The function of the Drosophila fat facets deubiquitinating enzyme in limiting photoreceptor cell number is intimately associated with endocytosis. Development, 2000. 127(8): p. 1727-36.
74. Xie, X., B. Cho, and J.A. Fischer, Drosophila Epsin's role in Notch ligand cells requires three Epsin protein functions: the lipid binding function of the ENTH domain, a single Ubiquitin

interaction motif, and a subset of the C-terminal protein binding modules. Dev Biol, 2012. 363(2): p. 399-412.
75. Banks, S.M., et al., The functions of auxilin and Rab11 in Drosophila suggest that the fundamental role of ligand endocytosis in notch signaling cells is not recycling. PLoS One, 2011. 6(3): p. e18259.
76. Eun, S.H., et al., Identification of genes that interact with Drosophila liquid facets. Genetics, 2007. 175(3): p. 1163-74.
77. Eun, S.H., S.M. Banks, and J.A. Fischer, Auxilin is essential for Delta signaling. Development, 2008. 135(6): p. 1089-95.
78. Overstreet, E., et al., Either part of a Drosophila epsin protein, divided after the ENTH domain, functions in endocytosis of delta in the developing eye. Curr Biol, 2003. 13(10): p. 854-60.
79. Fisher, R.D., et al., Structure and ubiquitin binding of the ubiquitin-interacting motif. J Biol Chem, 2003. 278(31): p. 28976-84.
80. Ford, M.G., et al., Curvature of clathrin-coated pits driven by epsin. Nature, 2002. 419(6905): p. 361-6.
81. Musse, A.A., L. Meloty-Kapella, and G. Weinmaster, Notch ligand endocytosis: mechanistic basis of signaling activity. Semin Cell Dev Biol, 2012. 23(4): p. 429-36.
82. Jafar-Nejad, H., et al., Sec15, a component of the exocyst, promotes notch signaling during the asymmetric division of Drosophila sensory organ precursors. Dev Cell, 2005. 9(3): p. 351-63.
83. Emery, G., et al., Asymmetric Rab 11 endosomes regulate delta recycling and specify cell fate in the Drosophila nervous system. Cell, 2005. 122(5): p. 763-73.
84. Windler, S.L. and D. Bilder, Endocytic internalization routes required for delta/notch signaling. Curr Biol, 2010. 20(6): p. 538-43.
85. Lovendahl, K.N., S.C. Blacklow, and W.R. Gordon, The Molecular Mechanism of Notch Activation. Adv Exp Med Biol, 2018. 1066: p. 47-58.
86. Langridge, P.D. and G. Struhl, Epsin-Dependent Ligand Endocytosis Activates Notch by Force. Cell, 2017. 171(6): p. 1383-1396.e12.
87. Hansson, E.M., et al., Control of Notch-ligand endocytosis by ligand-receptor interaction. J Cell Sci, 2010. 123(Pt 17): p. 2931-42.
88. Gordon, W.R., K.L. Arnett, and S.C. Blacklow, The molecular logic of Notch signaling – a structural and biochemical perspective. Journal of Cell Science, 2008. 121(19): p. 3109-3119.
89. Gordon, W.R., et al., Mechanical Allostery: Evidence for a Force Requirement in the Proteolytic Activation of Notch. Dev Cell, 2015. 33(6): p. 729-36.
90. Klein, T., Wing disc development in the fly: the early stages. Curr Opin Genet Dev, 2001. 11(4): p. 470-5.
91. de Celis, J.F., A. Garcia-Bellido, and S.J. Bray, Activation and function of Notch at the dorsal-ventral boundary of the wing imaginal disc. Development, 1996. 122(1): p. 359-69.
92. Panin, V.M., et al., Fringe modulates Notch-ligand interactions. Nature, 1997. 387(6636): p. 908-12.
93. Irvine, K.D. and E. Wieschaus, fringe, a Boundary-specific signaling molecule, mediates interactions between dorsal and ventral cells during Drosophila wing development. Cell, 1994. 79(4): p. 595-606.
94. Brand, A.H. and N. Perrimon, Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. Development, 1993. 118(2): p. 401-15.
95. Golic, K.G. and S. Lindquist, The FLP recombinase of yeast catalyzes site-specific recombination in the Drosophila genome. Cell, 1989. 59(3): p. 499-509.
96. Lee, T. and L. Luo, Mosaic analysis with a repressible cell marker for studies of gene function in neuronal morphogenesis. Neuron, 1999. 22(3): p. 451-61.
97. Furriols, M. and S. Bray, A model Notch response element detects Suppressor of Hairless-dependent molecular switch. Curr Biol, 2001. 11(1): p. 60-4.

98. Palardy, G. and A.B. Chitnis, Identification of the Mind Bomb1 Interaction Domain in Zebrafish DeltaD. PLoS One, 2015. 10(5): p. e0127864.
99. Venkatachalam, K., C.O. Wong, and M.X. Zhu, The role of TRPMLs in endolysosomal trafficking and function. Cell Calcium, 2015. 58(1): p. 48-56.
100. Glittenberg. 2006.
101. Lowe, N., et al., Analysis of the expression patterns, subcellular localisations and interaction partners of Drosophila proteins using a pigP protein trap library. Development, 2014. 141(20): p. 3994-4005.
102. Lye, C.M., H.W. Naylor, and B. Sanson, Subcellular localisations of the CPTI collection of YFP-tagged proteins in Drosophila embryos. Development, 2014. 141(20): p. 4006-17.
103. Couturier, L., et al., A fluorescent tagging approach in Drosophila reveals late endosomal trafficking of Notch and Sanpodo. J Cell Biol, 2014. 207(3): p. 351-63.
104. Sanchez-Vega, F., et al., Oncogenic Signaling Pathways in The Cancer Genome Atlas. Cell, 2018. 173(2): p. 321-337.e10.
105. Luxán, G., et al., Mutations in the NOTCH pathway regulator MIB1 cause left ventricular noncompaction cardiomyopathy. Nat Med, 2013. 19(2): p. 193-201.
106. Matsuda, M. and A.B. Chitnis, Interaction with Notch determines endocytosis of specific Delta ligands in zebrafish neural tissue. Development, 2009. 136(2): p. 197-206.
107. Okano, M., et al., Mib1 modulates dynamin 2 recruitment via Snx18 to promote Dll1 endocytosis for efficient Notch signaling. Genes Cells, 2016. 21(5): p. 425-41.
108. Lin, Y.H., et al., AP-2-complex-mediated endocytosis of Drosophila Crumbs regulates polarity by antagonizing Stardust. J Cell Sci, 2015. 128(24): p. 4538-49.
109. Nemetschke, L. and E. Knust, Drosophila Crumbs prevents ectopic Notch activation in developing wings by inhibiting ligand-independent endocytosis. Development, 2016. 143(23): p. 4543-4553.
110. Levin-Kravets, O., et al., E. coli-Based Selection and Expression Systems for Discovery, Characterization, and Purification of Ubiquitylated Proteins. Methods Mol Biol, 2018. 1844: p. 155-166.
111. Panin, V.M., et al., Notch ligands are substrates for protein O-fucosyltransferase-1 and Fringe. J Biol Chem, 2002. 277(33): p. 29945-52.
112. Palmer, W.H., D. Jia, and W.M. Deng, Cis-interactions between Notch and its ligands block ligand-independent Notch activity. Elife, 2014. 3.
113. Koutelou, E., et al., Neuralized-like 1 (Neurl1) targeted to the plasma membrane by N-myristoylation regulates the Notch ligand Jagged1. J Biol Chem, 2008. 283(7): p. 3846-53.
114. Yuan, M., et al., N-myristoylation: from cell biology to translational medicine. Acta Pharmacol Sin, 2020.
115. Tanner, N., et al., Remodeling Membrane Binding by Mono-Ubiquitylation. Biomolecules, 2019. 9(8).

8 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
A/P	anterior-posterior
Ala	Alanin
ci	cubitus interruptus
C-Terminus	Carboxyl-Terminus
CSL	CBF1 Su(H) Lag1
CyO	Curly of Oster – Balancer fur das 2. Chromosom
D/V	dorso-ventral
ddH_2O	doppelt destilliertes Wasser
dH_2O	destilliertes Wasser
Dl	Delta
Dll1	Delta like1
Dll4	Delta like4
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxynukleosidtriphosphat
DSL	Delta Serrate Lag2
DTT	Dithiothreitol
DUB	Deubiquitinasen
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EE	early endosome
EGF	epidermal growth factor
en	engrailed
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESCRT	endosomal sorting complex required for transport
Flp	Flippase
FRT	flippase recombinase target
g	Gramm
Gbe	Grainyhead binding element
GFP	grün fluoureszierendes Protein
Grh	Grainyhead
h	Stunde
HA	Hämagglutinin
ICD	intrazelluläre Domäne (engl. intracellular domain)
If	Irregular facets – Marker fur das 2. Chromosom
ILV	intraluminale Vesikel
Jag1	Jagged1
Jag2	Jagged2
K	Lysin
K2R	Lysin zu Arginin
kB	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
Kuz	Kuzbanian
l	Liter
Lqf	Liquid facets
M	Molar
Mam	Mastermind

MARCM	Mosaic Analysis with a Repressible Cell Marker
Mib1	Mind bomb 1
min	Minuten
MKRS	Marker fur das 3. Chromosom
MVB	multivesicular body
NEB	New England Biolab
NBM	Neuralized-Bindemotiv
N	Notch
NECD	extrazelluläre Domäne des Notch Rezeptors
Neur	Neuralized
NEXT	Notch extracellular truncation
NGS	normal goat serum - Normales Ziegenserum
NHR1 & 2	Neuralized Homology Repeat 1 & 2
NICD	intrazelluläre Domäne des Notch Rezeptors
nM	nanomolar
N-Terminus	Amino-Terminus
P	Plasmid
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl. polymerase chain reaction)
PFA	Paraformaldehyd
ptc	patched
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
SM6a-TM6b	Compound-Balancer
SOP	sensory organ precursor
Su(H)	Supressor of Hairless
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TM	Transmembrandomäne
TM6b	Balancher fur das 3. Chromosom
Trpml	transient receptor potential-mucolipin
tub	Tubulin
U	Unit
UAS	upstream activating sequence
Ubi	Ubiquitin
UIMs	ubiquitin interacting motifs
w	white
Wg/*wg*	Wingless, *wingless*
Ubi	Ubiquitin
x g/rpm	x-faches der Erdbeschleunigung/ revolutions per minute
β-Gal	β-Galactosidase
Δ	Deletion

9 Anhang

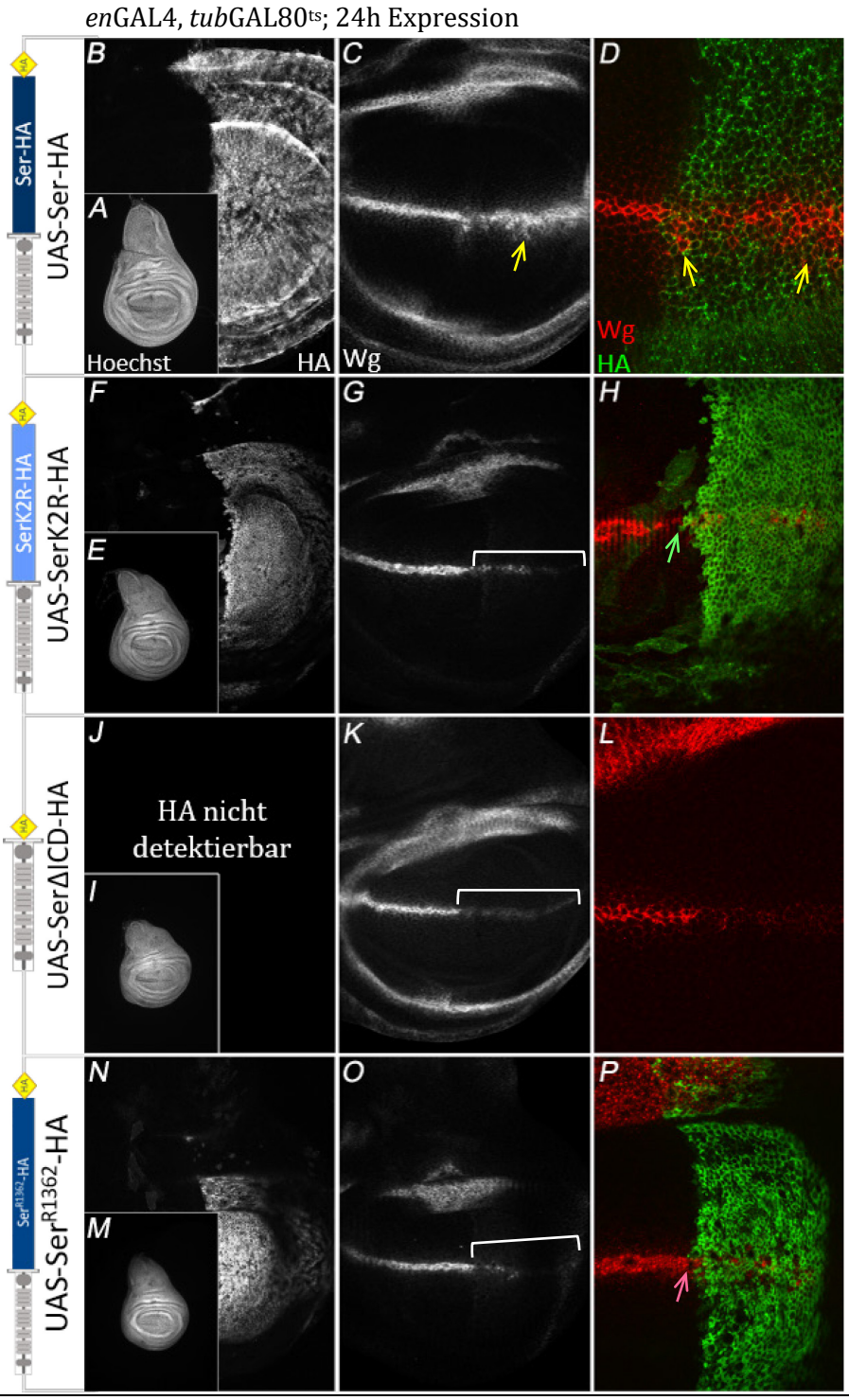


Abbildung 50: Zeitlich gesteuerte Expression von Ser-HA, SerK2R-HA, SerΔICD-HA und Ser^{R1362}-HA. Die Expression erfolgte unter Kontrolle des *engrailed*-Promoters mit zusätzlicher Expression von GAL80^{ts}. Die 24-stündige Expression aller Transgene hat keine Auswirkungen auf die Gesamtmorphologie der Flügelimaginalscheiben (A, E, I, M). Die Expression von Ser-HA resultiert in einer leichten ektopischen nicht zellautonomen Aktivierung des Notch-Signalwegs (C, D, gelbe Pfeile). Die Expressionen von SerK2R-HA, SerΔICD-HA oder Ser^{R1362}-HA führen zu einer Unterbrechung der meisten endogenen Wg-Expression in der *en*-Domäne (G, K, O weiße Klammer). Die Unterbrechung der Wg-Expression bei der SerK2R-HA-Expression war nicht zellautonom (H, grüner Pfeil), bei der Ser^{R1362}-HA- Expression dagegen zellautonom (P, rosafarbener Pfeil). Die Flügelimaginalscheiben sind in A, E, I, M 100-fach; in B, C, F, G, J, K, N, O 250-fach; in D, H, L, P 630-fach

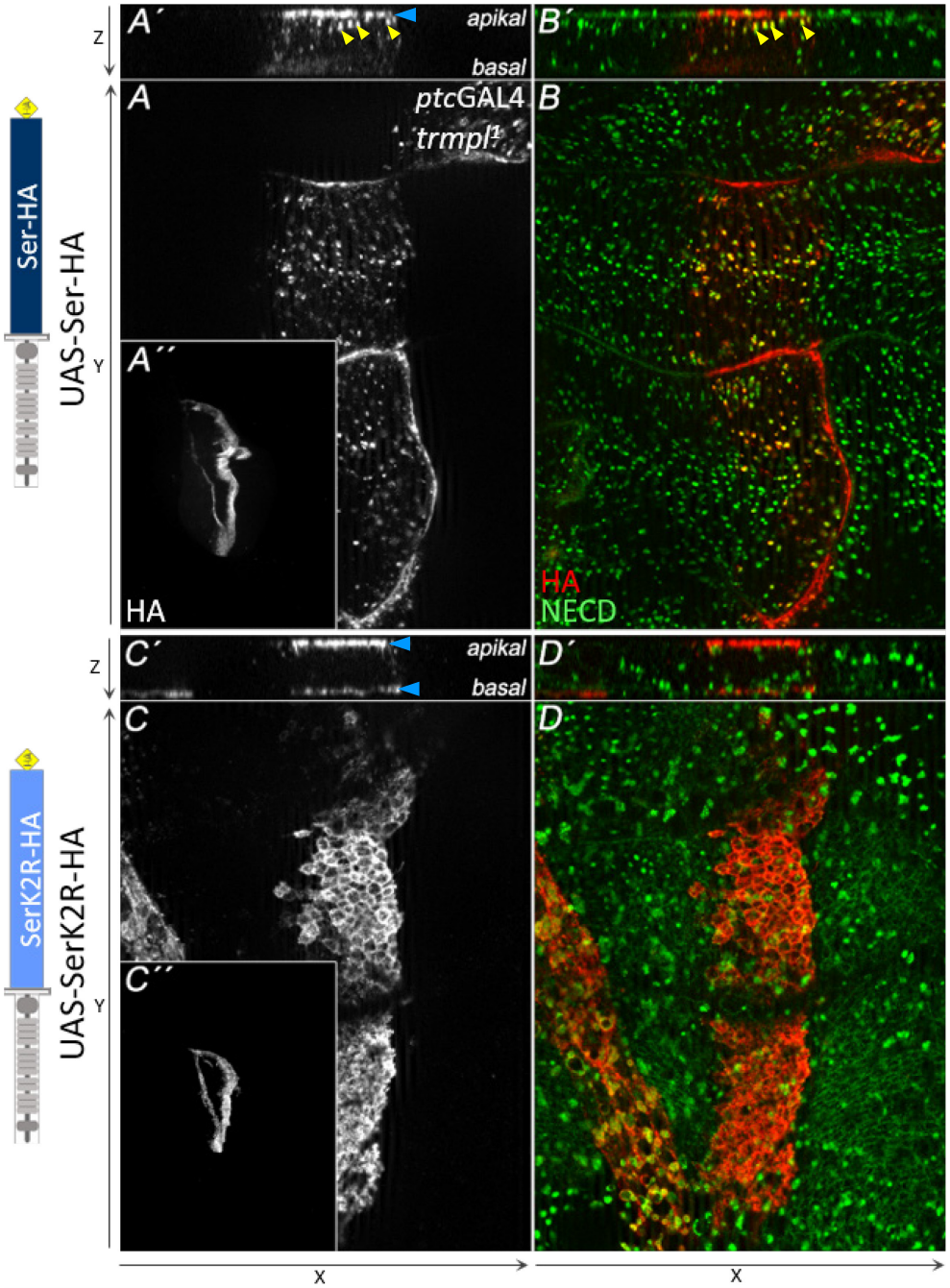


Abbildung 51: Subzelluläre Lokalisation von Ser-HA und SerK2R-HA bei der Expression im *trpml*-mutanten Hintergrund. Der Ausfall der Trpml-Funktion führt dazu, dass die Fusion des späten Endosoms mit dem Lysosom unterdrückt wird. Die Expression von Ser- und SerK2R-HA erfolgte mit *ptc*GAL4 (A, A´´, C, C´´). Für die Darstellung der apiko-basalen Lokalisation beider Liganden wurden Z-Stapel der Flügelimaginalscheiben aufgenommen (A´, B´, C´, D´). In der X/Y-Ebene ist Ser-HA auf der Höhe der lateralen und SerK2R-HA der apikalen Region dargestellt (A, B, C, D). Ser-HA lokalisiert im *trpml*-mutanten Hintergrund an der apikalen Membran (A´, blauer Pfeilkopf) und in vergrößerten Vesikeln (A´, gelbe Pfeilköpfe). Diese vergrößerten HA-Vesikel ko-lokalisieren mit den NECD-positiven Vesikeln (A´, B´, gelbe Pfeilköpfe). SerK2R-HA dagegen lokalisiert ausschließlich an der apikalen und partiell an der basalen Membran (C´, D´ blaue Pfeilköpfe). Es können keine HA-positive Vesikel beobachtet werden (C, C´, D, D´). Die Flügelimaginalscheiben sind in A´´ und C´´ 100-fach und in A, A´-D, D´ 630-fach vergrößert dargestellt.

N-YFP; *en*GAL4, *tub*GAL80^{ts}; 24h Expression

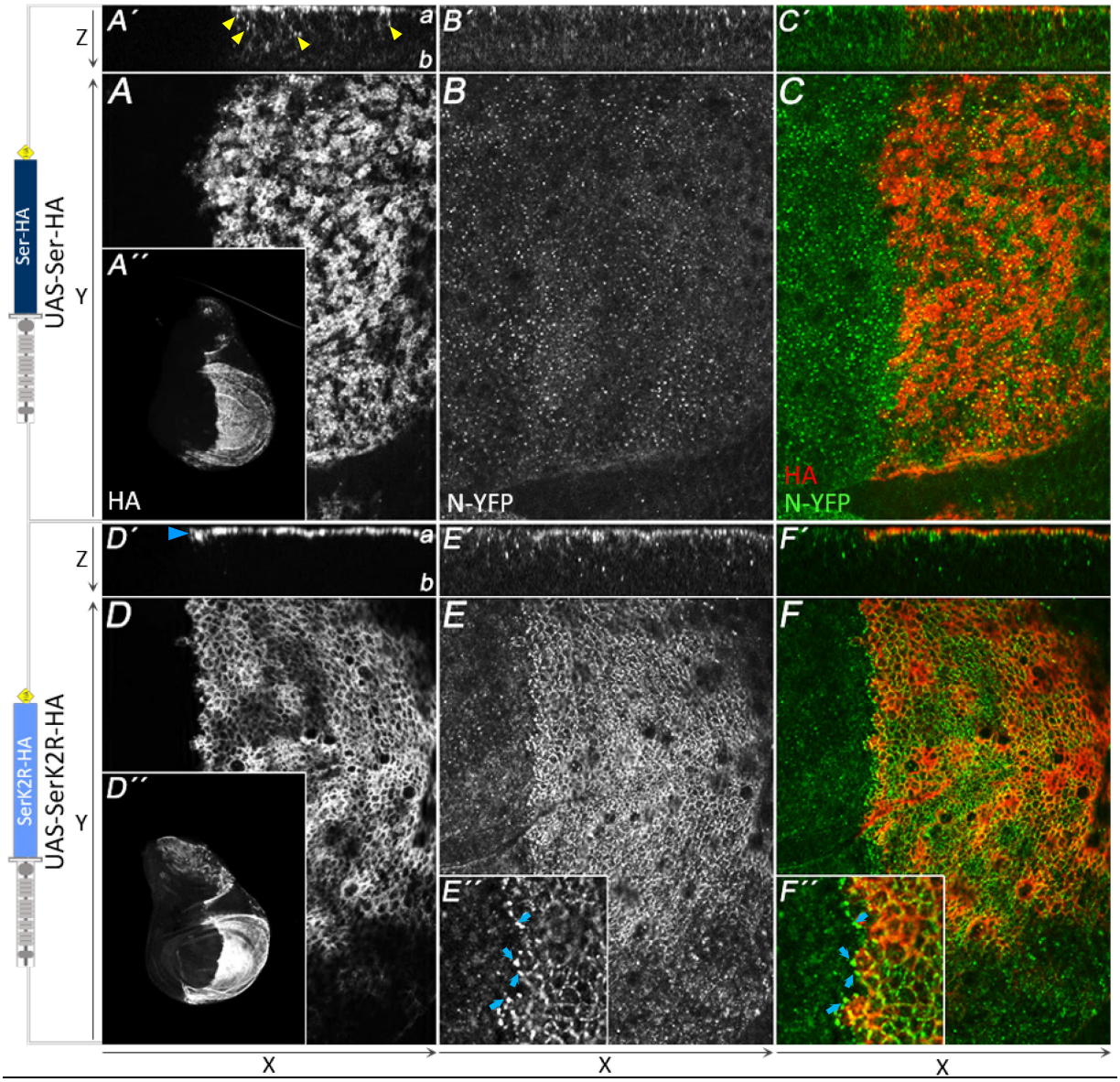


Abbildung 52: Detektion des endogenen Notch-Rezeptors nach einer 24-stündigen Expression von Ser-HA und SerK2R-HA. Die transgenen Liganden wurden für 24 Stunden unter Kontrolle des *en*-Promoters mit zusätzlicher Expression von GAL80^{ts} exprimiert. Anschließend wurde die subzelluläre Lokalisation von Ser-HA, SerK2R-HA und des endogenen N-YFP detektiert. Für die Darstellung der apiko-basalen Lokalisation der Proteine wurden Z-Stapel aufgenommen (A´- F´) Dabei lokalisiert Ser-HA sowohl an der apikalen Membran als auch in den Vesikeln (A, A´, C, C´), während SerK2R-HA ausschließlich an der apikalen Membran lokalisierte (D, D´, F, F´). Die Expression von Ser-HA hat zu diesem Zeitpunkt noch keine Auswirkung auf die Lokalisation des endogenen N-YFP (B, B´, C, C´). Bei der Expression von SerK2R-HA kann eine Anreicherung von N-YFP an der apikalen Membran detektiert werden, das in bestimmten Bereichen konzentrierter vorliegt (E-E´´, F-F´´, blaue Pfeile). Die Flügelimaginalscheiben sind in A´´ und D´´ 100-fach in A – F 630-fach vergrößert dargestellt. E´´ und F´´ zeigen je einen vergrößerten Ausschnitt aus E und F.

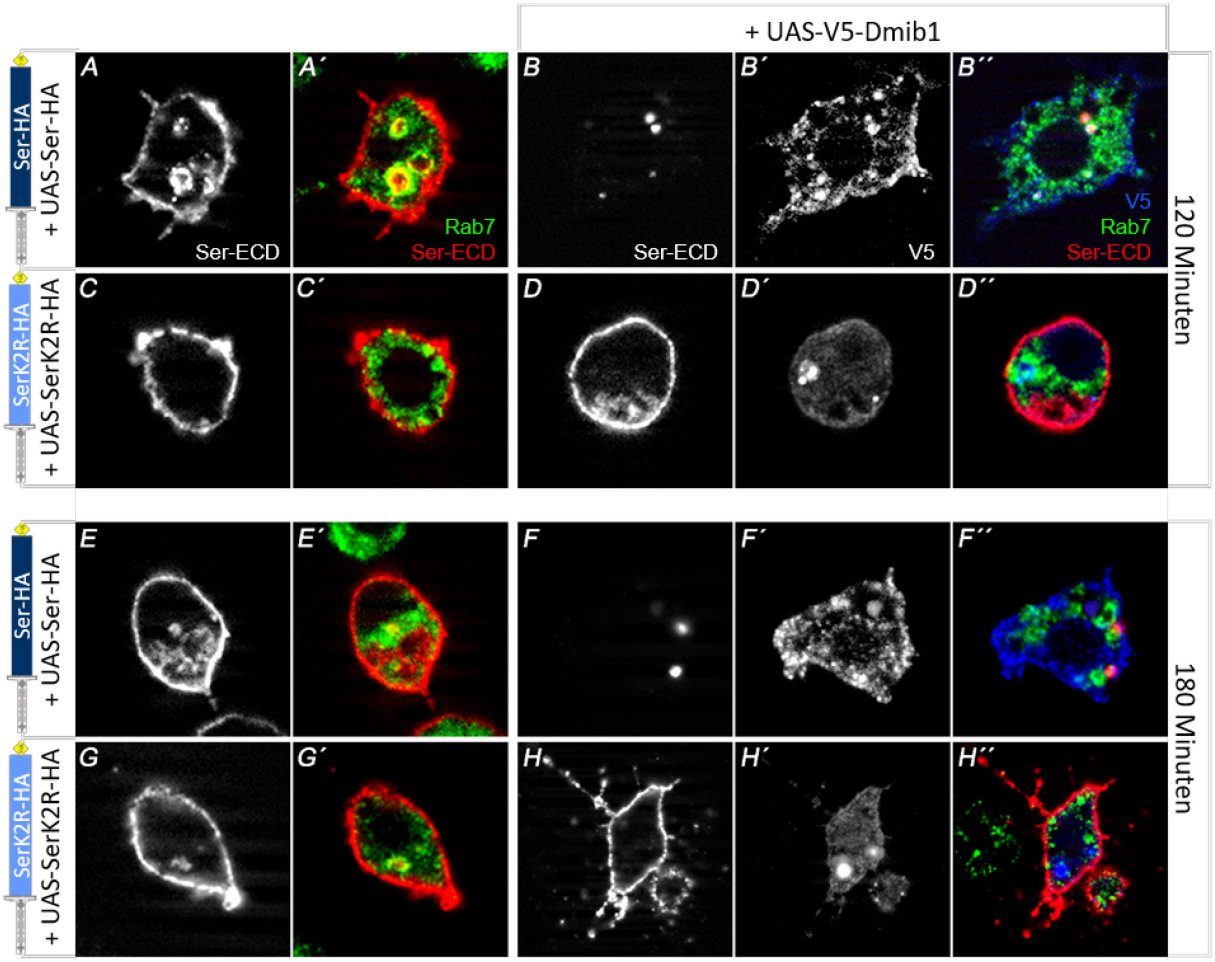


Abbildung 53: Antikörper-„Uptake"-Assay für die Analyse der Endozytose von Ser-HA und SerK2R-HA in S2-Zellen. Die Konstrukte UAS-Ser-HA, UAS-SerK2R-HA und UAS-V5-Dmib1 wurden mit pMT-Gal4 für 24 Stunden bei 25°C exprimiert. Um die Endozytose der transgenen Liganden zu analysieren, wurden die Proben mit dem αSer-ECD-Antikörper bei 4°C inkubiert. Daraufhin wurde der erste Antikörper ausgewaschen und die Zellen bei 25°C für 120, 180 Minuten bei 25°C inkubiert. Durch die Inkubation bei 25°C sollte die Endozytose der Liganden und des gebundenen Antikörpers initiiert werden. Danach wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und mit dem zweiten Antikörper gefärbt. Bei alleiniger Expression sowohl von Ser-HA als auch von SerK2R-HA werden die Liganden nach 120 und 180 Minuten hauptsächlich an der Zellmembran detektiert (A, A´, C, C´, E, E´, G, G´). Hierbei sind, besonders bei Ser-HA, vereinzelt HA- und Rab7-positive Vesikel zu sehen (A, A´, G, G´). Bei der Ko-Expression von Ser-HA mit dem V5-Dmib1 wird eine ausschließlich vesikuläre Lokalisation des Liganden beobachtet (B-B´´ und F-F´´). Während die Ko-Expression von SerK2R-HA mit UAS-Dmib1 keinen Einfluss auf die Lokalisation des Liganden hat (D-D´´ und H-H´´). SerK2R-HA lokalisiert an der Membran sogar nach 180 Minuten Endozytose.

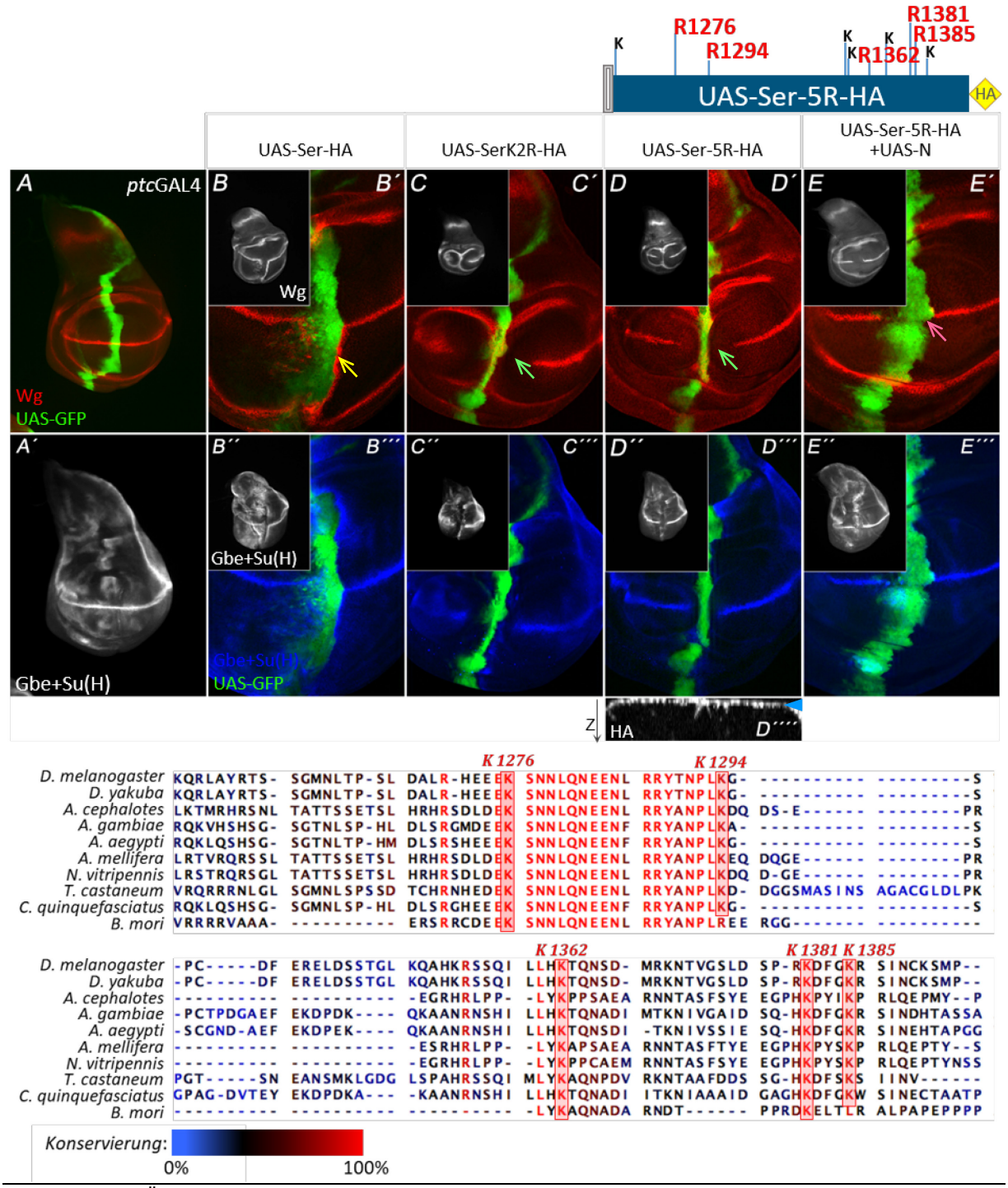
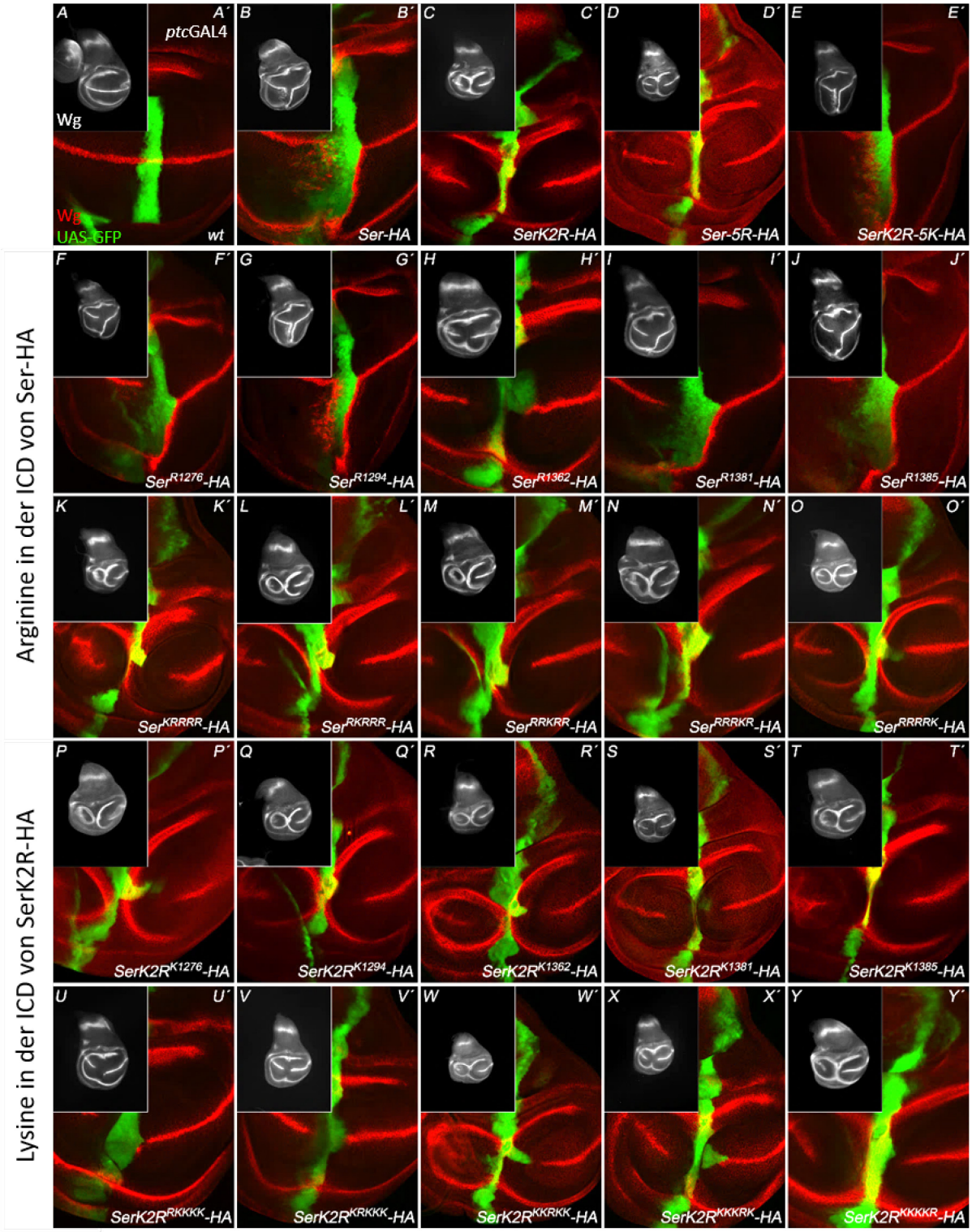


Abbildung 54: Übersicht über die Expression von Ser^{R1276,1294,1362,1381,1385}-HA (Ser-5R-HA). Bei der Ser-5R-HA-Variante wurden die Ks K1276,1294,1362,1381,1385, die am stärksten konserviert sind, durch R ersetzt. Der transgene Ligand wurde unter Kontrolle des *ptc*-Promoters exprimiert (A). Als Aktivitätsmarker für den Notch-Signalweg dient die Expression von Wg und des Reportergens Gbe+Su(H) (A, A´). Während die Expression von Ser-HA zu einer ektopischen Aktivierung des Notch-Signalwegs im ventralen Kompartiment führt (B-B´´´, gelber Pfeil), resultiert die Expression von Ser-5R-HA in einem SerK2R-HA-ähnlichen Phänotyp (vgl. C-C´´´ mit D-D´´´). Hierbei wird die endogene Aktivierung des Notch-Signalwegs in einer nicht zellautonomen Weise unterbunden (D-D´´´, grüner Pfeil). Ser-5R-HA lokalisiert ausschließlich an der apikalen Membran (D´´´´, blauer Pfeilkopf). Bei der Ko-Expression von Ser-5R-HA mit UAS-N wird der dominant negative Effekt des Liganden unterdrückt. Die endogene Aktivierung des Notch-Signalwegs wird weiterhin reprimiert, allerdings in einer zellautonomen Weise (E-E´´´´, rosafarbener Pfeil).

```
                                                K 1276                  K 1294
D. melanogaster KQRLAYRTS- SGMNLTP-SL DALR-HEEEK SNNLQNEENL RRYTNPLKG- ---------- ---------S
D. yakuba       KQRLAYRTS- SGMNLTP-SL DALR-HEEEK SNNLQNEENL RRYTNPLKG- ---------- ---------S
A. cephalotes   LKTMRHRSNL TATTSSETSL HRHRSDLDEK SNNLQNEENL RRYANPLKDQ DS-E------ --------PR
A. gambiae      RQKVHSHSG- SGTNLSP-HL DLSRGMDEEK SNNLQNEENF RRYANPLKA- ---------- ---------S
A. aegypti      RQKLQSHSG- SGTNLTP-HM DLSRSHEEEK SNNLQNEENF RRYANPLKG- ---------- ---------S
A. mellifera    LRTVRQRSSL TATTSSETSL HRHRSDLDEK SNNLQNEENL RRYANPLKEQ DQGE------ --------PR
N. vitripennis  LRSTRQRSGL TATTSSETSL HRHRSDLDEK SNNLQNEENL RRYANPLKDQ D-GE------ --------PR
T. castaneum    VRQRRRNLGL SGMNLSPSSD TCHRNHEDEK SNNLQNEENL RRYANPLKD- DGGSMASINS AGACGLDLPK
C. quinquefasciatus RQKLQSHSG- SGMNLSP-HL DLSRGHEEEK SNNLQNEENF RRYANPLKG- ---------- ---------S
B. mori         VRRRRVAAA- ---------- ERSRRCDEEK SNNLQNEENL RRYANPLREE RGG------- ----------
                                                K 1362                  K 1381 K 1385
D. melanogaster -PC-----DF EREL DSSTGL KQAHKRSSQI LLHKTQNSD- MRKNTVGSLD SP-RKDFGKR SINCKSMP--
D. yakuba       -PC-----DF EREL DSSTGL KQAHKRSSQI LLHKTQNSD- MRKNTVGSLD SP-RKDFGKR SINCKSMP--
A. cephalotes   ---------- ---------- -EGRHRLPP- -LYKPPSAEA RNNTASFSYE EGPHKPYIKP RLQEPMY--P
A. gambiae      -PCTPDGAEF EKDPDK---- QKAANRNSHI LLHKTQNADI MTKNIVGAID SQ-HKDFGKR SINDHTASSA
A. aegypti      -SCGND-AEF EKDPEK---- QKAANRNSHI LLHKTQNSDI -TKNIVSSIE SQ-HKDFGKR SINEHTAPGG
A. mellifera    ---------- ---------- -ESRHRLPP- -LYKAPSAEA RNNTASFTYE EGPHKPYSKP RLQEPTY--S
N. vitripennis  ---------- ---------- -EGRHRLPP- -LYKPPCAEM RNNTASFSYE EGPHKPYSKP RLQEPTYNSS
T. castaneum    PGT-----SN EANSMKLGDG LSPAHRSSQI MLYKAQNPDV RKNTAAFDDS SG-HKDFSKS IINV------
C. quinquefasciatus GPAG-DVTEY EKDPDKA--- -KAANRNSHI LLHKTQNADI ITKNIAAAID GAGHKDFGKW SINECTAATP
B. mori         ---------- ---------- ---------- -LYKAQNADA RNDT------ PPRDKELTLR ALPAPEPPPP
```



Bildunterschrift auf S. 133

Abbildung 55: Übersicht der Expressionen von Ser-R- und SerK2R-K-Varianten, um die Rolle der Ks 1276, 1294, 1362, 1381 und 1385 zu analysieren. Alle Liganden wurden unter Kontrolle des *ptc*-Promoters exprimiert (A´). Zum Nachweis der Notch-Aktivität wurde die Wg-Expression analysiert (A). Ser-HA ist in der Lage den Notch-Signalweg ektopisch zu aktivieren (B, B´). Es besitzt zehn Ks in der ICD, fünf davon sind hoch konserviert. SerK2R-HA ist ein Ligand mit einer K-freien ICD und es wirkt in einer dominant negativen Weise (C, C´). In der ICD von Ser-5R-HA wurden fünf konservierte Ks gleichzeitig gegen Rs ausgetauscht. Die Expression von Ser5R-HA verursacht einen SerK2R-ähnlichen Phänotyp (vgl. C, C´ mit D, D´). Durch die Wiedereinführung der fünf konservierten Ks in die SerK2R-ICD wurde ein SerK2R-5K-HA generiert. Dieser Ligand ist in der Lage den Notch-Signalweg zu aktivieren, ähnlich wie Ser-HA (vgl. B, B´ mit E, E´). Ein K zu R-Austausch von K1276, 1294, 1381, 1385 einzeln hat keine Auswirkungen auf die Aktivität des Liganden (vgl. B, B´ mit F, F´, G, G´, I, I´ und J, J´). Ein Austausch des K1362 zu R führt zu einem stark *cis*-inhibitorischen Liganden (vgl. B, B´ mit H, H´). Ein K zu R-Austausch von vier Ks gleichzeitig führt in jeder Kombination zu einem inaktiven dominant negativen Liganden (vgl. B, B´ und C, C´ mit K, K´-O, O´). Die Wiedereinführung der einzelnen konservierten Ks in die ICD von SerK2R-HA reicht für die Aktivität des Liganden nicht aus (vgl. C, C´ mit P, P´-T, T´). Die Wiedereinführung der Ks an vier Positionen gleichzeitig führt dazu, dass drei SerK2R-4K-Varianten nicht mehr dominant negativ wirken (U, V, X). Zwei SerK2R-4K-Varianten bleiben dagegen dominant negativ, ähnlich wie SerK2R-HA (vgl. C, C´ mit W, W´, Y, Y´)

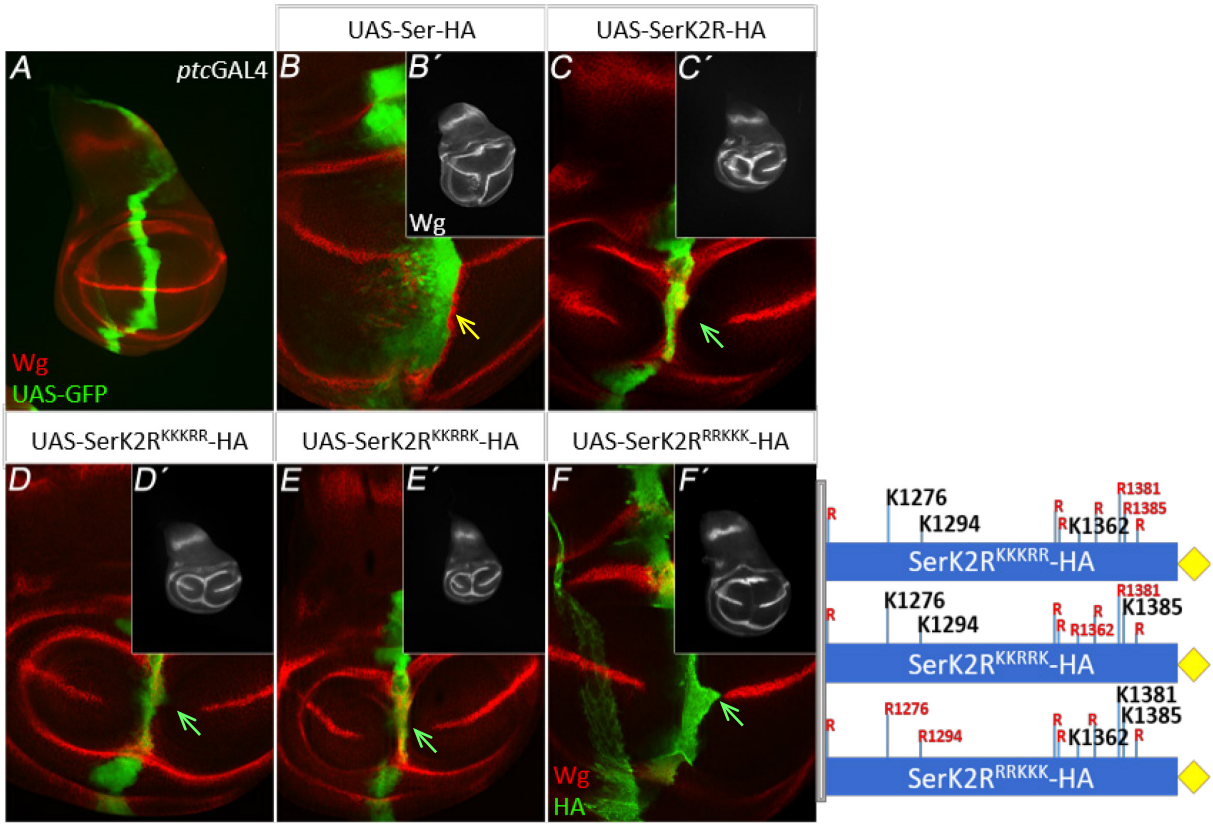


Abbildung 56: Expression der SerK2R-Varianten mit drei gleichzeitig wiedereingeführten Ks. Alle transgenen Liganden wurden mit dem *ptc*Gal4 exprimiert (A, GFP). Zum Nachweis der Notch-Aktivität wurde die Wg-Expression analysiert (A). Die Expression von Ser-HA führt zu einer Aktivierung des Notch-Signalwegs im ventralen Kompartiment (B, B´). Gleichzeitig wirkt Ser-HA *cis*-inhibitorisch und induziert eine zellautonome Unterbrechung der endogenen Wg-Expression (B, B´). Die Expression von SerK2R-HA resultiert in einem dominant negativen Effekt und führt zu einer nicht zellautonomen Unterbrechung der Wg-Expression (C, C´). Die Expression der getesteten SerK2R-3K-Varianten, SerK2R^{K1276,1294,1362}-HA, SerK2R^{K1276,1294,1385}-HA, SerK2R^{K1362,1381,1385}-HA, führt ebenfalls zu einer nicht zellautonomen Unterbrechung der endogenen Wg-Expression (D, D´-F, F´).

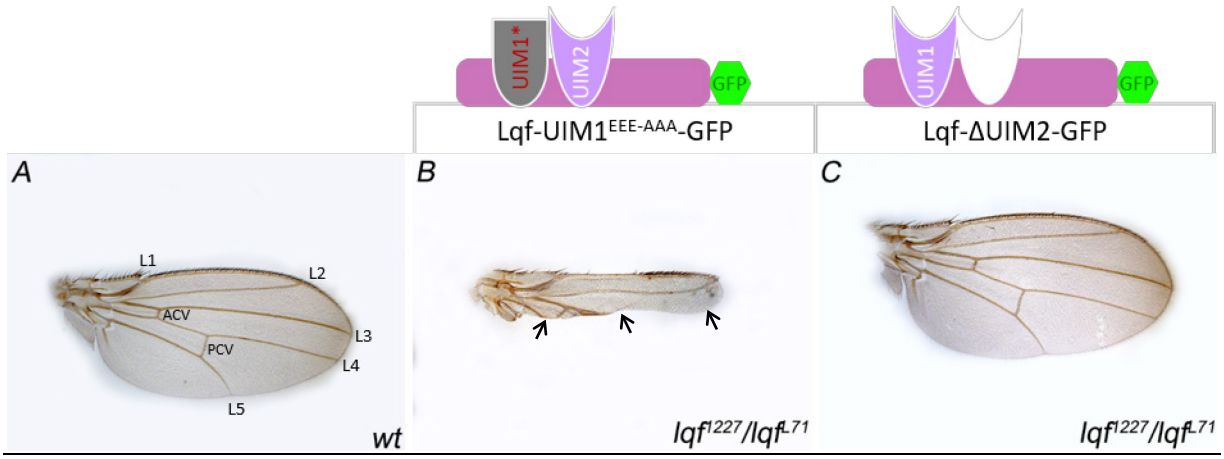


Abbildung 57: Phänotyp der Flügel nach der Rettung der *lqf*-homozygot mutanten Situation mit den Varianten Lqf-$^{\text{UIM1EEE-AAA}}$-GFP und Lqf-ΔUIM2-GFP. Ein wildtypischer Flügel von *Drosophila* besitzt fünf Längsvenen (L1-L5) und zwei Quervenen (ACV und PCV) (A). Nach der Rettung mit dem Lqf-$^{\text{UIM1EEE-AAA}}$-GFP, eine Lqf-Variante ohne erstes funktionales Ubiquitin-bindendes Motiv, schlüpfen Fliegen mit verkleinerten Flügeln. Dabei fehlt das meiste Gewebe an den Rändern (vgl. A mit B, schwarze Pfeile). Lqf-ΔUIM2-GFP, eine Variante mit deletiertem zweitem Ubiquitin-interagierenden Motiv, ist in der Lage den *lqf*-mutanten Hintergrund vollständig retten. Es schlüpfen wildtypisch aussehende Fliegen (C).

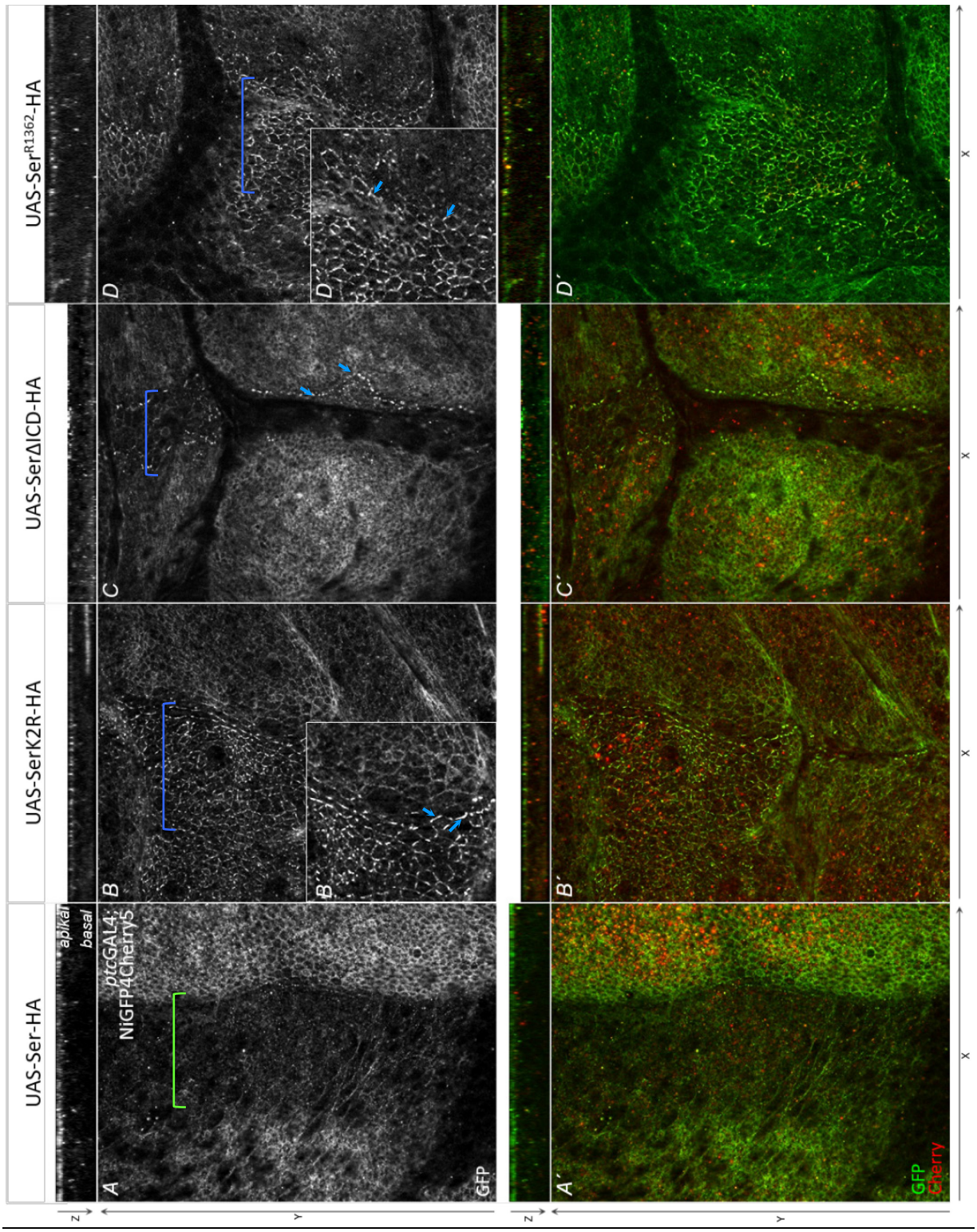


Abbildung 58: Subzelluläre Lokalisation des Notch-Rezeptors bei der Expression von Ser-HA, SerK2R-HA, SerΔICD-HA und Ser^{R1362}-HA. Die transgenen Liganden wurden mit *ptc*Gal4, Ni-GFP4Cherry5 exprimiert und anschließend die Flügelimaginalscheiben fixiert. Die Expression von Ser-HA resultiert in einer Entfernung des N-Rezeptors von der apikalen Membran (A, A´, grüne Klammer). Die Expression von SerK2R-HA, SerΔICD-HA und Ser^{R1362}-HA führt zu einer Anreicherung des N-GFP-Signals an der apikalen Membran (B, B´, B´´-D, D´, D´´, gelbe Klammer und hellgrüne Pfeile). Für die Darstellung der apiko-basalen Lokalisation der Proteine wurden Z-Stapel aufgenommen. In der X/Y-Ebene ist N-GFP auf der Höhe der apikalen Region gezeigt. Die Flügelimaginalscheiben sind 630-fach vergrößert dargestellt.

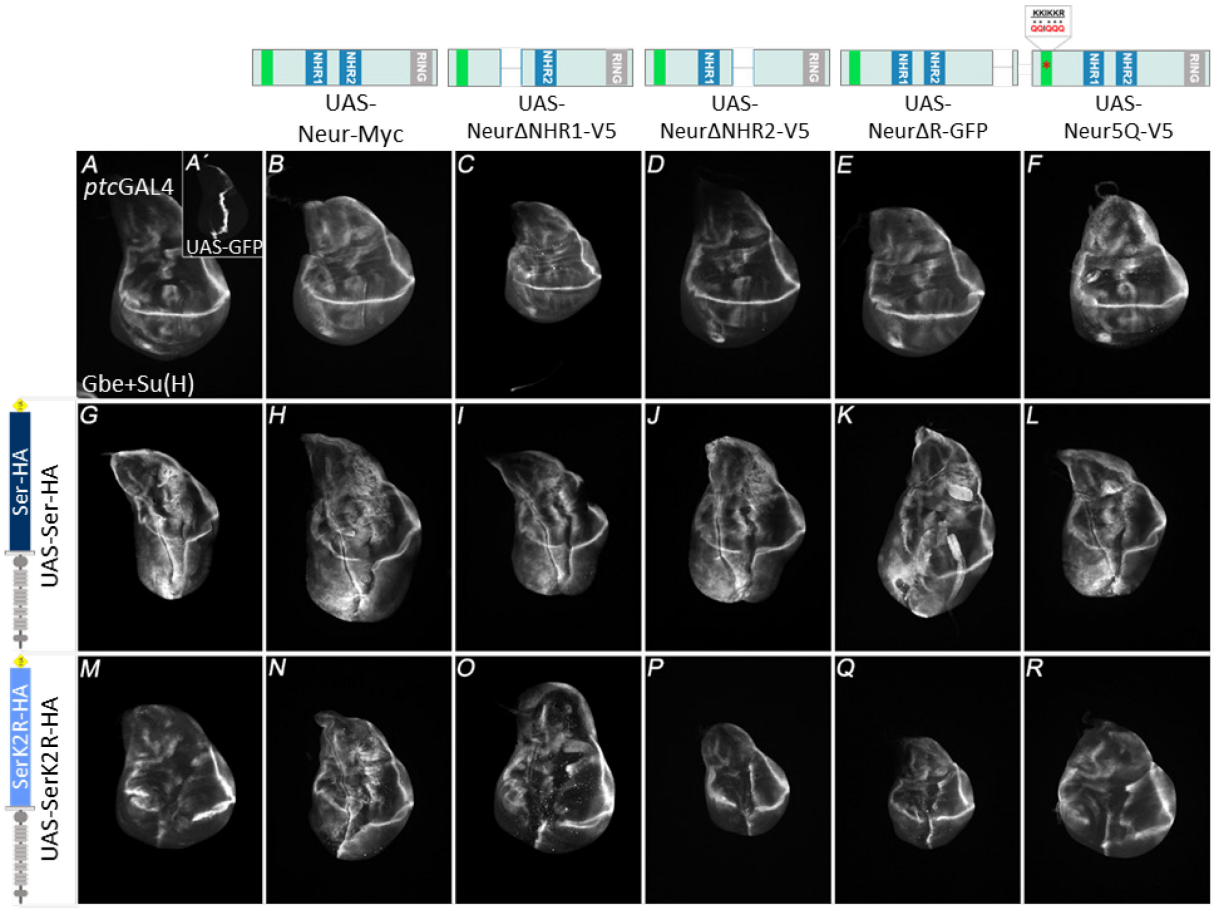


Abbildung 59: Ko-Expression von Ser-HA und SerK2R-HA mit Neur-Varianten im wildtypischen Hintergrund. Alle Konstrukte sind UAS-Konstrukte und wurden mit *ptc*Gal4 ektopisch exprimiert (A´). Zum Nachweis der Aktivierung des Notch-Signalwegs wurden die Expression des Reportergens Gbe+Su(H) analysiert (A). Die Expressionen von Neur-Myc, NeurΔNHR1-V5, NeurΔNHR2-V5, NeurΔR-GFP, Neur5Q-V5 hat keinen Einfluss auf die Gbe+Su(H)-Expression (vgl. A mit B-F). Die Ko-Expression von Ser-HA mit allen Neur-Varianten, mit der Ausnahme von NeurΔR-GFP, resultiert in einer ektopischen Aktivierung des Notch-Signalwegs (H-J, L). Des Weiteren wird ein *cis*-inhibitorischer Effekt innerhalb der *ptc*-Domäne beobachtet H-J, L). Bei der Ko-Expression von Ser-HA mit dem NeurΔR-GFP wird ein diffuses Signal für Gbe+Su(H) detektiert (K). Die Ko-Expression von SerK2R-HA mit dem Neur-Myc führt zu einer Aktivierung des Notch-Signalwegs, die schwächer ist als bei der Ko-Expression von Ser-HA mit Neur-Myc (vgl. H mit N). Hierbei ist die *cis*-inhibitorische Eigenschaft von SerK2R-HA vergleichbar mit der von Ser-HA (vgl. H und N). Die Ko-Expression von SerK2R-HA mit allen weiteren Neur-Varianten führt zu keiner Aktivierung des Notch-Signalwegs. Darüber hinaus wird ein dominant negativer Effekt von SerK2R-HA beobachtet (vgl. M mit O-R). Alle Flügelimaginalscheiben sind 100-fach vergrößert dargestellt.

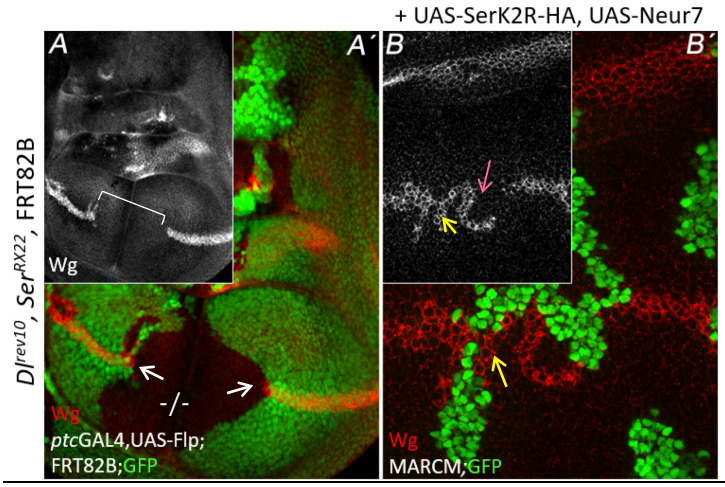


Abbildung 60: Ko-Expression von SerK2R-HA mit Neur7 im *Dl, Ser*-doppelmutanten Hintergrund. Um zu untersuchen, ob SerK2R-HA mit Neur7 in Abwesenheit von den endogenen Liganden den Notch-Signalweg ektopisch aktivieren können, wurden SerK2R-HA mit Neur-Myc mittels des MARCM-Systems in den *Dl, Ser*-doppelmutanten Zellen ko-exprimiert. Die *Dl, Ser*-doppelmutanten Zellen sind dabei anhand der GFP-Fluoreszenz sichtbar (B´). In der Kontrollkreuzung wurden *Dl, Ser*-doppelmutante Zellklone mit dem FLP-FRT-System generiert, wobei mutante Zellen durch das Fehlen des GFP-Signals markiert sind (A´). Ein Ausfall beider Liganden induziert eine nicht zellautonome Unterbrechung der endogenen Wg-Expression (A, A´). Die *Dl, Ser*-mutanten Zellen, die an die wildtypischen angrenzen, schalten die Wg-Expression ein. Die Ko-Expression von SerK2R-HA mit Neur in den *Dl, Ser*-doppelmutanten Zellklonen führt zu einer ektopischen Wg-Expression in den benachbarten Zellen (B, B´, gelbe Pfeile). Innerhalb der *Dl, Ser*-mutanten Zellklone wird keine Wg-Expression beobachtet, infolge der *Cis*-Inhibition (B, rosafarbener Pfeil).

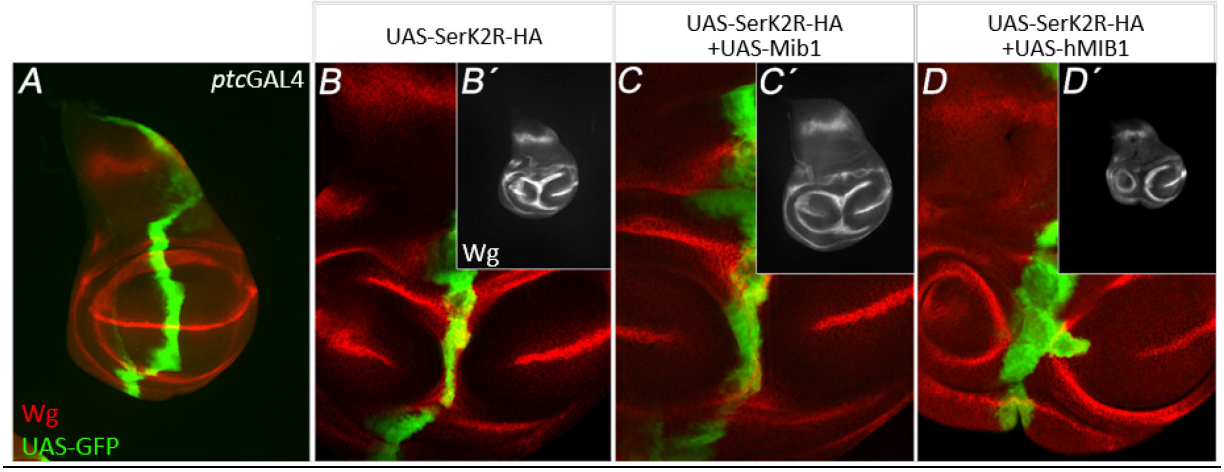


Abbildung 61: Ko-Expression von SerK2R-HA mit UAS-Mib1 und UAS-hMIB1 im wildtypischen Hintergrund. Die Expression der UAS-Konstrukte erfolgte unter Kontrolle des *ptc*-Promoters (A, visualisiert durch GFP). Zum Nachweis der Notch-Aktivität wurde die Expression von Wg untersucht (A). Die alleinige Expression von SerK2R-HA resultiert in einer Unterbrechung der endogenen Wg-Expression in einer nicht zellautonomen Weise (B, B´). Ähnlich dazu führt die Ko-Expression von SerK2R-HA sowohl mit *Drosophila* Mib1 als auch mit dem humanen MIB1 zu einer nicht zellautonomen Unterbrechung der endogenen Wg-Expression (vgl. B, B´ mit C, C´, D, D´). In A, B´, C´, D´ sind die Flügelimaginalscheiben 100-fach und in B, C, D 250-fach vergrößert dargestellt.

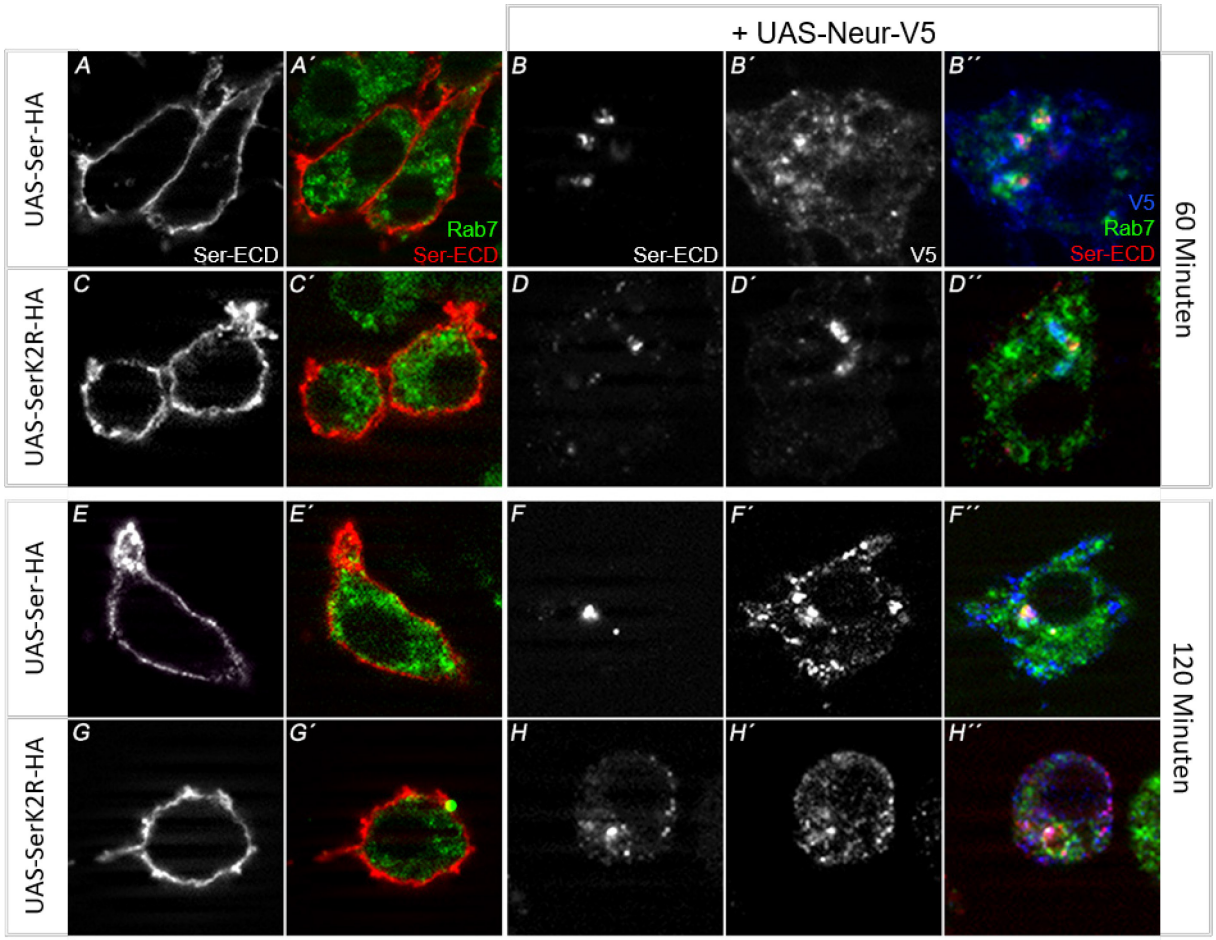


Abbildung 62: Antikörper-„Uptake"-Assay zur Analyse der Endozytose von Ser-HA und SerK2R-HA bei der Ko-Expression mit Neur in S2-Zellen. Die Konstrukte UAS-Ser-HA, UAS-SerK2R-HA und UAS-Neur-V5 wurden mithilfe von pMT-Gal4 für 24 Stunden bei 25°C exprimiert. Anschließend wurden die Proben mit dem αSer-ECD Antikörper bei 4°C inkubiert. Danach wurde der αSer-ECD Antikörper entfernt und die Zellen für 60 und 120 Minuten bei 25°C inkubiert, um die Endozytose der transgenen Liganden und des gebundenen Antikörpers auszulösen. Zum Schluss wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und mit dem zweiten Antikörper gefärbt. Bei alleiniger Expression von Ser-HA und SerK2R-HA lokalisieren beide Liganden sowohl nach 60-minütiger als auch nach 120-minütiger Endozytose an der Zellmembran (A, A´, C, C´, E, E´, G, G´). Bei der Ko- Expression von Ser-HA oder SerK2R-HA mit dem Neur-V5 lokalisieren beide Liganden ausschließlich in Vesikeln, die Rab7- und V5-positiv zu sein scheinen (B-B´´, D-D´´, F-F´´, H-H´´).

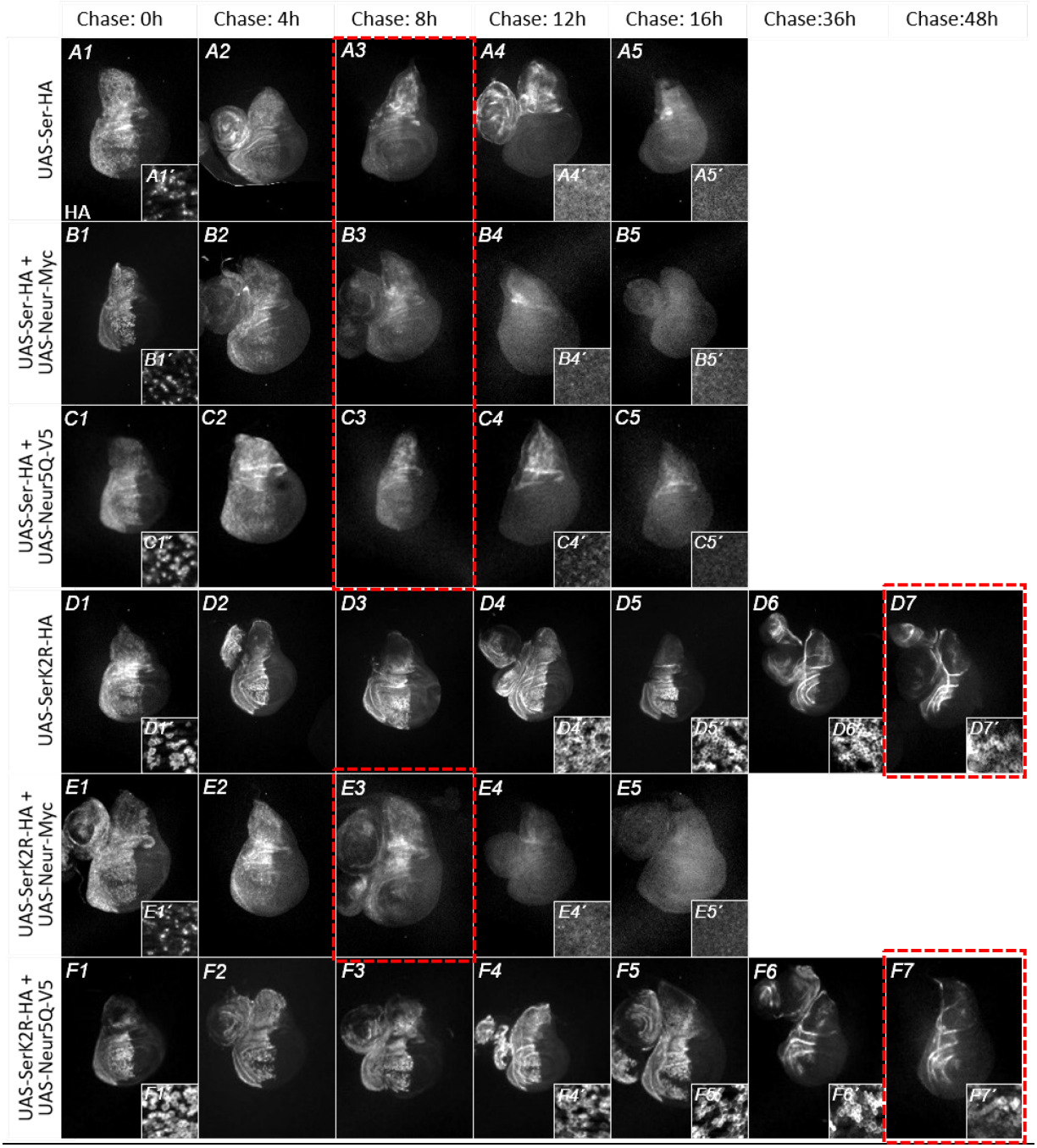


Abbildung 63: Pulse-Chase-Experiment zur Bestimmung der Degradationszeit von SerK2R-HA bei den Ko-Expressionen mit Neur-Myc und Neur5Q-V5. Alle UAS-Konstrukte wurden unter Kontrolle des *ci*-Promoters mit zusätzlichem GAL80^{ts} exprimiert. Zuerst wurden die Transgene für 16 Stunde bei 29°C in der Pulse-Phase exprimiert. Darauf folgten die Chase-Phasen, in denen keine neuen Proteine synthetisiert und die bereits vorhandenen degradiert werden sollten. Zu folgenden Chase-Zeitpunkten wurden die Flügelimaginalscheiben präpariert und eine anti-HA Antikörperfärbung durchgeführt: 0h, 4h, 8, 12, 16h, 36h, 48h. Zum Zeitpunkt 0 wird sowohl Ser-HA als auch SerK2R-HA in der ganzen *ci*-Domäne detektiert (A1-F1). Nach einer 8-stündigen Degradation ist das meiste Ser-HA-Signal nicht detektierbar (A1-A5). Die Ko-Expression mit Neur-Myc oder Neur5Q-V5 hat keine Auswirkung auf die Degradationsdauer von Ser-HA (vgl. A1-A5 mit B1-B5 und C1-C5). Im Gegensatz zu Ser-HA bleibt SerK2R-HA-Signal deutlich länger detektierbar, auch nach 48 Stunden Degradation (D1-D7). Ko- Expression mit Neur-Myc verkürzt die Degradationszeit von SerK2R-HA auf unter 12 Stunden (vgl. D1-D7 mit E1-E5). Die Ko-Expression von SerK2R-HA mit Neur5Q-V5 ist hingegen nicht in der Lage den Abbau von SerK2R-HA zu beschleunigen (vgl. D1-D7 mit F1-F7).

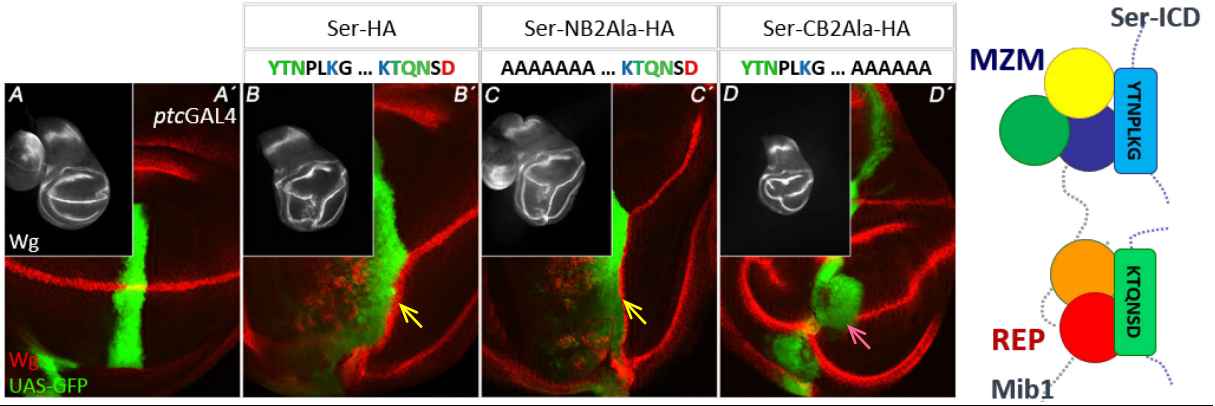


Abbildung 64: Übersicht der Expressionen von Ser-Varianten mit mutierten N- und C-Boxen. Bei den transgenen Liganden Ser-NB2Ala-HA und Ser-CB2Ala-HA wurden die Aminosäuren der N- oder C-Box jeweils gegen Alanine ausgetauscht. Die Expression von Ser-HA und SerNB2Ala-HA unter Kontrolle des *ptc*-Promoters (A´) führt zu einer ektopischen ventralen Aktivierung des Notch-Signalwegs, die in einer ektopischen Wg-Expression resultiert (vgl. A, A´ mit B, B´ und C, C´, gelbe Pfeile). Ser-CB2Ala-HA wirkt hingegen *cis*-inhibitorisch und ist nicht in der Lage den Notch-Signalweg zu aktivieren (D, D´, rosafarbener Pfeil). Die Flügelimaginalscheiben sind in A-D 100-fach und in A´-D´ 250-fach vergrößert dargestellt.

Teilpublikationen im Rahmen dieser Dissertation:

Nicole Berndt, Ekaterina Seib, Soya Kim, Tobias Troost, Marvin Lyga, Jessica Langenbach, Sebastian Haensch, Konstantina Kalodimou, Christos Delidakis, Thomas Klein (2017). „Ubiquitylation-independent activation of Notch signalling by Delta“ eLife 2017; 6:e27346

Ekaterina Seib hat zu dieser Publikation beigetragen:

Expression von Ser-HA im *mib1*-mutanten Hintergrund.

Herstellung transgener Fliegen mit Lqf-Varianten und Expression von Lqf-Varianten.

10 Danksagung

Ich bedanke mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. Thomas Klein für die Vergabe dieses spannenden Themas, für die gute Betreuung sowie für viele hilfreiche Diskussionen.

Ich bedanke mich ebenfalls bei Herrn Prof. Dr. Mathias Beller für die Übernahme des Koreferats.

Mein Dank gilt allen ehemaligen und gegenwärtigen Kollegen im Institut für ihre Hilfsbereitschaft und die freundliche Arbeitsatmosphäre!

Ein Dankeschön gilt auch Sylvia und Stefan für die zahlreichen Injektionen und dafür, dass sie jeden einzelnen Embryo gesammelt haben. Auch danke ich Gisela für die Hilfe beim Subklonieren einiger Konstrukte und Elke für die Hilfe bei der Vorbereitung des V-Moduls. Danke an Mehmet für die Aufrechterhaltung meiner Stammsammlung während meiner Baby-Pause.

Außerdem möchte ich mich bei Björn Schnute für das Korrekturlesen dieser Arbeit bedanken.
Ein besonderer Dank gilt Daniela Lichtblau!

Danke an Kristina für die schönen Mittagspausen und Sportabende!

Mein größter Dank gilt meiner Familie für die Unterstützung während der ganzen (nicht immer einfachen) Zeit!
Спасибо вам большое за бесконечную поддержку! Главное, что есть ВЫ у меня!

11 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, dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät zur Prüfung vorgelegen hat.

Düsseldorf, September 2020 Ekaterina Seib