

**Regulation des Notch-Signalweges durch
Lethal (2) giant discs (Lgd)
und durch die Notch-Liganden.**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von

Robert Jaekel

aus Poznań, Polen

Köln 2006

Erster Berichterstatter: Herr Priv.-Doz. Dr. Thomas Klein

Zweiter Berichterstatter: Herr Prof. Dr. Siegfried Roth

Tag der mündlichen Prüfung: 06. November 2006

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	6
1.1. DER NOTCH-SIGNALWEG	7
1.2. REGULATION DER NOTCH-AKTIVITÄT	9
1.2.1. <i>Expressionsmuster, Rückkopplung und Polarisierung der Signalrichtung</i>	10
1.2.2. <i>Endozytose und Monoubiquitinierung</i>	14
1.3. PROJEKT I – LETHAL (2) GIANT DISCS	18
1.4. PROJEKT II – CIS-INHIBITORISCHER EFFEKT DER NOTCH-LIGANDEN	20
2. ERGEBNISSE PROJEKT I	23
2.1. KARTIERUNG VON LETHAL (2) GIANT DISCS	23
2.1.1. <i>Meiotische Rekombination</i>	23
2.1.2. <i>Kartierung der Defizienz Df(2L)FCK-20</i>	26
2.1.3. <i>Komplementationsanalyse mit P-Element Insertionen</i>	27
2.1.4. <i>Analyse der P-Element Insertionslinie l(2)SH0495</i>	27
2.1.5. <i>Revertanten Screen</i>	31
2.1.6. <i>Molekulare Analyse der lethal (2) giant discs Allele</i>	32
2.1.7. <i>Rettung des lgd-Phänotyps mit induzierbaren Transgenen von CG4713</i>	33
2.2. BIOINFORMATISCHE ANALYSE VON LGD	35
2.2.1. <i>Struktur von Lgd</i>	35
2.2.2. <i>Lgd-Orthologe</i>	37
2.2.3. <i>Vertebraten-Orthologe retten die Flügelentwicklung in lgd-Mutanten</i>	39
2.3. FUNKTIONSANALYSE VON LGD	39
2.4. PHÄNOTYPEN DER ÜBEREXPRESSION VON LGD	40
2.4.1. <i>Zwei Seiten der Lgd-Überexpressionseffekte</i>	40
2.5. LOKALISATION VON LGD	43
2.6. LGD IST AN DEM ENDOZYTOTISCHEN TRANSPORT VON NOTCH BETEILIGT	46
2.6.1. <i>Die Zellpolarität ist in lgd-Klonen unbeeinflusst</i>	53
2.6.2. <i>Analyse der endosomalen Kompartimentierung von Notch</i>	55
2.6.3. <i>Suppressierender Einfluß von Rab5-, Rab7- und FYVE-GFP auf den lgd Phänotyp</i>	60
2.6.4. <i>Analyse der Lgd-Deletionskonstrukte</i>	62
3. ERGEBNISSE PROJEKT II – INHIBITORISCHER EFFEKT DER NOTCH-LIGANDEN	69
3.1. DIE NOTCH-LIGANDEN AUS DEN VERTEBRATEN	69
3.2. DAS UNTERSUCHUNGSSYSTEM	72
3.3. EFFEKTE DER EXPRESSION DER DELTA-LIKE UND JAGGED-PROTEINE IN DROSOPHILA	74
3.3.1. <i>Effekte der Expression von DLL1 und DLL1-HA</i>	75
3.3.2. <i>Effekte der Expression von DLL4</i>	77
3.3.3. <i>Effekte der Expression von DLL3, Jag1-HA und Jag2-HA</i>	80
3.4. EFFEKTE DER EXPRESSION VON DL-DLL HYBRID-KONSTRUKTEN	83

3.4.1. Hybride zwischen <i>Dl</i> und <i>DLL1</i> oder <i>DLL4</i>	84
3.4.2. Hybride zwischen <i>DLL1</i> und <i>DLL4</i>	89
4. DISKUSSION	92
4.1. PROJEKT I: LETHAL (2) GIANT DISCS	93
4.1.1. Die Transkriptionseinheit <i>CG4713</i> kodiert das <i>lgd</i> -Gen	93
4.1.2. Phänotypen der Überexpression von <i>Lgd</i>	94
4.1.3. Untersuchung der Funktion von <i>Lgd</i>	95
4.1.4. Funktionelle Untersuchung der Proteindomänen von <i>Lgd</i>	101
4.1.5. <i>Lgd</i> gehört zu einer in den Metazoen konservierten Proteinfamilie	102
4.1.6. Projekt II: Der cis-inhibitorische Effekt hoher Ligandenkonzentrationen auf die Notch-Aktivität	104
4.1.7. Interaktionen der Liganden-Orthologen aus den Vertebraten mit dem Notch-Rezeptor	105
5. MATERIAL UND METHODEN	109
5.1. MATERIAL	109
5.1.1. Chemikalien, Enzyme und Reaktions-Kits	109
5.1.2. Enzyme:	109
5.2. GERÄTE UND ARBEITSMATERIALIEN	109
5.3. ANTIKÖRPER:	110
5.3.1. Primäre Antikörper	110
5.3.2. Sekundäre Antikörper	110
5.3.3. Fliegenstämme:	111
5.3.4. Bakterien:	112
5.4. METHODEN	113
5.4.1. Kartierung der <i>Df(2L)FCK-20</i> Defizienz	113
5.4.2. Klonierung der <i>lgd</i> -cDNA	115
5.4.3. Klonierung der cDNA für <i>mlgd1</i> und <i>mlgd2</i>	116
5.4.4. Gewinnung genomischer DNA aus Fliegen/Larven:	117
5.4.5. Sequenzierung der <i>lgd</i> -Allele	117
5.4.6. DNA-Minipräparation nach TENS-Protokoll	118
5.4.7. Gene-SOEing-PCR	119
5.4.8. Herstellung der Delta/DLL-Hybridkonstrukte	120
5.4.9. Sequenzenalignments und phylogenetische Untersuchungen	127
5.4.10. Fliegenhaltung	128
5.4.11. Herstellung transgener Fliegen	128
5.4.12. Präparation und Antikörperfärbung von Flügelimaginalscheiben	129
5.4.13. Kutikulapräparationen	130
5.4.14. Uptake-Versuche	131
5.4.15. RNA in-situ Färbungen an Flügelimaginalscheiben	131
5.4.16. Erzeugung von MARCM-Klonen	135
6. LITERATUR	136

7.	ANHANG	148
8.	ZUSAMMENFASSUNG.....	153
9.	SUMMARY.....	154
10.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	155
11.	DANKSAGUNG	157
12.	ERKLÄRUNG	158
13.	LEBENS LAUF.....	159

1. Einleitung

Kommunikation ist eine der wichtigsten Grundlagen des Lebens. Während die Folgen mangelhafter Syntax, unklarer Ausdrucksweise oder fehlender Sprachkenntnisse bei zwischenmenschlichen Interaktionen zwischen Unverständnis, unfreiwilliger Komik oder eventueller Verstimmung variieren dürften, können Kommunikationsfehler zwischen den Zellen multizellulärer Organismen direktere und drastischere Auswirkungen für den Organismus haben wie Zelltod, Entstehung von Tumoren oder, betrachtet man die Entwicklung eines Organismus als Ganzes, zum Beispiel die Entstehung eines „...hoffnungslosen Monsters, das sich nicht über das embryonale Stadium hinaus entwickeln kann...“ bedingen (Poulson, 1945). Um derartige Fehlbildungen zu verhindern und eine normale Entwicklung eines Organismus von der einzelnen Zelle an bis zu seiner finalen, artspezifischen Form mit hunderten verschiedener Zelltypen zu gewähren, ist ein ausbalanciertes Wechselspiel aus zellintrinsic (zellautonomen) und den von anderen Zellen (nicht-autonom) zugetragenen Faktoren notwendig.

Die Signaltransduktionswege, durch die der Informationsaustausch zwischen den Zellen stattfindet sind in den Metazoen hoch konserviert, allerdings ist ihre Anzahl erstaunlich gering, führt man sich die Komplexität eines multizellulären Organismus wie die der Fliege oder die des Menschen vor Augen. Während der frühen Entwicklungsphasen werden vorwiegend nur fünf verschiedene Signaltransduktionswege benutzt (Wingless/Wnt, Rezeptor-Serin/Threoninkinasen, Hedgehog, Rezeptor-Tyrosinkinasen und der Notch-Signalweg), fünf weitere kommen hinzu in späteren Entwicklungsphasen, bei der Organogenese und Zelldifferenzierung. Weitere sieben werden noch später für physiologische Funktionen in bereits differenzierten Geweben der heranwachsenden und adulten Tiere gebraucht (Gerhart, 1999). Die Integration der mittels dieser Signalwege zugetragenen Informationen führt zu zeitlich und räumlich koordinierten Reaktionen in den Zellen, wodurch unter anderem ihre Zelldetermination bestimmt wird. So war das Aufkommen der oben erwähnten „Monster“ begründet in der Unterbrechung eines von diesen interzellulären Signaltransduktionswegen, des Notch-Signalweges während der Entwicklung von *Drosophila melanogaster*. Diese Unterbrechung des Notch-Signalweges führte zu einer Änderung der Zelldeterminierung, so daß in den Fliegenembryonen Zellen des frühen neurogenen Ektoderms, die normalerweise das epidermale Schicksal annehmen, nun zum neuronalen Gewebe wurden, was eine weitere normale Entwicklung des Embryos unmöglich machte

(Wright, 1970). Der Notch-Signalweg ist evolutionär hochkonserviert und in allen untersuchten Metazoen, von der Seescheide bis zum Menschen vorhanden (Egan et al., 1998; Kimble and Simpson, 1997; Weinmaster, 1997). In diesen Organismen ist der Notch-Signalweg, zum Teil im Wechselspiel mit anderen Faktoren, in eine noch nicht abschließend erforschte Anzahl verschiedener Prozesse involviert, die Einfluß auf Zelldetermination, Zellproliferation und Apoptose haben. Die Folgen der Aktivität des Signalweges sind hierbei vom zellulären Kontext und Zelltyp abhängig. Es überrascht daher nicht, daß mit der steigenden Anzahl der entdeckten Prozesse an denen der Notch-Signalweg beteiligt ist, auch die Menge an Mechanismen und Genen wächst, die die Aktivität dieses Signalweges beeinflussen und dessen Auswirkungen modulieren.

Die vorliegende Arbeit beschreibt zwei Projekte, die sich mit solchen, die Aktivität des Notch-Signalweges beeinflussenden Mechanismen in der Fliege *Drosophila melanogaster* befaßten.

1.1. Der Notch-Signalweg

Die Kernkomponenten des Notch-Signalweges bestehen in der Fliege aus dem Rezeptor Notch, den Liganden Delta (Dl) und Serrate (Ser), sowie dem Effektor Supressor of Hairless (Su(H)). In anderen Organismen variiert die Anzahl der Paralogen einzelner Komponenten, so sind in den Nematoden zwei (LIN-12, GLP-1) und in den Vertebraten vier Notch-ähnliche (Notch1-4) Proteine zu finden. Den Liganden lassen sich in den Nematoden vier (LAG-2, APX-1, ARG-2, F16B12.2) und in den Vertebraten drei Delta-ähnliche (Delta-like/DLL1, DLL3 und DLL4), sowie zwei Serrate-ähnliche (Jagged/Jag1 und Jag2) Proteine zurechnen. Lediglich von dem Effektor-Protein scheint es in allen Organismen nur ein Exemplar aus der CSL-Familie zu geben (CBF1-Vertebraten/Su(H)/Lag1-Nematoden) (Übersicht in (Lai, 2004).

Der Notch-Signalweg dient zur Signalübertragung zwischen direkt benachbarten Zellen, wobei sich Rezeptor und Ligand auf zwei verschiedenen Zellen (in *trans*) befinden (Mumm and Kopan, 2000) Der Notch-Rezeptor ist 2703aa lang, wie seine beiden Liganden ein Transmembranprotein (vom Typ I, also mit einem Membrandurchgang) und weist als charakteristisches Merkmal in seiner extrazellulären Domäne 36 Sequenzwiederholungen des *epidermal growth factor* (EGF) ähnlichen Motivs, die ebenfalls, wenn auch in geringerer Anzahl in den Liganden zu finden sind (Dl: 9 Wiederholungen, Ser: 14 –Liganden aus den Vertebraten: siehe Kapitel 3). Zusätzlich befindet sich bei den Liganden noch ein in seiner

Signatur etwas divergierendes EGF-Motiv (Tax et al., 1994) das als DSL-Domäne (DI/Ser/Lag2) bezeichnet wird und für die Interaktion mit dem Rezeptor notwendig ist (Fitzgerald and Greenwald, 1995). Der Rezeptor wird von einer Furin-ähnlichen Konvertase im *trans*-Golgi Netzwerk geschnitten (S1-Schnitt) und liegt als Heterodimer an der Zellmembran vor (Blaumueller et al., 1997; Logeat et al., 1998).

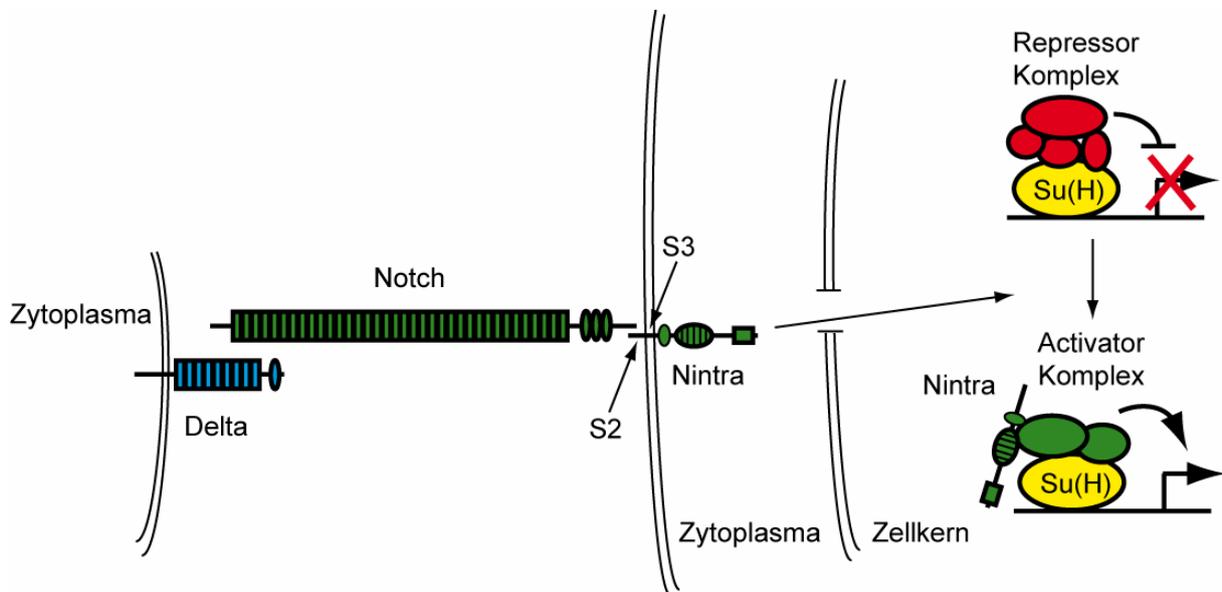


Abb.1.1: Eine Übersicht zum Notch-Signalweg. Nach Bindung des Liganden (hier Delta) wird der intrazelluläre Teil des Notch-Rezeptors (Nintra) durch zwei aufeinander folgende Schnitte (S2, S3) freigesetzt, transloziert in den Kern und aktiviert in einem Komplex mit dem Effektor Su(H) unter Beteiligung weiterer Proteine die Transkription verschiedener Zielgene. (Verändert nach (Lai, 2004))

Bindet einer der Liganden an den Rezeptor, so wird dieser zunächst im extrazellulären Bereich, etwa 12 Aminosäuren von der Transmembrandomäne entfernt, von einer Metalloprotease aus der ADAM-Familie geschnitten und der extrazelluläre Bereich abgetrennt (Kuzbanian/Kuz in *Drosophila*, S2-Schnitt) (Hartmann et al., 2002; Lieber et al., 2002). Bei diesem Prozeß, der als „*ectodomain shedding*“ bezeichnet wird und auch für die weitere Prozessierung anderer Transmembranproteine vom Typ I notwendig ist (Allinson et al., 2004), entsteht neben dem abgetrennten extrazellulären Rezeptorbereich, das membrangebundene, sogenannte NEXT-Produkt (*Notch extracellular truncation*) (Brou et al., 2000; Mumm et al., 2000). Dieses NEXT-Produkt wird anschließend in der Transmembrandomäne geschnitten, wobei der letzte Schritt auf der Aktivität des γ -Sekretase-Komplexes beruht, der aus der Aspartylprotease Presenilin (Psn) und den Kofaktoren Nicastrin/Aph-2, Aph-1 und Pen2 besteht (De Strooper et al., 1999; Song et al., 1999; Struhl and Adachi, 2000; Struhl and Greenwald, 1999; Ye et al., 1999). Der aktivierte, intrazelluläre Teil des Rezeptors (Nintra) ist nun von der Membran abgetrennt und transloziert in den

Zellkern (Struhl and Adachi, 1998). Hier bindet er an den Effektor, ein DNA-bindendes Protein aus der CSL-Familie, wobei er von diesem einen Transkriptionsrepressionskomplex entfernt (Kao et al., 1998), einen anderen, transkriptionsaktivierenden Komplex assoziiert (Petcherski and Kimble, 2000; Wu et al., 2002) und dadurch die Transkription verschiedener Zielgene auslöst (Übersicht für den Signalwegverlauf:(Kadesch, 2004)). Die Gene der HES-Familie (*Hairy/Enhancer of split [E(spl)]* Komplexes) bilden hierbei ein primäres Ziel. Sie kodieren für basische helix-loop-helix Transkriptionsrepressoren (bHLH), die die Aktivität der proneuralen Gene *achaete* und *scute* unterdrücken, indem sie mit den von ihnen kodierten Proteinen Heterodimere bilden (Giagtzoglou et al., 2003; Heitzler et al., 1996; Oellers et al., 1994).

1.2. Regulation der Notch-Aktivität

Das vorangehende Kapitel beschreibt nur die wichtigsten beteiligten Proteine und Vorgänge während der Signaltransduktion durch den Notch-Signalweg. Alleine in der Fliege sind bis jetzt über 140 verschiedene Gene gefunden worden, die, direkt oder indirekt, die Aktivität des Signalweges beeinflussen können (Louvi and Artavanis-Tsakonas, 2006) und Interaktionskarte in der SMART-Datenbank). Dementsprechend zeigt sich auch, daß die Regulation der Notch-Aktivität auf zahlreichen Wegen stattfinden kann, durch unterschiedliche Expressionsmuster des Rezeptors und der Liganden, verschiedene Interaktionsarten zwischen diesen, ferner durch kovalente Modifikationen von Glykosylierung bis zur Ubiquitinierung reichend und durch die Regulation des endozytotischen Transportes des Rezeptors wie der Liganden (Übersichten in (Baron et al., 2002; Kadesch, 2004; Le Borgne, 2006; Le Borgne et al., 2005a)).

D.melanogaster bietet für die Erforschung (nicht nur) des Notch-Signalweges und dessen Regulation ein nahezu ideales Modell, schon alleine deswegen, weil die Anzahl der beteiligten Komponenten viel niedriger ist als in den Vertebraten. Man nimmt an, daß in diesen, wahrscheinlich während der Frühzeit der Vertebratenentwicklung, eine Genomquadruplikation, oder zwei Duplikationsrunden stattgefunden haben, wodurch häufig vier Kopien eines Gens existieren statt des einen Exemplars das im Genom von Insekten zu finden ist, wobei weitere Duplikationen und häufiger Genverlust die Anzahl der Kopien weiter variabilisierten (Dehal and Boore, 2005). Diese Paralogen haben sich unterschiedlich entwickelt. Manche von ihnen haben neue Funktionen übernommen, oder werden in anderem Muster exprimiert, allerdings bleibt bei vielen eine gewisse Redundanz bestehen, die ihre

Erforschung in den Vertebraten erschwert. Demgegenüber steht die einfachere genetische Situation in der Fliege, die zudem eine Vielzahl etablierter Untersuchungsmethoden und schnellere Eingriffsmöglichkeiten in die Genetik bietet.

Einer der Entwicklungsprozesse, an denen der Notch-Signalweg in *Drosophila* beteiligt ist und der auch in Rahmen dieser Arbeit in Hinblick auf die Aufgabenstellung untersucht wurde, ist die Bildung des Flügels. Die Rolle und die Regulation der Notch-Aktivität bei diesem Prozeß wird im nächsten Kapitel beschrieben.

1.2.1. Expressionsmuster, Rückkopplung und Polarisierung der Signalrichtung

Wie für die meisten anderen adulten Organe beginnt die Entwicklung des Flügels bereits in der Larve, wo der Flügel in Form der Flügelimaginalscheibe angelegt wird. Imaginalscheiben lassen sich als einschichtige Epithelien beschreiben, die aus undifferenzierten, sich teilenden Zellen bestehen. Während der Flügelentwicklung kontrolliert der Notch-Signalweg die Induktion distaler Musterelemente (wie der distalen Gelenkregion, der Flügeltasche und des Flügelrandes), die Musterbildung und das Wachstum des Primordiums. Unabhängig von der Notch-Aktivität werden aus der Flügelimaginalscheibe auch noch die proximale Gelenkregion, das Scutellum sowie Teile des Notums gebildet. (Go et al., 1998; Klein, 2001; Klein and Arias, 1998a). Eine schematische Darstellung der Flügelimaginalscheibe und der daraus entstehenden adulten Strukturen ist in Abb.1.2 wiedergegeben.

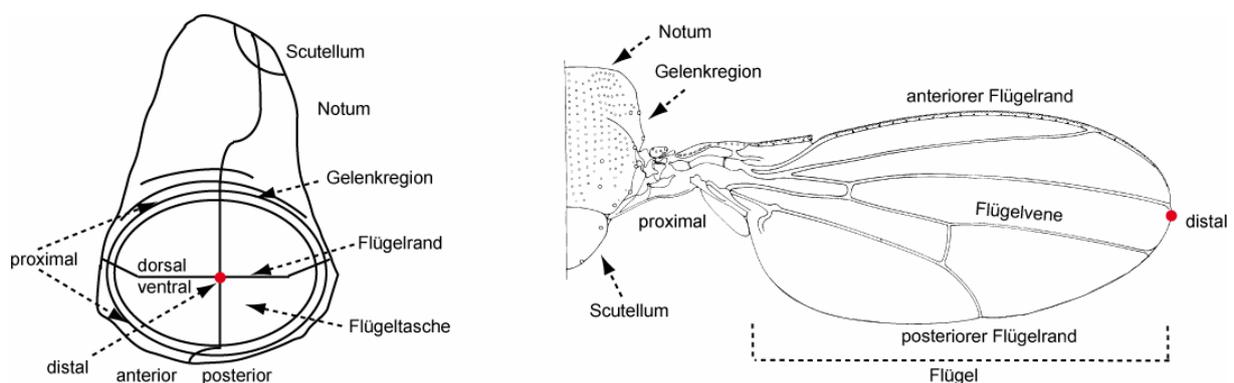


Abb.1.2: Schematische Darstellung der Flügelimaginalscheibe aus dem dritten Larvenstadium mit Kennzeichnung der Kompartimentsgrenzen (dorsal/ventral, anterior/posterior) sowie der Schicksale der einzelnen Regionen und des adulten Flügels. Der rote Punkt in der Mitte der Imaginalscheibe zeigt den später am weitesten distal liegenden Punkt des Flügels an. Übernommen und verändert aus: Imaginalscheibe-(Bryant, 1975), Flügel-(Heitzler et al., 1996).

Die Notch-Aktivität beschränkt sich in den meisten Zeitabschnitten während der Entwicklung der Flügelimaginalscheibe auf einen schmalen Streifen entlang der künftigen dorso-ventralen (d/v) Kompartimentsgrenze der Scheibe und reguliert hier sowohl direkt, als auch indirekt die Transkription verschiedener Gene, die für die Etablierung und Aufrechterhaltung der distalen Flügel und Gelenkstrukturen notwendig sind (Klein and Arias, 1998b). Die Vorgänge, die zu der Restriktion der Notch-Aktivität auf diesen schmalen Bereich führen, sind hoch dynamisch und stark miteinander verwoben.

Die erste Ebene der Regulation der Notch-Aktivität betrifft die Transkription mehrerer Gene. Der Notch-Rezeptor selbst ist ubiquitär exprimiert. Die Expression seiner Liganden allerdings wird während der Flügelentwicklung verändert. So wird die Expression von *Ser* durch die Aktivität von *apterous* (*ap*) zunächst (mitte bis spätes zweites larvales Stadium) nur auf den dorsalen Teil der Flügelimaginalscheibe beschränkt, *Dl* dagegen wird ubiquitär exprimiert, mit erhöhten Expressionsniveau im ventralen Bereich (de Celis and Bray, 1997). Diese differentielle Verteilung wird mit Hilfe eines weiteren Regulationsmechanismus zur Polarisierung der Signalrichtung genutzt. Im dorsalen Bereich der Scheibe aktiviert *ap* neben *Ser* auch die Expression von *fringe* (*fng*). Fringe ist eine N-acetylglucosaminyltransferase welche O-gebundene Fucosereste auf spezifischen EGF-Repeats des Notch-Rezeptors modifiziert (Bruckner et al., 2000; Fortini, 2000; Munro and Freeman, 2000). Diese Fucose-Reste sind zuvor durch die Aktivität eines anderen Enzyms, der O-Fucosyltransferase I (*OFUT1*), an die EGF-Repeats angefügt worden und sind für die Bindung der Liganden essenziell (Lei et al., 2003; Okajima et al., 2003). Durch die von Fng vermittelten Modifikationen verändern sich die Bindungseigenschaften von Notch zu seinen Liganden. Es wurde ein inhibitorischer Einfluß auf die Bindung von Ser beobachtet, für Dl wurde hingegen eine gesteigerte Bindungsaffinität zu Notch berichtet (Bruckner et al., 2000; Fleming et al., 1997; Panin et al., 1997). Die inhibierende Wirkung auf Ser führt dazu, daß Ser nur in einer Richtung signalisieren kann, aus Fng exprimierenden Zellen in die ohne Fng-Aktivität, also aus dem dorsalen ins ventrale Kompartiment (Fleming et al., 1997; Klein and Arias, 1998b). Dl dagegen ist vorwiegend im ventralen Bereich angereichert und signalisiert von da aus in das dorsale Kompartiment (Doherty et al., 1996; Klein and Arias, 1998b). Durch diese Signale wird nun beiderseits der d/v Grenze die Transkription verschiedener Gene induziert, darunter die des *Notch*-Rezeptors nebst beider Liganden, sowie unter anderem auch der Gene *cut*, *vg* sowie *wingless* (*wg*). Die Expression dieser Gene führt zur Bildung von mehreren positiven und negativen Rückkopplungsschleifen, die die Aktivität des Notch-Signalweges und seine Restriktion auf den schmalen Streifen entlang der d/v Grenze bestimmen. In dem

frühen und mittleren dritten Larvenstadium stimuliert die Notch-Aktivität die Expression der eigenen Liganden und des Notch-Rezeptors. Ab Mitte des dritten Larvenstadiums und dem Beginn der *cut*-Expression verändert sich das Expressionsmuster an der d/v Grenze (Micchelli et al., 1997). Cut ist ein transkriptioneller Repressor (Jack and DeLotto, 1995) und mit seinem Auftreten sinken die Level der beiden Liganden in den beiden Zellreihen unmittelbar an der d/v Grenze. Neben *cut* führt die Notch-Aktivität zur Expression von *wg* im gleichen Bereich. Dieses Gen kodiert für ein sekretiertes Glykoprotein, das nach seiner Expression sich mehrere Zellumfänge weit von der d/v Grenze fortbewegen und in den in diesem Bereich liegenden Zellen seine Rezeptoren Frizzled und Arrow aktivieren kann (Bhanot et al., 1996; Seto and Bellen, 2004; Wehrli et al., 2000). In der unmittelbaren Umgebung der d/v-Grenze stimuliert Wg die Expression der beiden Liganden (de Celis and Bray, 1997; Micchelli et al., 1997). In diesen, nicht unmittelbar an der d/v Grenze liegenden Zellen, die infolgedessen hohe Konzentrationen der Liganden ansammeln, kommt nun ein weiterer Regulationsmechanismus zum Tragen, die sogenannte *cis*-Inaktivierung. Hohe Konzentrationen der Liganden sind hierbei in der Lage, den Notch-Rezeptor zellautonom zu inhibieren und somit die Signaltransduktion zu unterbinden (Micchelli et al., 1997).

Die Verbindung all dieser verschiedenen Regulationsebenen, aus Transkriptionskontrolle, Polarisierung der Signalrichtung und der *cis*-Inaktivierung führt im mittleren und späten dritten larvalen Stadium dazu, daß in den zwei Zellreihen unmittelbar an der d/v-Grenze eine hohe Aktivität des Notch-Signalweges festzustellen ist, während in den beiden Zellstreifen, die daran grenzen, hohe Konzentrationen der Liganden aber keine Notch-Aktivität messbar ist. Durch diese räumliche Restriktion der Notch-Aktivität auf einen zwei Zellen breiten Streifen trägt der Notch-Signalweg zur Etablierung, räumlicher Eingrenzung und Aufrechterhaltung der d/v Kompartimentsgrenze bei, die ferner, neben der bereits in der Embryogenese angelegten antero-posterioren Kompartimentsgrenze (Blair, 1995), als Organisationszentrum für die Flügelmorphogenese dient.

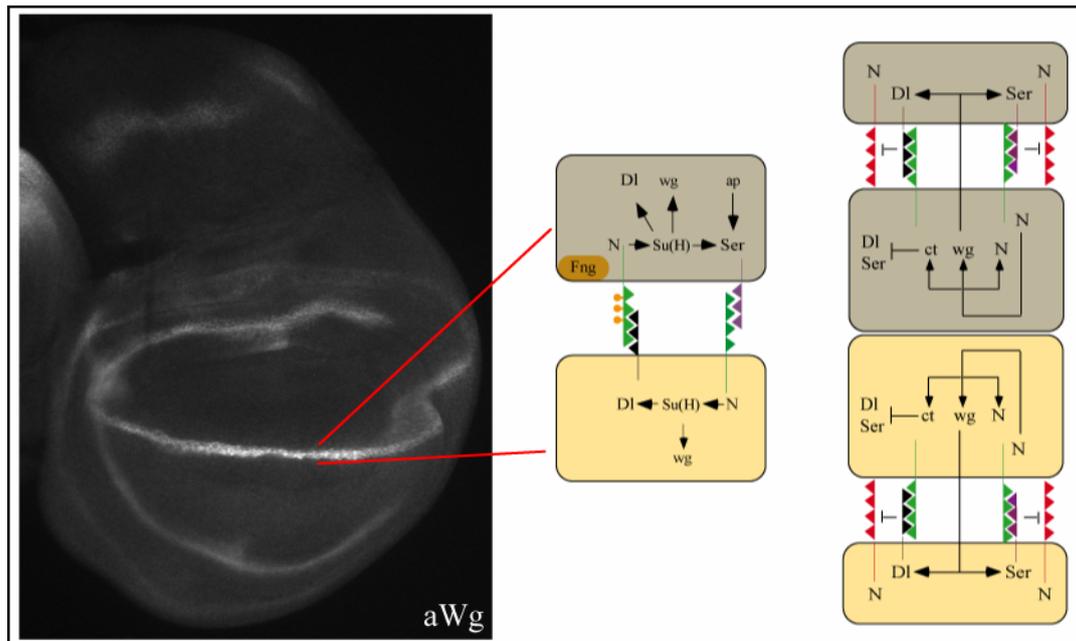


Abb.1.3: Rückkopplungs-Mechanismen regulieren die Notch-Aktivität an der d/v Kompartimentsgrenze der Flügelimaginalscheibe. Links eine wildtypische Scheibe, mit Antikörperfärbung der Wg-Expression, deren Regulation am d/v Streifen abhängig von der Notch-Aktivität ist. Rechts schematische Darstellung der Zellen an der d/v Grenze. Die Restriktion der Notch-Aktivität auf einen schmalen Streifen entlang der d/v Kompartimentsgrenze trägt entscheidend dazu bei, diese Zone als ein Organisationszentrum der Flügelentwicklung zu etablieren (de Celis et al., 1996). Die schematische Darstellung zeigt die Situation in dem frühen, dritten larvalen Stadium, in dem Notch noch die Transkription seiner eigenen Liganden stimuliert. Mit dem Beginn der Cut-Expression, mitte des dritten Larvenstadiums (rechts im Schema), inhibiert aber Cut die Expression der Liganden an der d/v-Grenze und stimuliert die von Wg, welches in den benachbarten Zellen wiederum die Expression der Notch-Liganden stimuliert.

Mit den oben beschriebenen Regulationsmechanismen läßt sich die Restriktion der Notch-Aktivität während der Flügelimaginalscheibenentwicklung jedoch nicht gänzlich erklären. So ist es bisher nicht geklärt, warum sich die Notch-Aktivität nicht von der d/v-Grenze aus ausbreitet. Neben den ausbalancierten Mengen an Rezeptor und Liganden, sowie den *cis*-Wechselwirkungen zwischen diesen scheint es noch weitere Mechanismen zu geben, die eine Ausbreitung verhindern, wie Mutanten zeigen, in denen statt der Restriktion eine Ausbreitung der Notch-Aktivität von der d/v Grenze aus zu beobachten ist. Ein Beispiel hierfür ist das Gen *nubbin*, bei dessen Ausfall die Cut und Wg-Expressions-Domäne verbreitert und die Aktivität des *vestigial boundary enhancer* (vgBE) erhöht ist, die Nubbin vermutlich normalerweise als Transkriptionsrepressor unterdrückt (Neumann and Cohen, 1998). vgBE und vgQE (*vestigial quadrant enhancer*) sind die beiden intronischen Enhancerelemente durch die die Vg-Expression während der larvalen Entwicklung gesteuert wird (Adams et al., 2000). Dabei ist die Expression von Vg über den vgBE von der Aktivität des Notch-Signalweges an der d/v Grenze abhängig und zusammen mit Wg für das Wachstum der Scheibe notwendig, es ist jedoch noch ungeklärt, auf welchem Wege diese Regulation stattfindet (Go et al., 1998; Klein

and Arias, 1999). Ähnlich verbreiterte Expressionsdomänen der Zielgene von Notch sind z.B. auch bei dem Ausfall von *lethal (2) discs* beobachtet worden, worauf später genauer eingegangen wird (Buratovich and Bryant, 1995; Klein, 2003). Ferner erschienen in letzter Zeit vermehrt Berichte über die Involvierung endozytotischer Prozesse bei sowohl positiver wie negativer Regulation der Notch-Aktivität, die im nächsten Kapitel zusammengefaßt werden.

1.2.2. Endozytose und Monoubiquitinierung

Endozytose und die anschließende Sortierung von Liganden wie Rezeptoren in spezifische endosomale Kompartimente spielen bei der Degradierung wie bei der normalen Signaltransduktion eine wichtige Rolle für die Funktion und Regulation verschiedener Signaltransduktionswege wie zB Notch, Decapentaplegic, Hedgehog, Wingless (Übersicht in (Di Fiore and De Camilli, 2001; Seto et al., 2002)). Hierbei stellt die Monoubiquitinierung der Signalrezeptoren einen der auslösenden Schlüsselmechanismen beider Prozesse dar, sowohl was ihre endozytotische Aufnahme wie auch ihre spätere Sortierung und Transport in die verschiedenen endosomalen Kompartimente anbetrifft (Hicke, 2001). Spezifisch zu dem Notch-Signalweg sind in der letzten Zeit mehrere Arbeiten erschienen, die die Bedeutung der Endozytose sowohl in der signalgebenden wie auch in der signalempfangenden Zelle aufzeigen (Übersicht in (Le Borgne, 2006)). Um diese Prozesse und Proteine näher vorzustellen, deren Beteiligung an endozytotischen Prozessen für die Notch-Aktivität notwendig oder regulierend ist, werden zunächst der Verlauf der Endozytose mit den dabei für die aufgenommene Fracht durchzulaufenden Kompartimenten vorgestellt.

Die endosomalen Kompartimente lassen sich zunächst grob in das frühe, sortierende Kompartiment, das lysosomale Kompartiment und das Wiederverwendungskompartiment (Recycling) einteilen (Seto et al., 2002). Die primären Vesikel entstehen in Eukaryonten auf mindestens zwei unterschiedlichen Wegen, die sich durch ihre Abhängigkeit oder Unabhängigkeit von Clathrin charakterisieren lassen, wobei nach dem initialen Entstehungsschritt die weitere Prozessierung der Vesikel häufig die gleiche zu sein scheint (Naslavsky et al., 2003; Sabharanjak et al., 2002; Sandvig and van Deurs, 2002). Für diesen ersten Schritt wird bei clathrinabhängiger Endozytose zunächst mit Hilfe verschiedener Adaptoren und akzessorischer Proteine an bestimmten Stellen der Zellmembran ein polygonales, flaches Gitter aus Clathrin angelegt. Dieses invaginiert (*clathrin coated pit/CCP*) und bildet nach der Abtrennung von der Plasmamembran, die Dynamin/Shibire-abhängig ist,

den primären, noch ummantelten Vesikel (*clathrin coated vesicle/CCV*) (Übersicht in (Le Borgne et al., 2005a; Mousavi et al., 2004) und Abb.1.4). Nach der Entfernung der Clathrin-Ummantelung fusioniert das primäre Vesikel mit anderen primären Vesikeln und bildet auf diese Weise das frühe sortierende Endosom, bzw. bindet direkt an dieses, falls es bereits besteht. Ursprünglich wurde angenommen, daß an dieser Stelle zuerst sämtliche endozytierte Fracht unspezifisch deponiert und anschließend, je nach Bestimmung, zum Abbau oder Recycling weitergeleitet wird (Goldstein et al., 1985; Mellman, 1996; Yamashiro and Maxfield, 1987). Neue Erkenntnisse legen nahe, daß diese Sortierung zumindest teilweise bereits vor diesem Schritt stattfindet und das frühe Endosom aus zwei Teilpopulationen bestehen könnte. Dieses wären eine schnell reifende und dynamische Fraktion, die die zum Abbau vorbestimmte Ladung schnell den Lysosomen zuführt und ferner eine andere, größere Population, die eher statisch ist, nicht-selektiv was die Fracht anbetrifft, und deren Reifung langsamer verläuft (Lakadamyali et al., 2006). Ob nun in der statischen oder der dynamischen Fraktion, beide Typen der frühen Endosomen assoziieren mit dem Rab5-Protein, welches somit als Marker für dieses Kompartiment benutzt werden kann.

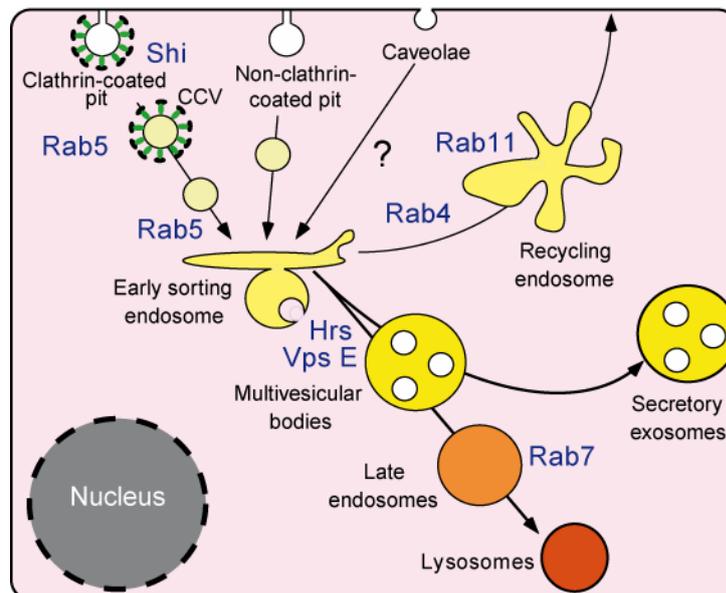


Abb.1.4: Übersicht zur Endozytose. Das primäre Vesikel assoziiert (nach Ablegen der Clathrin-Ummantelung) zunächst mit dem frühen, sortierenden Endosom. Von da aus stehen prinzipiell zwei Wege offen: zur Wiederverwertung/Recycling oder zum Abbau über das Lysosom. Für die Prozessierung entlang eines bestimmten Weges ist die Funktion der bestimmter Proteine (hier in blauer Farbe gekennzeichnet) notwendig, die sich auch hervorragend als Marker der einzelnen endosomalen Kompartimente eignen. Übernommen und verändert aus (Le Borgne et al., 2005a)

Rab5 ist ein Mitglied der Rab-Familie kleiner Ras-artigen GTPasen und vermittelt in frühem Endosom mit EEA1 (*early endosome antigen 1*) und einigen anderen Effektoren die Fusion

der primären Vesikel (Lawe et al., 2002; McBride et al., 1999). Rab-Proteine spielen in verschiedenen Bereichen der Endozytose eine Rolle und lassen sich dort verschiedenen Kompartimenten zuordnen. So sind Rab4 und Rab11 an den Recycling-Vorgängen aus dem frühen endosomalen Kompartiment zurück an die Zellmembran beteiligt (Übersicht in (Maxfield and McGraw, 2004)). Rab7 hingegen markiert Vesikel, deren Inhalt der Degradation in den Lysosomen zugeführt wird. Die Übergänge zwischen den endozytotischen Kompartimenten werden durch eine dynamische Konversion der an die Vesikel bindenden Rab-Proteine begleitet, wie kürzlich für Rab5 und Rab7 gezeigt wurde (Rink et al., 2005). Die frühen Vesikel nehmen zunächst an Größe und Rab5-Assoziation zu, während sie sich von der Zellperipherie ins Zellinnere bewegen. Im Übergang zu dem spätendosomalen Kompartiment akkumulieren die Vesikel in einem dynamischen Prozeß Rab7 und verlieren gleichzeitig Rab5 von ihrer Membran (Rink et al., 2005). An dieser Reifung der frühen Endosomen und der Sortierung ubiquitiniertes Ladung zur Degradation ist Hrs (*hepatocyte-growth-factor-regulated tyrosine kinase substrate*) beteiligt. Es erkennt ubiquitinierte Ladung, isoliert es in clathrinenthaltenden Mikrodomänen der Endosomen und rekrutiert dorthin Proteine der ESCRT Komplexe (*endosomal sorting complex required for transport*) (Bache et al., 2003b; Katzmann et al., 2003; Lu et al., 2003; Pornillos et al., 2003) über die es, zumindest indirekt, diese Ladung den sogenannten *multivesicular bodies* (MVBs) zuführt (Bache et al., 2003b; Lloyd et al., 2002). MVBs bilden damit eine Transportzwischenstufe zwischen dem frühen und dem späten Endosom auf dem Weg zum Lysosom (Übersicht in: (Gruenberg and Stenmark, 2004)). Die an ihrer Bildung und in die ubiquitinabhängige Proteinsortierung beteiligten Proteine werden zusammengefaßt als Klasse E Vps-Proteine (*vacuolar protein sorting*) so benannt und eingeteilt nach der Ähnlichkeit ihres primären Ausfallphänotyps in der Hefe (Hurley and Emr, 2006). Das Lysosom stellt dann die letzte Station der Endozytose dar und bildet die Umgebung, in der die Ladung degradiert wird.

Betrachtet man nun die Rolle der Endozytose für den Notch-Signalweg, so wird eine funktionierende Endozytose für die Signaltransduktion zunächst global benötigt. Dies ist bei Mutanten für das Drosophila Homolog von *dynamamin* – *shibire* zu sehen, in denen sowohl auf der signalgebenden wie der signalempfangenen Seite, durch die Verhinderung der Vesikelinternalisierung, die ligandenabhängige Aktivierung von Notch verhindert wird (Poodry, 1990; Seugnet et al., 1997). Spezifischere Prozesse sind dann jeweils nur in einem Teil der kommunizierenden Zellen involviert.

So wird in der signalgebenden Zelle die Aktivität von einer der E3-Ubiquitinligasen des RING-Domänentypus, Neuralized (Neur) oder Mindbomb (Mib) zusammen mit Liquid facets, dem *Drosophila* Homolog von Epsin, für die Aktivierung von Notch in den Nachbarszellen benötigt (Overstreet et al., 2004; Wang and Struhl, 2004; Wang and Struhl, 2005). Dabei scheint die Tätigkeit dieser Ubiquitinligasen, die in unterschiedlichen Entwicklungsvorgängen in der Fliege eingesetzt werden, und die von ihnen induzierte, Epsin-spezifische Endozytose der Liganden zumindest regulierend, wenn nicht obligatorisch zu sein, um den Notch-Rezeptor zu aktivieren (Le Borgne et al., 2005b; Wang and Struhl, 2005).

In den signalempfangenden Zellen wiederum fand man eine ganze Reihe von Proteinen, die an den Übergängen zwischen verschiedenen endosomalen Kompartimenten den Transport und die Aktivität des Notch-Rezeptors beeinflussen. Direkt am Anfang der Endozytose wird *Avalanche* benötigt. *Avalanche*, ein vermutliches Mitglied der Syntaxin-Familie, vermittelt die initialen Fusionsvorgänge beim Übergang in das frühe Endosom (Lu and Bilder, 2005). Der Ausfall von *avalanche* führt zu einer Akkumulation von Notch an der Zellmembran und zur Bildung neoplastischer Tumoren, die aber wohl unabhängig von der Notch-Aktivität ist, da diese in den Mutanten nicht erhöht ist. Sehr ähnliche Phänotypen finden sich auch in *rab5* mutanten Zellen. Die Notch-Konzentration an der Zelloberfläche erhöht sich und es kommt ebenfalls zur starken neoplastischen Wucherungen des mutanten Gewebes (Lu and Bilder, 2005). Da beide Proteine an der Bildung der frühen Endosomen beteiligt sind, zeigt dies, daß die Endozytose notwendig ist, um die Notch-Konzentration an der Zellmembran zu kontrollieren und den Transport des Rezeptors zur Degradation in den Lysosomen zu gewährleisten. Es wird angenommen, daß auch Notch über die MVBs zum Abbau transportiert wird. Notch kolokalisiert in Vesikeln mit Hrs in *Drosophila* (Wilkin et al., 2004) und in *hrs*-Zellen akkumuliert Notch neben anderen Rezeptoren (wie z.B. für EGF, Hedgehog und DPP) im endosomalen Kompartiment (Jekely and Rorth, 2003), was allerdings bei Notch im Unterschied zum EGF-Rezeptor zu keiner Überaktivierung des Notch-Signalweges führt (Lu and Bilder, 2005). Hrs erkennt die Fracht, die es den MVBs zuführt anhand ihrer Monoubiquitinierung. Die Identität der für die Monoubiquitinierung von Notch verantwortlichen Ubiquitinligase ist noch nicht festgestellt, allerdings wurden Mitglieder der *Drosophila* Nedd4-Familie von E3-Ubiquitinligasen des HECT-Domänentypus, Nedd4 und Suppressor of Deltex (Su(dx)) als negative Regulatoren der Notch-Aktivität gezeigt (Mazaley et al., 2003; Sakata et al., 2004; Wilkin et al., 2004). Deren Aktivität löst die Endozytose von Notch aus, wodurch der Rezeptor der lysosomalen Degradation zugeführt wird. Sie sind somit möglicherweise direkt oder indirekt für diese Funktion verantwortlich. Deltex

(Dx) eine weitere Ring-Domänen Ubiquitinligase stimuliert ebenfalls die Endozytose des Rezeptors, scheint aber eine ambivalente Rolle zu haben. Einerseits soll Dx eine den beiden (Nedd4/Su(dx)) entgegengesetzte Rolle als ein positiver Regulator der Notch-Aktivität spielen, wengleich auch hier der Mechanismus bis jetzt nicht aufgeklärt ist (Hori et al., 2004; Matsuno et al., 2002). Andererseits wurde kürzlich gezeigt, daß Dx zusammen mit Kurtz (Krz), dem einzigen *Drosophila*-Homolog non-visueller β -Arrestine, wahrscheinlich über die Vermittlung einer Polyubiquitinierung des Notch-Rezeptors dessen proteasomale Degradation fördert. (Mukherjee, 2005)

Wie wichtig die Bildung und die richtige Prozessierung der MVBs für die Regulation der Notch-Aktivität sind, zeigen mehrere Arbeiten über die an diesen Prozessen beteiligten Proteine. Wie oben erwähnt, rekrutiert Hrs die Proteine der ESCRT-Komplexe zu der für die MVBs vorbestimmten Fracht. Erupted (Fliegen-Ortholog von Vps23/Tsg101 (Hefe/Vertebrate)) und Vps25 stellen zwei solcher Proteine dar, die Mitglieder der ESCRT Komplexe I und II sind (Hurley and Emr, 2006). Deren Ausfall in der Fliege führt zu einer endosomalen Akkumulation von Notch und erhöhter Aktivität des Notch-, und anderer Signalwege, die mit der Bildung von neoplastischen Tumoren einhergeht und zum Tod der betroffenen Tiere während der larvalen Entwicklung führt (Moberg et al., 2005; Thompson et al., 2005; Vaccari and Bilder, 2005).

Endozytose wird also sowohl zur Signalübertragung wie auch zur Kontrolle des Notch-Signalweges benötigt, wobei ein stetiger Zu- und Abfluß der signalübertragenden Proteine zur Zellmembran und deren geordneter Transport zum Abbau gewährleistet sein muß (Le Borgne et al., 2005a; Wilkin and Baron, 2005), um eine Fehlfunktion mit desaströsen Folgen für den Organismus zu verhindern.

Anlaß zu der vorliegenden Arbeit waren zwei Fragestellungen innerhalb des Themenkomplexes um die Regulation der Notch-Aktivität, die nachfolgend näher dargelegt werden.

1.3. Projekt I – Lethal (2) giant discs

Vor etwa 30 Jahren ist eine Mutation zum ersten Mal beschrieben worden, deren Phänotypen in den weiteren Untersuchungen immer mehr eine Beteiligung des betroffenen Gens als negativer Regulator des Notch-Signalweges nahelegten. Tiere homozygot mutant für *lethal (2) giant discs (lgd)* sterben während der pupalen Phase, die sie jedoch mit deutlicher

Verzögerung gegenüber wildtypischen Larven erreichten. Die mutanten Larven sind lang und aufgebläht und ihre Imaginalscheiben sind stark vergrößert (Bryant and Schubiger, 1971). Die stark verbreiterte Expression von Zielgenen des Notch-Signalweges, wie Wg (siehe Abb.1.5), Vg und Cut in den Imaginalscheiben ((Buratovich and Bryant, 1995; Klein, 2003) und eigene Beobachtungen) deutet auf eine erhöhte Notch-Aktivität hin, da sie in ähnlicher Form auch in überaktiven *Notch*-Allelen der *Abruptex*-Klasse oder bei der Überexpression von *Nintra* zu beobachten ist. Bei diesen kommt weiterhin, wie im Falle der *lgd*-Mutanten, ebenfalls eine starke Überproliferation des Flügeltgewebes vor (de Celis and Bray, 2000). Den Eindruck einer Involvierung in den Notch-Signalweg bestätigten Experimente, die zeigten, daß die Effekte der *lgd*-Mutation abhängig von der Funktion der Mitglieder des Notch-Signalweges wie *Psn* oder *Su(H)* sind. So ist in *lgd; Psn* doppelt mutanten Scheiben die Expression von Wg und die Überproliferation des Flügeltgewebes unterbunden (Klein, 2003). Die Beteiligung von *Lgd* an der Regulation der Notch-Aktivität muß zudem genereller Natur sein, da verschiedene andere Entwicklungsprozesse neben der Flügelentwicklung, wie z.B. die Entwicklung der Flügelvenen oder der Augen betroffen waren (Klein, 2003)

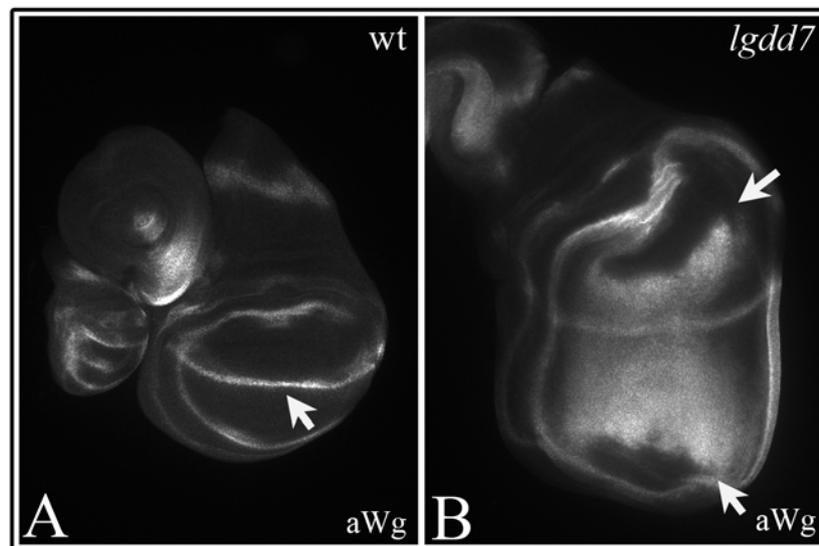


Abb.1.5: Expansion der Wg-Expression in *lgd*-Mutanten Flügelimaginalscheiben. Die wildtypische Expression von Wg ist auf einen schmalen Streifen entlang der d/v Kompartimentsgrenze beschränkt (Pfeil in **A**). In *lgd* mutanten Tieren kann man dagegen als ein Anzeichen der gesteigerten Notch-Aktivität eine Verbreiterung der Wg-Expressionsdomäne beobachten (Pfeile in **B**).

Das Ziel dieser Arbeit war es, die weitere Charakterisierung von *Lgd* und somit die Aufklärung des Mechanismus voranzutreiben, durch welchen *Lgd* die Aktivität des Notch-Signalweges negativ reguliert und sie auf die d/v Grenze beschränkt. Daher sollte zunächst das Gen kloniert und molekular charakterisiert werden. Hiernach sollte es als Transgen in die Fliege wiedereingebracht, dort mittels des GAL4-Systems im Wildtyp überexprimiert und die

dadurch hervorgerufenen Phänotypen charakterisiert werden. Für eine genauere Analyse sollten dann Deletionskonstrukte hergestellt und ebenfalls mit Hilfe des GAL4-Systems in der Fliege exprimiert werden. Die Analyse der Deletionskonstrukte sollte im wildtypischen und im mutanten Hintergrund stattfinden und zur Identifikation der für die Lgd-Funktion essenziellen Domänen beitragen.

1.4. Projekt II – *cis*-inhibitorischer Effekt der Notch-Liganden

Wie bereits beschrieben, führt eine hohe Konzentration der Liganden zur zellautonomen Inaktivierung des sich auf der gleichen Zelle befindenden Rezeptors (in *cis*). Dieses stellt der aktivierenden Bindung in *trans* einen entgegengesetzt anderen Weg zur Regulation der Rezeptor-Aktivität durch die Liganden zur Seite. Für diese inhibitorische Wechselwirkung gibt es bis jetzt kaum Hinweise auf den zugrundeliegenden Mechanismus. Eine Arbeit zeigte vor kurzem, daß die *cis*-Inaktivierung möglicherweise auf einer direkten Interaktion zwischen den Liganden und dem Rezeptor beruhen könnte, da es bei Überexpression von beiden in Hühnerzellen zu einer zellautonomen Bildung heterodimerer Komplexe zwischen dem Rezeptor und den Liganden kommt (Sakamoto et al., 2002). Allerdings gibt es noch keinen direkten Hinweis, daß diese Komplexbildung wirklich an der zellautonomen Inhibierung des Notch-Rezeptors beteiligt ist, noch liegen Erkenntnisse über die dafür verantwortlichen Proteindomänen der Liganden vor.

Um den *cis*-inhibierenden Mechanismus näher aufzuklären sollte in dieser Arbeit die Tatsache genutzt werden, daß in Säugetieren anstelle von nur einem Delta-Protein in *Drosophila* gleich drei Delta-artige Liganden (Delta-likes/DLLs) neben zwei Serrate-Orthologen, den Jagged-1 und Jagged-2 (Jag) Proteinen, existieren. Diese unterscheiden sich von Dl und Ser in ihrer Sequenz und Struktur, z.B. was die Anzahl der EGF-Motivwiederholungen anbetrifft (Siehe Ergebnisse II, Abb.3-1). Einen zusätzlichen Unterschied zwischen einigen Liganden aus den Vertebraten (DLL1 und DLL4) und den Liganden in *Drosophila* stellt am C-Terminus, durch die Peptidsequenz IATEV, das Vorhandensein einer PDZ-Domäne dar. Über diese PDZ-Domäne können DLL1 und DLL4 in den Vertebraten mit MAGI-Proteinen (MAGUK proteine mit invertiertem Domänenarrangement) interagieren. Es ist noch nicht vollkommen klar, wozu diese Interaktion dient. MAGUK und MAGI Proteine nehmen häufig am Aufbau intrazellulärer

Multiproteinsignalkomplexe teil, allerdings scheint diese Interaktion keinen Einfluß auf die klassische Delta-Notch Signalübertragung zu haben (Pfister et al., 2003; Wright et al., 2004). Der C-Terminus von DI unterscheidet sich stark von dem der Vertebraten und enthält soweit man weiß kein vergleichbares Motiv (Wright et al., 2004).

Weiter zeigen die unterschiedlichen Liganden in den Vertebraten teilweise Überlappung, teilweise aber auch Unterschiede in ihren Expressionsmustern und den Mutations-Phänotypen (Cormier et al., 2004; Dunwoodie et al., 2002; Kusumi et al., 2004; Zhang et al., 2002), was zusammengenommen mit ihren strukturellen Unterschieden die Möglichkeit offenläßt, daß die Notch-Liganden aus den Vertebraten auch funktionelle Unterschiede in der Wechselwirkung mit den Rezeptoren aufweisen, in Form (im für diese Arbeit idealen Fall) einer Trennung oder einer unterschiedlich starken Ausprägung der aktivierenden und inhibitorischen Funktion in den verschiedenen Liganden. Diese potentielle Eigenschaft könnte sich dann umso stärker offenbaren, führte man die orthologen Liganden in die Fliege ein, wo ihnen nur ein Rezeptortyp gegenüber den vier verschiedenen in den Ursprungsorganismen zur Verfügung stünde.

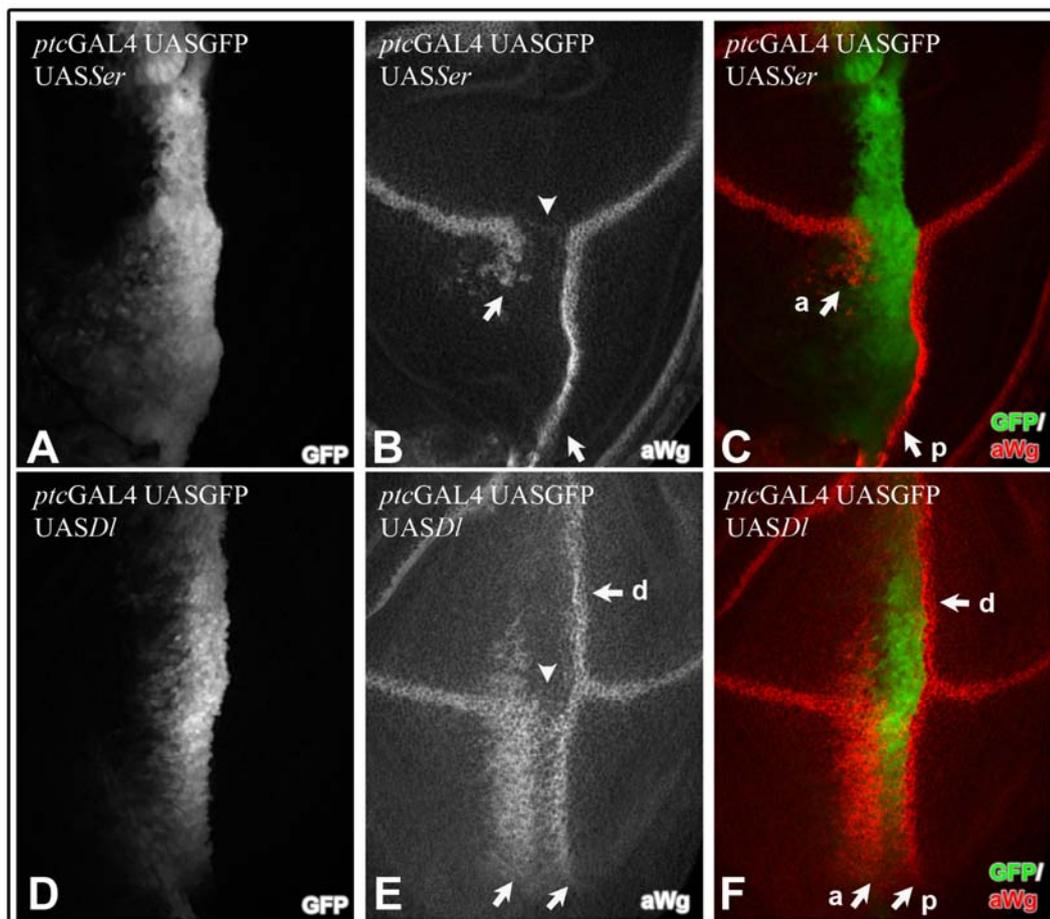


Abb.1.6: Der *cis*-inhibierende Effekt der Notch-Liganden Delta und Serrate. Entlang der antero-posterioren Grenze der Flügelimaginalscheibe wurden Serrate (A-C) oder Delta (D-F) exprimiert. Die Expressionsdomäne ist durch GFP (A, D) wiedergegeben, das ebenfalls im gleichen Muster exprimiert wurde. Dabei zeigt sich, daß

die Notch-Liganden den Rezeptor nicht in allen Bereichen der Expression aktivieren können. Vielmehr findet die Aktivierung in den Zellen benachbart an die Expressionsdomäne (p-Pfeil in **C** und **F**) und anterior teilweise überlappend mit der Expressionsdomäne (a-Pfeil). Inmitten der Expressionsdomäne, wo die höchsten Mengen der Liganden exprimiert werden (das Expressionssystem wird später noch genauer vorgestellt) kommt es zellautonom zur sogenannten *cis*-Inhibition des Rezeptors durch die Liganden (Pfeilspitzen in **B** und **E**).

Im ersten Schritt der Untersuchung sollten also die Liganden-Orthologen aus den Vertebraten als induzierbare Transgene in die Fliege eingeführt und dort durch Expression auf aktivierende und inhibitorische Wechselwirkungen mit dem endogenen Notch-Rezeptor untersucht werden. Zeigten sich hierbei funktionelle Unterschiede der Orthologen untereinander oder zur vergleichbaren Überexpression von Delta, so sollten zur sukzessiven Eingrenzung der dafür verantwortlichen Proteindomänen Hybridproteine erzeugt werden, die zunächst die intra- und die extrazellulären Bereiche der Orthologen mit den entsprechend ergänzenden Bereichen aus der Fliege neu kombinierten. Diese Hybridkonstrukte sollten dann in gleicher Art auf Wechselwirkungen mit Notch untersucht werden wie die ursprünglichen Proteine, um einer eventuellen Trennung der aktivierenden und der inhibierenden Funktion auf den Rezeptor, auf die jeweiligen Proteindomänen nachzuspüren.

2. Ergebnisse Projekt I

Frühere Beobachtungen (Buratovich and Bryant, 1995; Klein, 2003) legten den Eindruck nahe, daß mit Lgd ein neuer, genereller Regulator der Notch-Aktivität in der Entwicklung von *Drosophila melanogaster* gefunden wurde. Um diesen Eindruck zu überprüfen und gegebenenfalls zu bestätigen sollte als Grundlage für eine weitere Charakterisierung der Funktion von *lgd* das *lgd*-Gen kartiert und molekular charakterisiert werden. Dem sollte eine nähere Funktionsanalyse von *lgd* in Überexpressionsexperimenten sowie, zur Identifikation der für die Funktion des Proteins wichtigen Proteindomänen, eine Analyse der Funktion von Deletionskonstrukten folgen.

2.1. Kartierung von lethal (2) giant discs

2.1.1. Meiotische Rekombination

Durch vorangegangene Experimente ist die zytologische Lokalisierung von *lgd* auf den linken Arm des Chromosoms 2 in der Region 32D1 – 32D4 (Bryant and Schubiger, 1971) bestimmt worden. Als erster Ansatz, um diese Lokalisierung zu bestätigen und gegebenenfalls weiter einzuengen, wurde eine meiotische Kartierung durchgeführt. Diese wurde mittels zweier, zum Beginn dieser Arbeit für diese Region verfügbaren, über den *lgd*-Allelen komplementierenden, letalen P-Element Insertionen *l(2)k15817* und *l(2)k13807* (markiert mit 3 und 9 in Abb.2.1), und dem *lgd^{kl7}* Allel vorgenommen.

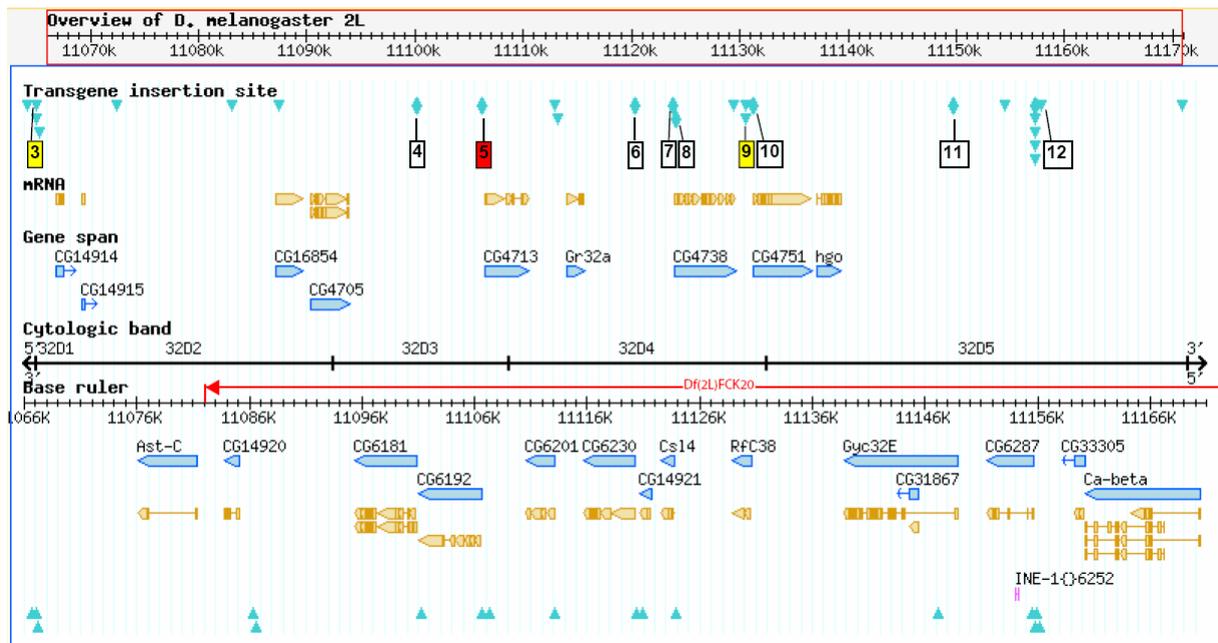
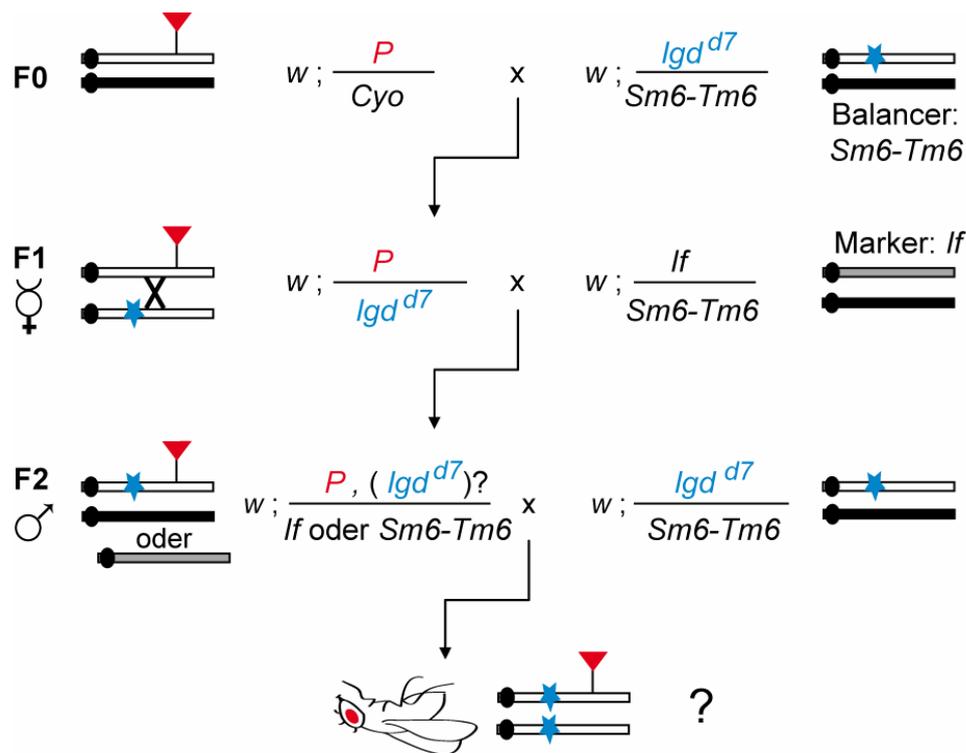


Abb.2.1: Karte der genomischen Region 32D übernommen und verändert von der FlyBase Webseite (<http://www.flybase.org>). Untersuchte P-Element Insertionen sind mit Zahlen gekennzeichnet entsprechend Tab. 2-2. Gelbe Markierungen kennzeichnen die beiden für die meiotische Rekombination benutzten P-Element Insertionen. Bioinformatisch vorhergesagte (CG+Nummer) Gene sind dargestellt mit blauen Pfeilen, ihre Transkripte mit Exon/Intronstruktur darunter bzw. darüber. Die Ausdehnung der *Df(2L)FCK20* Defizienz mit ihrem 5' Ende zwischen den Genen *Ast-C* und *Cg14920* wurde mit einer roten Linie wiedergegeben.

Der Versuchsablauf und die daraus resultierenden Ergebnisse sind in Abb.2.2 zusammengefaßt. Rekombination zwischen dem P-Element und dem *lgd*-Locus wurde bei Letalität über dem *lgd^{d7}* Allel festgestellt.

Die Rekombinationsfrequenz hängt nicht nur von der Entfernung zwischen den untersuchten Markern, sondern auch von der chromosomalen Region ab, auf der diese und die gesuchte Mutation sich befinden. So finden Rekombinationsereignisse vielfach seltener in der Nähe der Telomere und Centromere statt, als in Regionen inmitten eines chromosomalen Arms (Adams et al., 2000; True et al., 1996). Die Variabilität der Rekombinationshäufigkeit innerhalb kurzer Intervalle (<500kb) scheint ebenfalls sehr regionabhängig zu sein, wobei man sowohl Gebiete mit stark erhöhter (hot spots) wie auch welche mit erniedrigter Rekombinationshäufigkeit (cold spots) fand (Nairz et al., 2002; Zhai et al., 2003). Es ist deswegen nicht möglich, aus der erhaltenen Rekombinationsfrequenz exakte Angaben über die molekulare Entfernung der P-Elemente von der *lgd*-Mutation abzuleiten. Wird ein durchschnittlicher Wert für die Rekombinationsfrequenz herangezogen, ergibt sich in



P-Element Insertion	F2 Einzelkreuzungen	Nicht rekombinant	Steril	Rekombinant	Rekombinationsfrequenz (%)
<i>l(2)k15817</i>	1056	917	138	1	0,095
<i>l(2)k13807</i>	1090	1004	85	1	0,092

Abb.2.2: Übersicht zur meiotischen Rekombination der P-Insertionen *l(2)k13807* und *l(2)k15817* mit *lgd^{d7}*. Der Chromosomarm 2L wurde schematisch dargestellt mit der *lgd*-Mutation als blauem Stern und der P-Element Insertion als rotem Dreieck. Über der Tabelle das Kreuzungsschema zur meiotischen Rekombination, in der Tabelle zusammengefasst die Anzahl der F2-Einzelkreuzungen und die Rekombinationshäufigkeit.

Annäherung dennoch ein Bereich von etwa 50-100kb entsprechend der gefundenen genetischen Distanz von etwa 0.1cM (Zhai et al., 2003), von jeder Insertion aus. Die Entfernung der beiden Insertionen von 65kb einbezogen, ergibt sich hieraus für die Lokalisation des Gens *lgd* in der vermuteten Region 32D1-32D4, ein die beiden P-Element Insertionstellen umschließender Bereich von etwa 150bp, als der wahrscheinlichste.

Nachdem in Rahmen dieser Arbeit die für *lgd* kodierende Geneinheit bereits ermittelt worden war, erschien eine Publikation (Zhai et al., 2003), die genauere Rückschlüsse aus der genetischen auf die molekulare Distanz zwischen den untersuchten Markern zu ziehen erlaubte. Um die mit anderen Methoden gefundene Lokalisation von *lgd* zu bestätigen und die neuen Berechnungsmethoden für eventuelle künftige Anwendungen zu testen, wurde die

in der Abb.2.3 vorgestellte Kalkulation mit den Ergebnissen der oben beschriebenen Rekombination durchgeführt. Die so errechnete molekulare Distanz beträgt etwa 32kb von der Insertionsstelle von *l(2)k15817* und fällt somit in die Transkriptionseinheit CG6181, was der tatsächlichen genomischen Lokalisation von *lgd*, wie später noch gezeigt wird, sehr nahe kommt.

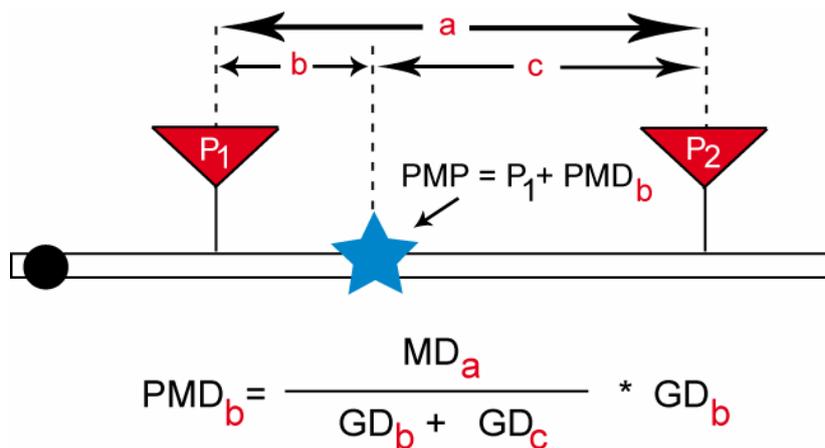


Abb.2.3: Kalkulation der projizierten molekularen Position. Mit $P1=l(2)k15817$ und $P2=l(2)k13807$, die Molekulare Distanz zwischen den beiden P-Elementen beträgt $\text{MD}_a=65\text{kb}$. Übernommen und verändert aus Zhai et al. (2003)

- PMP: Projizierte Molekulare Position in Basenpaaren [bp]
- PMD: Projizierte Molekulare Distanz in Basenpaaren [bp]
- MD: Molekulare Distanz in Basenpaaren [bp]
- GD: Genetische Distanz in centiMorgan [cM]

2.1.2. Kartierung der Defizienz *Df(2L)FCK-20*

Zur weiteren Einengung der *lgd* enthaltenden Region wurde das 5'-Ende der Defizienz *Df(2L)FCK-20* (Barrio et al., 1999) näher bestimmt, die, wie eine Komplementationsanalyse zeigte, den *lgd*-Lokus umfängt. Zu diesem Zwecke wurden Primerpaare generiert, mit denen Fragmente genomischer DNA amplifiziert werden konnten, durchgehend von dem Locus des bioinformatisch vorhergesagten Gens *CG14914* bis zum kartierten 3'-Ende der Defizienz in der Region kodierend für das Gen *Spalt-related*. Da die Defizienz *Df(2L)FCK-20* in Homozygotie embryonal letal ist, wurde die Defizienz über ein Chromosom mit einer *KrpGFP*-Insertion gekreuzt. *FCK20* homozygote Embryonen (keine GFP-Fluoreszenz) wurden dann gesammelt und die PCR-Reaktionen mit der daraus gewonnenen DNA durchgeführt (*single embryo PCR*, siehe Material und Methoden). Hierbei ergab sich, durch ein Fehlen entsprechender PCR-Produkte, ein 5'-Ende der Defizienz zwischen den Genen *Ast-C* und *CG14920* (siehe Abb.2.1), womit die Region vor der Transkriptionseinheit *CG14920* als potentieller *lgd*-Lokus ausschied (siehe Material und Methoden, sowie Anhang1.)

2.1.3. Komplementationsanalyse mit P-Element Insertionen

Zum Beginn der Untersuchung standen nur zwei letale P-Element Insertionen in der Region 32D zur Verfügung. Beide (3 und 9 in der Tabelle 2.2) wurden wie in Abschnitt 1.1.1 beschrieben zur genetischen Kartierung des *lgd*-Lokus benutzt. Später verfügbare letale P-Element Insertionen wurden sukzessive auf Komplementation mit der *lgd* Mutation untersucht. Eine Übersicht der untersuchten P-Insertionen und die Ergebnisse der Komplementationsanalyse gegen die verfügbaren *lgd*-Allele sind in der Tabelle 2.2 wiedergegeben. Die Linie *l(2)SH0495* komplementierte als einzige nicht gegen die *lgd*-Allele.

	Bezeichnung	Insertionslokus	Komplementation
1	B14219	vor 14914	Ja
2	B13362	vor 14914	Ja
3	<i>l(2)k15817</i>	vor 14914	Ja
4	B14124	CG6181	Ja
5	<i>l(2)SH0495</i>	CG4713	Nein
6	B13333	CG6230	Ja
7	B13418	Csl4	Ja
8	<i>l(2)SH2055</i>	CG4738	Ja
9	<i>l(2)k13807</i>	CG6258	Ja
10	<i>l(2)SH1134</i>	CG4751	Ja
11	B14137	Gyc32E	Ja
12	B13271	CG6287	Ja
13	B11362	VM32--CG4788	Ja
14	B12433	nahe CG4788	Ja
15	B14201	CG4807(<i>ab</i>)	Ja
16	<i>l(2)SH0770</i>	CG4807(<i>ab</i>)	Ja
17	B10680	CG 32831	Ja

Tab. 2.2: Übersicht zur Komplementationsanalyse mittels der in Abb.2- angezeigten P-Element Insertionen 1 und 2 sowie 12-17 liegen am Anfang der Region 32D1 bzw. in der Region 32E1 und werden übersichtshalber nicht angezeigt.

2.1.4. Analyse der P-Element Insertionslinie *l(2)SH0495*

Die nicht komplementierende Insertionslinie *l(2)SH0495* wurde anschließend phänotypisch auf Anzeichen einer Überaktivierung des Notch-Signalweges hin genauer untersucht, wie sie auch bei *lgd*-Mutanten vorkommen. Die im Folgenden berichteten Beobachtungen beziehen sich auf homozygote Träger der Insertion, heterozygote Tiere wiesen keine Auffälligkeiten auf.

Die Tiere starben zumeist während der pupalen Phase. Einzelne geschlüpfte Exemplare zeigten massive Probleme in der Bewegungsablauf und -koordination und verendeten innerhalb kurzer Zeit. Adulte Organe und larvale Organanlagen wiesen verschiedene Entwicklungsdefekte auf, die allesamt auf eine leichte Überaktivierung des Notch-Signalweges hindeuten (fehlende Mikrochaeten in Abb.2.5 B-C und zusätzliche Beingelenke

in H). Diese Phänotypen waren in gesteigerten Ausmaß in Transheterozygotie über der *Df(2L)FCK20* Defizienz oder über dem amorphen *lgd^{d7}*-Allel (Klein, 2003) zu beobachten (Abb.2.5), was zusammen mit anderen Beobachtungen, über die in nachfolgenden Kapiteln berichtet wird, darauf hindeutet, daß mit der *l(2)SH495*-Insertion ein neues *lgd*-Allel erzeugt worden ist. So war in den transheterozygoten Tieren die Wingless (Wg) Expression in leichtem Ausmaß ektopisch um den Streifen an der d/v Grenze in der Flügelimaginalscheibe zu sehen (Abb.2.4 B1). Dies ist (allerdings in viel stärkeren Maße,-siehe: Abb.2.4 C1) eine typische Beobachtung in *lgd* Mutanten (Buratovich and Bryant, 1995; Klein, 2003), Trägern überaktiver Notch Allele der *Abruptex* Klasse (de Celis and Bray, 2000), oder eine Folge der Expression des aktivierten, intrazellulären Teils von Notch, Nintra (de Celis and Bray, 2000; Lawrence et al., 2000).

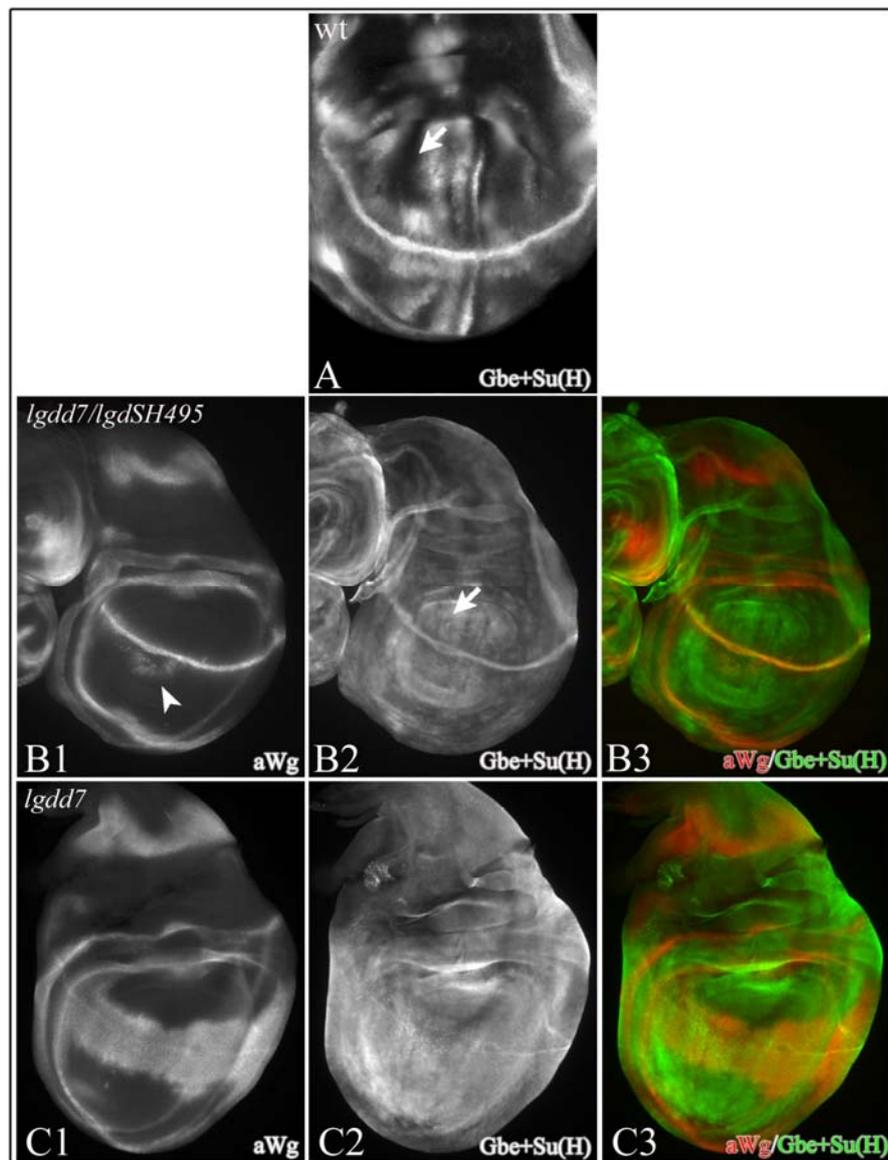


Abb.2.4: Die P-Element Insertion *l(2)SH0495* zeigt transheterozygot über dem amorphen *lgd^{d7}* Allel Phänotypen einer schwachen Überaktivierung des Notch-Signalweges. Wg-Expression (Pfeilspitze in **B1**) ist ektopisch um die d/v-Kompartimentsgrenze zu sehen, allerdings in schwächeren Ausmaß als das in

Flügelimaginalscheiben *lgd^{d7}*-homozygoter Tiere der Fall ist (**C1**). Das Gbe+Su(H)m8-Konstrukt, das als Indikator der Notch-Aktivität β -Galaktosidase exprimiert, zeigt in Vergleich zu einer wildtypischen Flügelimaginalscheibe (in **A**) ubiquitäre Expression in der transheterozygoten (**B2**), wie in der *lgd^{d7}*-homozygoten Situation (**C2**). In beiden Fällen (**B2,C2**) ist der Notch-Signalweg also auch in Bereichen der Scheibe aktiv, in denen keine Aktivität in wildtypischen Scheiben detektierbar ist (Pfeil in **A** und **B2**). Die Linie *l(2)SH0495* stellt also (unter Einbeziehung der im Weiteren gezeigten Phänotypen) ein schwaches Allel von *lgd* dar. Visualisierung: Antikörperfärbungen gegen Wg (aWg), und gegen β -Galaktosidase (Gbe+Su(H))

In den adulten Strukturen fehlten Makro- und Mikrochaeten auf dem Thorax (Abb.2.5 D) zu deren Bildung die Tätigkeit des Notch-Signalweges gleich mehrmals, bei der ursprünglichen Induzierung infolge der sogenannten lateralen Inhibition (Hartenstein et al., 1992; Matsuno et al., 1995) und auch später bei der Differenzierung der fünf Zelltypen, aus denen ein jedes dieser Sinnesorgane besteht, notwendig ist (Gho et al., 1999; Hartenstein et al., 1992). In manchen Fällen waren sogar Transformationen von Schaft- zu Sockelzellen zu beobachten (Abb.2.5 E,F), was darauf hindeutet, daß hier der zweite, der Differenzierungsschritt, beeinträchtigt war, wie es auch bei Überexpression von *Nintra* zu beobachten ist (Rebay et al., 1993). Eine solche *Nintra*-Überexpression führt auch zu einem weiteren (Lindsley und Zimm, 1992), auch hier gefundenem Defekt, zu der Verkürzung der Flügelvenen (Abb.2.5 J) Ebenfalls betroffen waren die Beine, an denen zusätzliche Beingelenke entstanden sind (Abb.2.5 I), was auch in *lgd*-Mutanten (Bryant and Schubiger, 1971) und bei Überexpression von *Nintra* zu beobachten ist (de Celis and Bray, 2000).

Aufgrund dieser Phänotypen, die auf eine leichte Aktivierung des Notch-Signalweges hindeuten und sehr den Beobachtungen an *lgd*-Mutanten ähneln, kann zusammenfassend und auf spätere Ergebnisse vorgehend *l(2)SH0495* als ein weiteres, schwaches *lgd*-Allel betrachtet werden.

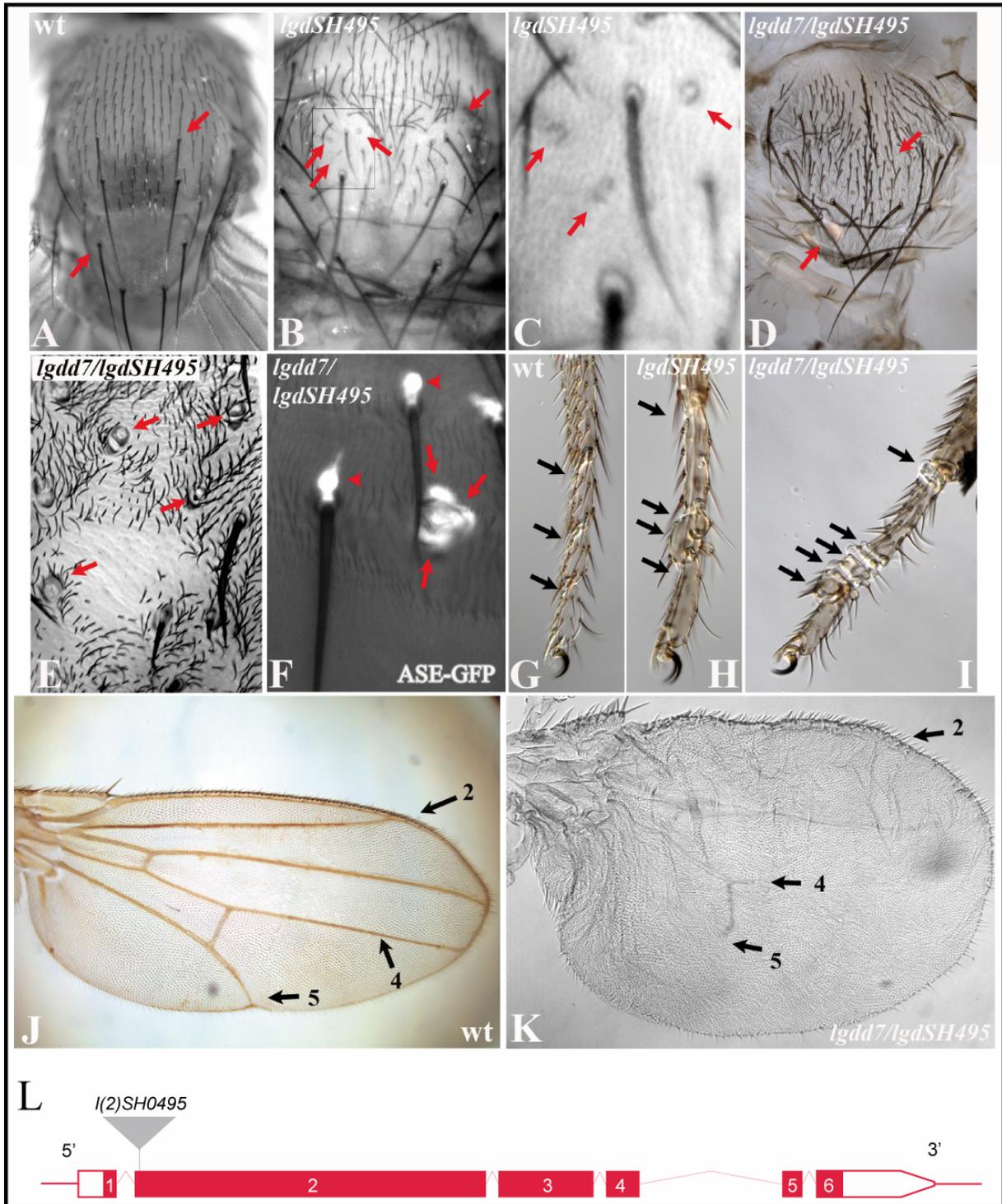


Abb.2.5: Phänotypische Analyse der Insertionslinie *I(2)SH0495* zeigt Phänotypen einer gesteigerten Notch-Aktivität, die noch verstärkt in Transheterozygotie über dem *lgd^{d7}*-Allel zu beobachten sind. **B-C:** Pfeile zeigen Positionen fehlender Mikrochaetaen auf dem Notum (wildtypisch in **A**) (**C** zeigt umrahmte region in **B** vergrößert an), in Transheterozygotie über dem *lgd^{d7}*-Allel fehlen ebenfalls einige Makrochaetaen (Pfeile in **D**) **E+F** Konversionen der Schaft- zu Sockelzellen, bestätigt durch die sockelzellenspezifische Expression von ASE-GFP. **D:** Duplikationen der Sockelzellen, angezeigt mit roten Pfeilen **E:** Pfeile zeigen die aus der Quadruplikation hervorgegangenen drei sichtbaren Sockelzellen. Pfeilspitzen zeigen einzelne Sockelzellen in den nicht betroffenen mechanosensorischen Borsten. **H:** Duplikationen der Beingelenke (Pfeile in **H**) in der Insertionslinie *I(2)SH0495* (**G**-Wildtyp), ebenfalls verstärkt in der transheterozygoten Situation (**I**). **K:** Pfeile zeigen die Verkürzung der Flügelvenen 4 und 5, Flügelvene 2 sogar gar nicht ausgebildet in Transheterozygotie der Insertion über dem *lgd^{d7}*-Allel (**J**-wildtypisch) **L:** genomische Region um die Transkriptionseinheit *CG4713* mit eingezeichneter cDNA des Gens. Die Insertionsstelle des P-Elements in der Linie *I(2)SH0495* befindet sich im Anfang der Region kodierend für das zweite Exon.

2.1.5. Revertanten Screen

Fliegen mit der *l(2)SH0495* Insertion wiesen also, wie im Kapitel davor dargelegt, Phänotypen auf, die denen der anderen *lgd*-Allele entsprachen. Um zu überprüfen, ob wirklich die P-Element Insertion für diese Phänotypen verantwortlich ist, wurde dieses von Thomas Klein und Stefan Kölzer durch das Einkreuzen von Transposaseaktivität mobilisiert ($\Delta 2-3$ Chromosom, (Robertson et al., 1988), was einerseits wildtypische Revertanten, andererseits neue *lgd*-Allele erzeugen müßte, je nachdem, ob das P-Elements rückstandsfrei herausgeschnitten oder, bei ungenauer Mobilisierung, Deletionen oder Teile des P-Elements am Insertionsort hinterläßt. Es konnten beide Klassen von Phänotypen generiert werden, was die These untermauert, daß das P-Element für die beobachteten Phänotypen verantwortlich ist und somit das betroffene Gen höchstwahrscheinlich die gesuchte *l(2)gd*-Transkriptionseinheit darstellt. In Abb.2.6 ist die Expansion der Wg-Expression in zweien der so erzeugten neuen *lgd*-Allelen *rsk-73a* und *rsk-82a* gezeigt.

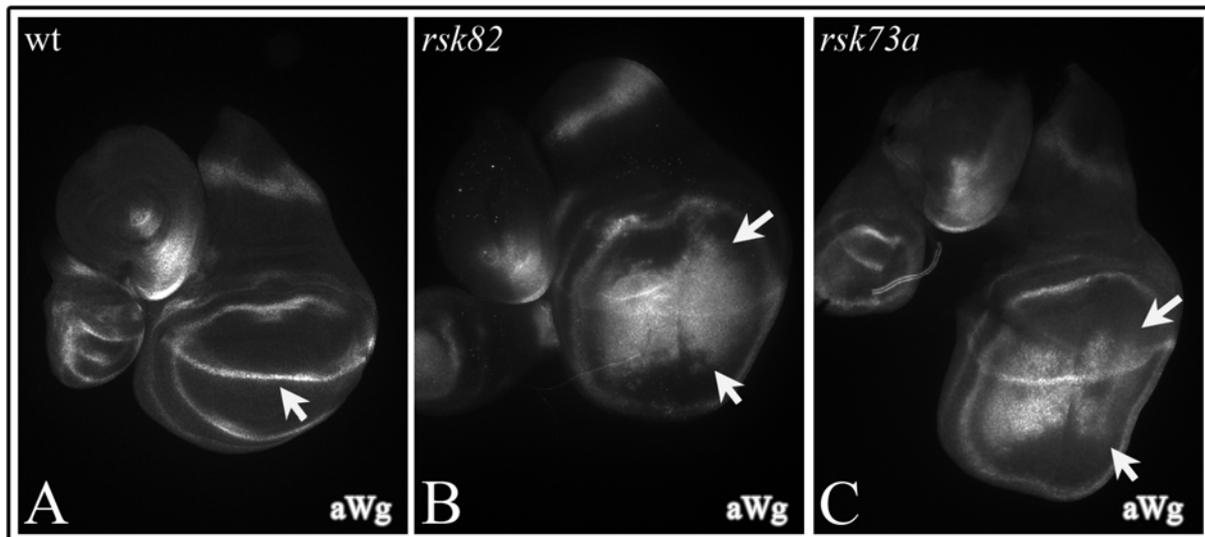


Abb.2.6: Expansion der Wg-Expression entlang der d/v-Kompartimentsgrenze in den Linien *lgd^{rsk82}* (Pfeile in **B**) und *lgd^{rsk73a}* (Pfeile in **C**), hergestellt durch ungenaue Exzision der P-Element Insertion *l(2)SH0495*. Zum Vergleich die auf einen schmalen Streifen beschränkte Wg-Expression in einer wildtypischen Scheibe (**A**).

Zur Untermauerung dieser These durch Rettungs- und Überexpressionsexperimente und somit zur Identifikation des *lgd*-Gens wurde hiernach die cDNA von CG4713, der vorhergesagten Gentranskriptionseinheit, in die das P-Element inserierte, als induzierbares Transgen in die Fliege eingeführt

2.1.6. Molekulare Analyse der lethal (2) giant discs Allele

Die Insertionsstelle des P-Elements im Stamm *l(2)SH0495* ist von Steven O. Hou und Mitarbeitern (Oh et al., 2003) durch Sequenzierung auf Anfang des zweiten Exons des bioinformatisch vorausgesagten Gens *CG4713* bestimmt worden (24bp nach Exonanfang).

Um die Art der Mutationen sowohl in den älteren *lgd*-Allelen *lgd^{d1,-d4,-d7,-d10}* wie auch in den, durch Mobilisierung des P-Elements, neu erzeugten Linien *lgd^{rsk73a}* und *lgd^{rsk82a}* aufzuklären, wurde die Transkriptionseinheit *CG4713* in diesen Linien sequenziert. Bei einer unvollständigen Mobilisierung eines P-Elements in der Keimbahn bleiben an der ursprünglichen Insertionsstelle häufig charakteristische Sequenzabschnitte zurück. Diese bestehen aus einer kurzen Duplikation der genomischen Sequenz 5' von der Insertionsstelle und Teilen der terminalen, invertierten Sequenzwiederholungen des P-Elements, deren durchschnittliche Länge 16 ± 1 bp beträgt. Dazwischen bleiben häufig auch andere Rückstände des P-Elements eingeschlossen zurück, die sehr A/T-reich sind und kurzen Sequenzabschnitten an den Enden des P-Elements ähneln. (Gloor et al., 2000; Staveley et al., 1995; Takasu-Ishikawa et al., 1992) Wie Abbildung 2.7 zeigt, waren alle diese charakteristischen Merkmale in den *rsk*-Linien *73a* und *82a* zu finden, wobei die totale Insertionslänge 66bp respektive 92bp betrug. Die Insertion in *lgd^{rsk73a}* führt mehrere Translationsstoppsignale ein, in *lgd^{rsk82a}* entstehen diese Translationsstoppkodons durch eine Leserasterverschiebung erst nach der eigentlichen Insertion, was wohl in beiden Fällen zum frühzeitigen Abbruch der Translation führt, wobei von den 816 Aminosäureresten des wildtypischen Lgd nur die ersten 27 im entstehenden Produkt zu finden wären (sowie 5 sequenzfremde in *lgd^{rsk73a}*, bzw 55 in *lgd^{rsk82a}*).

Wie bei den neuen Allelen ist die Transkriptionseinheit *CG4713* ebenso in den alten Allelen *lgd^{d1/-d4/-d7/-d10}* sequenziert worden. Diese Allele sind auf unterschiedliche Art und von unabhängigen Gruppen generiert worden. Um so überraschender war dann, daß alle vier Allele im zweiten Exon die gleiche G zu C Transversion mit anschließender 2bp Deletion enthielten, die zu einer Verschiebung des Leserasters mit einem Translationsstopp 48bp weiter führt.

Statt des wildtypisch 816 Aminosäurereste langen Protein wird in den *lgd^{d1/-d4/-d7/-d10}* homozygot mutanten Tieren nur ein auf 213 Aminosäurereste (+16 durch die Leserasterverschiebung erzeugte, sequenzfremde Aminosäurereste) verkürztes Produkt erzeugt. Eine Übersicht über die vorhandenen *lgd*-Allele und ihre Mutationen zeigt die Abbildung 2.7.

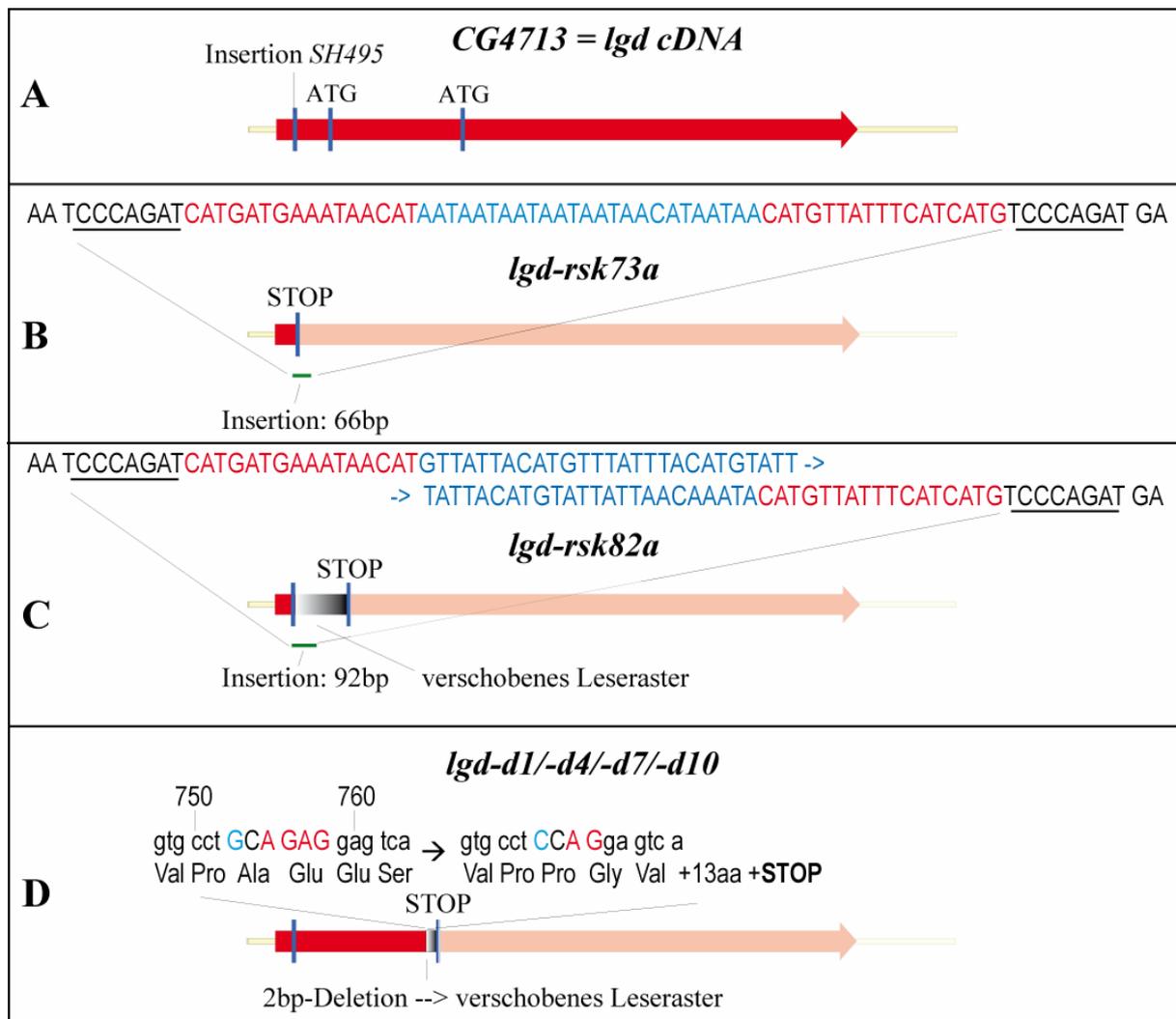


Abb.2.7: Übersicht der *lgd*-Allele. Um ihre Auswirkungen besser zu visualisieren, wurden die Mutationen anhand der cDNA und nicht auf genomischer DNA gezeigt. **A:** Wildtypische *lgd*-cDNA von 2981bp Länge. Die Insertionsstelle des P-Elements in der Linie *l(2)SH0495* sowie alternative Startkodons zeigen blaue Balken an. **B:** *lgd^{rsk73a}*-Allel mit 66bp Insertion. Der duplizierte Bereich ist unterstrichen, Reste der invertierten Sequenzwiederholungen in Rot, sonstige P-Element Rückstände in Blau, flankierende Basen abgetrennt. Translationsstopp am gekennzeichneten blauen Balken. **C:** *lgd^{rsk82a}*-Allel mit 92bp Insertion. Leserasterverschiebung im Bereich in Grau-Verlauf. **D:** Allele *lgd^{d1/-d4/-d7/-d10}* - Links wildtypische Sequenz. G>C Transversion blau markiert, zwei der rotmarkierten DNA-Basenpaare sind in den Mutanten deletiert worden, translatierte Proteinsequenz darunter. Bereich der Leserasterverschiebung grau schattiert. Nummerierung basierend auf der cDNA-Sequenz mit der NCBI Zugriffskennung: NM_135644.2, GI:24583636

2.1.7. Rettung des *lgd*-Phänotyps mit induzierbaren Transgenen von CG4713

Die cDNA der Transkriptionseinheit CG4713, die wie oben beschrieben in sämtlichen *lgd*-Allelen Mutationen aufwies, wurde in den pUAST-Vektor kloniert und als Transgen in die Fliege eingeführt (UAS-*CG4713*). Neben der unveränderten cDNA wurde auch ein Konstrukt kodierend für ein C-terminal mit dem HA-Epitop markiertes Protein als induzierbares

Transgen erstellt (UAS-*CG4713HA*). Mit Hilfe verschiedener GAL4 Treiberlinien war es dann möglich, die Expression der eingeführten Transgene mittels Induktion des UAS-Promotors in pUAST-Vektor zu aktivieren und, wie Abb.2.8 zeigt, die Genfunktion in *lgd*-mutanten Tieren wiederherzustellen. Die Transgene wurden in diesen Experimenten zunächst ubiquitär mit der *daughterless*-GAL4 (*da*-GAL4) exprimiert, was zu morphologisch normal aussehenden Flügelimaginalscheiben führte, deren *Wg*-Expressionsmuster ebenfalls normalisiert war. Um die erzielte Rettung besser zu visualisieren, wurde mit Hilfe der *hedgehog*-GAL4 (*hh*-GAL4) Treiberlinie die Expression der Transgene nur in dem posterioren Kompartiment der Flügelscheibe induziert. Dieses führt im posterioren Kompartiment zur Wiederherstellung der wildtypischen *Wg*-Expression, während im anterioren Bereich der Scheibe weiterhin die ektopische *Wg*-Expression zu beobachten ist.

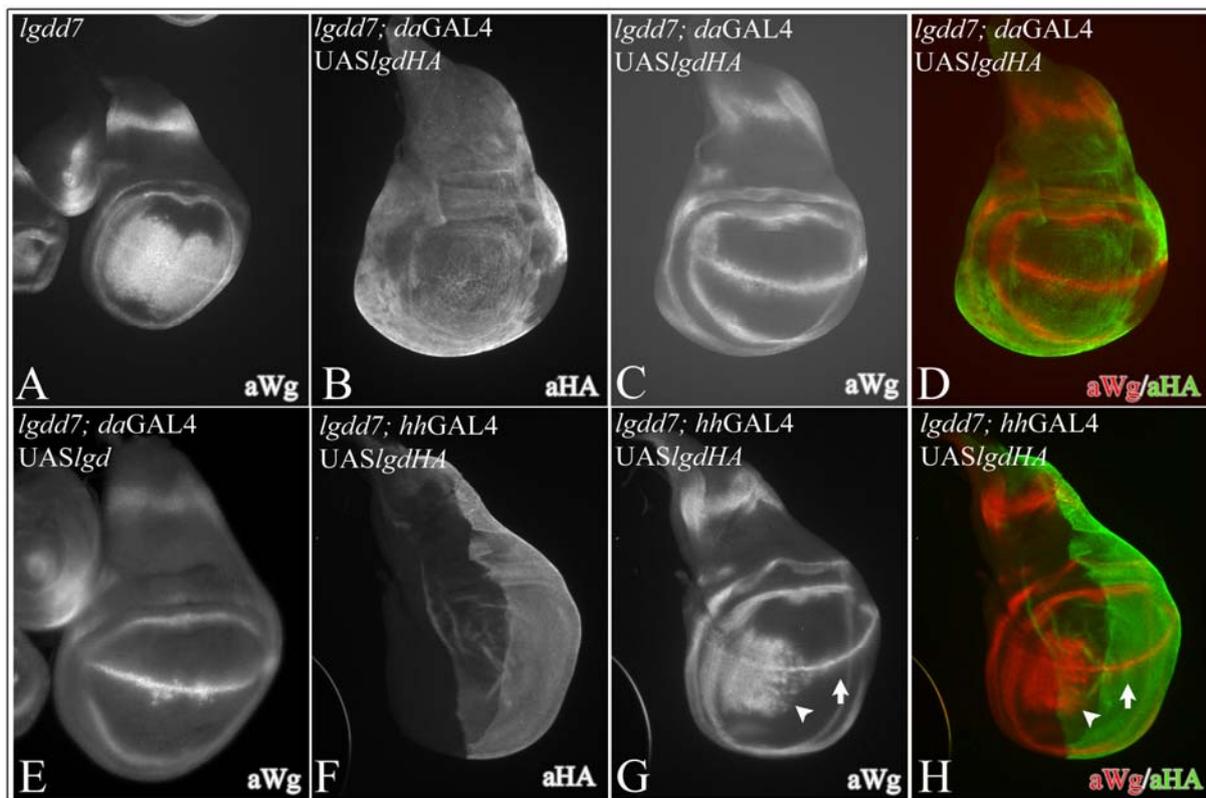


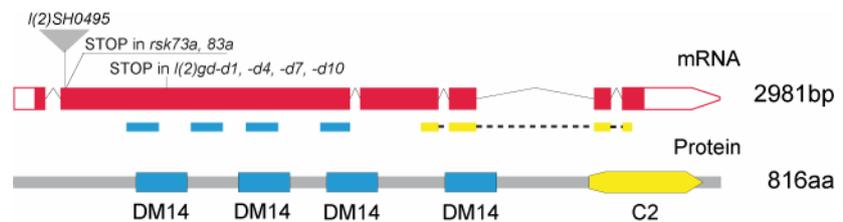
Abb.2.8: Rettung des *lgd*-Phänotyps durch Expression der cDNA von *CG4713/lgd*. In Flügelimaginalscheiben *lgd*-mutanter Tiere (A) ist die *Wg*-Expression verbreitert in Vergleich zur schmalen Expressionsdomäne wildtypischer Imaginalscheiben entlang der d/v-Kompartimentsgrenze (wt siehe Abb.2-6A). Ubiquitäre Expression von HA-markiertem *CG4713/Lgd* (UAS*lgdHA*) mittels der Treiberlinie *daGAL4* im *lgd*-mutanten Hintergrund stellt die normale Expression von *Wg* in den Flügelimaginalscheiben wieder her (C und D). B zeigt die ubiquitäre Expression des Konstruktes anhand der HA-Antikörperfärbung. Eine vergleichbare Expression des unmarkierten Konstruktes (UAS*lgd*) führt zu einer ähnlichen Wiederherstellung normaler *Wg*-Expression in der Flügelimaginalscheibe (E). Zur besseren Visualisierung der Rettung des *lgd*-Phänotypes können die Transgene auch mittels der *hhGAL4*-Treiberlinie nur im posterioren Bereich der *lgd*-mutanten Scheiben exprimiert werden (HA-Färbung in F zeigt die Expressionsdomäne von *hhGAL4*). Die normale *Wg*-Expression wird nur im posterioren Bereich wiederhergestellt (Pfeil in G und H), während im anterioren Bereich weiterhin die durch die *lgd*-Mutation bedingte Verbreiterung der *Wg*-Expressionsdomäne zu beobachten ist (Pfeilspitze in G und H)

2.2. Bioinformatische Analyse von Lgd

2.2.1. Struktur von Lgd

Das *lgd*-Gen trägt sechs Exons und wird zu einer mRNA von 2981bp Länge prozessiert (NCBI: NM_135644), von denen 2451bp für ein 816aa langes Protein kodieren (NCBI: NP_609488). Eine Suche nach charakteristischen Proteindomänen (NCBI-CDD, SMART,

Abb.2.9:Übersicht: mRNA und Lgd Protein aus *D.melanogaster*



INTERPRO) zeigt vier Wiederholungen der neuen DM14 Domäne und eine C2-Domäne am C-Terminus.

Die C2-Domäne ist zum ersten Mal als ein etwa 130 Aminosäuren langes (Rizo and Sudhof, 1998), Ca^{2+} -Ionen- und phospholipidbindendes Motiv in der Proteinkinase C charakterisiert worden (Übersicht in (Nalefski and Falke, 1996)). Mittlererweile ist eine Vielzahl Proteine mit dieser Domäne bekannt, die eine Diversifizierung sowohl im Aufbau wie in der Funktion aufzeigen. Neben der Bindung an Phospholipide und somit der Assoziation an Zellmembranen dient sie in einigen Proteinen zu Interaktionen mit anderen Proteinen (Dekker and Parker, 1997; Li et al., 1995), letzteres zum Teil auch über die Erkennung von Phosphotyrosinen, wie neue Forschungsergebnisse nahelegen (Benes et al., 2005). Die charakteristische Struktur der C2-Domänen ist aus acht β -Strängen aufgebaut, die antiparallel zu einer Sandwich- oder Faß-artigen Struktur angeordnet sind. Aminosäurereste, die für die Funktion der jeweiligen C2-Domäne verantwortlich sind, liegen dabei herausragend auf Schleifen zwischen den β -Strängen (Nalefski and Falke, 1996). Eine zyklische Permutation in der Anordnung der β -Stränge läßt zwei unterschiedliche Topologietypen der C2-Domänen unterschieden, Typ I und Typ II. Hierbei wird der erste der β -Stränge aus dem Typ I zum achten und letzten im Typ II, mit entsprechender Verschiebung der Reihenfolge der anderen Stränge (Essen et al., 1996; Sutton et al., 1995) (Abb.2.10).

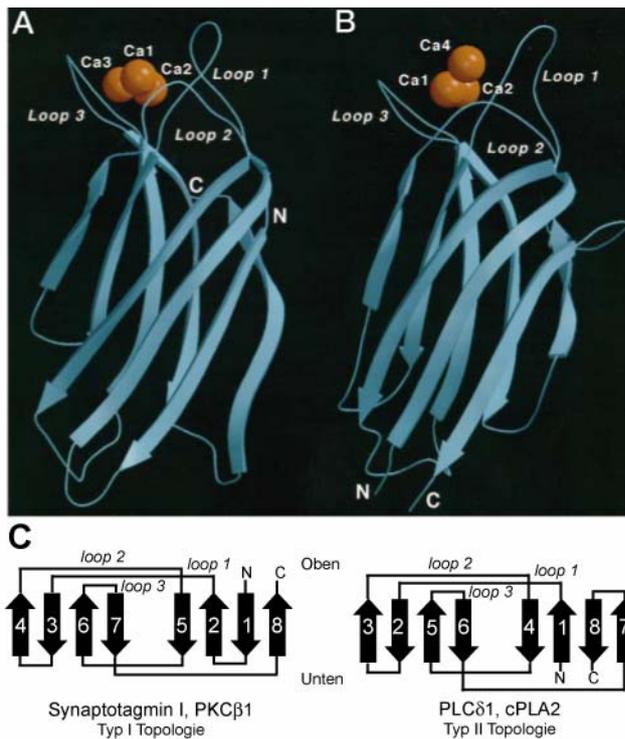


Abb.2.10: Schematische Darstellung des Aufbaus von C2 Domänen.

Acht β -Stränge sind anti-parallel zu zwei β -Faltblättern angeordnet, die wiederum sandwichartig übereinanderliegen. In C2 Domänen vom Typ II (B hier aus PLC δ 1) ist die Reihenfolge der Stränge um eins verschoben, Strang 1 ist homolog zum Strang 2 im Typ I usw. (C und in linearer Reihenfolge in D), bis als letztes Strang 8 den Kreis mit seiner Homologie zum Typ I-Strang 1 (A-hier C₂A von Synaptotagmin I) wieder schließt.

Verändert aus: (Rizo and Sudhof, 1998)

Die zunächst entdeckten Proteine mit der C2-Domäne benötigten Ca^{2+} Ionen für die Ausbildung einer Phospholipidbindung (Nalefski and Falke, 1996). Mittlererweile sind jedoch mehrere Proteine bekannt geworden, die kalziumunabhängig Phospholipide binden können (Rizo and Sudhof, 1998). Vergleicht man die Sequenzen der unterschiedlichen C2-Domänen miteinander, so stellt man fest, daß in den kalzium-unabhängigen C2-Domänen die ansonsten hochkonservierten, für die Koordination der Ca^{2+} Ionen notwendigen fünf Aspartatreste zum Teil oder auch gänzlich fehlen (Ponting and Parker, 1996). Vergleicht man die Sequenz der C2-Domäne aus dem Lgd-Protein mit der anderer bekannten C2-Domänen, so scheint diese dem Typ II anzugehören, für eine zuverlässige Zuordnung wäre allerdings eine genaue Röntgenstrukturanalyse notwendig. Weiterhin ist ihre Funktion wahrscheinlich kalziumunabhängig, da von den fünf, für die Kalziumbindung notwendigen Aspartaten drei fehlen und an diesen Positionen (rot umrahmt in Abb.2.10) nicht durch Aminosäurereste substituiert sind, die diese Funktion übernehmen könnten (Asn/N, Gln/Q, Ser/S, Thr/T) (Nalefski and Falke, 1996). Ein Vergleich der C2-Sequenz aus Lgd mit typischen C2-Domänen aus anderen Proteinen ist in Abbildung 2.11 dargestellt.



Abb.2.11: Alignment der C2 Domänen aus Lgd und beider Lgd-Orthologe aus dem Menschen, gegen PKCb, als Vertreter der TypI-Topologie und BCR-C2, der Lgd-ähnlichsten TypII Domäne. Die Positionen der β -Stränge sind oberhalb bzw. unterhalb des Aligments indiziert. Ihre Zuordnung erfolgt nach (Nalefski and Falke, 1996) entsprechend des typischen Aufbaus in den TypI (oberhalb) oder TypII C2-Domänen. Positionen, an denen die für die Kalziumbindung notwendigen Aspartatreste in kalziumabhängigen Vertretern der C2-Domänen konserviert sind wurden rot umrahmt

Die Funktion der anderen in Lgd gefundenen, für das Protein charakteristischen DM14-Domäne, ist zur Zeit unbekannt. Als mögliche funktionelle Domäne wurde die DM14-Domäne innerhalb eines bioinformatischen Screens identifiziert, der mittels eines Selbstvergleichs aller vorausgesagter Genprodukte in *Drosophila melanogaster* (Stand von 2000 - (Adams et al., 2000)) nach multiplen homologen Regionen innerhalb einzelner Polypeptide suchte (Ponting et al., 2001). Die Domäne ist 59aa lang, mit einer von SMART bestimmten, folgenden Konsensussequenz:

1.....10.....20.....30.....40.....50.....
 LALLQQRQEYKQAALQAKRAGDEEKARRHLRIAKQFDDAIKAARACRPVDLSELPPPP

Abb.2.12: Konsensussequenz der DM14-Domäne entnommen der SMART-Datenbank. Die rot markierten Aminosäurereste sind zu nahezu 100% bei allen bekannten Vertretern in allen Spezies konserviert. Sehr charakteristisch ist ferner die Polyprolinsequenz am C-terminalen Domänenende, die immer zumindest zwei Prolinreste beinhaltet.

2.2.2. Lgd-Orthologe

Lgd ist das einzige Protein in *Drosophila melanogaster* mit der DM14 Domäne und hat Orthologe im gesamten Tierreich, angefangen vom *Dictyostelium discoideum* bis zum Menschen (CC2D1B). In Vertebraten läßt sich zumeist noch ein zusätzliches Ortholog finden (CC2D1A im Menschen), welches, als auffallendes Unterscheidungsmerkmal zu dem Lgd aus der Fliege, eine längere Sequenz im Anschluß an die C2-Domäne im C-terminalen Bereich aufzeigt. (siehe Abb.2.13).

Für die Orthologen führen wir hier die Bezeichnungen Lgd1 und Lgd2, mit entsprechenden speziesspezifischen Präfixen ein (hLgd1/2 für humane, m- für murines etc).

Es existieren auch bereits einige Berichte über mögliche Funktionen der Vertebraten-Orthologe. hLgd2 (CC2D1A) ist in einem *2-Hybrid-Screen* als möglicher Nf-κB Interaktionspartner gefunden worden (Matsuda et al., 2003). Eine weitere Arbeit, die eine Assoziation zwischen Mutationen im hLgd2 und einer autosomal-rezessiven, non-syndromalen geistigen Retardierung aufdeckt, zeigt, daß diese Nf-κB Interaktion jedoch wahrscheinlich indirekt erfolgt (Basel-Vanagaite et al., 2006). Wiederum eine andere Gruppe beschreibt ein Fragment des entsprechenden Maus-Homologs, mLgd2/Cc2d1a, unter der Bezeichnung Freud-1, als einen Expressionsregulator für den Serotoninrezeptor 5-HT1A (Ou et al., 2003).

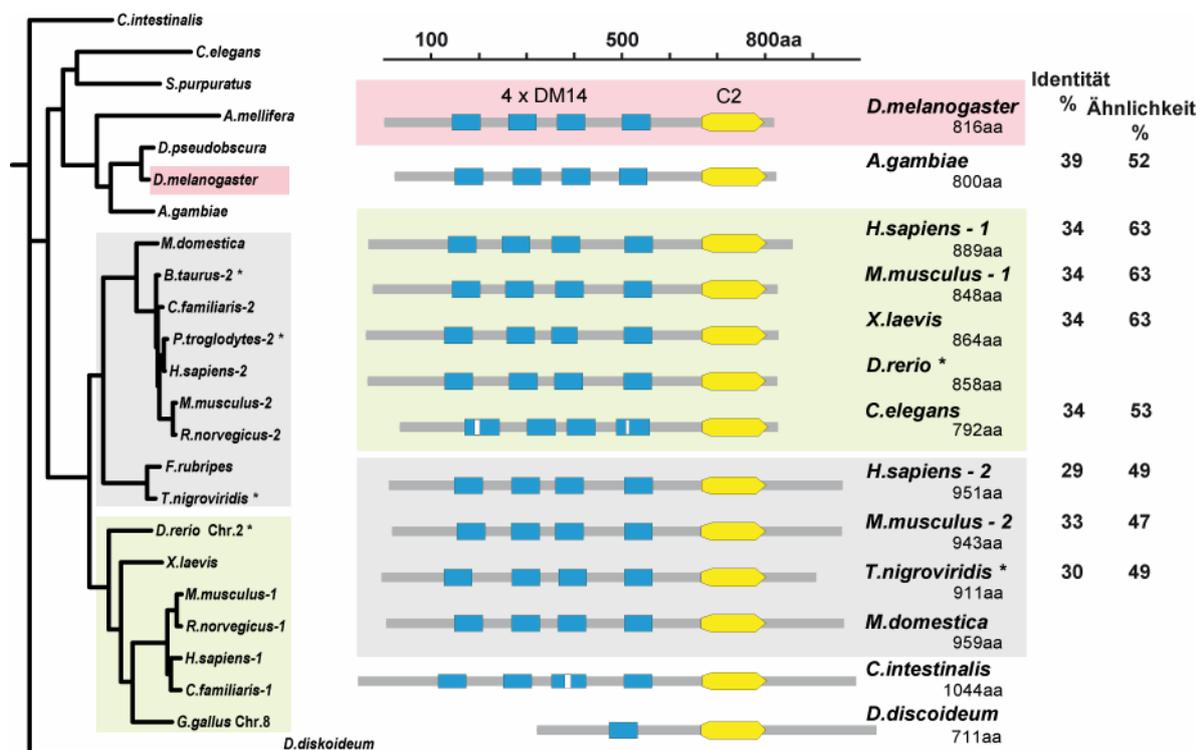


Abb.2.13: Übersicht ausgewählter Lgd-Orthologe. In den Vertebraten können zwei Typen der Lgd-Orthologe erkannt werden, deren auffälligstes Charakteristikum der Unterschied in der Proteinsequenzlänge C-terminal nach der C2-Domäne ist. Phylogenetischer Stammbaum links. Sternchen deuten an, daß noch ein zweites Homolog in der jeweiligen Spezies wahrscheinlich, doch noch keine finale, sondern nur Teilsequenzen erhältlich waren. Rechts die schematische Darstellung der Proteinsequenzen gezeigt in gleicher Skalierung. Werte zur Identität und Ähnlichkeit gegenüber dem Fliegen-Lgd wurden entnommen von NCBI. Die entsprechenden Proteinsequenzen beruhen auf dem Annotationsstand von Februar 2006. Der phylogenetische Stammbaum wurde mittels eines multiplen Sequenzvergleichs mit dem Programm ClustalX und der nachfolgenden Berechnung der Sequenzähnlichkeit im Phylip-Programmpaket erstellt (siehe Material und Methoden).

Um festzustellen, ob die Orthologe aus den Vertebraten eine ähnliche Funktion haben wie Lgd, führten wir die cDNA der murinen Orthologe ebenfalls als induzierbare Transgene in die Fliege ein und überprüften deren Funktionalität auf die Fähigkeit hin, *lgd* während der Flügelentwicklung zu ersetzen (UAS-*mlgd1* oder UAS-*mlgd2*).

2.2.3. Vertebraten-Orthologe retten die Flügelentwicklung in *lgd*-Mutanten

Die cDNA beider Mausehomologen ist in einem induzierbaren pUAST-Vektor in die Fliege eingeführt worden (UAS-*mlgd1/2*). Genau wie bei Ausprägung des endogenen Proteins kann in Bereichen, in denen eines der Homologen exprimiert wird, der *lgd*-Phänotyp, gezeigt anhand der Wg-Expression, unterdrückt werden (Abb.2.14). Die Funktion des Fliegen-Lgd kann also von beiden Vertebraten Orthologen übernommen werden, was darauf hindeutet, daß die Lgd-Orthologen in ihrer Funktion stark konserviert sind und auch in den Vertebraten eine Rolle als Regulatoren der Notch-Aktivität spielen könnten.

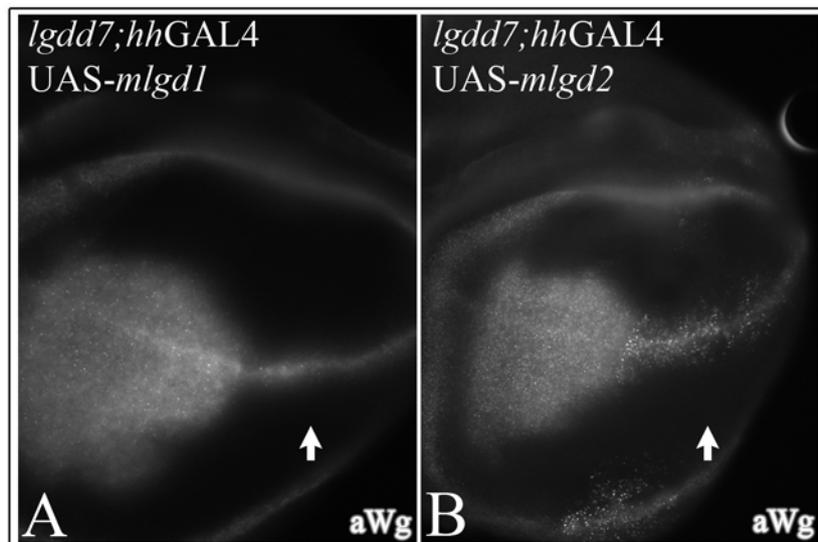


Abb.2.14: Expression der murinen *lgd*-Orthologe rettet den *lgd*-Phänotyp. cDNA beider murinen *lgd*-Orthologe wurde als UAS-Transgen in die Fliege eingeführt und mittels der hhGAL4-Treiberlinie im posterioren Kompartiment der Flügelimaginalscheibe, im *lgd*-mutanten Hintergrund exprimiert. Beide Orthologe können im Bereich der Expression die normale Wg-Expression wiederherstellen (Pfeile in B und C)

2.3. Funktionsanalyse von Lgd

In den vorangehenden Kapiteln sind Ergebnisse zusammengetragen worden, die zur Identifizierung der Gentranskriptionseinheit *CG4713* als *lgd* führten. Welche Hinweise es auf die Funktionsweise des Genprodukts von *lgd* gibt wird in Folgendem besprochen.

2.4. Phänotypen der Überexpression von Lgd

2.4.1. Zwei Seiten der Lgd-Überexpressionseffekte

Zur weiteren Charakterisierung der Funktionsweise von Lgd wurde das eingeführte Transgen mit Hilfe verschiedener GAL4-Treiberlinien (*sdGAL4*, *ptcGAL4*) in wildtypischen Tieren überexprimiert. Ausgehend von den Ergebnissen der Rettungsexperimente wäre hierbei eine Reduktion der Notch-Aktivität zu erwarten. Tatsächlich konnten bei Lgd-Überexpression von schwachen transgenen Linien (*UAS-lgd25*) in verschiedenen Entwicklungsvorgängen Phänotypen beobachtet werden, die charakteristisch für eine Reduktion der Notch-Aktivität sind. Betrachtet man die Wg-Expression in Flügelimaginalscheiben bei einer solchen, *sdGAL4*-getriebenen Überexpression von Lgd, so kann eine Abschwächung und bisweilen eine Unterbrechung der Expression entlang der dorso-ventralen Kompartimentsgrenze festgestellt werden. Korrespondierend dazu können am adulten Flügel Unterbrechungen des Flügelrandes beobachtet werden (Pfeile in Abb.2.15B). Die Flügelvenen waren verbreitert und ihre Enden liefen in breiten deltaförmigen Ausläufern aus (vergleiche Pfeilspitzen in Abb.2.15A und B). Am Scutellum entstanden zusätzliche Makrochaeten (Abb.2.15E) und die normalerweise den Flügelrand umlaufenden, in regelmäßigen Abständen positionierten Borsten waren nun nicht mehr durchgehend sondern unregelmäßig in enggestellten Reihen oder Büscheln aufzufinden (Abb.2.15 C+D), was auf eine Schwächung des Mechanismus der lateralen Inhibition hindeutet.

Exprimiert man hingegen Lgd mit einem stark exprimierenden UAS-Konstrukt (*UAS-lgd1-2*) oder von zwei Transgenen in der Flügelscheibe (*sdGal4*) gleichzeitig, so können gemischte Phänotypen beobachtet werden. Im adulten Flügel kommt es zu einer Erweiterung des Flügelrandes im distalen Bereich, was auf erhöhte Notch-Aktivität hinweist und gleichzeitig zum Verlust des Flügelrandes in der proximalen Region (Abb2-16 B), was ein Zeichen verminderter Notch-Aktivität ist.

In Flügelimaginalscheiben sieht man eine erweiterte lacZ-Expression des synthetischen Gbe+Su(H)m8 Konstrukts, das als Indikator der Notch-Aktivität konstruiert (Furriols and Bray, 2001) und während dieser Arbeit mehrmals als solcher benutzt wurde. Das Konstrukt kombiniert den normalerweise ubiquitär aktiven *grainyhead*-Promotor mit vier Su(H) Bindestellen vor der cDNA für das β -Galaktosidase Enzym. Nur nach Bindung von N-intra, also bei aktiviertem Notch-Signalweg, wird der Repressorkomplex um Su(H) in einen transkriptionsaktivierenden Komplex umgewandelt und β -Galaktosidase exprimiert, die dann zB. immunhistologisch nachgewiesen werden kann.

Ähnlich dem synthetischen Konstrukt ist die Expression von Wg und Senseless (Sens), die beide normalerweise entlang des Flügelrandes zu sehen sind, in Regionen der Überexpression erweitert. Senseless markiert im Wildtyp die Lage von Flügelrandzellen und von sensorischen Vorläuferzellen. Wie man jedoch in Abb.2.16 J an der Reduktion der Hindsight-Expression (Hnt) - eines spezifischen Markers der neuronalen Vorläuferzellen - sieht, entspringt die Sens-Expansion nicht einer ektopischen Bildung oder Annahme des Schicksals diesen Zelltypus.

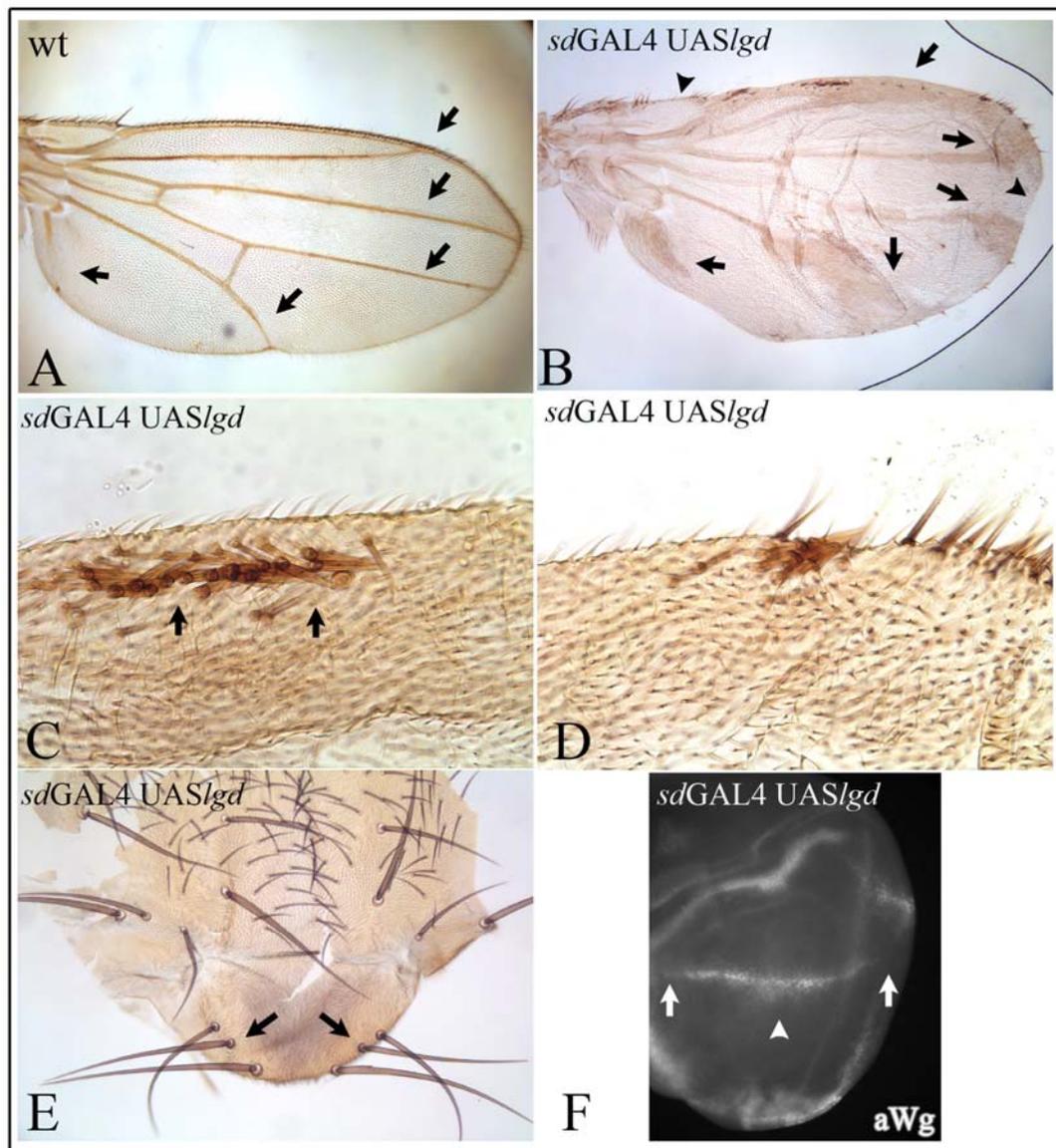


Abb.2.15: Typische Anzeichen einer reduzierten Notch-Aktivität konnten als Folge ektopischer Überexpression von Lgd. festgestellt werden. Diese Anzeichen sind: die verbreiterten Flügelvenen in B (Pfeile, in A der Wildtyp zum Vergleich), Verlust des Flügelrandes (Pfeilspitzen in B) und auch Verlust der lateralen Inhibition, der zu verringerten Abständen zwischen den mechanosensorischen Borsten am Flügelrand (C und D) und zur Entstehung überzähliger Macrochaeten am Scutellum führt (E). Korrespondierend dazu konnten bei Färbungen in der Flügelimaginalscheibe Unterbrechungen oder Abschwächung der Wg-Expression entlang des künftigen Flügelrandes festgestellt werden. (F).

Ähnliche, Notch-aktivierende Effekte wie mit *sdGAL4*, konnten auch bei Einsatz der *ptcGAL4* Treiberlinie ermittelt werden, wie anhand von Antikörperfärbungen gegen Wg, β -Galaktosidase (Abb.2.16D, E), Sens und Hnt (Abb.2.17 I, J) gezeigt. Wurde dabei zusätzlich zu Lgd auch Notch exprimiert, so konnte eine noch stärkere Aktivierung des Notch-Signalweges festgestellt werden (Abb.2.17 N). Die Funktion von Lgd zeigt sich damit als sehr dosisabhängig dar, mit einer Reduktion der Notch-Aktivität bei geringen und deren Verstärkung bei hohen Mengen von Lgd. Dieses legt die Existenz von Titrationseffekten nahe, dh. bei hohen Lgd-Konzentrationen könnte Lgd andere Effektoren, die für seine Notch-supprimierende Funktion notwendig sind, austitrieren und somit zum gleichen, Notch-aktivierenden Effekt führen, wie bei Verlust der Genfunktion.

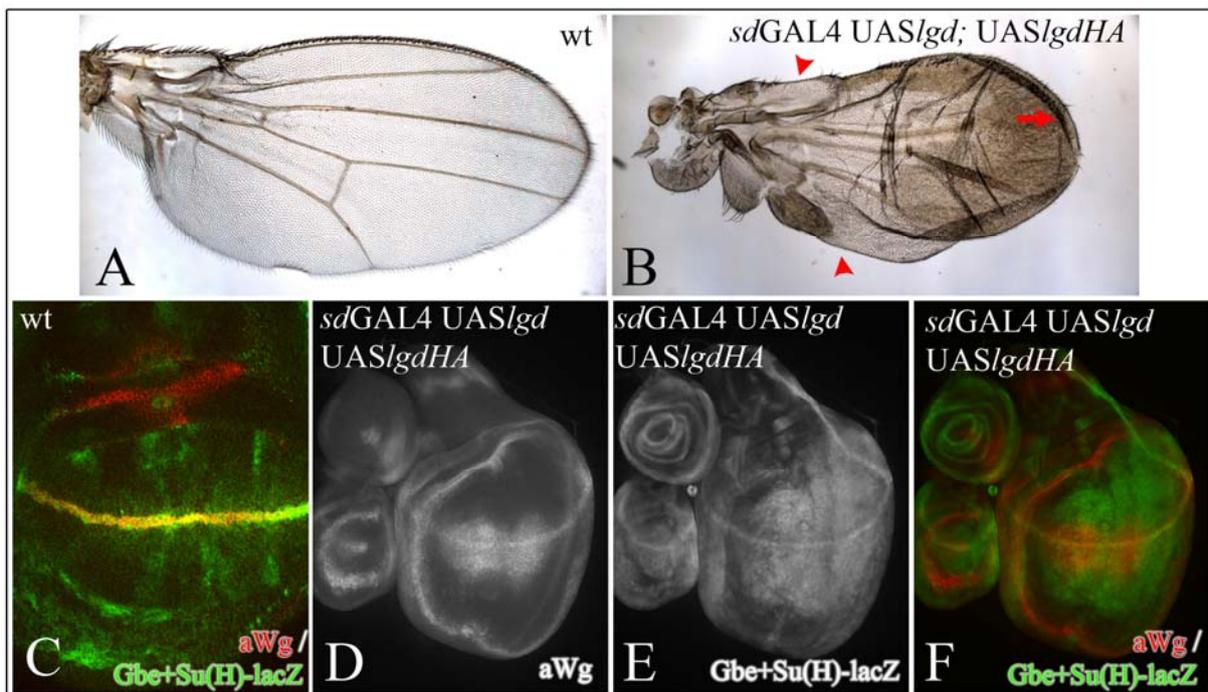


Abb.2.16: Erhöhung der Aktivität des Notch-Signalweges infolge der Überexpression von Lgd. Teil 1: Neben der Abschwächung der Notch-Aktivität (Abb.2.15) im Flügel konnten bei stark exprimierenden *lgd*-Allelen, oder bei der Expression von mehreren Allelen gleichzeitig gemischte, die Notch-Aktivität steigernde, wie auch von deren Schwächung bezeugende Effekte beobachtet werden. Auf adulten Flügeln kam es hierbei zur Bildung eines ektopischen Flügelrandes (Pfeil in **B**) im distalen Flügelbereich und gleichzeitig zum Verlust des Flügelrandes im proximalen Bereich (Pfeilspitzen in **B**). Korrespondierend dazu konnte in den Flügelimaginalscheiben solcher Tiere, die zugleich mehrere Konstrukte exprimierten eine verbreiterte Expression von Wg, eines Zielgens von Notch, oder eine gesteigerte Aktivität des synthetischen Gbe+Su(H)m8-Konstruktes anhand der β -Galaktosidase Färbung festgestellt werden. In Vergleich zu wildtypischen Scheiben (**C**) zeigte sich in den unter *sdGAL4* Lgd-exprimierenden Scheiben-eine Ausbreitung der Gbe+Su(H)-Aktivität in den ganzen Überexpressionsbereich hinein (**E**). Das Gbe+Su(H)-Konstrukt zeigt hierbei (**E**) eine viel höhere Sensitivität für die Notch-Aktivität dar, als die Wg-Expression, die etwas schwächer ausgebreitet ist (**D**)

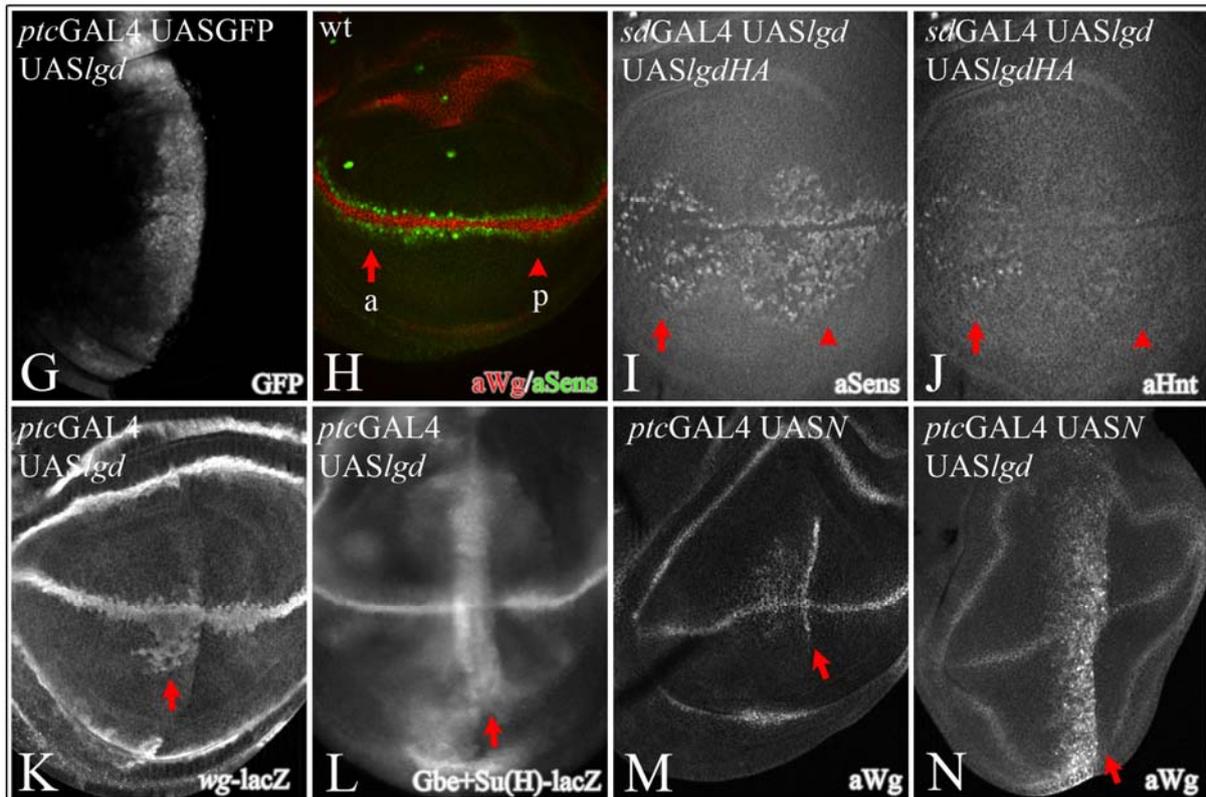


Abb.2.17: Erhöhung der Aktivität des Notch-Signalweges infolge der Überexpression von Lgd. Teil II
 Eine Expression von Lgd mit Hilfe von *ptcGAL4* führte zu einer Aktivierung des Notch-Signalweges entlang der Expressionsdomäne (G) - hier anhand der Expression von lacZ aus einer Insertion in das *wg*-Gen (Pfeil in K) und durch das Gbe+Su(H)-lacZ Konstrukt gezeigt (Pfeil in L). Eine Koexpression von N mit Lgd verstärkte diese Aktivierung des Notch-Signalweges noch weiter (Pfeil in N in Vergleich zu schwächeren Aktivierung bei der Expression von Notch alleine in M).
 Neben Wg konnte bei Expression von zwei UAS-*lgd*-Linien gleichzeitig eine Verbreiterung der Expression eines weiteren Markers des künftigen Flügelrandes – Sens – festgestellt werden (Pfeile in I in Vergleich zum Wildtyp in H). Sens markiert neben den Flügelrandzellen auch sensorische Vorläuferzellen. Die verbreiterte Sens-Expression stellt aber hier kein Anzeichen des Wechsels der Zelldetermination der betroffenen Zellen dar, wie man an der Tatsache sieht, daß diese in (J) keine Hnt-Färbung aufweisen, der ein spezifischer Marker der neuralen Vorläuferzellen ist.

2.5. Lokalisation von Lgd

Da noch kein Lgd-spezifischer Antikörper zur Verfügung stand und weil die Rettungsexperimente nahelegten, daß die HA-Markierung das Lgd-Protein in seiner Funktionalität wahrscheinlich nicht beeinflusst, wurde die intrazelluläre Lokalisation von Lgd anhand des HA-markierten Proteins untersucht: Hierbei wurde der spezifische morphologische Aufbau der Flügelimaginalscheibe als ein einschichtiges, flaches, aus langen zylindrischen Zellen bestehendes Epithel genutzt. Liegt die Scheibe flach ausgebreitet vor dem Beobachter, so blickt man dabei auf die schmalen Enden der Zellen, die säulenartig nebeneinander angeordnet sind. In zwei Regionen ist es allerdings möglich, die Zellen ihrer ganzen Länge nach zu beobachten. Dies ist einmal an den Rändern der Fall und speziell an

der Spitze der Scheibe, wo die Zellen bogenförmig in die die Scheibe kuppelartig umschließende Peripodialmembran übergehen. Die zweite Stelle befindet sich an den Falten, die unmittelbar vor der künftigen Gelenkregion, im dorsalen Bereich der Flügelimaginalscheibe liegen - siehe Abb.2.18.

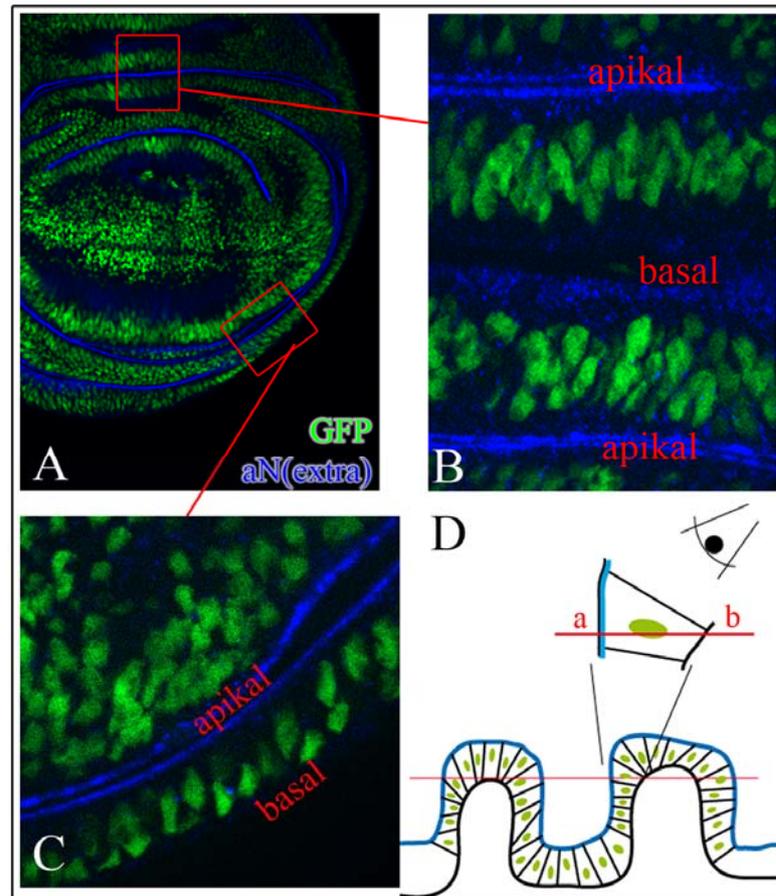


Abb.2.18: Optische Schnitte durch Faltenregionen der Flügelimaginalscheiben. An den Flügelfalten, die sich am Rande der Imaginalscheibe oder in der Nähe der künftigen Gelenkregion befinden (rot umrahmt in **A**) ist es möglich, mittels optischer Schnitte ganze Zellen von apikal nach basal (a bis b in **D**) zu besehen und hierdurch die subzelluläre Lokalisation immunhistologisch gefärbter Proteine festzustellen (in **D** schematisch als Querschnitt in dem gefalteten Bereichen der Scheibe angedeutet – Zellkerne in grün, Notch subapikal an der Membran in blau). Visualisierung in A-C durch nlsGFP im Kern und eine Antikörperfärbung gegen die extrazelluläre Domäne von Notch.

Exprimiert man nun in der Flügelimaginalscheibe das HA-markierte Lgd (*UAS-IgdHA*) mit der *ptcGAL4*-Treiberlinie in einem Streifen entlang der antero-posterioren Kompartimentsgrenze, so kann man bei entsprechender Fokussierung optische Schnitte über die ganze Zelllänge an den Falten und an der Spitze der Scheibe durchführen und die intrazelluläre Lokalisation des markierten Proteins feststellen. Das LgdHA war hierbei zytoplasmatisch mit einer schwachen apikalen Anreicherung zu finden.

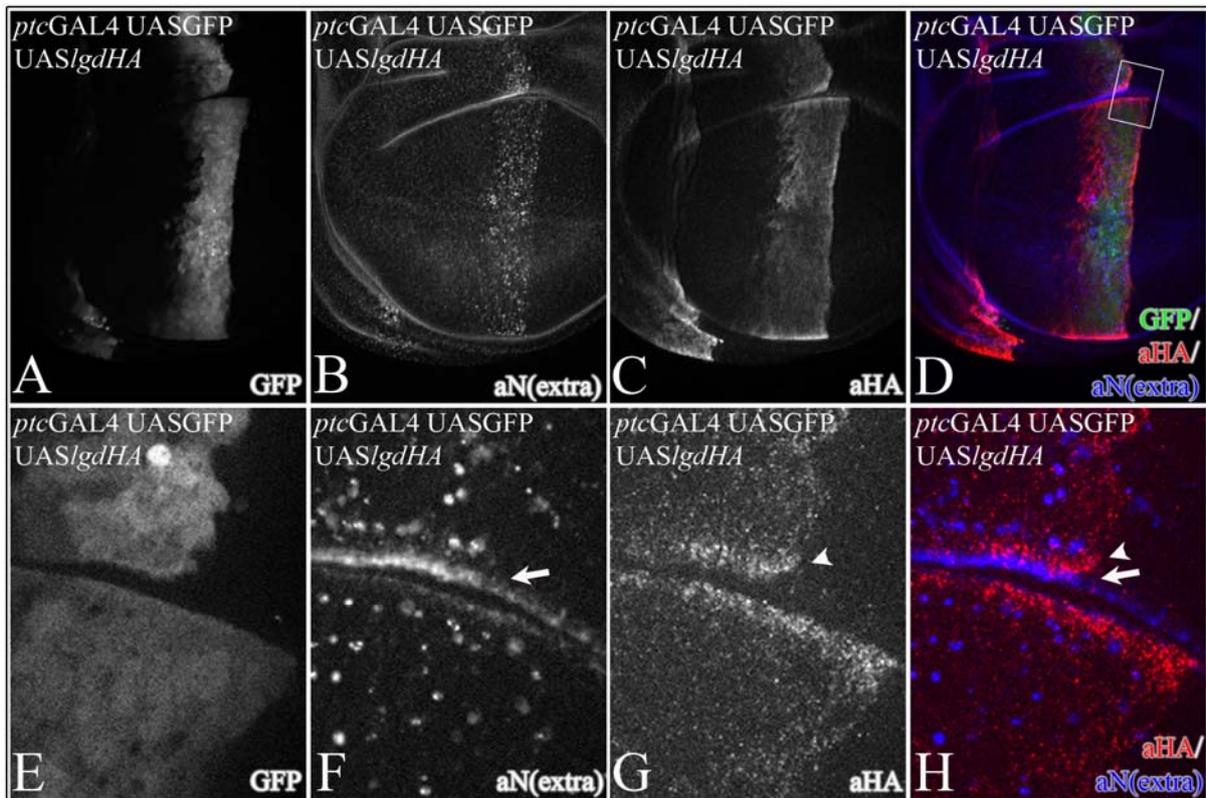


Abb.2.19: Subzelluläre Lokalisation von LgdHA. Mittels optischer Schnitte in den Faltenregionen der Flügelimaginalscheibe (siehe Abb.2-18) ist es möglich dort liegende Zellen in ihrer ganzen Länge von apikal nach basal zu besehen. In den Scheiben wurde LgdHA mit der *ptc*GAL4-Treiberlinie entlang der a/p Kompartimentsgrenze exprimiert (Expressionsdomäne visualisiert mittels GFP (A,D,E) und anti-HA Färbung (C,D,G,H)). **E-H** stellen die umrahmte Region aus **D** vergrößert dar. LgdHA kann im Zytoplasma mit einer leichten Anreicherung im apikalen Bereich lokalisiert werden (Pfeilspitze in **G+H**) wo es teilweise überlappend, zum größten Teil jedoch unterhalb der Lokalisierung des Notch-Proteins (Pfeil in **F,H**) zu sehen ist.

Als nächstes ist die mRNA-Expression von *lgd* mit Hilfe von RNA *in-situ* Färbungen in verschiedenen Organanlagen untersucht worden. Die Färbungen (Abb.2.20) zeigen ein ubiquitäres Muster wobei die Färbungsintensität, die kaum über dem Hintergrund der Kontrollfärbungen liegt, ein eher niedriges Expressionsniveau nahelegt. Die ubiquitäre Expression stimmt mit den in den Mutanten beobachteten Effekten überein, die sich auf die ganze Flügelimaginalscheibe und auf andere Organanlagen ausdehnen.

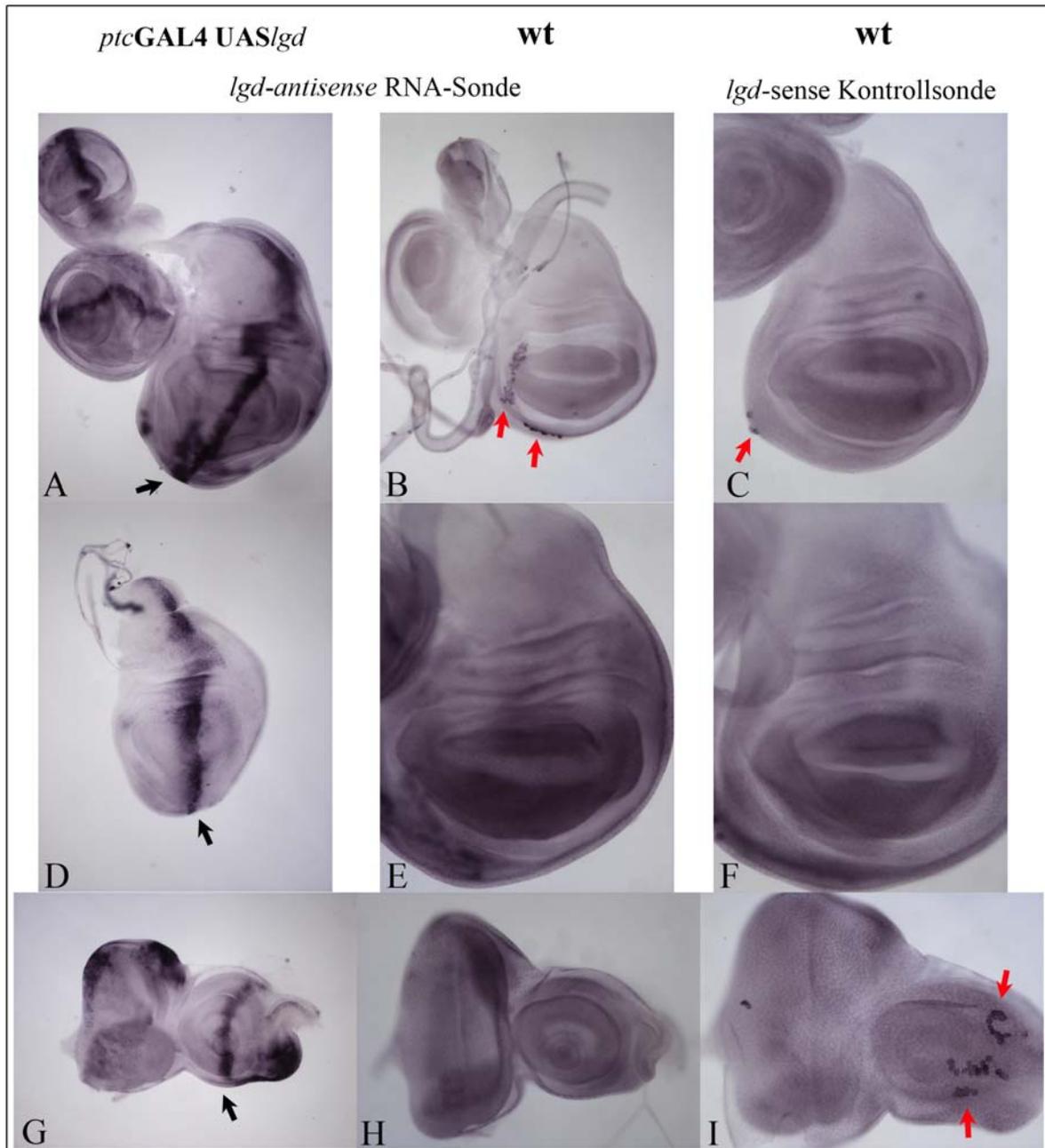


Abb.2.20: *In-situ* mRNA Färbungen zur Überprüfung der *lgd*-Expression in Imaginalscheiben. Die *lgd*-antisense Sonde zeigt in Scheiben, die *lgd* mittels der *ptc*GAL4 Treiberlinie überexprimieren, klare und deutliche Färbung in der *ptc*-Expressionsdomäne entlang der antero-posterioren Kompartimentsgrenze (Pfeil in **A,D,G**). Die endogenen mRNA-Konzentrationen konnten in mehreren Ansätzen nicht unterscheidbar von dem Hintergrund einer *sense*-Sonden Kontrollfärbung beobachtet werden, eine sehr niedrige endogene Expression nahelegend. **A-F** zeigen Flügelimaginalscheiben, **G-I** Augenimaginalscheiben, die ebenfalls eine ubiquitäre Färbung zeigen. Weiße Pfeile zeigen Zellen aus der Peripodialmembrane auf, die unspezifisch sowohl die antisense wie auch die sense-Sonden aufnahmen (**B,C,I**).

2.6. Lgd ist an dem endozytotischen Transport von Notch beteiligt

Eine weitere Beobachtung neben dem ambivalenten Einfluß auf die Notch-Aktivität war die Bildung großer Vesikel in den Zellen, in denen Lgd überexprimiert wurde. In den Vesikeln konnten Wg, N und Dl nachgewiesen werden (Abb.2.21), wobei Notch sowohl mit dem

Antikörper gegen die intra- wie auch mit dem gegen die extrazelluläre Domäne detektierbar war (Abb.2.21 Reihe A). Dieses legt die Möglichkeit nahe, daß die Vesikel den vollständigen Rezeptor enthalten.

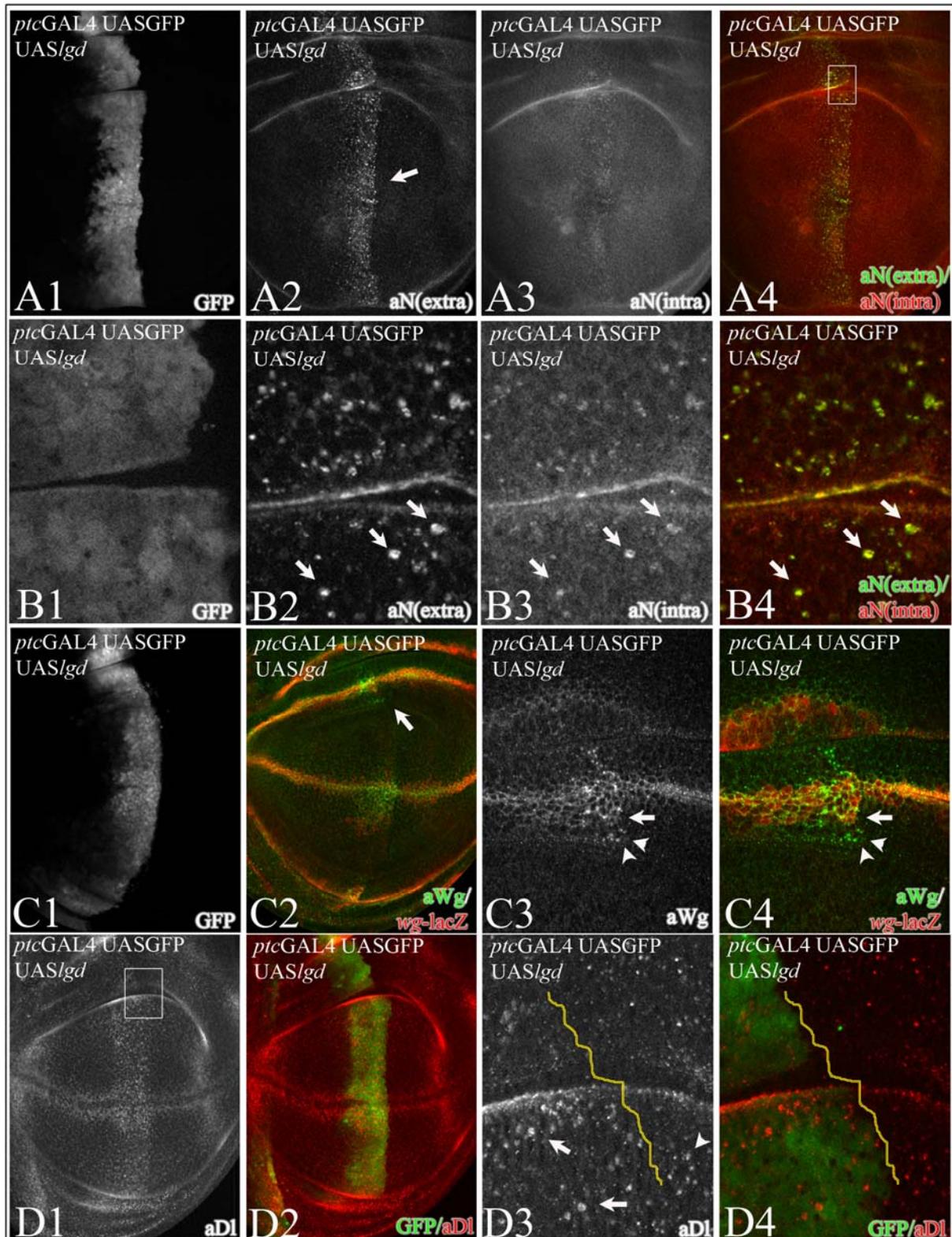


Abb.2.21: Die Überexpression von Lgd beeinflusst die Endozytose. In der Überexpressionsdomäne von Lgd, entlang der antero-posterioren Kompartimentsgrenze, konnte der Notch-Rezeptor in großen Vesikeln nachgewiesen werden, die sowohl den extra- wie den intrazellulären Teil des Rezeptors enthielten, möglicherweise also den vollständigen Rezeptor transportierten (Pfeile in B2-4). Ebenfalls konnte Wg in den

Vesikeln gefunden werden, wobei die Ausdehnung der Vesikel über die Region der Wg-Expression hinausreichte, es also keine sekretorischen Vesikel sein konnten. (Pfeilspitzen in C3-4). Als ein dritter Marker konnte noch Delta in den Vesikeln gefunden werden (Pfeile in D3, gelbe Linie markiert das posteriore Ende des *ptc*-Streifens. Pfeilspitze zeigt kleinere DL-enhaltende Vesikel außerhalb der Lgd-Überexpressionsdomäne). Jeweils vergrößert: C3 und C4 zeigen die mit einem Pfeil gekennzeichnete Region aus C2, B1-4 die umrahmte Region aus A4, D3-D4 die umrahmte Region aus D1.

Um die Natur dieser Vesikel zu klären wurde die Verteilung von Wg in den Scheiben näher untersucht. Das Glykoprotein Wingless kann als ein sekretierter Ligand in einer Entfernung von bis zu mehreren Zelldiametern von seiner Expressionsquelle in Zellen aufgenommen und dort detektiert werden (Gonzalez et al., 1991; Strigini and Cohen, 1999). Die Verteilung der Zellen mit Wingless-enhaltenden Vesikeln wurde nun mit den Wingless-exprimierenden Zellen verglichen. Hierzu wurde bei Überexpression von Lgd die Wg-Expression und Aktivität von *wg-lacZ* beobachtet, welches β -Galaktosidase (β -Gal) als Indikator für *wg*-exprimierende Zellen ausprägt. Eine Doppelfärbung gegen Wg und die β -Gal zeigte nun, daß in der Domäne der Lgd-Expression Wg auch in Zellen zu finden war, in denen es nicht ausgeprägt wurde (Abb.2.21 Pfeilspitzen in C3-4). Das in den Vesikeln akkumulierte Wg muß also von Außen durch Endozytose aufgenommen worden sein. Daraus folgt, daß Lgd eine Funktion während der Endozytose oder des endosomalen Vesikeltransports haben muß.

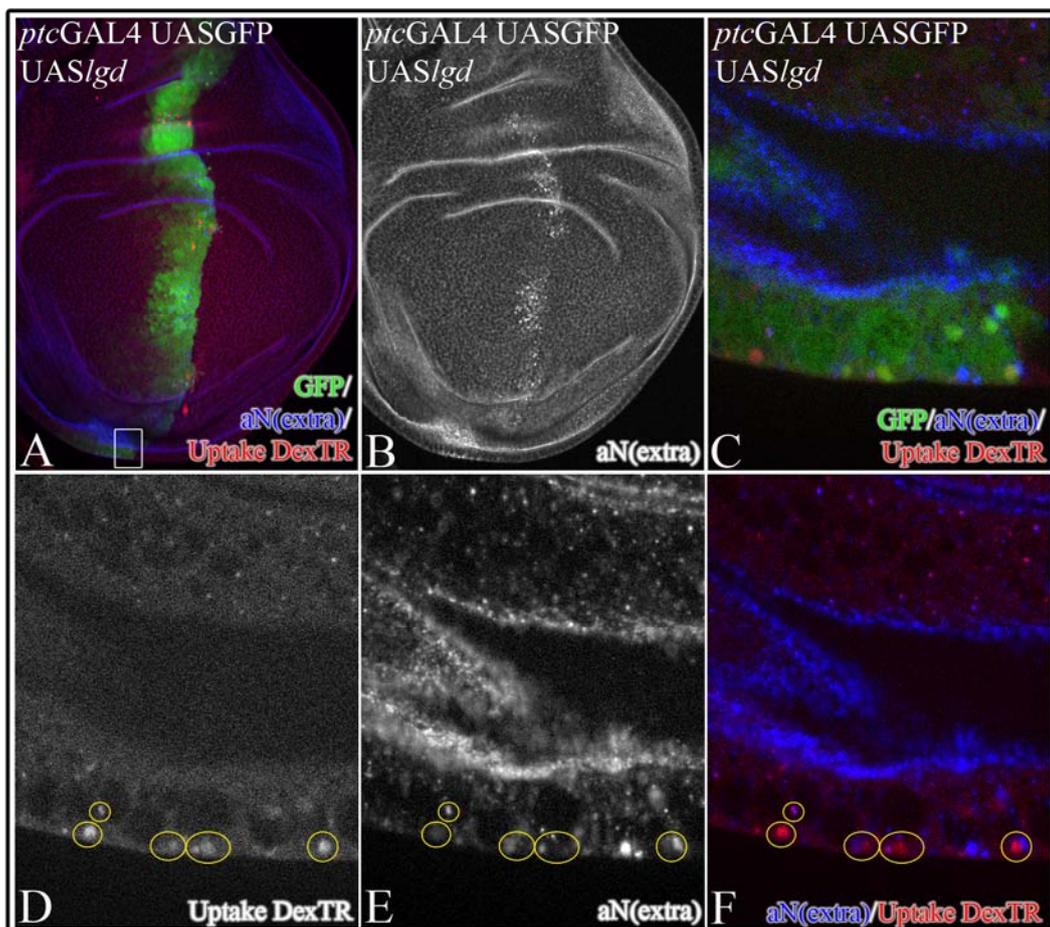


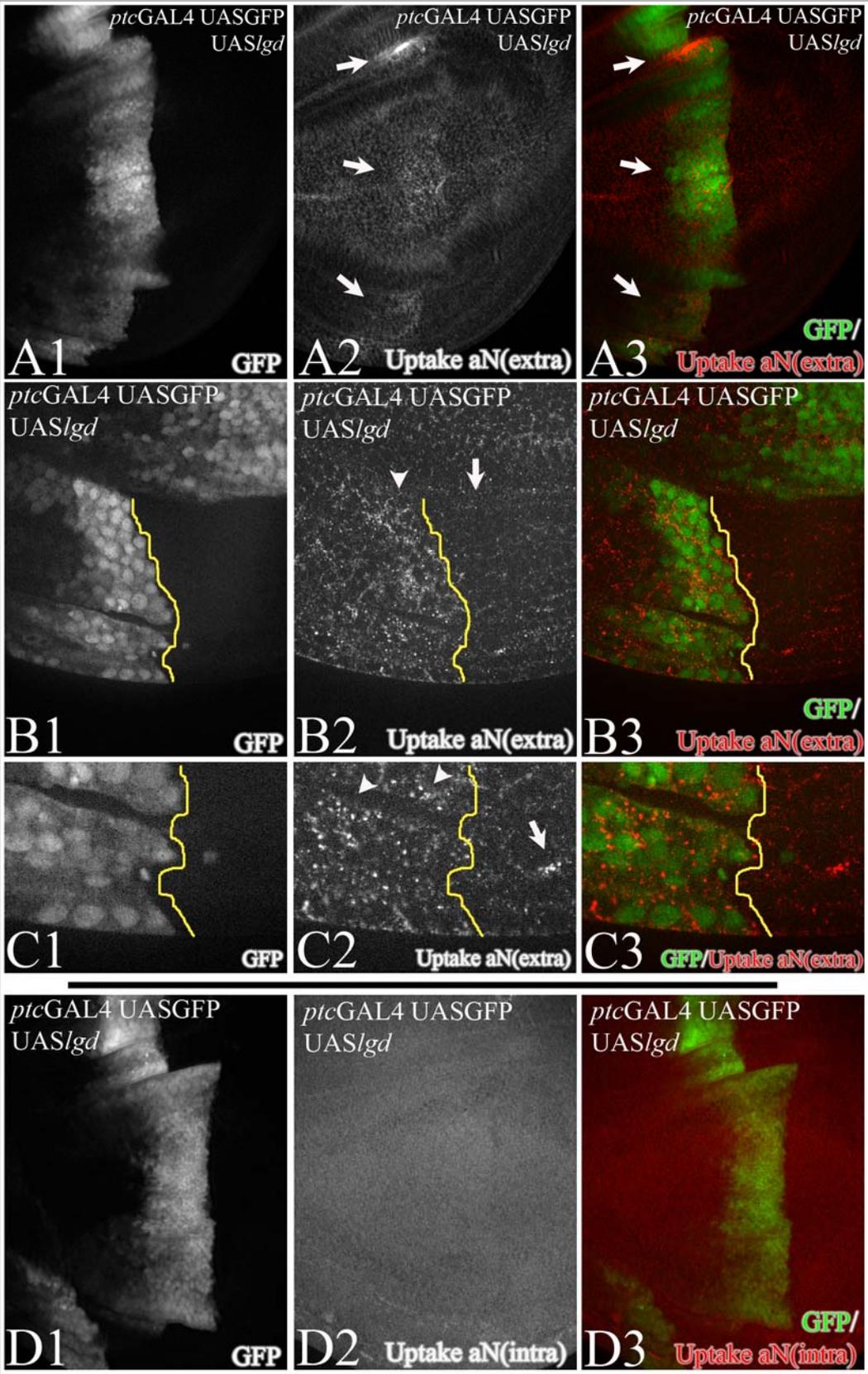
Abb.2.22: Dextran TexasRed *uptake* bei Lgd-Überexpression. Zur Bestätigung, daß die Vesikel Endosomen sind, wurden *uptake*-Experimente unternommen, in denen unspezifische Fracht wie Dextran TexasRed in der Domäne der Lgd-Überexpression in großen Vesikeln akkumulierte (umkreist in **D**). Viele der Dextran TexasRed enthaltenden Vesikel enthalten auch Notch, wie hier anhand einer nach dem *uptake* konventionell durchgeführten Antikörperfärbung gezeigt wurde (mit Kreisen gekennzeichnete Vesikel in **D-F**). **C-F** zeigen die umrahmte Region an der Spitze der Flügelimaginalscheibe aus **A** vergrößert dar.

Zur Bestätigung der Involvierung von Lgd in endozytische Prozesse wurden anschließend *uptake*-Experimente entweder mit Dextran, das mit einem Fluoreszenzfarbstoff konjugiert war (Dextran TexasRed) oder mit Antikörpern gegen wahlweise die extra- oder die intrazelluläre Domäne von Notch (N(extra/intra)) durchgeführt. Bei diesen Experimenten wurden Flügelimaginalscheiben präpariert und anschließend über eine Zeitspanne in Medium (PBS) mit einer der oben erwähnten Substanzen inkubiert. Findet in den Scheiben Endozytose statt, so wird an diesen Stellen unspezifisch das Dextran TexasRed, bzw. nach einer Bindung an Notch, spezifisch der N(extra) Antikörper in die Zellen aufgenommen. Mit dem N(intra) Antikörper dürfte sich hingegen keine Aufnahme in die Zellen zeigen lassen, da sein Epitop unter der zu diesem Zeitpunkt noch unpermeablen Zellembraun lag (für Details vor allem zur Verhinderung unspezifischer Aufnahme der Antikörper siehe Material+Methoden).

Sowohl für Dextran TexasRed (Abb.2.22 D,F) wie für den N(extra) Antikörper (Abb.2.23 Reihen B und C) konnte in den Regionen der Lgd-Überexpression Aufnahme in die Zellen festgestellt werden. In vielen Dextran TexasRed positiven Vesikeln konnte in einer anschließenden konventionellen Antikörperfärbung ebenfalls Notch gefunden werden, was entweder auf eine simultane Aufnahme oder spätere Verschmelzung der Vesikel hindeuten würde (Abb.2.22 F). Die Ergebnisse aus den N(extra)-*uptake*-Experimenten zeigen die erste der beiden Möglichkeiten als sehr wahrscheinlich an. Die Spezifität der N(extra)-Antikörper Aufnahme bestätigte die Tatsache, daß kein N(intra)-Antikörper in vergleichbaren Experimenten aufgenommen wurde (Abb.2-23 Reihe D).

Abb.2.23: *Uptake* Experimente mit den Antikörpern gegen die extra- und intrazelluläre Domäne des Notch-Rezeptors. In den Bereichen der Lgd-Überexpression sind in Vergleich zu umgebenden Bereichen mehr Notch-enthaltende Vesikel festzustellen (Pfeile in **A2**, **A3**, Region unterhalb der Pfeilspitze gegen die unterhalb des Pfeils in **B2**, Pfeilspitzen in **C2**). Nur sporadisch sind vergleichbare Vesikel auch in der benachbarten Domäne feststellbar (Pfeil in **C2**). Die Spezifität der Aufnahme von dem Antikörper gegen die extrazelluläre Domäne von

Notch bestätigte in parallel durchgeführten Experimenten die fehlende Aufnahme des N(intra)-Antikörpers (**D1** und **D2** – nur Hintergrundfärbung beobachtbar) Gelbe Linie in Reihen **B** und **C** markiert die posteriore Grenze der *ptcGAL4*-Expressionsdomäne. Reihen **B** und **C** zeigen die Scheibenspitze aus **A** vergrößert dar.



Um die Beteiligung von Lgd an endozytotischen Prozessen zu bestätigen wurde nun die Verteilung von Notch ebenfalls in *lgd*-mutanten MARCM Klonen untersucht. In diesen Klonen geht durch die Rekombination, die mutante Zellen erzeugt, zusätzlich der Transkriptionsrepressor GAL80 verloren, so daß danach die Transkription von GAL4/UAS-Transgenen eingeschaltet wird, wie z.B hier UAS-GFP zur Markierung der Klone (Lee et al., 2000). Genau wie im Falle der Überexpression konnte durch Antikörperfärbungen in den Klonen das Auftreten großer, Notch-enthaltender Vesikel beobachtet werden, wobei die Aktivität des synthetischen Gbe+Su(H)_{m8} Konstruktes als Indikator für die tatsächliche Notch-Aktivität in den Klonen diente. Neben Notch konnte auch wieder Delta (Abb.2.25 Säule E), Wingless, (Abb.2.25 Säule F) sowie in Uptake-Experimenten Dextran TexasRed in den Vesikeln gefunden werden, was deren endozytischen Ursprung nun auch in der mutanten Situation bestätigte (Abb.2.24 B4-6).

Wichtig hierbei ist ebenfalls, daß trotz des massiven Auftretens großer, Notch-enthaltender Vesikel weder bei Lgd-Überexpression noch in der *lgd*-mutanten Situation eine sichtbare Veränderung der Notch-Konzentration an der Zelloberfläche festgestellt werden konnte (Abb.2.24 A2-3, rote Pfeile). Das in den Vesikeln detektierbare Notch wird also durch Endozytose in die Zellen aufgenommen, doch basiert dieser Effekt nicht etwa auf einer generellen Steigerung der Endozytoserate. Es scheint eher, daß die der Endozytose nachfolgenden Prozesse beeinflußt oder beeinträchtigt werden und dieses sich sodann in der vesikulären Akkumulation von Notch niederschlägt. Wie bei der Lgd-Überexpression (Abb.2.21) kann in den Vesikeln der *lgd*-MARCM Klone Notch ebenfalls mit den Antikörpern gegen die extra- wie gegen die intrazelluläre Domäne detektiert werden (Abb.2.25 Säule D), was auch hier die Möglichkeit nahelegt, daß das gesamte Protein in den Vesikeln enthalten ist.

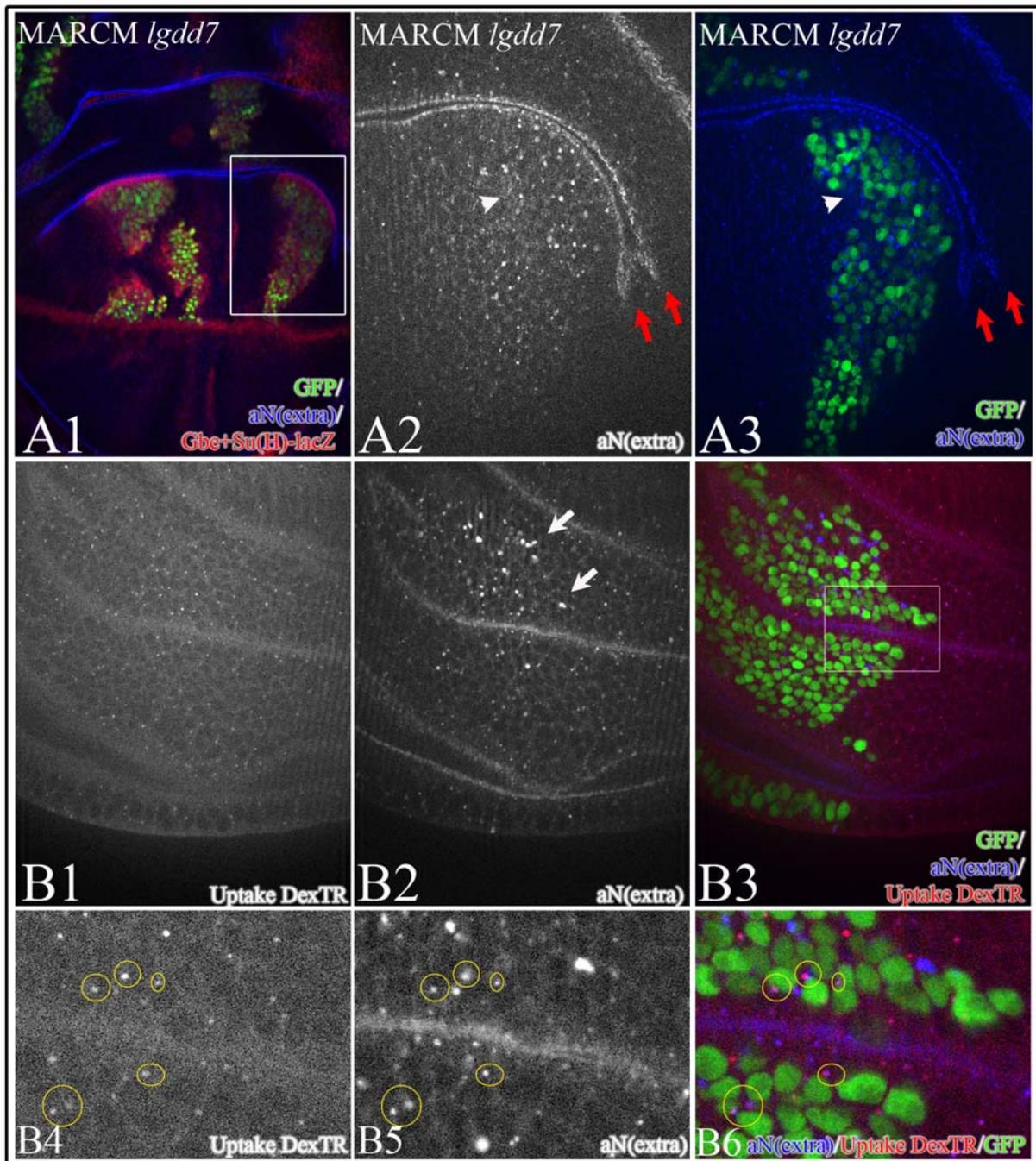


Abb.2.24: Notch kann neben der Überexpressionssituation (Abb. 2.19) auch in MARCM *lgd^{d7}*-Klonen innerhalb großer Vesikeln detektiert werden (A2-3, B2,3,5,6). Der Ausfall der *lgd*-Funktion konnte dabei über die erhöhte Aktivität des Gbe+Su(H) Indikators der Notch-Aktivität in den Klonen bestätigt werden (A1 und Abb.2.26). Wichtig in A2-3: Trotz des massiven Vorkommens großer Notch-enthaltender Vesikel in den Klonen kann keine Veränderung der Notch-Konzentration an der Zellmembran gefunden werden. Rote Pfeile zeigen die apikale Lokalisation von Notch entlang der Falte vollkommen vergleichbar entlang der *lgd*-Klone mit den wildtypischen Zellen auf der anderen Seite der Falte. Die Akkumulation in den Vesikeln in den Klonen ist also nicht auf eine verstärkte Aufnahmerate des Rezeptors dort zurückzuführen. Die Notch-enthaltenden Vesikel sind wie im Falle der Überexpression endocytotischer Natur, wie die Koloalokalisation mit Dextran TexasRed in *uptake*-Experimenten zeigt (Umkreiste Vesikel in B4-B5)

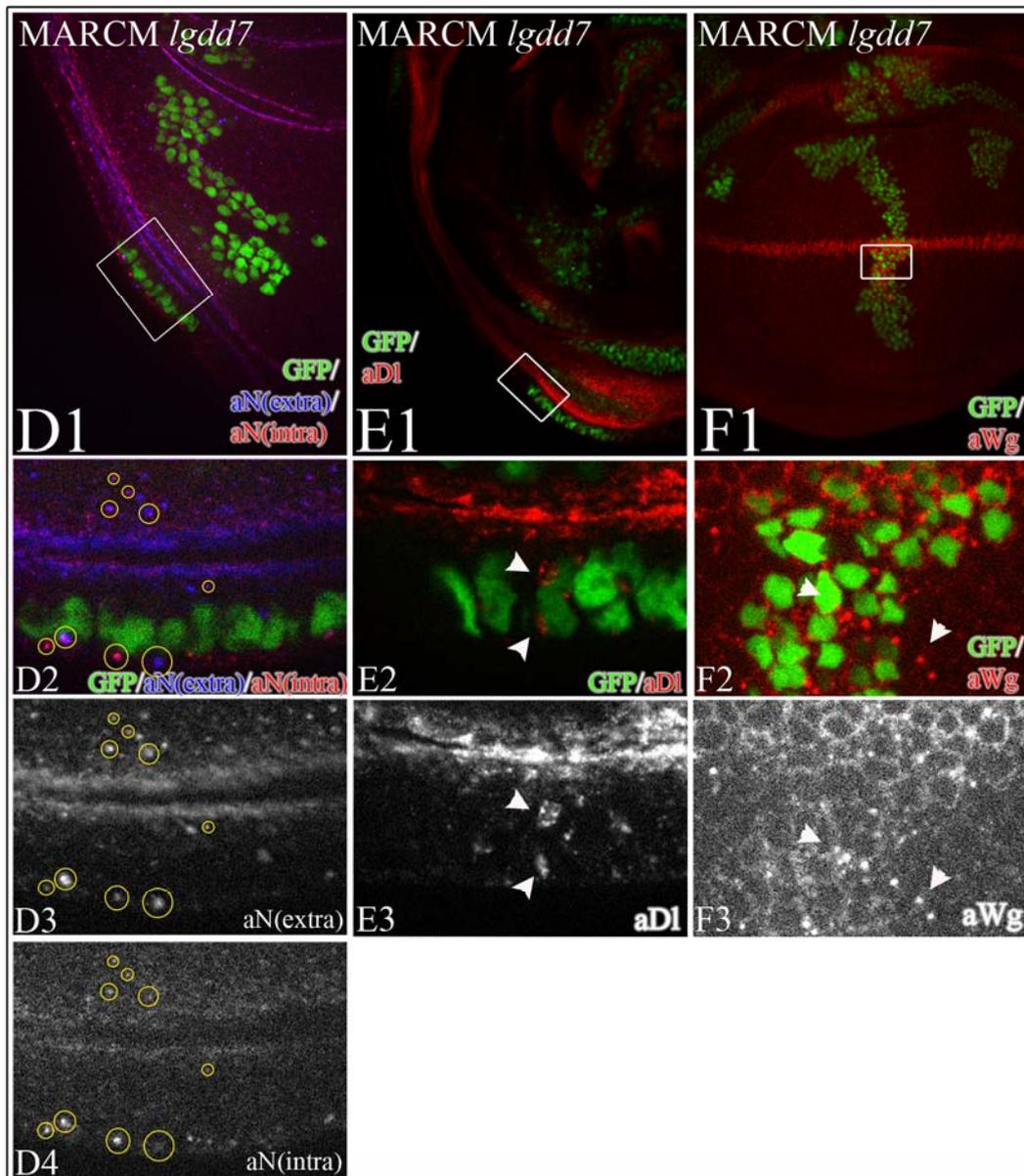


Abb.2.25: Analyse der MARCM *lgd^{d7}*-Klone Teil II. In vielen Vesikeln können wieder sowohl der extra- wie der intrazelluläre Teil des Notch-Rezeptors (gelb umkreiste Vesikel in **D2-D4**) detektiert werden, sie enthalten also wahrscheinlich das vollständige Protein. Neben Notch wird wie in der *Lgd*-Überexpressions-situation wieder *Dl* und *Wg* in den Vesikeln detektiert. (markiert mit Pfeilspitzen Vesikel enthaltend: *Dl* in **E2+E3**, sowie *Wg* in **F2+F3**)

2.6.1. Die Zellpolarität ist in *lgd*-Klonen unbeeinflusst

Die unbeeinflusste apikale Lokalisierung von Notch in den MARCM *lgd^{d7}*-Klonen (Abb.2.24 A2-3) deutet darauf hin, daß die *lgd*-Mutation keinen Einfluß auf die apiko-basale Zellpolarität hat. Dieses wurde auch schon aufgrund morphologischer Daten in früheren Untersuchungen als solches festgestellt (Ryerse and Nagel, 1984). Um diese Daten auch genauer auf molekularer Ebene zu bestätigen, ist zusätzlich zu Notch die Lokalisierung von den Zellpolaritätsmarkern Crumbs (*Crb* – apikal, oberhalb der zonula adherens), der

atypischen Proteinkinase ζ (aPKC ζ - apikal, unterhalb/überlappend mit Crb) und Discs-large (Dlg – baso-lateral) untersucht worden (Übersichtsartikel siehe: (Bilder, 2004)).

Auch hierbei konnte keine Veränderung der Lokalisierung dieser Proteine in den *lgd*-Klonen festgestellt werden (Abb.2.26), die Mutation hat also keinen Einfluß auf die apiko-basale Zellpolarität. Kolokalisation von aPKC ζ und Notch (Abb.2.26 B1-2) zeigt nochmal die apikale Lokalisation von Notch auf.

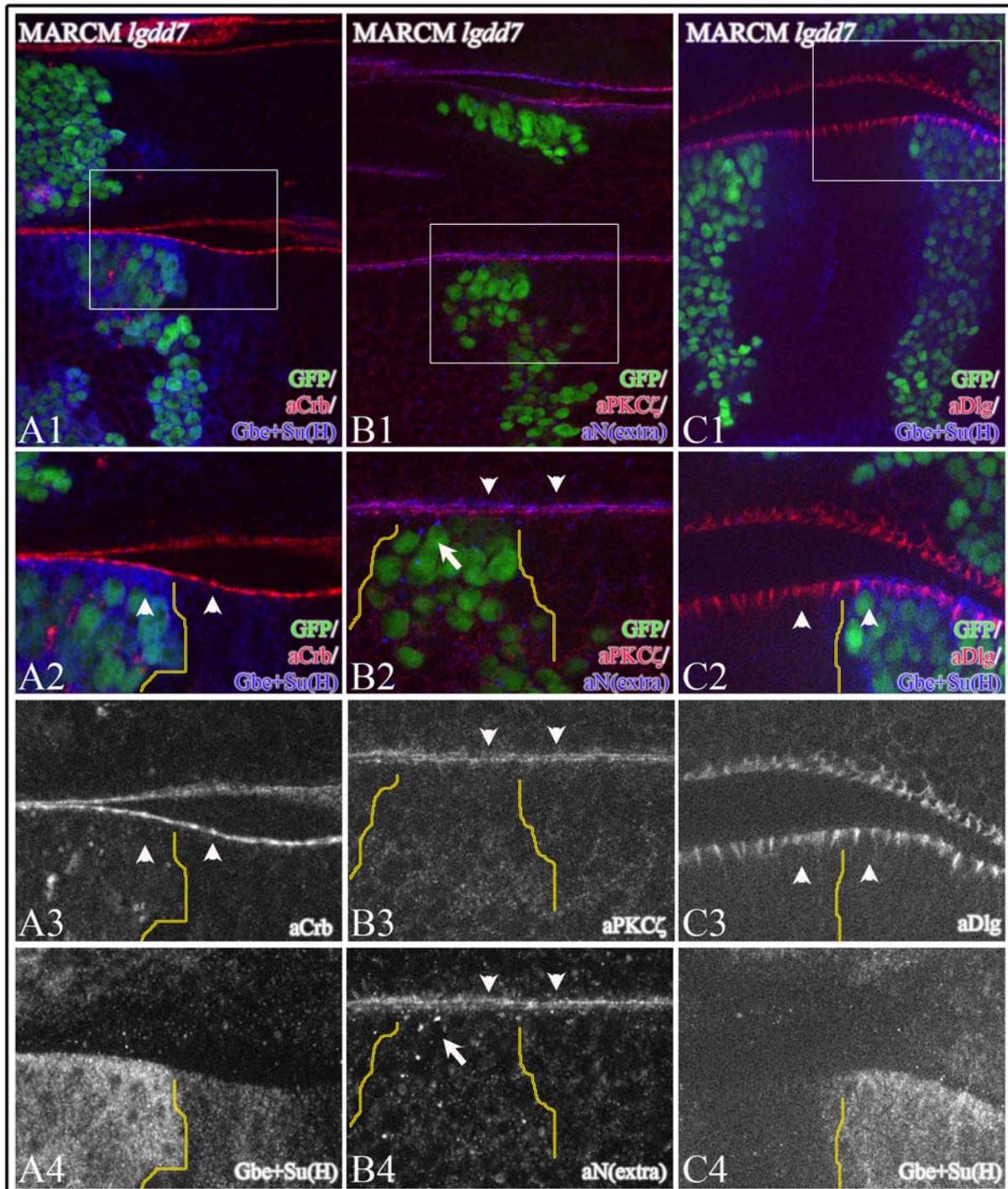


Abb.2.26: Ausfall der *lgd*-Funktion in MARCM *lgd^{d7}*-Klonen hat keinen Einfluß auf die Zellpolarität. Vergleicht man mutantes mit umgebenden wildtypischen Gewebe, so ergeben sich keinerlei Veränderungen in Bezug auf die Lokalisierung der untersuchten Zellpolaritätsmarker Crb (Säule A), aPKC ζ (Säule B) oder Dlg

(Säule C). Die Grenzen der Klone sind den untersten beiden Bilderreihen mittels gelber Linien gekennzeichnet worden. Pfeilspitzen zeigen die unveränderte Lokalisation der untersuchten Marker innerhalb und außerhalb der Klone auf. Als Bestätigung der mutanten Natur der Klone ist die Aktivität des Gbe+Su(H)-lacZ- Konstrukts (A und C), bzw. das Auftreten großer, Notch-enthaltender Vesikel (B, Pfeil in B2,4) verfolgt worden. Notch kolokalisiert im apikalen Bereich der Zellmembran mit aPKC ζ (B2-lila Färbung im Überlappungsbereich). Bilder 2-4 stellen jeweils Vergrößerungen der in den oberen Bildern umrahmten Bereiche dar.

In den nun anschließenden Experimenten wurden Antikörper gegen die endosomalen Markerproteine Rab5, Rab7, Rab11, Hrs sowie GFP-Fusionskonstrukte mit Rab-Proteinen (Rab5/7-GFP) sowie mit der, für die Lipidbindung verantwortlichen, FYVE*-Domäne aus Hrs (FYVE-GFP) zur Identifizierung des Notch-enthaltenden endosomalen Kompartiments benutzt.

2.6.2. Analyse der endosomalen Kompartimentierung von Notch

Zunächst wurde die Lgd-Überexpressionssituation betrachtet. Zu diesem Zweck wurde UAS-*lgd* mit Hilfe einer *ptcGAL4*-Treiberlinie in einem Streifen entlang der antero-posterioren Flügelkompartimentsgrenze exprimiert. In immunhistologischen Flügelscheibenpräparationen wurde dann der Einfluß der Überexpression auf die zelluläre Verteilung der Vesikelmarker sowie, falls gegeben, ihre Kolokalisation mit Notch in entsprechenden Vesikeln untersucht. Wie die Abbildung 2.27 Reihe A zeigt, hatte die Lgd-Überexpression den größten Einfluß auf die zelluläre Verteilung von Rab5. In der Überexpressionsdomäne läßt sich ein verstärktes Auftreten großer, Rab5-positiver Vesikel beobachten. Betrachtet man wie oben beschrieben an den Flügelimaginalscheibenfalten oder an der Scheibenspitze die Zellen in der ganzen Länge von apikal nach basal, so erkennt man, daß in den großen Vesikeln, die in der Region der Lgd-Überexpression entstehen, Rab5 und Notch vorwiegend im apikalen Bereich kolokalisieren (umkreist in Abb 2.27 A2-4).

* benannt nach den ersten vier Proteinen in denen es entdeckt wurde: Fab1, YOTB, Vas1, EEA1

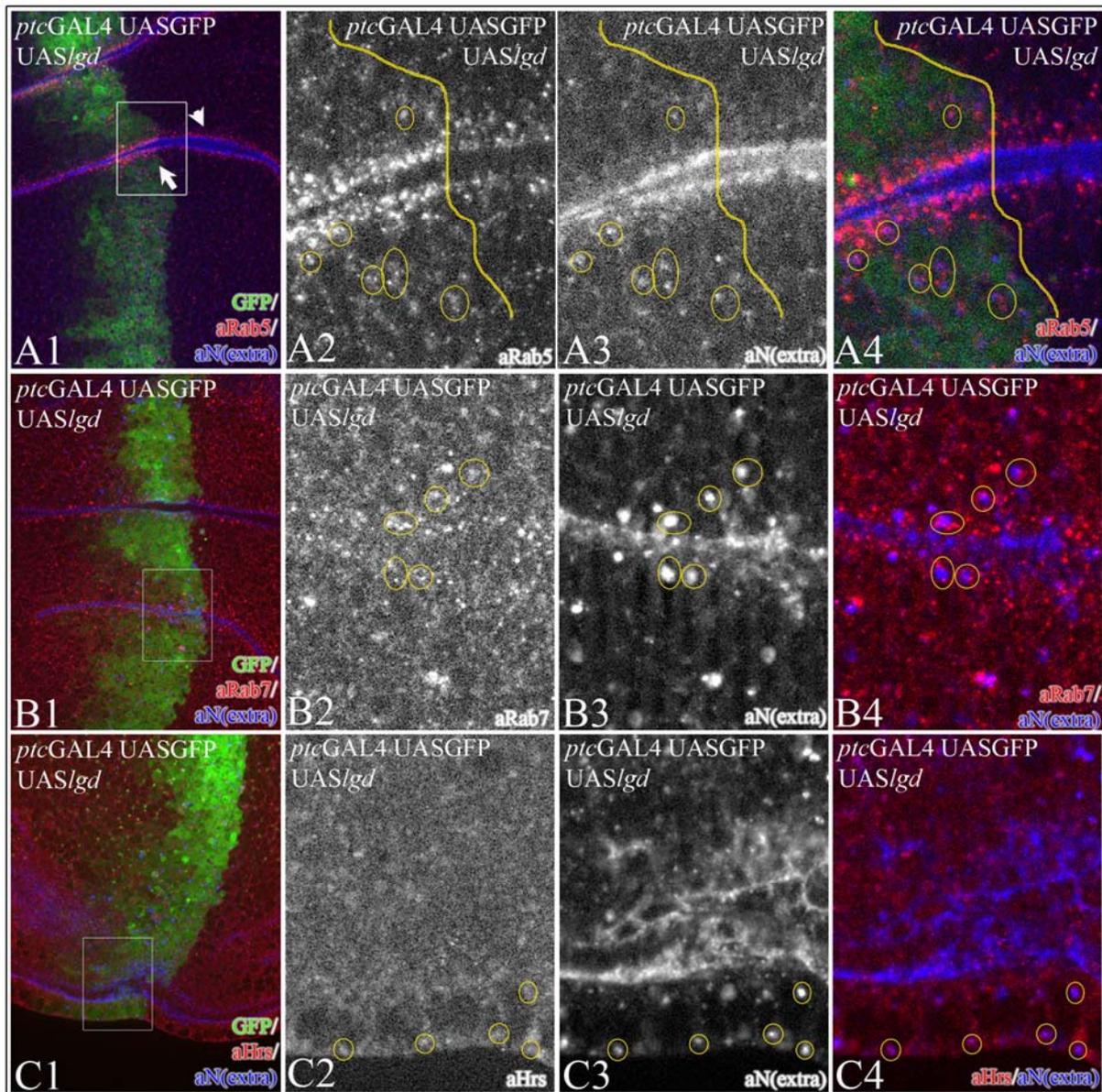


Abb.2.27: Die Notch-enhaltenden Vesikel in dem Bereich der Lgd-Überexpression assoziieren mit Rab5 (Reihe A) und Rab7 (Reihe B) und in einem schwächeren Maße mit Hrs (Reihe C) – jeweils einige Vesikel durch Umkreisung hervorgehoben. In der Lgd-Überexpressionsdomäne konnte neben der Assoziation mit Rab5 auch verstärktes Auftreten großer, Rab5-positiver Vesikel beobachtet werden und eine verstärkte Assoziation von Rab5 an die apikale Zellmembran. (Vergleiche Rab5-Akkumulation im Gebiet der Lgd-Überexpression, links der gelben Markierung in A2/A4 -Pfeil in A1 gegen wildtypische Region rechts der *ptc*-Domäne/der gelben Markierung in A2/A4 – Pfeilspitze in A1)

In gleicher Weise wie für Rab5 wurde der Einfluß der Lgd-Überexpression auf die weiteren Marker untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, daß die Notch-positiven Vesikel ebenfalls eine Kolokalisation mit dem Marker für das spätendosomale Kompartiment Rab7 (umkreist in Abb.2.27.B2-4) zeigen sowie, in etwas schwächeren Maße, eine Assoziation mit Hrs (umkreist in Abb.2.27 C2-4), dem Marker für reifende Endosomen und die MVB's.

Dagegen konnte keine Assoziation der Notch-enthaltenden Vesikel mit Rab11, dem Marker des Recycling-Kompartiments oder mit dem Golgi-Marker Lava Lamp festgestellt werden. (Abb.2.28).

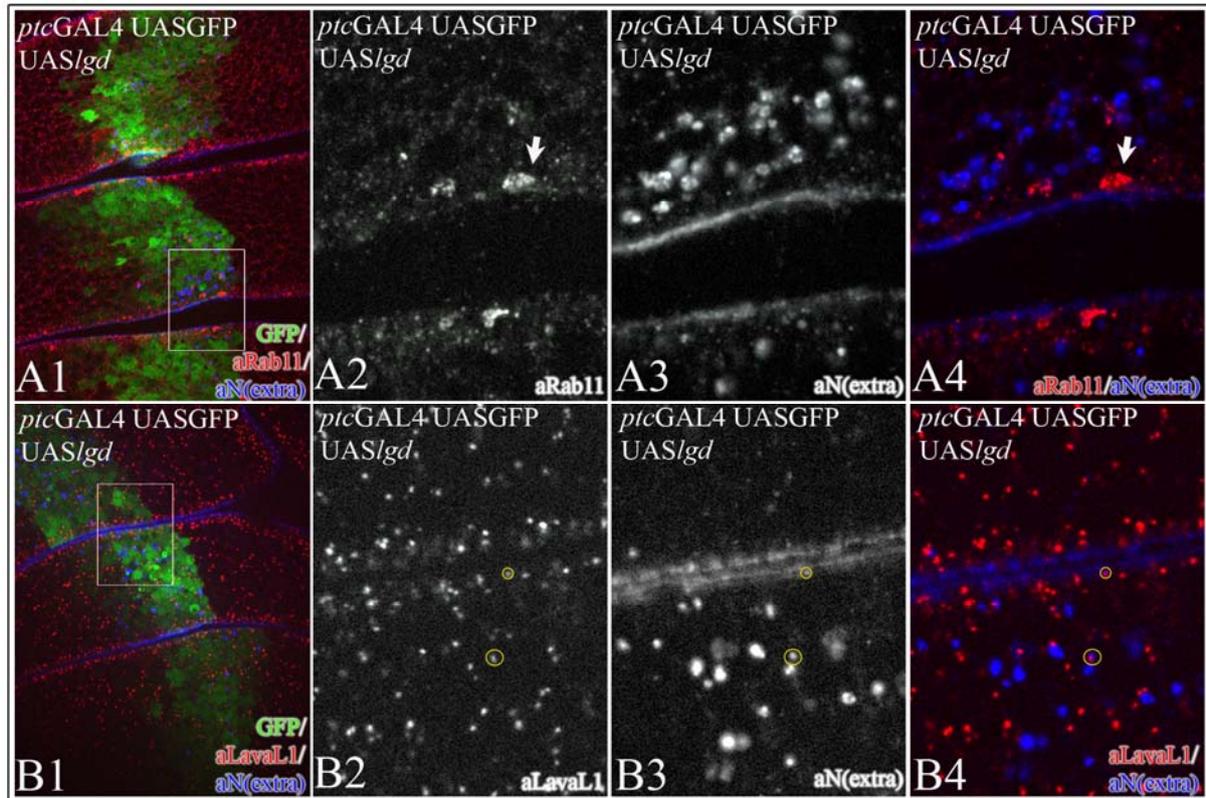


Abb.2.28: Die durch die Überexpression von Lgd entstandenen großen, Notch-enthaltenden Vesikel zeigen keine Assoziation mit Rab11, dem Marker des wiederverwertungs-Kompartiments oder mit LavaLamp, einem Golgi-spezifischen Marker. Rab11-positive Vesikel an der Zellmembran (Pfeil in **A4**) zeigen keine Assoziation mit den Notch-enthaltenden Vesikeln, noch Anzeichen einer veränderten Lokalisation in Vergleich zu Gebieten außerhalb der Lgd-Überexpressionsdomäne (*ptc*-Streifen, visualisiert mit GFP in **A1** und **B1**). Sporadisch zeigen kleine, Notch-enthaltende Vesikel eine Assoziation mit dem Golgimarker Lavalamp (umkreist in **B2-4**), für die großen Vesikel ist jedoch keine Assoziation feststellbar. Bilder **A/B-2-4** zeigen jeweils Vergrößerungen der umrahmten Gebiete aus **A/B-1**.

Das massive Auftreten Rab5-positiver Vesikel in der Überexpressionsdomäne von Lgd ist dabei auf Vorgänge zurückzuführen, die dessen intrazelluläre Verteilung und nicht etwa die Expression beeinflussen. Dieses wurde in einem Kontrollexperiment durch *in-situ* Färbungen von Flügelscheiben, die ebenfalls mittels der *ptc*GAL4-Treiberlinie Lgd exprimierten, mit einer *rab5*-mRNA spezifischen Sonde festgestellt (Abb.2.29).

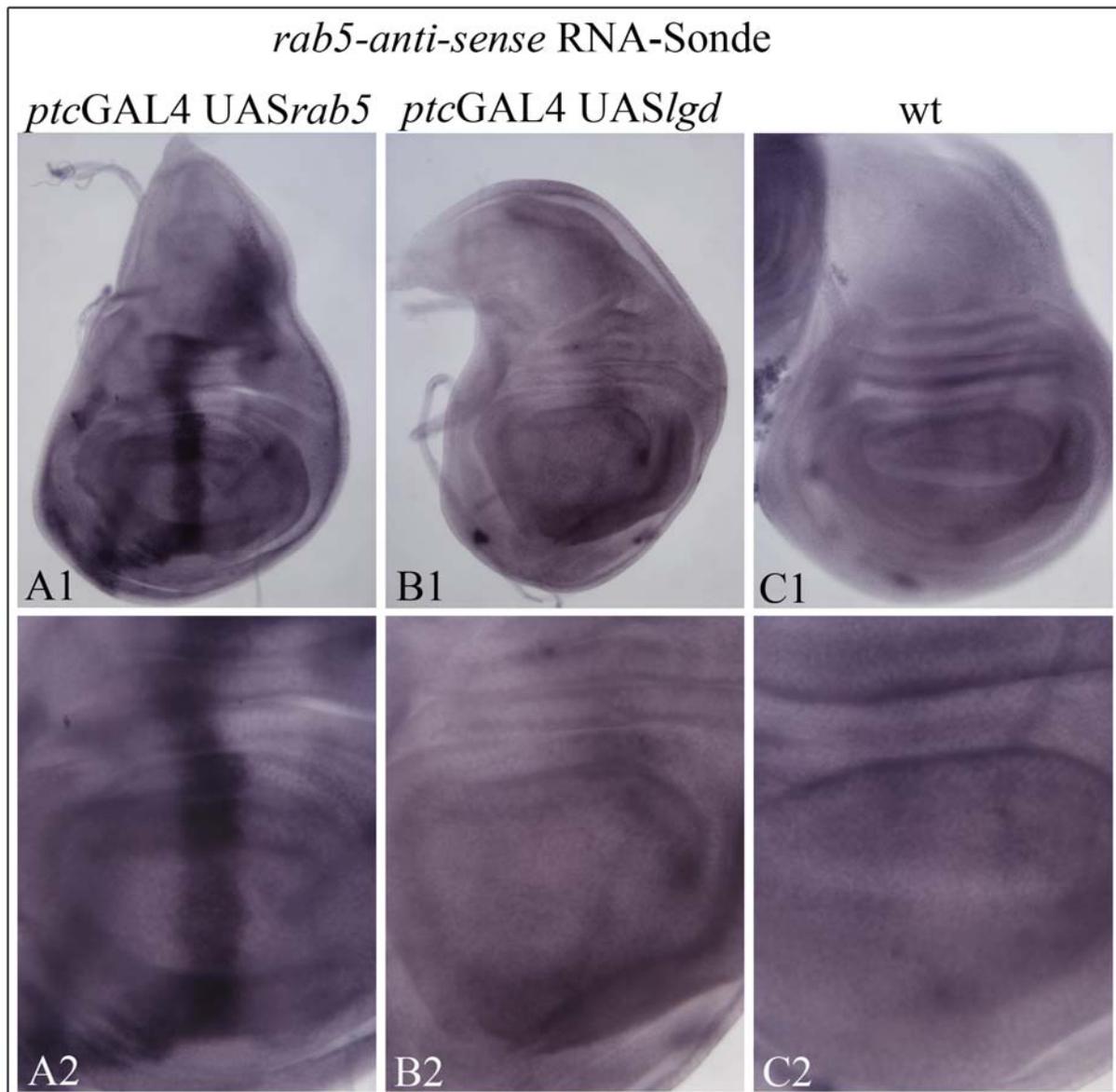


Abb.2.29: *In-situ* Färbungen zur Feststellung der *Rab5*-Expression. Die Spezifität der Sonde ist in A1 und A2 anhand von Imaginalscheiben angezeigt, in denen mittels *ptcGAL4* *Rab5* überexprimiert wurde. Keine erhöhte Transkription ist in Scheiben, die *Lgd* überexprimieren in Vergleich zum Wildtyp festzustellen. Die Überexpression von *Lgd* und dessen Effekte auf den endosomalen Transport basieren also nicht auf einer veränderten *Rab5*-Expression.

Wenn *Lgd* an dem endosomalen Transport von Notch und Wg beteiligt ist, so müssten doch ebenfalls bei dem Ausfall seiner Genfunktion Effekte auf deren endozytotische Kompartimentierung zu sehen sein. Wie bereits oben beschrieben kann in *lgd*-mutanten Klonen die Bildung großer, Notch oder Wingless enthaltender Vesikel beobachtet werden. Sie wurden in gleicher Weise wie bei der Überexpression auf Kollokalisierung mit den Markern der unterschiedlichen endosomalen Kompartimente hin untersucht. Hierbei ergab sich wiederum eine sehr starke Kollokalisierung der entstandenen Vesikel mit *Rab5*, dem Marker früher

Endosomen (Abb.2.30 A2-4). Es konnte auch, wie in der Überexpression, eine Assoziation der Vesikel mit Rab7 (Umkreiste Vesikel in Abb.2.30 B2-4) und eine schwächere mit Hrs (Abb.2.30 C2-4) festgestellt werden.

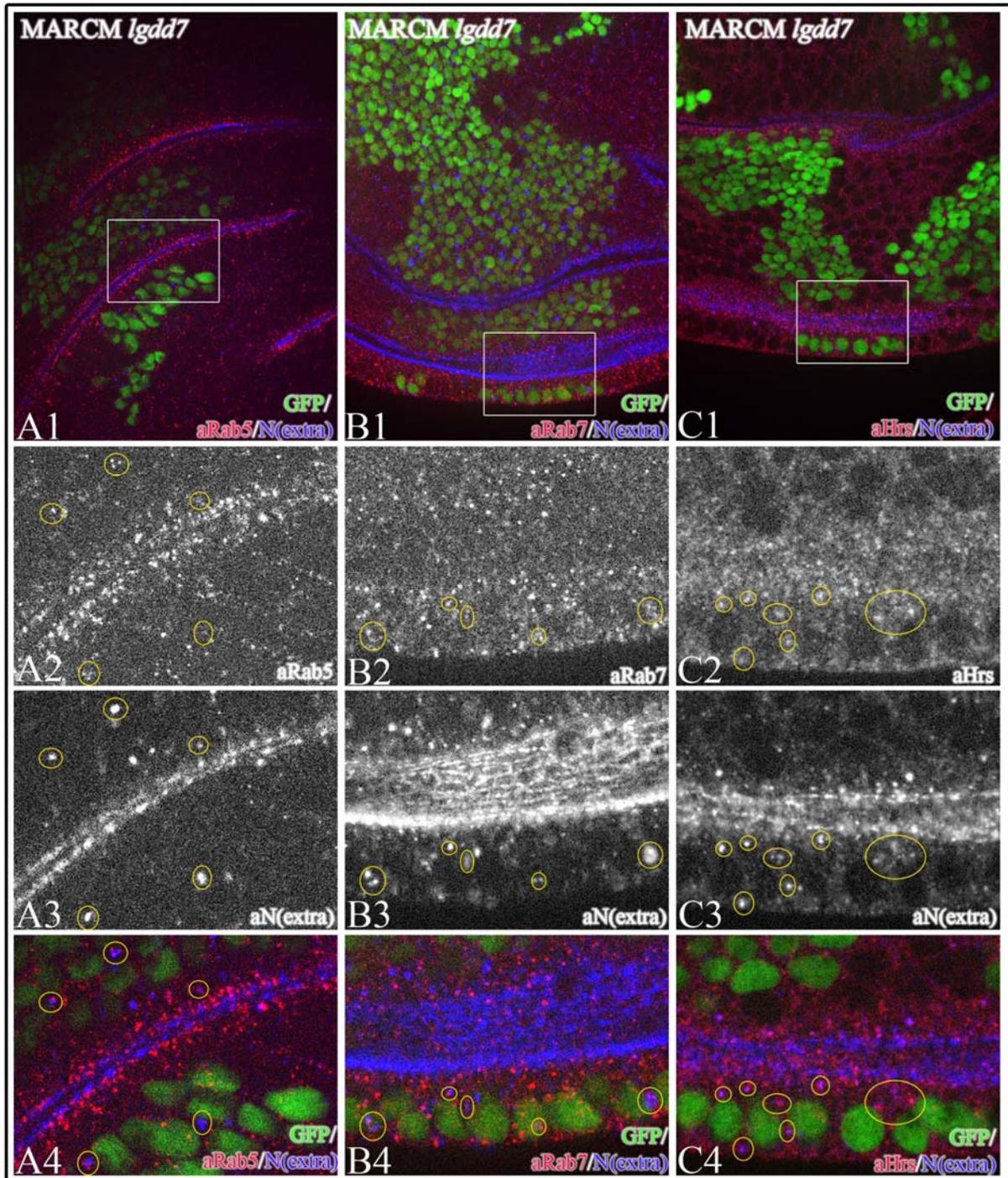


Abb.2.30: In MARCM-*Igdd^{d7}*-Klonen konnte Notch in Assoziation mit Rab5 (einige Vesikel in **A2-4** markiert) und Rab7 (**B2-4**) gefunden werden. Ebenfalls gegeben, wenn auch im schwächeren Ausmaß war die Assoziation mit Hrs (**C2-4**). Untere drei Bilder stellen Vergrößerungen der umrahmten Bereiche in oberen Übersichtsbildern dar. In Vergleich zur *Lgd*-Überexpression (Abb.2.27) konnte in den *Igd*-Klonen kein verstärktes Auftreten Rab5-positiver Vesikel festgestellt werden.

Zusammengefaßt legen die Ergebnisse aus den Lgd-Überexpressionsexperimenten nahe, daß durch die Überexpression von Lgd die Endozytose in einem Stadium nach der Bildung des frühen Endosoms (große, Rab5-positive Vesikel) beeinträchtigt wird, wahrscheinlich in dem reifenden Endosom, was die Assoziation mit Hrs und Rab7 nahelegt.

2.6.3. Suppressierender Einfluß von Rab5-, Rab7- und FYVE-GFP auf den *Igd* Phänotyp

Während der Untersuchungen zur Kompartimentierung von Notch in der Lgd-Überexpressionssituation wurden neben den Antikörpern auch Rab-GFP-Fusionsproteine auf ihre Eignung als Kompartimentmarker untersucht. Dabei fiel eine induktive Eigenschaft dieser Konstrukte auf den endosomalen Transport auf, über die auch schon von anderen Gruppen berichtet wurde. Die Überexpression von sowohl Rab5-GFP wie Rab7-GFP führt nämlich zur Akkumulation großer Vesikel in den Zellen (Bucci et al., 1992; Stenmark et al., 1994; Wucherpfennig et al., 2003). Rab-Proteine sind während des endosomalen Transports an der Bildung der Vesikel, deren tubulinabhängigen Transport und an Membranfusionsvorgängen zwischen den Vesikeln und ihren endosomalen Zielkompartimenten verantwortlich (Zerial and McBride, 2001). Allerdings bleibt auch die Expression des FYVE-GFP Konstruktes, das keinerlei katalytische Domänen sondern nur zwei Kopien der lipidbindenden FYVE-Domäne aus Hrs mit dem GFP fusioniert, nicht ohne Folgen auf den intrazellulären Vesikeltransport. Bei hohen Expressionsraten verdrängt es den Rab5-Effektor EEA1 von den Membranen früher Endosomen und führt zu deren Vergrößerung (Gillooly et al., 2000). Ferner kann, wie für den aktivierten EGF-Rezeptor gezeigt wurde, eine Expression von FYVE-GFP dessen Einsortierung in die MVBs verhindern, während der generelle Transport vom frühen ins späte Endosom unbeeinflusst bleibt (Petiot et al., 2003). Die FYVE-Domäne bindet spezifisch an Phosphatidyl-Inositol-3-Phosphat (PI3P) welches besonders in luminalen frühen Endosomen und internen Vesikeln der MVBs angereichert ist (Gillooly et al., 2000) und von mehreren Endozytose-Effektoren als eines der Bindsignale benutzt wird (auch von Rab5 mit EEA1 (Petiot et al., 2003; Simonsen et al., 1998)). Zumindest für FYVE-GFP wäre also ein dominant negativer Effekt naheliegend, in dem bei FYVE-GFP Expression dieses die Phosphatidyl-Inositol-3-Phosphate (PI3P) in den Vesikeln „maskieren“ und die Bindung anderer Effektoren verhindern würde.

Da in den Lgd-Überexpressionsexperimenten eine starke Kolo­kalisierung zwischen Notch-positiven Vesikeln und Rab5-GFP (die Bestätigung mit dem Rab5-Antikörper erfolgte erst später) beobachtet wurde, wurde Rab5-GFP zunächst als Kontrolle ebenfalls in *lgd*-mutantem Hintergrund exprimiert. Bei einer Expression mit dem *hhGAL4* Treiber zeigte sich dabei überraschenderweise, daß dieses Konstrukt den *lgd*-Phänotyp retten konnte, ähnlich wie eine vergleichbare Expression von Lgd (Abb.2-31 A+B). Nachfolgende Experimente mit Rab7-GFP (Abb.2-31 C+D) und FYVE-GFP (Abb.2-31 E+F) führten ebenso zu einer Rettung des Phänotyps. Waren diese Rettungen nur auf eine unspezifische Wechselwirkung mit der endozytotischen Maschinerie zurückzuführen, oder greifen alle Maßnahmen womöglich in den gleichen Mechanismus ein?

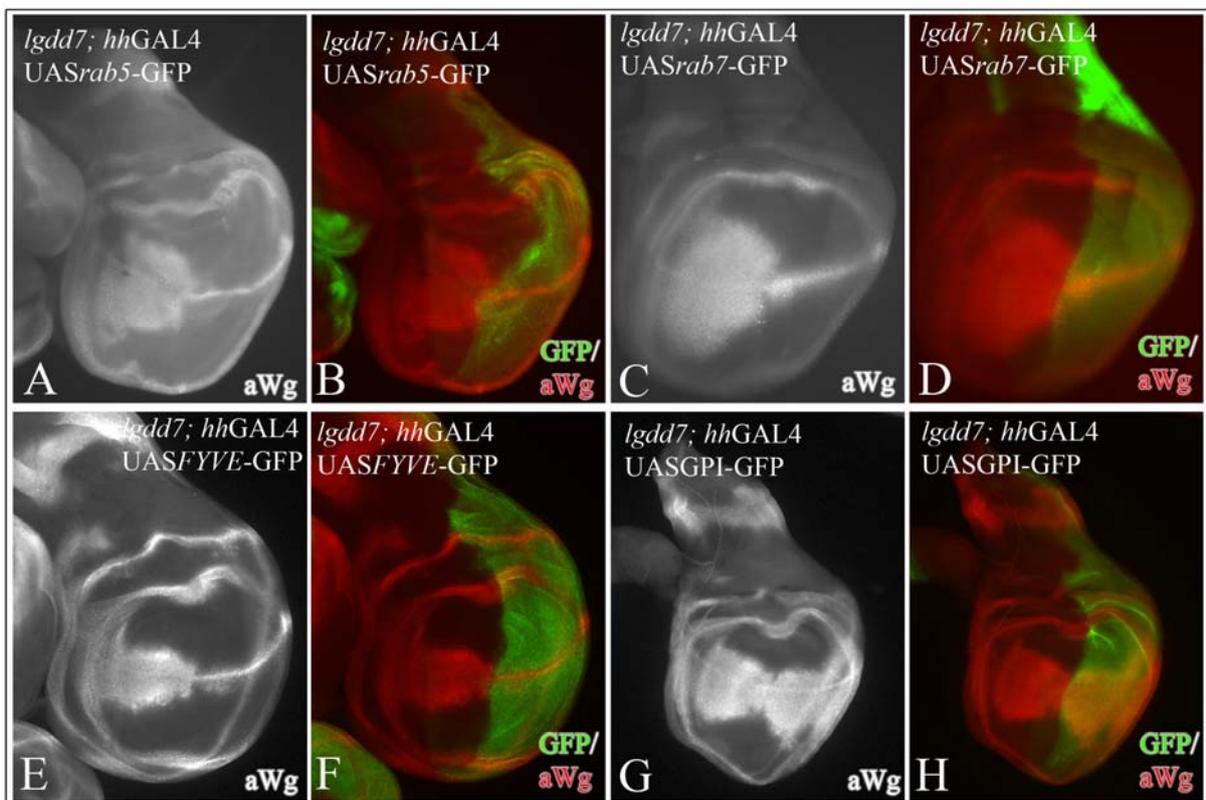


Abb.2.31: Rettung des *lgd*-Phänotypen mittels der Expression der Endozytose-Effektoren Rab5 und Rab7. Eine Expression von Rab5-GFP mittels *hhGAL4* normalisiert die Wg-Expression im posterioren Bereich (angezeigt über GFP in **B**) der Flügelmaginalscheibe. **C+D**: Gleiches kann auch über die Expression von Rab7-GFP erreicht werden. **E+F**: Der Phänotyp der verbreiteten Wg-Expression kann auch mit dem FYVE-GFP-Konstrukt gerettet werden, der aus der PI3P-bindenden Domäne des Hrs-Proteins besteht und keine katalytische Domäne beinhaltet. Keine Rettung konnte mit der vergleichbaren Expression von GFP-GPI erzielt werden, welches nicht über den clathrinabhängigen Weg sondern über die Pinozytose aufgenommen wird (**G+H**).

Als eine Kontrolle wurde GPI-GFP in *lgd*-mutanten Hintergrund exprimiert. GPI bzw Glycosylphosphatidylinositol wird von einer großer Anzahl verschiedener Proteine als Membrananker benutzt (Ferguson, 1999). Es dient gleichzeitig als Internalisierungssignal,

wobei die Aufnahme wahrscheinlich auf dem Weg der Pinozytose stattfindet und Clathrin-, Dynamin- und Rab5-unabhängig ist (Sabharanjak et al., 2002). Der Rettungsversuch mittels GPI-GFP-Expression hatte jedoch keinen Einfluß auf die *lgd*-bedingte Wg-Überexpression (Abb.2-31 G+H).

Die Rettungen des *lgd*-Phänotypen mit Rab5-/Rab7-/FYVE-GFP scheinen also auf spezifischeren, wenn auch möglicherweise unterschiedlichen Eingriffen in den degenerativen Endozytoseweg, wahrscheinlich in der Spanne vom frühen ins späte Endosom zu basieren. Die Tatsache, daß die Notch enthaltenden Vesikel, neben der Assoziation mit Rab5 und Rab7 auch die mit Hrs zeigen und die Ähnlichkeit des Phänotyps mit dem der Mutationen der Klasse E Vps-Proteine legt die Möglichkeit nahe, daß der beobachtete Defekt zeitlich zwischen die Hrs-Bindung an die Vesikel und die Bildung der MVBs anzusiedeln ist. Des weiteren erfolgt in *hrs*-mutanten Zellen eine Akkumulation des Notch-Rezeptors, ohne, daß dessen Aktivierung stattfindet (Lu and Bilder, 2005). Mutationen in TSG101 allerdings, einem Mitglied des ESCRT-I Komplexes, das mit Hrs zur Bildung der MVBs interagiert (Hurley and Emr, 2006), führen zu einer Überaktivierung des Notch-Signalweges (Moberg et al., 2005). Möglichen Interaktionen zwischen Lgd und Hrs wird derzeit noch nachgegangen. Das Fehlen einer Rettung bei der Expression von GPI-GFP zeigt dagegen lediglich, daß nicht etwa ein beliebiger Eingriff in die Membranzusammensetzung einen Effekt auf den *lgd*-Phänotypen hat.

2.6.4. Analyse der Lgd-Deletionskonstrukte

Lgd ist also an dem vesikulären Transport von Notch, Wg und möglicherweise weiteren Proteine beteiligt. Von dem Aufbau her zeigt es jedoch keine Ähnlichkeiten mit einem der schon bekannten Effektoren des endozytotischen Transports. Der einzige Hinweis auf mögliche Funktionen des Proteins ist das Vorhandensein der C2-Domäne, die bei vielen Proteinen zur Bindung an Phospholipidmembranen benutzt wird (Hurley and Misra, 2000), allerdings zeigt sich das Protein, bzw. seine HA-markierte Version ubiquitär im Zytosol verteilt, mit lediglich einer schwachen apikalen Anreicherung. Die Funktion des zweiten identifizierten Domänen-Typs, der DM14-Domäne ist hingegen bisher unbekannt. Um einen Hinweis auf die Bedeutung dieser Domänen für die Lgd-Funktion bei der Regulation der Notch-Aktivität zu finden wurden Deletionskonstrukte erzeugt, in denen die beiden ersten, oder alle DM-14 Domänen entfernt wurden. Weiter wurde ein Konstrukt ohne die C2-

Domäne erstellt um deren Effekt auf die Proteinfunktion oder Lokalisation zu testen. Eine Übersicht der Deletionskonstrukte ist in Abb.2.32 gezeigt.

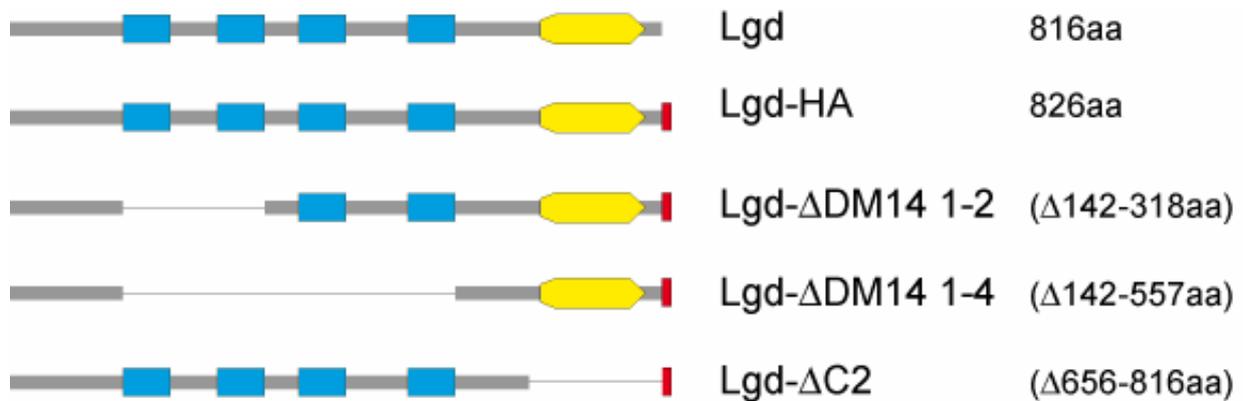


Abb.2.32: Übersicht der untersuchten Lgd-Deletionskonstrukte. Alle Konstrukte wurden am C-terminus mit einem HA-Epitop markiert. Neben dem Konstruktnamen ist der entfernte Proteinbereich angegeben. Zahlenangaben basierend auf der veröffentlichten Proteinsequenz aus NCBI: NP_609488.

Die so erzeugten Konstrukte sind dann in in zwei verschiedenen Versuchsansätzen untersucht worden. Zum einen wurde bei Expression in der wildtypischen Flügelimaginalscheibe untersucht, ob vergleichbare Effekte, wie bei der Expression des vollständigen Lgd auf Vesikelbildung und Aktivität des Notch-Signalweges auftreten. Zum anderen sind mit den Deletionskonstrukten Rettungsexperimente im *lgd*-mutantem Hintergrund durchgeführt worden, um festzustellen welche Bereiche des Proteins für die Regulation der Notch-Aktivität notwendig sind. Betrachtet wurde hierbei, inwieweit die Deletionskonstrukte die normale Wg-Expression in Vergleich zur Expression des vollständigen Lgd in den Flügelimaginalscheiben wiederherstellen können.

Bei der Expression der Konstrukte ohne die DM14-Domänen konnte eine deutliche Reduktion in der Entstehung großer, Notch-enhaltender Vesikel in dem Expressionsbereich der Konstrukte beobachtet werden, in Vergleich zu den Effekten, die mit bei Expression von vollständigen Lgd (mittels stark exprimierender Linien) austraten. Das Konstrukt ohne die ersten beiden DM14-Domänen führte dabei noch zur Entstehung einiger weniger Vesikel (Pfeile in Abb.2.33 A3,B3-4), welche Fähigkeit dem Konstrukt ohne alle DM14-Domänen nahezu vollkommen fehlte (Pfeilspitzen in Abb.2.33 C3, D3-4). Beide Konstrukte zeigten die gleiche zytoplasmatische Lokalisation, wie das vollständige LgdHA-Konstrukt, auch hier mit einer leichten subapikalen Anreicherung, wie es anhand der Kolo-kalisation mit Notch in

diesem Bereich zu beobachten ist (Abb.2.33 A2, B4 für das Konstrukt Lgd Δ DM14 1-2HA und Abb.2.33 C2, D4 für Lgd Δ DM14 1-2HA).

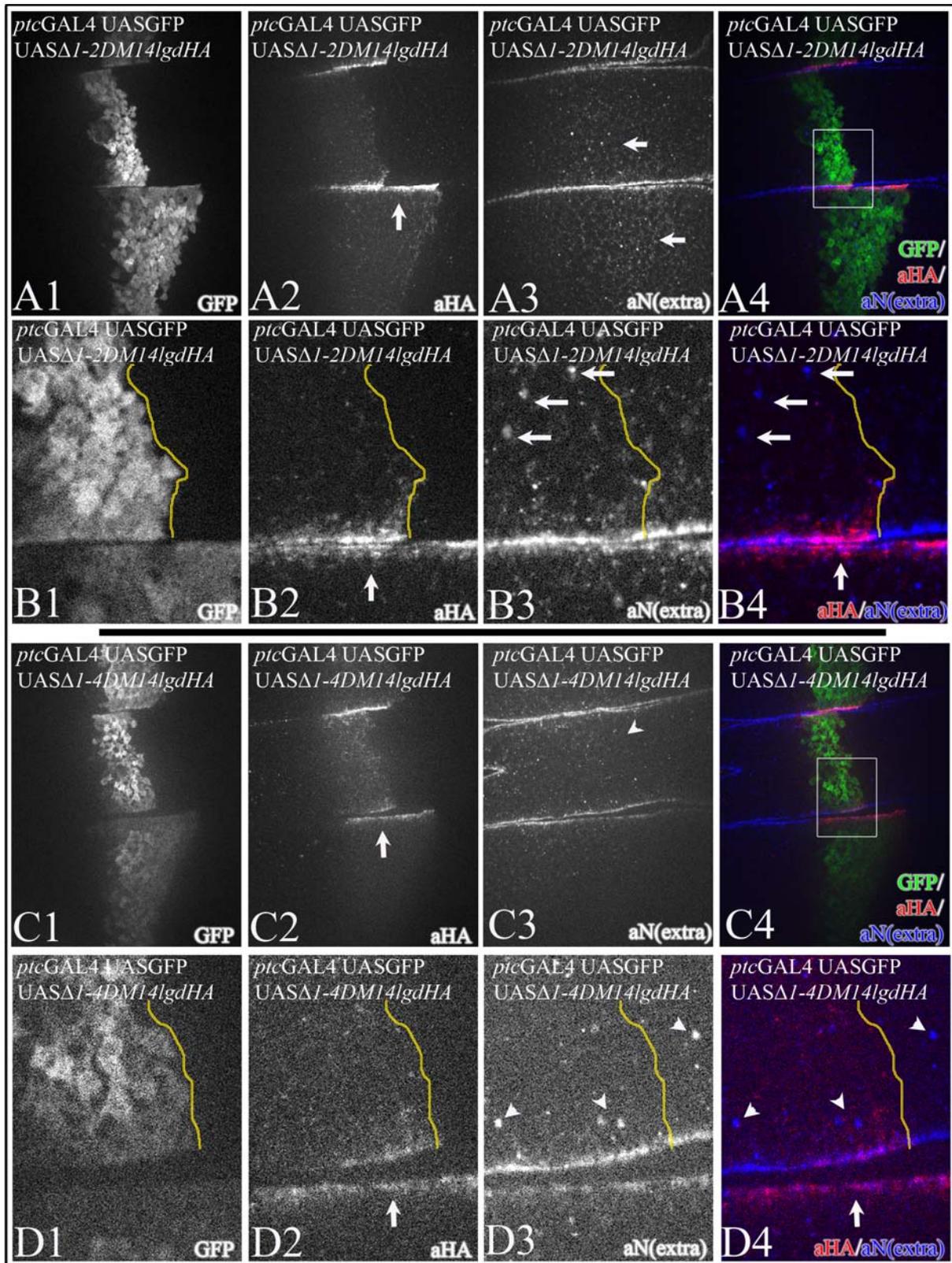


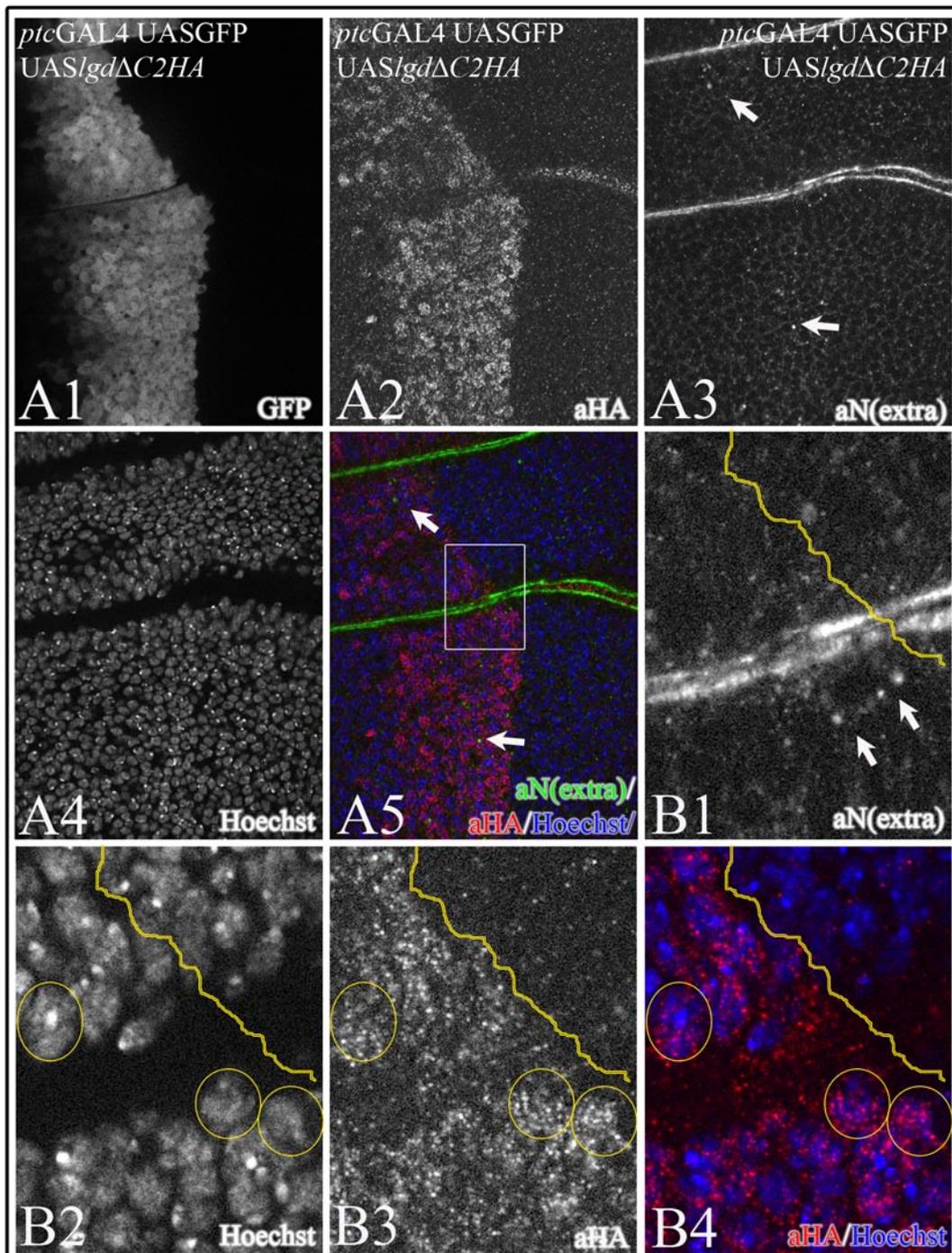
Abb.2.33: Expressionseffekte der Konstrukte mit Deletionen der DM14-Domänen in wildtypischen Flügelimaginalscheiben. Beide Konstrukte zeigten die gleiche Lokalisation wie das vollständige LgdHA-Konstrukt - im Zytoplasma mit einer leichten apikalen Anreicherung (Pfeile in der Säule 2 und B4/D4 – überlappend mit Notch). Das Konstrukt in dem zwei der DM14-Domänen deletiert wurden führte in seiner

Expressionsdomäne zur Entstehung großer, Notch-enhaltender Vesikel (Pfeile in **A3,B3-4**), was bei der Expression des Konstruktes ohne alle DM14-Domänen nicht beobachtet werden konnte. Hier traten nur gelegentlich Notch-enhaltende Vesikel auf, die in gleicher Größe auch im wildtypischen Gewebe beobachtet werden konnten (Pfeilspitzen in **D3**)

Im Gegensatz zu den beiden DM-14 Deletionskonstrukten, die die gleiche intrazelluläre Lokalisation zeigten wie das vollständige, HA-markierte Protein zeigte das Lgd Δ C2-Konstrukt eine vollständig andere und auch unerwartete Lokalisation im Zellkern (Abb. 2.34 B2-4). Es konnten daneben noch kleine Mengen des Proteins im Zytoplasma nachgewiesen werden, die leichte apikale Anreicherung jedoch, die für das vollständige Protein typisch ist, war für dieses Konstrukt nicht festzustellen. Eine Überprüfung der Proteinsequenz mit verschiedenen internetgestützten Suchprogrammen nach Kernlokalisierungssequenzen zeigte, daß eine solche weder im endogenen Protein vorhanden war, noch daß eine durch die Deletion erzeugt wurde. Daraus folgt, daß die C2-Domäne höchstwahrscheinlich für die wildtypische Lokalisation im Zellplasma und die Anreicherung an der apikalen Zellmembran verantwortlich ist.

Abb. 2.34: Effekte der Expression des Deletionskonstrukts Lgd Δ C2HA in der Flügelimaginalscheibe mittels der *ptc*GAL4-Treiberlinie. Das Konstrukt ohne die C2-Domäne zeigte überraschenderweise eine kernspezifische Lokalisation, wie anhand der Hochst-DNA-Färbung angezeigt wird (umkreist in B2-4). Trotz dieser veränderten

Lokalisation löst es, wenn auch in abgeschwächten Maße verglichen mit dem vollständigen Lgd-Protein, immer noch die Entstehung großer, Notch-enhaltender Vesikel im Bereich seiner Expression aus (Pfeile in **A3**, **A5**, **B1**)
 Bilder B1-4 stellen das umrahmte Gebiet aus A5 jeweils vergrößert dar. Die Grenze der *ptc*-Expressionsdomäne ist mit einer gelben Linie markiert worden.



Trotz dieser massiven Veränderung der zellulären Lokalisation konnte die Expression des UAS-*lgdΔC2*-Konstrukts aber erstaunlicherweise den *lgd*-Phänotypen retten (Abb.2.35 C1-2). Zudem konnte das Konstrukt in dem anderen Versuchsansatz, bei *ptcGAL4* getriebener Expression in ansonsten wildtypischen Scheiben, einige wenige Vesikel positiv für Notch (Abb.2.34 A3, B1) erzeugen sowie in den adulten Flügeln die Bildung der posterioren

Quervene unterdrücken, wengleich ein wenig schwächer als das bei dem vollständigen Protein der Fall wäre (Abb.2.36 E). Bei der Expression des Lgd Δ 1-2DM14HA könnte diese Unterdrückung der posterioren Quervene ebenfalls beobachtet werden (Abb.2.36 C), während die Expression des Lgd-Deletionskonstruktes Lgd Δ 1-4 DM14HA, welches keine DM14-Domänen mehr besitzt, keinen Einfluß auf die Bildung der posterioren Quervene zeigte (Abb.2.36-D). Allerdings konnte die Expression beider Konstrukte im posterioren Kompartiment *lgd*-mutanter Flügelimaginalscheiben dort die normale Wg-Expression wiederherstellen (Abb.2.35 A, B).

Für die Lgd-Funktion, in Bezug auf die Regulation der Notch-Aktivität in der Flügelimaginalscheibe sind also weder die C2-Domäne noch die DM-14 Domänen unbedingt notwendig. Genausowenig scheint auch die wildtypisch beobachtete apikale Anreicherung des Proteins zwingend für seine Funktion zu sein.

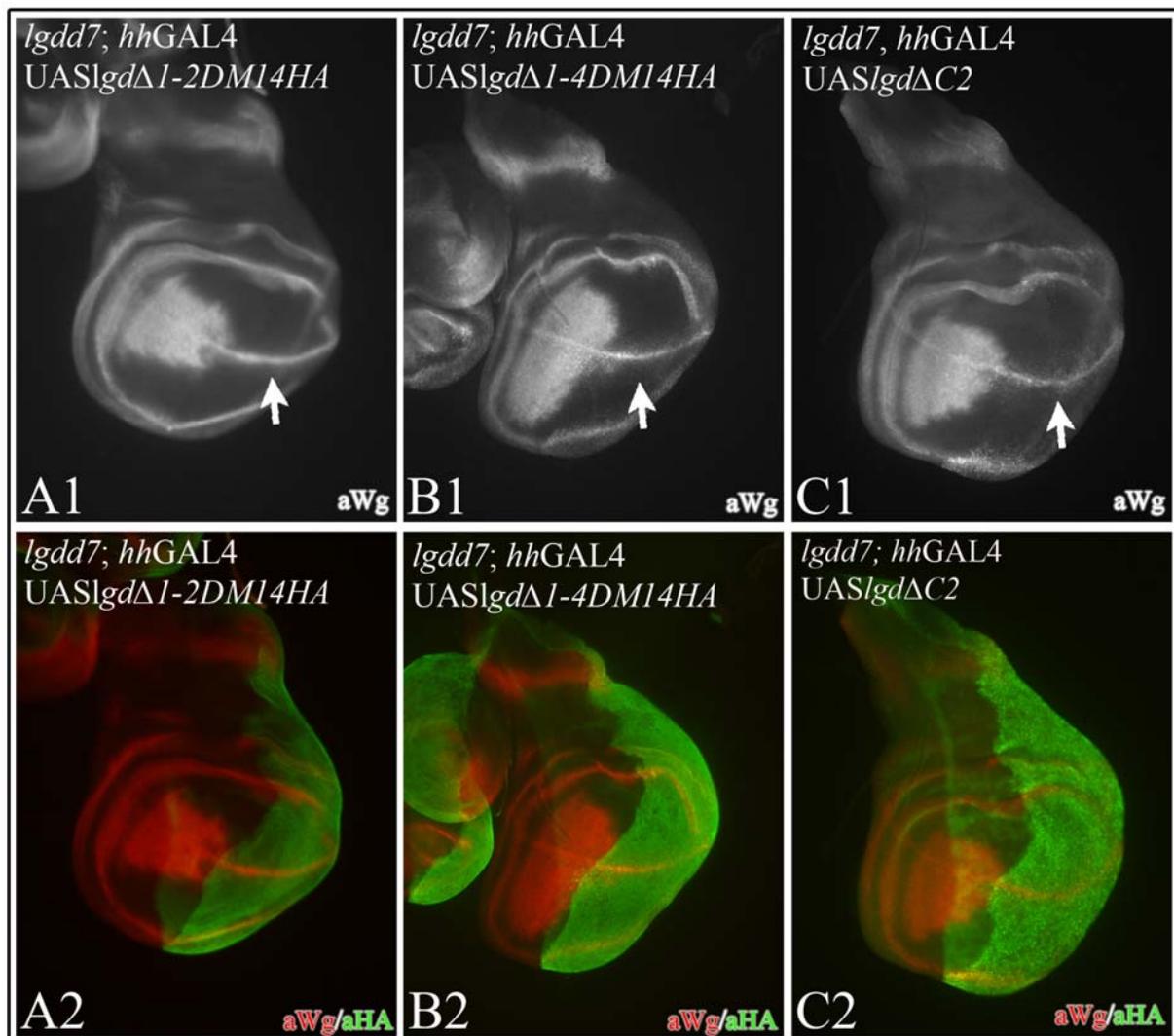


Abb.2.35: Rettung des *lgd*-Phänotyps mit den Deletionskonstrukten. Sowohl die Lgd-Konstrukte ohne zwei (A), ohne alle DM14-Domänen (B) wie auch das Konstrukt ohne die C2-Domäne (C) konnten bei Expression in *lgd*-mutanten Hintergrund in der Flügelimaginalscheibe die normale Wg-Expression in dem Bereich ihrer Expression wiederherstellen (mittels hhGAL4 im posterioren Kompartiment, Pfeile in A1+B1+C1).

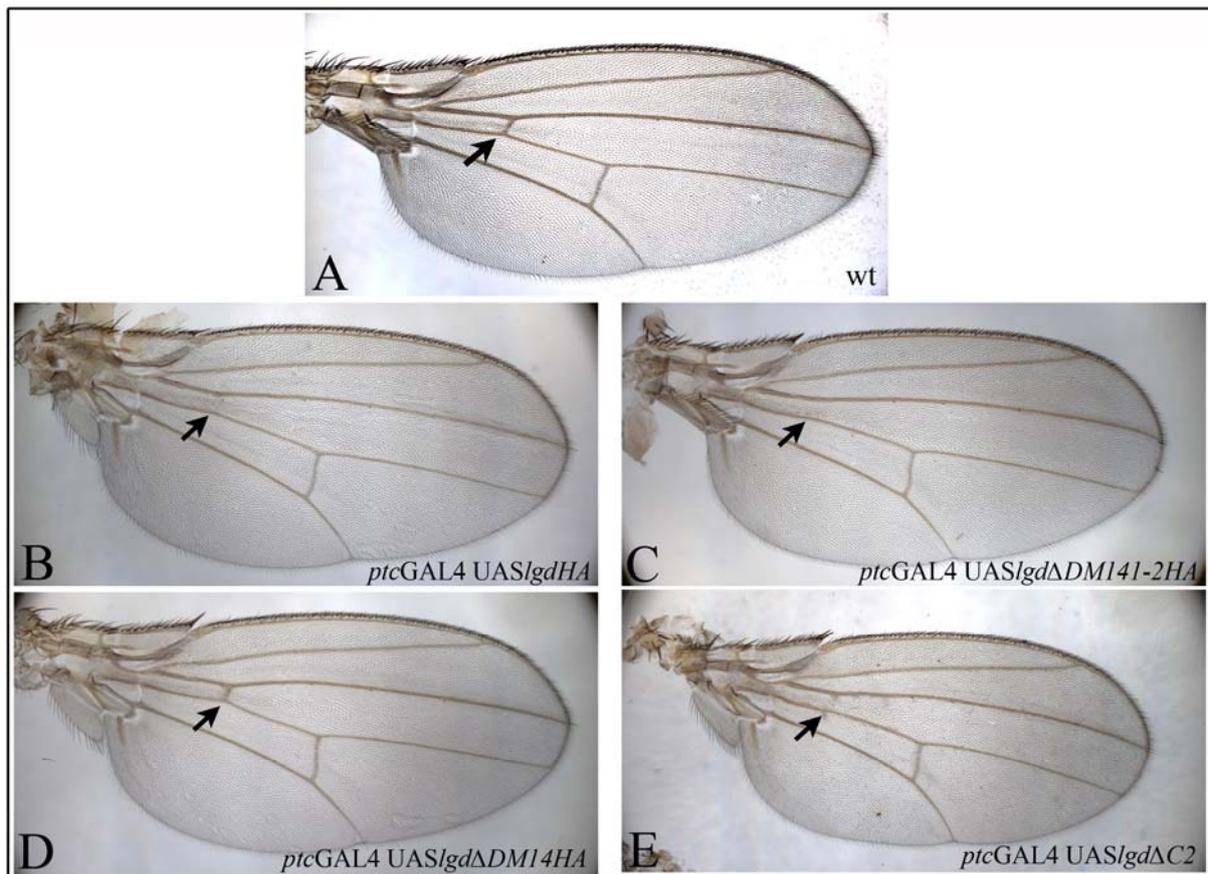


Abb.2.36: Analyse der Expressionseffekte der Deletionskonstrukte von Lgd in wildtypischen Hintergrund auf den adulten Flügel. Eine vergleichbare Expression von LgdHA führt zum Verlust der hinteren Quervene (Pfeil in **B**), durch den die *ptcGAL4* induzierte Expression des Konstruktes schneidet. Das Konstrukt ohne die ersten beiden DM14-Domänen führt zum gleichen Phänotyp (**C**). Bei der Deletion der C2-Domäne ist ebenfalls eine abgeschwächte Bildung der Quervene zu beobachten (**E**), während das Konstrukt ohne alle DM14-Domänen keinen Einfluß mehr auf die Ausbildung der Vene zeigt (**D**).

Allerdings zeigten die beiden Konstrukte ein unterschiedliches Verhalten, wenn sie im wildtypischen Hintergrund exprimiert wurden. Die Deletion der DM14-Domänen führte hier zum reduzierten Aufkommen der Notch-enthaltenden Vesikel. Zudem beeinflusste die Expression des Konstruktes ohne alle DM14-Domänen die Bildung der posterioren Quervene nicht mehr im Gegensatz zum Konstrukt, in welchem nur die ersten beiden DM14-Domänen deletiert worden waren. Diese Reduktion der beobachteten Effekte legt also nahe, daß die DM14-Domänen weitere, möglicherweise helfende oder ergänzende Funktionen für die Lgd-Aktivität haben, während die C2-Domäne für die subzelluläre Lokalisation des Proteins verantwortlich ist.

3. Ergebnisse Projekt II – Inhibitorischer Effekt der Notch-Liganden

In Rahmen dieses Projektes sollte der Frage nachgegangen werden, welche Proteindomänen der Notch-Liganden für die Vermittlung des *cis*-inhibitorischen Mechanismus verantwortlich sind, der bei hohen Konzentrationen der Liganden zellautonom die Aktivierung des Notch-Rezeptors unterdrückt. Als Ansatz, diese Frage aufzuklären, sollte die Tatsache genutzt werden, daß gegenüber nur zwei Liganden in *Drosophila* (Dl und Ser) es drei Delta-artige (DLL1, -3, -4) und zwei Serrate-artige (Jag1, -2) Liganden in den Säugetieren gibt (zur Übersicht siehe Abb.3-1). Die Liganden in den Säugetieren weisen untereinander und zu den Liganden aus *Drosophila* strukturelle Unterschiede auf (Abb.3-1). Da sie zudem teilweise unterschiedliche, teilweise aber auch überlappende Expressionsdomänen während der Entwicklung aufweisen (Cormier et al., 2004; Dunwoodie et al., 2002; Kusumi et al., 2004; Zhang et al., 2002), ergibt sich hierbei die Möglichkeit, daß es daneben zu einer funktionellen Diversifikation unter den verschiedenen Liganden gekommen sein könnte.

Um diese Möglichkeit zu überprüfen und gegebenenfalls zur Identifizierung der für den *cis*-inhibitorischen Mechanismus verantwortlichen Domänen der Liganden zu nutzen, sollten Liganden aus der Ratte und aus der Maus in die Fliege eingeführt werden. Hier sollten sie dann mit Hilfe des UAS/GAL4-Systems (Brand and Perrimon, 1993) in der Flügelimaginalscheibe überexprimiert und dabei auf Beeinflussung der Notch-Aktivität untersucht werden.

3.1. Die Notch-Liganden aus den Vertebraten

Für den Vergleich ihrer funktionellen Eigenschaften Notch gegenüber wurden die Liganden DLL1, Jag1 und Jag2 aus der Ratte sowie DLL3 und DLL4 aus der Maus benutzt. Betrachtet man die Primärstruktur dieser Proteine, so fällt auf, daß sie sich in verschiedenen Merkmalen von ihren Orthologen aus der Fliege unterscheiden. Die Delta-Orthologe werden von DLL1 über DLL4 nach DLL3 sukzessive kürzer und weisen weniger EGF-Repeats auf (Delta-9, DLL1/4 – 8, DLL3 – 6 Repeats). Ebenso nimmt die Länge der intrazellulären Domänen ab. Ähnlicher Trend ist auch in den Serrate-ähnlichen Jagged-Proteinen zu beobachten. Beide sind ungefähr 200aa kürzer als Ser. Zudem divergieren sie stark in den EGF-ähnlichen Sequenzmotivwiederholungen. In Ser sind die EGF-Motivwiederholungen 4, 6 und 10 durch Insertionen durchbrochen (Fleming et al., 1990; Thomas et al., 1991), dagegen findet man in

den Jagged-Proteinen jeweils nur im Repeat 10 eine vergleichbare Insertion (Lindsell et al., 1995; Shawber et al., 1996). Ferner verfügen beide Jagged-Proteine über je zwei EGF-Repeats mehr, als Ser. Vergleicht man also die Orthologen aus den Vertebraten und der Fliege alleine aufgrund ihrer Sequenzlänge und der primären Struktur, so scheint DLL3 am weitesten von DI entfernt zu sein.

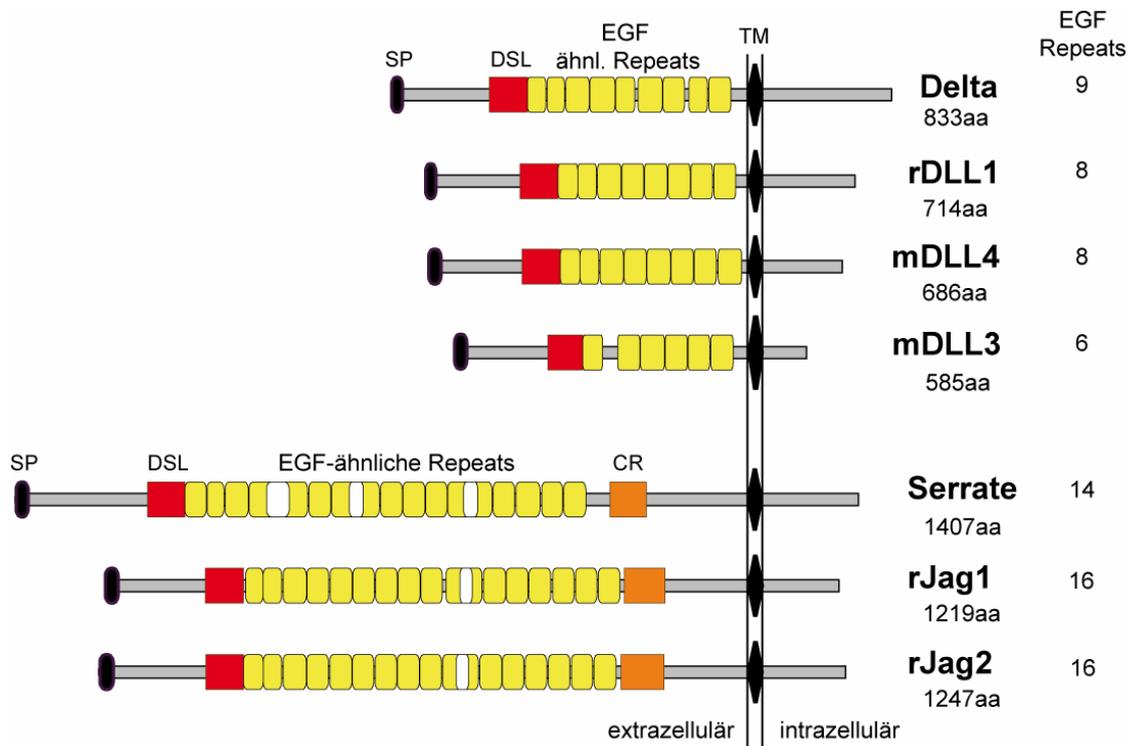


Abb. 3.1: Schematische Darstellung der Notch-Liganden aus *Drosophila* (DI, Ser) und ihrer Orthologe aus den Vertebraten. Abgebildet sind die Liganden, die in dieser Arbeit untersucht wurden. Das Präfix vor dem Namens Kürzel kennzeichnet den Organismus, aus dem der Ligand stammte (r-Ratte, m-Maus). Die unterschiedlichen Proteindomänen sind als Boxen dargestellt. Im extrazellulären Bereich am N-Terminus das vermutliche Signalpeptid (SP) in Schwarz, danach die DSL-Domäne in Rot mit nachfolgenden EGF-ähnlichen Repeats in Gelb. In Ser und den Jag-Proteinen folgt die Cystein-reiche Region (CR) in Orange. Nach der Transmembrandomäne (TM) folgt der intrazelluläre Bereich, der keine vorausgesagten Domänen aufweist.

Im Falle der Serrate-artigen Proteine zeigen sich starke Veränderungen sowohl in der Anzahl wie in dem Aufbau der EGF-Repeats. Führt man einen multiplen Sequenzvergleich durch (Alignment), so bestätigt sich dieser Eindruck, wie die nachfolgende Tabelle zeigt (siehe Tabelle 3). Bei diesen Vergleichen zeigte DLL3 wiederum die stärksten Abweichungen zu DI (siehe auch (Dunwoodie et al., 1997)). Alleine die intrazelluläre Domäne zeigt die höchste Ähnlichkeit zu DI, allerdings ist die Konservierung in diesem Bereich zwischen allen Liganden sehr niedrig und angesichts der stark verkürzten Domäne in DLL3 verglichen zu Delta und der insgesamt niedrigen Ähnlichkeit nicht aussagekräftig. Hinzu kommt, daß die DSL-Domäne von DLL3 neben der Sequenz auch in der Länge von den anderen DSL-Domänen abweicht. Bei allen anderen Orthologen ist die DSL-Domäne 63aa lang. In DLL3 dagegen hat die durch Sequenzvergleiche vorausgesagte DSL-Domäne nur 58aa. Delta am

ähnlichsten zeigt sich in allen Bereichen (bis auf den intrazellulären) das DLL1-Protein (Gesamtprotein-36%, DSL-53%, Extrazellulär-45%) und in etwas abgeschwächten Maße DLL4 (Gesamt-33%, DSL-46%, Extrazellulär-41%).

Ganzes Protein							DSL						
	mDLL3	mDLL4	rDLL1	rJag1	rJag2	Ser		mDLL3	mDLL4	rDLL1	rJag1	rJag2	Ser
Delta	24	33	36	28	28	27	Delta	17	46	53	52	47	46
mDLL3		29	29	25	29	23	mDLL3		24	25	18	15	12
mDLL4			47	31	30	30	mDLL4			49	44	38	41
rDLL1				32	33	33	rDLL1				47	44	42
rJag1					50	33	rJag1					65	49
rJag2						34	rJag2						47

Extrazelluläre Domäne							Intrazelluläre Domäne						
	mDLL3	mDLL4	rDLL1	rJag1	rJag2	Ser		mDLL3	mDLL4	rDLL1	rJag1	rJag2	Ser
Delta	26	41	45	39	38	36	Delta	12	6	4	6	7	3
mDLL3		32	35	26	30	27	mDLL3		9	13	9	12	11
mDLL4			50	40	37	37	mDLL4			34	11	6	3
rDLL1				40	41	39	rDLL1				5	6	11
rJag1					55	37	rJag1					10	8
rJag2						37	rJag2						7

Tab. 3: Vergleich der Liganden-Orthologen aus Maus und Ratte mit den Notch-Liganden der Fliege. Durchgeführt wurden Sequenzen-alignments, die dabei ausgerechnete Sequenzidentität zwischen verschiedenen Sequenzen wird hier in Prozent wiedergegeben. Verglichen wurden zunächst jeweils die ganzen Proteine, danach die DSL-Domänen, sowie nur die extra- bzw intrazellulären Proteindomänen. Rot zeigt die Sequenzen an, die am stärksten von den Fliegen-Orthologen divergieren, Dunkelgrün – die mit der höchsten Ähnlichkeit, Hellgrün bei DSL-Vergleich immer noch sehr hohe Sequenzkonservierung. In Gelb die größten Ähnlichkeiten der Notch-Liganden aus den Vertebraten untereinander markiert. DLL3 zeigte bis auf die intrazelluläre Domäne die geringste Konservierung gegenüber Delta. Die Alignments und die daraus erfolgenden Einschätzungen der Proteinidentität wurden mit dem CLUSTAL W(1.60)-Programm (Thompson et al., 1994) innerhalb des OMIGA 2.0-Paketes unter Standardeinstellungen erstellt und berechnet.

Ser zeigt eine niedrigere Konservierung seinen Orthologen Jag1 und Jag2 gegenüber, als DL den Delta-artigen und bei dem Vergleich der extrazellulären Domänen ist sogar die von DLL1 derjenigen von Ser am ähnlichsten (DLL1-Ser 39% gegen Ser-Jag1/2-37%). Zieht man jedoch den Vergleich der DSL-Domänen und den der ganzen Proteine hinzu, so bestehen die größten Ähnlichkeiten, wie zu erwarten war, zwischen DL und seinen Orthologen, sowie Ser und den beiden Jagged-Proteinen. Man sollte allerdings diese Zahlen nicht als absolut ansehen, sondern nur als eine relative Indikation der Verwandtschaftsverhältnisse. Vergleicht man nämlich die in der Literatur überlieferten Werte, die von anderen Gruppen mit anderen Programmen berechnet wurden, so weichen die absoluten Zahlen voneinander ab, die Aussagen über die Verwandtschaft der Proteine dagegen bleiben bestehen (Lindsell et al., 1995; Shawber et al., 1996).

Sollte man aus diesen Analysen eine Voraussage treffen wollen, bezüglich der Interaktion zwischen den Notch-Liganden aus den Vertebraten und dem Notch-Rezeptor in der Fliege, so würde man aufgrund der starken Abweichungen die geringsten Erwartungen DLL3 gegenüber haben und vor allem mit DLL1 aufgrund dessen stärksten Ähnlichkeit zu Dl eventuelle Interaktionen mit dem Notch-Rezeptor erwarten, die zu seiner Aktivierung und/oder Inhibierung im Expressionsbereich von DLL1 führen könnte.

3.2. Das Untersuchungssystem

Die experimentelle Umgebung, in der die Orthologen aus den Vertebraten auf ihre Fähigkeit mit Notch zu interagieren untersucht werden sollten bildete die Flügelimaginalscheibe, in der mit Hilfe des UAS/GAL4-Systems (Brand and Perrimon, 1993) die Konstrukte exprimiert wurden. Bei der Verwendung einer *ptc*GAL4-Treiberlinie, wird der Transkriptionsaktivator GAL4 in einem Streifen entlang der antero-posterioren Kompartimentsgrenze exprimiert und löst seinerseits die Expression der transgenen UAS-Konstrukte innerhalb der gleichen Domäne aus. Die *ptc*GAL4-Treiberlinie bietet hierbei den großen Vorteil, daß innerhalb des Expressionsstreifens GAL4 in einem Gradienten exprimiert wird (siehe Abb.3-2). Die höchste Expressionsrate befindet sich am posterioren Ende der Expressionsdomäne, die damit einen scharfen Übergang zu den benachbarten Zellen liefert, die kein GAL4 und somit auch kein UAS-Transgen exprimieren. Dieses liefert eine Situation ähnlich den Verhältnissen an der dorso-ventralen Grenze mit klar abgegrenzten ligandenexprimierenden und ligandenfreien Zellreihen. Von der posterioren Grenze des *ptc*-Streifens nach anterior hin sinkt dann die GAL4/UAS-Konstruktexpressionsstärke im sigmoiden Verlauf ab. Dies bietet die Gelegenheit, die eventuelle Effektart und Effektintensität über diesen Gradienten hinweg zu beobachten. Eine weitere Möglichkeit, die Intensität der Konstruktexpression zu modulieren bietet die Temperatursensitivität des UAS/GAL4-Systems, wobei mit steigender Temperatur auch die Expressionsrate des Konstruktes steigt (Speicher, 1994). Desweiteren durchheilt die *ptc*-Domäne senkrecht die dorso-ventrale Grenze der Flügelimaginalscheibe und ermöglicht es so, den Effekt des jeweils ausgeprägten Konstruktes auf die endogene Notch-Aktivität in diesem Bereich zu untersuchen. Als ein Indikator der Notch-Aktivität wurde in allen Versuchen die *Wg*-Expression entlang des *ptc* Streifens und an der d/v Grenze betrachtet, da *wg* eines der Zielgene darstellt, deren Transkription in der Flügelscheibe durch die Notch-Aktivität stimuliert wird.

Exprimiert man nun in diesem System Ser in der Scheibe entlang des *ptc*-Streifens, so aktiviert es den Notch-Rezeptor und somit die Wg-Expression zum einen in den Zellen, die unmittelbar posterior benachbart zum *ptc*-Streifen liegen (Pfeil p in Abb.3.2 B+C). Zum anderen wird die Wg-Expression auch noch in diffusen Muster zum anterioren Ende des Streifens hin aktiviert. (Pfeil a in Abb.3.2 B+C). Inmitten des Ser-Expressionsstreifens ist hingegen keine Wg-Expression zu sehen, es wird sogar die endogene Expression an der d/v Kompartimentsgrenze unterbrochen (Pfeilspitze in Abb.3.2-B). Die Aktivierung des Notch-Rezeptors findet dabei nur in der ventralen Hälfte der Scheibe statt, da im dorsalen Bereich Fng exprimiert und durch eine Glykosylierung des Rezeptors eine Aktivierung durch Ser verhindert wird (Fleming et al., 1997).

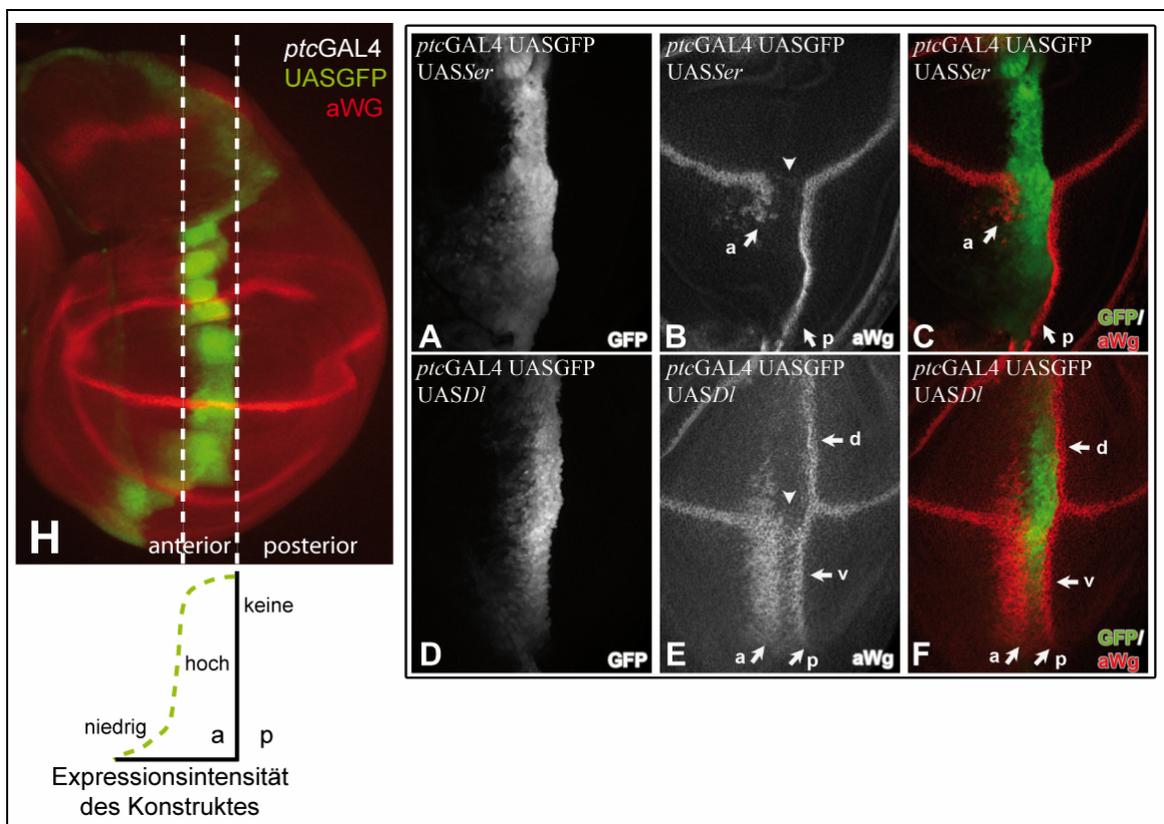


Abb.3.2: Mittels der *ptcGAL4*-Treiberlinie wird der Transkriptionsaktivator GAL4 entlang des *patched*-Streifens in der Flügelimaginalscheibe exprimiert und aktiviert die Transkription eines gegebenen Transgens in derselben Domäne (hier *UASGFP*). Damit lassen sich Effekte der Transgenexpression über einen Konzentrationsgradienten hinweg untersuchen mit dem zusätzlichen Vorteil einer scharfen Grenze am posterioren Ende des Streifens zwischen den Zellen mit der höchsten Expression und den direkt benachbarten gänzlich ohne Expression des Transgens. Effekte einer solchen Expression der Notch-Liganden wurden bereits in der Einleitung dargestellt und werden hier zur besseren Visualisierung nochmal dargestellt. Bilder A-C zeigen Effekte einer Expression von Ser, D-F die von DI entlang des *ptc*-Streifens auf die durch den Notch-Signalweg vermittelte Expression von Wg. Weitere Erklärungen im Text.

Exprimiert man DI entlang des *ptc*-Streifens so kommt es zur Aktivierung der Wg-Expression sowohl im dorsalen (Pfeil-d in Abb.3.2 E,F) wie im ventralen Kompartiment (Pfeil-v in Abb.3.2 E,F), da die Aktivität von Fng die Aktivierung von Notch durch DI nicht verhindert

sondern möglicherweise sogar noch begünstigt (Bruckner et al., 2000; Fleming et al., 1997). Die Wg-Expression wird ansonsten im gleichen Muster wie gerade für Ser beschrieben ausgelöst. Einerseits in den posterior zum *ptc*-Streifen benachbarten Zellen (Pfeil p in Abb.3.2 E+F), andererseits im Bereich der niedrigen Expression des Konstruktes (Pfeil a in Abb.3.2 E+F). In dem Bereich der höchsten Expressionsintensität von sowohl D1 wie auch Ser kommt es infolge der hohen Konzentration der Liganden zum sogenannten *cis*-inhibitorischen Effekt, der zellautonom die Aktivierung des Notch-Rezeptors verhindert (de Celis and Bray, 1997; Lawrence et al., 2000), und sogar zur Unterbrechung der endogenen Wg-Expression in dem Bereich führt, in welchem der *ptc*-Streifen die d/v Kompartimentsgrenze kreuzt (Pfeilspitzen in Abb.3.2 B+E).

3.3. Effekte der Expression der Delta-like und Jagged-Proteine in Drosophila

Die cDNA der Liganden-Orthologe aus den Vertebraten für die folgenden Konstrukte wurde mittels Restriktionsverdau in den pUAST-Vektor kloniert und als Transgen in die Fliege eingebracht. (siehe Material&Methoden)

Delta-Orthologe

UAS-*DLL1HA* – mit dem Orthologen aus der Ratte

UAS-*DLL3* – mit dem Orthologen aus der Maus

UAS-*DLL4* – mit dem Orthologen aus der Maus

Serrate-Orthologe

UAS-*Jagged1HA* – mit dem Orthologen aus der Ratte

UAS-*Jagged2HA* – mit dem Orthologen aus der Ratte

Das *DLL1*, *Jag1* und *Jag2*-Konstrukt waren am C-Terminus mit einer HA-Markierung versehen, die übrigen Konstrukte waren unmarkiert.

Ergänzend wurden auch ein HA-markiertes Konstrukt von *DLL4* (UAS-*DLL4HA*), sowie eine unmarkierte Version von *DLL1* (UAS-*DLL1*) mittels PCR erzeugt, da beide Proteine in Vertebraten über ihre PDZ-Domäne am C-Terminus mit MAGI-Proteinen (MAGUK proteine mit invertiertem Domänenarrangement) interagieren. Es ist noch nicht vollkommen klar,

wozu diese Interaktion dient. allerdings scheint sie keinen Einfluß auf die klassische Delta-Notch Signalübertragung zu haben (Pfister et al., 2003; Wright et al., 2004). Ferner unterscheidet sich der C-Terminus von Dl stark von dem der Vertebraten und enthält soweit man weiß kein vergleichbares Motiv (Wright et al., 2004). Die zusätzlichen Konstrukte sollten als Kontrolle dienen, daß die beobachteten Effekte auf die intrinsischen Eigenschaften der Liganden, mit dem Notch-Rezeptor zu interagieren zurückzuführen sind und nicht eventuell nur ein Artefakt, entstehend aus der HA-Markierung.

Im Gegensatz zu Dl, dessen Überexpression mit dem GAL4/UAS-System zu embryonalen Letalität bei 25°C führt und deswegen bei 18°C durchgeführt wurde, konnte die Expression sämtlicher Orthologen bei 25°C durchgeführt werden. Einige Orthologe sind zusätzlich bei 18°C bzw 29°C exprimiert worden, wobei die Expressionsintensität von GAL4 und folglich des Transgens gesenkt bzw erhöht wurde, um eventuelle Veränderungen der beobachteten Expressionseffekte festzustellen. Es sind für jedes Konstrukt zwischen drei und fünf verschiedene Linien auf die Effekte ihrer Expression hin untersucht worden, um mögliche linienspezifischen Artefakte auszuschließen.

3.3.1. Effekte der Expression von DLL1 und DLL1-HA

Die Expression von DLL1 zeigte eine Aktivierung von Notch in allen Bereichen der Expression und in den unmittelbar posterior angrenzenden Zellen (Pfeile in Abb.3.3). DLL1 ist also wie Dl in der Lage, Notch in nicht-zellautonomer Weise zu aktivieren. In keinem Bereich des *ptc*-Streifens war ein inhibitorischer Effekt auf die Notch-Aktivität zu finden (Abb.3.3) Dieses Verhalten änderte sich auch nicht, wenn das Expressionsexperiment bei 29°C mit zwei Kopien des Transgens gleichzeitig durchgeführt wurde (*UAS-DLL1 13-2+UAS-DLL1 39-3*), um deren maximale Expressionsstärke zu erreichen (Abb.3.3 B1-2).

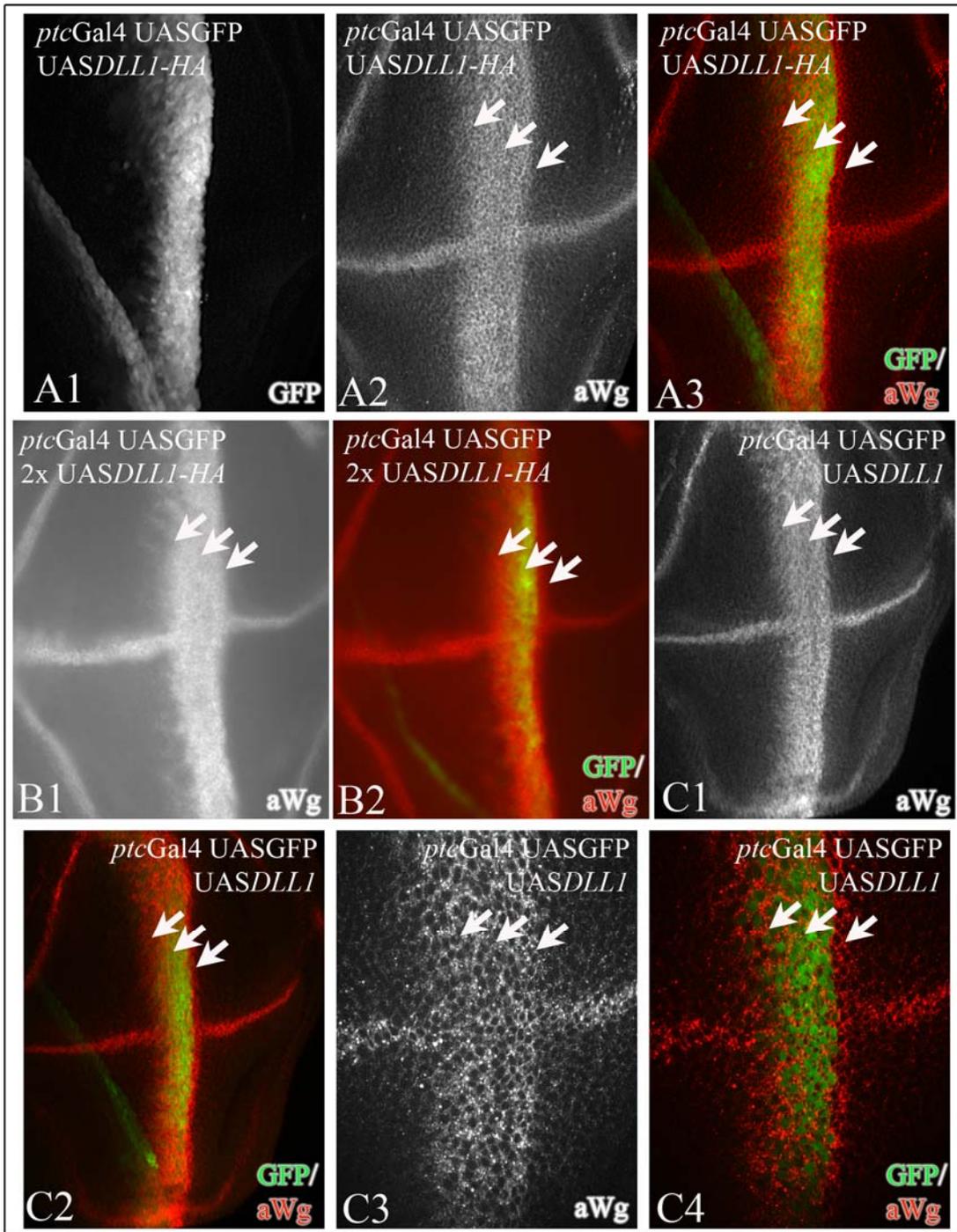


Abb.3.3: Effekte der Expression von DLL1 auf die Aktivität des Notch-Signalweges in der Flügelimaginalscheibe. Sowohl bei den HA-markierten (A,B) wie den unmarkierten (C) DLL1-Konstrukten konnte eine Aktivierung des Notch-Signalweges anhand der Ausgelösten Wg-Expression in allen Bereichen der DLL1-Expression und in den Zellen posterior benachbart zum Expressionsbereich festgestellt werden. (Pfeile aufzeigend auf die Regionen mit induzierter Wg-Expression). Steigerung der Expressionsrate von DLL1 mittels gleichzeitiger Expression zweier Transgene zeigt ebenfalls nur aktivierende Effekte in allen Bereichen der Expression und unmittelbar posterior dazu benachbart an (B1, B2))
 C3 und C4 stellen jeweils die Region um die dorso-ventrale Kompartimentsgrenze in C1 und C2 vergrößert dar.

Offenbar hat dieser Ortholog keinerlei oder nur eine sehr abgeschwächte inhibitorische Wirkung auf Notch in *Drosophila*. Morphologisch zeigte die Expression von DLL1 einen ähnlichen Effekt wie die von D1. Die Scheibenform ist nicht rund, wie im der wildtypischen

Situation sondern zeigt eine deutliche Streckung zu einer eher elliptischen Form mit dem *ptc*-Streifen als verlängerte Achse, was auf eine Stimulierung der Zellproliferation infolge erhöhter Notch-Aktivität zurückzuführen ist, wie auch ähnliche Überexpressionsversuche mit *Nintra* zeigen (de Celis and Bray, 2000). Die Aktivierung von Notch fand sowohl im dorsalen wie im ventralen Kompartiment der Scheibe statt, ohne offensichtlicher Unterschiede in der Intensität. Die Aktivität von Fng scheint also wie bei einer Überexpression von D1 nicht notwendig zu sein für eine Aktivierung des Notch-Rezeptors.

Die C-terminal mit einem HA-Epitop markierten Konstrukte (DLL1HA) zeigten keinen Unterschied bei der Aktivierung von Notch in Vergleich zu denen ohne Markierung (DLL1) (Abb.3.3 A+B-HA-markiert gegen C-unmarkiert). Die Zugänglichkeit der IATEV-PDZ Domäne an ihrem C-Terminus wird also entweder von dem HA-Epitop nicht beeinflusst, oder ist in dem vorgestellten Untersuchungssystem vollkommen unerheblich für die Notch-Aktivierung.

3.3.2. Effekte der Expression von DLL4

Im Gegensatz zu den Effekten der Expression von DLL1 aktivierte DLL4 Notch in den ersten Experimenten nur in dem Zellstreifen posterior der Expressionsdomäne, in dem selbst kein DLL4 exprimiert wurde. Die Aktivierung war nur in dem dorsalen Kompartiment der Flügelimaginalscheibe zu beobachten, was auf eine mögliche Fng-Abhängigkeit der aktivierenden Proteinfunktion hindeutet. Innerhalb der Expressionsdomäne wurde Notch nicht aktiviert, an der dorso-ventralen Kompartimentsgrenze hingegen war über die ganze Breite des Streifens hinweg eine Inhibition der Notch-Aktivität zu beobachten (Abb.3.4 D1-D3) Der Effekt trat auch unter reduzierter Expressionsstärke bei 18°C auf. Problematisch war nur, daß zunächst lediglich eine einzige transgene UAS-*DLL4* (UAS-*DLL4* 69-1) Linie erzeugt werden konnte und somit die Aussagekraft der beobachteten Effekte noch weiterer Bestätigung durch Beobachtungen an anderen Linien bedurfte. Zu diesem Zweck wurde das Transgen von Thomas Klein durch das Einkreuzen des sogenannten $\Delta 2-3$ Chromosoms, welches durch eine nicht mehr mobilisierbare P-Elementinsertion hohe Transposaseaktivität erzeugt (Robertson et al., 1988), mobilisiert und neue UAS-*DLL4* Linien erzeugt. Diese zeigten bei Expression in der Flügelimaginalscheibe die gleichen Effekte wie die erste Linie. Um die Ergebnisse weiter abzusichern wurden aber später zusätzliche transgene Fliegen erzeugt, deren Expressionseffekte jedoch deutlich von denen der ersten Linie divergierten.

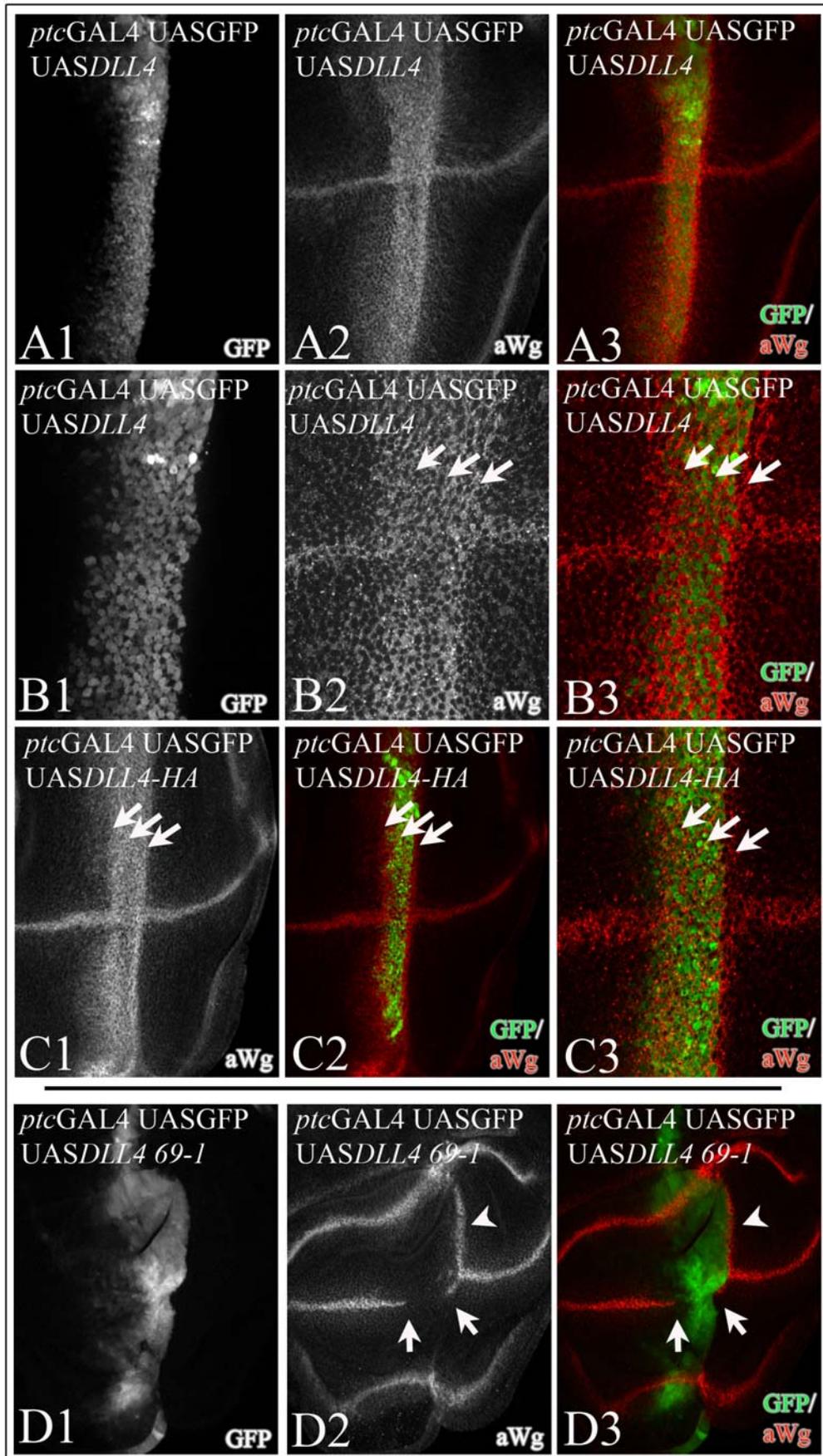


Abb.3.4: Effekte der Expression von mDLL4 und mDLL4HA in der Flügelimaginalscheibe. Sowohl bei der Expression von unmarkiertem (A+B) wie von dem HA-markierten mDLL4 (C) konnte eine Aktivierung des Notch-Signalweges anhand der Wg-Expression in allen Bereichen des *ptc*-Streifens und in den posterior unmittelbar benachbarten Zellen festgestellt werden

(Pfeile in **B+C**). In keinem Bereich war ein *cis*-inhibitorischer Einfluß der Expression von mDLL4 auf die Aktivität des Notch-Signalweges feststellbar, bis auf eine UAS*mDLL4* transgene Linie, deren Expressionseffekte in **D1-3** angezeigt sind. In dieser Linie konnte die Induktion der Wg-Expression nur in den unmittelbar posterior zur mDLL4-Expressionsdomäne gelegenen Zellen im dorsalen Bereich der Scheibe festgestellt werden (Pfeilspitze in **D2**). In dem gesamten Bereich der *ptc*GAL4 getriebenen Expression dagegen, kam es zu keiner Induktion der Wg-Expression, sondern sogar zu einer Unterbrechung der endogenen Wg-Expression an der d/v Kompartimentsgrenze (Pfeile in **D2**)

In dieser zweiten Injektionsrunde wurden sowohl neue unmarkierte (UAS-*DLL4*), wie auch C-terminal HA-markierte UAS-*DLL4HA*-Linien erzeugt, um zu überprüfen, ob der primär beobachtete Unterschied zwischen der Expression von DLL1HA und DLL4 nicht etwa aufgrund der HA-Epitop-Markierung entstanden war. Allerdings zeigten alle getesteten Linien der neu erzeugten transgenen Fliegen gleiche Expressionseffekte, wie diejenigen, die bei der Expression von DLL1/DLL1HA zu beobachten waren. Unabhängig davon, ob mit den neuen Linien DLL4 oder DLL4HA exprimiert wurde, Notch-Aktivität konnte über den gesamten *ptc*-Streifen hinweg und in den unmittelbar posterior angrenzenden Zellen stimuliert werden (Abb3.4. A-C). Worauf das abweichende Verhalten der ersten erzeugten Linie (UAS-*DLL4-69-1*) zurückzuführen ist, konnte innerhalb dieser Arbeit nicht mehr geklärt werden. Sowohl der alte wie die neuen DNA-Injektionsmische, die zur Erzeugung der transgenen Fliegen benutzt wurden sind nachträglich nochmals sequenziert worden, ohne daß irgendwelche Unstimmigkeiten oder Mutationen nachgewiesen werden konnten. Möglicherweise ist eine solche Mutation in der abweichenden Linie entstanden und hatte ausgerechnet die, für die Vermittlung der *cis*-Inaktivierung essenzielle Sequenz entsprechend verändert. Dieser Möglichkeit wird in nächster Zukunft nachgegangen werden.

3.3.3. Effekte der Expression von DLL3, Jag1-HA und Jag2-HA

Die Expression der Orthologen DLL3 (Abb.3.5 Reihe A) und Jag1 (Abb.3.5 Reihe B) zeigte keinen Effekt in der Flügelimaginalscheibe, weder auf die Notch-Aktivität noch auf die Scheibenmorphologie.

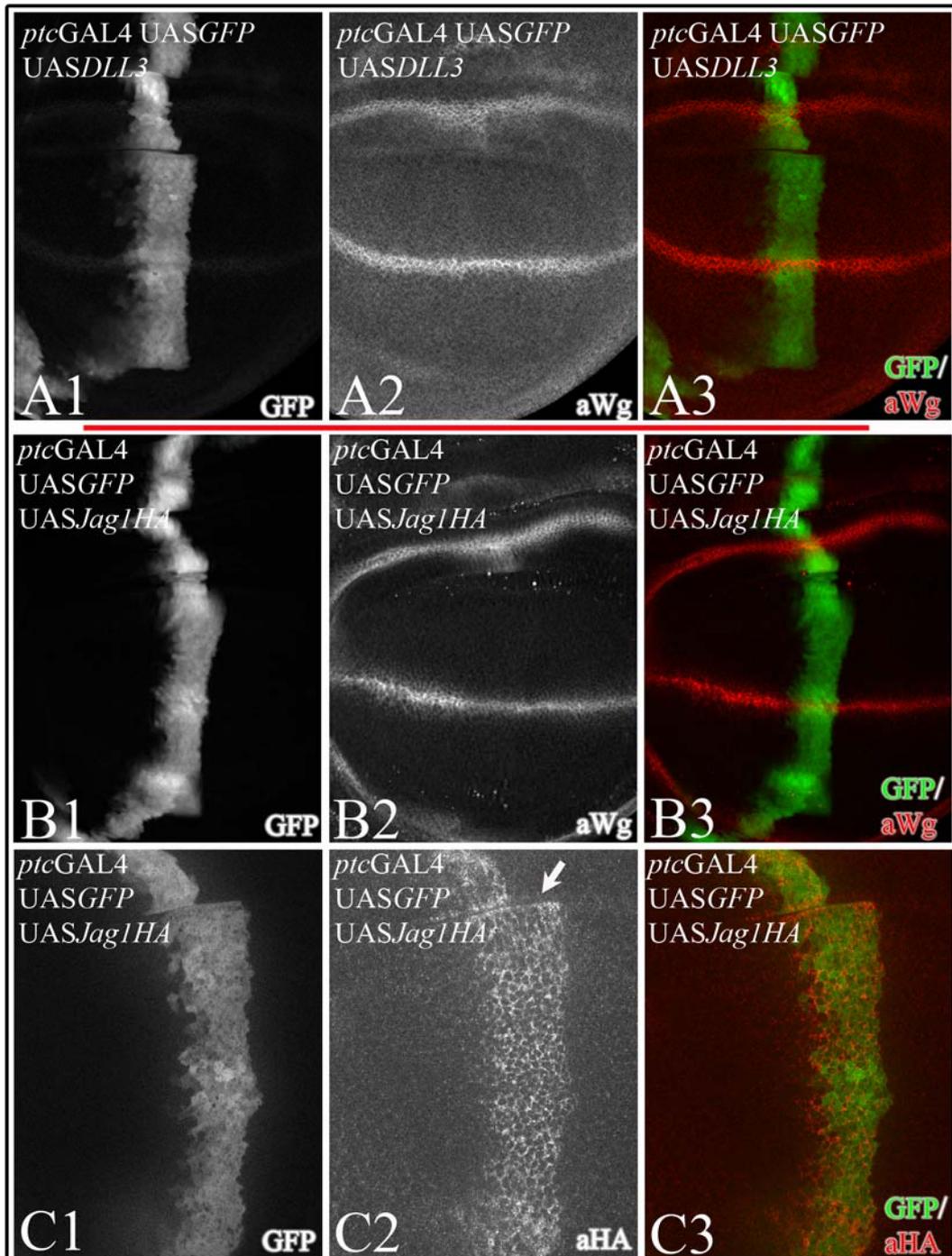


Abb.3.5: Die Expression von mDLL3 (A1-3) oder rJag1HA (B1-3) zeigt weder aktivierende noch inhibierende Effekte auf den Notch-Signalweg in der Flügelimaginalscheibe. Die Scheiben zeigen ein wildtypisches Expressionsmuster von Wg in einem Streifen entlang der d/v Kompartimentsgrenze. Das Fehlen eines Effektes ist bei Jag2HA nicht auf fehlende, oder schwache Expression zurückzuführen, wie die HA-Färbung in C1-C3 zeigt.

Die Expression der Konstrukte konnte für rJag1HA anhand von Färbungen gegen die HA-Markierung bestätigt werden, wobei die Fokussierung auf die apikale Membran in den Falten der Imaginalscheibe eine apikale Lokalisation des Konstruktes dort nahelegt (Pfeil in Abb.3.5 C2). DLL3-Expression konnte aufgrund fehlender Markierung nicht derart überprüft werden, aber ausgehend davon, daß alle transgenen Tiere in dieser Arbeit mittels der gleichen Methode erzeugt wurden und hierbei jeweils mehrere Linien untersucht wurden, ist davon auszugehen, daß es ebenfalls exprimiert wurde. Zur endgültigen Bestätigung wird im Rahmen eines anderen Projektes derzeit ein markiertes DLL3-Konstrukt in die Fliege eingeführt und dort auf Expressionseffekte und Expression überprüft.

Wie die Betrachtung der Primärsequenzen und Vergleiche mit den anderen Liganden zeigten divergiert DLL3 sehr stark sowohl von D1 und Ser als auch von den anderen Orthologen aus den Säugetieren. Möglicherweise führt dieser stark abweichender Aufbau und Sequenz dazu, daß DLL3 nicht in der Lage ist, mit dem Notch-Rezeptor zu interagieren. Vor kurzem ist ein Artikel erschienen, der zeigte, daß in Zellkultur das DLL3-Protein aus der Ratte weder einen der vier Notch-Rezeptoren binden, noch aktivieren kann. In diesen Experimenten scheint es allerdings in zellautonomer Weise die Notch-Aktivierung verhindern zu können (Ladi et al., 2005). Die erste Beobachtung könnte eine Erklärung dafür sein, warum auch bei den hier beschriebenen Versuchen keine Aktivierung des Notch-Rezeptors beobachtet wurde. Es konnte in den hier durchgeführten Experimenten in der Domäne der mDLL3-Expression aber im Gegensatz zu diesen Zellkulturexperimenten kein inhibitorischer Einfluß auf die Notch-Aktivität, gemessen an der endogenen Wg-Expression, festgestellt werden (Abb.3.5 D+E). Möglicherweise ist das Fehlen dieses Effektes auf Unterschiede zwischen Notch und seinen Orthologen in den Vertebraten zurückzuführen.

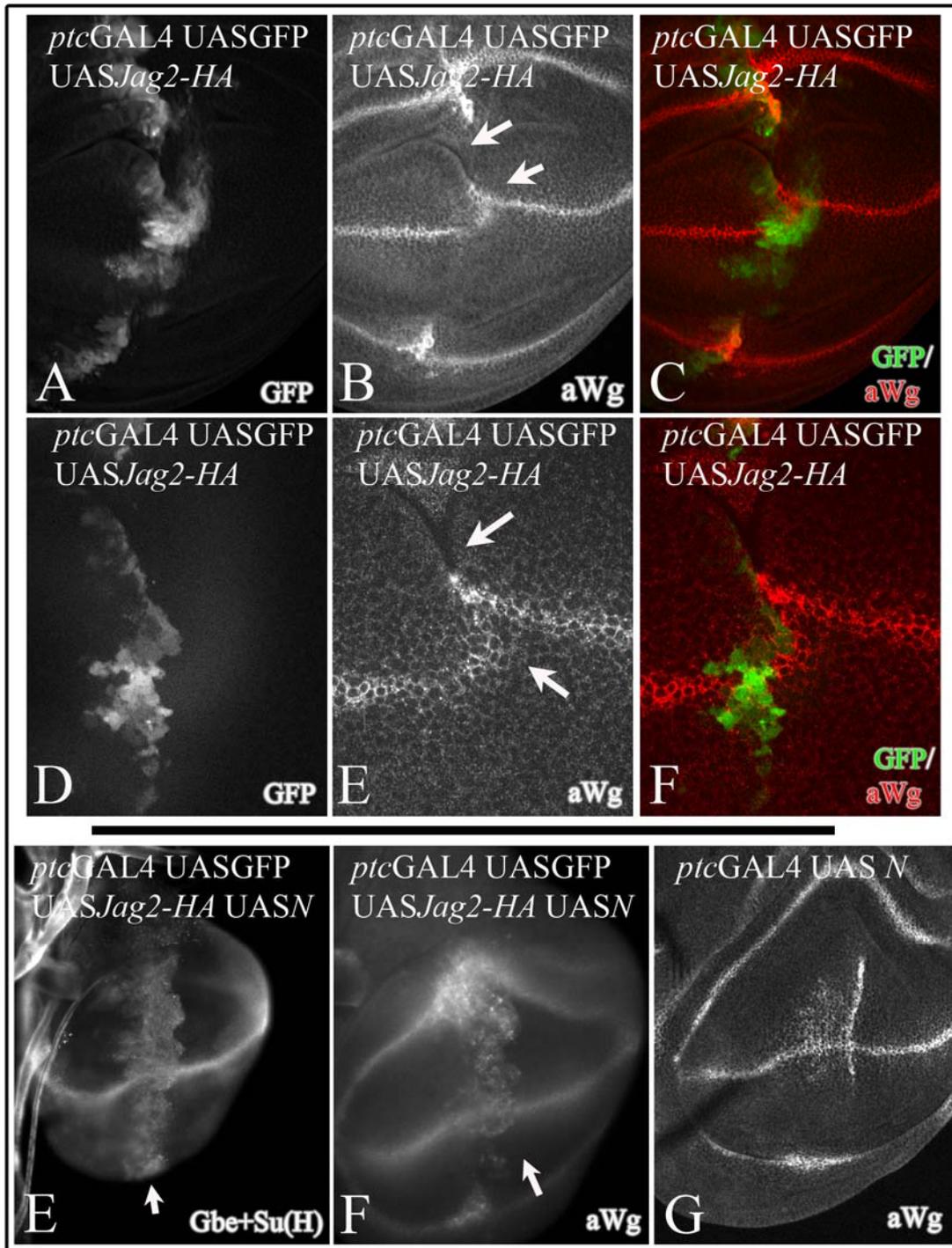


Abb.3.6: Effekte der Expression des Ser-Orthologen aus der Ratte, rJag2 und rJag1 auf die Notch-Aktivität in der Flügelimaginalscheibe. Die Expression von rJag2 führt zu einer Narbenbildung entlang des *ptc*-Streifens (Pfeile in **B**, **C**). Bei einer Koexpression von Jag2HA mit Notch kommt es zu einer Aktivierung des Notch-Rezeptors entlang der Expressionsdomäne (gezeigt anhand der Aktivität des Gbe+Su(H)-lacZ Konstruktes in **E** und Wg-Expression in **F**). D, E, F stellen die Region um die Kompartimentsgrenze in A, B, C jeweils vergrößert dar.

Jag1 aus der Ratte ist als ein aktivierender Ligand in Zellkulturexperimenten beschrieben worden (Lindsell et al., 1995), seine Expression in der Fliege zeigte jedoch keine Effekte, möglicherweise kann der Ligand aufgrund der Sequenzunterschiede zu Ser gar nicht mit Notch interagieren. Im Gegensatz dazu führte die Expression von rJag2 zu Narben- und

Faltenbildung entlang der posterioren Grenze des *ptc*-Streifens (Abb.3.6 Pfeile in B+E), was auf einen starken dominant-negativen Effekt hinweist, ähnlich der Expression von einem ECN Notch-Konstrukt, das nur aus der extrazellulären und der Transmembrandomäne besteht (Lawrence et al., 2000). Der dominant-negative Effekt von ECN kann durch Koexpression von einem der beiden Liganden, Ser oder D1 aufgehoben werden, was darauf hinweist, daß der Effekt bei alleiniger Expression von ECN durch Interaktionen mit den Liganden zustande kommt, die dadurch daran gehindert werden, mit dem endogenen Rezeptor zu interagieren und diesen zu aktivieren. Exprimiert man im Falle von Jag2 gleichzeitig Notch im gleichen Bereich, so wird die Narbenbildung unterdrückt und es kommt zu Aktivierung des Notch-Rezeptors im Koexpressionsbereich (Abb.3.6 E,F), was nahelegt, daß der zuvor beobachtete Effekt auf einer Interaktion mit dem Notch-Rezeptor basiert.

Die weiteren Arbeiten konzentrierten sich jedoch auf die funktionellen Eigenheiten von rDLL1 und mDLL4 und die Wechselwirkungen zwischen rJag2 und Notch sind in Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht worden.

3.4. Effekte der Expression von DI-DLL Hybrid-Konstrukten

Da die erste Runde der Experimente auf einen starken funktionellen Unterschied zwischen DLL1 und DLL4 hinwies, mit einem sehr starken *cis*-inhibitorischen Effekt bei DLL4 und einem sehr schwachen oder keinem bei der Expression von DLL1, sollte im nächsten Schritt dieser Unterschied zur Eingrenzung der für den inhibitorischen Effekt verantwortlichen Proteindomäne von DI genutzt werden. Zusätzlich wurden auch noch Konstrukte hergestellt, die diese Proteindomänen zwischen DLL1 und DLL4 austauschten

Dazu sind mittels *splice over extension* PCR (Ho et al., 1989; Horton et al., 1990) Hybridproteine erzeugt worden, wobei in einem ersten Schritt die extra- und intrazellulären Domänen der beiden Liganden aus den Vertebraten mit den entsprechenden Gegenparts von DI kombiniert wurden. Diese Methode erlaubt einen nahtlosen Übergang zwischen den beiden Proteinteilen, die zu einem Hybrid zusammengefügt werden (*gene SOEing* siehe M&M). In Vergleich dazu fügen konventionelle Methoden, bei denen die kodierenden cDNA-Bereiche über eingeführte Restriktionsschnittstellen zusammengefügt werden, zusätzliche, fremde Aminosäurereste in die Proteinsequenz der Hybride ein, die ebenfalls einen Einfluß auf ihre Funktion haben könnten.

Um möglichst viele Nebeneffekte eines solchen Austausches auszuschließen, wurde bei den Hybriden mit dem DI-Protein immer dessen Transmembrandomäne mit übernommen. Bei Hybriden, die die Domänen der beiden DI-Orthologen kombinierten war es immer die Transmembrandomäne von DLL4, die Verwendung fand (Abb.3.7).

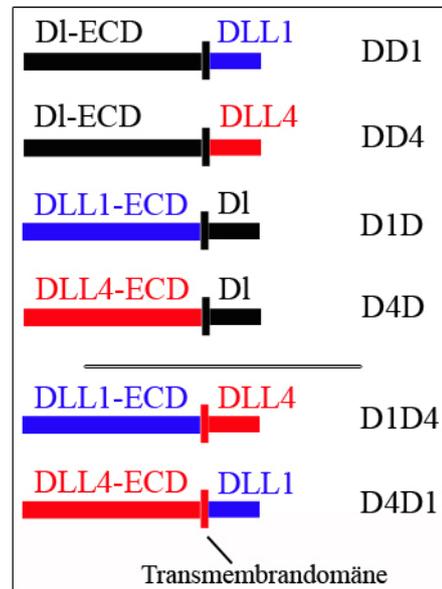


Abb.3.7: Schematische Darstellung der Liganden-Hybridproteine und Schlüssel zu den Namensabkürzungen für die Konstrukte. Es wurden jeweils die extra- (Abstammung+ECD) und die intrazelluläre Domäne (nur die Abstammung angegeben) von zwei Liganden ausgetauscht. Die Abstammung der jeweiligen Transmembrandomänen (TM) ist durch die Farbe angezeigt, in den Hybriden mit dem DI-Protein wurde jeweils die DI-TM, in den zwischen den Liganden aus den Vertebraten die mDLL4-TM verwendet.

Durch die späteren Erkenntnisse aus der Expression der neuen DLL4 und DLL4HA-Konstrukte, die die gleichen Effekte wie die Expression von DLL1 zeigten und keinen *cis*-inhibitorischen Effekt auslösten, war nun allerdings keine Separation der aktivierenden und inhibierenden Effekte auf verschiedene Proteine mehr gegeben. Beide, DLL1 und DLL4 waren also nur noch, da sie beide keinen *cis*-inhibitorischen Effekt zeigten, als Gegenparts zu DI nutzbar, um festzustellen, ob und in welchen Domänenkombinationen die Fähigkeit von DI, Notch zu inhibieren verändert wird.

3.4.1. Hybride zwischen DI und DLL1 oder DLL4

Konstrukte mit der extrazellulären Domäne von DI und der intrazellulären Domäne von DLL1 (DD1) zeigten bei Expression ein Verhalten, das dem von DI sehr ähnlich war. Wurde die Expression bei 25°C durchgeführt, so führte sie zur embryonalen Letalität, folglich wurden die Versuche bei 18°C durchgeführt. Die Effekte der Expression waren ebenfalls der von DI

sehr ähnlich. Notch wurde in den Zellen posterior zur Expressionsdomäne und in den Gebieten niedriger Expression nach anterior hin aktiviert (Pfeilspitzen in Abb.3.8 A3+B3). In der Region der hohen expressionsbedingten Konzentrationen von DD1 war dagegen keine Wg-Expression als Indikator der Notch-Aktivität zu sehen (Pfeile in Abb.3.8 A2+B2). Die endogene Expression von Wg an der d/v Kompartimentsgrenze wurde durch die Expression von DD1 in der gleichen Region nicht beeinflusst (Pfeilspitzen in Abb.3.8 A2+B2).

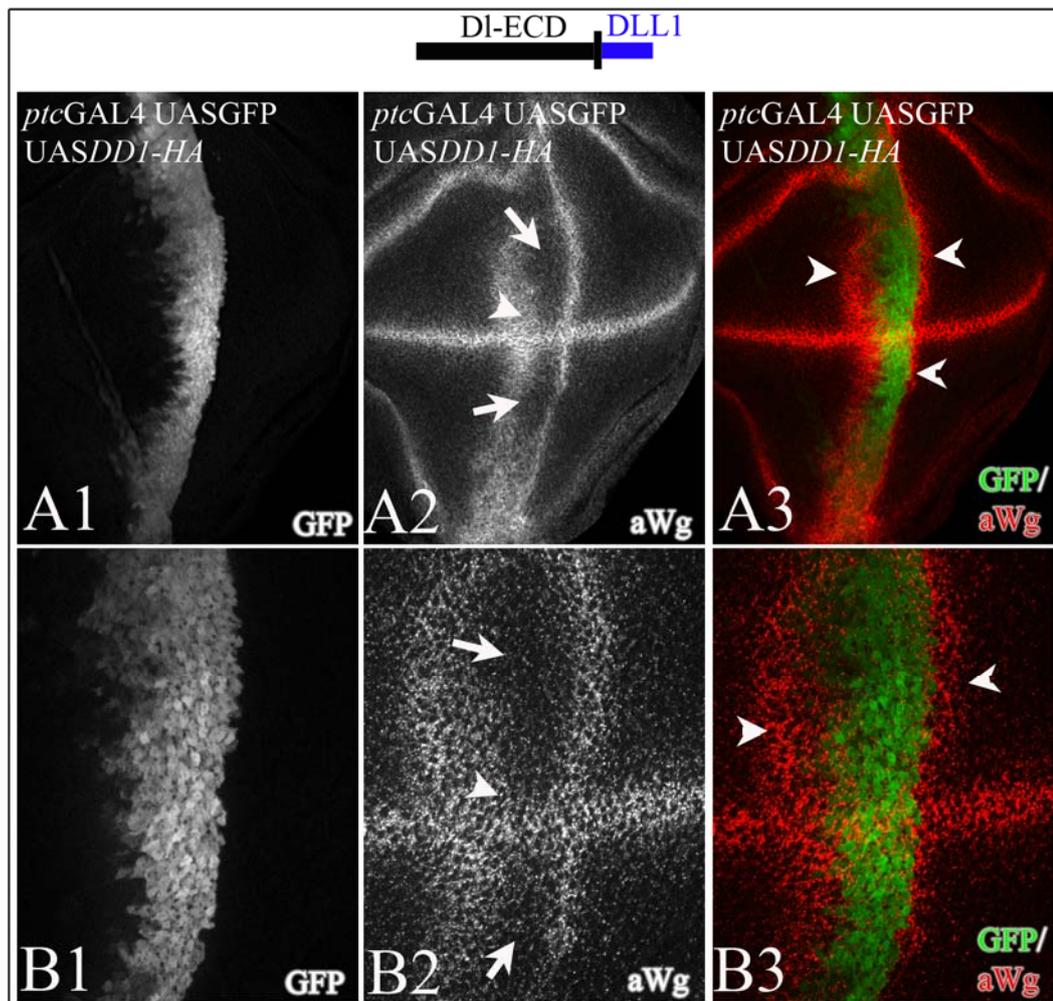


Abb.3.8: Effekte der Expression von DD1-Hybriden. Bei diesen Hybriden ist die extrazelluläre Domäne von DI mit der intrazellulären rDLL1-Domäne kombiniert worden. Die Expression der Konstrukte führt zu einer Aktivierung der Wg-Expression in den unmittelbar posterior benachbarten Zellen und in den anterioren, diffusen Ausläufern der *ptc*-Expressionsdomäne (Pfeilspitzen in **A3+B3**). In den Bereichen der höchsten Expressionsintensität des Konstruktes kommt es dagegen zu keiner Wg-Expression (Pfeile in **A2+B2**). Die endogene Wg-Expression an der d/v Kompartimentsgrenze wird dagegen nicht beeinflusst. Dieses Verhalten ähnelt sehr dem, welches bei einer vergleichbaren Expression von DI beobachtet werden kann (siehe Abb.3-2). Bilderreihe B stellt die Region um die dorso-ventrale Kompartimentsgrenze in A vergrößert dar.

Gleiches Verhalten ist auch von der anderen Kombination der extrazellulären Domäne von DI mit der intrazellulären von DLL4 (DD4) zu berichten. Auch in diesem Falle mußten die Kreuzungen auf 18°C gehalten werden und die Expression des Konstruktes führte zu gleichen Effekten wie sie oben über DD1 berichtet wurden (Abb.3.9).

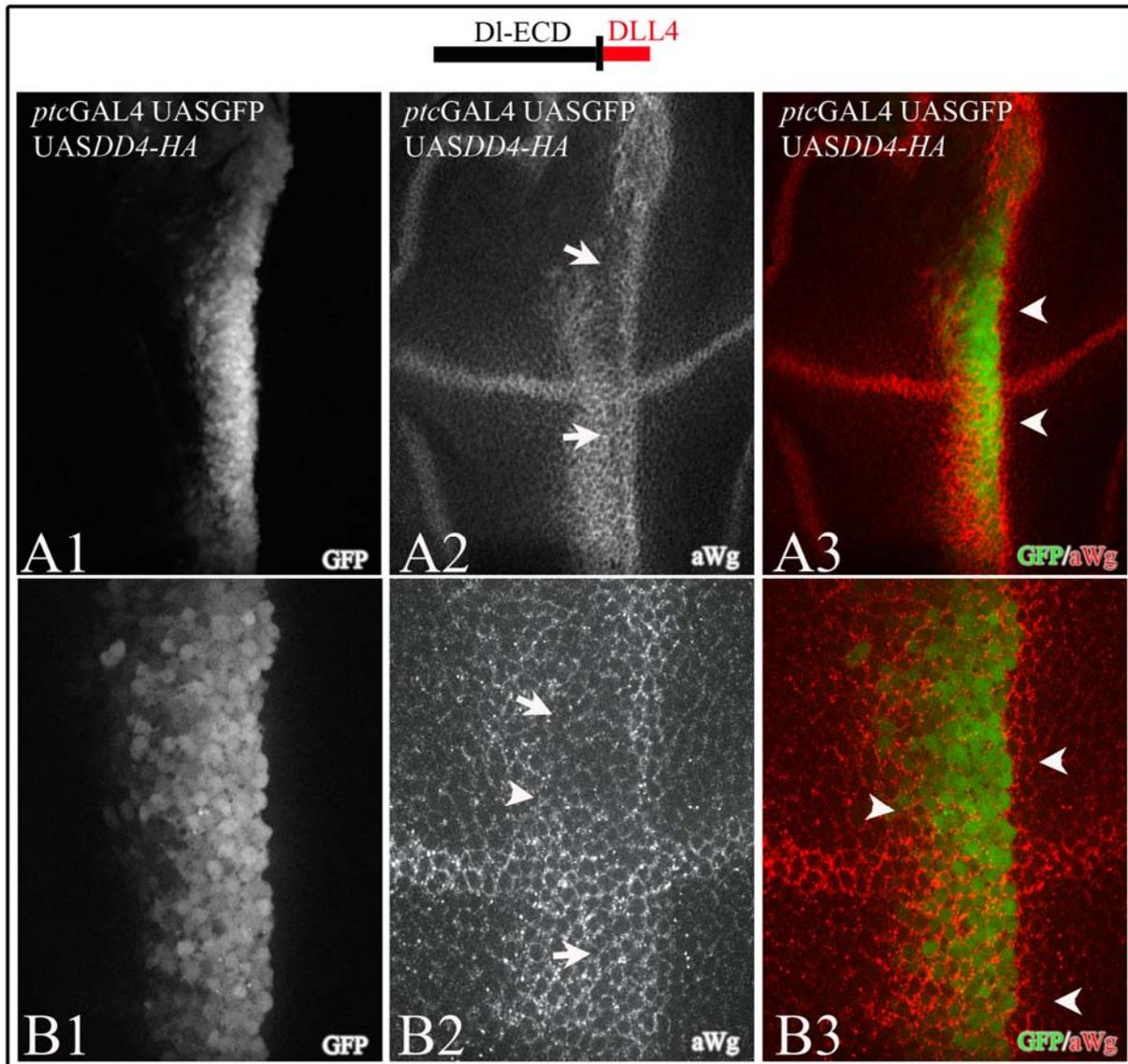


Abb.3.9: Effekte der Expression von DD4-Hybriden. Die Aktivierung des Notch-Signalweges erfolgt bei der Expression von DD4 in einem Muster, das dem einer vergleichbaren Expression von DI sehr ähnlich ist. Wg-Expression wird aktiviert in den Zellen unmittelbar posterior benachbart zu Zellen im *ptc*-Streifen mit der höchsten Expression des hybriden Proteins (Pfeilspitzen in **A3+B3**). Zudem erfolgt auch eine Aktivierung der Wg-Expression im Bereich der diffusen, nachlassenden Expression von DD4. In den Zellen innerhalb des Streifens dagegen (Pfeile in **A2+B2**) kommt es zu keiner oder nur schwachen Aktivierung der Wg-Expression. Bilderreihe B stellt die Region um die dorso-ventrale Kompartimentsgrenze in A vergrößert dar.

Ein wenig abweichend waren die Effekte der umgekehrten Kombinationen. Das Konstrukt mit der extrazellulären DLL1-Domäne und der intrazellulären von DI (D1D) zeigte ebenfalls eine Aktivierung posterior zur Expressionsdomäne und in anterioren Bereichen niedriger Expression. Zusätzlich jedoch zeigten einige Linien auch eine Aktivierung der Notch-Aktivität in den Bereichen hoher Expression des Konstruktes. Diese Aktivierung zeigte eine gewisse Variabilität zwischen den Linien aber auch zwischen verschiedenen Individuen der gleichen transgenen Linie (UAS-DID-1, UAS-DID-4) (Abb.3.10).

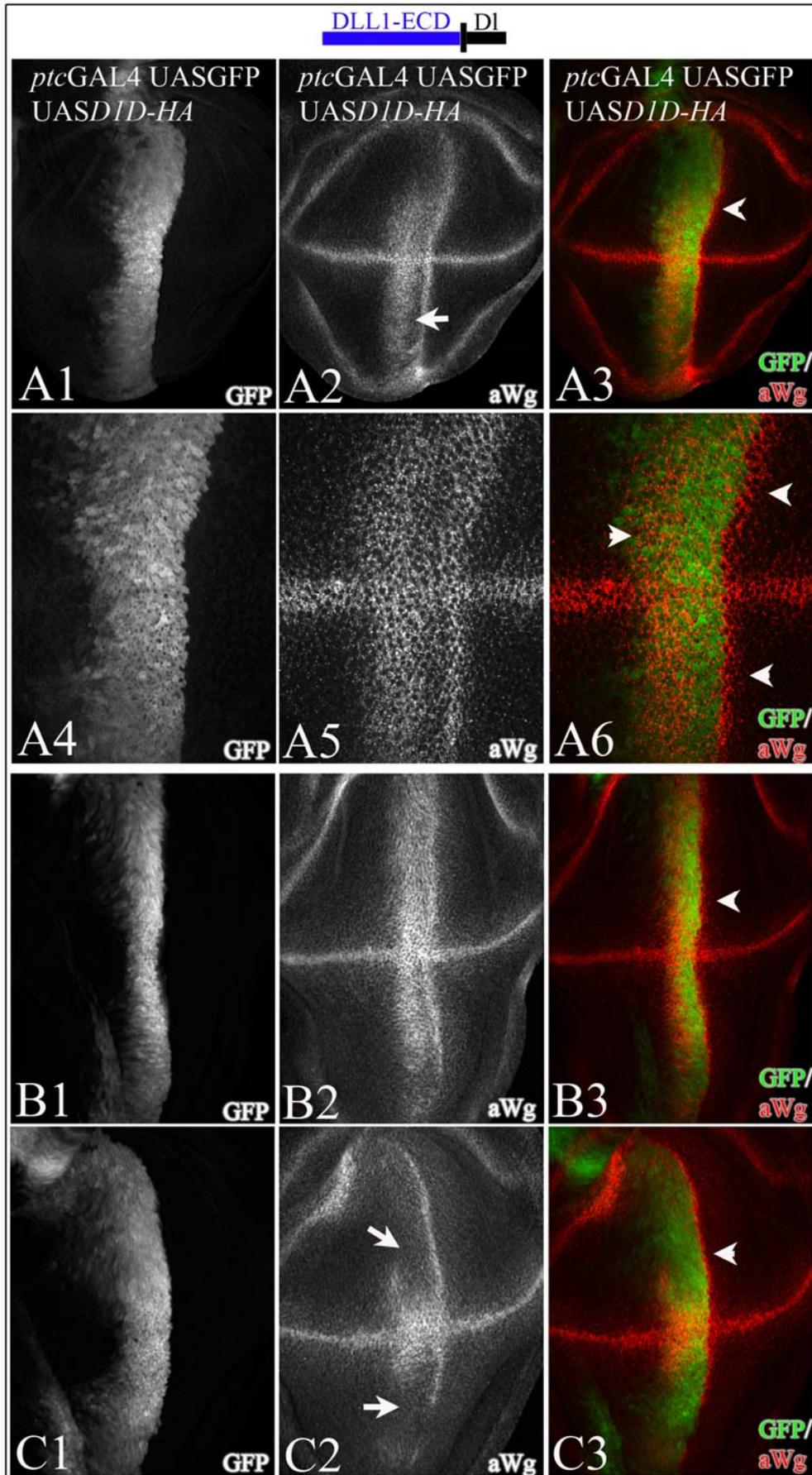


Abb.3.10: Effekte der Expression der D1D-Hybridproteine. Die Konstrukte zeigten eine Aktivierung der Wg-Expression in Zellen unmittelbar benachbart zum *ptc*-Streifen und in den Gebieten der niedrigen Expression im

anterioren Bereich des Streifens (Pfeilspitzen in **A3**, **A6**). Innerhalb der Bereiche höchster Expression führte die Expression von D1D zu einem *cis*-inhibitorischen Effekt (Pfeile in **A2** und **C2**), allerdings in variablen Ausmaß, zwischen den untersuchten Linien wie auch bei verschiedenen Flügelimaginalscheiben gleicher Linie. (Linie UAS-*DID-1* in **A**, 2Scheiben aus der Linie UAS-*DID-4* in **B** und **C**)
A4-A6 Stellt die Scheibe aus A1-3 vergrößert dar, um die Aktivierung der Wg-Expression unmittelbar posterior zum *ptc*-Streifen in dem das Konstrukt exprimiert wird, besser darzustellen.

Ein stärkerer *cis*-Inhibitorischer Effekt war bei den letzten Hybriden dieser Reihe zu beobachten, die die extrazelluläre Domäne von DLL4 mit der intrazellulären Domäne von DI kombinierten (D4D). Die Expression dieser Konstrukte führte zur Aktivierung von Notch vorwiegend im dorsalen Bereich der Flügelimaginalscheibe, auf einen möglichen Fng-Einfluß deutend (Pfeilspitzen in Abb.3.11 A3, B3).

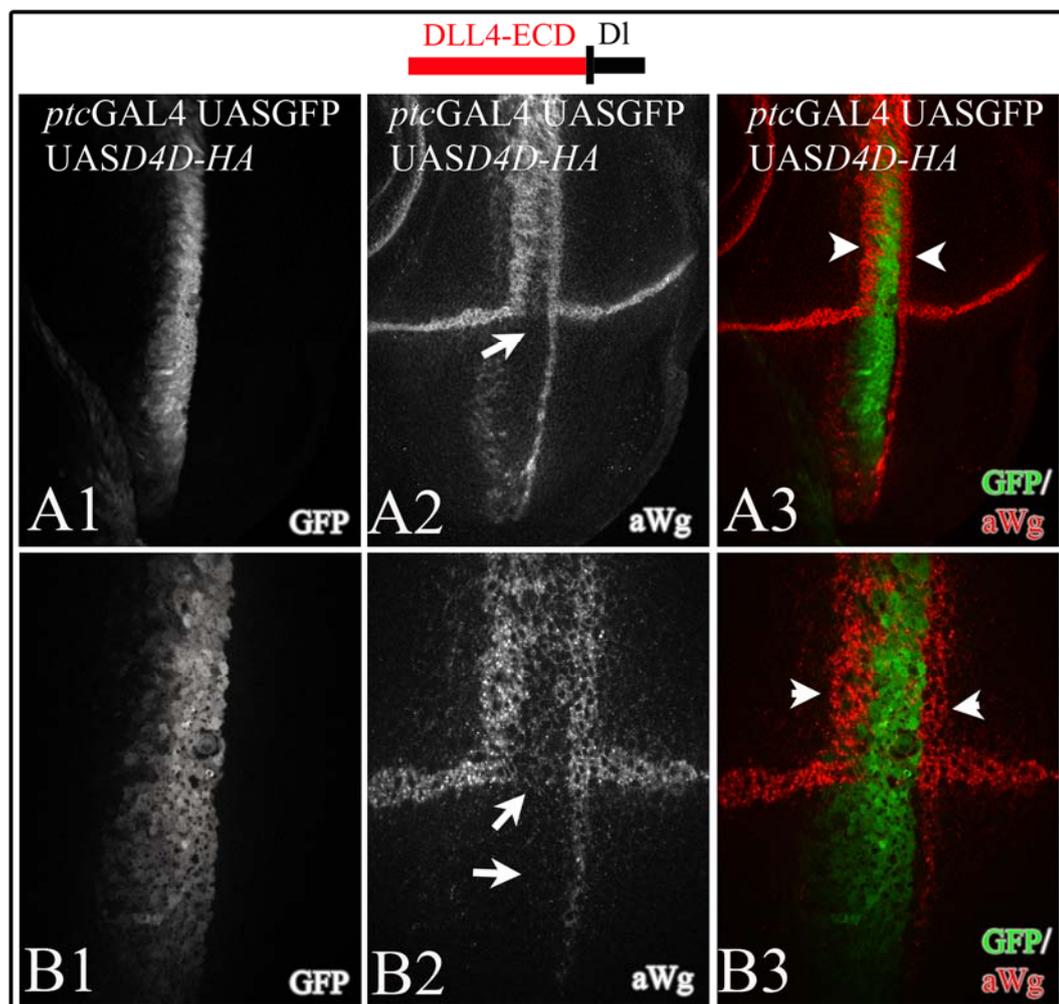


Abb.3.11: Effekte der Expression der D4D-Hybridproteine. Die Konstrukte aktivierten Wg-Expression in den Bereichen unmittelbar posterior zur Expressionsdomäne und in anterioren Bereichen niedrigerer Expressionsintensität (Pfeilspitzen in **A3**, **B3**). Keine Aktivierung und sogar eine Unterbrechung der endogenen Wg-Expression an der dorso-ventralen Grenze war jedoch im Bereich der hohen Expressionsintensität des Konstruktes zu beobachten (Pfeile in **A2**, **B2**).

Bilderreihe B stellt eine Vergrößerung der dorso-ventralen Region aus der Bilderreihe A dar.

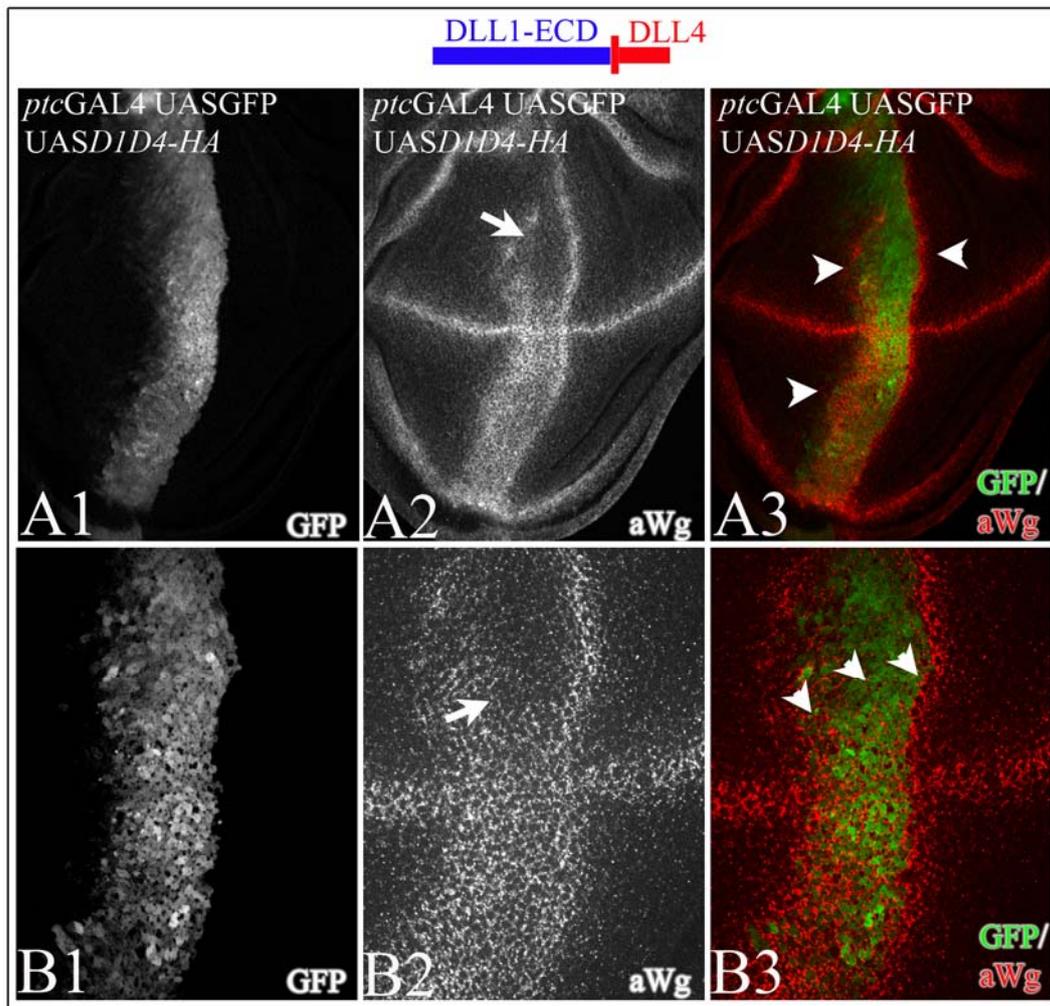
An der d/v Kompartimentsgrenze kam es zumeist zu einer Unterbrechung der Wg-Expression. Im ventralen Bereich, posterior zur Expressionsdomäne und in den diffusen, anterioren Ausläufern der *ptc*-Domäne fand ebenfalls eine Aktivierung von Notch statt. In der Regionen der hohen Expression jedoch, genauso wie an der d/v Grenze war im ventralen Bereich keine Aktivierung von Notch zu beobachten. Dieses Konstrukt weist also eine stärkere *cis*-inhibierende Funktionalität aus als dasjenige mit der extrazellulären Domäne aus DLL1. Diese Inhibierung scheint aber stärker im ventralen Bereich der Scheibe aufzutreten, während dorsal, also im Bereich der Fng-Expression, das Konstrukt über eine breiteren Expressionsbereich hinweg zur Aktivierung von Notch führen kann. Diese Effekte sind etwas verwirrend, da sie eine stärkere *cis*-inhibitorische Potenz der DLL4 extrazellulären Domäne in Vergleich zu der von DLL1 nahelegen, während die Expression des ganzen DLL4 Proteins bei allen neu generierten Transgenen keinen solchen Effekt zeigte. Von daher, kann bezüglich dieser Hybride eigentlich nur eine Aussage in Hinsicht auf DI getroffen werden.

3.4.2. Hybride zwischen DLL1 und DLL4

Eigentlich würde man bei diesen Hybriden erwarten, daß sie, wie die unveränderten Orthologen DLL1 und DLL4 den Notch-Signalweg in der ganzen *ptc*-Domäne und den posterior angrenzenden Zellen aktivieren. Dies war jedoch nicht der Fall.

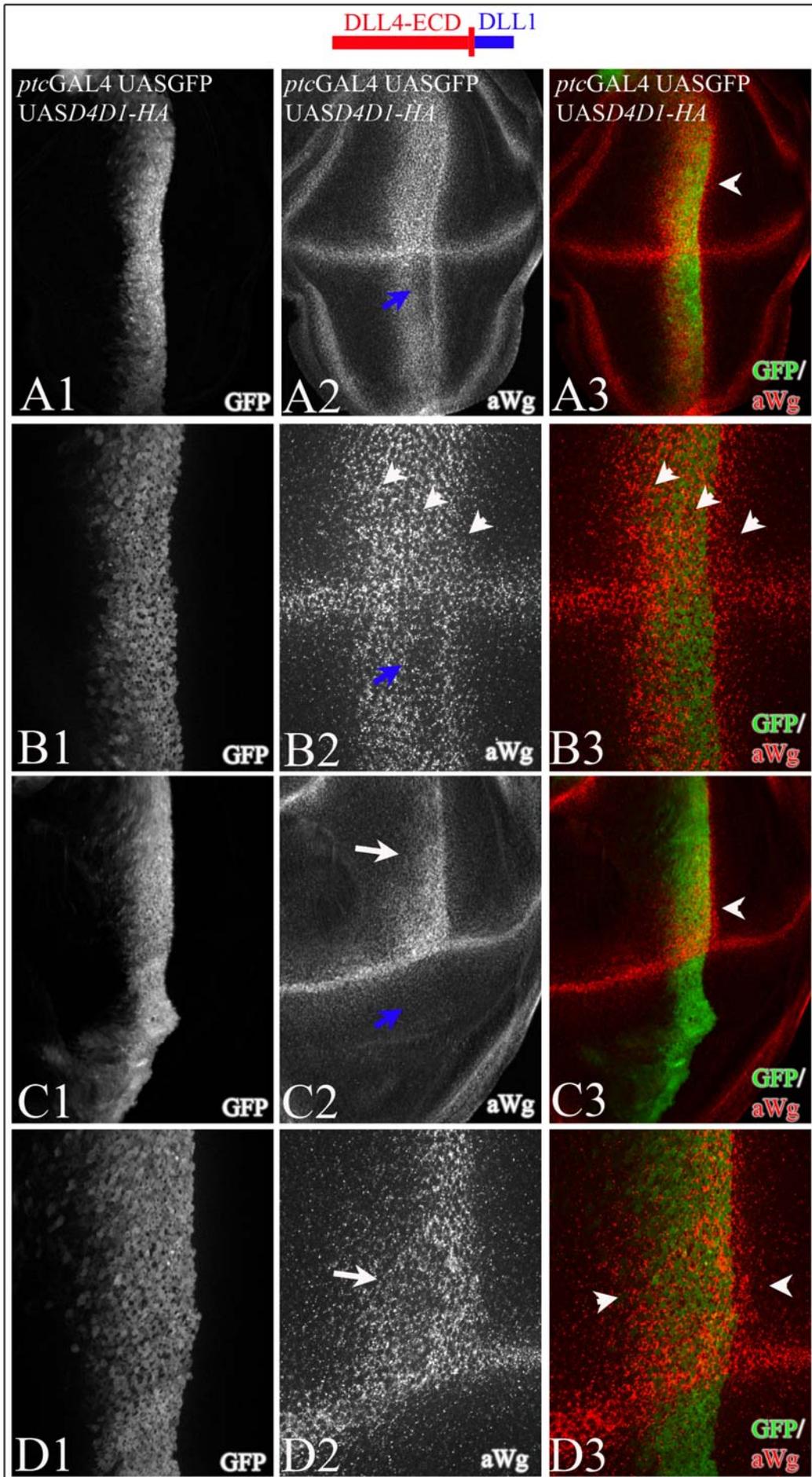
Hybride mit der extrazellulären Domäne von DLL1 und der intrazellulären von DLL4 (D1D4) zeigten einen schwachen *cis*-inhibitorischen Effekt in den Bereichen hoher Expression, vorwiegend im dorsalen Bereich (Pfeile in Abb.3.12 A2, B2). Ansonsten aktivierten sie Notch in allen Bereichen des *ptc*-Streifens und posterior daran angrenzend (Pfeilspitzen in Abb.3.12 A3, B3). Die Effekte ähneln denen aus der Expression von D1D, die im vorhergehenden Kapitel beschrieben wurde.

Abb.3.12: Effekte der Expression der D1D4-Hybridproteine. Die Expression der Konstrukte führte zu einer Aktivierung der Wg-Expression in den Bereichen unmittelbar posterior neben dem *ptc*-Expressionsstreifen und anterior in den Regionen niedrigerer Expressionsintensität des Konstrukts (Pfeilspitzen in **A3,B3**). In Bereichen hoher Expressionsintensität des Konstruktes konnte hingegen im dorsalen Bereich ein schwacher *cis*-inhibitorischer Effekt beobachtet werden (Pfeile in **A2, B2**). Bilderreihe B stellt die Region um die dorso-ventrale Kompartimentsgrenze aus A vergrößert dar.



Die umgekehrte hybride Kombination mit der extrazellulären Domäne von DLL4 und der intrazellulären von DLL1 (D4D1) zeigte wie vorhin D4D vorwiegend im dorsalen Bereich eine Aktivierung von Notch. Der *cis*-inhibierende Effekt scheint aber hier viel schwächer zu sein, da keinerlei Unterbrechungen der Wg-Expression an der d/v-Grenze und eine Aktivierung der Wg-Expression auch innerhalb des *ptc*-Streifens, in dem Bereich hoher Expressionsintensität des Konstruktes zu beobachten war (Abb.3.13 Pfeilspitzen in B2, B3). Dagegen kam es zur abgeschwächten oder keiner Induktion der Wg-Expression im ventralen Teil der Scheibe (Abb.3.13 blaue Pfeile in A2, B2, C2), was möglicherweise auf eine stärkere Abhängigkeit des Konstruktes von der Fng-Aktivität hindeutet.

Abb.3.13: Expressionseffekte der D4D1-Hybride. Die Expression dieser Konstrukte führte zu einer Aktivierung der Wg-Expression vorwiegend im dorsalen Bereich der Scheibe, dort im gesamten Bereich des *ptc*-Streifens und auch in den Zellen unmittelbar posterior daran angrenzend (Pfeilspitzen in Säule **A-D-3**) Im ventralen Bereich der Flügelimaginalscheibe konnte hingegen eine abgeschwächte Induktion der Wg-Expression (blauer Pfeil in **A2, B2**) oder sogar ihr völliges Fehlen (blauer Pfeil in **C2**) beobachtet werden, mit alleiniger Induktion im dorsalen Bereich der Scheibe (weißer Pfeil in **C2, D2**). Reihe B und D stellen vergrößert die Region um die d/v Grenze in A, respektive C dar.



4. Diskussion

Der Notch-Signalweg ist während der Entwicklung und in der Homöostase von Tieren wie Menschen an einer Vielzahl verschiedener Prozesse beteiligt. Alleine die Anzahl der Entwicklungsprozesse mit Beteiligung des Notch-Signalweges ist in den Invertebraten wie in den Vertebraten enorm und umfaßt Vorgänge wie z.B. die Neurogenese, Myogenese, Kardiogenese, Hämatopoese, die Bildung von Körperanhängen wie des Flügels, der Insektenbeine oder die Anlage der Extremitätenknospen in den Vertebraten (Lai, 2004). Die Aufgabe des Notch-Signalweges läßt sich hierbei als die eines Kontrollschalters beschreiben, der in direkter Interaktion benachbarter Zellen deren Determination steuert, indem er Vorgänge wie die Proliferation, Differenzierung und Apoptosis beeinflusst (Artavanis-Tsakonas et al., 1999). Es ist deswegen nicht erstaunlich, daß ein Signalweg, der derart vielseitig eingesetzt wird, strikt kontrolliert werden muß. Noch weniger erstaunt es, daß bei Versagen dieser Kontrollvorgänge, Fehler in der Signalübertragung zu schweren Entwicklungsdefekten, bzw. zur Entstehung verschiedener Krankheitssyndrome führen können, deren Auswirkungen bis zum Tod des betroffenen Individuums reichen. In den Vertebraten führen Mutationen in den Genen für Rezeptoren oder Liganden des Notch-Signalweges, ob sie nun die Notch-Aktivität steigern oder senken, allesamt zu vergleichbaren Phänotypen. Infolge von Defekten der vaskulären Morphogenese verenden die Embryonen an inneren Blutungen (Bianchi et al., 2006; Villa et al., 2001). Etwas schwächer in ihren Auswirkungen und häufig nicht letal sind Mutationen an *Jag1* und *Notch3*, sie führen allerdings zu verschiedenen Krankheitssyndromen. Mutationen im *Jag1*-Gen lösen das sogenannte Alagille Syndrom aus mit angeborenen Defekten an Herz, Nieren, Leber und Skelettaufbau (Li et al., 1997; Oda et al., 1997). Die Defekte verursacht durch Mutationen im *Notch3* treten erst mit dem Eintritt in die Adoleszenz in Form des CADASIL-Syndroms auf (Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy), der durch Schäden in den kleinen zerebralen Gehirnarterien eine Prädisposition zu Hirninfarkten erschafft (Joutel et al., 2004; Tournier-Lasserre, 1993). Da der Notch-Signalweg ferner ebenfalls eine Rolle in der Homeostasis hat, können neben diesen angeborenen Defekten auch im Laufe des Lebens erworbene Mutationen zu Krankheiten führen. Dies ist z.B. durch die Beteiligung des Notch-Signalweges an der Hämatopoese bei der Entstehung der akuten T-Zellen lymphoblastischer Leukämie (T-ALL) der Fall. Sequenzierung von DNA-Proben von T-ALL Patienten zeigte auf, daß in über 50% aller Fälle

das Auftreten der Krankheit mit aktivierenden Mutationen im *Notch1*-Gens korrelierte. (Weng et al., 2004).

Die oben aufgeführten Krankheiten und embryonale Entwicklungsdefekte beziehen sich mit Mutationen in Notch-Rezeptoren oder Liganden der Vertebraten allesamt auf Kernkomponenten des Notch-Signalweges. Mit den wachsenden Erkenntnissen über die Beteiligung neuer Proteine und Regulationsprozesse am Notch-Signalweg, erscheint es aber naheliegend, daß auch diese neuen Prozesse möglicherweise bei einer Fehlfunktion pathologische Folgen haben könnten, was die Bedeutung ihrer Erforschung auch außerhalb reiner Grundlagenwissenschaft herausstellt.

Die vorliegende Arbeit untersuchte zwei solcher Regulationsmechanismen der Notch-Aktivität, einen, der durch das Protein Lethal (2) giant discs vermittelt wird und als zweites die ligandenabhängige *cis*-Inaktivierung des Notch-Signalweges. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen werden in folgenden Kapiteln diskutiert.

4.1. Projekt I: Lethal (2) giant discs

Der Ausfall von *lgd* führt zu mannigfaltigen Defekten in der Entwicklung von *Drosophila melanogaster*, die zur Letalität in der pupalen Phase führen. Entwicklungsprozesse in der Fliege, an denen der Notch-Signalweg beteiligt ist, wie die Entwicklung der Flügel, der Beine und der Augen zeigen Defekte wie Überproliferation und verbreiterte Expression der Zielgene des Notch-Signalweges wie *wg*, *cut* und *vg*, die auf eine erhöhte Aktivität des Notch-Signalweges deuten ((Buratovich and Bryant, 1995; Klein, 2003) und eigene Beobachtungen). Zudem zeigten weitere Untersuchungen, daß die Herausnahme von wichtigen Proteinen des Notch-Signalweges wie Psn, das für den S3-Schnitt nach der Ligandenbindung notwendig ist, oder des Effektors Su(H), das Auftreten der *lgd*-verursachten Defekte unterdrückt (Klein, 2003). All diese Beobachtungen implizierten zusammengenommen, daß Lgd ein neuer, genereller negativer Regulator der Notch-Signalwegaktivität ist. Um diese Schlußfolgerung zu überprüfen und die Funktion von Lgd weiter charakterisieren zu können, war es das Ziel dieses Projektes, *lgd* zu klonieren und es molekular zu charakterisieren.

4.1.1. Die Transkriptionseinheit CG4713 kodiert das *lgd*-Gen

Mit Hilfe der P-Element-Insertion *l(2)SH0495* ist es in Rahmen dieser Arbeit gelungen, die für das *lgd*-Gen kodierende Transkriptionseinheit zu identifizieren. Die in der bioinformatisch vorhergesagten Geneinheit *CG4713* inserierende *l(2)SH0495*-Linie, komplementierte nicht

gegen die vorhandenen *lgd*-Allele. Homozygote *l(2)SH0495* Tiere zeigten Anzeichen einer leichten Überaktivität des Notch-Signalweges. In Heterozygose über den alten *lgd*-Allelen oder die Defizienz *Df(2L)FCK-20* (Barrio et al., 1999), die den *lgd*-Locus umfaßt, war die Überaktivität des Notch-Signalweges verstärkt zu beobachten, darauf hindeutend, daß *l(2)SH0495* ein neues, schwaches *lgd*-Allel darstellte. Die Mobilisierung der Insertion führte sowohl zur Entstehung von wildtypischen Revertanten wie von neuen, starken *lgd*-Allelen. Eine Sequenzierung der neu generierten und der vorher vorhandenen Allele zeigte in allen Linien Mutationen in der, von der P-Element *l(2)SH0495* Insertion betroffenen *CG4713* Transkriptionseinheit. Erstaunlich hierbei war, daß die Allele *lgd^{d1, -d4, -d7, -d10}*, die von unterschiedlichen Arbeitsgruppen stammten (siehe für: *lgd^{d1, -d7}*- (Bryant and Schubiger, 1971; Buratovich and Bryant, 1997), *lgd^{-d4}*- (Agrawal et al., 1995), *lgd^{d10}*- (Santaren et al., 1998)) und auf unterschiedlichen Wegen erzeugt worden waren, alle die gleiche 2bp lange Deletion aufwiesen. Offensichtlich muß es dabei irgendwo zur Verwechslung der Fliegenlinien gekommen sein.

All die oben aufgezählten Hinweise darauf, daß *CG4713* tatsächlich das gesuchte *lgd*-Gen war, fanden ihre letztendliche Bestätigung in der Tatsache, daß durch eine Expression der *CG4713* bzw. nun *lgd*-Transkriptionseinheit, die als Transgen in die Fliege wiedereingeführt wurde, der *lgd*-Phänotyp gerettet werden konnte. Als Rettung wurde hierbei die Wiederherstellung der normalen Flügelmorphologie und Wg-Expression in der Flügelimaginalscheibe in den Bereichen einer Überexpression von Lgd oder Expression von LgdHA mittels einer *daGAL4* oder *hhGAL4*-Treiberlinie betrachtet.

4.1.2. Phänotypen der Überexpression von Lgd

Gesucht und kloniert wurde mit *lgd* ein negativer Regulator der Notch-Aktivität. Von dieser Klassifizierung und den Ergebnissen der Rettungsexperimente ausgehend würde man bei einer Überexpression von Lgd im wildtypischen Hintergrund eine Reduktion der Notch-Aktivität erwarten. Diese Erwartung erfüllte sich nur zum Teil, bei der Überexpression von schwachen transgenen *lgd*-Linien. Hierbei war eine Abschwächung der Notch-Aktivität zu beobachten, die sich in den Flügelimaginalscheiben in etwas abgeschwächter und teilweise unterbrochener Wg-Expression manifestierte, wenn das Transgen im Bereich der künftigen Flügeltasche exprimiert wurde (*sdGAL4* Treiberlinie). In adulten Strukturen waren dann dementsprechend korrespondierende Phänotypen abgeschwächter Notch-Aktivität zu sehen, wie z.B. verbreitete Flügelvenen, Unterbrechungen des Flügelrandes oder zusätzliche Borsten auf dem Scutellum. Das Bild wandelte sich jedoch bei Lgd-Überexpression mittels einer stark

exprimierenden oder mehrerer UAS-*lgd* transgener Linien gleichzeitig. In diesem Fall war in der Scheibe eine verbreiterte Expression des Gbe-Su(H)-lacZ Konstruktes, der die Notch-Aktivität widerspiegelt, sowie der Marker des künftigen Flügelrandes, Wg und Sens zu beobachten. Untersuchungen adulter Flügel von Tieren, die solche stärkeren, oder mehrere UAS-*lgd* Transgene überexprimierten zeigten eine Erweiterung des Flügelrandes im distalen und seinen Verlust in den proximalen Flügelregionen. Somit stand der Abschwächung der Notch-Aktivität bei Überexpression von schwach exprimierenden Linien eine Mischung aus den, die Notch-Aktivität inhibierenden und verstärkenden Effekten bei erhöhter Transgenüberexpression gegenüber. Die verstärkende Wirkung der Lgd-Überexpression ähnelt hierbei sehr den Phänotypen, die bei Verlust der Genfunktion beobachtet wurden. Eine weitere Steigerung der Notch-Aktivität war festzustellen, wenn zusammen mit Lgd ebenfalls Notch überexprimiert wurde. Anscheinend ist die Funktion von Lgd sehr dosisabhängig, wobei, wenn man die *in-situ* Färbungen, die eine niedrige *lgd*-Transkription nahelegen und die Effekte hoher Lgd-Konzentrationen infolge gleichzeitiger Überexpression von mehreren Transgenen in Zusammenhang betrachtet, eine niedrige Konzentration von Lgd für die Inhibition der Notch-Aktivität notwendig und ausreichend ist. Die erhöhte Notch-Aktivität bei hohen Konzentrationen von Lgd könnte darauf zurückzuführen sein, daß andere Faktoren, die für die negative Regulation der Notch-Aktivität notwendig sind, bei hoher Konzentration von Lgd herabtitriert werden. Dies würde bedeuten, daß Lgd wahrscheinlich die Inhibition der Notch-Aktivität nicht alleine bewerkstelligen kann, sondern dazu der Bindung und möglicherweise auch der Aktivität anderer, noch zu identifizierenden Proteine bedarf. In der Überexpressionssituation wäre dann die Bildung oder die Lokalisation dieses, die Notch-Aktivität inhibierenden, Komplexes durch Titration von seinen Komponenten verhindert, was zu den beobachteten Phänotypen einer erhöhten Notch-Aktivität führte. Die Identifikation dieser anderen Faktoren ist eines der vordringlichen Ziele zur weiteren Erforschung der Lgd-Funktion.

4.1.3. Untersuchung der Funktion von Lgd

Die Ähnlichkeit der beobachteten Effekte in der *lgd*-Mutanten wie in der Lgd-Überexpressionssituation auf die Notch-Aktivität und die Flügelentwicklung bestätigte sich auch bei näherer Untersuchung beider experimenteller Situationen auf der zellulären Ebene. Sowohl bei Verlust der *lgd*-Genfunktion wie auch in Überexpression konnte in den betroffenen Zellen das Auftreten großer Vesikel beobachtet werden. Diese Vesikel enthielten Notch, Wg und Dl. Der Notch-Rezeptor war hierbei in den gleichen Vesikeln sowohl mit dem

Antikörper gegen seine extrazelluläre, wie dem gegen die intrazelluläre Domäne detektierbar, was bedeutet, daß möglicherweise der vollständige Notch-Rezeptor darin enthalten war und nicht nur der aktive intrazelluläre Teil, der nach der ligandenabhängigen Aktivierung des Rezeptors durch den γ -Sekretase-Komplex vermittelten S3-Schnitt generiert wird (De Strooper et al., 1999; Song et al., 1999; Struhl and Adachi, 2000; Struhl and Greenwald, 1999; Ye et al., 1999). Mit Hilfe von *uptake*-Experimenten konnte gezeigt werden, daß diese Vesikel endosomalen Ursprungs sind, wobei der Notch-Rezeptor oder auch unspezifische Fracht (Dextran TexasRed) von der Zelloberfläche aufgenommen wird. Sowohl das Fehlen von *lgd* als auch dessen Überexpression haben also eine Störung des endosomalen Transports zur Folge, welche von der Überaktivierung des Notch-Signalweges begleitet werden. Erst kürzlich sind Störungen des endosomalen Transports verursacht durch Mutationen in verschiedenen Mitgliedern der ESCRT-Komplexe als ursächlich für eine ektopische Aktivierung verschiedener Signalwege, darunter auch des Notch-Signalweges gezeigt worden (Moberg et al., 2005; Thompson et al., 2005; Vaccari and Bilder, 2005). Die Ähnlichkeit der beobachteten Effekte legt also die Möglichkeit nahe, daß *lgd* ebenfalls eine Funktion in dem endosomalen Transport von Notch hat. Dieser Eindruck wurde durch die Tatsache bestätigt, daß die Überaktivierung des Notch-Signalweges bei *lgd*-Ausfall mittels Expression von GFP-Fusionsproteinen mit Rab5, Rab7 oder der FYVE-Domäne gerettet werden konnte. Es ist unklar, worauf diese Rettung beruht, da die von den drei Konstrukten hervorgerufenen Effekte möglicherweise vollkommen unterschiedlicher Natur sind. Die Expression von Rab5 und der FYVE-Domäne führt zur Bildung von großen Endosomen, die dem frühen endosomalen Kompartiment zugerechnet werden (Gillooly et al., 2000; Stenmark et al., 1994). Dieser Effekt scheint bei Rab5 durch die gesteigerte Rate der Endozytose und eine Stimulierung der Fusion früher Endosomen zustande zu kommen (Bucci et al., 1992; Stenmark et al., 1994). Das FYVE-GFP Konstrukt führt ebenfalls bei Expression zur Bildung großer Vesikel, verdrängt aber dabei den Rab5-Effektor EEA1 von den Vesikelmembranen (Gillooly et al., 2000), die Entstehung großer Vesikel basiert also hierbei möglicherweise auf einem anderen Mechanismus, als bei der Rab5-Überexpression. Über die Auswirkungen einer Überexpression von Rab7 gibt es widersprüchliche Berichte, die allesamt von einer veränderten Transportgeschwindigkeit der Endosomen berichten (Beschleunigung: (Choudhury et al., 2002; Dale et al., 2004; Mukhopadhyay et al., 1997), Verlangsamung: (Lebrand et al., 2002)) wobei die meisten Arbeiten eine Beschleunigung des Transports hin zu dem späten endosomalen und lysosomalen Kompartiment nahelegen, die zu einer perinukleären Akkumulation der Vesikel führen (Referenzen für Beschleunigung und

Verlangsamung + (Vonderheit and Helenius, 2005), für Rab7 (Bucci et al., 2000; Lebrand et al., 2002)

Als eine Gemeinsamkeit der Expression dieser drei Proteine kann herausgestellt werden, daß sie das Gleichgewicht zwischen den einzelnen endosomalen Kompartimenten stören, wobei die Vesikel hervorgerufen durch die Expression von Rab5 und FYVE-GFP dem frühen, die hervorgerufen durch Rab7 dem späten endosomalen Kompartiment zugerechnet werden (Bucci et al., 2000; Gillooly et al., 2000; Lebrand et al., 2002; Stenmark et al., 1994). Noch näher zu bestimmende Aspekte erfolgend aus dieser Störung des Gleichgewichts zwischen den endosomalen Kompartimenten führten zur Rettung des *lgd*-Phänotypen, was zusammen mit den Daten über Effekte der Mutationen in Mitgliedern der ESCRT-Komplexe und den hier beobachteten Störungen des endosomalen Transports in *lgd*-Mutanten und bei der Lgd-Überexpression nahelegt, daß *lgd* ebenfalls in den endosomalen Transport von Notch involviert sein könnte.

Um festzustellen, welchem endosomalen Kompartiment die bei *lgd*-Ausfall oder Überexpression beobachteten Vesikel zuzurechnen sind, wurden Antikörperfärbungen gegen verschiedene Effektoren des endosomalen Transports durchgeführt, die aufgrund ihrer Beteiligung an spezifischen Prozessen während der Endozytose als Marker bestimmter endosomaler Kompartimente benutzt werden können. Hierbei zeigte sich in der Lgd-Überexpressionsdomäne ein massives Aufkommen großer, Rab5-markierter Vesikel, dem Marker des frühen endosomalen Kompartiments. *In-situ* Färbungen der Scheiben aus solchen Lgd-Überexpressionsexperimenten mit einer spezifischen Sonde gegen die *Rab5*-mRNA zeigten, daß die Transkription von *Rab5* durch die Lgd-Überexpression nicht beeinflusst wurde. Das massive Erscheinen der großen Vesikel ist also nicht einfach auf eine erhöhte Expression von Rab5 zurückzuführen, das die initialen Vorgänge der Vesikelbildung und Vesikelfusion vermittelt sowie ihre Motilität beeinflusst (Stenmark and Olkkonen, 2001). Ebenfalls bleibt die Internalisierungsrate des Notch-Rezeptors unbeeinflusst, bzw. dieser Einfluß liegt unterhalb der Schwelle, die zu sichtbaren Veränderungen der Konzentration des Notch-Rezeptors an der Zelloberfläche führen würde. In der *lgd*-mutanten Situation konnte ebenfalls eine Assoziation der meisten Vesikel mit Rab5 beobachtet werden, allerdings ohne, daß ein mit der Überexpression vergleichbares verstärktes Auftreten solcher Vesikel in den *lgd*-Klonen erkennbar wäre. Eine etwas schwächere Assoziation der Notch-enthaltenden Vesikel konnte sowohl in der mutanten als auch in der Überexpressionssituation mit den Markern der folgenden beiden Kompartimente, Hrs und Rab7 festgestellt werden.

In der Überexpression wie bei Genausfall assoziierten die beobachteten Vesikel also im starken Ausmaß mit Rab5, dem Marker des frühen Endosoms, Hrs, das die reifende endosomale Fraktion, die MVBs kennzeichnet und mit Rab7. Die beiden ersten Beobachtungen legen eine Zugehörigkeit der Notch-enthaltenden Vesikel in der mutanten wie in der *Lgd*-Überexpressionssituation zu den reifenden Endosomen nahe. Rab7 wird üblicherweise den späten Endosomen zugerechnet, allerdings zeigten in letzter Zeit Untersuchungen des endosomalen Transportweges in vertebraten Zelllinien, daß das Rab7-Protein anscheinend auch an den früheren Phasen des endozytotischen Transports beteiligt ist, als dies bis vor kurzem angenommen wurde. In verschiedenen Zelllinien sind etwa 10-15% aller Rab5-positiver Vesikel gleichzeitig mit Rab7 assoziiert (Lakadamyali et al., 2006). Diese Koassoziation ist auf die sogenannte Rab-Konversion zurückzuführen, die während der Vesikelreifung zu beobachten ist (Rink et al., 2005). Dieser Begriff beschreibt die während der Vesikelreifung stattfindende Veränderung der Proteinzusammensetzung auf der Oberfläche der Vesikel, die nicht schlagartig, sondern kontinuierlich auf dem Weg von der Zellperipherie zur perinuklearen Region geschieht, so daß zur gleichen Zeit auch Marker verschiedener endosomaler Kompartimente auf den Vesikeln vorhanden sind (Lakadamyali et al., 2006; Rink et al., 2005). Mit der Größe der Vesikel und deren Entfernung von der Zellmembran nimmt dabei die Konzentration von Rab5 auf der Vesikeloberfläche ab, die von Rab7 dagegen zu. Frachtabhängig scheint es dabei Geschwindigkeitsunterschiede in dem Prozeß der Rab-Konversion zu geben (Lakadamyali et al., 2006). Vesikel mit Fracht, die zum Recycling bestimmt ist, wie z.B. dem Transferrin-Rezeptor, reifen und akkumulieren Rab7 langsamer, als die zum Abbau bestimmten Vesikel mit dem EGF-Rezeptor (Lakadamyali et al., 2006). Ähnliches wurde auch für den Transport einiger Viren beobachtet, die die Endozytose als den Weg zur Infektion der Zellen mißbrauchen (Lakadamyali et al., 2006; Vonderheit and Helenius, 2005). Rab7 kann also durchaus auch auf frühen und reifenden Endosomen vorhanden sein. Man könnte nun versuchen, die Identität der beobachteten, Notch-enthaltenden Vesikel über die Quantifizierung der Assoziationsgrade mit den verschiedenen Vesikelmarkern näher zu bestimmen. Problematisch ist nur, daß der Ausfall von *lgd* wie die Überexpressionssituation anscheinend zum abweichenden endozytotischen Transport des Notch-Rezeptors führt, und daß dieser Defekt vielleicht auch generell den Transport anderer Fracht beeinträchtigt, wie an Beispiel von Wg und D1 auch in dieser Arbeit festgestellt werden konnte. Der beobachtete Phänotyp vergrößerter Vesikel, die Marker des frühen und des reifenden endosomalen Kompartiments enthalten, tritt sehr ähnlich bei der

Überexpression von Rab5, Rab7 und FYVE-GFP (Gillooly et al., 2000; Stenmark et al., 1994) oder bei Mutationen in vielen Genen der sogenannten Klasse E Vps-Gruppe (Raymond et al., 1992) auf, die an der Bildung der MVBs beteiligt sind. Infolge verzögerten Transports akkumuliert in den oben genannten Fällen die Fracht ebenfalls in vergrößerten, frühen Endosomen. Diese Verzögerung könnte eventuell auch zu Veränderungen in der Art und Geschwindigkeit der Prozesse führen, die z.B. zur Akkumulation von Rab7 auf den Vesikeln führt und somit die Zuordnung der Vesikel anhand der Quantifizierung vereiteln. Ob die Geschwindigkeit der Endozytose von Notch in *lgd*-mutanten Zellen und bei der Lgd-Überexpression verändert wird, ist in Rahmen dieser Arbeit noch nicht untersucht worden und wird eines der vordringlichen Projekte in der nächsten Zeit sein. Eines der Anzeichen für einen solchen verzögerten Transport ist die Ansammlung ubiquitiniertes Fracht in den vergrößerten frühen Endosomen, wie zB. in *hrs*-mutanten Zellen (Jekely and Rorth, 2003). Ob eine solche Ubiquitinierung ebenfalls in *lgd*-Zellen stattfindet ist aufgrund unspezifischer Wechselwirkungen der bis jetzt getesteten Ubiquitin-Antikörper noch unklar und wird im Anschluß an diese Arbeit weiter zu untersuchen sein.

Momentan gilt jedoch, daß Lgd an dem endosomalen Transport von Notch beteiligt ist, indem es entweder dessen Transport durch das endosomale Netzwerk oder den Zugang des Rezeptors zu einem spezifischen endosomalen Kompartiment kontrolliert, in dem die Aktivierung des Rezeptors stattfinden kann. Diese Aktivierung hängt auch in *lgd*-mutanten Zellen von der Aktivität des γ -Sekretase-Komplexes ab (Klein, 2003), allerdings ist es bis jetzt unbekannt, in welchem zellulären Kompartiment der von diesem Komplex vermittelte S3-Schnitt stattfindet. Beobachtungen aus HeLa Zellen, die zeigen, daß dem S3-Schnitt eine Monoubiquitinierung und Endozytose des Notch-Rezeptors vorausgehen müssen legen nahe, daß zumindest in menschlichen Zellen, der S3-Schnitt in einem bis jetzt unidentifizierten endosomalen Kompartiment stattfindet (Gupta-Rossi et al., 2004).

Einige Arbeiten zeigten in letzter Zeit auf, daß Funktionsverlust von Genen für die Proteine Vps25 oder Erupted/TSG101 (Moberg et al., 2005; Thompson et al., 2005; Vaccari and Bilder, 2005) Defekte in der Endozytose mit ähnlicher ektopischer Notch-Aktivierung zur Folge haben wie im Falle von *lgd*. Diese Proteine gehören den ESCRT-Komplexen an und sind an der Bildung der MVBs beteiligt, die essenziell für den Abbau verschiedener Transmembranrezeptoren sind (Babst, 2005; Hurley and Emr, 2006). Der Ausfall von Hrs allerdings, das die ESCRT-Komplexe zu der Ihnen bestimmten, ubiquitinierten Fracht an den

frühen Endosomen rekrutiert (Bache et al., 2003a) führt zwar zu einer Akkumulation aber zu keiner Aktivierung von Notch (Lu and Bilder, 2005). Dies legt nahe, daß die Aktivierung von Notch zu einem Zeitpunkt nach der von Hrs vermittelten Rekrutierung der Proteine der ESCRT-Komplexe stattfinden muß. Stört man die Prozesse vor diesem Schritt, wie z.B. durch das Ausschalten der *hrs*-Funktion, so verändert man den endozytotischen Transport des Notch-Rezeptors, sei es nun, daß der Transport verzögert, sei es, daß möglicherweise das Kompartiment, in dem die Aktivierung von Notch stattfindet umgangen wird.

So rettet z.B. die Expression der FYVE-Domäne, die aus dem Hrs-Protein stammt, den *lgd*-Phänotyp. Es wurde gezeigt, daß die Expression von FYVE-GFP wie von Hrs zu einer Akkumulation des EGF-Rezeptors in den frühen Endosomen führt (Gillooly et al., 2000; Jekely and Rorth, 2003). FYVE-GFP verhindert dabei die über den Rab5-Effektor EEA1 vermittelte homotypische Fusion der frühen Vesikel, indem es EEA1 von den PI3P-reichen Abschnitten auf der Vesikelmembran verdrängt (Petiot et al., 2003). Der Transport der Fracht, die normalerweise von Hrs spezifisch zum Transport über die MVBs zum spätendosomalen Kompartiment sortiert wird, wird dadurch stark verlangsamt, während Fracht, die unspezifisch zum Abbau transportiert wird, unbeeinflusst bleibt (Petiot et al., 2003). Die Überexpression von Rab5 führt ebenfalls zur Bildung von vergrößerten frühen Endosomen (Stenmark et al., 1994) und verzögert so den Transport zu dem späten Endosom. Die Rettung des *lgd*-Phänotypen ist also wahrscheinlich auf verzögerten Zufluß des Rezeptors infolge der Expression von FYVE-GFP oder Rab5-GFP zurückzuführen, will man nicht hierzu einen neuen, bis jetzt noch unentdeckten Transportweg postulieren, der als Alternative zu dem blockierten zum späten Endosom eingeschlagen wird.

Die Rettung mit Rab7-GFP ist auch aufgrund der schon erwähnten Diskrepanzen, zur seiner endosomalen Zuordnung, die neben den Aufgaben im spätendosomalen auch gewisse Funktionen im frühendosomalen Kompartiment nahelegt, wie zu den Effekten der Expression, ob nun den endosomalen Transport beschleunigend oder bremsend, noch schwieriger zu deuten. Betrachtet man jedoch die Effekte der Mutationen in den Genen für die ESCRT-Komplex-Mitglieder mit den Rettungen mittels Rab5/FYVE-Domäne-GFP zusammen, so erscheint es im Moment am wahrscheinlichsten, daß die Funktion von *lgd* und die von dessen Ausfall verursachten Defekte in das reife endosomale Kompartiment anzusiedeln sind. allerdings wahrscheinlich zu einem anderen Zeitpunkt, als dies bei den ESCRT-Proteinen der Fall ist. Trotz der Ähnlichkeit der Ausfall-Phänotypen zwischen *lgd* und den *ESCRT* Zellen, was die Überaktivierung des Notch-Signalweges anbetrifft, treten daneben auch einige Unterschiede zwischen den Mutationen zutage. Die Ausfall von *lgd* führt zur hyperplastischer

und nicht neoplastischer Überproliferation des Gewebes, die zudem auf die *lgd*-Zellen beschränkt ist. Allerdings legt die Tatsache, daß Lgd nicht in der Hefe vorkommt, wie dies der Fall für alle Proteine der ESCRT-Komplexe ist, nahe, daß Lgd kein mit ihnen vergleichbar genereller Faktor während des endosomalen Transports ist.

4.1.4. Funktionelle Untersuchung der Proteindomänen von Lgd

Um Hinweise auf mögliche Funktionen der bioinformatisch vorausgesagten Proteindomänen von Lgd zu erhalten sind Konstrukte erzeugt und in die Fliege eingeführt worden, in denen die C2-Domäne, bzw. die ersten zwei oder alle DM14-Domänen deletiert worden waren. Diese Konstrukte sind anschließend in wildtypischen und *lgd*-mutanten Hintergrund exprimiert worden und auf die Phänotypen der Expression, bzw. auf Rettung des *lgd*-Phänotypen hin (anhand der Normalisierung der verbreiterten Wg-Expression in der Flügelimaginalscheibe) untersucht worden.

Für die Funktion von Lgd bei der Regulation der Notch-Aktivität schien zumindest die Funktion der C2-Domäne und die dadurch vermittelte subzelluläre Lokalisation des Proteins nicht relevant zu sein, da das Konstrukt trotz der weitgehend nukleären Lokalisation dennoch den *lgd*-Phänotypen retten konnte. Die gleiche Entbehrlichkeit konnte auch für die DM14-Domäne festgestellt werden, trotz der Tatsache, daß diese Domäne und weitgehend auch deren vierfache Wiederholung in allen Orthologen konserviert ist. Auch ein Konstrukt in dem alle DM14 Domänen deletiert wurden (Lgd Δ DM14) konnte bei Expression im posterioren Teil der Flügelscheibe die normale Notch-Aktivität dort wiederherstellen. Trotzdem scheinen die DM14-Domänen eine Hilfsfunktion zu haben, sei es in der Lokalisierung, sei es in der Bindung anderer Effektoren. Bei Expression im Flügel zeigte das Konstrukt nämlich viel schwächere Aktivität als das vollständige LgdHA und unterbrach nicht wie dieses die posteriore Quervene, die im Gebiet der Expression mittels *ptc*GAL4 liegt. Für die Funktion von Lgd, also die negative Regulation der Notch-Aktivität müssen also andere Proteinbereiche primär verantwortlich sein. Tatsächlich zeigt ein Sequenzvergleich aller Lgd-Orthologen zwei weitere Bereiche, N- und C-terminal zu den DM14-Wiederholungen als stark konserviert an.

4.1.5. Lgd gehört zu einer in den Metazoen konservierten Proteinfamilie

Die bioinformatische Analyse von Lgd ergab, daß es ein Mitglied einer neuartigen Familie ist, die sich durch das Vorhandensein zweier Domärentypen charakterisieren läßt. Dies ist zum einen die neuartige DM14-Domäne, die als vierfache Wiederholung in Lgd vorliegt sowie die C2-Domäne. Die Funktion der DM14-Domänen ist unbekannt, Lgd ist das einzige Protein in der Fliege mit diesem Motiv. Die C2-Domäne wird zumeist für die Bindung von Phospholipiden benutzt (Nalefski and Falke, 1996), in manchen Proteinen aber auch für Protein-Protein Interaktionen eingesetzt (Benes et al., 2005). Auch in Lgd scheint sie für die Lokalisation verantwortlich zu sein, wie die Deletion des Motivs zeigte. Anstatt der zytoplasmatischen Verteilung und einer leichten apikalen Anreicherung, die das HA-markierte, ansonsten wildtypische Protein zeigte, war das Deletionskonstrukt ohne die C2-Domäne überraschenderweise im Zellkern zu finden. Ob diese veränderte Lokalisation auch einen funktionellen Hintergrund haben kann ist unklar. Eine andere Gruppe hat ein Fragment von mLgd2/Freud-1 als einen möglichen transkriptionellen Repressor des 5-HT1A Serotonin Rezeptors gefunden (Ou et al., 2003). Auch wenn innerhalb dieser Arbeit kein Hinweis auf eine derartige Funktion von Lgd gefunden werden konnte, ein anderer Artikel beschreibt ebenfalls die nukleare Lokalisierung verschiedener endozytischer Proteine nach Inhibition des nuklearen Exportes, die allesamt kleiner als ~50kDa waren und somit frei in den Kern diffundieren konnten, ua. für Eps15, α -Adaptin und Epsin1 (Vecchi et al., 2001). Allerdings konnte auch hier keine funktionelle Begründung für diese Lokalisierung der endozytischen Proteine gezeigt werden. Das von dem UAS*lgd* Δ C2-Konstrukt kodierte Protein ist in etwa 71kDa groß, was oberhalb der erwähnten Grenze für freie Permeabilität in den Kern liegt. Die Akkumulierung des Lgd Δ C2-Konstruktes im Kern ist also möglicherweise auf aktive Vorgänge zurückzuführen.

Mit *lgd* wurde also innerhalb dieser Arbeit ein neuer Regulator der Notch-Aktivität kloniert. Die Phänotypen des *lgd*-Ausfalls und der Lgd-Überexpression legen die Beteiligung des Proteins in Prozessen innerhalb des Transports von dem Notch-Rezeptor im degenerativen Zweig des endosomalen Transportweges nahe. Der Ausfall der *lgd*-Funktion führt zu einer ektopischen Aktivierung des Notch-Signalweges in unterschiedlichen Entwicklungsprozessen. Angesichts der Konservierung von Lgd in allen Metazoa ist es wahrscheinlich, daß die Lgd-Orthologen möglicherweise auch eine wichtige und konservierte Rolle in der Entwicklung dieser Lebewesen haben. Tatsächlich konnte mit beiden Orthologen

aus der Maus in der Fliege der *lgd*-Phänotyp gerettet werden. Dieses legt nahe, daß Lgd auch in den Vertebraten die Notch-Aktivität steuert. Der Ausfall von *lgd* könnte also auch dort zu Entwicklungsdefekten oder Tumorbildung infolge ektopischer Notch-Aktivierung führen. Da kürzlich auch Mutationen in Lgd2/Freud-1/CC2D1A als verantwortlich für die Herausbildung einer nonsyndromalen geistiger Retardierung gezeigt wurden (Basel-Vanagaite et al., 2006), legt diese Arbeit als weitere Möglichkeit nahe, daß eine unkontrollierte Aktivierung des Notch-Signalweges auch zur Entwicklung geistiger Krankheiten in betroffenen Menschen führen könnte.

4.1.6. Projekt II: Der *cis*-inhibitorische Effekt hoher Ligandenkonzentrationen auf die Notch-Aktivität

Die Überexpression von Dl und Ser in der Flügelimaginalscheibe führt zu einem auf den ersten Blick paradoxen Ergebnis. Der Notch-Rezeptor wird nur in den Zellen direkt benachbart zu der gegebenen Überexpressionsdomäne - was bei einem Signalweg zur direkter Zell-Zell-Kommunikation noch vollkommen nachvollziehbar ist - und in den Regionen der schwachen Überexpression der Liganden aktiviert. Bereiche hingegen, in denen die Liganden mit höchster Intensität überexprimiert werden zeigen keine Aktivierung des Notch-Signalweges, stattdessen wird teilweise sogar die endogene Notch-Aktivität unterbunden. Bei näherer Untersuchung der Vorgänge in wildtypischen Flügelimaginalscheiben erweist sich diese merkwürdige Beobachtung nicht als ein einfaches Versuchsartefakt, sondern als ein Effekt, der durchaus auch in der normalen Entwicklung des Flügels Anwendung findet (Micchelli et al., 1997). Es ist genau diese sonderbare Eigenschaft der Liganden, in hohen Konzentrationen die Aktivität des Rezeptors in *cis* unterdrücken zu können, die als einer der Notch-Aktivität regulierenden Mechanismen zur Etablierung der d/v Kompartimentsgrenze als Organisationszentrum der Flügelentwicklung beiträgt (de Celis et al., 1996). Durch direkte und indirekte Rückkopplungseffekte wird die Notch-Aktivität in der Flügelimaginalscheibe auf zwei Zellstreifen beschränkt, die die d/v Kompartimentsgrenze bilden. Notch-Liganden sind in diesen Zellen nicht detektierbar, dafür aber in hoher Konzentration in den daran angrenzenden zwei Zellreihen, die aber ihrerseits keine Notch-Aktivität aufweisen. Obgleich dieses Phänomen der *cis*-Inhibition schon seit Jahren bekannt ist, gibt es auf den zugrundeliegenden Mechanismus kaum Hinweise. Bekannt ist wie gesagt, daß hohe Konzentrationen der Liganden für die Inhibition verantwortlich sind. Ferner gibt es einen Bericht, der Bildung von Heterodimeren aus den Liganden und dem Rezeptors als möglichen Weg zur Inhibition aufzeigt (Sakamoto et al., 2002). Dennoch, auch dieser Bericht zeigt nicht unzweideutig diese zellautonome Interaktion der Liganden mit dem Rezeptor als die Grundlage des inhibierenden Mechanismus, noch gibt es weitere Erkenntnisse, welche Proteindomänen der Liganden für die Vermittlung der *cis*-Inhibition verantwortlich sind. Dieser Frage sollte in dem zweiten Projekt dieser Arbeit nachgegangen werden. Dazu sollte die Tatsache genutzt werden, daß die Vertebraten gegenüber zwei Notch-Liganden in *Drosophila*, drei Dl-artige und zwei Ser-artige Liganden haben, die möglicherweise auch funktionell unterschiedlich sind. Sie wurden als induzierbare Transgene in die Fliege

eingeführt und dort auf Vorhandensein und Art einer Interaktion mit dem endogenen Notch-Rezeptor hin untersucht.

4.1.7. Interaktionen der Liganden-Orthologen aus den Vertebraten mit dem Notch-Rezeptor

Die Notch-Liganden aus den Vertebraten sind als UAS-Transgene in die Fliege eingebracht und mit *ptc*-GAL4 in einem Streifen entlang der anterior-posterioren Kompartimentsgrenze in der Flügelscheibe exprimiert worden. Das Vorhandensein und Art der Interaktion mit dem Notch-Rezeptor wurde hierbei in drei verschiedenen Bereichen untersucht.

Den ersten Bereich bildeten die Zellen unmittelbar posterior neben dem Expressionsstreifen. Dieses zeigte an, ob die vertebraten Liganden den Notch-Rezeptor nicht-zellautonom aktivieren konnten und ahmte die Situation nach, die an der d/v Kompartimentsgrenze während der Entwicklung vorhanden ist, mit hohen Konzentrationen von Liganden in einem Zellstreifen, die den Notch-Rezeptor in benachbarten, ligandenfreien Zellstreifen aktivieren.

Der zweite untersuchte Bereich befand sich innerhalb des Expressionsdomäne. Mit den hohen Konzentrationen der eingebrachten Notch-Liganden in diesem Bereich, infolge hoher Transgenexpression durch das UAS/GAL4-System ähnelte dies dem Zellstreifen mit den hohen Konzentrationen der endogenen Liganden an der d/v Grenze, in denen infolge des ligandenabhängigen, *cis*-inhibitorischen Effektes die Notch-Aktivierung zellautonom inhibiert wird. In diesem Bereich wurde also die Fähigkeit der eingebrachten Liganden zur *cis*-Inhibition des endogenen Notch-Rezeptors untersucht.

Den dritten Bereich stellte die Zone der auslaufenden, diffusen Transgenexpression im anterioren Bereich des *ptc*-Streifens dar. Hier konnten die Effekte einer schwächeren Expression der vertebraten Notch-Liganden und der Hybridkonstrukte auf die Notch-Aktivierung untersucht werden.

Zwei der eingebrachten Liganden aus den Vertebraten zeigten in keinem der erwähnten drei Bereiche eine Interaktion, weder aktivierender noch inhibierender Art, mit dem Notch-Rezeptor. Dies waren rJag1 und mDLL3. Bei beiden ist anzunehmen, daß die Unterschiede im strukturellen Aufbau, wie in der Sequenz zu den Liganden aus der Fliege zum jeglichen Fehlen einer Interaktion mit Notch geführt haben, während zumindest Jag1 als Notch-aktivierender Ligand in den Vertebraten gefunden wurde (Lindsell et al., 1995). Im Falle von mDLL3 zeigt sich die starke Divergenz in der Proteinsequenz auch in der Tatsache, daß im

intrazellulären Bereich des Proteins kein Lysin-Rest zu finden ist. Dies könnte neben den sonstigen Unterschieden entscheidend dazu beigetragen haben, daß das Protein den Notch-Rezeptor nicht aktivieren konnte. Eine Arbeit von Wang und Struhl (Wang and Struhl, 2004) zeigt nämlich, daß für die Aktivierung des Notch-Rezeptors eine Ubiquitinierung und nachfolgende, epsinabhängige Endozytose des interagierenden Liganden notwendig ist. Mangels eines Lysin-Restes kann dies bei mDLL3 nicht stattfinden. Möglicherweise ist dies auch der Grund, warum mDLL3 in Zellkultur als Notch-inhibierend beschrieben wird (Lindsell et al., 1995), diesen Effekt auf die Notch-Aktivität unterdrückte nämlich eine fehlende Ubiquitinierung in den Versuchen von Wang und Struhl nicht.

Der andere Ser-ähnliche Ligand, rJag2 zeigte nur eine schwache Interaktion mit Notch, die nur bei gleichzeitiger Überexpression des Rezeptors zu dessen leichten Aktivierung führt. Wahrscheinlich kann rJag2 aufgrund der Sequenz- und Strukturunterschiede zu Ser nur in eine schwache Wechselwirkung mit dem Notch-Rezeptor treten, die zu keiner Aktivierung des Rezeptors führt, doch anscheinend ausreichend ist, um durch Verdrängung der endogenen Liganden zu einem leichten dominant negativen Effekt zu führen. Führt man aber in der Expressionsdomäne von rJag2 zusätzlichen Notch-Rezeptor zu, so stehen den endogenen Liganden wiederum ausreichende Mengen des Rezeptors gegenüber und die schwache Wechselwirkung mit rJag2 kann zu einer Aktivierung des Notch-Signalweges in dem gemeinsamen Expressionsbereich von rJag2 und Notch führen.

rDLL1 und mDLL4 zeigten sehr ähnliche Effekte bei Expression in der Flügelimaginalscheibe, die in allen drei untersuchten Bereichen zu einer Aktivierung des Notch-Rezeptors führten. In keinem Bereich zeigten sie eine *cis*-Inhibition des Notch-Rezeptors.

Ihre extra- und intrazellulären Domänen sind deswegen in weiteren Experimenten mit den entsprechend ergänzenden Bereichen aus DI kombiniert worden, um festzustellen, welche der beiden Proteinbereiche von DI für die Vermittlung des *cis*-inhibitorischen Effekts verantwortlich ist. Dabei zeigte es sich, daß das Vorhandensein von wahlweise der extra- oder der intrazellulären Domäne von DI in den Hybridkonstrukten, diesen die Fähigkeit zur *cis*-Inhibition des Notch-Rezeptors verlieh. Beide Hybridkonstrukte mit der extrazellulären Domäne von DI zeigten dabei in Expression Effekte, die denen der Überexpression von DI sehr ähnelten. Die Konstrukte führten zur embryonalen Letalität bei Expression bei 25°C und zeigten, bei Versuchsdurchführung bei 18°C in den Flügelimaginalscheiben eine Aktivierung des Notch-Signalweges in den beiden Bereichen posterior zur Expressionsdomäne und in

deren diffusen Ausläufern nach anterior hin. Im dem Bereich der hohen Transgenexpression dagegen, inmitten des *ptc*-Streifens, wurde keine Notch-Aktivität ausgelöst.

Die Einführung des intrazellulären Domäne von Dl führte zu etwas schwächeren *cis*-Inhibitorischen Effekten in Kombination mit der extrazellulären Domäne von rDLL1, eine sehr starke dagegen zusammen mit der extrazellulären Domäne von mDLL4. Dieses steht im Widerspruch zu der Expression von unverändertem mDLL4, das keinerlei *cis*-inhibitorischen Effekt zeigte und den Ergebnissen von Wang und Struhl (Wang and Struhl, 2004), die zeigten, daß sie die intrazelluläre Domäne von Dl durch verschiedene anderen Sequenzen, selbst beliebig gewählte austauschen konnten, was zwar eventuellen Einfluß auf die aktivierende jedoch nie auf die *cis*-inhibierende Fähigkeit von Dl hatte. Wie sind diese verschiedenen Ergebnisse zu erklären? Möglicherweise tragen tatsächlich beide Domänen von Dl zu dem *cis*-inhibitorischen Effekt bei, allerdings mit einer unterschiedlicher Bedeutung der beiden Domänen für den Effekt. Betrachtet man die beiden unterschiedlichen Kombinationen von DLL1 und DL, so fällt auf, daß das Konstrukt mit der extrazellulären Domäne von Dl einen viel stärkeren *cis*-inhibitorischen Effekt auslöst, als dasjenige mit der intrazellulären Domäne von Dl. Möglicherweise reicht also der von der extrazellulären Domäne vermittelte *cis*-Inhibitorische Effekt aus, um auch in den Versuchen von Wang und Struhl das Fehlen der endogenen, intrazellulären Domäne zu kompensieren.

Der Effekt der extrazellulären Domäne von mDLL4 in den Hybridkonstrukten ist allerdings auf dem Hintergrund der früheren Experimente kaum zu deuten. Wurde das Protein in unveränderter Form exprimiert, so zeigte es keinen *cis*-inhibitorischen Effekt, ähnlich rDLL1. Die extrazelluläre Domäne von mDLL4 zeigte aber in Kombination mit der intrazellulären Domäne von Dl wie mit der von rDLL1 einen inhibierenden Einfluß auf die Notch-Aktivität, die sogar zur Unterbrechung der endogenen Aktivität an der d/v Kompartimentsgrenze (D4D) führte. In Verbindung mit der intrazellulären Domäne von rDLL1 (D4D1) zeigte sich dieser Effekt zwar abgeschwächt in Vergleich zu D4D, war aber vorher, bei der Expression von vollständigem rDLL1 wie mDLL4 überhaupt nicht vorhanden. Warum die Kombination von beiden zu so unterschiedlichen Ergebnissen führt, ist hier nicht zu klären, abgesehen vielleicht von Spekulationen, daß die Kombination von Teilen beider Proteine aus den Vertebraten zu sterischen Veränderungen führt, die die Aktivität des hybriden Proteins gegenüber dem Notch-Rezeptor Dl-ähnlicher macht.

In Bezug auf die ursprüngliche Fragestellung führen die hier vorgestellten Ergebnisse also zu dem Schluß, daß wahrscheinlich sowohl die intra- wie die extrazelluläre Domäne von Dl an

der Auslösung des *cis*-inhibitorischen Effektes auf die Notch-Aktivität beteiligt sind, mit einer stärker vermittelten Komponente durch den extrazellulären Bereich des Liganden. Für eine genauere Lokalisation der für die *cis*-Inhibition verantwortlichen Bereiche in der extrazellulären Domäne könnte in weiteren Versuchen vielleicht die Tatsache genutzt werden, daß das vollständige DLL1 Protein und auch seine extrazelluläre Domäne in den Hybriden nur eine stark abgeschwächte *cis*-inhibitorische Wirkung zeigten. Es könnten also weitere Austausche von kleineren Domänenbereichen zwischen D1 und DLL1 durchgeführt werden, um den verantwortlichen Proteinbereich näher einzukreisen. Eine etwas direktere und vielleicht auch aussichtsreichere Möglichkeit zur Identifizierung der für den *cis*-inhibitorischen Effekt verantwortlichen Region könnte aber die Sequenzierung der einen mDLL4 Transgenen Linie, die vollkommen anders als alle anderen mDLL4-Linien einen sehr starken *cis*-inhibitorischen Effekt zeigte. Diese Sequenzierung wird in der nächsten Zeit geschehen.

5. Material und Methoden

5.1. Material

5.1.1. Chemikalien, Enzyme und Reaktions-Kits

Es wurden, soweit nicht anders vermerkt, analysereine Substanzen (p.A.) folgender Firmen eingesetzt: Bachem, Fluka, Gibco-BRL, Merk, Pharmacia, Roth, Riedel-de-Häen, Roche Diagnostics, Serva, Sigma-Aldrich

Feinchemikalien und Reaktions-Kits:

ABI PRISM Big Dye Terminator (V. 3.1)	Perkin Elmer
DNA-Standard (1 kb Hyperladder I)	Bioline
DNA-Standard (Hyperladder II / 100 bp Leiter)	Bioline/NEB
DNA-Standard (λ -DNA HindIII-Verdau)	NEB
Expand High Fidelity PCR-Kit	Roche
Illustra GFX PCR und Gel Band Purification Kit	GE Healthcare
Nucleobond PC100 Midiprep. Kit	Macherey und Nagel
Normales Ziegen Serum (NGS)	Dianova
SP6 und T7 RNA-Polymerase Message Kit	Ambion
Vectashield Mounting Medium	Vector

5.1.2. Enzyme:

Für molekularbiologische Arbeiten wurden, soweit nicht anders erwähnt, Enzyme von den folgenden Firmen bezogen: Boehringer, Gibco-BRL, NEB, Roche

5.2. Geräte und Arbeitsmaterialien

Computer: Apple Macintosh unter OS9 und OSX, IBM-kompatible PC's unter Windows XP

Software: Adobe Photoshop (Adobe Systems), Canvas (Daneba Systems), ClustalX 1.81

(<http://wwwesc.fi/molbio/progs/clustalw>), CHROMA 1.0

(<http://www.lg.ndirect.co.uk/chroma>), Endnote (Niles Software Inc.), Graphic Converter

(Lemke Software), Microsoft Office (Microsoft Corp.), Omega 2.0 (Oxford Molecular Ltd.),

Phylip 3.62 (CSC-Scientific Computing Ltd.

<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>), Vector NTi 7.0-Mac, 9.0-PC-Version

(Informax/Invitrogen)

Faltenfilter: Schleicher&Schüll

Fotographie: CCD-Kamera QUANTIX (Photometrics), ProgRes 3008 (Kontron Elektronik),

PowerShot G6 (Canon)

Geldokumentation: Polaroid-System, Bio-Rad

Gelelektrophorese: PeqLab

Inkubatoren: Heizblöcke (Unitek HB-130), Wasserbäder (mgw Lauda), Heizschränke (Ehret)

Mikroskope: Axiovert 10, Axioplan, Stemi 200-C, Stemi DCR (alle von Zeiss)

Mikrowellengerät: Daewoo

PCR-Maschinen: T-Gradient, Personal-Cycler, UNO-Block (alle von Biometra)

pH-Meter: 761 Calimatic (Knick)

Plastikartikel: Reaktionsgefäße, Petrischalen, Multiwellplatten (Eppendorf, Falcon, Greiner)

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

Sequenzierer: ABI 377A DNA-Sequenzierer (Perkin Elmer)

Spektralphotometer: Genequant II (Pharmacia)

Zentrifugen: Beckmann, Eppendorf, Hettich, Heraeus, Sorvall,

Zentrifugationszubehör: SS-34 Rotor (Beckmann)

5.3. Antikörper:

5.3.1. Primäre Antikörper

Antikörper gegen:	Herkunft	Verdünnung	Bezugsquelle
β-Galaktosidase	Kaninchen	1:1500	Cappel Research Products
β-Galaktosidase	Maus	1.500	Sigma-Aldrich
Crumbs (Crb)	Ratte	1:100	Edith Knust
Delta (DI)	Maus	1:500	DSHB Iowa C594.9B
Disc large (Dlg)	Maus	1:100	DSHB Iowa 4F3
HA	Kaninchen	1.500	Santa Cruz Biotechnology
HA	Ratte	1:250	Boehringer Mannheim
Hindsight (Hnt)	Maus	1:10	DSHB Iowa 27B8 1G9
Fl-Hrs	Meerschweinchen	1:1000	Hugo Bellen
N-Hrs	Meerschweinchen	1:1000	Hugo Bellen
Lva	Kaninchen	1:250	Alfonso Martinez-Arias
N(intra)	Maus	1:500	DSHB C17.9C6
N(intra)	Schaf	1:5000	Alfonso Martinez-Arias
N(extra)	Maus	1.100	DSHB Iowa C17.9C6
PKCζ C20	Kaninchen	1:500	Santa Cruz Biotechnology
Rab5	Kaninchen	1:200	M. Gonzalez-Gaitan
Rab7	Kaninchen	1:50	M. Gonzalez-Gaitan
Rab11	Kaninchen	1:50	M. Gonzalez-Gaitan
Sens	Meerschweinchen	1:500 - 1:1000	Hugo Bellen
Wg	Maus	1:50	DSHB Iowa 4D4

5.3.2. Sekundäre Antikörper

Sekundäre Antikörper	gekoppelt mit	Verdünnung	Bezugsquelle
(Herkunft)			
Kaninchen (Ziege)	Alexa568	1:500	Invitrogen

Kaninchen (Ziege)	Cy5	1:250	Dianova
Maus (Ziege)	Alexa488	1:500	MoBiTec
Maus (Ziege)	Alexa568	1:500	Invitrogen
Maus (Ziege)	Rhodamin-RedX	1:500	Dianova
Maus (Ziege)	Alexa647	1:250	MoBiTec
Meerschweinchen (Ziege)	Texas-Red	1:500	Jackson Immuno Research
Schaf (Esel)	Rhodamin-RedX	1:500	Jackson Immuno Research
Ratte	Alexa568	1:500	MoBiTec

5.3.3. Fliegenstämme:

Bezeichnung / Genotyp	Herkunft / Referenz
<i>ptc</i> GAL4 UASGFP	(Wilder and Perrimon, 1995)
<i>sd</i> GAL4	Thomas Klein
<i>hh</i> GAL4	(Tanimoto et al., 2000)
<i>da</i> GAL4	(Wodarz et al., 1995)
UAS <i>Delta</i> (III)	Edith Knust
UAS <i>Ser</i> (III)	(Speicher, 1994)
w-; <i>lf</i> /CyO ^{wg-lacZ} ; MKRS / TM6b	Frank Sprenger
w-; UASN	Thomas Klein
<i>Df(2L)FCK-20</i>	(Barrio et al., 1999)
<i>Df(2L)Prl</i> /CyO	Bloomington
<i>lgd-d7</i> FRT40A	Thomas Klein
wg-lacZ auf dem CyO-Chromosom	(Kassis et al., 1992)
CyO-30 / CyO, P{w ^{+mC} = <i>Kr</i> -GAL4}DC4, P{w ^{+mC} =UAS-GFP.S65T}DC8	Bloomington
B14219 / y ¹ w ^{67c23} ; P{SUPor-P}-KG05885	Bloomington
B13362 / y ¹ w ^{67c23} ; P{SUPor-P}-KG04270	Bloomington
<i>l(2)k15817</i> / y ¹ w ^{67c23} ; P{lacW} <i>l(2)k15817</i> ^{k15817} /CyO	Bloomington
B14124 / y ¹ w ^{67c23} ; P{SUPor-P}-KG05826	Bloomington
<i>l(2)SH0495</i>	(Oh et al., 2003)
B13333 / y ¹ w ^{67c23} ; P{SUPor-P}- CG6230 ^{KG02884}	Bloomington
B13418 / y ¹ w ^{67c23} ; P{SUPor-P}-KG01276	Bloomington
<i>l(2)SH2055</i>	(Oh et al., 2003)
<i>l(2)k13807</i> / y ¹ w ^{67c23} ; P{lacW} RfC38 ^{k13807} /CyO	Bloomington

<i>l(2)SH1134</i>	(Oh et al., 2003)
B14137 / <i>y¹ w^{67c23};P{SUPor-P}-KG06014</i>	Bloomington
B13271 / <i>y¹ w^{67c23};P{SUPor-P}-KG03958</i>	Bloomington
B11362 / <i>P{PZ}l(2)04008⁰⁴⁰⁰⁸ cn¹/CyO;<i>ry⁵⁰⁶</i></i>	Bloomington
B12433 / <i>w¹¹¹⁸;P{GT1}-BG00672</i>	Bloomington
B14201 / <i>y¹;P{SUPor-P}- KG05262/CyO;<i>ry⁵⁰⁶</i></i>	Bloomington
<i>l(2)SH0770</i>	(Oh et al., 2003)
B10680 / <i>y¹ w^{67c23};P{lacW}cana^{K07716}/CyO</i>	Bloomington
<i>UAS-FYVE-GFP</i>	(Gillooly et al., 2000)
<i>UAS-Rab5-GFP</i>	(Wucherpennig et al., 2003)
<i>UAS-Rab7-GFP</i>	(Entchev et al., 2000)
<i>UAS-GPI-GFP</i>	(Greco et al., 2001)
<i>Gbe+Su(H)-lacZ</i>	(Furriols and Bray, 2001)
<i>ASE-GFP</i>	(Barolo et al., 2000)
<i>hsFLP1.22; If / SM6a-TM6b</i>	Thomas Klein
<i>w-; If / SM6a-TM6b</i>	Thomas Klein
<i>y w- hsFLP1.22 tubGal4 UAS-nlsGFP / FM7 ; FRT40A Gal80 / CyO^{wg-lacZ}</i>	Thomas Klein
<i>w-; lgd-d1 / SM6a-TM6b</i>	Thomas Klein
<i>w-; lgd-d4 / SM6a-TM6b</i>	Thomas Klein
<i>w-; lgd-d7 / SM6a-TM6b</i>	Thomas Klein
<i>w-; lgd-d7 FRT40A / SM6a-TM6b</i>	Thomas Klein
<i>w-; lgd-d10 / SM6a-TM6b</i>	Thomas Klein

Als Wildtyp-Stamm und zur Herstellung transgener Fliegen mittels DNA Injektion (Lindsley und Zimm 1992) wurde *white-* (*w*¹¹¹⁸, abgekürzt als *w-*) verwendet. Alle beschriebenen Marker sind bei (Lindsley und Zimm, 1992) beschrieben.

5.3.4. Bakterien:

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

Dieser Bakterienstamm wurde zur Vermehrung und Gewinnung von Plasmid-DNA benutzt. Transformation chemisch kompetenter Zellen erfolgte durch Hitzeschock nach Angaben des Herstellers (Ligationsansatz/Plasmid-Zugabe zu 50 μ l aufgetauter Bakterien, 15min Inkubation auf Eis, 1min Hitzeschock im Wasserbad bei 37°C, 2min Inkubation auf Eis, 1h

Schütteln in 900µl LB-Medium bei 37°C, Zentrifugation 2min/2500rpm, Resuspendierung des Peletts in 120µl LB-Medium, Ausstreichen von je 100/20µl auf zwei LB-Platten, Inkubation der Platten üN. bei 37°C).

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

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

LB-Medium: 10g Bactotrypton, 5g Hefeextrakt, 10g NaCl – pH 7,2 mit NaOH eingestellt, mit H₂O auf 1 l Endvolumen aufgefüllt.

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

5.4. Methoden

Alle molekularbiologischen Arbeiten erfolgten nach den Angaben aus (Sambrook et al., 1989)

5.4.1. Kartierung der *Df(2L)FCK-20* Defizienz

Die PCR-Reaktionen wurden parallel auf genomischer-DNA durchgeführt, die aus wildtyp-Embryonen (*Oregon-R* und *white*⁻) gewonnen wurde, sowie auf DNA der für die Defizienz *Df(2L)FCK-20* homozygoter Embryonen. Dazu wurde die Defizienz über ein CyO-Balancerchromosom gekreuzt, welches die P-Elementinsertionen: P{w^{+mC}=Kr-GAL4}DC4, P{w^{+mC}=UAS-GFP.S65T}DC8 trug (FlybaseID: FBab0000294, Symbol: *CyO-30*) und anschließend Embryonen unter UV-Licht eingesammelt, die kein GFP-Leuchten aufwiesen.

Single Embryo PCR:

Embryonen wurden in 600µl PBT gesammelt (+5µl Tween) und nach Zugabe von 600µl Chlorix für 2 Min dechorionisiert. Zur Oberfläche aufsteigende Embryonen wurden mit einer Pipette in ein Körbchen in einer Multiwell-Platte übertragen und dort mehrmals mit Wasser gewaschen. Anschließend wurden sie in einem Eppendorf-Gefäß in 750µl MeOH+750µl Heptan unter starkem Vortexen devitellinisiert. Jeweils 5 Embryonen wurden in ein neues Gefäß übertragen, wo sie nach Verdampfen des MeOH in 100µl SB-Puffer mit 1µl ProteinaseK (10µg/µl) aufgenommen wurden. Die Embryonen wurden dort mit einer Pipettenspitze zerdrückt und das Gefäß bei 37°C für 20-30 Min inkubiert (anschließendes Pipettieren vermeiden!). Anschließend wurde Proteinase K durch eine 1-2 minütige

Inkubation bei 95°C inaktiviert und die DNA-Präparation bis zur Verwendung bei 4°C verwahrt.

SB-Puffer: 10mM Tris pH 8.2, 1mM EDTA, 25mM NaCl

Für die PCR-Reaktion wurde das HF-PCR Kit von Roche eingesetzt. Zusammensetzung der PCR-Reaktion:

5µl	DNA-Homogenat	PCR-Bedingungen
2µl	MgCl ₂ (25mM)	1. 3min 94°C
4µl	Buffer 3	2. 15sec 94°C
1µl	Primer 1 (10pmol)	3. 30sec 50-60°C (primerabhängig)
1µl	Primer 2 (10pmol)	4. 2-8min 72°C (produktabhängig)
1µl	dNTP's (10mM)	Schritte 2.-4. 30x wiederholt
0,5µl	Enzym	5. 10min 72°C
23,5µl	H ₂ O	6. Pause 4°C

je 1µl von Kontrollprimer 1 und 2 (Produkt: Fragment aus *rp49* oder *archipelago*)

Benutzte Primer:

14914-1a	TAAGTCCATGAACG	
14914-1b	AGCCAAGAAACATACG	Produktlänge: 1416bp
14915-1	GGTACGACAAACACATGG	
14915-2	AGCTGAATGGCAGATCC	739bp
14919-1	GCATCGGGATTAGC	
14919-2	TACTTCCTAAAGCAGG	638bp
14920-2	TAATCCACTCCAGAGACG	
14920-1	CACAAGAATGCATCAACC	1436bp

4705-1a	AGAACCCTATACCTGAACTCC	
6181-22	TGTCATCCCCTCAGC	
6181-32	GGAGCAGCCTAAACAGC	
6181-C5	GAATTCGAATTCTCTAGATCCGTGTTGATTGGT	
4705-1a --- 6181-22		7509 bp
4705-1a --- 6181-32		8304 bp
4705-1a --- 6181-C5		6524 bp

4826 6-1	CGAAAATAGAGCTGACACTCC	
4826 6-2	GAACCATCAAATCAGCAGG	3379bp
4826 9-1	ACTCTTCCACTCGCCACAAATAC	
4826 9-2	GCATACTAGCCAAGCCCAAC	5171bp
14926-R1a	CCTCCATCGAATCC	
14926-R1b2	ATCCATACCATCCATC	3043bp

4851-14926 – innerhalb der Deletion nach (Barrio et al., 1999)

1-1	TCCCATACCCACAACC	
1-12	ATCCCCAGAAATATCCC	
3' außerhalb der Deletion nach (Barrio et al., 1999)		
salRa	CCAAGTTCGATAGTACACC	
salRb	AGTCCCAGAACTACAACC	9472bp

Kontrollen:

rp49a CCGCCCAGCATAACAGGCC

rp49b CGACCAGGTTACAAGAAC

~450bp

Produkt aus dem Gen *RpL32*, lokalisiert auf dem dritten Chromosom

5'1135 ACCACATCTCCGAGAGCTCCACTC

3'ULR GTCCCACACGCGAATAGAGGTGTC ~7300bp

Produkt aus dem Gen *archipelago*, lokalisiert auf dem X-Chromosom

5.4.2. Klonierung der *Igd*-cDNA

Die cDNA für das unmarkierte wie das C-terminal mit dem HA-Epitop markierte *Igd*-Konstrukt wurde mittels PCR aus dem EST-Klon LD23056 (DGRC) kloniert. Verwendet wurden folgende Primer. Für das unmarkierte Konstrukt:

4713-3 GAATTCGCGGCCGCATGTTCTCCAGAAAGAAG

4713-4 CGTCTAGAGGTACCCTAGGCATCCAAGACCAAC Produktlänge 2479bp

Für das C-terminal mit einem HA-Epitop markierte Konstrukt:

4713-HA-1 CGAATTCGCGGCCGCATGTTCTCCAGAAAGAAGC

4713-HA-2 CTCTAGAGGTACCTCAAGCGTAATCTGGCACATCGTATGGGTA

AGCGGCATCCAAGACCAAC

Produktlänge 2509bp

Die mittels PCR erzeugten Produkte wurden in den TOPO-Vektor kloniert, dort sequenziert und nach Feststellung einer fehlerfreien PCR-Amplifikation in den pUAST-Vektor über die N- bzw C-terminal an die CG4713-CDS hinzugefügten NotI, bzw KpnI-Restriktionsschnittstellen kloniert. Zur Sequenzierung wurden die folgenden Primer benutzt:

(zur Übersicht siehe Abb.5.1)

L1 ATATGGTGAGGACGATGGGG

L10 AGCTGTCGGCTATCATTTTG

L2 AGACCTTTCTGCCACGAC

L3 TGAAGTCAGTGTAAGCC

L4 AAATGTGTGAAGACGGACAGG

L5 ACAAGGCAGGCAAACCAG

L6 CAAAAAAGCGGGAGAAATAG

L7 TATGGGAGATGTAGCAGG

L8 CAGTCCTGACTACGATGAAC

L9 GACCAAGTGCGAGATACAC

L11 ACCAATTCGCAAAGACTTTCC

L12 AACAGCCTCTGTGCAATCAAG

L13 CCCATCGTCCTCACCATATC

L14 GCAGCTCAATCAACAGC

L15 ACCTCTGAAACAACACAG

L16 GCAAAAGCGTACATACTTAG

4713ante1 GAATTCGAATTCAAGCCAGAGCCAGCGAAAAG

4713ante2 GAATTCGCGGCCGCTTGCATCACAAGAGGATTAGGG

4713post1
4713post2

GAATTCGAATTCTACATCTCCACCGCCAACAGCAAG
GAATTCGCGGCCGC CATCATTGAGCAGGGGAAACTCTAC

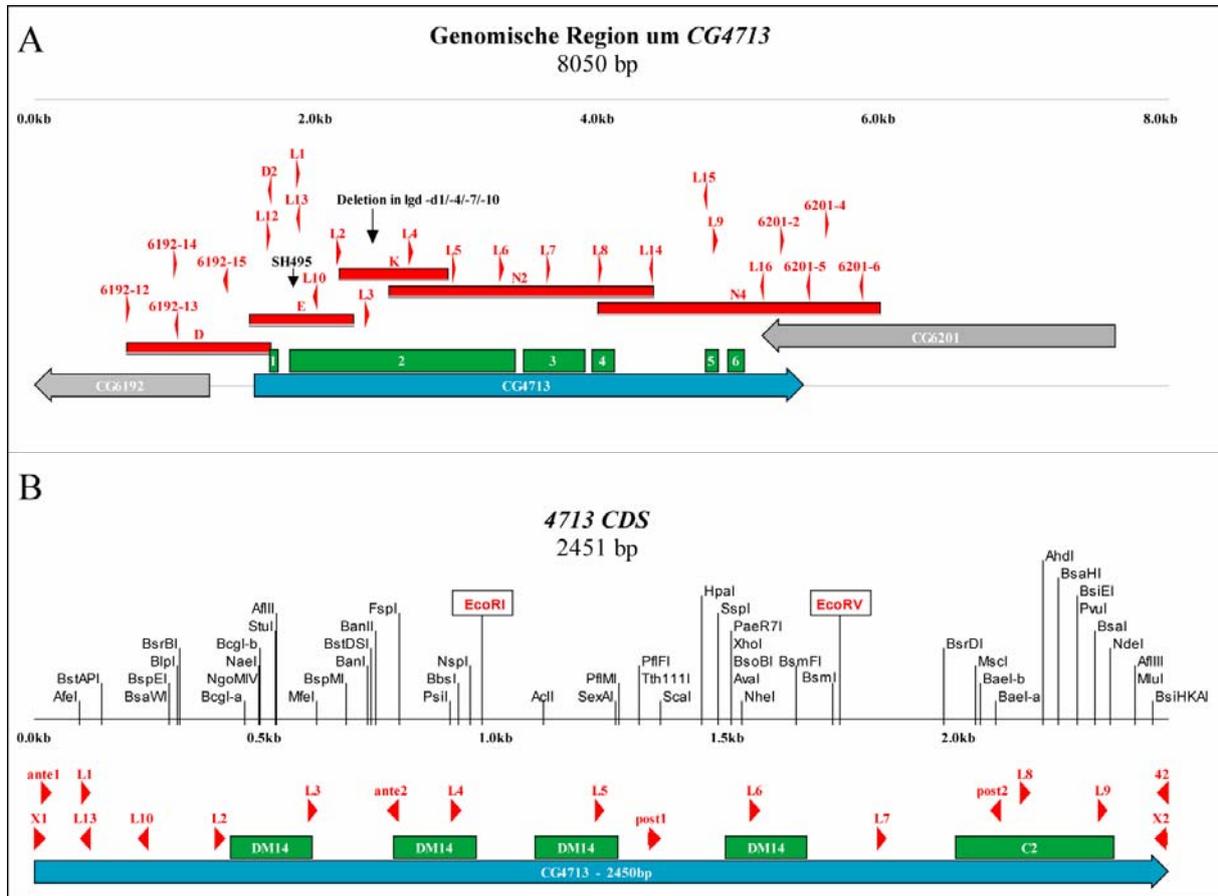


Abb.5.1: Übersicht der Sequenzierungsprimer für die genomische Region um die Transkriptionseinheit *CG4713* (**A**) und für die *CG4713/lgd* kodierende Sequenz (**B**).

In **A** wurde oberhalb der in Blau gehaltenen *CG4713*-Transkriptionseinheit zu besserer Übersicht die Lage der Exons dargestellt (in Grün, nummeriert von 1 bis 6). 5' und 3' von *CG4713* sind die beiden benachbarten Transkriptionseinheiten *CG6192* und *CG6201* in Grau gezeigt. Die Lage der Sequenzierungsprimer und ihre Orientierung zeigen in **A** und **B** rote Pfeilspitzen an. Rote Vierecke (D, E, K, N2, N4) zeigen Abschnitte genomischer DNA an, die zur Bestimmung der Mutationen in den *lgd*-Allele amplifiziert und anschließend sequenziert wurden. Insertionsstelle des P-Elements *l(2)SH0495*, bzw. die 2bp-Deletion in den *lgd*-Allelen *-dl/-4/-7/-10* zeigen schwarze Pfeile an.

B zeigt die Lage der Sequenzierungsprimer an der kodierenden *lgd*-Sequenz an. Regionen, die für die DM14 und die C2-Domäne kodieren, wurden oberhalb der Sequenz in Grün markiert. Oberhalb der Sequenz sind jeweils nur ein Mal innerhalb der Sequenz vorkommende Restriktionsschnittstellen angezeigt. Das Fragment EcoRI-EcoRV wurde für die Herstellung der *in-situ* RNA-Proben benutzt. Für die Primersequenzen siehe Text.

5.4.3. Klonierung der cDNA für *mlgd1* und *mlgd2*

- *mlgd-1* cDNA wurde mittels NotI und KpnI Doppelverdau aus dem RIKEN Mouse FANTOM™ Klon A830039804. (Kawai et al., 2001; Okazaki et al., 2002) in den ebenso verdauten pUAST-Vektor kloniert.

- *mlgd-2* cDNA (BC016188) aus dem I.M.A.G.E. Consortium Klon: IRAKp961B1438Q (RZPD) (Lennon et al., 1996) über NotI und Sall Doppelverdau und eine Ligation über aufgefüllte Enden (blunt) in XhoI verdauten pUAST-Vektor.

5.4.4. Gewinnung genomischer DNA aus Fliegen/Larven:

Zu etwa 50 Fliegen/Larven in einem 2ml Eppendorf-Gefäß werden 500µl des Extraktionspuffers hinzugegeben. Die Fliegen/Larven werden anschließend auf Eis mit einem kleinen Stößel 6min lang homogenisiert und danach 20min bei 65°C inkubiert. Es folgt eine Phenol-Chloroform Extraktion (2x 600µl Phenol/Chloroform 1:1, 2x500µl Chloroform, dazwischen je 5min Zentrifugation bei 12000rpm und anschließender Übertragung der oberen Phase in ein neues Gefäß) und die Fällung der DNA (+EtOH 2,5xVol., 8M Kaliumacetat 0,1xVol. – 15min Zentrifugation bei 14000rpm, dann 2-3 Waschschrte mit 70%-EtOH und je 5Min Zentrifugation). Nach Trocknung des Peletts werden 100µl H₂O hinzugefügt und die DNA durch 10min Inkubation bei 68°C und anschließende üN Verwahrung bei 4°C resuspendiert. (Vorsicht: nach dem Homogenisieren nur mit abgeschnittenen Spitzen Pipettieren und durch leichtes Kippen des Gefäßes die Flüssigkeit mischen. Vortexen und enge Spitzenenden würden zur Fragmentierung der DNA führen). Am nächsten Tag wird die Qualität der DNA auf einem 0,7% Agarose-Gel bei niedriger Laufgeschwindigkeit (40V bei 10cm Gellänge) getestet (hochmolekulare Bande über 10kb und wenig „Schmier“ erwünscht). Aufbewahrung der DNA erfolgt bei 4°C.

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

5.4.5. Sequenzierung der *Igd*-Allele

Zur Sequenzierung der *Igd*-Allele wurden zunächst Abschnitte genomischer DNA, die aus Larven des jeweiligen Stammes gewonnen wurde, mittels PCR amplifiziert (Expand HF-PCR Kit von Roche). Die PCR-Produkte wurden anschließend gereinigt und sequenziert. Zur Amplifikation der Abschnitte genomischer DNA wurden folgende Primer benutzt (nach dem Primerpaar ist die jeweilige Produktlänge angegeben, zur Lage der Abschnitte siehe Abb.5.1-A). Zur Kontrolle wurden die gleichen genomischen DNA-Abschnitte aus wildtypischen Fliegen sequenziert (*white*-)

Benutzte Primer:

Zur Klonierung der Fragmente aus genomischer DNA

D1	ACACAAATTGGACCTACC	
D2	GAGAACATCCTTGATTGC	1023bp

E1	CTTTCCTGCGTCACCTTTCG	
E2	CCTTGCTTTGCCAGAATCG	742bp
K1	ACGACTGTGGACACATTAAGC	
K2	CCTTCCAAAGCGTCTTGC	771bp
N21	CACATCTCCCCCTAATCC	
N22	TGCAGCTCAATCAACAGC	1877bp
N41	ACACCAGCAGTCCTGACTACG	
N42	AGTCCGGCTTATCCCAACG	1987bp

Zur Sequenzierung der amplifizierten Fragmente

6192-12	ACACAAATTGGACCTACC
6192-13	CCAAAGGCAGAAAATCATC
6192-14	GTCTGATGATTTTCTGCC
6192-15	AGCCACCTTACAAAACATC
6201-2	GTCCAGAAGATTGTGC
6201-4	AAACGACGGATATGG
6201-5	TGTTTAATGAAACCAGTCCC
6201-6	TATCAACTCCGCCAGCATC

Die erzeugten PCR-Produkte wurden auf einem Gel aufgetrennt, die Gelbanden ausgeschnitten und nach einer Aufreinigung (Illustra GFX-Kit) sequenziert.

5.4.6. DNA-Minipräparation nach TENS-Protokoll

1,5ml der üN-Bakterienkultur werden in einem Eppendorf-Gefäß runterzentrifugiert (2Min, 4000rpm). Der Überstand wird bis auf etwa 50-100µl abgegossen und die Bakterien durch Vortexen wieder resuspendiert. 300µl der TENS-Lösung werden hinzugefügt und für 5-10Sek gemischt (Vortex), bis die Lösung zähflüssig wird (falls dieser Schritt über 10Min dauert, sollten die Gefäße vorgekühlt werden, um eine Kontamination mit bakterieller (chromosomalen) DNA zu vermeiden). 150µl Natriumacetat (3.0M, pH5,2) werden hinzugefügt und die Flüssigkeiten bis zur Vermischung stark geschüttelt (5Sek Vortex). In einem Zentrifugationsschritt (5Min, 15000rpm) werden Zelltrümmer und bakterielle (chromosomale) DNA abgetrennt, der Überstand in ein neues Gefäß überführt und 900µl kalten EtOH hinzugegeben (-20°C). Nach Mischen und eventueller Kühlung (5-10Min, -20°C) wird die DNA gefällt und gewaschen (70%EtOH). Nach Trocknung wird das Pellet in 40-50µl TE+RNase A resuspendiert (50ng/µl RNase A).

TENS-Lösung: TE (10mM Tris-Cl, 1mM EDTA pH 8.0) mit 0,1N NaOH und 0,5% SDS
Natriumacetat: 408g NaOAc*3H₂O in 800ml H₂O, auffüllen mit H₂O bis 1 l,
pH wird mit 3M Essigsäure auf 5,2 eingestellt.

5.4.7. Gene-SOEing-PCR

Die *lgd*-Deletionskonstrukte sowie sämtliche Hybridkonstrukte aus dem Delta-DLL-Projekt sind mittels der *Gene-SOEing-PCR* generiert worden, die es ermöglicht, verschiedene DNA-Stücke nahtlos aneinanderzufügen. Dies bietet den Vorteil, daß hierbei keine zusätzlichen DNA-Abschnitte, für sequenzfremde Aminosäuren kodierend, zwischen den zu verbindenden Bereichen verbleiben, z.B. aus angehängten Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme. Die *Gene-SOEing-PCR* wird in zwei Runden durchgeführt. In der ersten PCR-Runde werden die zwei zu verbindenden DNA-Sequenzabschnitte amplifiziert. Dabei werden an das Ende des ersten Sequenzabschnittes und an den Anfang des zweiten Sequenzabschnittes mittels überhängender Primer Sequenzbereiche hinzugefügt, die mit dem jeweils anderen Sequenzbereich überlappen. In der zweiten PCR-Runde werden diese beiden Produkte im Reaktionsgefäß gemischt, wobei die beiden DNA-Abschnitte im mittleren Bereich über die komplementären Sequenzabschnitte miteinander paaren können. Dieser paarende Bereich wird in der zweiten PCR-Reaktion als Primer benutzt und verlängert, wobei das erwünschte, verbundene Produkt entsteht. Dieses wird dann mit zusätzlichen, an die Enden des erwünschten Produktes paarenden Primern amplifiziert, die ebenfalls der Reaktion beigefügt wurden. Der Reaktionsverlauf ist in der Abb.4.2 dargestellt.

Siehe auch Abb.5.2 und (Ho et al., 1989; Horton et al., 1990)

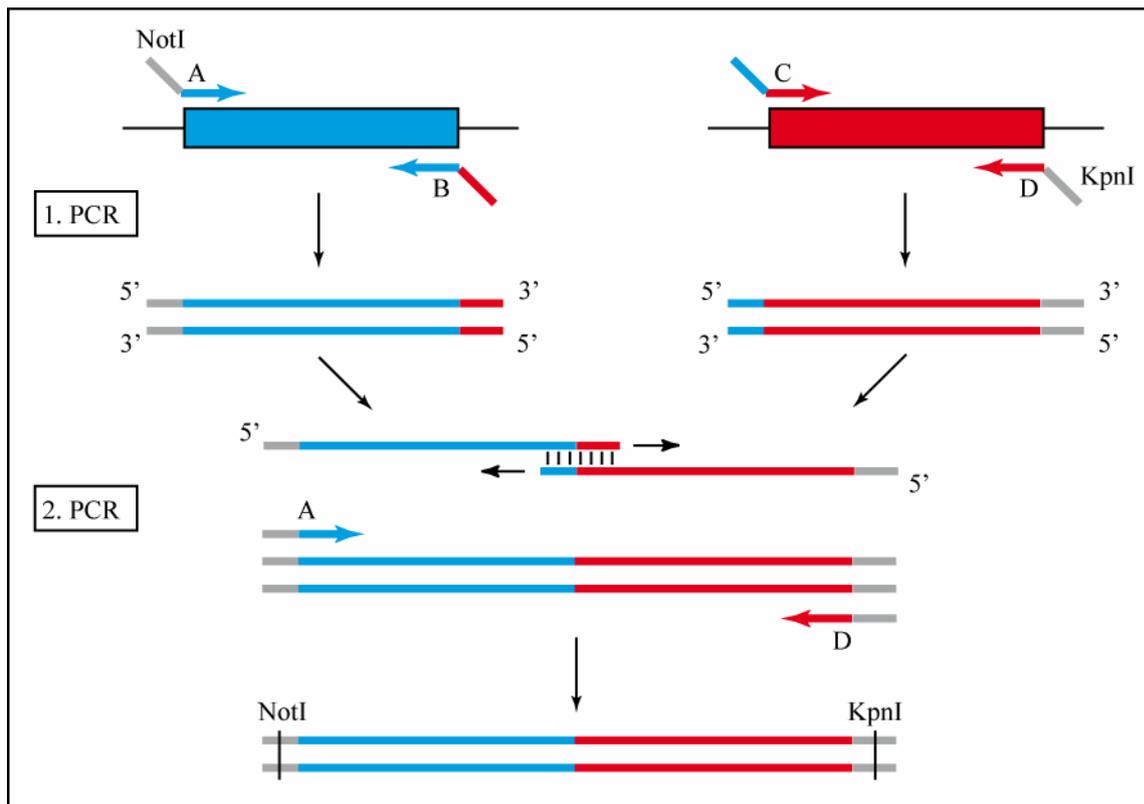


Abb.5.2 Gene-SOE-ing. Mit Hilfe dieser Methode wurden DNA-Abschnitte kodierend für verschiedene Protein-Domänen mittels PCR nahtlos aneinandergesetzt (hier dargestellt in Blau und Rot). Hierdurch war die Herstellung hybrider Proteine möglich, die zwischen den aneinandergesetzten Domänen keine zusätzlichen Aminosäurereste beinhalten, etwa von hinzugefügten Restriktionsschnittstellen. Die Produkte aus der ersten PCR-Runde beinhalten komplementäre Bereiche, die in der zweiten Runde als Primer für das Gesamtprodukt dienen. Die so erzeugte Matrize wird dann mittels weiterer Primer (A und D) amplifiziert.

5.4.8. Herstellung der Delta/DLL-Hybridkonstrukte

Alle Hybridkonstrukte wurden mittels der oben beschriebenen *Gene-SOE-ing* Methode hergestellt, wobei der Primer für das 3'-Ende des Konstrukts (D in Abb.4.2), neben einer geeigneten Restriktionsschnittstelle auch eine Sequenz kodierend für das HA-Epitop (Abb.4.3) und ein Stop-Kodon dem Konstrukt hinzufügte. Die Produkte der zwei PCR-Reaktionen der ersten Runde dienen als Matrizen in der zweiten PCR-Runde. Produkte aus der zweiten PCR-Runde wurden zunächst mittels des TOPO TA-Cloning Kits in den pCR2.1-TOPO oder den pCRII-TOPO Vektor kloniert, darin sequenziert und danach in den pUAST-Vektor kloniert. Das genaue Vorgehen für die jeweiligen Konstrukte, sowie die Sequenzierungsprimer sind unterstehend beschrieben.

pUAST-*Delta*, die Grundlage für alle Delta-Hybride, wurde erhalten von Alfonso Martinez-Arias.

PCR-Bedingungen wurden nach Angaben des Herstellers der HF-Polymerase (Roche) gewählt. Im Überblick:

0,5-1µg	DNA	PCR-Bedingungen
5µl	Buffer 2 (15mM MgCl ₂)	1. 2min 95°C
4µl	Primer 1 (10pmol)	2. 15sec 94°C
4µl	Primer 2 (10pmol)	3. 30sec 45-55°C (primerabhängig)
1µl	dNTP's (10mM)	4. 0,5-3min 72°C (produktabhängig)
0,75µl	Enzym	Schritte 2.-4. 10x wiederholt
auffüllen bis 50µl H ₂ O		5. 15sec 94°C
		6. 30sec 45-55°C
		7. 0,5-3min 72°C +5sek/Zyklus
		Schritte 5-7 20x wiederholt
		8. 10min 72°C
		9. Pause 4°C

Hybridkonstrukt Delta-DLL1 (DD1):

Hierzu wurden die DNA-Bereiche kodierend für die Aminosäurereste 1-617 des Delta-Proteins mit dem DNA-Bereich kodierend für die Aminosäurereste 561-714 des rDLL1 fusioniert.

Erste PCR-Reaktion

1d GGAGTCCTACGATTCGGTGACCTTCGATGCC
1c AGCCGGACGAAGACCACGCACGC 162bp
1b TGC GTGGTCTTCGTCCGGCTGAAGCTAC
6a AATTCTCTAGATCAAGCGTAATCTGGCACATCGTATGGGTAAG
CAACCTCAGTCGCTATAAC 518bp

Zweite PCR-Reaktion

Primer 1d + 6a1 AATTCTCTAGATCAAGCGTAATCTGGCACAT
CGTATGGGTAAGCAAC 660bp

Zur Erzeugung des Konstrukts wurden folgende drei Fragmente ligiert:

1. Trägervektor: pUAST-*Delta* – Verdaut mit BstXI und XbaI, größtes Fragment enthaltend den pUAST-Vektor mit dem 5'-Abschnitt der *Delta*-cDNA bis zur BstXI-Schnittstelle
2. BstXI Fragment aus pUAST-*Delta* (700bp)
3. BstXI und XbaI Doppelverdau des zweiten PCR-Produkts (1d+6a1)

Hybridkonstrukt DLL1-Delta (D1D):

Es wurden DNA-Bereiche kodierend für die Aminosäurereste 1-537 in rDLL1 mit denen kodierend für die Aminosäurereste 595-833 des Delta-Proteins zusammengefügt.

Erste PCR-Reaktion

2d3 GCGAGGACAATGTGGATGACTGTGCC
2c1 AGCAATTAGGACTACCCAGGGGAAGGACC 311bp
2b3 CGGGTCCTTCCCCTGGGTAGTCCTAATTGCTGTTTTCTC
2a3 AATTCTCTAGATCAAGCGTAATCTGGCACATCGTATGGGTAAG
CCATATGCGGAGTGCCGC 777bp

Zweite PCR-Reaktion

2d4 GAGGACAATGTGGATGAC
2a4 AATTCTCTAGATCAAGCGTAATC 1055bp

Zur Erzeugung des Konstrukts wurden folgende drei Fragmente ligiert:

1. Trägervektor: pUAST linearisiert mit XbaI
2. XbaI-SphI Fragment aus pUAST-*DLL1* (1783bp)
3. Produkt der zweiten PCR-Reaktion (2d4+2a4), verdaut mit SphI und XbaI

Hybridkonstrukt Delta-DLL4 (DD4):

Das Konstrukt kodiert für die Aminosäurereste 1-617 aus Delta, denen der Bereich kodierend für die Aminosäurereste 553-685 aus mDLL4 folgte.

Erste PCR-Reaktion:

1d ggagtcctacgattcggtagacctcgatgcc
3c cgcagctgccggaagaccacgca 165bp
3a2 gcgtgcgtggtctccggcagctgcg
3b2 aattctctagatcaagcgaatctggcacatcgtatgggtaagctacctctgtggcaatcac 458bp

Zweite PCR-Reaktion:

Primer 1d + 3b2 597bp

Zur Erzeugung des Konstrukts wurden drei Fragmente ligiert (ähnlich DD1):

1. Trägervektor: pUAST-*Delta* – Verdaut mit BstXI und XbaI, größtes Fragment enthaltend den pUAST-Vektor mit dem 5'-Abschnitt der *Delta*-cDNA bis zur BstXI-Schnittstelle
2. BstXI Fragment aus pUAST-*Delta* (700bp)
3. BstXI-XbaI Verdau des zweiten PCR-Produkts (Primer: 1d+3b2)

Hybridkonstrukt DLL4-Delta (D4D):

Das Konstrukt kodiert für die Aminosäurereste: 1-532 aus mDLL4, denen der Bereich kodierend für die Transmembrandomäne und die anschließende intrazelluläre Domäne aus Delta folgte (Aminosäurereste 595-833)

Erste PCR-Reaktion

4d GAGAATGGGCCTGTGTGCACCTGC
4c GCAATTAGGACTACAGCTACCCAGGGGAAGC 233bp
4a CCAGCTTCCCCTGGGTAGCTGTAGTCCTAATTGCTGTTTTCT
2a1 AATTCTCTAGATCAAGCGTAATCTGGCACATCGTATGGGTAAGCCA
TATGCGGAGTGCC 778bp

Zweite PCR-Reaktion

4d1 CTGGAGAATGGGCCTGTGTGCACCTGCCCCG + Primer 2a1 980bp

Zur Erzeugung des Konstrukts wurden folgende drei Fragmente ligiert:

1. Trägervektor: pUAST verdaut mit EcoRI+XbaI
2. EcoRI+ApaLI Fragment aus pBS-DLL4
3. ApaLI+XbaI Verdau des zweiten PCR-Produkts

Hybridkonstrukt DLL4-DLL1 (D4D1):

Das Konstrukt kodiert für den extrazellulären Bereich mitsamt der Transmembrandomäne aus mDLL4 (Aminosäurereste: 1-553). Dem folgte ein DNA-Abschnitt kodierend für die intrazelluläre Domäne von rDLL1 (Aminosäurereste 561-714).

Erste PCR-Runde:

4d4 CAGGCACCCACTGTGAACTGCACATCAGC
6c1 GTAGCTTCAGCCGGACCACAGCCACTACCAC 375bp

6b1 GGTGGTAGTGGCTGTGGTCCGGCTGAAGC
6a AATTCTCTAGATCAAGCGTAATCTGGCACATCGTATGGGTAAGCAA
CCTCAGTCGCTATAAC 522bp

Zweite PCR-Runde:

Primer 4d4 + 6a1 AATTCTCTAGATCAAGCGTAATCTGGCACATCGTATG
GGTAAGCAAC 865bp

Für die Herstellung des Konstrukts wurden folgende drei Fragmente ligiert:

1. Trägervektor: pUAST, verdaut mit EcoRI und KpnI
2. EcoRI-ApaLI Fragment aus UAS-DLL4
3. ApaLI-KpnI Fragment aus dem PCR-Produkt (4d4+6a1) in pCR2.1-TOPO

Hybridkonstrukt DLL1-DLL4 (D1D4):

In dem Konstrukt wurde DNA kodierend für den extrazellulären Bereich von rDLL1 (Aminosäurereste 1-537) mit einem DNA-Abschnitt kodierend für die Transmembrandomäne und die intrazelluläre Domäne von mDLL4 (Aminosäurereste 531-686) kombiniert.

Erste PCR-Runde:

5a1 CGGGTCCTTCCCCTGGGTAGCTGTCTCGCTGGGC
3b1 AATTCTCTAGATCAAGCGTAATCTGGCACATCGTATGGGTAAGCT
ACCTCTGTGGCAATCACACAC 528bp

5d1 CGGATAACCCCGATGGAGGCTACACC
5b1 CAGCGAGACAGCTACCCAGGGGAAGGACC 485bp

Zweite PCR-Runde:

5d2 GATAACCCCGATGGAGGCTACAC
3b2 AATTCTCTAGATCAAGCGTAATCTGGCAC 980 bp

Für die Herstellung des Konstrukts wurden folgende drei Fragmente ligiert:

1. pUAST-Trägervektor XhoI+KpnI Doppelverdau
2. XhoI-SapI Fragment aus dem UAS-DLL1 Vektor
3. SapI-KpnI Fragment aus dem PCR-Produkt (5d2+3b2) in pCR2.1-TOPO:

Konstrukt rDLL1 ohne HA-Epitop

rD1 GGCTCGAGGGTACCTCTAGAACTAGTGGAT

rD2 GAAGCTCTAGATTAACCTCAGTCGCTATAACACACTC 2490 bp

pUAST-DLL1HA diente als Matrize für die PCR-Reaktion, das Produkt wurde dann mittels XhoI + XbaI Doppelverdau in den pUAST-Trägervektor kloniert.

Konstrukt mDLL4-HA

D4HA1 CCAGCTCAAAAACACAAACCAGAAG

3b AATTCTCTAGATCAAGCGTAATCTGGCACATCGTATGGGTAAGCTACCTCT
GTGGCAATCACACA 351bp

Als Matrize diente pUAST-mDLL4. Das PCR-Produkt wurde dann über einen Doppelverdau mit PshAI+KpnI und Austausch des unmarkierten PshAI+KpnI-Fragments in pUAST-DLL4 kloniert.

HA-Epitop in Delta-Hybriden, DLL4-HA, Igd-HA und Igd-Deletionskonstrukten:

A Y P Y D V P D Y A Stop
GCT TAC CCA TAC GAT GTG CCA GAT TAC GCT TGA

HA-Epitop in DLL1HA, Jag1, Jag2

Y P Y D V P D Y A G Y P Y D V P D Y A G
TAC CCA TAC GAT GTT CCT GAC TAT GCG GGC TAT CCC TAT GAC GTC CCG GAC TAT GCA...GGA
S Y P Y D V P D Y A A Q C G R S R G S L Stop
TCC TAT CCA TAT GAC GTT CCA GAT TAC GCT GCT CAG TGC GGC CGC TCT AGA GGA TCT TTG TGA

Abb.5.3: HA-Epitope in den benutzten Konstrukten. Das obere, kurze HA-Epitop konnte mit beiden benutzten HA-Antikörpern erkannt werden und wurde bei der Konstruktion aller in dieser Arbeit hergestellten Konstrukte zur Markierung benutzt. Das untere Epitop wurde leider lediglich mit dem HA-Antikörper aus der Ratte erkannt.

Andere Klonierungen:

- mDLL4 aus pCR2.1 mittels EcoRI-Verdau in pUAST – Ausgangsplasmid erhalten von Amgen, USA
- mDLL3 aus pBluescriptSK+ mittels EcoRI-Verdau in pUAST – Ausgangsplasmid erhalten von Sally Dunwoodie, Australien
- rJag2HA, rJag1HA, rDLL1HA alle aus pEF-Bos mittels XbaI-Verdau in pUAST – Ausgangsplasmid erhalten von Garry Weinmaster, USA.

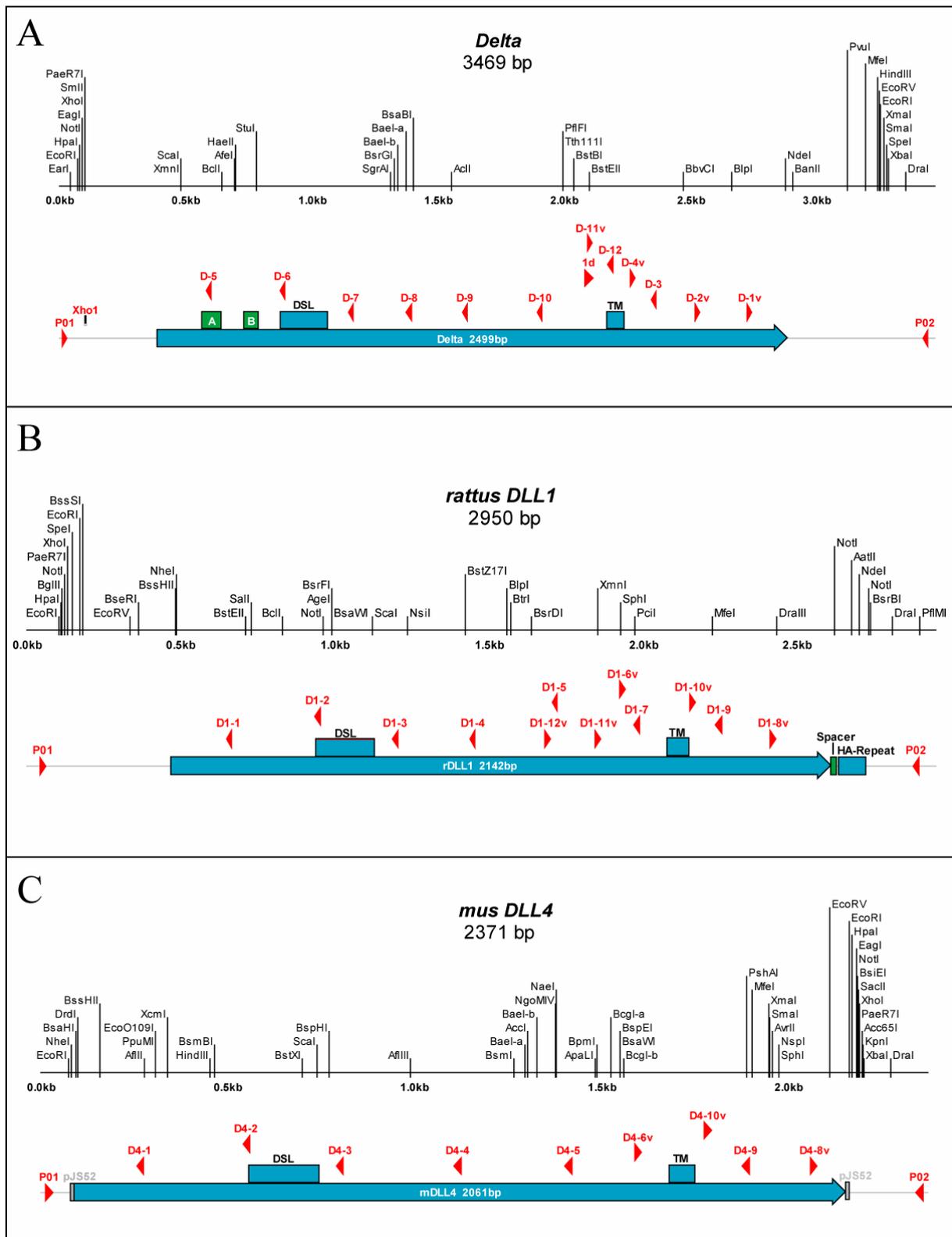


Abb.5.4 Lage der Sequenzierungsprimer, die zur Überprüfung der Delta/Delta-like-Hybridkonstrukte benutzt wurden. Für die Sequenzen der Primer siehe folgenden Text.

pCR2.1-TOPO- und pCRII-TOPO-spezifische Sequenzierungsprimer

M13 gtaaacgacggccag (M13 Reverse Primer)
M20 caggaacagctatgac (M13 (-20) Forward Primer)

pUAST-spezifische Sequenzierungsprimer

P01 CTGAAATCTGCCAAGAAG
P02 GGTTGGAATCTAAAATACAC

Delta – intrazellulär

D-1v TAGGCGAGGGTTCCTACTG
D-2v ATGTACGGCGGATATGTG
D-3 CTGAAGCCAAAGCTACAC
D-4v CTCAGGAAAAGGACGACG

Delta - extrazellulär

D-5 AGTGCTTTAGGCAGACGC
D-6 CCGACTTGTTTCGTCTTCC
D-7 ACTCGTTGCACAAGGCTC
D-8 GCATCGCAGGAGTAGATCTC
D-9 TAGCCAATGGGACATTTCG
D-10 GAGATTCAAGCAGGTTCC
D-11v ATTCGGTGACCTTCGATG
D-12 CAACGGAGAAAACAGCAATTAG

DLL1 – extrazellulär

D1-1 GTAATGCTTGAGGCATAC
D1-2 AAGGTCCTGAGACCACTC
D1-3 ACTCTGCACTTGCATTCC
D1-4 CATCTACCTCCAGCTCAC
D1-5 ACTTGGCACCGTTAGAAC
D1-6v ATGCACCCTGTCATAACG
D1-7 GCGCACTCACACATGTAG

DLL1 – intrazellulär

D1-8v ACACAGCAAACGTGACAC
D1-9 CTAACAGAAACATCCTTCTCAC
D1-10v GGCTGAAGCTACAGAAACAC

DLL4 – extrazellulär

D4-1 AAATGCGGAAGAAAGTCC
D4-2 CCAAATCTTACCCACAGC
D4-3 ACTCATCTGGCTTGCTGC
D4-4 TTCTCCTGGTCCTTACAGC
D4-5 GCTGATGTGCAGTTCACAG
D4-6v CTCTCCCCAAACAACCTTC
D4-7 AGGACTACAGCTACCCAG

DLL4 - intrazellulär

D4-8v ATCAGCCATTTGCTCTCC
D4-9 CCAGACCACAGTCCACTTC
D4-10v ATGACGAGAGCAGGGAAG

5.4.9. Sequenzalignments und phylogenetische Untersuchungen

Die Alignments der Sequenzen der Proteinsequenzen von Lgd-Orthologen sind mit dem ClustalX-Programm (Version 1.81) mit Standardvorgaben erstellt worden (Thompson et al., 1997; Thompson et al., 1994). Das von diesem Programm herausgegebene Alignment ist zur phylogenetischer Analyse weiter mittels des Phylip-Programmpaketes (Version 3.62) bearbeitet worden. Der Verlauf war wie in den Anleitungen auf der Herstellerseite beschrieben: <http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>, alle Programme sind mit Standardvorgaben benutzt worden, wobei zur Errechnung der Sequenzverwandschaft die Jones-Taylor-Thornton Matrix benutzt wurde (im Programm protdist.exe). Die vom Paket erzeugten phylogenetischen Bäume sind anschließend mit Adobe Illustrator bearbeitet worden.

Alignments der Notch-Liganden aus der Fliege und den Vertebraten und Angaben zu ihrer Ähnlichkeit sind mit dem ClustalX-Programm (Version 1.60) innerhalb des Omega 2.0-Programmpaketes mit Standardeinstellungen erstellt worden.

Die Datenbankidentifikationsnummern der verglichenen Sequenzen sind im Folgenden angegeben:

Lgd-Projekt:

Proteine:

NCBI: D.melanogaster-NP_609488, A.gambiae-XP_314506, H.sapiens-1/CC2D1B/Freud2-XM_114087.5, M.musculus-1/Cc2d1b/Freud2-NP_796019.1, R.norvegicus-XP_233342.3, C.elegans(Y37H9A.3)-NP_493412.2, X.laevis (MGC68887)-AAH57723.1, H.sapiens-2/CC2D1A/Freud1-AAH64981, M.musculus-2/Cc2d1a/Freud1- 148-2976bp translation from mRNA-seq. NM_145970.1, T.nigroviridis-CAG06037, D.discoideum-XP_638866.

Ensembl: D.rerio-ENSDARP00000016483, M.domestica-ENSMODP00000014978, C.intestinalis-SNAP_CIONA00000055157

Proteindomänen sind angezeigt nach kombinierten Angaben aus der Conserved Domain Database(CDD), der SMART-Datenbank, gefunden anhand ihrer Ähnlichkeit mit der DM14 Konsensussequenz mittels der Suchfunktion auf dem SMART-Server und Sequenzalignments sowie der Sequenzmotiv-Suchfunktion in VectorNTi 9.0 (Informax).

Delta-Projekt:

Proteine: Delta-NP_477264, rDLL1-Swissprot: P97677, mDLL3-NM_007866.1, mDLL4-NM_019454.1, Serrate-NM_079803.2, rJag1-NM_019147.1, rJag2-XM_343119.2

DNA: genomische Region 32D-F aus den NCBI-Einträgen AE003631 und AE003632.

Proteindomänen sind angegeben nach Angaben von NCBI und Sequenzalignments in VectorNTi 9.0

Für die Herstellung der Primer für die Hybridkonstrukte dienten folgende Sequenzen als Referenz:

mRNA: Delta-Y00222, rDLL1-NM_032063, mDLL3-NM_007866, mDLL4-NM_019454

5.4.10. Fliegenhaltung

Fliegenstämme wurden auf Futtermedium in zylindrischen Futterröhrchen die mit Schaumstoffstopfen verschlossen waren gehalten. Die Haltung erfolgte, falls keine andere Temperatur angegeben ist, bei 25°C. Für Kreuzungen wurden frisch geschlüpfte, jungfräuliche Weibchen (unter 22h nach Verlassen des Pupariums) mit Männchen unterschiedlicher Altersstufen verwandt. Zur Gewinnung von größeren Eiablagen (zB. für die Erzeugung von Transgenen) wurden die Fliegen in einem großen, zylindrischen Käfig gehalten, dessen obere Öffnung mit einem Netz bespannt war. Die untere Öffnung wurde mit einer Apfelsaft-Agarplatte mit etwas Bäckerhefe verschlossen, die zur Eiablage für 30min dort verblieb. Nach Auswechseln der Apfelsaft-Agarplatte konnte das Gelege gesammelt werden.

Fliegenfutter: 240g Agar in 10 l Wasser für 2,5h kochen. Anschließend 2,4kg Maismehl, 430g Trockenhefe, 300g Sojamehl, 2,4kg Malzextrakt und 630g Zuckerrübensirup in 15 l Wasser zugeben und die gesamte Mischung weitere 4,5h kochen. Nach Abkühlung auf 60°C werden 190ml Propionsäure hinzugefügt und das Futter in entsprechende Futterröhrchen (Ø 2,5cm, ↓ 6cm oder Ø 4,5cm, ↓ 9cm) bis etwa 1/3 Höhe gegossen.

5.4.11. Herstellung transgener Fliegen

Zur Herstellung transgener Fliegen wurde die P-Element vermittelte Transformation von *Drosophila* Embryonen eingesetzt (Rubin and Spradling, 1982). Dabei wird das in den pUAST-Trägervektor (Brand and Perrimon, 1993) klonierte Transgen X stabil in die chromosomale Fliegen-DNA integriert. Hierzu wurde eine Mischung aus dem pUAST-Trägerplasmid (400ng/μl) und dem Δ^{2-3} -Transposase-Helferplasmid (100ng/μl) in VE-H₂O hergestellt und diese in *white*⁻ Embryonen injiziert. Der Injektionsmix wurde zuvor im Photometer überprüft, wobei das A260/A280-Verhältnis (DNA/RNA-Ratio) oberhalb von 1,7-1,8 zu liegen hat. Zu beachten ist weiterhin, daß der Injektionsmix möglichst wenig TE enthält, da dieses toxisch auf die Embryonen wirkt. Deswegen sollten schon die Ausgangslösungen der beiden Plasmide in H₂O vorgelegen haben. Der Injektionsverlauf war wie folgt:

- Embryonen aus bis zu 30min alten Ablagen werden dechorionisiert (1min Chlorix:Wasser 1:1, 1min intensives Waschen mit Wasser im Sieb)
- Aufreihen der Embryonen auf einem Apfelagarblock (50-80Stück, RT unterhalb von 25°C, Aufreihdauer unter 15min, Durchlicht zur besseren Abschätzung des Alters und Zustands der Embryonen)

- Übertragung der Embryonen auf ein mit Heptan-Kleber bestrichenes Deckglas
- Trocknung der Embryonen im Exsikator auf Silikagel (7-11min, möglichst kurze Zeit bevorzugen, abzuschätzen bei der ersten Injektion – es sollte kein Ausfließen von Zellplasma aus dem Embryo nach Nadeleinstich auftreten)
- Montierung des Deckgläschens mit den Embryonen auf einem Objektträger und Überschichtung mit 10S Voltalev-Öl
- Beladen der Injektionsnadel (Mikrokapillare Ø 1mm, Spitzen in einem Nadelzieher gezogen und mit einer Pinzette geöffnet) mit 0,7µl Injektionslösung und Injektion der Embryonen in einer Mikroinjektionsapparatur (am posterioren Pol, geringe Injektionsmengen notwendig, starkes Aufwirbeln des Zellplasma vermeiden)
- Entfernung zu alter Embryonen (Zellularisierung) mit einer Nadel
- Überführung des Deckgläschens in eine Eppendorf-Schale und Überschichtung mit 3S Voltalev-Öl
- Inkubation der injizierten Embryonen bei 25°C in einer feuchten Kammer üN.
- Aufsammeln der schlüpfenden Larven mit einer Nadel (Durchlicht von unten) und Überführung in einen Klecks frischer Hefe in einem Futterröhrchen

Heptan-Kleber: Streifen vom braunen Paketband (von Tesa, Kleber anderer Marken wirken toxisch) werden üN. in Heptan eingelegt. Am nächsten Tag werden 1-2ml Heptankleber in kleinen Eppendorf-Gefäßen 2-3x für je 2min bei 14.000rpm in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert, bis der Überstand gelb und klar ist. Aufgetragen am Rand eines Deckgläschens (etwa 2-3µl bei 20mm Kantenlänge) sollte nach 2-5min Trocknung der Streifen fühlbar klebrig sein.

Erzeugte transgene Fliegen wurden gegen den *multibalancer*-Stamm ($w^-;IF/CyO^{wg-lacZ}; MKRS/TM6b$) ausgekreuzt und Linien auf dem ersten ($w^-/UAS-X;IF/CyO^{wg-lacZ}; MKRS/TM6b$), zweiten ($w^-;UAS-X/CyO^{wg-lacZ}; MKRS/TM6b$) und dritten Chromosom ($w^-;IF/CyO^{wg-lacZ}; UAS-X/TM6b$) etabliert (UAS-X hier stellvertretend für das jeweilige Transgen), wobei alle drittchromosomalen Linien über dem TM6b-Chromosom balanciert waren. Die dominante Mutation *Tubby* (*Tb*) auf diesem Chromosom führt bei den betroffenen Tieren zu einer charakteristisch kurz-gedrungenen Körperform, die ab dem zweiten Larvenstadium gut zu erkennen ist. Dadurch ist es möglich, für Färbungen nur Tiere mit dem wildtypischen, langen Körperbau zu selektieren, die dann das gewünschte Transgen oder andere Mutation in Homozygose tragen.

5.4.12. Präparation und Antikörperfärbung von Flügelimaginalscheiben

Es wurden meistens Imaginalscheiben von Larven präpariert, die sich im mittleren oder späten dritten larvalen Stadium befanden. Diese konnten daran erkannt werden, daß sie den Futterbrei verließen bzw. aufgrund von Größenvergleichen kurz davor standen.

- Larven werden in ein Dreierblockschälchen gefüllt mit PBS überführt, in der Mitte aufgetrennt und die vordere Hälfte umgestülpt

- Imaginalscheiben werden vorsichtig freipräpariert

Für die folgenden Schritte werden die umgestülpten Larvenhälften mit daran hängenden Imaginalscheiben in ein Siebchen überführt, das sich in einer der Kammervertiefungen einer 48-Lochkammer befindet. Alle Schritte finden, falls nicht anders erwähnt, bei Raumtemperatur statt.

- Fixierung: 30min in 4% Paraformaldehyd
- Waschen: 3x10min in PBT
- Blocken: 30min in 5% NGS/PBT (oder über Nacht bei 4°C)
- Primärer AK: 1,5h in 5% NGS/PBT
- Waschen: 3x20min in PBT
- Sekundärer AK: 1h in 5% NGS/PBT
- Waschen: 3x10min in PBT

Die Larvenhälften werden in einen Tropfen Einbettungsmedium (Vectashield bei Fluoreszenzfärbungen) auf einen Objektträger überführt, wo dann vorsichtig die Imaginalscheiben mit Pinzetten abgetrennt und im Medium belassen werden, während der restliche Larvenkörper verworfen wird. Die Scheiben werden mit einem Deckgläschen abgedeckt und anschließend photographiert. Die Präparate können abschließend im Dunkeln bei 4°C gelagert werden.

PBS: 137mM NaCl, 2,7mM KCl, 8mM Na₂HPO₄, 1,7mM KH₂PO₄. pH 7,4 mit HCl

PBT: 0,3% Tween20 in PBS

5.4.13. Kutikulapräparationen

Adulte Fliegen oder Puppen wurden bis zur Präparation in Methanol gesammelt und darin ebenfalls präpariert. Das freipräparierte Gewebe wurde anschließend in einen Tropfen Hoyers-Medium auf einem Objektträger übertragen und eingedeckelt. Das Deckgläschen wurde zu einer besseren Verteilung des Mediums mit einem Bleigewicht beschwert und die Präparate zur Klärung und Aushärtung des Mediums üN. Auf einem Heizblock bei 65°C inkubiert.

Hoyers-Medium : 30g Gummi-Arabicum mit 50ml H₂O üN. rühren. Am nächsten Tag unter Rühren 200g Chloralhydrat und 16ml (20g) Glycerin hinzufügen. Lösung in einer Sorvall-Zentrifuge abzentrifugieren, Überstand abnehmen und unter Mikroskop auf Klarheit überprüfen.

5.4.14. Uptake-Versuche

Präparation findet wie im Falle der Antikörperfärbung statt, allerdings sollte das Präparationsmedium kalt sein und die freipräparierten Larvenhälften in PBS auf Eis gesammelt werden, bis sämtliche Larven präpariert und der nächste Schritt angegangen werden kann. Es wurden Uptake-Versuche mit Dextran unternommen, das mit einem Fluoreszenzfarbstoff konjugiert war (Dextran TexasRed von Molecular Probes) und mit den Antikörpern gegen wahlweise die intra- oder die extrazelluläre Domäne des Notch-Proteins. (Durchführung nach: (Entchev et al., 2000; Le Borgne and Schweisguth, 2003))

Der Verlauf für die Dextran TexasRed-*uptakes* war wie folgt:

- Präparation und Lagerung der Larvenhälften – in eiskaltem PBS
- Wechsel des Mediums gegen neues PBS
- Zugabe von Dextran TexasRed (5mM)
- Inkubation bei 25°C über 20-30min (pulse)
- Waschen: 1x schnell und 2x 1min in eiskaltem PBS
- Inkubation 5min bei 25°C in PBS (chase)

Um eine spezifische Aufnahme der Antikörper in den Versuchen zu gewährleisten und eine unspezifische zu verhindern wurde bei *uptake*-Versuchen mit den Antikörpern die Inkubationsphase bei 4°C durchgeführt, um die Endozytose in dieser Zeit zu blockieren. Der Verlauf war wie folgt:

- Präparation und Lagerung der Larven wie bei Dextran, in eiskaltem PBS
- Inkubation mit dem Antikörper: 1h bei 4°C
- 1x schnelles Waschen mit PBS
- 2x 2min Waschen mit PBS
- 20min Inkubation bei 25°C

Anschließend wurde mit der Fixierung das Protokoll der normalen Antikörper-Färbung befolgt.

5.4.15. RNA *in-situ* Färbungen an Flügelimaginalscheiben

Die RNA *in-situ* Färbungen sind nach (Tautz and Pfeifle, 1989) durchgeführt worden, mit einigen Modifikationen aus dem Protokoll von Mark Sturtevant und Ethan Bier aus der University of California, San Diego, veröffentlicht online, derzeit nicht mehr verfügbar. Die einzelnen Schritte werden im Folgenden beschrieben.

Sonden-Herstellung:

1. Synthese der Sonde

Für die Sonden-Herstellung wurde das „DIG RNA Labeling Mix“ von Boehringer Mannheim benutzt. Dazu wurden 2µg Vektor mit dem als Matrize dienenden cDNA-Fragment mit einem geeigneten Restriktionsenzym linearisiert. Für die *lgd*-spezifische Probe wurde aus der *lgd*-cDNA das EcoRI-EcoRV Fragment erzeugt, das EcoRI-Ende mit dem Klenow-DNAPolI-Fragment aufgefüllt und in den pBluescriptII-KS Vektor kloniert. Dabei wurden zwei Plasmide erzeugt, in denen das Fragment in verschiedener Orientierung vorlag, so daß diese Plasmide mittels T7-Promotor vermittelten Transkription zur Gewinnung der *sense* (pBS-4713-11) und *anti-sense* (pBS-4713-14) RNA-Proben genutzt werden konnten. Die Linearisierung der Plasmide erfolgte jeweils mittels SallI-Restriktionsverdau.

Für die *Rab5*-spezifische *anti-sense* Probe wurde der pBluescript-Rab5 Vektor mit EcoRI verdaut und die RNA ebenfalls mittels T7-Promotor vermittelten Transkription erzeugt.

Nach der Aufreinigung mit dem PCR Purification Kit der Firma Quiagen wurde die DNA in 20µl Wasser aufgenommen. Davon wurde 1µl zur Kontrolle der Restriktion auf einem Agarosegel besehen, und bei bestätigter Linearisierung der Rest für die Sondenherstellung verwendet. Dazu wurden:

- 8µl der linearisierten DNA
- 2µl des DIG-RNA Labelling Mix
- 0,5 µl RNase-Inhibitor
- 2µl Polymerase (T7/Sp6)
- 2µl Transkriptionspuffer
- 5,5µl sterilfiltriertes H₂O

Für 3h bei 37°C inkubiert. Die Sonde konnte anschließend bei -20°C gelagert werden. Zur Kontrolle der Sondenherstellung wurde 1µl wiederum auf einem Agarosegel besehen.

2. Hydrolyse der Sonde

Spezifische Färbungen an Imaginalscheiben konnten erst nach einer Hydrolyse der Sonde erreicht werden. Dazu wurden:

- 10µl vom obigen Syntheseansatz
- 38µl sterilfiltriertes H₂O
- 50µl Carbonatpuffer (2x)
(2xCarbonatpuffer: 120mM Na₂CO₃, 80mM NaHCO₃, pH10.2, Lagerung bei -20°C)

vermischt und für 40min bei 70°C inkubiert.

Anschließend wurden

- 100µl der Stopplösung
(Stopplösung: 0,2M NaAc, 1% HAc, auf pH6.0 mit Essigsäure)

- 5µl tRNA (20mg/ml)
- 45µl LiCl (4M)
- 500µl EtOH (100%)

hinzugefügt, der Ansatz für 10min bei -20°C inkubiert und durch Zentrifugation gefällt (14.000rpm, 10min). Das Pellet wurde jeweils 2x mit 500µl EtOH gewaschen (70%) und Zentrifugiert (14.000, je 10min).

Nach dem Trocknen wurde das Pellet in 50µl Hybridisierungslösung aufgenommen und nach Auflösung bei -20°C bis zur Verwendung gelagert.

Präparation der Imaginalscheiben

Die Larven wurden wie für eine Antikörperfärbung umgestülpt, die Larvenkörper mit daran hängenden Imaginalscheiben auf Eis in PBS gesammelt. Die Präparation wurde ebenfalls in kalten PBS durchgeführt, wobei jeweils nur etwa 20min/20Larven präpariert wurden, bevor der nächste Schritt, die Fixierung eingeleitet wurde. Alle Waschschritte werden in 100% EtOH/MeOH durchgeführt, falls nicht anders angegeben. Durchführung jeweils in Siebchen in einer Multiwell-Platte, Flüssigkeitsmengen je 500µl, falls nicht anders angegeben.

- Fixierung: 30min im Fix (1,6ml FixLösung + 500µl Formaldehyd (FA)
(FixLösung: 100mM HEPES, 2mM MgSO₄, 1mM EGTA, pH6.9)
- 4x schnelles Waschen in MeOH

Anschließend konnten die Larven mit den Scheiben auf RT gehalten werden, bis alle anderen präpariert waren. Es folgte:

- 1x 5min Waschen mit MeOH
- 5x 5min Waschen mit EtOH

Danach wurden die Präparate auf -20°C gelagert, bis die weitere Färbung durchgeführt wurde.

***In-situ* Färbung**

Die vorher vorbereiteten Larven wurden aus der Aufbewahrung bei -20°C entnommen und wie folgt weiter behandelt:

Fixierung:

- 3x 5min Waschen in EtOH
- 1x 1h Waschen in Xylen/EtOH 50/50 (Xylen greift das Material der Multiwell-Platten an, deswegen durchzuführen in Eppendorf-Gefäßen)
- 5x 5min Waschen in EtOH
- 2x 5min Waschen mit MeOH
- 1x 5min Fixierung in 50/50 MeOH/PBT + 5% FA
- 1x 20min im Fix + 0,1% Triton X-100
- 2x 5min Waschen mit PBT
- 1x 1min 15sek ProteinaseK-Verdau (1:3000 von Boehringer Mannheim)
- Auf Eis! ProteinaseK-Lösung absaugen, weiteres Waschen wieder bei RT

- 2x 1min Waschen in 2mg/ml Glycin in PBT (zum Stoppen der ProteinaseK-Aktivität)
- 2x 5min Waschen mit PBT
- 1x 20min im Fix –Refixierung
- 5x 5min Waschen in PBT

Prähybridisierung (ab hier in Eppendorf, oder PCR-Gefäßen):

- 1x 10min Waschen in PBT
- 1x 10min Waschen in der Hybridisierungslösung bei 55°C
(Hybridisierungslösung: 50%Formamid, 5xSSC, 100µg/ml sonifizierte Heringssperma-DNA, 50µg/ml Heparin, 0,1%Tween20 – alles gelöst in H₂O – Lagerung bei -20°C)
- 1x 1h Prähybridisierung in der Hybridisierungslösung bei 55°

Hybridisierung:

- Denaturierung der Sonde: 2-4µl Sonde werden in 100µl der Hybridisierungslösung bei 80°C für 5min inkubiert und anschließend sofort auf Eis gestellt.
- Austauschen der Prähybridisierungslösung gegen die denaturierte Sonde
- Hybridisierung über Nacht bei 55°C

Waschschritte:

- Entnahme der Probe (kann bei -20gelagert und wiederverwendet werden)
- 1x 5min Waschen in der Hybridisierungslösung bei 55°C
- 1x 15min Waschen in der Hybridisierungslösung bei 55°C
- 1x 5min Waschen in 70/30 HYBE/PBT bei 55°C
- 1x 5min Waschen in 50/50 HYBE/PBT bei 55°C
- 1x 5min Waschen in 30/70 HYBE/PBT bei 55°C
(HYBE: 50%Formamid, 5xSSC)
- 2x schnell Waschen in PBT bei 55°C
- 1x 5min Waschen in PBT bei 55°C
- 1x 10min Waschen in PBT bei 55°C
- 1x 15min Waschen in PBT bei 55°C

Die nächsten Schritte wurden bei RT in einer Multiwell-Platte durchgeführt:

- 1h 45min Inkubation mit dem Antikörper gegen DIG
- 2x schnelles Waschen mit PBT
- 3x 5min Waschen mit PBT
- 1x schnelles Waschen in der Färbelösung
(Färbelösung: 100mM NaCl, 25mM MgCl₂, 100mM TrisHCl pH9.5, 0,1% Tween in H₂O)
- 1x 5min Waschen in der Färbelösung
- Färben in der Färbelösung (500µl) + 2µl NBT + 2µl BCIP bei 37°C im Dunklen, bis deutliche Färbung sichtbar
- 2x 5min Waschen in PBT zum Abstoppen der Farbreaktion
- Je 30min Inkubation in 30%, 50%, und 70% Glycerol
- Aufziehen der Scheiben in 70% Glycerol auf einem Objektträger

5.4.16. Erzeugung von MARCM-Klonen

Dank dieser Methode ist es möglich, eine klonale Analyse von letalen Mutationen durchzuführen und in den Klonen zu gleicher Zeit UAS-Konstrukte ektopisch zu exprimieren. Gleichzeitig bietet diese Methode den Vorteil, mutantes und wildtypisches Gewebe nebeneinander in der gleichen Organanlage (hier Flügelimaginalscheiben) zu betrachten. Es kombiniert das UAS/GAL4-Expressionssystem mit dem Flp/FRT-Rekombinationssystem, wobei hier als weitere Komponente noch das GAL80-Protein hinzutritt, welches als Repressor an das GAL4-Protein bindet und die Aktivierung des UAS-Promotors verhindert. Wird das GAL80-Protein unter der Kontrolle eines ubiquitären Promotors transkribiert, so ist das UAS/GAL4-System zunächst im gesamten Tier inaktiv. Hier kann nun das Flp/FRT-Rekombinationssystem eingesetzt werden. Befindet sich das GAL80 auf einem Chromosom mit einer FRT-Insertion, so kann man dieses mit einem weiteren Chromosom mit einer FRT-Insertion kombinieren, auf welchem auch die zu analysierende Mutation liegt. Befinden sich nun sowohl GAL80 und die zu untersuchende Mutation *in trans* auf homologen Chromosomen, so löst die Flippase (Flp) Rekombination zwischen den FRT-Insertionen aus. Dadurch entstehen Zellen, die für die betreffende Mutation homozygot sind. Gleichzeitig verlieren diese Zellen GAL80, so daß in ihnen das UAS/GAL4-System aktiv wird. In den hier beschriebenen Experimenten wurde das UAS/GAL4-System zur Aktivierung der UAS-GFP Insertion benutzt, wodurch die GAL4-exprimierenden, homozygot *lgd*-mutanten Zellen positiv markiert wurden. Siehe auch: (Lee et al., 2000).

MARCM-Klone sind in dieser Arbeit in Larven des Genotyps:

hsFlp1.22 *tub*GAL4 UAS-nlsGFP; FRT40A GAL80 / *lgd*^{d7} FRT40A; Gbe+Su(H)-lacZ erzeugt worden.

Die Expression der Flippase und Induktion der Klone erfolgte durch einen Hitzeschock im 1-2ten Larvenstadium (24-48h nach Eiablage) für 1h bei 37°C in einem Wasserbad. Präparation und immunhistologische Färbung der Imaginalscheiben erfolgten im 3ten Larvenstadium, etwa 48-72h später.

6. Literatur

- Adams, M. D., Celniker, S. E., Holt, R. A., Evans, C. A., Gocayne, J. D., Amanatides, P. G., Scherer, S. E., Li, P. W., Hoskins, R. A., Galle, R. F., George, R. A., Lewis, S. E., Richards, S., Ashburner, M., Henderson, S. N., Sutton, G. G., Wortman, J. R., Yandell, M. D., Zhang, Q., Chen, L. X., Brandon, R. C., Rogers, Y. H., Blazej, R. G., Champe, M., Pfeiffer, B. D., Wan, K. H., Doyle, C., Baxter, E. G., Helt, G., Nelson, C. R., Gabor, G. L., Abril, J. F., Agbayani, A., An, H. J., Andrews-Pfannkoch, C., Baldwin, D., Ballew, R. M., Basu, A., Baxendale, J., Bayraktaroglu, L., Beasley, E. M., Beeson, K. Y., Benos, P. V., Berman, B. P., Bhandari, D., Bolshakov, S., Borkova, D., Botchan, M. R., Bouck, J., Brokstein, P., Brottier, P., Burtis, K. C., Busam, D. A., Butler, H., Cadieu, E., Center, A., Chandra, I., Cherry, J. M., Cawley, S., Dahlke, C., Davenport, L. B., Davies, P., de Pablos, B., Delcher, A., Deng, Z., Mays, A. D., Dew, I., Dietz, S. M., Dodson, K., Doup, L. E., Downes, M., Dugan-Rocha, S., Dunkov, B. C., Dunn, P., Durbin, K. J., Evangelista, C. C., Ferraz, C., Ferreira, S., Fleischmann, W., Fosler, C., Gabrielian, A. E., Garg, N. S., Gelbart, W. M., Glasser, K., Glodek, A., Gong, F., Gorrell, J. H., Gu, Z., Guan, P., Harris, M., Harris, N. L., Harvey, D., Heiman, T. J., Hernandez, J. R., Houck, J., Hostin, D., Houston, K. A., Howland, T. J., Wei, M. H., Ibegwam, C., et al. (2000). The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* **287**, 2185-95.
- Agrawal, N., Kango, M., Mishra, A., and Sinha, P. (1995). Neoplastic transformation and aberrant cell-cell interactions in genetic mosaics of lethal(2)giant larvae (lgl), a tumor suppressor gene of *Drosophila*. *Dev Biol* **172**, 218-29.
- Allinson, T. M., Parkin, E. T., Condon, T. P., Schwager, S. L., Sturrock, E. D., Turner, A. J., and Hooper, N. M. (2004). The role of ADAM10 and ADAM17 in the ectodomain shedding of angiotensin converting enzyme and the amyloid precursor protein. *Eur J Biochem* **271**, 2539-47.
- Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M. D., and Lake, R. J. (1999). Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* **284**, 770-6.
- Babst, M. (2005). A protein's final ESCRT. *Traffic* **6**, 2-9.
- Bache, K. G., Brech, A., Mehlum, A., and Stenmark, H. (2003a). Hrs regulates multivesicular body formation via ESCRT recruitment to endosomes. *J Cell Biol* **162**, 435-42.
- Bache, K. G., Raiborg, C., Mehlum, A., and Stenmark, H. (2003b). STAM and Hrs are subunits of a multivalent ubiquitin-binding complex on early endosomes. *J Biol Chem* **278**, 12513-21.
- Barolo, S., Walker, R. G., Polyanovsky, A. D., Freschi, G., Keil, T., and Posakony, J. W. (2000). A notch-independent activity of suppressor of hairless is required for normal mechanoreceptor physiology. *Cell* **103**, 957-69.
- Baron, M., Aslam, H., Flasza, M., Fostier, M., Higgs, J. E., Mazaleyrat, S. L., and Wilkin, M. B. (2002). Multiple levels of Notch signal regulation (review). *Mol Membr Biol* **19**, 27-38.
- Barrio, R., de Celis, J. F., Bolshakov, S., and Kafatos, F. C. (1999). Identification of regulatory regions driving the expression of the *Drosophila* spalt complex at different developmental stages. *Dev Biol* **215**, 33-47.
- Basel-Vanagaite, L., Attia, R., Yahav, M., Ferland, R. J., Anteki, L., Walsh, C. A., Olender, T., Straussberg, R., Magal, N., Taub, E., Drasinover, V., Alkelai, A., Bercovich, D., Rechavi, G., Simon, A. J., and Shohat, M. (2006). The CC2D1A, a member of a new gene family with C2 domains, is involved in autosomal recessive non-syndromic mental retardation. *J Med Genet* **43**, 203-10.

- Benes, C. H., Wu, N., Elia, A. E., Dharia, T., Cantley, L. C., and Soltoff, S. P. (2005). The C2 domain of PKCdelta is a phosphotyrosine binding domain. *Cell* **121**, 271-80.
- Bhanot, P., Brink, M., Samos, C. H., Hsieh, J. C., Wang, Y., Macke, J. P., Andrew, D., Nathans, J., and Nusse, R. (1996). A new member of the frizzled family from *Drosophila* functions as a Wingless receptor. *Nature* **382**, 225-230.
- Bianchi, S., Dotti, M. T., and Federico, A. (2006). Physiology and pathology of notch signalling system. *J Cell Physiol* **207**, 300-8.
- Bilder, D. (2004). Epithelial polarity and proliferation control: links from the *Drosophila* neoplastic tumor suppressors. *Genes Dev* **18**, 1909-1925.
- Blair, S. S. (1995). Compartments and appendage development in *Drosophila*. *Bioessays* **17**, 299-309.
- Blaumueller, C. M., Qi, H., Zagouras, P., and Artavanis-Tsakonas, S. (1997). Intracellular cleavage of Notch leads to a heterodimeric receptor on the plasma membrane. *Cell* **90**, 281-91.
- Brand, A. H., and Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* **118**, 401-15.
- Brou, C., Logeat, F., Gupta, N., Bessia, C., LeBail, O., Doedens, J. R., Cumano, A., Roux, P., Black, R. A., and Israel, A. (2000). A novel proteolytic cleavage involved in Notch signaling: the role of the disintegrin-metalloprotease TACE. *Mol Cell* **5**, 207-16.
- Bruckner, K., Perez, L., Clausen, H., and Cohen, S. (2000). Glycosyltransferase activity of Fringe modulates Notch-Delta interactions. *Nature* **406**, 411-5.
- Bryant, P. J. (1975). Pattern formation in the imaginal wing disc of *Drosophila melanogaster*: fate map, regeneration and duplication. *J Exp Zool* **193**, 49-77.
- Bryant, P. J., and Schubiger, G. (1971). Giant and duplicated imaginal discs in a new lethal mutant of *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol* **24**, 233-63.
- Bucci, C., Parton, R. G., Mather, I. H., Stunnenberg, H., Simons, K., Hoflack, B., and Zerial, M. (1992). The small GTPase rab5 functions as a regulatory factor in the early endocytic pathway. *Cell* **70**, 715-28.
- Bucci, C., Thomsen, P., Nicoziani, P., McCarthy, J., and Van Deurs, B. (2000). Rab7: a key to lysosome biogenesis *Mol Biol Cell* **11**, 467-480.
- Buratovich, M. A., and Bryant, P. J. (1995). Duplication of l(2)gd imaginal discs in *Drosophila* is mediated by ectopic expression of wg and dpp. *Dev Biol* **168**, 452-63.
- Buratovich, M. A., and Bryant, P. J. (1997). Enhancement of overgrowth by gene interactions in lethal(2)giant discs imaginal discs from *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **147**, 657-70.
- Choudhury, A., Dominguez, M., Puri, V., Sharma, D. K., Narita, K., Wheatley, C. L., Marks, D. L., and Pagano, R. E. (2002). Rab proteins mediate Golgi transport of caveola-internalized glycosphingolipids and correct lipid trafficking in Niemann-Pick C cells. *J Clin Invest* **109**, 1541-50.
- Cormier, S., Vandormael-Pournin, S., Babinet, C., and Cohen-Tannoudji, M. (2004). Developmental expression of the Notch signaling pathway genes during mouse preimplantation development. *Gene Expr Patterns* **4**, 713-7.
- Dale, L. B., Seachrist, J. L., Babwah, A. V., and Ferguson, S. S. (2004). Regulation of angiotensin II type 1A receptor intracellular retention, degradation, and recycling by Rab5, Rab7, and Rab11 GTPases. *J Biol Chem* **279**, 13110-8.
- de Celis, J. F., and Bray, S. (1997). Feed-back mechanisms affecting Notch activation at the dorsoventral boundary in the *Drosophila* wing. *Development* **124**, 3241-51.
- de Celis, J. F., and Bray, S. J. (2000). The Abruptex domain of Notch regulates negative interactions between Notch, its ligands and Fringe. *Development* **127**, 1291-302.
- de Celis, J. F., Garcia-Bellido, A., and Bray, S. J. (1996). Activation and function of Notch at the dorsal-ventral boundary of the wing imaginal disc. *Development* **122**, 359-69.

- De Strooper, B., Annaert, W., Cupers, P., Saftig, P., Craessaerts, K., Mumm, J. S., Schroeter, E. H., Schrijvers, V., Wolfe, M. S., Ray, W. J., Goate, A., and Kopan, R. (1999). A presenilin-1-dependent gamma-secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain. *Nature* **398**, 518-22.
- Dehal, P., and Boore, J. L. (2005). Two rounds of whole genome duplication in the ancestral vertebrate. *PLoS Biol* **3**, e314.
- Dekker, L. V., and Parker, P. J. (1997). Regulated binding of the protein kinase C substrate GAP-43 to the V0/C2 region of protein kinase C-delta. *J Biol Chem* **272**, 12747-53.
- Di Fiore, P. P., and De Camilli, P. (2001). Endocytosis and signaling. an inseparable partnership. *Cell* **106**, 1-4.
- Doherty, D., Feger, G., Younger-Shepherd, S., Jan, L. Y., and Jan, Y. N. (1996). Delta is a ventral to dorsal signal complementary to Serrate, another Notch ligand, in Drosophila wing formation. *Genes Dev* **10**, 421-34.
- Dunwoodie, S. L., Clements, M., Sparrow, D. B., Sa, X., Conlon, R. A., and Beddington, R. S. (2002). Axial skeletal defects caused by mutation in the spondylocostal dysplasia/pudgy gene Dll3 are associated with disruption of the segmentation clock within the presomitic mesoderm. *Development* **129**, 1795-806.
- Dunwoodie, S. L., Henrique, D., Harrison, S. M., and Beddington, R. S. (1997). Mouse Dll3: a novel divergent Delta gene which may complement the function of other Delta homologues during early pattern formation in the mouse embryo. *Development* **124**, 3065-76.
- Egan, S. E., St-Pierre, B., and Leow, C. C. (1998). Notch receptors, partners and regulators: from conserved domains to powerful functions. *Curr Top Microbiol Immunol* **228**, 273-324.
- Entchev, E. V., Schwabedissen, A., and Gonzalez-Gaitan, M. (2000). Gradient formation of the TGF-beta homolog Dpp. *Cell* **103**, 981-91.
- Essen, L. O., Perisic, O., Cheung, R., Katan, M., and Williams, R. L. (1996). Crystal structure of a mammalian phosphoinositide-specific phospholipase C delta. *Nature* **380**, 595-602.
- Ferguson, M. A. (1999). The structure, biosynthesis and functions of glycosylphosphatidylinositol anchors, and the contributions of trypanosome research. *J Cell Sci* **112** (Pt 17), 2799-809.
- Fitzgerald, K., and Greenwald, I. (1995). Interchangeability of Caenorhabditis elegans DSL proteins and intrinsic signalling activity of their extracellular domains in vivo. *Development* **121**, 4275-82.
- Fleming, R. J., Gu, Y., and Hukriede, N. A. (1997). Serrate-mediated activation of Notch is specifically blocked by the product of the gene fringe in the dorsal compartment of the Drosophila wing imaginal disc. *Development* **124**, 2973-81.
- Fleming, R. J., Scottgale, T. N., Diederich, R. J., and Artavanis-Tsakonas, S. (1990). The gene Serrate encodes a putative EGF-like transmembrane protein essential for proper ectodermal development in Drosophila melanogaster. *Genes Dev* **4**, 2188-201.
- Fortini, M. E. (2000). Fringe benefits to carbohydrates. *Nature* **406**, 357-8.
- Furriols, M., and Bray, S. (2001). A model Notch response element detects Suppressor of Hairless-dependent molecular switch. *Curr Biol* **11**, 60-4.
- Gerhart, J. (1999). 1998 Warkany lecture: signaling pathways in development. *Teratology* **60**, 226-39.
- Gho, M., Bellaiche, Y., and Schweisguth, F. (1999). Revisiting the Drosophila microchaete lineage: a novel intrinsically asymmetric cell division generates a glial cell. *Development* **126**, 3573-84.
- Giagtzoglou, N., Alifragis, P., Koumbanakis, K. A., and Delidakis, C. (2003). Two modes of recruitment of E(spl) repressors onto target genes. *Development* **130**, 259-70.

- Gillooly, D. J., Morrow, I. C., Lindsay, M., Gould, R., Bryant, N. J., Gaullier, J. M., Parton, R. G., and Stenmark, H. (2000). Localization of phosphatidylinositol 3-phosphate in yeast and mammalian cells. *Embo J* **19**, 4577-88.
- Gloor, G. B., Moretti, J., Mouyal, J., and Keeler, K. J. (2000). Distinct P-element excision products in somatic and germline cells of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **155**, 1821-30.
- Go, M. J., Eastman, D. S., and Artavanis-Tsakonas, S. (1998). Cell proliferation control by Notch signaling in *Drosophila* development. *Development* **125**, 2031-40.
- Goldstein, J. L., Brown, M. S., Anderson, R. G., Russell, D. W., and Schneider, W. J. (1985). Receptor-mediated endocytosis: concepts emerging from the LDL receptor system. *Annu Rev Cell Biol* **1**, 1-39.
- Gonzalez, F., Swales, L., Bejsovec, A., Skaer, H., and Martinez Arias, A. (1991). Secretion and movement of wingless protein in the epidermis of the *Drosophila* embryo. *Mech Dev* **35**, 43-54.
- Greco, V., Hannus, M., and Eaton, S. (2001). Argosomes: a potential vehicle for the spread of morphogens through epithelia. *Cell* **106**, 633-45.
- Gruenberg, J., and Stenmark, H. (2004). The biogenesis of multivesicular endosomes. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 317-23.
- Gupta-Rossi, N., Six, E., LeBail, O., Logeat, F., Chastagner, P., Olry, A., Israel, A., and Brou, C. (2004). Monoubiquitination and endocytosis direct gamma-secretase cleavage of activated Notch receptor. *J Cell Biol* **166**, 73-83.
- Hartenstein, A. Y., Rugendorff, A., Tepass, U., and Hartenstein, V. (1992). The function of the neurogenic genes during epithelial development in the *Drosophila* embryo. *Development* **116**, 1203-20.
- Hartmann, D., de Strooper, B., Serneels, L., Craessaerts, K., Herreman, A., Annaert, W., Umans, L., Lubke, T., Lena Illert, A., von Figura, K., and Saftig, P. (2002). The disintegrin/metalloprotease ADAM 10 is essential for Notch signalling but not for alpha-secretase activity in fibroblasts. *Hum Mol Genet* **11**, 2615-24.
- Heitzler, P., Bourouis, M., Ruel, L., Carteret, C., and Simpson, P. (1996). Genes of the Enhancer of split and achaete-scute complexes are required for a regulatory loop between Notch and Delta during lateral signalling in *Drosophila*. *Development* **122**, 161-71.
- Hicke, L. (2001). A new ticket for entry into budding vesicles - ubiquitin. *Cell* **106**, 527-530.
- Ho, S. N., Hunt, H. D., Horton, R. M., Pullen, J. K., and Pease, L. R. (1989). Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* **77**, 51-9.
- Hori, K., Fostier, M., Ito, M., Fuwa, T. J., Go, M. J., Okano, H., Baron, M., and Matsuno, K. (2004). *Drosophila* deltex mediates suppressor of Hairless-independent and late-endosomal activation of Notch signaling. *Development* **131**, 5527-37.
- Horton, R. M., Cai, Z. L., Ho, S. N., and Pease, L. R. (1990). Gene splicing by overlap extension: tailor-made genes using the polymerase chain reaction. *Biotechniques* **8**, 528-35.
- Hurley, J. H., and Emr, S. D. (2006). THE ESCRT COMPLEXES: Structure and Mechanism of a Membrane-Trafficking Network *. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **35**, 277-298.
- Hurley, J. H., and Misra, S. (2000). Signaling and subcellular targeting by membrane-binding domains. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **29**, 49-79.
- Jack, J., and DeLotto, Y. (1995). Structure and regulation of a complex locus: the cut gene of *Drosophila*. *Genetics* **139**, 1689-700.
- Jekely, G., and Rorth, P. (2003). Hrs mediates downregulation of multiple signalling receptors in *Drosophila*. *EMBO Rep* **4**, 1163-8.
- Joutel, A., Monet, M., Domenga, V., Riant, F., and Tournier-Lasserre, E. (2004). Pathogenic mutations associated with cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical

- infarcts and leukoencephalopathy differently affect Jagged1 binding and Notch3 activity via the RBP/JK signaling Pathway. *Am J Hum Genet* **74**, 338-47.
- Kadesch, T. (2004). Notch signaling: the demise of elegant simplicity. *Curr Opin Genet Dev* **14**, 506-12.
- Kao, H. Y., Ordentlich, P., Koyano-Nakagawa, N., Tang, Z., Downes, M., Kintner, C. R., Evans, R. M., and Kadesch, T. (1998). A histone deacetylase corepressor complex regulates the Notch signal transduction pathway. *Genes Dev* **12**, 2269-77.
- Kassis, J. A., Noll, E., VanSickle, E. P., Odenwald, W. F., and Perrimon, N. (1992). Altering the insertional specificity of a Drosophila transposable element. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 1919-23.
- Katzmann, D. J., Stefan, C. J., Babst, M., and Emr, S. D. (2003). Vps27 recruits ESCRT machinery to endosomes during MVB sorting. *J Cell Biol* **162**, 413-23.
- Kawai, J., Shinagawa, A., Shibata, K., Yoshino, M., Itoh, M., Ishii, Y., Arakawa, T., Hara, A., Fukunishi, Y., Konno, H., Adachi, J., Fukuda, S., Aizawa, K., Izawa, M., Nishi, K., Kiyosawa, H., Kondo, S., Yamanaka, I., Saito, T., Okazaki, Y., Gojobori, T., Bono, H., Kasukawa, T., Saito, R., Kadota, K., Matsuda, H., Ashburner, M., Batalov, S., Casavant, T., Fleischmann, W., Gaasterland, T., Gissi, C., King, B., Kochiwa, H., Kuehl, P., Lewis, S., Matsuo, Y., Nikaido, I., Pesole, G., Quackenbush, J., Schriml, L. M., Staubli, F., Suzuki, R., Tomita, M., Wagner, L., Washio, T., Sakai, K., Okido, T., Furuno, M., Aono, H., Baldarelli, R., Barsh, G., Blake, J., Boffelli, D., Bojunga, N., Carninci, P., de Bonaldo, M. F., Brownstein, M. J., Bult, C., Fletcher, C., Fujita, M., Gariboldi, M., Gustincich, S., Hill, D., Hofmann, M., Hume, D. A., Kamiya, M., Lee, N. H., Lyons, P., Marchionni, L., Mashima, J., Mazzarelli, J., Mombaerts, P., Nordone, P., Ring, B., Ringwald, M., Rodriguez, I., Sakamoto, N., Sasaki, H., Sato, K., Schonbach, C., Seya, T., Shibata, Y., Storch, K. F., Suzuki, H., Toyo-oka, K., Wang, K. H., Weitz, C., Whittaker, C., Wilming, L., Wynshaw-Boris, A., Yoshida, K., Hasegawa, Y., Kawaji, H., Kohtsuki, S., and Hayashizaki, Y. (2001). Functional annotation of a full-length mouse cDNA collection. *Nature* **409**, 685-90.
- Kimble, J., and Simpson, P. (1997). The LIN-12/Notch signaling pathway and its regulation. *Annu Rev Cell Dev Biol* **13**, 333-61.
- Klein, T. (2001). Wing disc development in the fly: the early stages. *Curr Opin Genet Dev* **11**, 470-5.
- Klein, T. (2003). The tumour suppressor gene l(2)giant discs is required to restrict the activity of Notch to the dorsoventral boundary during Drosophila wing development. *Dev Biol* **255**, 313-33.
- Klein, T., and Arias, A. M. (1998a). Different spatial and temporal interactions between Notch, wingless, and vestigial specify proximal and distal pattern elements of the wing in Drosophila. *Dev Biol* **194**, 196-212.
- Klein, T., and Arias, A. M. (1998b). Interactions among Delta, Serrate and Fringe modulate Notch activity during Drosophila wing development. *Development* **125**, 2951-62.
- Klein, T., and Arias, A. M. (1999). The vestigial gene product provides a molecular context for the interpretation of signals during the development of the wing in Drosophila. *Development* **126**, 913-25.
- Kusumi, K., Mimoto, M. S., Covello, K. L., Beddington, R. S., Krumlauf, R., and Dunwoodie, S. L. (2004). Dll3 pudgy mutation differentially disrupts dynamic expression of somite genes. *Genesis* **39**, 115-21.
- Ladi, E., Nichols, J. T., Ge, W., Miyamoto, A., Yao, C., Yang, L. T., Boulter, J., Sun, Y. E., Kintner, C., and Weinmaster, G. (2005). The divergent DSL ligand Dll3 does not activate Notch signaling but cell autonomously attenuates signaling induced by other DSL ligands. *J Cell Biol* **170**, 983-92.

- Lai, E. C. (2004). Notch signaling: control of cell communication and cell fate. *Development* **131**, 965-73.
- Lakadamyali, M., Rust, M. J., and Zhuang, X. (2006). Ligands for clathrin-mediated endocytosis are differentially sorted into distinct populations of early endosomes. *Cell* **124**, 997-1009.
- Lawe, D. C., Chawla, A., Merithew, E., Dumas, J., Carrington, W., Fogarty, K., Lifshitz, L., Tuft, R., Lambright, D., and Corvera, S. (2002). Sequential roles for phosphatidylinositol 3-phosphate and Rab5 in tethering and fusion of early endosomes via their interaction with EEA1. *J Biol Chem* **277**, 8611-7.
- Lawrence, N., Klein, T., Brennan, K., and Martinez Arias, A. (2000). Structural requirements for notch signalling with delta and serrate during the development and patterning of the wing disc of *Drosophila*. *Development* **127**, 3185-95.
- Le Borgne, R. (2006). Regulation of Notch signalling by endocytosis and endosomal sorting. *Curr Opin Cell Biol* **18**, 213-22.
- Le Borgne, R., Bardin, A., and Schweisguth, F. (2005a). The roles of receptor and ligand endocytosis in regulating Notch signaling. *Development* **132**, 1751-62.
- Le Borgne, R., Remaud, S., Hamel, S., and Schweisguth, F. (2005b). Two distinct E3 ubiquitin ligases have complementary functions in the regulation of delta and serrate signaling in *Drosophila*. *PLoS Biol* **3**, e96.
- Le Borgne, R., and Schweisguth, F. (2003). Unequal segregation of Neuralized biases Notch activation during asymmetric cell division. *Dev Cell* **5**, 139-48.
- Lebrand, C., Corti, M., Goodson, H., Cosson, P., Cavalli, V., Mayran, N., Faure, J., and Gruenberg, J. (2002). Late endosome motility depends on lipids via the small GTPase Rab7. *Embo J* **21**, 1289-300.
- Lee, T., Winter, C., Marticke, S. S., Lee, A., and Luo, L. (2000). Essential roles of *Drosophila* RhoA in the regulation of neuroblast proliferation and dendritic but not axonal morphogenesis. *Neuron* **25**, 307-16.
- Lei, L., Xu, A., Panin, V. M., and Irvine, K. D. (2003). An O-fucose site in the ligand binding domain inhibits Notch activation. *Development* **130**, 6411-21.
- Lennon, G., Auffray, C., Polymeropoulos, M., and Soares, M. B. (1996). The I.M.A.G.E. Consortium: an integrated molecular analysis of genomes and their expression. *Genomics* **33**, 151-2.
- Li, C., Ullrich, B., Zhang, J. Z., Anderson, R. G., Brose, N., and Sudhof, T. C. (1995). Ca(2+)-dependent and -independent activities of neural and non-neural synaptotagmins. *Nature* **375**, 594-9.
- Li, L., Krantz, I. D., Deng, Y., Genin, A., Banta, A. B., Collins, C. C., Qi, M., Trask, B. J., Kuo, W. L., Cochran, J., Costa, T., Pierpont, M. E., Rand, E. B., Piccoli, D. A., Hood, L., and Spinner, N. B. (1997). Alagille syndrome is caused by mutations in human *Jagged1*, which encodes a ligand for Notch1. *Nat Genet* **16**, 243-51.
- Lieber, T., Kidd, S., and Young, M. W. (2002). kuzbanian-mediated cleavage of *Drosophila* Notch. *Genes Dev* **16**, 209-21.
- Lindsell, C. E., Shawber, C. J., Boulter, J., and Weinmaster, G. (1995). Jagged: a mammalian ligand that activates Notch1. *Cell* **80**, 909-17.
- Lloyd, T. E., Atkinson, R., Wu, M. N., Zhou, Y., Pennetta, G., and Bellen, H. J. (2002). Hrs regulates endosome membrane invagination and tyrosine kinase receptor signaling in *Drosophila*. *Cell* **108**, 261-9.
- Logeat, F., Bessia, C., Brou, C., LeBail, O., Jarriault, S., Seidah, N. G., and Israel, A. (1998). The Notch1 receptor is cleaved constitutively by a furin-like convertase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 8108-12.
- Louvi, A., and Artavanis-Tsakonas, S. (2006). Notch signalling in vertebrate neural development. *Nat Rev Neurosci* **7**, 93-102.

- Lu, H., and Bilder, D. (2005). Endocytic control of epithelial polarity and proliferation in *Drosophila*. *Nat Cell Biol* **7**, 1132-9.
- Lu, Q., Hope, L. W., Brasch, M., Reinhard, C., and Cohen, S. N. (2003). TSG101 interaction with HRS mediates endosomal trafficking and receptor down-regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 7626-31.
- Matsuda, A., Suzuki, Y., Honda, G., Muramatsu, S., Matsuzaki, O., Nagano, Y., Doi, T., Shimotohno, K., Harada, T., Nishida, E., Hayashi, H., and Sugano, S. (2003). Large-scale identification and characterization of human genes that activate NF-kappaB and MAPK signaling pathways. *Oncogene* **22**, 3307-18.
- Matsuno, K., Diederich, R. J., Go, M. J., Blaumueller, C. M., and Artavanis-Tsakonas, S. (1995). Deltex acts as a positive regulator of Notch signaling through interactions with the Notch ankyrin repeats. *Development* **121**, 2633-44.
- Matsuno, K., Ito, M., Hori, K., Miyashita, F., Suzuki, S., Kishi, N., Artavanis-Tsakonas, S., and Okano, H. (2002). Involvement of a proline-rich motif and RING-H2 finger of Deltex in the regulation of Notch signaling. *Development* **129**, 1049-59.
- Maxfield, F. R., and McGraw, T. E. (2004). Endocytic recycling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 121-32.
- Mazaleyrat, S. L., Fostier, M., Wilkin, M. B., Aslam, H., Evans, D. A., Cornell, M., and Baron, M. (2003). Down-regulation of Notch target gene expression by Suppressor of deltex. *Dev Biol* **255**, 363-72.
- McBride, H. M., Rybin, V., Murphy, C., Giner, A., Teasdale, R., and Zerial, M. (1999). Oligomeric complexes link Rab5 effectors with NSF and drive membrane fusion via interactions between EEA1 and syntaxin 13. *Cell* **98**, 377-86.
- Mellman, I. (1996). Endocytosis and molecular sorting. *Annu Rev Cell Dev Biol* **12**, 575-625.
- Micchelli, C. A., Rulifson, E. J., and Blair, S. S. (1997). The function and regulation of cut expression on the wing margin of *Drosophila*: Notch, Wingless and a dominant negative role for Delta and Serrate. *Development* **124**, 1485-95.
- Moberg, K. H., Schelble, S., Burdick, S. K., and Hariharan, I. K. (2005). Mutations in *erupted*, the *Drosophila* ortholog of mammalian tumor susceptibility gene 101, elicit non-cell-autonomous overgrowth. *Dev Cell* **9**, 699-710.
- Mousavi, S. A., Malerod, L., Berg, T., and Kjekens, R. (2004). Clathrin-dependent endocytosis. *Biochem J* **377**, 1-16.
- Mukherjee, A., Veraksa, A., Bauer, A., Rosse, C., Camonis, J., Artavanis-Tsakonas, S. (2005). Regulation of Notch signalling by non-visual beta-arrestin. *Nat Cell Biol* **7**, 1191-1201.
- Mukhopadhyay, A., Barbieri, A. M., Funato, K., Roberts, R., and Stahl, P. D. (1997). Sequential actions of Rab5 and Rab7 regulate endocytosis in the *Xenopus* oocyte. *J Cell Biol* **136**, 1227-37.
- Mumm, J. S., and Kopan, R. (2000). Notch signaling: from the outside in. *Dev Biol* **228**, 151-65.
- Mumm, J. S., Schroeter, E. H., Saxena, M. T., Griesemer, A., Tian, X., Pan, D. J., Ray, W. J., and Kopan, R. (2000). A ligand-induced extracellular cleavage regulates gamma-secretase-like proteolytic activation of Notch1. *Mol Cell* **5**, 197-206.
- Munro, S., and Freeman, M. (2000). The notch signalling regulator fringe acts in the Golgi apparatus and requires the glycosyltransferase signature motif DXD. *Curr Biol* **10**, 813-20.
- Nairz, K., Stocker, H., Schindelholz, B., and Hafen, E. (2002). High-resolution SNP mapping by denaturing HPLC. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 10575-80.
- Nalefski, E. A., and Falke, J. J. (1996). The C2 domain calcium-binding motif: structural and functional diversity. *Protein Sci* **5**, 2375-90.

- Naslavsky, N., Weigert, R., and Donaldson, J. G. (2003). Convergence of non-clathrin- and clathrin-derived endosomes involves Arf6 inactivation and changes in phosphoinositides. *Mol Biol Cell* **14**, 417-31.
- Neumann, C. J., and Cohen, S. M. (1998). Boundary formation in *Drosophila* wing: Notch activity attenuated by the POU protein Nubbin. *Science* **281**, 409-13.
- Oda, T., Elkahloun, A. G., Pike, B. L., Okajima, K., Krantz, I. D., Genin, A., Piccoli, D. A., Meltzer, P. S., Spinner, N. B., Collins, F. S., and Chandrasekharappa, S. C. (1997). Mutations in the human Jagged1 gene are responsible for Alagille syndrome. *Nat Genet* **16**, 235-42.
- Oellers, N., Dehio, M., and Knust, E. (1994). bHLH proteins encoded by the Enhancer of split complex of *Drosophila* negatively interfere with transcriptional activation mediated by proneural genes. *Mol Gen Genet* **244**, 465-73.
- Oh, S. W., Kingsley, T., Shin, H. H., Zheng, Z., Chen, H. W., Chen, X., Wang, H., Ruan, P., Moody, M., and Hou, S. X. (2003). A P-element insertion screen identified mutations in 455 novel essential genes in *Drosophila*. *Genetics* **163**, 195-201.
- Okajima, T., Xu, A., and Irvine, K. D. (2003). Modulation of notch-ligand binding by protein O-fucosyltransferase 1 and fringe. *J Biol Chem* **278**, 42340-5.
- Okazaki, Y., Furuno, M., Kasukawa, T., Adachi, J., Bono, H., Kondo, S., Nikaido, I., Osato, N., Saito, R., Suzuki, H., Yamanaka, I., Kiyosawa, H., Yagi, K., Tomaru, Y., Hasegawa, Y., Nogami, A., Schonbach, C., Gojobori, T., Baldarelli, R., Hill, D. P., Bult, C., Hume, D. A., Quackenbush, J., Schriml, L. M., Kanapin, A., Matsuda, H., Batalov, S., Beisel, K. W., Blake, J. A., Bradt, D., Brusic, V., Chothia, C., Corbani, L. E., Cousins, S., Dalla, E., Dragani, T. A., Fletcher, C. F., Forrest, A., Frazer, K. S., Gaasterland, T., Gariboldi, M., Gissi, C., Godzik, A., Gough, J., Grimmond, S., Gustincich, S., Hirokawa, N., Jackson, I. J., Jarvis, E. D., Kanai, A., Kawaji, H., Kawasaki, Y., Kedzierski, R. M., King, B. L., Konagaya, A., Kurochkin, I. V., Lee, Y., Lenhard, B., Lyons, P. A., Maglott, D. R., Maltais, L., Marchionni, L., McKenzie, L., Miki, H., Nagashima, T., Numata, K., Okido, T., Pavan, W. J., Pertea, G., Pesole, G., Petrovsky, N., Pillai, R., Pontius, J. U., Qi, D., Ramachandran, S., Ravasi, T., Reed, J. C., Reed, D. J., Reid, J., Ring, B. Z., Ringwald, M., Sandelin, A., Schneider, C., Semple, C. A., Setou, M., Shimada, K., Sultana, R., Takenaka, Y., Taylor, M. S., Teasdale, R. D., Tomita, M., Verardo, R., Wagner, L., Wahlestedt, C., Wang, Y., Watanabe, Y., Wells, C., Wilming, L. G., Wynshaw-Boris, A., Yanagisawa, M., et al. (2002). Analysis of the mouse transcriptome based on functional annotation of 60,770 full-length cDNAs. *Nature* **420**, 563-73.
- Ou, X. M., Lemonde, S., Jafar-Nejad, H., Bown, C. D., Goto, A., Rogava, A., and Albert, P. R. (2003). Freud-1: A neuronal calcium-regulated repressor of the 5-HT1A receptor gene. *J Neurosci* **23**, 7415-25.
- Overstreet, E., Fitch, E., and Fischer, J. A. (2004). Fat facets and Liquid facets promote Delta endocytosis and Delta signaling in the signaling cells. *Development* **131**, 5355-66.
- Panin, V. M., Papayannopoulos, V., Wilson, R., and Irvine, K. D. (1997). Fringe modulates Notch-ligand interactions. *Nature* **387**, 908-12.
- Petcherski, A. G., and Kimble, J. (2000). LAG-3 is a putative transcriptional activator in the *C. elegans* Notch pathway. *Nature* **405**, 364-8.
- Petiot, A., Faure, J., Stenmark, H., and Gruenberg, J. (2003). PI3P signaling regulates receptor sorting but not transport in the endosomal pathway. *J Cell Biol* **162**, 971-9.
- Pfister, S., Przemeck, G. K., Gerber, J. K., Beckers, J., Adamski, J., and Hrabe de Angelis, M. (2003). Interaction of the MAGUK family member Acvrin1 and the cytoplasmic domain of the Notch ligand Delta1. *J Mol Biol* **333**, 229-35.

- Ponting, C. P., Mott, R., Bork, P., and Copley, R. R. (2001). Novel protein domains and repeats in *Drosophila melanogaster*: insights into structure, function, and evolution. *Genome Res* **11**, 1996-2008.
- Ponting, C. P., and Parker, P. J. (1996). Extending the C2 domain family: C2s in PKCs δ , ϵ , η , θ , phospholipases, GAPs and perforin. *Protein Sci* **5**, 162-166.
- Poodry, C. A. (1990). shibire, a neurogenic mutant of *Drosophila*. *Dev Biol* **138**, 464-72.
- Pornillos, O., Higginson, D. S., Stray, K. M., Fisher, R. D., Garrus, J. E., Payne, M., He, G. P., Wang, H. E., Morham, S. G., and Sundquist, W. I. (2003). HIV Gag mimics the Tsg101-recruiting activity of the human Hrs protein. *J Cell Biol* **162**, 425-34.
- Poulson, D. (1945). Chromosomal control of embryogenesis in *Drosophila*. *Am. Nat.* **79**, 340-363.
- Raymond, C. K., Howald-Stevenson, I., Vater, C. A., and Stevens, T. H. (1992). Morphological classification of the yeast vacuolar protein sorting mutants: evidence for a prevacuolar compartment in class E vps mutants. *Mol Biol Cell* **3**, 1389-402.
- Rebay, I., Fehon, R. G., and Artavanis-Tsakonas, S. (1993). Specific truncations of *Drosophila* Notch define dominant activated and dominant negative forms of the receptor. *Cell* **74**, 319-29.
- Rink, J., Ghigo, E., Kalaidzidis, Y., and Zerial, M. (2005). Rab conversion as a mechanism of progression from early to late endosomes. *Cell* **122**, 735-49.
- Rizo, J., and Sudhof, T. C. (1998). C2-domains, structure and function of a universal Ca²⁺-binding domain. *J Biol Chem* **273**, 15879-82.
- Robertson, H. M., Preston, C. R., Phillis, R. W., Johnson-Schlitz, D. M., Benz, W. K., and Engels, W. R. (1988). A stable genomic source of P element transposase in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **118**, 461-70.
- Rubin, G. M., and Spradling, A. C. (1982). Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors. *Science* **218**, 348-53.
- Ryerse, J. S., and Nagel, B. A. (1984). Gap junction distribution in the *Drosophila* wing disc mutants vg, l(2)gd, l(3)c43hs1, and l(2)gl4. *Dev Biol* **105**, 396-403.
- Sabharanjak, S., Sharma, P., Parton, R. G., and Mayor, S. (2002). GPI-anchored proteins are delivered to recycling endosomes via a distinct cdc42-regulated, clathrin-independent pinocytic pathway. *Dev Cell* **2**, 411-23.
- Sakamoto, K., Ohara, O., Takagi, M., Takeda, S., and Katsube, K. (2002). Intracellular cell-autonomous association of Notch and its ligands: a novel mechanism of Notch signal modification. *Dev Biol* **241**, 313-26.
- Sakata, T., Sakaguchi, H., Tsuda, L., Higashitani, A., Aigaki, T., Matsuno, K., and Hayashi, S. (2004). *Drosophila* Nedd4 regulates endocytosis of notch and suppresses its ligand-independent activation. *Curr Biol* **14**, 2228-36.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989). "Molecular Cloning. A Laboratory Manual " Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour USA.
- Sandvig, K., and van Deurs, B. (2002). Transport of protein toxins into cells: pathways used by ricin, cholera toxin and Shiga toxin. *FEBS Lett* **529**, 49-53.
- Santaren, J. F., Milan, M., and Garcia-Bellido, A. (1998). Two-dimensional gel analysis of proteins in the *Drosophila* wing imaginal disc mutants fat and lethal (2) giant discs. *Exp Cell Res* **243**, 199-206.
- Seto, E. S., and Bellen, H. J. (2004). The ins and outs of Wingless signaling. *Trends Cell Biol* **14**, 45-53.
- Seto, E. S., Bellen, H. J., and Lloyd, T. E. (2002). When cell biology meets development: endocytic regulation of signaling pathways. *Genes Dev* **16**, 1314-36.
- Seugnet, L., Simpson, P., and Haenlin, M. (1997). Requirement for dynamin during Notch signaling in *Drosophila* neurogenesis. *Dev Biol* **192**, 585-98.

- Shawber, C., Boulter, J., Lindsell, C. E., and Weinmaster, G. (1996). Jagged2: a serrate-like gene expressed during rat embryogenesis. *Dev Biol* **180**, 370-6.
- Simonsen, A., Lippe, R., Christoforidis, S., Gaullier, J. M., Brech, A., Callaghan, J., Toh, B. H., Murphy, C., Zerial, M., and Stenmark, H. (1998). EEA1 links PI(3)K function to Rab5 regulation of endosome fusion. *Nature* **391**, 494-498.
- Song, W., Nadeau, P., Yuan, M., Yang, X., Shen, J., and Yankner, B. A. (1999). Proteolytic release and nuclear translocation of Notch-1 are induced by presenilin-1 and impaired by pathogenic presenilin-1 mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 6959-63.
- Speicher, S. A., Thomas, U., Hinz, U. and Knust, E. (1994). The Serrate locus of *Drosophila* and its role in morphogenesis of the wing imaginal discs: control of cell proliferation. *Development* **120**, 535-544.
- Staveley, B. E., Heslip, T. R., Hodgetts, R. B., and Bell, J. B. (1995). Protected P-element termini suggest a role for inverted-repeat-binding protein in transposase-induced gap repair in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **139**, 1321-9.
- Stenmark, H., and Olkkonen, V. M. (2001). The Rab GTPase family. *Genome Biol* **2**, REVIEWS3007.
- Stenmark, H., Parton, R. G., Steele-Mortimer, O., Lutcke, A., Gruenberg, J., and Zerial, M. (1994). Inhibition of rab5 GTPase activity stimulates membrane fusion in endocytosis. *Embo J* **13**, 1287-96.
- Strigini, M., and Cohen, S. M. (1999). Formation of morphogen gradients in the *Drosophila* wing. *Semin Cell Dev Biol* **10**, 335-44.
- Struhl, G., and Adachi, A. (1998). Nuclear access and action of notch in vivo. *Cell* **93**, 649-60.
- Struhl, G., and Adachi, A. (2000). Requirements for presenilin-dependent cleavage of notch and other transmembrane proteins. *Mol Cell* **6**, 625-36.
- Struhl, G., and Greenwald, I. (1999). Presenilin is required for activity and nuclear access of Notch in *Drosophila*. *Nature* **398**, 522-5.
- Sutton, R. B., Davletov, B. A., Berghuis, A. M., Sudhof, T. C., and Sprang, S. R. (1995). Structure of the first C2 domain of synaptotagmin I: a novel Ca²⁺/phospholipid-binding fold. *Cell* **80**, 929-38.
- Takasu-Ishikawa, E., Yoshihara, M., and Hotta, Y. (1992). Extra sequences found at P element excision sites in *Drosophila melanogaster*. *Mol Gen Genet* **232**, 17-23.
- Tanimoto, H., Itoh, S., ten Dijke, P., and Tabata, T. (2000). Hedgehog creates a gradient of DPP activity in *Drosophila* wing imaginal discs. *Mol Cell* **5**, 59-71.
- Tautz, D., and Pfeifle, C. (1989). A non-radioactive in situ hybridization method for the localization of specific RNAs in *Drosophila* embryos reveals translational control of the segmentation gene hunchback. *Chromosoma* **98**, 81-5.
- Tax, F. E., Yeagers, J. J., and Thomas, J. H. (1994). Sequence of *C. elegans* lag-2 reveals a cell-signalling domain shared with Delta and Serrate of *Drosophila*. *Nature* **368**, 150-4.
- Thomas, U., Speicher, S. A., and Knust, E. (1991). The *Drosophila* gene Serrate encodes an EGF-like transmembrane protein with a complex expression pattern in embryos and wing discs. *Development* **111**, 749-61.
- Thompson, B. J., Mathieu, J., Sung, H. H., Loeser, E., Rorth, P., and Cohen, S. M. (2005). Tumor suppressor properties of the ESCRT-II complex component Vps25 in *Drosophila*. *Dev Cell* **9**, 711-20.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., and Higgins, D. G. (1997). The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* **25**, 4876-82.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., and Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting,

- position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**, 4673-80.
- Tournier-Lasserre, E., Joutel, A., Melki, J., Weissenbach, J., Lathrop, M., Chabriat, H., Mas, J.-L., Cabanis, E.-A., Baudrimont, M., Maciazek, J., Bach, M.-A. & Bousser, M.-G. (1993). Cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy maps to chromosome 19q12. *Nat Genet* **3**, 256-259.
- True, J. R., Mercer, J. M., and Laurie, C. C. (1996). Differences in crossover frequency and distribution among three sibling species of *Drosophila*. *Genetics* **142**, 507-23.
- Vaccari, T., and Bilder, D. (2005). The *Drosophila* tumor suppressor *vps25* prevents nonautonomous overproliferation by regulating notch trafficking. *Dev Cell* **9**, 687-98.
- Vecchi, M., Polo, S., Poupon, V., van de Loo, J. W., Benmerah, A., and Di Fiore, P. P. (2001). Nucleocytoplasmic shuttling of endocytic proteins. *J Cell Biol* **153**, 1511-7.
- Villa, N., Walker, L., Lindsell, C. E., Gasson, J., Iruela-Arispe, M. L., and Weinmaster, G. (2001). Vascular expression of Notch pathway receptors and ligands is restricted to arterial vessels. *Mech Dev* **108**, 161-4.
- Vonderheit, A., and Helenius, A. (2005). Rab7 associates with early endosomes to mediate sorting and transport of Semliki forest virus to late endosomes. *PLoS Biol* **3**, e233.
- Wang, W., and Struhl, G. (2004). *Drosophila* Epsin mediates a select endocytic pathway that DSL ligands must enter to activate Notch. *Development* **131**, 5367-80.
- Wang, W., and Struhl, G. (2005). Distinct roles for Mind bomb, Neuralized and Epsin in mediating DSL endocytosis and signaling in *Drosophila*. *Development* **132**, 2883-94.
- Wehrli, M., Dougan, S. T., Caldwell, K., O'Keefe, L., Schwartz, S., Vaizel-Ohayon, D., Schejter, E., Tomlinson, A., and DiNardo, S. (2000). *arrow* encodes an LDL-receptor-related protein essential for Wingless signalling. *Nature* **407**, 527-30.
- Weinmaster, G. (1997). The ins and outs of notch signaling. *Mol Cell Neurosci* **9**, 91-102.
- Weng, A. P., Ferrando, A. A., Lee, W., Morris, J. P. t., Silverman, L. B., Sanchez-Irizarry, C., Blacklow, S. C., Look, A. T., and Aster, J. C. (2004). Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. *Science* **306**, 269-71.
- Wilder, E. L., and Perrimon, N. (1995). Dual functions of wingless in the *Drosophila* leg imaginal disc. *Development* **121**, 477-88.
- Wilkin, M. B., and Baron, M. (2005). Endocytic regulation of Notch activation and down-regulation (review). *Mol Membr Biol* **22**, 279-89.
- Wilkin, M. B., Carbery, A. M., Fostier, M., Aslam, H., Mazaleyrat, S. L., Higgs, J., Myat, A., Evans, D. A., Cornell, M., and Baron, M. (2004). Regulation of notch endosomal sorting and signaling by *Drosophila* Nedd4 family proteins. *Curr Biol* **14**, 2237-44.
- Wodarz, A., Hinz, U., Engelbert, M., and Knust, E. (1995). Expression of crumbs confers apical character on plasma membrane domains of ectodermal epithelia of *Drosophila*. *Cell* **82**, 67-76.
- Wright, G. J., Leslie, J. D., Ariza-McNaughton, L., and Lewis, J. (2004). Delta proteins and MAGI proteins: an interaction of Notch ligands with intracellular scaffolding molecules and its significance for zebrafish development. *Development* **131**, 5659-69.
- Wright, T. R. (1970). The genetics of embryogenesis in *Drosophila*. *Adv Genet* **15**, 261-395.
- Wu, L., Sun, T., Kobayashi, K., Gao, P., and Griffin, J. D. (2002). Identification of a family of mastermind-like transcriptional coactivators for mammalian notch receptors. *Mol Cell Biol* **22**, 7688-700.
- Wucherpennig, T., Wilsch-Brauninger, M., and Gonzalez-Gaitan, M. (2003). Role of *Drosophila* Rab5 during endosomal trafficking at the synapse and evoked neurotransmitter release. *J Cell Biol* **161**, 609-24.
- Yamashiro, D. J., and Maxfield, F. R. (1987). Acidification of morphologically distinct endosomes in mutant and wild-type Chinese hamster ovary cells. *J Cell Biol* **105**, 2723-33.

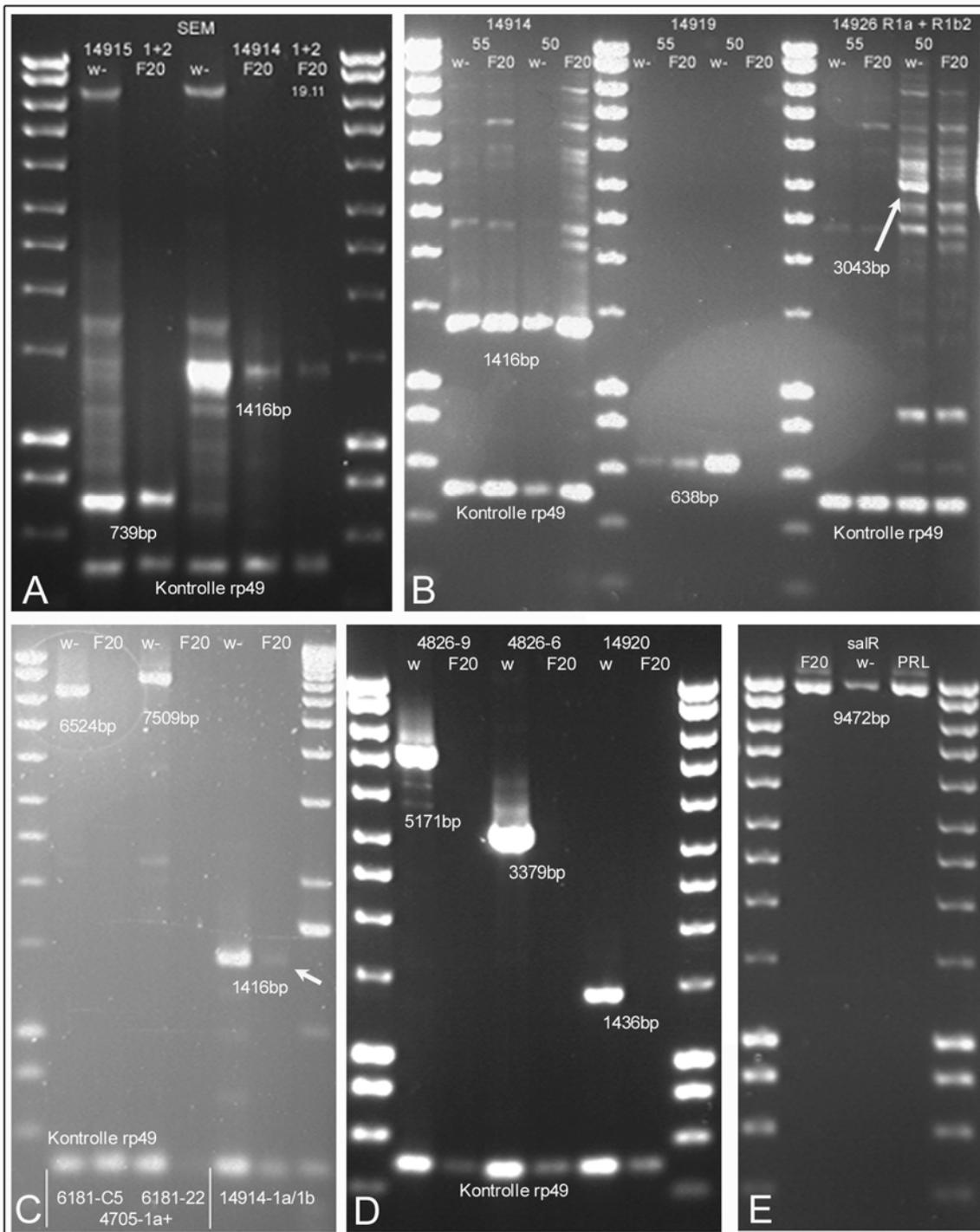
- Ye, Y., Lukinova, N., and Fortini, M. E. (1999). Neurogenic phenotypes and altered Notch processing in *Drosophila* Presenilin mutants. *Nature* **398**, 525-9.
- Zerial, M., and McBride, H. (2001). Rab proteins as membrane organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 107-17.
- Zhai, R. G., Hiesinger, P. R., Koh, T. W., Verstreken, P., Schulze, K. L., Cao, Y., Jafar-Nejad, H., Norga, K. K., Pan, H., Bayat, V., Greenbaum, M. P., and Bellen, H. J. (2003). Mapping *Drosophila* mutations with molecularly defined P element insertions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 10860-5.
- Zhang, N., Norton, C. R., and Gridley, T. (2002). Segmentation defects of Notch pathway mutants and absence of a synergistic phenotype in lunatic fringe/radical fringe double mutant mice. *Genesis* **33**, 21-8.

7. Anhang

1. Kartierung der Defizienz *Df(2L)FCK-20* (Barrio et al., 1999). Das 3'-Ende der Defizienz wurde in der Arbeit von (Barrio et al., 1999) in die Nähe des Genlokus von *spalt-related* kartiert. Entsprechend diesen Angaben konnte mit dem salR-Primerpaar ein Produkt sowohl auf wildtypischer DNA (w- in **E** der unterstehenden Abb.1) wie auf genomischer DNA aus der Defizienz *Df(2L)FCK-20* gewonnen werden (F20 in **E**). Ebenso entsprechend den Angaben konnten keine Produkte mit den Primerpaaren 4826-6 und 4826-9 auf genomischer DNA der *Df(2L)FCK-20*-Defizienz (**D**), und mit dem Primerpaar 14926R1a gewonnen werden da diese Region innerhalb der Defizienz liegt (**B**). Für das 5'-Ende der Defizienz ergab sich die Region nach dem Genlokus von CG14919, da dies die letzte Region war, für die ein PCR-Produkt erzeugt werden konnte (**B**). Für die genomische Region ab dem Genlokus von CG14920 an konnten keine PCR-Produkte mehr amplifiziert werden (**C,D**).

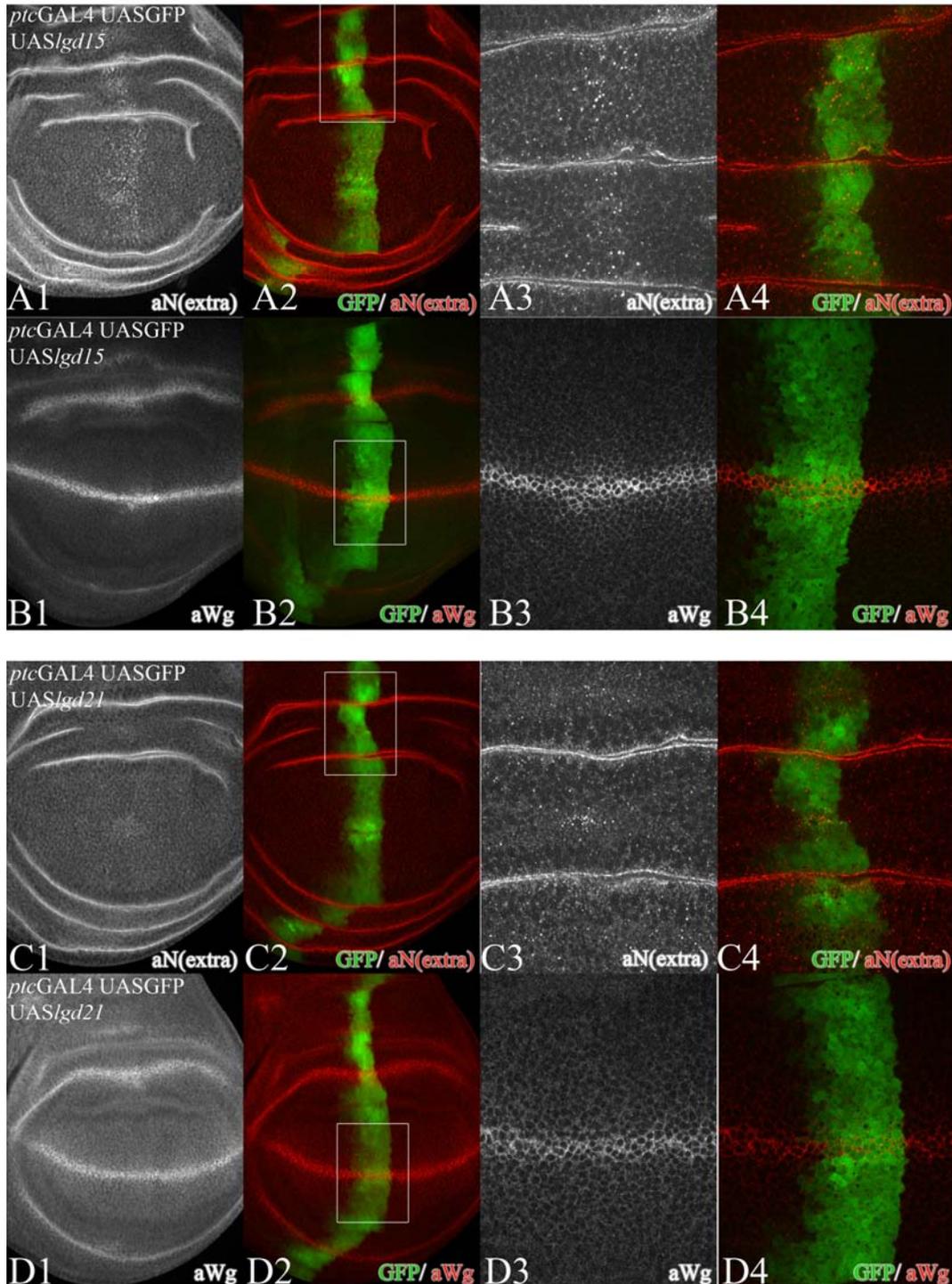
Lineare Anordnung der Genloci von 32D bis 32F:

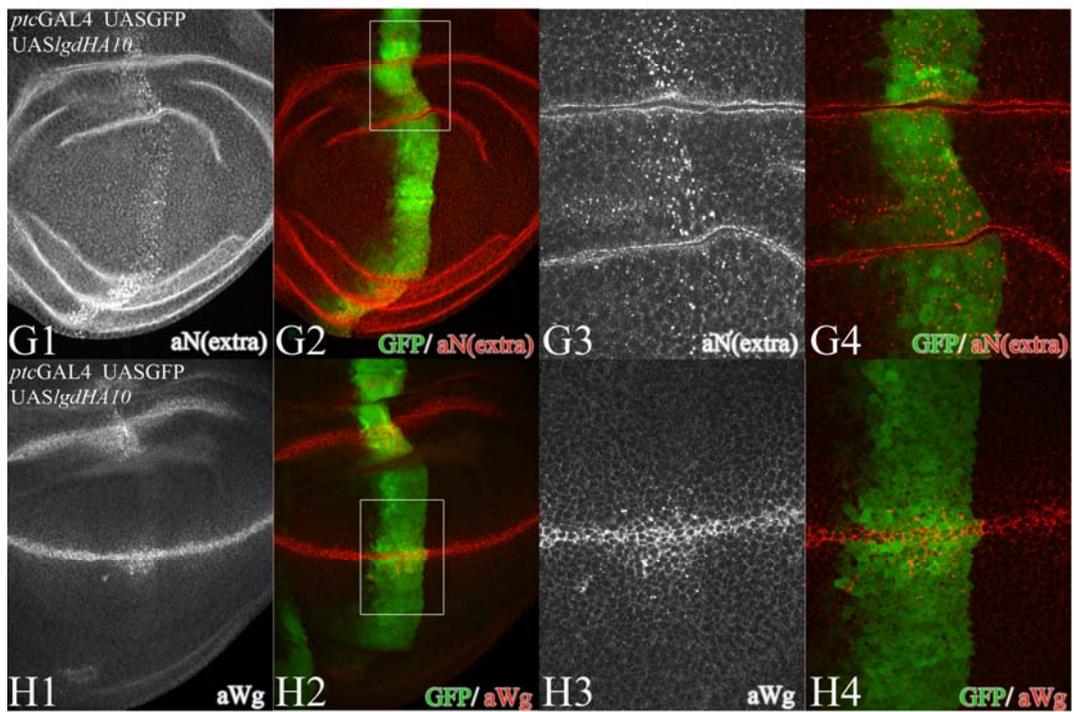
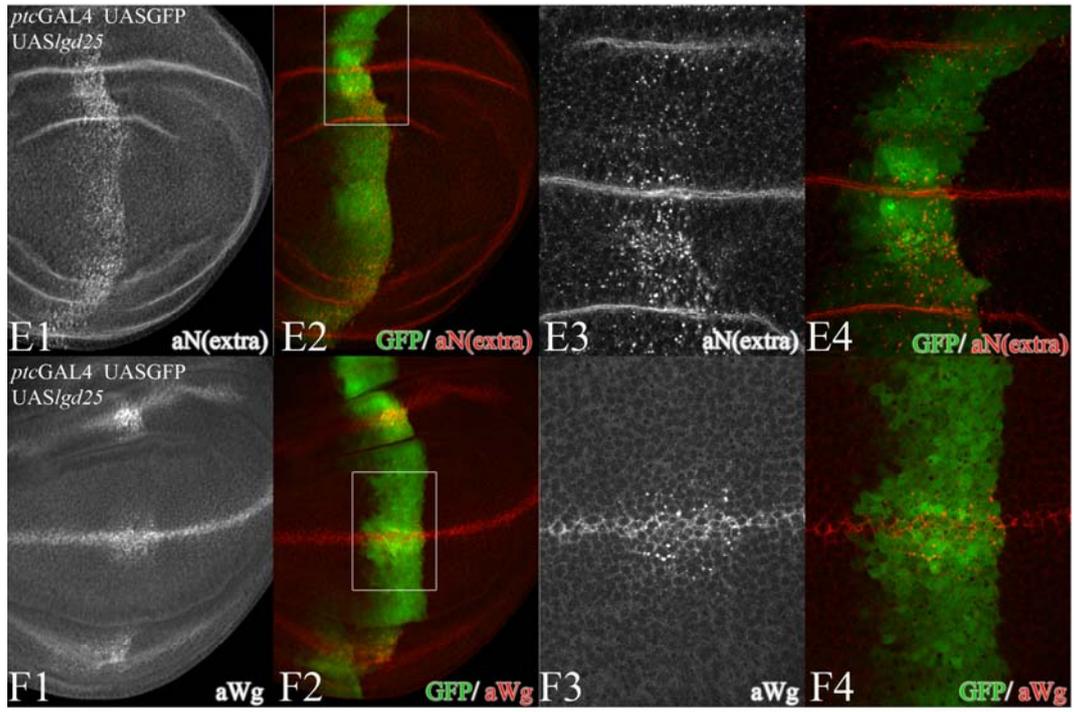
CG14914–CG14915–CG14919–CG149120- -CG4705-CG6181-----CG14926-*spaltR*-*spalt*
(siehe auch Abb.2.1, die allerdings nur die Region 32D-E umfaßt, CG14919 ist dort als Ast-C gekennzeichnet)

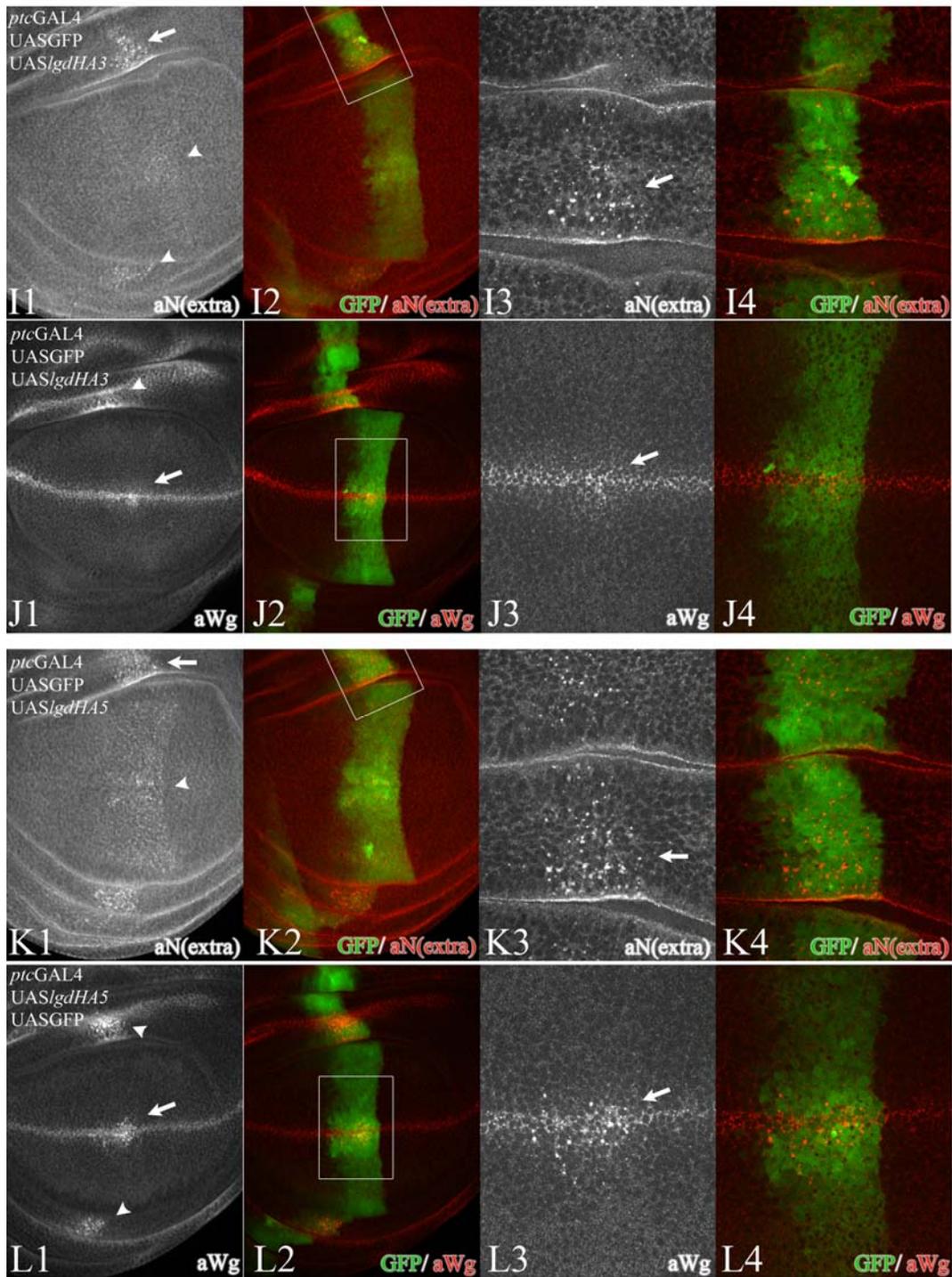


Anhang1.: Kartierung von FCK20 – siehe vorangehenden Text und Material und Methoden-Teil für Details. Pfeil in C zeigt auf ein vorhandenes, wenn auch nur schwaches Produkt, welches allerdings, da alle Reaktionen mehrfach durchgeführt wurden, hier auch in A generiert werden konnte.

2.: Vergleich der Expressionseffekte unterschiedlicher *UASlgd* und *UASlgdHA*-Linien mittels der *ptcGAL4*-Treiberlinie in der Flügelimaginalscheibe. Betrachtet wurde die Menge von Notch oder Wg-enthaltender Vesikel in der Expressionsdomäne der jeweiligen Konstrukte. Die Expression der Konstrukte in den Linien *UASlgd25* (Reihen **E, F**), *-lgdHA5* (Reihen **K, L**), *-lgdHA10* (Reihen **G, H**) führte zur stärksten Ausbildung beiderlei Vesikeltypen in der *ptc*-Expressionsdomäne. Schwächere Effekte waren bei der Expression der Konstrukte in den Linien *UASlgd21* (Reihen **C, D**) und *UASlgdHA3* zu beobachten (Reihen **I, J**).







8. Zusammenfassung

Der Notch-Signalweg wird zur direkten Kommunikation benachbarter Zellen als eine Art binärer Schalter eingesetzt, über dessen Aktivität eine Vielzahl unterschiedlicher Prozesse in der Entwicklung und Homöostase von Tieren und Menschen beeinflusst wird. Der Ausfall von Kernkomponenten des Notch-Signalweges während der Entwicklung ist in den meisten Fällen letal, eine Überaktivierung während des Lebenszyklus ist im Menschen unter anderem mit der Entstehung von Leukämie und Darmkrebs in Zusammenhang gebracht worden.

Zwei Mechanismen, die zur Regulation der Aktivität des Notch-Signalweges in *Drosophila melanogaster* eingesetzt werden, sind innerhalb dieser Arbeit untersucht worden. Dies war zum einen das Gen *lethal (2) discs (lgd)*, welches in vorangegangenen Experimenten als notwendig für die Regulation der Notch-Aktivität während der Flügelentwicklung gezeigt, und im Rahmen dieser Arbeit kloniert und molekularbiologisch charakterisiert wurde. Lgd, das in allen Metazoen vorkommt, gehört zu einer neuen Proteinfamilie und weist eine vierfache Wiederholung der neuartigen DM14-Domäne und eine C2-Domäne am C-Terminus auf. Die C2-Domäne konnte als verantwortlich für die subzelluläre Lokalisation von Lgd gezeigt werden, während die Funktion der DM14-Domäne unklar bleibt. Eine Deletionsanalyse legte aber nahe, daß sie möglicherweise eine unterstützende Funktion hat. Lgd ist zytoplasmatisch lokalisiert und in dem endosomalen Transport von Notch und weiteren Proteinen involviert. Bei einem Ausfall der *lgd*-Funktion wie bei einer Lgd-Überexpression kommt es zur Entstehung großer Endosomen, die den Notch-Rezeptor und andere Proteine enthalten und von einer ektopischen Aktivierung des Notch-Signalweges begleitet sind. Expression von murinen Lgd-Orthologen konnte die mutante Situation in der Flügelimaginalscheibe retten, was nahelegt, daß Lgd möglicherweise auch in den Vertebraten bei der Regulation der Notch-Aktivität eine Rolle spielen könnte.

Das zweite Projekt setzte sich mit der ligandenabhängigen *cis*-Inhibierung des Notch-Rezeptors auseinander. Hohe Konzentrationen von Liganden des Notch-Rezeptors verhindern die Aktivierung des Rezeptors auf der gleichen Zelle. Weder der dieser Inhibition zugrunde liegende Mechanismus, noch die dafür verantwortlichen Proteindomänen der Liganden konnten bisher identifiziert werden. Als ein Ansatz, die verantwortlichen Proteindomänen zu identifizieren, wurden Orthologe der Notch-Liganden aus den Vertebraten in die Fliege eingeführt, um zu überprüfen, ob mit der zahlenmäßigen auch möglicherweise eine funktionelle Diversifizierung der Liganden gegenüber dem Rezeptor einhergeht. Bei Expression in Flügelimaginalscheiben wurde die Interaktion der eingeführten Liganden anhand der Expression des Notch-Zielgenes *wingless* überprüft. Die Expression zweier der Liganden aus den Vertebraten, Delta-like-1 und -4 (DLL1 bzw. -4) aktivierte dabei die *wg*-Expression, zeigte jedoch keinen *cis*-inhibierenden Effekt auf, wie bei einer vergleichbaren Expression von Delta (Dl). Es wurden anschließend Hybridkonstrukte hergestellt, in denen zur ersten Eingrenzung der für die *cis*-Inhibition durch Dl verantwortlichen Domäne die extra- und intrazellulären Bereiche von DLL1 und DLL4 mit denen von Dl ausgetauscht wurden. Bei nachfolgender Expression der Hybride zeigte es sich, daß möglicherweise beide Domänen von Dl, sowohl die intra-, als auch die extrazelluläre, wenn auch in unterschiedlichen Maße, an der Vermittlung des *cis*-inhibitorischen Effektes beteiligt sind.

9. Summary

The Notch signalling pathway is used as a binary switch in direct cell-cell communication, regulating different processes during the development and homeostasis of humans and higher eukaryotes. Loss of core components of the Notch signalling pathway during development is mostly lethal whereas hyperactivation of the Notch signalling pathway in later phases has been found to cause special forms of leukemia or colon cancer in humans. This thesis investigates various aspects of two mechanisms used for the regulation of the Notch signalling pathway activity in *Drosophila melanogaster*.

The first part of this work describes the cloning and molecular characterization of the gene *lethal (2) giant discs*, which has been shown previously to be necessary for the regulation of Notch activity during the wing development in *Drosophila*. Lgd is a member of a new family of proteins, found in all metazoa. The Lgd protein shows four repeats of a novel DM14 domain followed by a C2 domain at the C-terminus. In this work the C2 domain has been shown to be responsible for the subcellular localization. The role of the DM14 domains remains unresolved, but the analysis of deletion constructs suggests an auxiliary function. Lgd is localized throughout the cytoplasm and is involved in the endosomal trafficking of Notch and other proteins. Loss of *lgd* function as well as Lgd overexpression causes the accumulation of large endosomes including the Notch receptor and other proteins, and leads to an ectopic activation of the Notch signalling pathway. Expression of the murine Lgd orthologs rescues loss of *lgd* function in the wing imaginal disc, suggesting a strong functional conservation and possibly an involvement of Lgd in the regulation of the Notch signalling pathway in mammals also.

The second part of this work was on the ligand-dependent *cis*-inhibition of the Notch receptor. High concentrations of the ligands of the Notch receptor prevent the activation of the receptor in a cell-autonomous manner. Neither the mechanism underlying this inactivation, nor the protein domains responsible for this could be identified so far. In order to identify the responsible protein domains, vertebrate orthologs of the *Drosophila* Notch ligands were introduced into the fly to check whether the increased number of ligands in the vertebrates was also accompanied by a diversification of their function. The effects of the expression of the ligand orthologs and possible interactions with the endogenous Notch receptor were investigated by monitoring the expression of a target gene of the Notch activity, *wg* in the wing imaginal discs. Expression of two of the vertebrate ligands, Delta-like-1 and Delta-like-4 (DLL1 and DLL4) activated *Wg* expression in the experiments, though without the co-occurrence of the *cis*-inhibitory effect which can be observed during a comparable overexpression of Delta (Dl). To narrow down the Dl protein region responsible for the *cis*-inhibitory effect protein hybrids were constructed, exchanging the extra- and intracellular parts of DLL1 and DLL4 with their counterparts from Dl. The expression of the hybrid proteins showed a possible involvement of both, the extra- and the intracellular domain of Dl, in performing the *cis*-inhibitory effect, whereby the extracellular domain seemed to have a stronger impact on this.

10. Abkürzungsverzeichnis

aa	amino acid/-s = Aminosäure/-n
Abb.	Abbildung
ATP	Adenosintriphosphat
β-Gal	β-Galaktosidase
bp	Basenpaar/-e
BSA	bovines Serumalbumin
cDNA	kodierende DNA
CIP	Alkalische Phosphatase aus dem Kälberdarm
Δ	Deletion
DI	Delta
DLL	Delta-like
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleotidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
Dx	Deltex
E _x	Extinktion bei der Wellenlänge x nm
EEA1	<u>early endosome antigen 1</u>
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor
EGFR	Rezeptor des Obigen
EGTA	Bisaminoethoxyethantetraessigsäure
EtOH	Ethanol
ESCRT	<u>endosomal sorting complex required for transport</u>
g	Gramm
h	vor Gennamen – human/menschlich
h	Stunden
Hrs	<u>hepatocyte-growth-factor-regulated tyrosine kinase substrate</u>
Jag	Jagged
k	kilo
kb	Kilobasenpaare
Kan	Kanamycin
Kuz	Kuzbanian
l	Liter
LB	Luria-Bertani-Medium
Lgd	Lethal (2) giant discs
m	vor Gennamen – murin/maus
m	mili
M	Mol pro Liter
MARCM	mosaic analysis with a repressible cell marker
MeOH	Methanol
min	Minuten
mol	molar
mRNA	boten RNA
MVBs	multi vesicular bodies
μ	mikro
n	nano
NGS	normales Zigenserum
p	pico
PCR	Polymerasekettenreaktion
Psn	Presenilin

RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
sek	Sekunden
Ser	Serrate
Shi	Shibire
SOE	splice over extension
Su(dx)	Suppressor of Deltex
Su(H)	Suppressor of Hairless
Tris	Tris(hydroxamethyl)aminomethan
U	Enzym-Einheiten
UV	Ultraviolettes Licht
üN	über Nacht
Vg	Vestigial
Wg	Wingless

11. Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Genetik der Universität zu Köln im Labor von Herrn Priv.-Doz. Dr. Thomas Klein durchgeführt.

Insbesondere möchte ich mich bei Herr Priv.-Doz. Dr. Thomas Klein für die Überlassung des Themas, seine stete Unterstützung, seine Bereitschaft zu kritischen Diskussion aber vor allen Dingen auch für seine ansteckende Begeisterung für die Wissenschaft danken, die mir immer wieder neue Motivation und Freude an der Forschung schenkte.

Herrn Prof. Dr. Siegfried Roth danke ich für die Übernahme der Begutachtung der Arbeit und Herrn Prof. Martin Hülskamp für die Übernahme des Vorsitzes bei der Disputation.

Besonders herzlich möchte ich mich auch bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppen Klein, Leptin und Sprenger bedanken, für die angenehme Arbeitsatmosphäre, die wissenschaftlichen, wie privaten Gespräche und die Bereitschaft zur Hilfe, wo immer sie nötig war. Hier gilt mein Dank für die erste Zeit noch dem Meister – Robert Wilson, der vielleicht nicht immer vernehmlich, aber dafür dann umso fundierter alle meine Fragen beantworten konnte. Danken möchte ich auch Stefan, Evelin und Hannelore für technische Assistenz, dabei insbesondere Hannelore auch für das Umsorgen meiner Fliegen und die Blauhelmeinsätze, sowie Erika und Siegrid für die Arbeit in der Futterküche, ohne die wir alle ziemlich verloren wären.

Die internationale Mischung im Labor war ebenfalls etwas, wofür ich mich vielleicht nicht bedanken kann, was ich aber sehr zu schätzen lernte, weil es mir neben der Möglichkeit mein Englisch auf- und auszubauen auch einen Blick auf die Vielfalt aller möglichen Welten bot, in denen wir alle leben.

Ausnehmend danken möchte ich auch Cornelia, für das unermüdliche Korrekturlesen und für die herrlichen Gespräche über Phylogenese, Strände, so manches andere und vor allem auch für das „dass“ im schönsten Signalrot.

Zuletzt, wenngleich auf keinen Fall in der Bedeutungsreihenfolge, möchte ich meinen Eltern danken, deren Unterstützung und Liebe mich stets in meinem Leben begleitet haben und diese Arbeit damit erst möglich machten.

12. Erklärung

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

Die Bestimmungen der Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Herrn Priv.-Doz. Dr. Thomas Klein betreut worden.

Teilpublikationen:

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht unter dem Titel:

„The *Drosophila* Notch Inhibitor and Tumour Suppressor Gene *lethal (2) giant discs* Encodes a Conserved Regulator of Endosomal Trafficking”

Jaekel, R., Klein, T.

in *Developmental Cell*, **2006** Nov; 11(5): 655-669

Ich versichere, daß ich alle Angaben wahrheitsgemäß nach besten Wissen und Gewissen gemacht habe und verpflichte mich, jedmögliche, die obigen Angaben betreffenden Veränderungen, dem Dekanat unverzüglich mitzuteilen.

13. Lebenslauf

Name: Robert Jaekel
Geburtsdatum/-ort: 20.10.1972 in Poznań, Polen
Eltern: Gerhard Jaekel und
Maria Jaekel, geb. Frącek
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Schulbildung und Wehrdienst:

1979-1987	Grundschule Nr.84 in Poznań
1987	Gymnasium Nr.8 in Poznań
Ende 1987	Übersiedlung nach Deutschland
01/1988-06/1993	Antoniuskolleg in Neunkirchen Abschluß mit allgemeiner Hochschulreife
07/1993-06/1994	Wehrdienst an der Stammdienststelle des Heeres in Köln
10/1994-05/1999	Studium der Biologie an der Universität zu Köln
05/1999	Erlangung des Diploms. Prüfungsfächer: Genetik, Biochemie, Pharmakologie
	Diplomarbeit unter der Betreuung von Herrn Prof. Dr. Klaus Rajewsky am Institut für Genetik der Universität zu Köln und in der Artemis-Pharmaceuticals GmbH- Köln. Titel der Diplomarbeit: „Vergleichende Untersuchung verschiedener Systeme zur Regulation der Rekombinase Cre“
Seit 06/2000	Anfertigung der vorliegenden Dissertation am Institut für Genetik der Universität zu Köln unter der Betreuung von Herrn Priv.-Doz. Dr. Thomas Klein mit dem Titel: „Regulation des Notch-Signalweges durch Lethal (2) giant discs (Lgd) und durch die Notch-Liganden