

**Identifizierung eines Interaktionspartners von
Lethal (2) giant discs (Lgd) in *Drosophila melanogaster*
und konditionale Inaktivierung der *Igd*-Orthologen
in der Maus**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Sandra Jäckel

aus Gummersbach

Köln 2010

Berichtersteller: Prof. Dr. Jens Brüning
Prof. Dr. Thomas Klein

Tag der mündlichen Prüfung: 15.06.2010

„In der Wissenschaft gleichen wir alle nur den Kindern, die am Rande des Wissens hie und da einen Kiesel aufheben, während sich der weite Ozean des Unbekannten vor unseren Augen erstreckt.“
Isaac Newton

Für Andreas

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
1. Einleitung	1
1.1 Die Endozytose und der endosomale Transportweg	1
1.2 Funktionen der ESCRT-Komplexe im endosomalen Transportweg	5
1.2.1 Bedeutung der ESCRT-Proteine während der Entwicklung	11
1.2.2 ESCRT und Krankheiten	12
1.3 Der Notch-Signalweg	18
1.3.1 Bedeutung der Endozytose für die Regulation der Notch-Aktivität	24
1.4 Das Gen <i>lethal (2) giant discs (lgd)</i>	25
1.4.1 Funktionen der Lgd-Orthologen in Säugetieren	32
1.5 Ziele der Arbeit	35
2. Ergebnisse	36
2.1 Projekt 1: Identifizierung von Interaktionspartnern des Proteins Lgd	36
(Lethal (2) giant discs) in <i>Drosophila melanogaster</i>	36
2.1.1 Lgd interagiert nicht mit dem Notch-Rezeptor	36
2.1.2 Mögliche Interaktionspartner sind ESCRT-Proteine	37
2.1.3 Lgd interagiert mit dem ESCRTIII-Protein Shrub	46
2.1.4 Für die Lgd-Shrub-Interaktion werden die DM14-Domänen benötigt	48
2.1.5 Ermittlung der für die Lgd-Interaktion benötigten Domänen im Shrub-Protein	49
2.1.6 Genetische Interaktion von <i>lgd</i> und <i>shrub</i>	56
2.2 Projekt 2: Knockout der Gene <i>mlgd1</i> und <i>mlgd2</i> in der Maus	59
2.2.1 Expression von <i>mlgd1</i> und <i>mlgd2</i> in der Maus	59
2.2.2 Spezifitätstest eines mLgd2-Antikörpers	60
2.2.3 Herstellung eines Antikörpers für mLgd1	64
2.2.4 Allgemeine Gensatzstrategie für den konditionalen Knockout von <i>mlgd1</i> und <i>mlgd2</i>	68
2.2.5 Details der Gensatzstrategie für <i>mlgd1</i>	70
2.2.6 Details der Gensatzstrategie für <i>mlgd2</i>	72
2.2.7 Transfektion der ES-Zellen mit dem Gensatzvektor für <i>mlgd1</i> oder <i>mlgd2</i>	74

2.2.8 Nachweis der Funktionalität der verwendeten Gensatzvektoren mittels Cre-vermittelter Rekombination in ES-Zellen	79
2.2.9 Injektion von ES-Zellen in Blastozysten und Verpaarung der chimären Mäuse	81
2.2.10 Generierung von <i>mlgd2^{flox/flox}</i> -Mäusen	82
2.2.11 Generierung von <i>mlgd2^{-/-}</i> -Mäusen	83
2.2.12 Bestätigung des <i>mlgd2</i> -Knockouts durch Western-Blot-Analyse	85
3. Diskussion	87
3.1 Lgd interagiert mit der ESCRT-III-Komponente Shrub und vermutlich mit weiteren ESCRT-Proteinen	88
3.1.1 Biochemischer Nachweis der Lgd-Shrub-Interaktion	88
3.1.1.1 Für die Bindung an Shrub sind die DM14-Domänen essentiell	89
3.1.1.2 Herstellung von Shrub-Deletionskonstrukten zur Analyse der für die Interaktion benötigten Domänen im Shrub-Protein	90
3.1.1.3 Probleme beim Nachweis einer direkten Interaktion von Lgd und Shrub	90
3.1.2 Bestätigung der Lgd-Shrub-Interaktion auf genetischer Ebene	91
3.1.3 Mögliche Bedeutung der Lgd-Shrub-Interaktion für Vertebraten	92
3.1.4 Auch andere ESCRT-Proteine könnten Interaktionspartner von Lgd sein	93
3.2 Funktionsanalyse der Shrub-Deletionskonstrukte	94
3.3 Konditionale Inaktivierung von <i>mlgd1</i> und <i>mlgd2</i> in der Maus	97
3.4 Vollständige Inaktivierung von <i>mlgd2</i> führt zu einem perinatalen Tod	98
3.4.1 Mögliche Ursachen für den perinatalen Tod der <i>mlgd2</i> -Knockout-Mäuse	98
3.4.2 Ausblick	102
4. Material und Methoden	103
4.1 Materialien	103
4.1.1 Chemikalien	103
4.1.2 Geräte und Zubehör	104
4.1.3 Molekularbiologische Kits	104
4.1.4 Größenstandards	105
4.1.5 Enzyme	105

4.1.6 Antikörper	106
4.1.7 Plasmide und BACs	107
4.1.8 Bakterien und Zelllinien	107
4.2 Methoden zur Arbeit mit DNA und RNA	108
4.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	108
4.2.2 Konstruktion der Genersatzvektoren	112
4.2.3 DNA-Gelelektrophorese und Gelextraktion	113
4.2.4 DNA- bzw. RNA-Konzentrationsbestimmung	113
4.2.5 Ligation	114
4.2.6 Transformation	114
4.2.7 Präparation von Plasmid-DNA	114
4.2.8 Sequenzierung	115
4.2.9 Southern Blot	117
4.2.10 Radioaktivmarkierung der Sonden	118
4.2.11 Strippen eines Southern Blots	118
4.2.12 RNA-Isolierung aus ES-Zellen oder murinen Organen	119
4.2.13 Reverse Transkription	119
4.3 Proteinbiochemie	120
4.3.1 Proteinextraktion aus Drosophila-Larven	120
4.3.2 Koimmunopräzipitation aus Drosophila-Larvenlysaten	121
4.3.3 Proteinextraktion aus murinem Gewebe	122
4.3.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Western-Blot- Analyse	124
4.3.5 Strippen eines Western-Blots	123
4.3.6 Kolloidal-Coomassie-Färbung	124
4.3.7 Analyse von Proteinbanden mittels Peptidmassen-Fingerabdruck	124
4.3.8 Expression und Aufreinigung des GST-mLgd1(1-253)-Peptids	125
4.4 Zellkulturtechniken	127
4.4.1 Auftauen von Zellen	127
4.4.2 Einfrieren von Zellen	127
4.4.3 Passage von Zellen	127
4.4.4 Kultivierung embryonaler Fibroblasten	128
4.4.5 Behandlung von embryonalen Fibroblasten mit Mitomycin C (MMC)	128

4.4.6 Kultivierung embryonaler Stammzellen	129
4.4.7 Transfektion von ES-Zellen mittels Elektroporation	129
4.4.8 Selektion von ES-Zellklonen	130
4.4.9 Isolation von ES-Zellklonen	131
4.4.10 Einfrieren und Passagieren der isolierten ES-Zellklone	131
4.4.11 HTNC-Behandlung von ES-Zellen	132
4.4.12 DNA-Isolation aus ES-Zellen	132
4.4.13 Protein-Extraktion aus ES-Zellen	133
4.5 Fliegen	134
4.5.1 Anzucht und Haltung von <i>Drosophila melanogaster</i>	134
4.5.2 Verwendete Fliegenstämme	134
4.5.3 Präparation und Antikörperfärbung von Flügelimaginalscheiben	135
4.5.4 Herstellung transgener Fliegenlinien	136
4.6 Mäuse	137
4.6.1 Tierhaltung und verwendete Mausstämme	137
4.6.2 Genotypisierung von Mäusen mittels Schwanzspitzenbiopsie	138
Zusammenfassung.....	139
Summary.....	140
Literaturverzeichnis.....	141
Abbildungsverzeichnis.....	151
Tabellenverzeichnis.....	154
Abkürzungsverzeichnis.....	155
Erklärung.....	156
Lebenslauf.....	157
Danksagung.....	158

1. Einleitung

1.1 Die Endozytose und der endosomale Transportweg

Die Internalisierung extrazellulären Materials ist für Zellen lebenswichtig, um Nährstoffe aufzunehmen, in Kontakt mit ihrer Umgebung zu bleiben und so ihre Aufgaben innerhalb des Organismus zu erfüllen. Die verschiedenen dazu ablaufenden Prozesse werden unter dem Oberbegriff der Endozytose zusammengefasst, worunter man die Aufnahme eines Teils der Plasmamembran durch Abschnürung von Vesikeln ins Zytoplasma der Zelle versteht. Je nachdem was dabei in die Zelle aufgenommen wird, unterscheidet man zwischen Pinozytose (Aufnahme von Flüssigkeiten), Phagozytose (Aufnahme von Makromolekülen, Zelltrümmern bis hin zu ganzen Zellen) und Rezeptor-vermittelter Endozytose [Übersicht in Soldati and Schliwa, 2006]. Während die Phagozytose meist von darauf spezialisierten Zellen (wie z.B. Makrophagen) in einer diskontinuierlichen Weise durchgeführt wird, erfolgt in nahezu allen Zelltypen eine kontinuierliche Pinozytose. Die Rezeptor-vermittelte Endozytose stellt eigentlich nur eine besondere Form der Pinozytose dar, bei der bestimmte Moleküle (z.B. Hormone, Wachstumsfaktoren, Lipoproteine, Antikörper) an spezifische Rezeptoren der Plasmamembran binden, dann in einer bestimmten Region konzentriert und schließlich gemeinsam in die Zelle aufgenommen werden.

Durch diese Konzentration der Rezeptoren mit ihren gebundenen Molekülen können auch Substanzen, die im Extrazellulärraum in niedrigen Konzentrationen vorliegen, ohne zusätzliche Aufnahme von extrazellulärer Flüssigkeit in die Zelle gelangen. In Bezug auf die Endozytose der Rezeptoren lassen sich die drei verschiedenen Mechanismen der Calveolae-vermittelten Endozytose, der Clathrin-abhängigen und der Clathrin- und Calveolae- unabhängigen Endozytose unterscheiden, von denen die Clathrin-abhängige Endozytose bisher am besten untersucht ist [Übersicht in Doherty and McMahon, 2009].

Eine wichtige Aufgabe der Rezeptor-vermittelten Endozytose ist die Regulation von Signalwegen, die auf unterschiedlichen Wegen erfolgen kann [Übersicht in Fiore and Camilli, 2001; Seto et al., 2002; Sorkin and Zastrow, 2009]. Die offensichtlichste Möglichkeit einer Regulation besteht in der Kontrolle der Rezeptoren- und

Ligandenanzahl in der Plasmamembran, wodurch bereits die Aktivierung des Signalwegs verhindert werden kann. Des weiteren kann aber auch die Verteilung anderer Komponenten des Signalwegs die Aktivierung, Dauer und die Weitergabe des Signals beeinflussen. So müssen z.B. G-Protein-gekoppelte Rezeptoren und die für ihre Aktivierung benötigten G-Proteine in derselben Membran lokalisiert sein. Zur Inaktivierung von Rezeptoren kann der endozytierte Rezeptor entweder zum Lysosom transportiert und dort abgebaut werden oder es kommt im frühen Endosom aufgrund des dort vorliegenden erniedrigten pH-Werts zu einer Dissoziation von Ligand und Rezeptor [Übersicht in Mellman, 1992], so dass dieser für eine erneute Aktivierung durch einen Ligand zurück an die Plasmamembran gebracht werden kann.

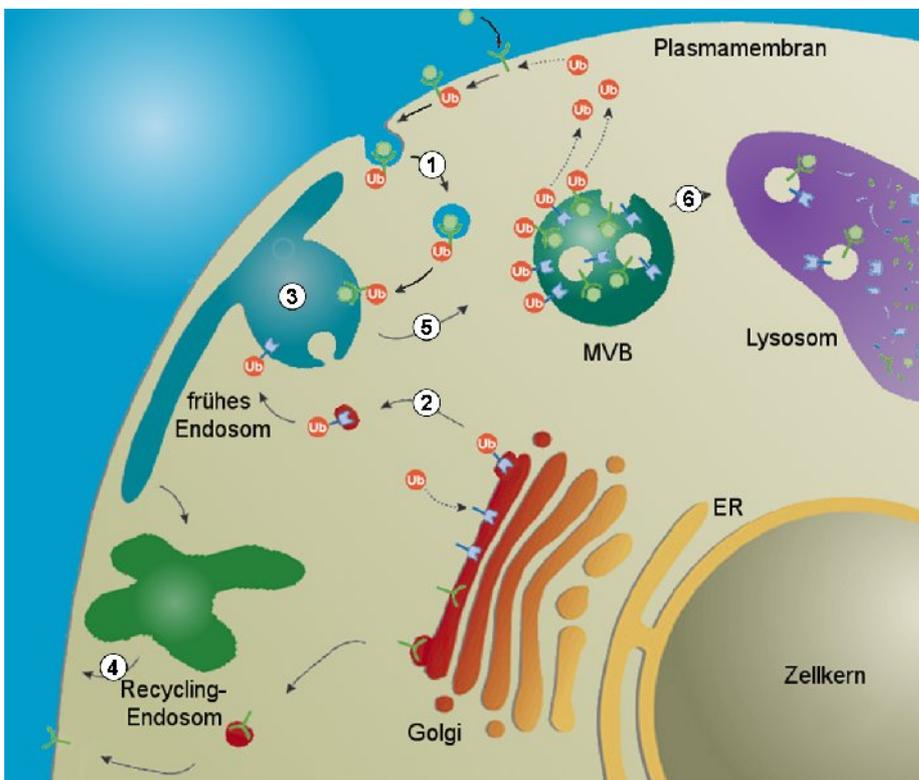


Abbildung 1.1: Protein-Transport im endosomalen System

Für den Transport zum Lysosom werden Transmembranproteine (meist Rezeptoren) der Plasmamembran (1) (endozytotischer Weg) oder des Golgi-Apparats (2) (biosynthetischer Weg) ubiquitiniert (Ub) und in Vesikel abgeschnürt, die anschließend mit dem frühen Endosomen fusionieren (3). Einige der so aufgenommenen Rezeptoren werden über Recycling-Endosomen wieder an die Plasmamembran zurückgebracht (4). Durch die Reifung eines Membranabschnitts des frühen Endosoms zum MVB (*multivesicular body*) werden Transmembranproteine aber auch in intraluminale Vesikel verpackt (5), damit sowohl ihr extra- als auch ihr intrazellulärer Teil nach der Fusion des MVB mit dem Lysosom abgebaut werden können oder - im Falle der lysosomal lokalisierten Proteine - ihren Wirkungsort erreichen (6).

(Abbildung modifiziert nach [Nickerson et al., 2007] und [Babst, 2004])

Die Bedeutung der Endozytose für die negative Regulation von verschiedenen Signalwegen (EGF, Notch, Decapentaplegic, Hedgehog, Wingless; [Übersicht in Zastrow and Sorkin, 2007]) wurde in den letzten Jahren immer deutlicher, da Defekte in diesem Prozess mit verschiedenen Krankheiten, besonders Krebs, assoziiert werden konnten [Übersicht in Lanzetti and Fiore, 2008]. Daher soll der Weg des Rezeptors von der Plasmamembran bis zum Lysosom nun genauer betrachtet werden (siehe Abb. 1.1).

Im klassischen endosomalen Transportweg werden Proteine der Plasmamembran, darunter auch Rezeptoren, in Clathrin-umhüllte Vesikel verpackt und mithilfe der GTPase Dynamin von der Plasmamembran abgetrennt (Schritt 1 in Abb. 1.1) [Übersicht in Borgne et al., 2005 b; Mousavi et al., 2004]. Nach der Fusion mit frühen, sortierenden Endosomen (Schritt 3 in Abb. 1.1) werden sie entweder über sogenannte Wiederverwertungs-(Recycling-)Endosomen zur Plasmamembran zurückgebracht (Schritt 4 in Abb. 1.1) oder für den Abbau durch Lysosomen an späte Endosomen weitergeleitet (Schritt 5 in Abb. 1.1) [Übersicht in Trowbridge et al., 1993; Mellman, 1996]. Für die Endozytose und die Sortierung in den degradierenden Weg scheint eine Monoubiquitinierung als Signal zu dienen [Übersicht in Hicke, 2001; Haglund et al., 2003]. Der Abbau von Transmembranproteinen stellt allerdings in soweit ein Problem dar, dass sowohl der extra- als auch der intrazelluläre Teil degradiert werden muss. Während der extrazelluläre Teil des Proteins in das Vesikellumen - das dem Extrazellularraum entspricht - gerichtet ist, ist der für die Signalweiterleitung zuständige intrazelluläre Teil des Rezeptors weiterhin dem Zytoplasma zugewandt. Dort kann er auch nach der endozytotischen Aufnahme aktiv sein. Für die Beendigung dieser Aktivität muss daher auch der intrazelluläre Teil der Rezeptoren in das Lumen des Vesikels gebracht werden, um in den Lysosomen abgebaut werden zu können. Dazu schnüren sich Vesikel von der endosomalen Membran ins Innere des Endosoms ab, wodurch sogenannte MVBs (*multivesicular bodies*) - auch multivesikuläre/späte Endosomen genannt – entstehen (siehe MVB in Abb. 1.1) [Odorizzi et al., 1998; Lemmon and Traub, 2000]. Fusioniert nun die äußere Membran eines solchen MVBs mit der eines Lysosoms, werden die intraluminalen Vesikel des MVBs, die den kompletten Rezeptor enthalten ins Innere des Lysosoms entlassen und können dort von den vorhandenen Enzymen abgebaut werden (Schritt

6 in Abb. 1.1). Neben dieser Beteiligung beim Abbau und Recycling von Proteinen der Plasmamembran ist der endosomale Transportweg auch am biosynthetischem Transport vom Golgi zum Lysosom (für lysosomal-lokalisierte Proteine) beteiligt (Schritt 2, 3, 5 und 6 in Abb. 1.1) [Rothman and Orci, 1992].

Die frühen und späten Endosomen sowie die Wiederverwertungs (Recycling)-Endosomen lassen sich anhand ihres pH-Werts, assoziierter Proteine und ihrer Form voneinander unterscheiden. Dies ist in der folgenden Tabelle zusammenfassend dargestellt.

Kompartiment	pH-Wert ¹⁾	assoziierte Proteine ²⁾	Morphologie ³⁾
frühes Endosom	6,3 – 5,5	EEA1, Rab5	tubulo-vesikulär
spätes Endosom, MVB	5,5 – 5,0	Rab7, LBPA, LAMP1 M6PR	kugelförmig, mit intraluminalen Vesikeln
Recycling-Endosomen	>6,4	Rab4, Rab11	tubulär
Lysosomen	5,0 - 4,6	LAMP1, ohne M6PR	tubulär mit internalen Vesikeln

Tabelle 1.1: Charakteristische Eigenschaften der verschiedenen endosomalen Kompartimente

Die Tabelle gibt eine Übersicht über den pH-Wert, die assoziierten Proteine und die Morphologie die für die angegebenen endosomalen Kompartimente charakteristisch sind. **1)** Übersicht in Mellman et al., 1986; Mellman, 1992 und Ijzendoorn, 2006 **2)** Rab-Proteine (Übersicht in Rodman and Wandinger-Ness, 2000); LBPA (*lysobisphosphatidic acid*) = Matsuo et al., 2004; LAMP1 (lysosome-associated membrane protein 1) = Falcon-Perez et al., 2005; M6PR (Mannose-6-Phosphat-Rezeptor) = Kornfeld and Mellman, 1989; EEA1 (*early endosome antigen-1*) = Mu et al., 1995 **3)** Übersicht in Gruenberg, 2001

Wie aus der Tabelle 1.1. ersichtlich, sind die Rab (*Ras genes from rat brain*)-Proteine, die zu den kleinen Ras-artigen GTPasen zählen, mit verschiedenen Kompartimenten assoziiert, wodurch sie sich besonders gut als Marker für diese Kompartimente verwenden lassen [Übersicht in Rodman and Wandinger-Ness, 2000]. Diese Proteine vermitteln über die Rekrutierung von Effektorproteinen die Abschnürung, den Transport entlang des Zytoskeletts und die Fusion von Vesikeln [Übersicht in Stenmark, 2009].

Bei der Bedeutung der assoziierten Proteine für die Klassifizierung eines Kompartiments muss aber beachtet werden, dass eine Reifung bestimmter

Membranabschnitte des frühen Endosoms zu den MVBs stattfindet, die dann mit dem Lysosom fusionieren [Stoorvogel et al., 1991; Dunn and Maxfield, 1992; Luzio et al., 2000]. Beim Übergang vom frühen zum späten Endosom kommt es daher zum Beispiel zu einem Austausch von Rab5 gegen Rab7, wodurch auch Endosomen entstehen, die mit beiden Proteinen assoziiert sind [Rink et al., 2005]. Die ansteigende Ansäuerung der Endosomen vom frühen Endosom zum Lysosom erfolgt durch V-ATPasen und ist für die optimale Aktivität der lysosomalen Enzyme notwendig [Lafourcade et al., 2008].

1.2 Funktionen der ESCRT-Komplexe im endosomalen Transportweg

Bei dem beschriebenen endosomalen Transportweg ist die Bildung der MVBs ein entscheidender Prozess, da nur dadurch der komplette Abbau der Transmembranproteine gewährleistet werden kann. Für diesen Prozess sind die sogenannten VpsE [class E VPS (vacuolar protein sorting)]-Proteine essentiell, die zunächst in Hefe-Mutanten gefunden wurden, deren lysosomaler/vakuoler Transport beeinträchtigt war. In den Mutanten kam es zur Akkumulation von Hydrolasen und endozytierten Rezeptoren in abnormalen vergrößerten Endosomen, die die Bezeichnung Klasse E-Kompartimente erhielten [Raymond et al., 1992]. Biochemische und strukturelle Untersuchungen konnten dann zeigen, dass diese VpsE-Proteine vier multimere Proteinkomplexe, die sogenannten ESCRT (endosomal sorting complexes required for transport)-Komplexe 0, I, II und III bilden und eine wichtige Rolle bei der Bildung der intraluminalen Vesikel haben [Übersicht in Williams and Urbé, 2007].

In der folgenden kurzen Erläuterung dieser verschiedenen Komplexe beim endosomalen Transport vom frühen Endosom bis zum MVB werden die Bezeichnungen für die einzelnen ESCRT-Komponenten für *Drosophila melanogaster* verwendet (siehe Abb. 1.2.). Für die abweichenden Bezeichnungen in anderen Organismen siehe Tabelle 1.2.

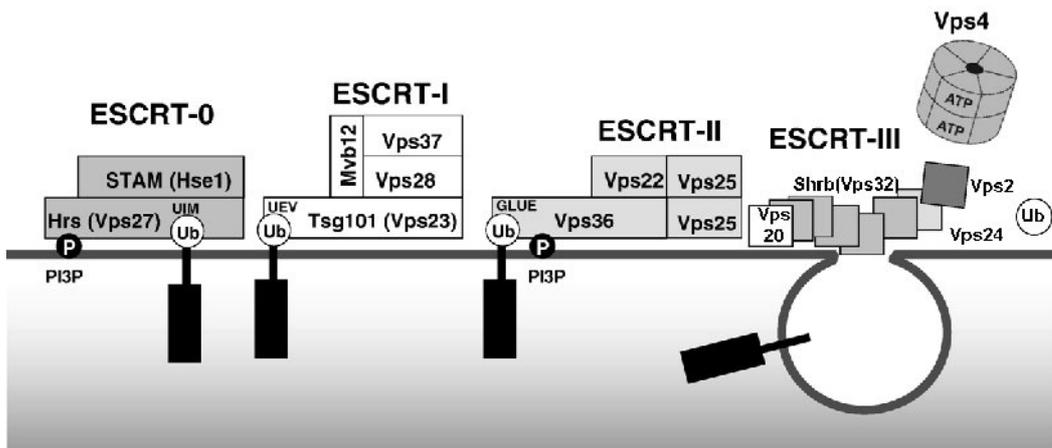


Abbildung 1.2: Funktion der ESCRT-Komplexe bei der Sortierung ubiquitiniertes Membranproteine in intraluminale Vesikel

Die ESCRT-Komplexe 0, I und II binden über bestimmte Motive an die ubiquitinierten Proteine (schwarze Rechtecke), um sie in die intraluminale Vesikel zu sortieren. Die Ubiquitin-Markierung (Ub) wird vor der Internalisation in intraluminale Vesikel von deubiquitierenden Enzymen, die der ESCRT-III-Komplex rekrutiert, entfernt. Vermutlich über polymere Filamente, die von der ESCRT-III-Komponente Shrb/Vps32 gebildet werden, vermittelt der ESCRT-III-Komplex die Abschnürung des intraluminale Vesikels. Durch Rekrutierung der ATPase Vps4 über den ESCRT-III-Komplex wird der gesamte Komplex deassembliert und die einzelnen Komponenten ins Zytoplasma entlassen, wo sie dann für einen neuen Zyklus zur Verfügung stehen. PI3P=Phosphatidylinositol-3-Phosphat (modifiziert nach Stuffers et al., 2009)

Der ESCRT-0-Komplex vollzieht den ersten Schritt in diesem Transportweg, der in der Erkennung und Bindung der für den Abbau bestimmten monoubiquitinierten Proteine besteht (siehe Abb. 1.2). Er besteht aus den Proteinen Hrs (*hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate*) und Stam1 (*signal-transducing adaptor molecule-1*), die beide miteinander interagieren und die beide an monoubiquitinierte Proteine über ein ubiquitin-bindendes Motiv (UIM, *ubiquitin interacting motif*) sowie an Clathrin binden können [Raiborg et al., 2001; Hirano et al., 2006; McCullough et al., 2006]. Die Interaktion von Hrs und Clathrin dient wahrscheinlich der Konzentrierung ubiquitiniertes Transmembranproteine in Mikrodomänen früher Endosomen, die durch Einstülpung die intraluminale Vesikel bilden. Weiterhin könnte diese Konzentrierung in Clathrin-ummantelten Mikrodomänen die Wiederverwertung (Recycling) der Proteine verhindern [Raiborg et al., 2002]. Hrs besitzt darüber hinaus noch eine FYVE (Fab1, YGL023, Vps27, EEA1)-Domäne, die das frühe Endosomen-spezifische Phospholipid PI(3)P (Phosphatidylinositol-3-Phosphat) erkennt und so die Bindung an die endosomale Membran ermöglicht [Komada and Soriano, 1999; Burd and Emr, 1998; Gillyooly et al.,

2000]. Durch die Bindung von Hrs an Tsg101 wird der ESCRT-I-Komplex an die Membran rekrutiert.

Der ESCRT-I-Komplex ist neben Tsg101 (Erupted) aus den Proteinen Vps28, Vps37 und Mvb12 aufgebaut, die in einer 1:1:1:1 Stöchiometrie vorliegen (siehe Abb. 1.2; [Gill et al., 2007]). Neben Hrs bindet Tsg101 über eine UEV (*ubiquitin E2 variant*)-Domäne auch an Ubiquitin und kann vermutlich so die zu transportierenden Proteine vom ESCRT-0-Komplex übernehmen. Durch die Bindung von Vps28 an Vps36 erfolgt die Rekrutierung des ESCRT-II-Komplexes.

Der ESCRT-II-Komplex besteht aus den drei Proteinen Vps22, Vps25 und Vps36 in einem 1:2:1 Verhältnis (siehe Abb. 1.2; [Teo et al., 2004; Hierro et al., 2004]). Vps36 bindet neben Vps28 (ESCRT-I) auch Ubiquitin und PI(3)P über eine GLUE (*GRAM-like ubiquitin-binding in EAP45*)-Domäne [Slagsvold et al., 2005]. Die Verbindung ESCRT-III-Komplex wird über die Interaktion von Vps25 mit Vps20 vermittelt.

Der ESCRT-III-Komplex ist ein multimerer Komplex aus den vier Untereinheiten Untereinheiten Vps20, Vps32, Vps24 und Vps2, die als Monomere im Zytoplasma vorliegen und erst an der Membran aus den einzelnen monomeren Untereinheiten in einer bisher nicht bekannten Stöchiometrie zusammengesetzt, wobei allerdings vermutet wird, dass Vps32 die Hauptkomponente darstellt (siehe Abb. 1.2; [Babst et al., 2002; Saksena et al., 2009]). Die Interaktion der ESCRT-II-Komponente Vps25 mit Vps20 scheint dabei den Prozess der Komplexbildung zu initiieren [Saksena et al., 2009]. Im Gegensatz dazu liegen die ESCRT-Komplexe 0, I und II bereits im Zytosol als stabile, hetero-oligomere Komplexe vor [Katzmann et al., 2001; Babst et al., 2002].

Die Ursache für die monomere Form der ESCRT-III-Proteine im Zytoplasma liegt in ihrem molekularem Aufbau der für alle ESCRT-III-Proteine gleich zu sein scheint und maßgeblich durch die Analyse der Kristallstruktur des humanen VPS24-Proteins aufgeklärt wurde (siehe Abb. 1.3; [Muziol et al., 2006]).

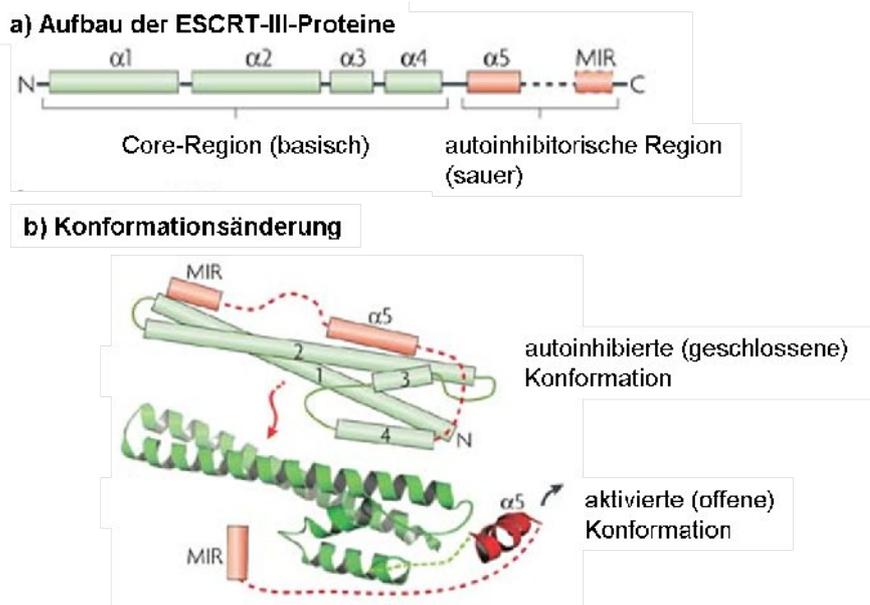


Abbildung 1.3: Aufbau und Konformationsänderung der ESCRT-III-Proteine

a) Der schematische Aufbau der ESCRT-III-Proteine zeigt die basische Core-Region (grün), die aus vier Helices besteht, die ein asymmetrisches, antiparalleles Helix-Bündel bilden (in der Kristallstruktur von Vps24 in b) zu sehen). Über diese Helices wird die Interaktion mit anderen ESCRT-III-Proteinen vermittelt. Die saure, autoinhibitorische Domäne (rot) beinhaltet auch die MIR-Domäne, die für die Bindung der ATPase Vps4 verantwortlich ist.

b) Der obere Teil der Abbildung zeigt schematisch, die autoinhibierte Konformation, in der die ESCRT-III-Proteine als Monomere im Zytoplasma vorliegen. Hierbei blockiert die autoinhibitorische Region die Bindungsoberfläche für andere ESCRT-Proteine (durch den roten Pfeil gekennzeichnet), weshalb diese Konformation auch als „geschlossene“ bezeichnet wird. Durch die Rekrutierung an die Membran wird eine Konformationsänderung ausgelöst, bei der die autoinhibitorische Domäne die Bindungsoberfläche freigibt (daher „offene“ Konformation), wodurch andere ESCRT-III-Proteine binden können. (modifiziert nach Williams and Urbé, 2007)

Sie bestehen alle aus ca. 200-250 Aminosäuren und besitzen ein basisches N-terminales und ein saures C-terminales Ende (siehe Abb. 1.3a). Die N-terminale Region beinhaltet ein asymmetrisches, antiparalleles Bündel aus vier Helices und bildet die sogenannte Core-Region, die für die Hetero- und Homooligomerisierung benötigt wird. Die autoinhibitorische C-terminale Hälfte besteht aus einer weiteren fünften Helix sowie einer MIR (*MIT-interacting-region*) Region. Die MIR-Region ist für die Interaktion mit der N-terminalen MIT (*microtubule-interacting and transport*)-Domäne der ATPase Vps4 verantwortlich, deren Funktion später erläutert wird [Scott et al., 2005].

Befinden sich die ESCRT-III-Proteine im Zytoplasma werden die Bindungsstellen der Core-Region durch das C-terminale Ende blockiert, wodurch die Proteine in einer monomeren, „geschlossenen“ Konformation vorliegen (siehe Abb. 1.3b). Nach

Rekrutierung an die Membran erfolgt eine Konformationsänderung zur „offenen“ Form, wobei die Bindungsstellen frei werden und so eine Interaktion mit den anderen Untereinheiten erfolgen kann [Lin et al., 2005; Zamborlini et al., 2006].

Im Gegensatz zu ESCRT-0, I und II bindet keines der ESCRT-III-Proteine an Ubiquitin, so dass kein direkter Kontakt zu den transportierten Proteinen vorliegt (siehe Abb. 1.2). Allerdings sorgen sie für die Rekrutierung der ATPase Vps4 und ALIX (*ALG-2 interacting protein X*)/Bro1 [Odorizzi et al., 2003]. Bro1 bindet wiederum an Doa4 [Luhtala and Odorizzi, 2004], welches für die Deubiquitinierung der Transmembranproteine vor ihrer Internalisierung in die intraluminalen Vesikel sorgt. Vps4 oligomerisiert zu einem Komplex aus 10-12 Untereinheiten und wird dadurch zu einer funktionsfähigen ATPase, die unter Verwendung von ATP die Dissoziation des ESCRT-III-Komplexes bewirkt, wodurch die einzelnen Komponenten wieder als Monomere ins Zytoplasma entlassen werden und so für einen neuen Zyklus bereitstehen [Babst et al., 1998]. Hierbei scheint das Protein Did2 wichtig zu sein, welches über seinen C-Terminus Vps4 und über seinen N-Terminus Vps2 und Vps24 bindet [Nickerson et al., 2006].

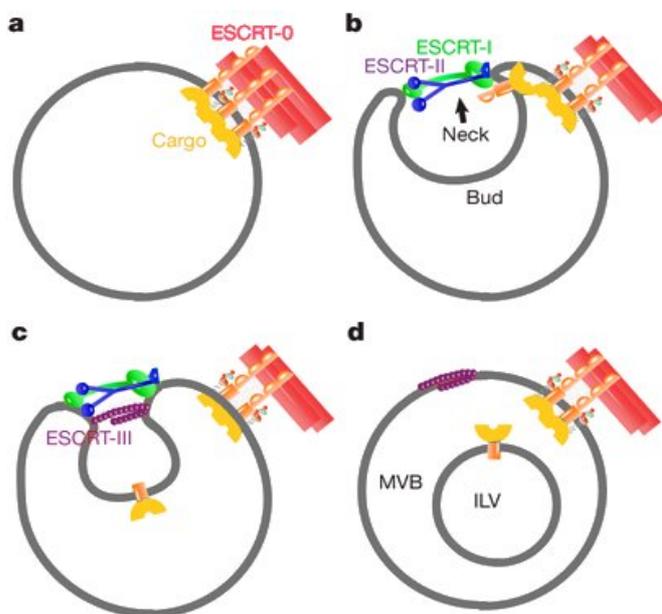


Abbildung 1.4: Aktuelles Modell zur Funktion der ESCRTs bei der Bildung intraluminaler Vesikel

a) ESCRT-0 bindet und konzentriert die abzubauenen, ubiquitinierten Transmembranproteine ; b) ESCRT-I und -II induzieren die Membrandeformation und sorgen für eine Sortierung der Proteine in die entstehenden Einstülpungen; c) ESCRT-II rekrutiert Vps20 (ESCRT-III-protein) zu der entstandene Membranverengung, welches wiederum Vps32 rekrutiert. Vps32 bildet Filamente und ist zusammen mit Vps24 und Vps2 von zentraler Bedeutung für die Abschnürung des Vesikels; d) Nach der Abschnürung verbleiben der Komplex an der limitierenden Membran des MVBs bis er durch die Aktivität des ATPase-

Komplexes Vps4 wieder deassembliert wird. MVB=*multivesicular body*; ILV=*intraluminales Vesikel* (modifiziert nach Wollert and Hurley, 2010)

Ein aktuelles Modell aus der Hefe zur Bildung der intraluminalen Vesikel weist den einzelnen ESCRT-Komplexen verschiedene Aufgaben zu (siehe Abb. 1.4) [Wollert

and Hurley, 2010]. Während der ESCRT-0-Komplex für die Konzentrierung der zu degradierenden, ubiquitinierten Proteine zuständig ist, bilden ESCRT-I und ESCRT-II einen gemeinsamen Komplex, der die Invagination der Membran induziert und die abzubauenen Proteine in diese sich einstülpenden Vertiefungen sortiert. Die abschließende Abschnürung des Vesikels wird von dem ESCRT-III-Komplex durchgeführt. Danach verbleibt der ESCRT-III-Komplex an der limitierenden Membran bis er durch die Aktivität der ATPase Vps4 deassembliert wird. Im Gegensatz zum bisherigen Modell scheinen also auch ESCRT-I und -II an der Deformation der Membran (Einstülpung) beteiligt zu sein.

	<i>S. cerevisiae</i>	<i>D. melanogaster</i>	<i>C. elegans</i>	<i>H. sapiens/Mus musculus</i>
ESCRT-0	vps27	Hrs	VPS-27 /HRS-1	HRS
	Hse1	Stam1	PQN-19	STAM1,STAM2
ESCRT-1	Vps23	Tsg101/Ept	VPS-23	TSG101
	Vps37	Vps37	VPS-37	VPS37A,B,C,D
	Mvb12	Mvb12	MVB-12	MVB12A,B
	Vps28	Vps28	VPS-28	Vps28
ESCRT-II	Vps36	Vps36	VPS-36	EAP45
	Vps22	Vps22	VPS-22	EAP30
	Vps25	Vps25	VPS-25	EAP20
ESCRT-III	Vps20	Vps20	VPS-20	CHMP6
	Vps32/Snf7	Vps32/Snf7/Shrub	VPS-32	CHMP4A, B, C (mSnf7-1,-2,-3)
	Vps24	Vps24	VPS-24	CHMP3
	Vps2/Did4	Vps2A (CG14542) Vps2B (CG4618)	VPS-2	CHMP2A,B
ATPase	Vps4	Vps4	VPS-4	VPS4A, SKD2, VPS4B, SKD1
	Vta1	CG7967	T23G11.7	LIP5
ESCRT-III-assoziert	Vps60/Mos10	Chmp5	F41E6.9	CHMP5
	Vps46/Did2/Fti1	Chmp1	F23C8.6	CHMP1A, B
	Ist1	---	---	IST1
	Vps31/Bro1	ALIX	ALX-1	ALIX/AIP1
	Vps44/Nhx1	---	---	SLC9A6

Tabelle 1.2: Nomenklatur der ESCRT-Proteine in verschiedenen Organismen

Die Tabelle gibt eine Übersicht über die verschiedenen Bezeichnungen der ESCRT-Proteine in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*, dem Nematoden *Caenorhabditis elegans* sowie in Mensch und Maus.

In *Drosophila* wurde in dieser Arbeit ein weiteres *vps2*-Gen (CG14542) gefunden. Da die Aminosäuresequenz des entsprechenden Proteins eine hohe Homologie zu humanem CHMP2A aufweist, wurde es *vps2A* benannt, während das bereits bekannte *vps2*-Gen (CG4618) ebenfalls aufgrund von Sequenzhomologien zu humanem CHMP2B in *vps2B* umbenannte wurde (siehe Kapitel 2.1.2). CHMP = *charged multivesicular body protein / chromatin-modifying protein*; Snf = *sucrose non-fermenting*; VPS = *vacuolar protein sorting*

1.2.1 Bedeutung der ESCRT-Proteine während der Entwicklung

Da die ESCRT-Komplexe wie bereits erläutert an der Regulation von Signalwegen, als auch an Prozessen wie der mRNA-Lokalisation [Irion and Johnston, 2007] und der Zytokinese [Carlton and Martin-Serrano, 2007] beteiligt sind, ist es nicht verwunderlich, dass ihr Ausfall während der Entwicklung eines Organismus schwerwiegende Folgen haben kann. Während Mutationen von ESCRT-Proteinen in der einzelligen Hefe *Saccharomyces cerevisiae* nicht letal sind [Raymond et al., 1992], führt in vielzelligen Organismen schon der Verlust eines einzigen ESCRT-Proteins zum Tod. Die folgende Tabelle zeigt den Zusammenhang zwischen dem Ausfall einer ESCRT-Komponenten und dem Todeszeitpunkt für die beiden Organismen *Drosophila melanogaster* und Maus.

Organismus	Gen	ESCRT-Komplex	Mutation	Letalität	Publikation
<i>D. melanogaster</i>	<i>vps27/Hrs</i>	0	LOF	Embryo	Lloyd et al., 2002
	<i>vps23/Tsg101</i>	I	LOF	L1-Larve	Moberg et al., 2005
	<i>vps28</i>	I	LOF	L1-Larve	Sevrioukov et al., 2005
	<i>vps25</i>	II	LOF	L1-Larve	Vaccari and Bilder, 2005
	<i>vps32/shrub</i>	III	LOF	Embryo	Sweeney et al., 2006
	<i>vps4</i>		LOF	L1-Larve	Rodahl et al., 2009a
<i>M. musculus</i>	<i>vps27/Hrs</i>	0	KO	E11	Komada and Soriano, 1999
	<i>STAM1/STAM2</i>	0	KO	E11	Yamada et al., 2002
	<i>vps23/Tsg101</i>	I	KO	E6.5	Ruland et al., 2001
	<i>vps32</i>	III	KO	E7.5 - 8.5	Lee et al., 2007
	<i>CHMP5</i>	ESCRT-III assoziiert	KO	E10	Shim et al., 2006

Tabelle 1.3: Letalität von ESCRT-Mutanten in *Drosophila* und Maus

Die Tabelle zeigt die verschiedenen Genen, deren Ausfall bisher in *Drosophila* und in der Maus untersucht worden ist. Des weiterenn wird die Art der Mutation (LOF = *loss-of-function*, KO = *knockout*), deren homozygotes Auftreten zum Ausfall des Gens führte, die Zugehörigkeit der entsprechenden Proteine zu den verschiedenen ESCRT-Komplexen, der Todeszeitpunkt und die entsprechenden Publikationen angegeben.

Diese Beispiele zeigen, dass der Ausfall von Mitgliedern jedes einzelnen ESCRT-Komplexes zum Tod führen kann. Da die Funktion eines Komplexes scheinbar nicht durch einen anderen ersetzt werden kann, scheint die koordinierte Zusammenarbeit der vier Komplexe notwendig zu sein. Die Ursache für die Letalität bei Ausfall einer

einzigsten ESCRT-Komponente liegt vermutlich daran, dass die ESCRT-Proteine als Komplexe mit einer definierten Stöchiometrie agieren. Fehlt eine Komponente, kann der Komplex nicht mehr gebildet werden und ist funktionslos.

1.2.2 ESCRT und Krankheiten

In den letzten Jahren wurde die Bedeutung der ESCRT-Proteine an der Entstehung von Krankheiten wie Krebs, Neurodegeneration oder Viruserkrankungen immer deutlicher. Daher soll ihre Rolle bei der Pathogenese dieser Krankheiten nun kurz dargestellt werden.

a) Krebs

Der erste Hinweis auf eine Rolle der ESCRT-Proteine bei der Entstehung von Krebs war die Identifizierung der ESCRT-I-Komponente Tsg101 als Tumorsuppressor [Li and Cohen, 1996]. Eine abgeschwächte Aktivität von Tsg101 führte zum Wachstum von 3T3-Fibroblasten in Zellkultur und die Injektion dieser Zellen in Mäuse resultierte in metastatischen Tumoren [Li and Cohen, 1996]. Allerdings führte der konditionale Knockout von TSG101 in murinem Brustdrüsengewebe zu einem verstärkten Zelltod, aber nicht zu Tumorgenese [Krempler et al., 2002; Wagner et al., 2003]. Da des weiteren mehrere Arbeiten zeigen konnten, dass Tsg101 in verschiedenen Krebsformen hochreguliert ist [Liu et al., 2002; Oh et al., 2007], scheint Tsg101 eher nicht als Tumorsuppressor zu dienen. In Tumoren in der Leber bzw. im Pankreas wurden reduzierte Mengen von Vps37A/HCRP1 [Xu et al., 2003] bzw. CHMP1A [Li et al., 2008] gefunden, was auf eine Funktion dieser Proteine als Tumorsuppressoren hindeutet, die allerdings durch weitere Untersuchung erst noch bestätigt werden muss

Obwohl Tsg101 in Säugern anscheinend nicht als Tumorsuppressor fungiert, konnte diese Funktion in *Drosophila* bestätigt werden. Hier führt der klonale Verlust von *Tsg101* (*erupted*) in den mutanten Zellen selbst zur Apoptose, löst aber im umgebenden Gewebe eine starke Überproliferation aus [Moberg et al., 2005]. Einen ähnlichen Phänotyp verursacht der Ausfall der ESCRT-II-Komponente *vps25* [Vaccari and Bilder, 2005; Thompson et al., 2005]. In *Tsg101* und *vps25*-mutanten Zellen kommt es zu einer Akkumulation und einer ektopischen Aktivierung des Notch-

Rezeptors. Dadurch werden Zielgene von Notch, wie z.B. das Interleukin-6-ähnliche Zytokin Unpaired (Upd) ektopisch exprimiert, welches dann von den mutanten Zellen sekretiert wird und über die Aktivierung des JAK- (Janus-Kinase) STAT (signal transducer and activator of transcription)-Signalwegs in den benachbarten nicht-mutanten Zellen zu einer Proliferation führt [Vaccari and Bilder, 2005]. Ähnliche Effekte wurden auch bei der klonalen Analyse der ESCRT-Komponenten *vps28* (ESCRT-I), *vps22* (ESCRT-II), *vps20* und *vps2* (beide ESCRT-III) beobachtet [Vaccari et al., 2009], was auf eine Funktion der ESCRT-Proteine als Tumorsuppressoren hindeutet.

In *hrs*-mutanten konnte eine solche Überproliferation nicht beobachtet werden [Moberg et al., 2005]. Die Hypothese, dass Hrs nicht als Tumorsuppressor fungiert, wird durch die Beobachtung unterstützt, dass es in *hrs*-mutanten Zellen zwar zu einer Akkumulation des Notch-Rezeptors kommt, jedoch nicht wie bei den anderen ESCRT-Proteinen zu einer ektopischen Aktivierung.

Der Mechanismus, der in den *tsg101*- und *vps25*-mutanten Zellen die Apoptose einleitet, ist bisher noch nicht aufgeklärt. Interessant ist aber, dass in *vps25*-mutanten Zellen die Expression eines Apoptose-Inhibitors zur Bildung von neoplastischen Tumoren führt, die ein invasives Potential besitzen [Thompson et al., 2005]. Die Ursache hierfür liegt in der Überproliferation und dem Verlust der epithelialen Polarität in den mutanten Zellen durch bisher nicht geklärte Prozesse. In der Abwesenheit von Apoptose-Inhibitoren scheinen daher benigne, „gutartige“ Tumore gebildet zu werden, während die Anwesenheit von Apoptose-Inhibitoren zur Entstehung von malignen, „bösartigen“ Tumoren führt.

Ein weiterer Bezug zu Krebs könnte die Beteiligung der ESCRT-Proteine an dem Prozess der Zellteilung sein. In Säugerzellen und Pflanzenzellen konnte gezeigt werden, dass der Verlust von ESCRT-Komponenten zu einem Arrest der Zytokinese führt, was in Zellen mit zwei oder mehreren Zellkernen resultiert [Spitzer et al., 2006; Morita et al., 2007]. Bei der Zytokinese scheint die ESCRT-Maschinerie über die Interaktion von ALIX und Tsg101 mit dem zentrosomalem Protein CEP55 zum Midbody rekrutiert zu werden und führt die finale Abschnürung durch, die in der Entstehung zweier Tochterzellen resultiert. Die bei Ausfall von ESCRT-Komponenten entstehende Aneuploidie wird häufig mit Krebs assoziiert, wobei noch nicht geklärt

ist, ob es sich dabei um eine Ursache oder eine Folge von Krebs handelt.

b) neuronale Krankheiten

Bei neurodegenerativen Krankheiten wie Alzheimer, Huntington und Parkinson, bei denen es zum Absterben von Neuronen kommt, spielt der Abbau von Proteinaggregaten über die Autophagie neben dem Ubiquitin-Proteasom-System eine wichtige Rolle [Übersicht in Nixon, 2006]. Neben dem bereits beschriebenen endosomalen Transportweg führt auch die Autophagie zum Abbau von Proteinen durch das Lysosom. Die Autophagie bezeichnet einen Prozess, bei dem ein Teil des Zytoplasmas in ein sogenanntes Autophagosom (von einer Doppelmembran abgegrenzt) aufgenommen wird, welches dann mit einem späten Endosom oder direkt mit dem Lysosom fusioniert und zum Abbau der enthaltenen Bestandteile führt [Übersicht in Levine and Klionsky, 2004]. Die Autophagie ist besonders für den Abbau von beschädigten Organellen, wie z.B. Mitochondrien als auch für den Abbau von potenziell zelltoxischen Proteinaggregaten, die als Ursache neurodegenerativer Krankheiten gelten, verantwortlich [Übersicht in Rubinsztein, 2006]. In der Tat konnte eine Akkumulation von Autophagosomen bei Alzheimer, Huntington und Parkinson beobachtet werden [Yu et al., 2005; Nixon et al., 2005], was darauf hindeutet, dass in diesen Krankheiten die Autophagie gestört ist. Die Ursache für das Auftreten dieser Krankheiten erst in einem höheren Alter kann dadurch erklärt werden, dass sich der Autophagie-Prozess im Alter verlangsamt [Übersicht in Bergamini et al., 2004; Cuervo and Dice, 2000] und so der Abbau entstehender Proteinaggregate immer mehr beeinträchtigt wird und letztendlich zum Zelltod führt.

Die Vermutung, dass die ESCRT-Komplexe durch ihre Rolle bei der Autophagie einen Schutz vor neurodegenerativen Krankheiten bieten könnten, entstand durch die Identifizierung einer autosomal dominanten Mutation in CHMP2B (CHMP2B^{Inton5}) in Patienten mit einer bestimmten Form von frontotemporaler Demenz (FTD3 = *frontotemporal dementia linked to chromosome 3*) und amyotropher lateraler Sklerose [Skibinski et al., 2005; Parkinson et al., 2006]. In beiden Krankheiten kommt es zu einer Akkumulation von Ubiquitin-positiven Proteinaggregaten, vermutlich verursacht durch einen gestörten Abbau solcher Proteinaggregate über die Autophagie in diesen Neuronen. Dies wird durch die Beobachtung unterstützt, dass

die Expression der mutanten Form von CHMP2B (CHMP2B^{Intron5}) in kortikalen Neuronen zu einer Akkumulation Ubiquitin-positiver Proteinaggregate und Autophagosomen mit anschließendem Zelltod führt [Lee et al., 2007; Filimonenko et al., 2007]. Der Ausfall von wildtypischem CHMP2B führt nicht zu solchen Effekten, da seine Funktion scheinbar von seinem Homolog CHMP2A übernommen werden kann [Lee et al., 2007]. Die Ursache für den beobachteten Phänotyp liegt vermutlich darin, dass dem mutanten CHMP2B-Protein die letzten 36 Aminosäuren vom C-Terminus [Skibinski et al., 2005] fehlen, wodurch die Funktion des C-terminalen Endes (Autoinhibition, Bindung der ATPase Vps4) gestört zu sein scheint. Daher bindet CHMP2B^{Intron5} an seinen normalen Bindungspartner mSnf7-2 (Vps32/Shrub), kann aber nicht mehr mit der ATPase Vps4 interagieren. Dadurch kann der Komplex nicht deassembliert werden und wird daher funktionslos. Es wird vermutet, dass der Funktionalitätsverlust der ESCRT-III-Proteine zu Problemen bei der Reifung von Autophagosomen oder ihrer Fusion mit dem Lysosom führt, was in einer Ansammlung dieser Strukturen resultiert, die schließlich zum Zelltod führt. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass eine Inhibition der Autophagie in beiden Fällen zu einer Verzögerung des Zelltods führte [Lee et al., 2009].

CHMP2B ist wahrscheinlich nicht das einzige ESCRT-Protein, das eine Rolle bei der Pathogenese neurodegenerativer Krankheiten spielt. Untersuchungen in *Drosophila* und in Säugerzellen konnten zeigen, dass auch der Ausfall anderer ESCRT-Komponenten aller vier Komplexe (Tsg101, Vps28, Vps22, Vps24, mSnf-2/Vps32, Vps4) zu einer Akkumulation von Autophagosomen und Proteinaggregaten führt [Filimonenko et al., 2007; Rusten et al., 2007; Lee et al., 2007; Nara et al., 2002]. Des Weiteren konnte in einem *Drosophila*-Modell für die Huntington-Krankheit gezeigt werden, dass verminderte Proteinmengen der ESCRT-Proteine Vps28, Vps25 und Vps32 die Neurodegeneration verstärken [Rusten et al., 2007].

Neben dem Überleben der Neuronen ist auch die Morphologie ihrer Dendriten für ihre Verbindung zu anderen Neuronen und damit für die synaptische Plastizität wichtig [Übersicht in Sjoestroem et al., 2008]. Veränderungen in der Dendriten-Morphologie werden daher auch bei vielen Formen geistiger Behinderung beobachtet [Übersicht in Dierssen and Ramakers, 2006].

Einige Untersuchungen legen nahe, dass auch die ESCRT-Proteine an der Dendriten-Morphogenese und in der Erhaltung ihrer Struktur beteiligt sind. Die ESCRT-III-Komponente *Shrub* wurde in einem genetischen Screen in *Drosophila* gefunden, in dem Gene gesucht wurden, die an der Dendriten-Entwicklung beteiligt sind [Gao et al., 1999]. Der homozygote Ausfall von *shrub* führt zu verkürzten Dendriten, die sich sehr stark verzweigen, wodurch sich das abgedeckte dendritische Feld verkleinert (siehe Abb. 1.5; Sweeney et al., 2006). Diese *shrub*-mutanten Embryonen sterben bevor sie das erste Larvenstadium erreichen.

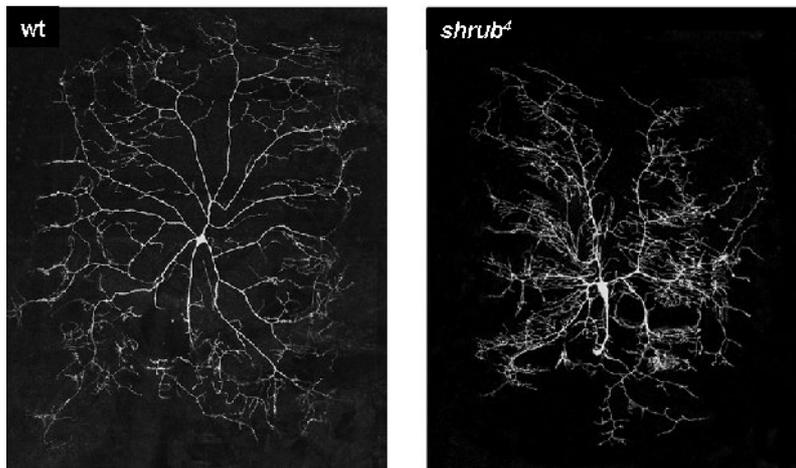


Abbildung 1.5: Zellautonomer Effekt von *shrub* in der Dendriten-Morphogenese

Die Abbildung zeigt rechts ein wildtypisches *ddaC*-Neuron des peripheren Nervensystems von *Drosophila melanogaster* und links ein *shrub*-mutantes *ddaC*-Neuron. Im Vergleich zum Wildtyp sind die Dendriten stark verkürzt, wodurch das abgedeckte dendritische Feld verkleinert ist. Außerdem treten an den verkürzten Dendriten starke Verzweigungen auf. [Sweeney et al., 2006]

Für das murine Ortholog *mSnf7-2* konnte in Zellkultur mit kortikalen Neuronen gezeigt werden, dass die Neurone nach einer Behandlung mit siRNA die Dendriten zurückziehen und sterben [Lee et al., 2007]. Ein ähnlicher Phänotyp wurde bei der Expression von *CHMP2B^{Intron5}* beobachtet. Wie bereits beschrieben kommt es in beiden Fällen auch zu einer Akkumulation von Autophagosomen mit anschließendem Zelltod. Wie die Dendriten-Morphologie und die Autophagie zusammenhängen ist allerdings noch unbekannt.

c) Virale Infektionen

Die Endozytose ist für die Immunantwort sehr wichtig, wird aber leider auch von Viren für ihre eigenen Zwecke verwendet. Einige Viren, die zur Klasse der membran-

umhüllten RNA-Viren gehören wie z.B. das HI- oder das Ebolavirus, können sich nicht selbst von der Plasmamembran abschnüren, um ihre Wirtszelle als Virionen zu verlassen, sondern benutzen dazu die ESCRT-Maschinerie der Wirtszelle. Über bestimmte Motive (P(S/T)AP, PPXY oder YP(X)nI) in der L (late)-Domäne ihrer Strukturproteine (z.B. Gag) rekrutieren sie zunächst ESCRT-Komponenten wie Tsg101 [Garrus et al., 2001] oder Alix [Strack et al., 2003]. Diese vermitteln wahrscheinlich die Rekrutierung weiterer ESCRT-Proteine und auch der ATPase Vps4, so dass die Abschnürung des Virions von der Plasmamembran in den Extrazellulärraum erfolgen kann [Fisher et al., 2007].

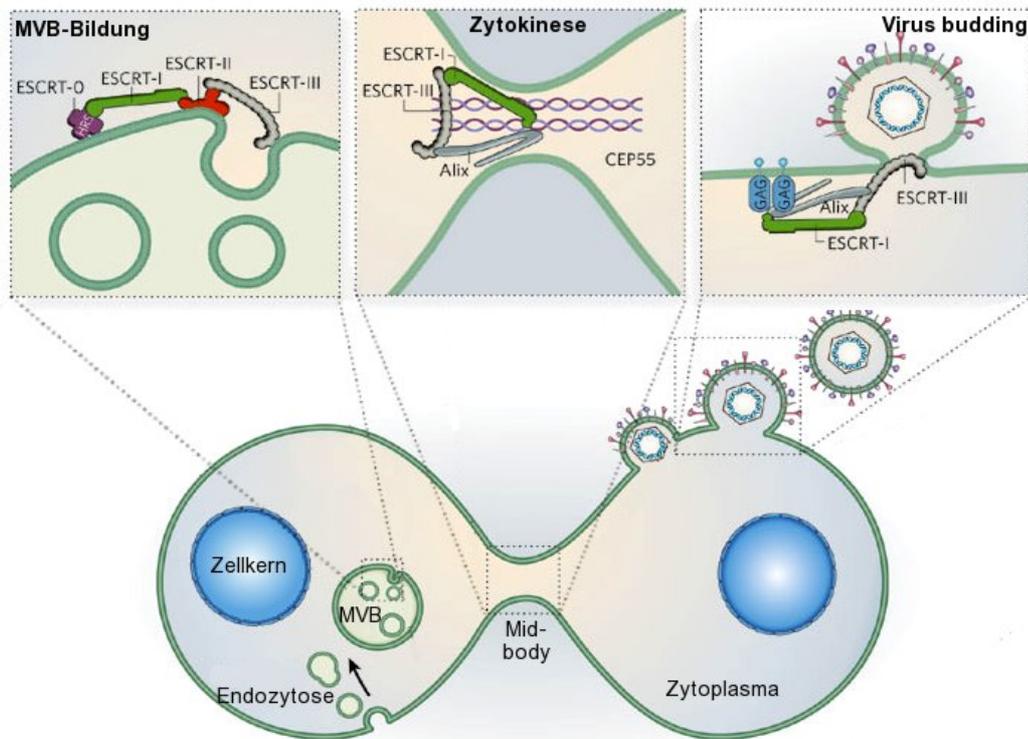


Abbildung 1.6: Topologische Ähnlichkeit der MVB-Bildung, der Zytokinese und der Virenknospung

Der ESCRT-III-Komplex ist eine konservierter Maschinerie zur Abschnürung von Membraneinstülpungen. Bei der Bildung von MVBs (links) wird der ESCRT-III-Komplex über die ESCRT-0, -I und -II-Komplexe an die Membran rekrutiert. Im Falle der Zytokinese (Mitte) erfolgt die Rekrutierung über das Zentrosom/Midbody-Protein CEP55 und Alix, aber auch durch ESCRT-I. Bei der Knospung von Viren (z.B. HIV, rechts) sind ESCRT-I, Alix und das virale GAG-Protein an der Rekrutierung beteiligt. (modifiziert nach [Raiborg and Stenmark, 2009])

Die beschriebenen Prozesse der Bildung der intraluminalen Vesikel, der finale Abschnürungsprozess bei der Zytokinese oder die Abknospung („budding“) von

Virionen zeigen alle eine topologische Ähnlichkeit, die vermuten lässt, dass der ESCRT-III-Komplex ein genereller Mechanismus zur Abschnürung von Membraneinstülpungen ist (siehe Abb.1.6).

Wie bereits beschrieben, wurde eine erhöhte Aktivität des Notch-Signalweges in nahezu allen ESCRT-Mutanten festgestellt. Dies gilt auch für den Ausfall eines weiteren Regulators der Notch-Aktivität, für den in dieser Arbeit eine Beziehung zu den ESCRT-Proteinen nachgewiesen werden konnte. Daher soll der Notch-Signalweg nun genauer betrachtet werden.

1.3 Der Notch-Signalweg

Der Notch-Signalweg ist einer der wenigen Signalwege, die einen direkten Zell-Zell-Kontakt der signal-sendenden zur signal-empfangenden Zelle voraussetzen. Über diesen kontakt-abhängigen Signalweg, der in allen Metazoen vorhanden ist, werden Prozesse wie Zellproliferation (Wachstum oder Wachstumsstopp), Zelldifferenzierung (Differenzierung oder Erhalt des undifferenzierten Zustands) und Apoptose (Überleben der Zelle oder Zelltod) gesteuert, die zellspezifisch gehemmt oder gefördert werden können [Artavanis-Tsakonas et al., 1999]. Das Verständnis wie dieser Signalweg solch gegensätzlichen Auswirkungen zur Folge haben kann, ist besonders für seine Rolle bei der Pathogenese von Krebs wichtig, da Notch hier auch als Onkogen oder Tumorsuppressor, Repressor oder Induzierer der terminalen Differenzierung oder auch als Stammzell-Erhaltungsfaktor (besonders im Haut- und Darmepithel, sowie in den Blutzellen) agieren kann [Übersicht in Roy et al., 2007].

Im Gegensatz zu den vielfältigen Auswirkungen dieses Signalweges ist sein Ablauf innerhalb der beteiligten Zellen relativ einfach (siehe Abb. 1.7). Nach der Bindung des Liganden erfolgen zwei proteolytische Spaltungen des plasmamembranständigen Notch-Rezeptors, die in der Freisetzung der intrazellulären Domäne Nintra (NICD) resultieren. Nintra transloziert in den Kern und bindet an ein Effektorprotein der CSL-Familie, wodurch die Transkription der Zielgene ausgelöst wird.

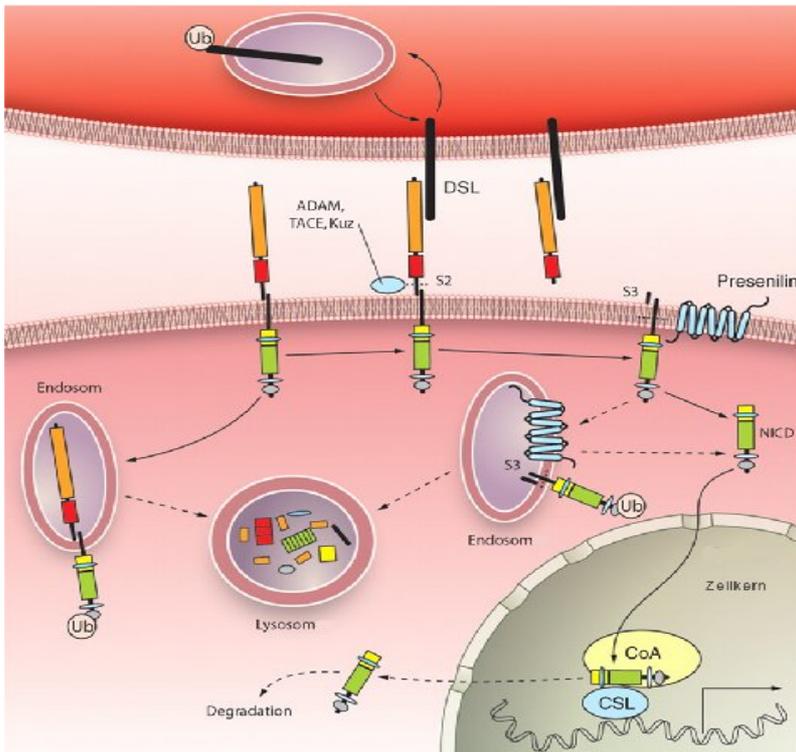


Abbildung 1.7: Der Notch-Signalweg

Nach der Bindung des Liganden wird der intrazelluläre Teil des Notch-Rezeptors an der S2-Stelle von einer ADAM-Protease geschnitten, wodurch die extrazelluläre Domäne freigesetzt wird. Hierbei entsteht das sogenannte NEXT-Produkt (NEXT), welches innerhalb der Transmembrandomäne von dem γ -Sekretase-Komplex (Presenilin + Kofaktoren, siehe Text) geschnitten wird. Es ist noch nicht klar, ob dieser Schnitt nur an der Plasmamembran oder auch in Endosomen erfolgen kann. Durch diesen S3-Schnitt entsteht die aktivierte Form des Rezeptors (Nintra / NICD) die in den Zellkern transloziert und dort an ein Effektorprotein aus der CSL-Familie bindet. Hierdurch wird ein Repressorkomplex entfernt und ein aktivierende Komplex assoziiert, wodurch die Transkription der Zielgene eingeleitet wird. NEXT = Notch extracellular truncation NICD = Notch intracellular domain (modifiziert nach [Ehebauer et al., 2006])

Die Anzahl dieser Grundelemente des Notch-Signalwegs variiert allerdings in den verschiedenen Organismen, wodurch die Komplexität gesteigert wird. Während *Drosophila* nur einen Notch-Rezeptor besitzt, treten in den Nematoden zwei (LIN-12, GLP-1) und in den Vertebraten gleich vier Rezeptoren (Notch1-4) auf. Auch die Anzahl der Liganden ist unterschiedlich, da den beiden Vertretern Delta und Serrate aus *Drosophila*, vier Liganden in den Nematoden (LAG-2, APX-1, ARG2 und F16B12.2) und drei Delta-ähnliche (DLL1, DLL3 und DLL4) sowie zwei Serrate-ähnliche (Jag1 und Jag2) Liganden in den Vertebraten gegenüberstehen. Nur das Effektorprotein, an das Nintra im Kern bindet, liegt in den meisten Organismen einzeln vor und zwar als CBF-1 in den Vertebraten, Su(H) in *Drosophila* und LAG-2

in den Nematoden, weshalb diese Proteine zusammen auch als CSL-Familie bezeichnet werden [Übersicht in Lai, 2004].

Der Notch-Rezeptor wird im endoplasmatischem Retikulum als ca. 300 kDa Vorläuferprotein synthetisiert. Nach einer Spaltung im trans-Golgi-Netzwerk an der sogenannten S1-Stelle, die durch eine Furin-ähnliche Konvertase vermittelt wird, wird der Rezeptor als Heterodimer zur Plasmamembran transportiert [Blaumueller et al., 1997; Logeat et al., 1998]. Da der Notch-Rezeptor die Plasmamembran mit seiner Transmembrandomäne nur einmal durchspannt, weshalb der Notch-Rezeptor – ebenso wie seine Liganden – zu den Typ-1-Transmembranproteinen gerechnet wird. Der extrazelluläre Teil des Rezeptors besitzt 29-36 Wiederholungen des EGF (Epidermal growth factor) ähnlichen Motivs, wobei besonders die Wiederholungen 11 und 12 für die Interaktion mit der DSL (Delta/Serrate/LAG-2)-Domäne der Liganden benötigt werden [Rebay et al., 1991, Fleming, 1998].

Wie bereits beschrieben, wird der Rezeptor nach der Bindung des Liganden zweimal geschnitten (siehe Abb. 1.7). Der erste Schnitt (S2) erfolgt innerhalb der intrazellulären Domäne zwischen Heterodimerisierungs- und Transmembrandomäne und wird von einer Protease der ADAM-Familie durchgeführt (*kuzbanian* in *Drosophila*) [Hartmann et al., 2002; Lieber et al., 2002]. Dadurch wird die extrazelluläre Domäne freigesetzt, ein Prozess als „*ectodomain shedding*“ bezeichnet wird, und es verbleibt das membrangebundene sogenannte NEXT (Notch extracellular truncation)-Fragment des Rezeptors [Brou et al., 2000; Mumm et al., 2000]. Anschließend erfolgt ein weiterer Schnitt innerhalb der Transmembrandomäne von NEXT, der durch den γ -Sekretase-Komplex - bestehend aus der Aspartylprotease Presenilin (Psn) und den Kofaktoren Nicastrin/Aph-2, Aph-11 und Pen2 – durchgeführt wird [Übersicht in Fortini, 2002]. Dies führt zur Freisetzung der intrazellulären Domäne (Nintra/NICD), die durch ihre nukleären Lokalisationssignale in den Kern wandert [Struhl and Adachi, 1998]. Dort bindet Nintra/NICD an ein Effektorprotein aus der CSL-Familie, wodurch ein mit dem CSL-Protein assoziierter, transkriptions-reprimierender Proteinkomplex entfernt [Kao et al., 1998] und ein aktivierender Komplex assoziiert wird [Petcherski and Kimble, 2000; Wu et al., 2000].

Die primären Zielgene stammen aus der HES-Familie (Hairy/Enhancer of split [E(spl)] Komplexes, die für basische helix-loop-helix-(bHLH)-Proteine kodieren [Bailey and Posakony, 1995; Lecourtois and Schweisguth, 1995]. Diese Faktoren besitzen innerhalb der Metazoen viele Homologe, so zum Beispiel die Maus-E(spl)-Homologe *Hes-1-5* [Sasai et al., 1992; Takebayashi et al., 1995]. Weitere Zielgene sind *wingless (wg)*, *vestigial (vg)*, *Distal less (Dll)*, *Delta (DI)*, *Serrate (Ser)* und *cut (ct)* [Kim et al., 1995; Couso et al., 1995; Diaz-Benjumea and Cohen, 1995; Rulifson and Blair, 1995; Neumann and Cohen, 1996; Micchelli et al., 1997].

Durch seine Rolle bei Prozessen der Zellproliferation, Zelldifferenzierung und des Zelltods verwundert es nicht, dass Mutationen in Komponenten dieses Signalweges oder ihn regulierenden Faktoren dramatische Auswirkungen auf den sich entwickelnden, aber auch auf den adulten Organismus haben können.

In Mäusen konnte gezeigt werden, dass der homozygote Knockout von *Notch1* [Swiatek et al., 1994; Conlon et al., 1995], und *Notch2* [Hamada et al., 1999] zu einer Letalität an Tag 11 der Embryonalentwicklung erfolgt, während *Notch3* [Krebs et al., 2003]- und *Notch4* [Krebs et al., 2000]-Knockout-Embryonen keinen Phänotyp zeigen und die adulten Mäuse lebensfähig und fertil sind. Auf der Seite der Liganden für der homozygote Knockout von *Delta-like1* [Angelis et al., 1997], *Delta-like4* [Duarte et al., 2004; Gale et al., 2004] und *Jagged1* [Xue et al., 1999] zu einem Tod zwischen Tag E9.5 und E12.5. Die Embryonen zeigen unterschiedlich starke Defekte in der Somitogenese und Gefäßbildung, eine gesteigerte Apoptose, als auch verstärkte neuronale Differenzierung.

Im Menschen resultieren Funktionsverluste von Komponenten dieses Signalweges in einigen vererbaren Krankheiten. Beim Alagille-Syndrom führen Mutationen in *JAG1* zu angeborenen Defekten von Herz, Leber, Auge und im Skelettaufbau [Li et al., 1997; Oda et al., 1997]. Bei der spondylokostalen Dysostose verursachen Mutationen in *DLL3* starke Skelettanomalien, darunter Veränderungen der Wirbelkörper, verkürzter Hals und Rumpf sowie Fusion von Rippen [Bulman et al., 2000]. Mutationen in den extrazellulären EGF-Wiederholungen von *NOTCH3* resultieren in CADASIL (*cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy*), einer progressiven Krankheit des zentralen Nervensystems, die von einer Migräne über Schlaganfälle bis zur Demenz führen

kann [Joutel et al., 1996].

Auch bei verschiedenen Krebsformen – meist in sich selbst-erneuernden Geweben wie Blut, Darm oder Haut - ist eine veränderte Notch-Aktivität beobachtet worden. In diesen Geweben ist der Notch-Signalweg immer wieder an Prozessen wie der Zelldifferenzierung und der Zelldetermination beteiligt, wobei seine Deregulation zur Entstehung von Krebs beitragen kann (zusammengefasst in Abb. 1.8). Dabei kann je nach Gewebe eine verringerte oder eine erhöhte Notch-Aktivität zur Bildung der Tumoren beitragen. Mutationen im *NOTCH1*-Rezeptor, die in einer konstitutiven Aktivität resultieren sind beispielsweise in 50% der Patienten die Ursache der akuten T-Zellen lymphoblastische Leukämie (T-ALL) [Ellisen et al., 1991; Weng et al., 2004]. Der Notch-Signalweg ist aber auch bei der normalen Entwicklung der T-Zellen beteiligt, da es bei der Entscheidung zwischen B- und T-Zellentwicklung die T-Zellentwicklung induziert [Übersicht in Radtke et al., 2004]. Daher scheint die leukämische Aktivität von Notch, durch eine gesteigerte Aktivität während diese Entwicklungsschritts verursacht zu werden.

In Mäusen konnte gezeigt werden, dass *Notch1* in dem sich selbst-erneuernden Dünndarmepithel zwei verschiedene Funktionen hat [Übersicht in Wilson and Radtke, 2006]. Auf der einen Seite hält er die proliferierenden DDarmvorläuferzellen in einem undifferenzierten Zustand und dirigiert auf der anderen Seite das Zellschicksal bei der binären Entscheidung zwischen der absorptiven (Enterozyten) und der sekretorischen Zelllinie (Schleim-produzierende Becherzellen, enteroendokrine Zellen) in Richtung der absorptiven Zelllinie. Dieser Prozess scheint durch das Notch-Zielgen *Hes-1* (*Hairy/Enhancer of split-1*) reguliert zu werden, dass den undifferenzierten Zustand der proliferierenden Vorläuferzellen aufrecht erhält und die Entwicklung der absorptiven Zelllinie fördert [Jensen et al., 2000]. Dies wird u.a. durch die Unterdrückung der Expression des Transkriptionsfaktors *Math1* (*mammalian atonal homolog 1*) erzielt [Kageyama et al., 2000], der für die Entwicklung der sekretorischen Zelllinie entscheidend ist [Yang et al., 2001]. Dementsprechend führt die postnatale Inaktivierung von CSL/RBP-J im Darm von Mäusen zum Verlust der proliferierenden, undifferenzierten Zellen gefolgt von ihrer Konversion zu Schleim-produzierenden Becherzellen [Es et al., 2005b]. Im reziproken Versuch führt die Expression einer dominant-aktiven Form von Notch1

(NICD) zu einem Darmepithel, das hauptsächlich aus undifferenzierten Vorläuferzellen besteht [Fre et al., 2005].

Neben dem Notch- ist auch der Wnt-Signalweg an der Aufrechterhaltung des undifferenzierten Zustands der proliferierenden Vorläuferzellen beteiligt und neuere Untersuchungen konnten zeigen, dass diese Vorläuferzellen ein ähnliches Genexpressionsmuster wie Darmkrebszellen und gutartigen Geschwulsten (Adenomen) aufweisen [Wetring et al., 2002; Es et al., 2005b]. Daher scheinen der Notch- und der Wnt-Signalweg auch in proliferierenden Adenomen aktiv zu sein. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Behandlung mit γ -Sekretase-Inhibitoren in Mäusen mit einer Mutation im Tumorsuppressorgen *Apc* die Differenzierung der proliferierenden Adenom-Zellen zu Becherzellen induzieren konnte [Es et al., 2005b]. Im Gegensatz zu den T-Zellen und zum Darm führt z.B. in der Haut eine verringerte Aktivität von Notch1 zu Tumoren [Thelu et al., 2002; Nicolas et al., 2003].

Neuere Untersuchungen zeigen außerdem, dass Notch nicht nur bei der Entstehung von Tumoren beteiligt ist, sondern auch einen Einfluss auf die Tumorangio-genese hat, da sich die Inaktivierung des Dll4/Notch-Signalwegs negativ auf das Tumorwachstum auswirkt, da es die Bildung von defekten Blutgefäßen verursacht [Noguera-Troise et al., 2006; Ridgway et al., 2006]. Durch die genannten Beispiele ist der Notch-Signalweg zu einem möglichen therapeutischen Ansatzpunkt bei der Behandlung von Krebs geworden.

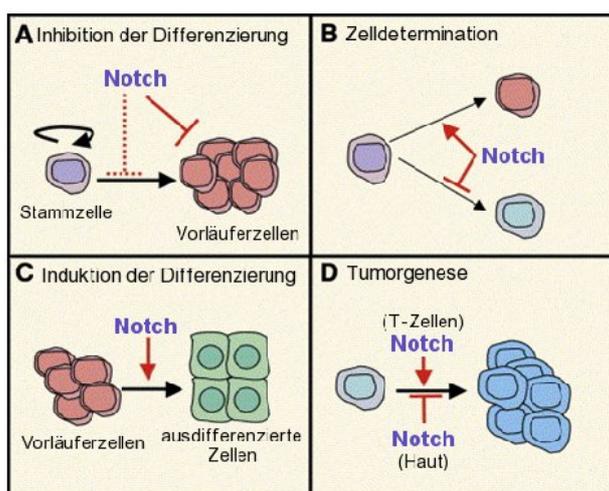


Abbildung 1.8: Verschiedene Effekte des Notch-Signalwegs

Dargestellt sind die vier Funktionen des Notch-Signalwegs, die während der Entwicklung, aber auch in sich selbst-erneuernden Geweben und in der Tumorgenese wichtig sind. A) Inhibition der Differenzierung: Notch erhält den undifferenzierten Status von Vorläufer- und vermutlich auch von Stammzellen aufrecht. B) Zelldetermination. Notch fungiert als binärer Schalter bei der Entscheidung zwischen zwei Zellschicksalen. C) Induktion der Differenzierung: Notch induziert die terminale Differenzierung von Vorläuferzellen. D) Tumorgenese: Bei Überexpression kann Notch

als Onkogen wirken, welches die Bildung von Tumoren induziert (T-Zell-Leukämie). Im Gegensatz dazu führt in der Haut der Verlust der Notch-Funktion zur Tumorbildung. (modifiziert nach Wilson and Radtke, 2006)

1.3.1 Bedeutung der Endozytose für die Regulation der Notch-Aktivität

Der Notch-Signalweg kann an verschiedenen Stellen durch unterschiedliche Mechanismen reguliert werden. Allein in *Drosophila melanogaster* sind ca. 140 Gene bekannt, die direkt oder indirekt die Notch-Aktivität beeinflussen [Louvi and Artavanis-Tsakonas, 2006]. Hierbei können u.a. das Expressionsmuster des Rezeptors und der Liganden oder kovalente Modifikationen wie Glykosilierungen und Ubiquitinierungen die Aktivität des Signalweges regulieren. In den letzten Jahren wurde auch dem endosomalen Transportsystem eine wichtige Rolle bei der Regulation dieses Signalweges zugesprochen [Übersicht in Borgne et al., 2005 b].

Hierbei scheint die Endozytose sowohl in der signal-empfangenden als auch in der signal-sendenden Zelle wichtig zu sein, da es in Mutanten für *shibire* (*Drosophila*-Homolog von Dynamin, [Chen et al., 1991; Blik and Meyerowitz, 1991], das unter anderem an der Ablösung der Clathrin-umhüllten Vesikel von der Plasmamembran beteiligt ist, nicht mehr zu einer ligandenabhängigen Aktivierung des Notch-Signalweges kommt [Poodry, 1990; Seugnet et al., 1997].

Des Weiteren werden auf der signal-sendenden Seite, also für die Internalisierung von Delta und Serrate, die E3-Ubiquitinligasen Neuralized (Neur) und Mindbomb (Mib) sowie das Epsin-Homolog liquid facets benötigt [Overstreet et al., 2004; Wang and Struhl, 2004; Wang and Struhl, 2005]. Es ist allerdings bisher noch nicht eindeutig geklärt, welche Funktion die Endozytose der Liganden bei der Aktivierung des Notch-Rezeptors hat. Möglicherweise werden gerade erst an die Plasmamembran gebrachte Liganden zunächst internalisiert und wieder an die Membran zurückgebracht, bevor sie aktiv sind [Wang and Struhl, 2004; Wang and Struhl, 2005]. Die Internalisierung der Liganden nach Bindung an den Notch-Rezeptor könnte aber auch eine mechanische Kraft („pulling force“) auf den Rezeptor ausüben, so dass die S2-Schnittstelle im Notch-Rezeptor freigelegt und für die ADAM-Protease erst zugänglich wird. Diese Theorie wird durch die Beobachtung unterstützt, dass Ligand nach dem S2-Schnitt zusammen mit der extrazellulären Domäne des Notch-Rezeptors in die signal-sendende Zelle transendozytiert wird [Parks et al., 2000; Nichols et al., 2007].

In der signal-empfangenden Zelle ist die Endozytose zum einen an der Regulation der Notch-Konzentration an der Zelloberfläche beteiligt. In Mutanten für die beiden

Proteine Avalanche und Rab5, die beide an der Bildung früher Endosomen beteiligt sind, kommt es zu einer Akkumulation von Notch an der Plasmamembran, die jedoch nicht in einer erhöhten Aktivierung des Signalwegs resultiert. In diesen Mutanten scheint der Transport des Notch-Rezeptors zum den ihn abbauenden Lysosom blockiert zu sein [Lu and Bilder, 2005].

Zum anderen scheint die Clathrin-abhängige Endozytose als auch die Monoubiquitinierung eine Voraussetzung für die Aktivierung des Notch-Rezeptors zu sein, da sie für den Presenilin-vermittelten S3-Schnitt, der die intrazelluläre Domäne freisetzt, notwendig sind [Gupta-Rossi et al., 2004]. Die Monoubiquitinierung dient aber auch einem konstitutivem Transport des nicht-aktivierten, vollständigen Notch-Rezeptors durch den endosomalen Transportweg bevor die Degradation im Lysosom erfolgt [Jekely and Rørth, 2003; Wilkin and Baron, 2005]. Dieser kontinuierliche Transport wird vermutlich durch die E3-Ubiquitinligasen Nedd4 und Suppressor of Deltex vermittelt, deren Ausfall in einer liganden-unabhängigen Aktivierung des Notch-Rezeptors resultiert [Sakata et al., 2004; Wilkin et al., 2004].

Die Bedeutung des endosomalen Transportwegs für den Abbau des Notch-Rezeptors im Zusammenhang mit den ESCRT-Proteinen wurde bereits erläutert (siehe 1.2.2). Neben den Komponenten der ESCRT-Komplexe scheinen auch andere Proteine an dem endosomalen Transport des Notch-Rezeptors beteiligt zu sein, wie z.B. das Gen *lethal (2) giant discs*.

1.4 Das Gen *lethal (2) giant discs (lgd)*

Das Gen *lethal (2) giant discs* wurde 1971 zum ersten Mal von Bryant und Schubiger beschrieben [Bryant and Schubiger, 1971]. Homozygote Träger eines Nullallels sterben kurz nach der Puppenbildung, vor der sie – in Abhängigkeit von Futter- und Platzangebot - bis zu 13 Tage in der larvalen Phase verbleiben, während diese beim Wildtyp nur 4 Tage andauert. In den Larven sind alle Imaginalscheiben deutlich vergrößert, wobei jedoch die Integrität der Scheiben erhalten bleibt, weshalb Lgd den hyperplastischen Tumorsuppressorgen zuzuordnen ist. Andere Defekte in den larvalen Organen konnten nicht gefunden werden [Bryant and Schubiger, 1971].

Erst 32 Jahre nach seiner Entdeckung konnte gezeigt werden, dass der *lgd*-mutante Phänotyp aus einer ektopischen Aktivierung des Notch-Signalweges resultiert [Klein,

2003]. Im Gegensatz zu *Igd*-homozygoten Tieren sterben transheterozygote Tiere, die ein Nullallel (*Igd^{d7}*) und ein hypomorphes Allel von *Igd* (*Igd^{SH495}*) tragen, erst kurz vor dem Schlüpfen als sogenannte „pharate adults“. Diese Fliegen zeigten einen Verlust von Mikro- und Makrochaeten, Duplikation oder Quadruplikation von Sockelzellen auf Kosten anderer Zellschicksale dieses Organs, Bildung von zusätzlichen Gelenken in den Beinen oder die Verkürzung bzw. Verlust von Flügelvenen (siehe Abb. 1.9) [Jaekel and Klein, 2006]. Diese Defekte können alle mit einer Überaktivierung des Notch-Signalwegs in Verbindung gebracht werden [Bang et al., 1991; Bishop et al., 1999; Celis and Bray, 2000], weshalb *Igd* ein genereller negativer Regulator der Notch-Aktivität zu sein scheint [Jaekel and Klein, 2006; Gallagher and Knoblich, 2006].

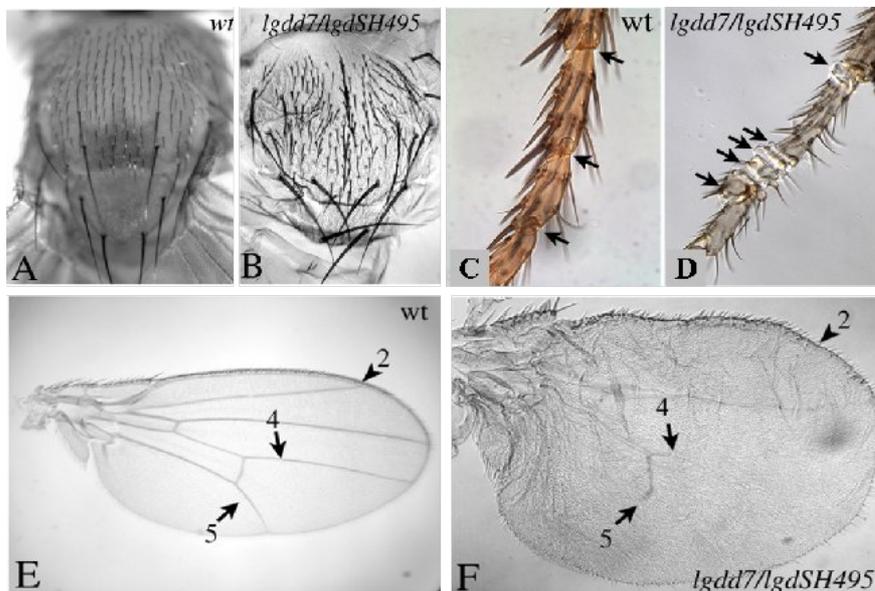


Abbildung 1.9: *Igd*-mutante Fliegen zeigen in verschiedenen Organen Effekte einer gesteigerten Notch-Aktivität

Die Abbildung zeigt die Borsten auf dem Notum (A, B), Beine (C, D) und Flügel (E, F) des Wildtyps und der transheterozygoten *Igd^{d7}/Igd^{SH495}*-Mutante. Diese Mutanten sterben kurz vor dem Schlüpfen als sogenannte „pharate adults“. Sie zeigen auf dem Notum einen Verlust von Mikro- und Makrochaeten und Duplikation oder Quadruplikation von Sockelzellen (hier nicht gezeigt). In den Beinen werden zusätzliche Gelenke gebildet (Pfeile in C und D) und den Verlust von Flügelvenen. (aus [Jaekel and Klein, 2006])

Eine genauere Analyse der Funktion von *Igd* wurde in der Beinimaginalscheibe, aber vor allem in der Flügelimaginalscheibe durchgeführt, aus der sich später die Hälfte des Notums und ein Flügel bildet (siehe Abb. 1.10). Die Flügelimaginalscheibe eignet sich dafür besonders gut, da hier die Bedeutung des Notch-Signalwegs für die

Entwicklung bekannt ist. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression der Notch-Zielgene *wg* (*wingless*), *ct* (*cut*), *Delta* (*DI*), *Serrate* (*Ser*), *vestigial boundary enhancer* (*vgBE*) in *Igd*-mutanten Flügelimaginalscheiben nicht mehr auf die dorsoventrale Grenze beschränkt ist, sondern eine massive Verbreiterung erfährt [Buratovich and Bryant, 1995; Klein, 2003]. Diese Beobachtung wurde auch bei überaktiven *Notch*-Allelen der *Abruptex*-Klasse oder bei der Überexpression von *Nintra* gemacht, da es auch hier wie in *Igd*-Mutanten zu einer starken Überproliferation des Flügelgewebes kommt [Couso et al., 1995; Celis and Bray, 2000; Diaz-Benjumea and Cohen, 1995; Klein et al., 1998]. Eine Steigerung der Notch-Aktivität bei Ausfall von *Igd* konnte mithilfe des sensitiven Gbe+Su(H)-Reporter [Furriols and Bray, 2001] in allen Zellen der Imaginalscheibe gefunden werden. Daher scheint *Igd* in allen Zellen der Flügelimaginalscheibe die Notch-Aktivität zu unterdrücken und nicht nur in denen, die an Notch-abhängigen Prozessen beteiligt sind.

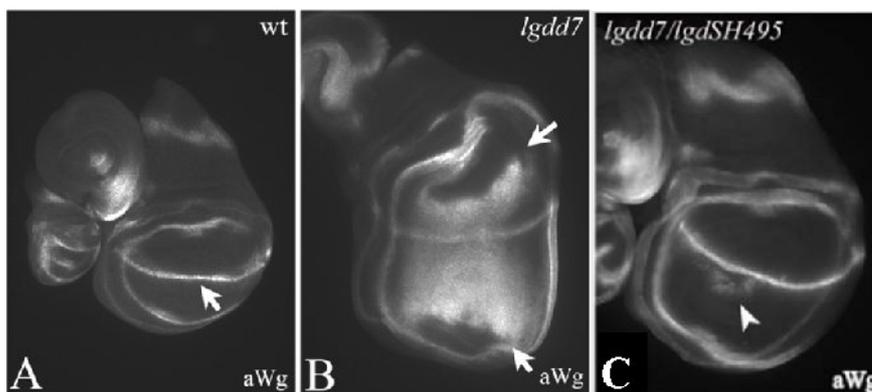


Abbildung 1.10: Verbreiterte Expression des Notch-Zielgens *wingless* (*wg*) in *Igd*-mutanten Flügel-imaginalscheiben

Während die *Wg*-Expression in wildtypischen Scheiben auf die dorso-ventrale Kompartimentätsgrenze (D/V-Grenze) beschränkt ist (Pfeil in A), sieht man in *Igd*⁷-homozygot mutanten Scheiben eine starke Expansion dieses Expressionsbereichs, der auf eine gesteigerte Notch-Aktivität zurückzuführen ist (Pfeile in B). In den transheterozygoten *Igd7/IgdSH495*-mutanten Scheiben ist dieser Effekt stark reduziert (Pfeilspitze in C). (aus Dissertation Robert Jaekel, 2006)

Eine Deregulation des Notch-Signalweges als Ursache des *Igd*-mutanten Phänotyps, konnte des weiteren durch die Unterdrückung des *Igd*-Phänotyps durch gleichzeitige Deletion von Mitgliedern des Notch-Signalweges wie z.B. *Presenilin* (*Psn*) oder *Su(H)* gezeigt werden. Diese beiden Gene sind epistatisch zu *Igd*, da *Igd; Psn* oder *Igd; Su(H)* doppelt-mutante Scheiben die Phänotypen von *Psn* oder *Su(H)*-Einzelmutanten zeigen [Klein, 2003]. Da der *Igd*-mutante Phänotyp also nur bei

einem intakten Notch-Signalweg hervortritt, ist es wahrscheinlich, dass dieser Phänotyp durch eine Deregulation dieses Signalwegs verursacht wird, wobei die Auswirkungen auf eine Steigerung der Aktivität schließen lassen.

Die Klonierung des *lgd*-Gens [Jaekel and Klein, 2006; Gallagher and Knoblich, 2006] erlaubte auch die Untersuchung der Effekte der Überexpression. Da der Ausfall von *lgd* zu einer ektopischen Notch-Aktivität führt, sollte die Überexpression in einer verminderten Aktivität resultieren. Diese Annahme konnte allerdings nur bei schwachen transgenen *lgd*-Linien beobachtet werden, da starke transgene Linien eine Mischung aus den Phänotypen zeigten, die bei Verlust bzw. Anstieg der Notch-Aktivität auftreten. Der unerwartete Anstieg der Notch-Aktivität bei *lgd*-Überexpression könnte dadurch erklärt werden, dass Faktoren, die die Notch-Aktivität negativ regulieren, durch die hohe Konzentrationen an Lgd herausitriert werden. Dies würde auch bedeuten, dass Lgd nicht alleine, sondern nur durch Bindung anderer Proteine die negative Regulation des Notch-Signalwegs verursacht.

Da bereits bekannt war, dass eine gesteigerte Notch-Aktivität durch Defekte beim endosomalen Transport des Notch-Rezeptors zum Lysosom verursacht werden kann [Moberg et al., 2005; Thompson et al., 2005; Vaccari and Bilder, 2005], wurde dies in *lgd*-mutanten als auch in starken *lgd*-überexprimierenden Zellen untersucht. Im Gegensatz zu wildtypischen Zellen treten in *lgd*-mutanten wie auch in *lgd*-überexprimierenden Zellen große endosomale Vesikel auf, die neben Wg und Df auch den kompletten Notch-Rezeptor (mit extra- und intrazellulären Domänen) enthalten [Jaekel and Klein, 2006]. Da die Internalisierungsrate des Notch-Rezeptors in diesen Zellen aber nicht verändert ist, entstehen die vergrößerten Vesikel vermutlich nicht durch eine gesteigerte Endozytose des Notch-Rezeptors, sondern durch einen Defekt beim Transport des Rezeptors zum Lysosom [Jaekel and Klein, 2006]. Diese Theorie wird von den Beobachtungen unterstützt, dass die vergrößerten Endosomen mit den Markern für späte Endosomen, Spin (spinster) und Rab7, und Ubiquitin kolokalisiert. Daher scheint der Notch-Rezeptor in *lgd*-mutanten Zellen in einem späten endosomalen Kompartiment zu akkumulieren [Jaekel and Klein, 2006]. Ein weiterer Hinweis auf eine Beteiligung von Lgd am endosomalen Transport von Notch lieferte die Beobachtung, dass die ektopische Aktivierung des Notch-Signalwegs bei *lgd*-Ausfall durch die Expression von GFP-Rab5, GFP-Rab7 oder

der FYVE-Domäne oder durch Ausfall von Hrs gerettet werden konnte [Jaekel and Klein, 2006]. Die Ursache dieser Rettung liegt vermutlich darin, dass der Transport der abzubauenen, ubiquitinierten Proteine zum Lysosom verlangsamt oder ganz blockiert wird. Dadurch kann der Notch-Rezeptor womöglich nicht in dem Kompartiment akkumulieren, in dem er sich in *lgd*-mutanten Zellen anreichert und scheinbar auch aktiviert wird.

Die Beobachtung, dass die Expression dieser Proteine oder der Ausfall von Hrs nur zur Unterdrückung der verbreiterten Expressionsdomäne von Notch-Zielgenen nicht aber zu einer Unterbrechung ihrer normalen Notch-abhängigen Expression an der dorsoventralen Grenze führt, konnte dadurch erklärt werden, dass die ektopische Aktivierung des Notch-Signalwegs in *lgd*-Mutanten unabhängig von den Liganden Delta und Serrate [Jaekel and Klein, 2006] ist. Außerdem ist diese Aktivierung unabhängig von der den S2-Schnitt vermittelnden ADAM-Protease Kuzbanian (Thomas Klein unveröffentlichte Daten), aber immer noch angewiesen auf den γ -Sekretase-Komplex [Klein, 2003].

Einige *lgd*-Phänotypen können allerdings nicht mit einer deregulierten Notch-Aktivität in Verbindung gebracht werden. Dazu zählen die verstärkte Apoptose innerhalb *lgd*-mutanter Klone in der Flügeltasche und Auswucherungen von *lgd*-Klone im Notum der Flügelimaginalscheibe [Jaekel and Klein, 2006]. Außerdem bleibt festzustellen, weshalb der Ausfall von *Lgd* nur zu einer veränderten Aktivität des Notch-Signalweges führt, obwohl sich in den vergrößerten Vesikel auch Signalmoleküle anderer Signalwege anreichern [Jaekel and Klein, 2006].

Zusammenfassend scheint *Lgd* am konstitutiven Transport des nicht-aktivierten Notch-Rezeptors beteiligt zu sein. Bei Ausfall von *Lgd* akkumuliert der vollständige Notch-Rezeptor in einem späten endosomalen Kompartiment und wird durch einen noch nicht aufgeklärten, liganden-unabhängigen Mechanismus aktiviert. Einen Hinweis auf die Möglichkeit einer Aktivierung des Rezeptors in einem späten endosomalen Kompartiment gibt die Beobachtung, dass der zur Aktivierung benötigte γ -Sekretase-Komplex eine optimale Aktivität bei niedrigem pH (~4.5) zeigt und auch in Lysosomen gefunden wurde (Pasternak et al., 2003).

Die molekulare Charakterisierung ergab, dass das Lgd-Protein in *Drosophila* von der Transkriptionseinheit CG4713 kodiert wird [Jaekel and Klein, 2006; Gallagher and Knoblich, 2006]. Das resultierende Protein besteht aus 816 Aminosäuren und beinhaltet vier Wiederholungen einer DM14-Domäne [Ponting et al., 2001], sowie eine C2-Domäne. Die DM14-Domäne wurde in einem Screen zur Identifizierung sich wiederholender Domäne innerhalb eines Polypeptids als 14. Domäne in *Drosophila melanogaster* gefunden und erhielt so auch ihren Namen [Ponting et al., 2001]. Die Funktion dieser ca. 59 Aminosäuren umfassenden Domäne, die in *Drosophila* nur in Lgd vorkommt, ist bisher noch unbekannt. C2-Domänen vermitteln sowohl Interaktionen zwischen Proteinen und Phospholipiden als auch zwischen Proteinen und Proteinen [Übersicht in Nalefski and Falke, 1996]. Dabei gibt es Kalzium-abhängige und unabhängige Formen, wobei für die Bindung der Kalzium-Ionen fünf Aspartatreste wichtig sind [Ponting and Parker, 1996]. Da in der C2-Domäne von Lgd drei dieser Aspartatreste fehlen, ist diese Domäne vermutlich Kalzium-unabhängig [Jaekel and Klein, 2006; Ou et al., 2003]. Da die Deletion der C2-Domäne zu einer Kernlokalisierung des normalerweise zytoplasmatischen Lgd-Proteins führt, scheint die C2-Domäne von Lgd für die Lokalisation des Proteins wichtig zu sein (Dissertation Robert Jaekel; Tobias Troost unveröffentlichte Daten).

Die Struktur des Lgd-Proteins scheint im gesamten Tierreich von den Schleimpilzen bis zum Menschen konserviert zu sein [Jaekel and Klein, 2006; Gallagher and Knoblich, 2006]. Bei den Vertebraten tritt allerdings neben einer *Drosophila*-ähnlichen Variante noch eine weitere Form auf, die sich durch einen längeren Bereich hinter der C2-Domäne auszeichnet (siehe Abb. 1.11).

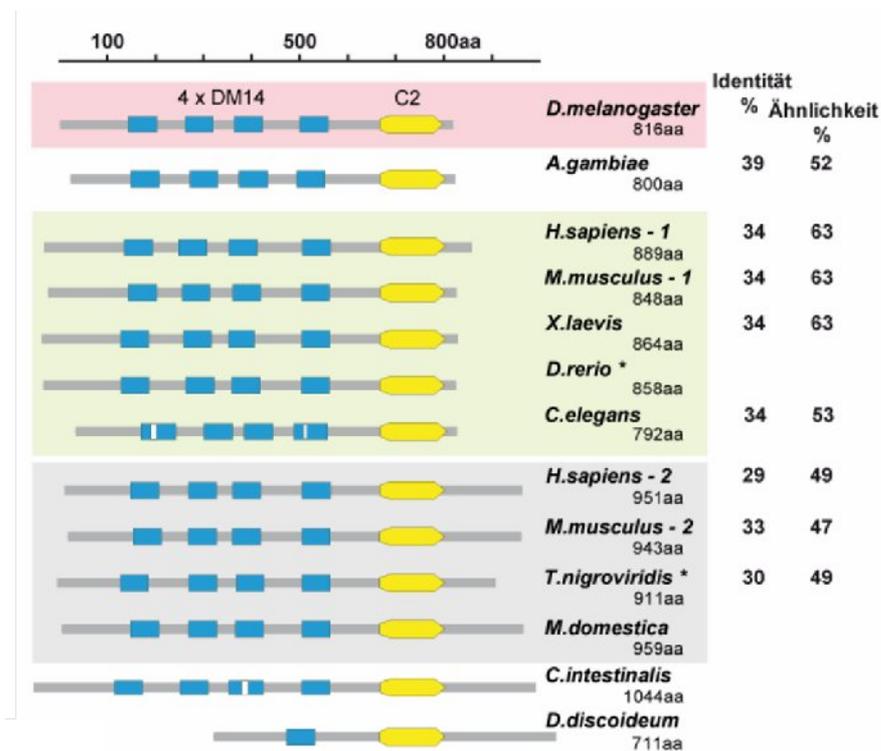


Abbildung 1.11: Hohe Konservierung der Proteinstruktur von Lgd

Die Abbildung zeigt auf der linken Seite die schematische Proteinstruktur einiger Lgd-Orthologe. Die Angaben zur Identität und Ähnlichkeit gegenüber dem Fliegen-Lgd sind vom NCBI übernommen. Vertebraten zeigen zwei Lgd-Orthologe, die sich in der Länge ihrer C-terminalen Sequenz nach der C2-Domäne unterscheiden. [Jaekel and Klein, 2006]

Neben der Struktur scheint auch die Funktion konserviert zu sein, da der *lgd*-mutante Phänotyp in der Flügelimaginalscheibe durch Expression der murinen Orthologe unterdrückt werden konnte [Jaekel and Klein, 2006].

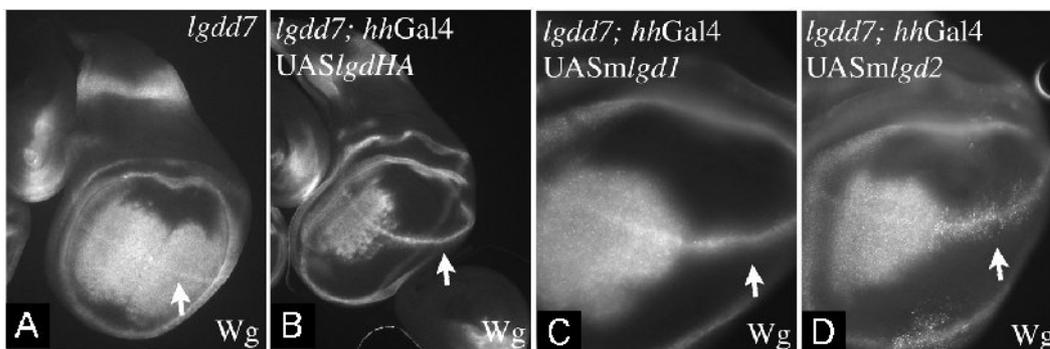


Abbildung 1.12: Rettung des *lgd*-Phänotyps durch die murinen Orthologe *mldg1* und *mldg2*

Im *lgd*-mutanten Hintergrund wurde die cDNA des *Drosophila lgd*-Gens sowie die der beiden murinen *lgd*-Orthologe, *mldg1* und *mldg2*, als UAS-Konstrukt mit der *hhGAL4*-Linie im posterioren Kompartiment exprimiert. Wie das Lgd aus *Drosophila* können die beide murinen Orthologe die normale Expression von Wg wiederherstellen. [Jaekel and Klein, 2006]

1.4.1 Funktionen der Lgd-Orthologen in Säugetieren

Den *lgd*-Orthologen von Maus/Ratte und Mensch werden unterschiedliche Funktionen zugesprochen, die hier kurz erläutert werden sollen. Dabei ist zu beachten, dass die beiden Lgd-Orthologen, die in dieser Arbeit mLgd1 und mLgd2 genannt werden, von verschiedenen Arbeitsgruppen unterschiedliche Namen erhalten haben (mLgd1 = CC2D1B / Freud-2; mLgd2 = CC2D1A / Freud-1 / Aki1). Zur besseren Klarheit wird im folgenden immer der Name des murinen Orthologs in Klammern angeführt.

Im Menschen wurde das Gen *CC2D1A* (coiled-coil and conserved region 2 (C2) domain containing 1A; „mLgd2“) bereits 2003 in einer Studie zur Identifizierung neuer humaner Gene, die den NF- κ B-Signalweg aktivieren, gefunden [Matsuda et al., 2003]. Seine Expression führt zu einer gesteigerten Transkription eines Luziferase-Reporter-Gens, das von einem Promotor mit NF- κ B-Bindestellen gesteuert wurde.

Eine Mutation in *CC2D1A* wurde im Menschen bereits mit einer autosomal rezessiv vererbten Form einer schweren geistigen Behinderung in Verbindung gebracht, die sich durch eine verzögerte psychomotorische Entwicklung in der frühen Kindheit sowie gravierende kognitive Defizite auszeichnet [Basel-Vanagaite et al., 2006]. Da die geistige Behinderung aber nicht von anatomischen oder neurologischen Auffälligkeiten begleitet wird, ist sie in die Klasse der nicht-syndromischen mentalen Retardierung (NSMR) einzustufen. Die die Krankheit verursachende Mutation bestand in der Deletion der Exons 14, 15 und 16, die den Verlust der letzten DM14- und der C2-Domäne zur Folge hat [Basel-Vanagaite et al., 2006]. Wie diese Mutation zur Entstehung dieser Krankheit führt, konnte allerdings nicht geklärt werden.

Eine Rolle von Freud-1 („mLgd2“) und Freud-2 („mLgd1“) als Transkriptionsfaktoren legen Versuche mit Zellkulturlinien aus der Ratte nahe, in denen gezeigt wurde, dass beide Proteine über die Bindung an eine spezielle regulatorische Region die basale Transkription des Serotonin-1A-Rezeptors reprimieren [Ou et al., 2003; Hadjighassem et al., 2009]. Diese sogenannte DRE (*dual repressor element*)-Region besteht aus den beiden Teilelementen FRE (*five prime repressive element*) und TRE (*three prime repressive element*). Da *CC2D1A* an die FRE-Sequenz bindet, erhielt es

den Namen Freud-1 (FRE under dual repression binding protein-1). CC2D1B/Freud-2 bindet ebenfalls an das DRE-Element und zwar an eine Sequenz, die teilweise mit der der von Freud-1 übereinstimmt [Hadjighassem et al., 2009]. Beide Proteine werden im Gehirn von Ratten und Menschen exprimiert, wobei sich das Expressionsmuster jedoch unterscheidet. Da in diesen Regionen auch der Serotonin-1A-Rezeptor exprimiert wird, könnten diese Proteine auch *in vivo* an der Regulation dieses Rezeptors beteiligt sein [Ou et al., 2003; Rogaeva and Albert, 2007]. Der Serotonin-1A-Rezeptor fungiert als Autorezeptor, der nach Aktivierung die serotonerge Neurotransmission inhibiert. Dies geschieht unter anderem durch das Verhindern der Freisetzung von Serotonin in den synaptischen Spalt. Eine verminderte Serotonin-Ausschüttung wird oft mit Angstzuständen und Depressionen in Verbindung gebracht. Tatsächlich konnte bei Selbstmordopfern mit schweren Depressionen in bestimmten Hirngebieten eine erhöhte Dichte des Serotonin-1A-Rezeptors festgestellt werden. Daher scheint eine erhöhte basale Expression dieses Rezeptors und damit eine verminderte Serotonin-Ausschüttung eine Prädisposition zur Entwicklung von Depressionen und Angstzuständen zu sein.

Des weiteren scheint CC2D1A („migd2“) als eine Art Gerüstprotein im EGF-abhängigen PDK1/Akt-Signalweg zu fungieren, was in Versuchen mit humanen Zellkulturlinien gezeigt werden konnte [Nakamura et al., 2008]. Hierbei wurde CC2D1A zunächst als Interaktionspartner von PDK1 (*3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1*) identifiziert, weshalb ihm der Name Aki1 (*Akt-kinase-interacting protein*) gegeben wurde. Des weiteren konnte eine Interaktion mit Akt und dem EGF-Rezeptor gefunden werden. Im vorgestellten Modell (siehe Abb. 1.13) bildet Aki1 nach EGF-Stimulation mit Akt und dem EGF-Rezeptor einen Komplex, der in der PDK-vermittelten Phosphorylierung und damit Aktivierung von Akt resultiert. Daher scheint Aki1 sozusagen eine Plattform für die EGF-abhängige Phosphorylierung von Akt durch PDK1 zu sein [Nakamura et al., 2008].

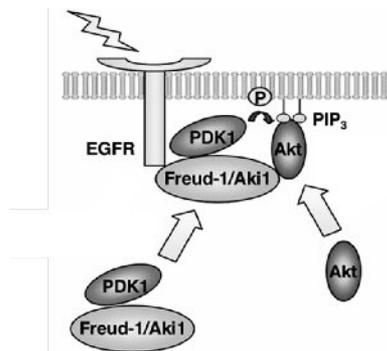


Abbildung 1.13: Schematische Darstellung der Funktion von Akt1/Freud-1 als Gerüstprotein für PDK1 und Akt im EGF-Signalweg

Nach EGF-Stimulation bildet Freud-1/Aki1/CC2D1A mit dem EGF-Rezeptor und Akt einen Komplex, wodurch PDK1 Akt phosphorylieren kann. Dabei scheint PIP3 die Interaktion zwischen Akt und Freud-1/Aki1 an der Membran zu erleichtern. [aus Nakamura et al., 2008]

Des Weiteren ist Akt1 vermutlich an der Zellteilung beteiligt, da es mit Zentrosomen assoziiert ist und so die Spindelpol-Lokalisation der Cohesin-Untereinheit Scc1 vermittelt. Dadurch wird die Kohäsion der Zentriolen bis zum Beginn der Anaphase aufrecht erhalten [Nakamura et al., 2009]. Für die Bindung an Scc1 scheint eine Phosphorylierung von Akt1 wichtig zu sein, die durch den Cyclin B1-Cdk1-Komplex durchgeführt wird [Nakamura et al., 2010].

1.5 Ziele der Arbeit

Das Gen *lethal (2) giant discs* ist in *Drosophila melanogaster* an der Regulation des Notch-Signalwegs beteiligt. Hierbei scheint es eine Funktion beim endosomalen Transport des Notch-Rezeptors auszuüben, deren Mechanismus aber noch nicht bekannt ist. Des Weiteren ist unklar, ob die Funktion von Lgd als negativer Regulator der Notch-Aktivität auch in höheren Organismen konserviert ist. Untersuchungen aus *Drosophila* legen dies allerdings nahe, da die Mausorthologen den *lgd*-Phänotyp in der Flügelimaginalscheibe retten konnten.

Um diese Fragen zu klären, sollten in dieser Arbeit zwei Ziele verfolgt werden, die im folgenden kurz erläutert werden.

Im ersten Projekt sollten Interaktionspartner von Lgd durch genetische und biochemische Experimente gefunden werden, um darüber Hinweise auf den Prozess zu erhalten, über den Lgd den Transport des Notch-Rezeptors reguliert. Des Weiteren sollte die Bedeutung der DM14- und der C2-Domäne für die Interaktion mit diesen Proteinen untersucht werden.

Im zweiten Projekt sollten konditionale Knockout-Mäuse für die beiden *lgd*-orthologen Gene *mlgd1* und *mlgd2* generiert werden, um Einblicke in die Funktion von Lgd in den Vertebraten zu erlangen. Dabei sollte zunächst die Analyse der vollständigen Inaktivierung der einzelnen Gene erfolgen. Dabei könnte die mögliche funktionelle Redundanz von *mlgd1* und *mlgd2* dazu führen, dass nur der gleichzeitige Ausfall beider Gene (Doppelknockout) in detektierbaren Defekten resultiert.

2. Ergebnisse

2.1 Projekt 1: Identifizierung von Interaktionspartnern des Proteins Lgd (Lethal (2) giant discs) in *Drosophila melanogaster*

Für die Aufklärung des Mechanismus über den Lgd den Transport des Notch-Rezeptors im endosomalen System reguliert, sollten Interaktionspartner dieses Proteins sowohl durch biochemische als auch durch genetische Experimente identifiziert werden. Da auch die ESCRT-Proteine am Transport dieses Rezeptors beteiligt sind und Yeast-Two-Hybrid-Experimente mit dem humanen Lgd auf eine Interaktion mit diesen Proteinen hindeuteten [Tsang et al., 2006], waren die Proteine des Notch-Signalwegs und der ESCRT-Komplexe erste mögliche Kandidaten als Interaktionspartner für Lgd.

2.1.1 Lgd interagiert nicht mit dem Notch-Rezeptor

Als erstes Experiment sollte die Interaktion zwischen HA-markiertem Lgd und dem endogenen Notch-Rezeptor getestet werden. Dazu wurden Koimmunopräzipitationen mit den Lysaten von wildtypischen Larven (*w*) und Larven, in denen UAS-*lgd-HA* mit einem *hsGAL4*-Treiber exprimiert wurde, durchgeführt. Wie man in Abb. 2.1 sieht, konnte Notch nicht mit Lgd-HA kopräzipitiert werden, obwohl ausreichend Notch-Protein im verwendeten Lysat vorhanden war (siehe „Input“ und „Überstand“). Daher besteht anscheinend keine direkte Interaktion zwischen Lgd und dem Notch-Rezeptor. Es muss allerdings beachtet werden, dass aufgrund nicht vorhandener Antikörper keine Positiv-Kontrolle durchgeführt werden konnte.

Der Western-Blot zeigt auch das unerwartete Laufverhalten des Lgd-Proteins, welches mit einem berechneten Molekulargewicht von 90 kDa in drei Banden 140, 120 und 80 kDa detektiert wird (siehe Abb.2.1). Die Ursachen für dieses Laufverhalten konnten bisher nicht geklärt werden.

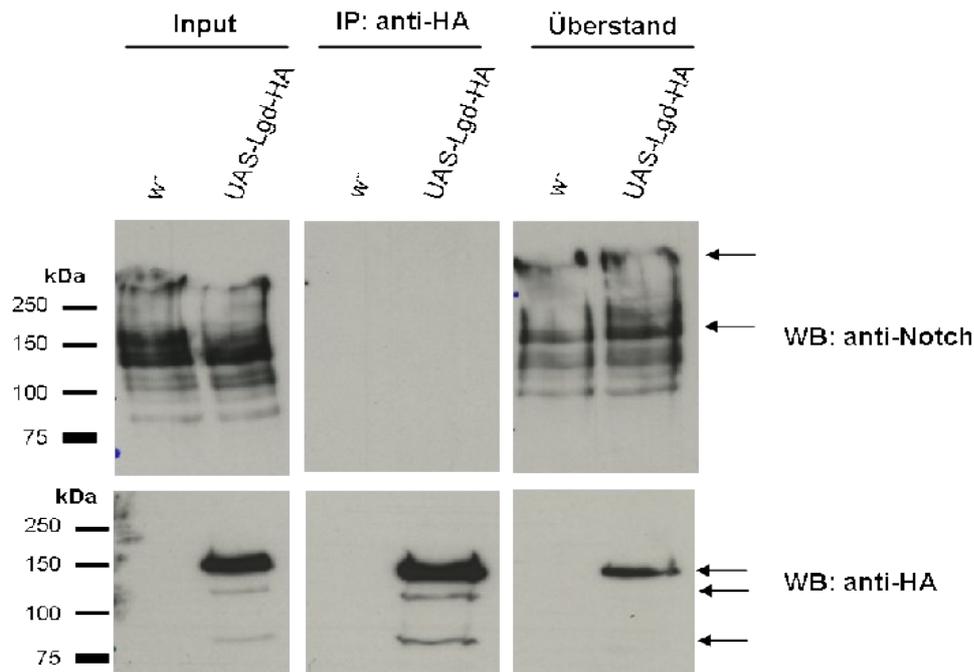


Abbildung 2.1: Koimmunopräzipitation von Lgd-HA und Notch

Für diese Koimmunopräzipitation wurden die Lysate von je 30 Larven verwendet und das Lgd-Protein mit dem HA-Antikörper präzipitiert. Für den Western-Blot wurden je 6,25 % des Lysats als Input-Kontrolle und 10% des Überstandes (der die nicht gebundenen Proteine enthält) verwendet. Das Eluat der Koimmunopräzipitation (IP) wurde komplett aufgetragen. Nach der Behandlung mit anti-Notch (1:1000) wurde der Blot gestrippt und mit anti-HA (1:3000) inkubiert. In diesem Blot erkennt man den charakteristischen Schmier des Notch-Proteins im Western-Blot mit den deutlichen Banden bei 350 kDa (kompletter Notch-Rezeptor) und 120 kDa (intrazellulärer Bereich, Nintra). Eine Interaktion zwischen Lgd und Notch ist nicht erkennbar.

2.1.2 Mögliche Interaktionspartner sind ESCRT-Proteine

Im Vorfeld dieser Arbeit war bereits ein genetischer Screen mit einem Defizienzen-Kit (Bloomington, Version 2006) durchgeführt worden, bei dem Modifikatoren des *lgd*-Überexpressions-Phänotyps im Flügel identifiziert werden sollten (siehe Diplomarbeit Alexandra Böcke). Für die Überexpression von *UAS-lgd¹⁵* wurde der *C5-GAL4*-Treiber verwendet. Dieser sorgt in der Flügelimaginalscheibe für eine Expression von UAS-Konstrukten in der gesamten Flügeltasche, jedoch nicht an der dorsoventralen Grenze [Gustafson and Boulianne, 1996]. Daher sind Veränderungen im ganzen Flügel mit Ausnahme des Flügelrandes, der aus der dorsoventralen Grenze entsteht, zu erwarten. Die Abbildung 2.2 gibt eine Übersicht über die verschiedenen Regionen der Flügelimaginalscheibe und den entsprechenden Strukturen im adulten Flügel.

Der verwendete UAS-*Igd*¹⁵;C5-GAL4-Stamm zeigt einen gemischten Phänotyp. Zum einen kommt es zu Verbreiterungen bis zu Verschmelzungen von Flügelvenen (siehe Pfeile Abb. 2.3 B), die auf einer verminderte Notch-Aktivität hindeuten, zum anderen aber auch zu Unterbrechungen von Flügelvenen (siehe Pfeilspitzen Abb. 2.3 B), was für eine erhöhte Notch-Aktivität spricht. Dieser Stamm wird im folgenden als *Igd*-Überexpressionsstamm bezeichnet.

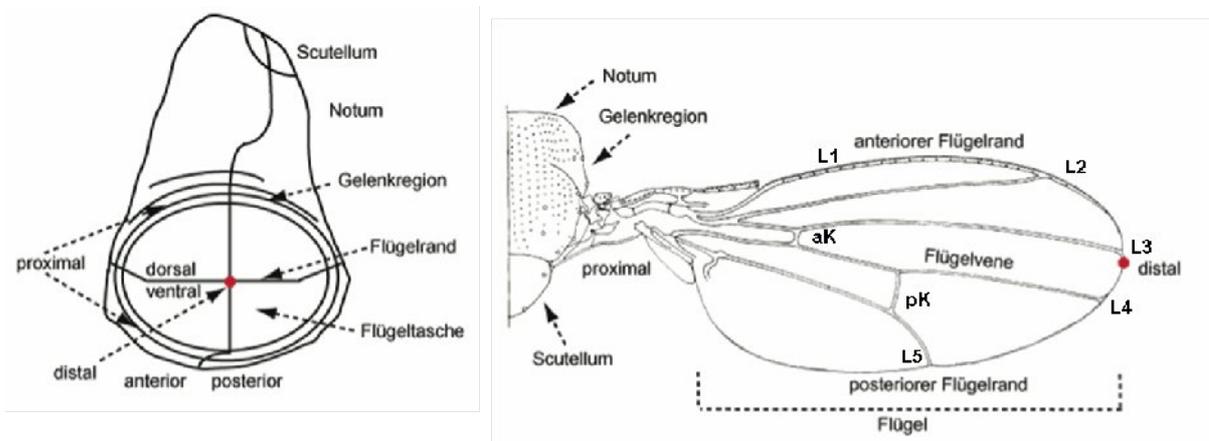


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung der Flügelimaginalscheibe und des adulten Flügels

Das Schema zeigt links eine Flügelimaginalscheibe aus dem dritten Larvenstadium und rechts den adulten Flügel. Neben den Kompartimentsgrenzen (dorsal/ventral, anterior/posterior) ist angegeben, aus welchen Regionen der Flügelimaginalscheibe sich später die adulten Strukturen entwickeln. Der rote Punkt in der Mitte der Imaginalscheibe zeigt den später am weitesten distal liegenden Punkt des Flügels.

aK = anteriore Kreuzvene, pK = posteriore Kreuzvene; L1-L5 = Flügelvenen (modifiziert aus [Bryant, 1975] und [Heitzler et al., 1996])

Durch den *Igd*-Überexpressions-Phänotyp im Flügel konnte ein sensibilisierter genetischer Hintergrund generiert werden, in dem auch rezessive Gene eine Modifikation der Phänotyps bewirken könnten. In dieser Arbeit sollten die Ergebnisse des initialen Screens geprüft werden und so mögliche Interaktionspartner von *Lgd* identifiziert werden. Bei den nachfolgenden Beschreibungen der Effekte der Defizienzen ist anzumerken, dass mit einer Verstärkung des Phänotyps eine weitere Entfernung vom Wildtypflügel gemeint ist.

Die Defizienzen #3591 und #4966 (genaue Bezeichnung im Abbildungstext 2.3) zeigten beide eine solche starke Verstärkung des Phänotyps. In der F1-Generation waren die Flügel sehr klein, zeigten fast keine Flügelvenen und die Adhäsion

zwischen dorsalem und ventralem Flügepithel ging fast im ganzen Flügel verloren (siehe Abb. 2.3 D,F). Im Überlappungsbereich dieser beiden Defizienzen (siehe Abbildungstext 2.3) liegt unter anderem das Gen *shrub* (CG8055), welches eine ESCRT-III-Komponente kodiert. Um zu testen, ob die durch die Defizienzen hervorgerufenen Effekte durch die Deletion dieses Gens verursacht wurden, erfolgte eine Kreuzung von Fliegen mit einem Nullallel für *shrub* (*shrub*⁴⁻¹) gegen den *lgd*-Überexpressionsstamm. Hierbei zeigte sich, dass der Ausfall einer Kopie des *shrub*-Gens ebenfalls zu einer drastischen Verstärkung des *lgd*-Überexpressionsphänotyps führt (siehe Abb. 2.3 I). Diese Verstärkung ist aber nicht so stark wie der der Defizienzen, da der Flügel nur leicht verkleinert ist und sich die Adhäsionsprobleme auf den distalen Abschnitt des Flügels beschränken. Außerdem werden die Flügelvenen gebildet, wobei es allerdings zu einer starken Verbreiterung (besonders Flügelvene 1 und 5, siehe Abb. 2.3 I) kommt.

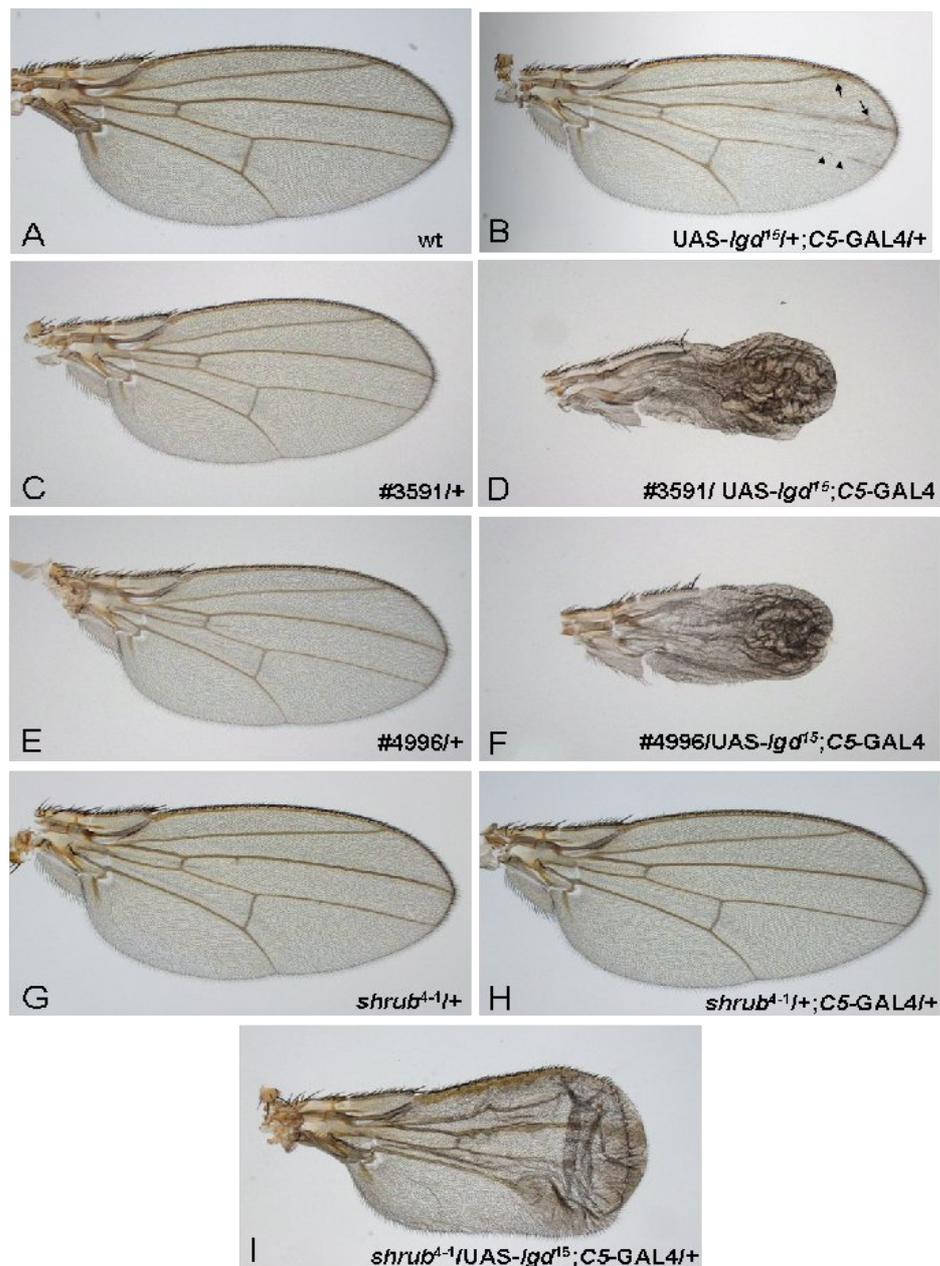


Abbildung 2.3: Flügel der Nachkommen aus den Kreuzungen des *Igd*-Überexpressionsstamms gegen *shrub*-enthaltende Defizienzen oder das *shrub*⁴⁻¹-Allel

In A ist ein Wildtyp-Flügel und in B ein Flügel des *Igd*-Überexpressionsstamms gezeigt, der sowohl Zeichen einer gesteigerten Notch-Aktivität (Unterbrechung/Verlust von Flügelvenen, siehe Pfeilspitzen) als auch Effekte einer verminderten Notch-Aktivität (Verbreiterung/Verschmelzung von Flügelvenen, siehe Pfeile) aufweist. Gegen diesen Stamm wurden die Defizienzen #3591 und #4966, sowie das *shrub*-Nullallel *shrub*⁴⁻¹ gekreuzt. Hierbei zeigte das *shrub*-Allel eine deutliche Verstärkung des *Igd*-Phänotyps (I), die aber deutlich schwächer als in den Defizienzen war (E,F).

Die Genotypen und die jeweils deletierten Chromosomenabschnitte der Defizienzen-Stämme, sowie die Lage des *shrub*-Gens sind im folgenden angegeben (Angaben von Bloomington, FlyBase).

#3591 = w[1]; Df(2R)Np5, In(2LR)w45-32n, cn[1]/CyO
 #4966 = w[1]; Df(2R)w45-30n, cn[1]/CyO

deletiertes Segment = 44F11-45E1
 deletiertes Segment = 45A6-45E3
shrub (CG8055) = 45A12-45E

Die F1-Nachkommen der Kreuzung des *Igd*-Überexpressionsstamms gegen die *shrub*-enthaltenden Defizienzen #3591 und #4966 zeigten außerdem den Verlust aller vier scutellaren Borsten (siehe Abb. 2.4). Dies wurde im *Igd*-Überexpressionsstamm sowie nach Kreuzung gegen das *shrub*⁴⁻¹-Allel nicht beobachtet. Daher scheinen andere Gene in dem sich überlappenden Bereich der beiden Defizienzen zu liegen, die sowohl für die stärkere Verkleinerung des Flügels als auch für den scutellaren Borstenverlust, der auf eine Überaktivierung des Notch-Signalwegs hindeutet, verantwortlich sind.



Abbildung 2.4: Scutellarer Borstenverlust nach Kreuzung der Defizienzen #3591 und #4966 gegen den *Igd*-Überexpressionsstamm

Die vier im Wildtyp (A) deutlich erkennbaren Borsten des Scutellums, sind in den F1-Nachkommen der Kreuzung der Defizienzen #3591 und #4966 gegen den *Igd*-Überexpressionsstamm nicht mehr vorhanden. Teilweise treten sogar Duplikationen von Sockelzellen auf (Pfeilspitzen in C). Diese Defekte deuten auf eine gesteigerte Notch-Aktivität hin.

Auch die Kreuzung gegen die Defizienzen #3096 und #3686 führten zu einer Verstärkung des Phänotyps, der allerdings nicht so stark wie bei den *shrub*-enthaltenden Defizienzen war (Abb. 2.5 D,F). Hier kam es zu einem starken Verlust der Flügelvenen im distalen Bereich des Flügels, wobei bei der Kreuzung gegen #3686 nur der posteriore Teil des Flügels betroffen war (siehe Abb. 2.5 F). Venen, die bis zum Flügelrand reichten, zeigten deltaförmige Ausläufer und im distalen Abschnitt kam es zu schwachen Adhäsionsdefekten. Im Gegensatz zu #3096 führte eine Kreuzung gegen #3686 außerdem zu Verbreiterungen von Venen (besonders bei der dritten Flügelvene). In beiden Defizienzen liegt das ESCRT-Gen *vps2* (CG4618) für das leider kein Nullallel zur Verfügung stand, um den Effekt der Defizienzen diesem Gen zuschreiben zu können.

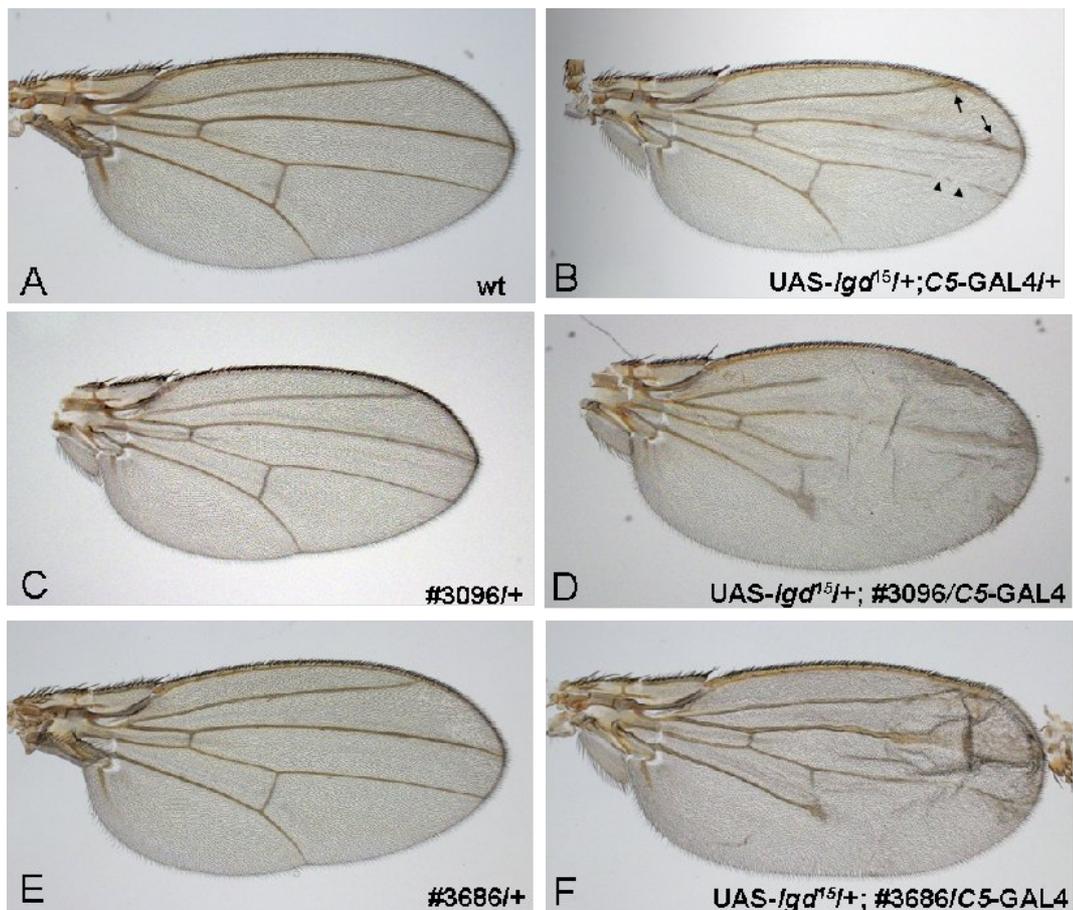


Abbildung 2.5: Flügel der Nachkommen aus den Kreuzungen des *lgd*-Überexpressionsstamms gegen Defizienzen, die *vps2* (CG4618) deletieren

In A bzw. B ist ein Wildtyp-Flügel bzw. Flügel des *lgd*-Überexpressionsstamms gezeigt. Gegen diesen Stamm wurden die Defizienzen #3096 und #3686 gekreuzt, die eine Verstärkung des *lgd*-Phänotyps hervorriefen (D, F). Auffällig war hier der starke Verlust von Flügelvenen (besonders in D) und deren Verbreiterung (F), sowie die Adhäsionsdefekte im distalen Bereich.

Die Genotypen und die jeweils deletierten Chromosomenabschnitte, sowie die Lage des *shrub*-Allels sind im folgenden angegeben (Angaben von Bloomington, FlyBase).

#3096 = Df(3L)ZN47, ry[506]/TM3, Sb[1]

deletiertes Segment = 64C-65C

#3686 = Df(3L)GN24/TM8, l(3)DTS4[1]

deletiertes Segment = 63F6-64C15

vps2(CG4618) = 64C7

Kreuzungen des *lgd*-Überexpressionsstamms gegen die Defizienzen #5601 und #9500 führte in der F1-Generation zu einer starken Verbreiterung der Flügelvenen (besonders der dritten Flügelvene, siehe Abb. 2.6 D, F). Im Bereich des Flügelrandes kam es zu deltaförmigen Ausläufern, die bei der ersten und zweiten Flügelvene in einer Verschmelzung resultierten. Außerdem wurde manchmal eine Verkürzung der fünften Flügelvene und der Verlust der posterioren Kreuzvene (pK) beobachtet. Adhäsionsdefekte traten in schwacher Form im Bereich der posterioren Kreuzvene

auf. In beiden Defizienzen war das Gen CG14542 deletiert und ein Vergleich der Aminosäure-Sequenzen zeigte eine hohe Homologie zu dem *CHMP2A*-Ortholog aus Mensch und Maus. Daher wurde dieses Gen *vps2A* genannt, während das bereits bekannte *vps2*-Gen (CG4618) in *vps2B* umbenannt wurde, da es größere Ähnlichkeiten zu den *CHMP2B*-Orthologen zeigt.

Da für das *vps2A*-Gen die Nullallele *vps2^{PP6}* zur Verfügung stand, konnten seine Auswirkungen auf den *Igd*-Überexpressionsphänotyp analysiert werden. Wie in Abb. 2.6 I abgebildet, kommt es wie bei den Defizienzen zu Verbreiterungen bis zu Verschmelzungen von Flügelvenen, aber auch zum Verlust der posterioren Kreuzvene, weshalb der in den Defizienzen hervorgerufene Phänotyp maßgeblich durch den Ausfall des *vps2A*-Allels verursacht wird.

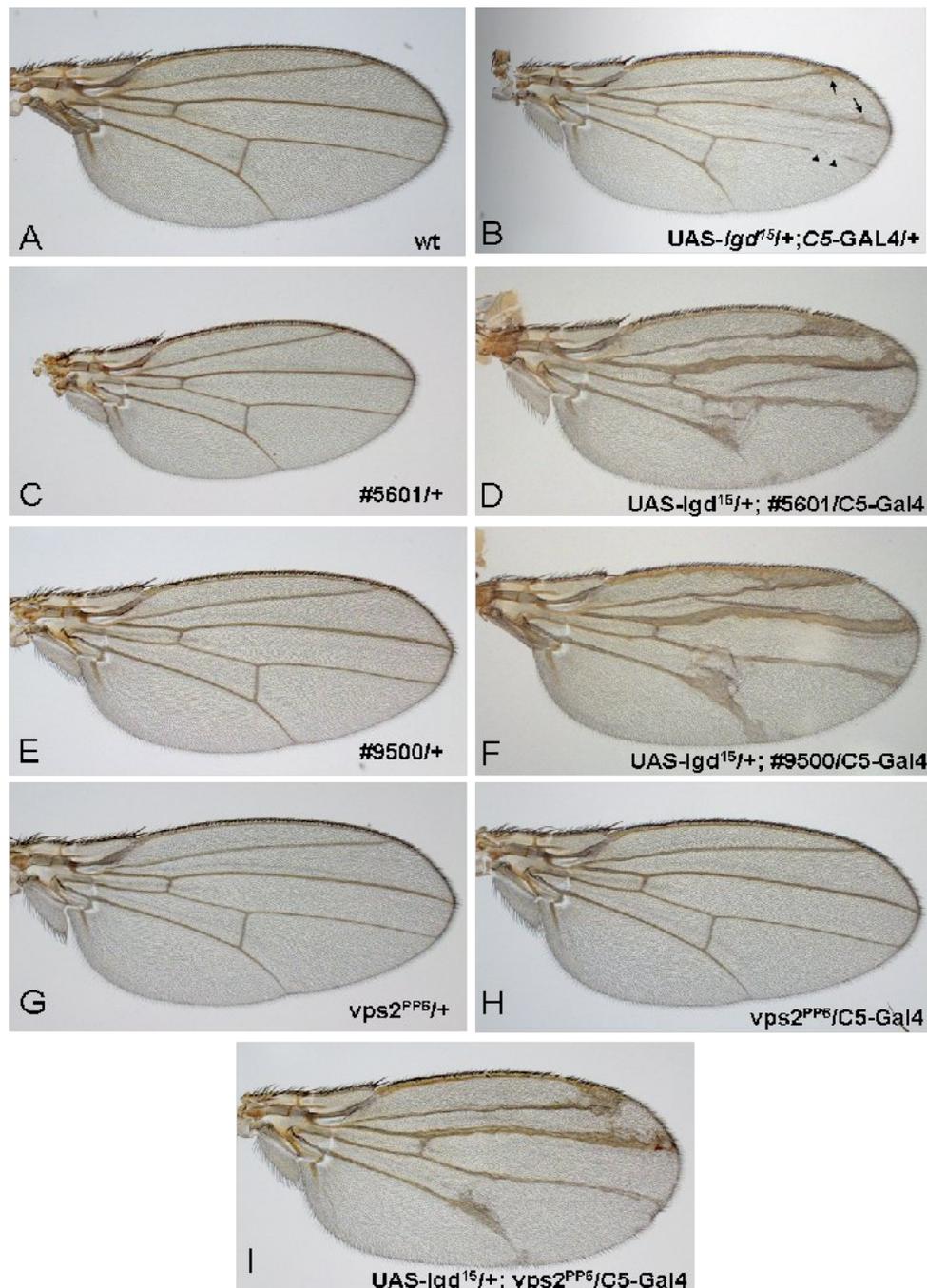


Abbildung 2.6: Flügel der Nachkommen aus den Kreuzungen des *Igd*-Überexpressionsstamms gegen *vps2*(CG14542)-enthaltende Defizienzen oder das *vps2*^{PP6}-Allel

In A bzw. B ist ein Wildtyp-Flügel bzw. Flügel des *Igd*-Überexpressionsstamms gezeigt. Gegen diesen Stamm wurden die Defizienzen #5601 und #9500, sowie das *vps2*-Nullallel *vps2*^{PP6} gekreuzt. Hierbei zeigte das *vps2*-Allel in eine deutliche Verstärkung des *Igd*-Phänotyps (I), die schwächer als in den Defizienzen war (E,F). Auffällig waren hier die starke Verbreiterung der Flügelvenen als auch der Verlust der posterioren Kreuzvene.

Die Genotypen und die jeweils deletierten Chromosomenabschnitte, sowie die Lage des shrub-Allels sind im folgenden angegeben (Angaben von Bloomington, FlyBase).

#5601 = Df(3R)EspI3/TM6C, cu[1] Sb[1] Tb[1] ca[1] deletiertes Segment: 96F1-97B1
 #9500 = w[1118]; Df(3R)BSC140/TM6B, Tb[+] deletiertes Segment: 96F1-96F10
vps2 (CG14542) = 96F10

Des weiteren zeigte die Kreuzung des Nullallels *vps20³* gegen den *Igd*-Überexpressionsstamm ebenfalls eine Verstärkung des *Igd*-Phänotyps, die allerdings nicht so stark wie bei den *vps2*-Genen oder dem *shrub*-Gen ausfiel (Abb.2.7 E). Neben stärkeren deltaförmigen Ausläufern der Flügelvenen am Flügelrand kam es häufig zu dem Verlust der posterioren Kreuzvene.

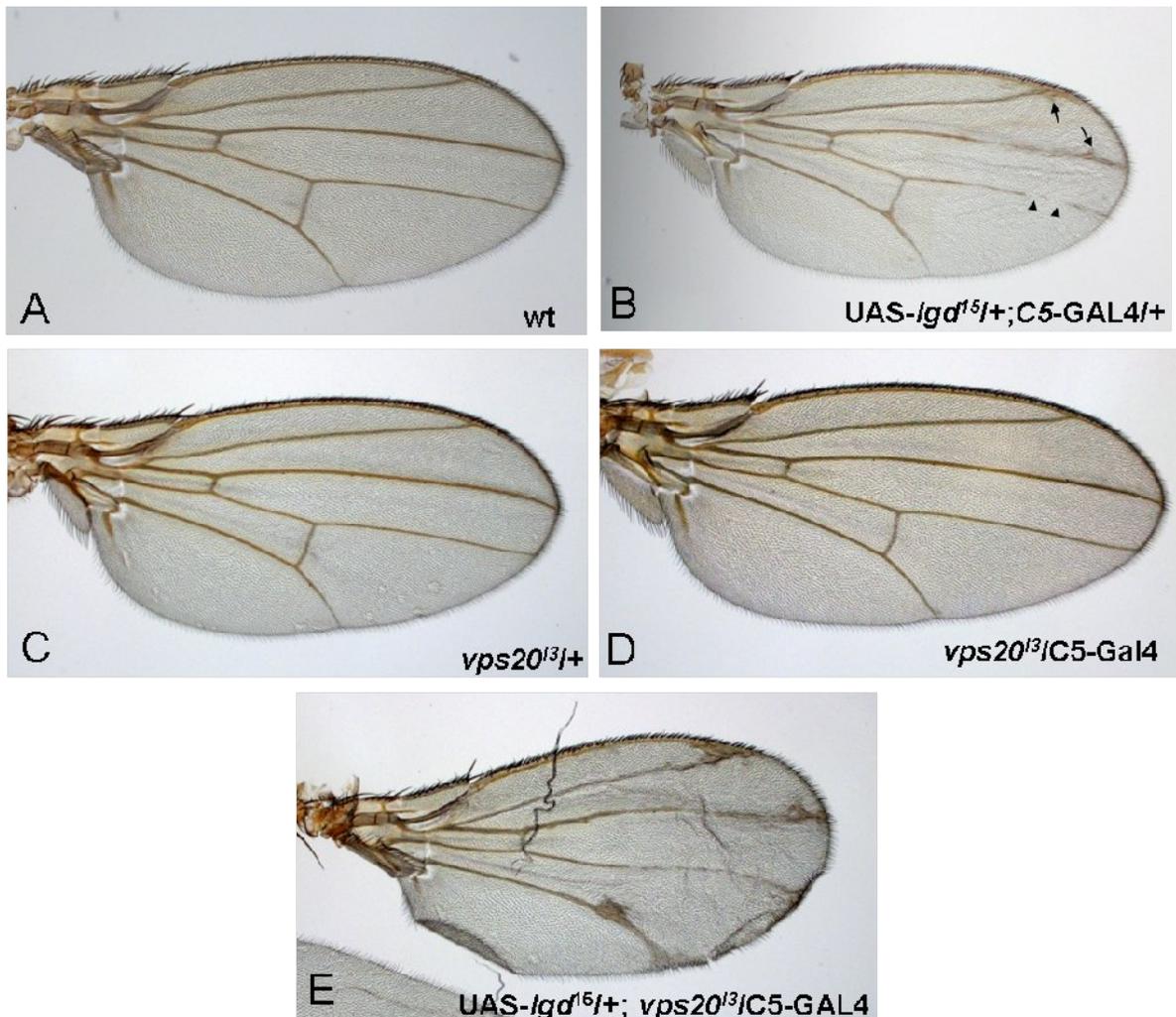


Abbildung 2.7: Flügel der Nachkommen aus den Kreuzungen des *Igd*-Überexpressionsstamms gegen das *vps20³*-Allel

In A bzw. B ist ein Wildtyp-Flügel bzw. Flügel des *Igd*-Überexpressionsstamms gezeigt. Gegen diesen Stamm wurden *vps20*-Nullallel *vps20³* gekreuzt. Die F1-Nachkommen zeigten eine schwache Verstärkung des *Igd*-Phänotyps (E), der aber immer zum Verlust der posterioren Kreuzvene führte, was bei dem *Igd*-Überexpressionsstamm nicht beobachtet wurde.

2.1.3 Lgd interagiert mit dem ESCRTIII-Protein Shrub

Von den beschriebenen möglichen Lgd-Interaktionspartnern der ESCRT-Komplexe wurde die Interaktion zwischen Lgd und dem ESCRT-III-Protein Shrub näher untersucht. Durch den Erhalt eines Antikörper gegen das endogene Shrub-Protein (F.-B. Gao) konnte die Interaktion zwischen Lgd und dem endogenem Shrub getestet werden. Dazu wurde *UAS-*lgd*-HA* mit *hsGAL4* exprimiert und dann mit einem HA-Antikörper aus dem Proteinlysat präzipitiert. Im Western-Blot zeigte sich, dass Lgd-HA zusammen mit endogenem Shrub-Protein präzipitiert werden konnte (Abb. 2.8). Das Lgd-Protein zeigt hier wieder die drei charakteristischen Banden. Das Shrub-Protein mit einem berechneten Gewicht von 25 kDa läuft bei ca. 35 kDa, also etwas höher als erwartet. Die in derselben Spur deutliche Bande bei 140 kDa trat auch in den Wiederholungen des Experiments auf, konnte aber leider nicht genauer identifiziert werden.

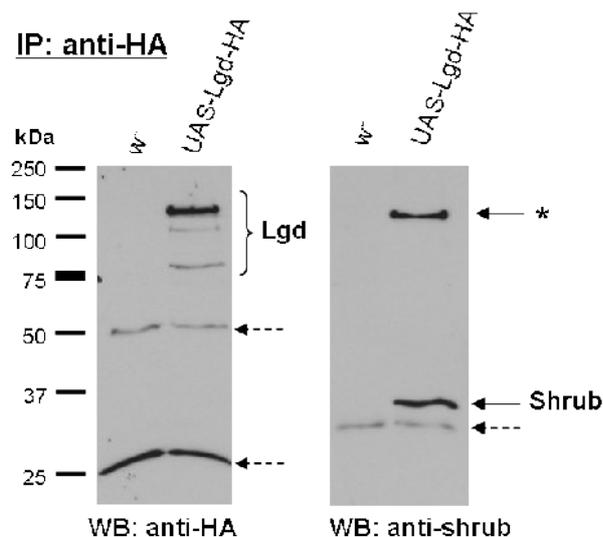


Abbildung 2.8: Nachweis der Interaktion von Lgd-HA mit endogenem Shrub mittels Koimmunopräzipitation

Mit den Proteinlysaten von *wt*-Larven (*w*) und *UAS-*lgd*-HA*-exprimierenden Larven wurden Koimmunopräzipitationen mit dem HA-Antikörper durchgeführt. Die erhaltenen Eluate wurden auf zwei Blots aufgeteilt und mit anti-HA (1:3000) bzw. anti-Shrub (1:1000) inkubiert. Dies zeigte, dass Lgd-HA (drei Banden) zusammen mit endogenem Shrub präzipitiert werden konnte. Im Blot auf der linken Seite deuten die gestrichelten Pfeile auf die IgG-Banden des Antikörpers. Der gestrichelte Pfeil im rechten Blot deutet auf eine unspezifische Bindung hin. Die darüberliegende Bande bei 35 kDa ist das Shrub-Protein, während die Identität der oberen Bande (*) nicht geklärt werden konnte. WB = Western-Blot, IP = Immunopräzipitation

Da nur eine geringe Menge des endogenen Shrub-Antikörpers zur Verfügung stand, sollte für die weiteren Experimente ein GFP-markiertes Shrub-Protein ebenso wie das HA-markierte Lgd mit dem *hsGAL4*-Treiber exprimiert werden. Hierzu sollte das ebenfalls von F.B. Gao erhaltene *UAS-shrub-GFP* verwendet werden. Da aber beschrieben worden war, dass die Markierung von ESCRTIII-Proteinen am C-Terminus zu dominant-negativen Effekten führen kann [Sweeney et al., 2006], sollte zunächst getestet werden, ob die GFP-Markierung die Lgd-Shrub-Interaktion beeinflusst. Dazu wurden wieder Koimmunopräzipitationen durchgeführt, wobei diesmal HA- oder GFP-Antikörper zur Präzipitation genutzt wurden. Um auszuschließen, dass Shrub-GFP oder Lgd-HA auch ohne einen vermittelnden Antikörper (unspezifisch) an die verwendeten Beads binden, wurden auch Immunopräzipitationen ohne Antikörper durchgeführt. Wie in Abb. 2.9b in den beiden letzten Spuren zu erkennen ist, interagieren Lgd-HA und Shrub-GFP. Daher scheint die GFP-Markierung die Interaktion nicht zu beeinträchtigen. Des Weiteren zeigt die letzte Spur in b), dass alle drei Lgd-Banden (140, 120 und 80 kDa) mit Shrub-GFP präzipitiert werden können.

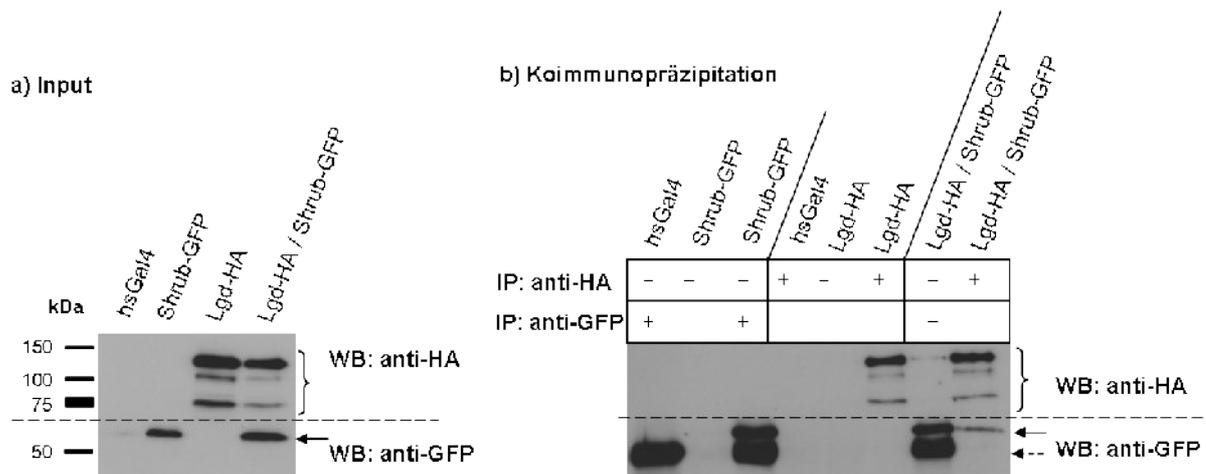


Abbildung 2.9: Koimmunopräzipitation von Lgd-HA und Shrub-GFP

Zur Bestätigung der Interaktion von Lgd und Shrub wurden Lgd-HA und Shrub-GFP über einen *hsGAL4* Treiber exprimiert und die larvalen Proteinlysate für Koimmunopräzipitationen verwendet. Es wurden außerdem Kontrollversuche durchgeführt, um eine unspezifische Bindung der exprimierten Proteine an die verwendeten Beads auszuschließen. Die Koimmunopräzipitation wurden reziprok durchgeführt. Zur Expressionskontrolle (Input) wurden 10% des eingesetzten Lysats aufgetragen. Die Klammer deutet auf die drei Banden des Lgd-Proteins, während die Pfeile das Shrub-GFP-Protein anzeigen. Der gestrichelte Pfeil in b) zeigt die IgG-Bande.

WB = Western-Blot; IP = Immunopräzipitation

2.1.4 Für die Lgd-Shrub-Interaktion werden die DM14-Domänen benötigt

Für eine genauere Analyse der Interaktion zwischen Lgd und Shrub sollte die Fähigkeit verschiedener Lgd-Deletionskonstrukte an Shrub zu binden, getestet werden. Dies ist besonders interessant, da den DM14-Domänen im Lgd-Protein bisher keine Funktionen zugeschrieben werden konnten.

Bei den untersuchten HA-markierten Deletionskonstrukten von Lgd (hergestellt von Tobias Troost) handelte es sich um Deletionen der ersten beiden oder aller DM14-Domänen sowie um ein Lgd-Protein mit deletierter C2-Domäne. Es war bereits bekannt, dass die Deletion der C2-Domäne zu einer unvollständigen Verlagerung des eigentlich zytoplasmatischen Lgd-Proteins in den Kern führt (Dissertation Robert Jaekel). Da Shrub nicht im Kern vorkommt, sondern zwischen der Lokalisation im Zytoplasma und der endosomalen Membran wechselt, könnte die Kernlokalisation von Lgd Δ C2 die Interaktion verhindern, obwohl sie biochemisch möglich wäre. Daher wurde außerdem ein Lgd Δ C2-Konstrukt untersucht, dem eine nukleäre Exportsequenz (NES) an den N-Terminus angehängt worden war. Dieses Protein zeigte dann neben der nukleären auch wieder eine zytoplasmatische Lokalisation (Diplomarbeit Tobias Troost). Abb. 2.10 liefert eine Übersicht über die verwendeten Deletionskonstrukte.

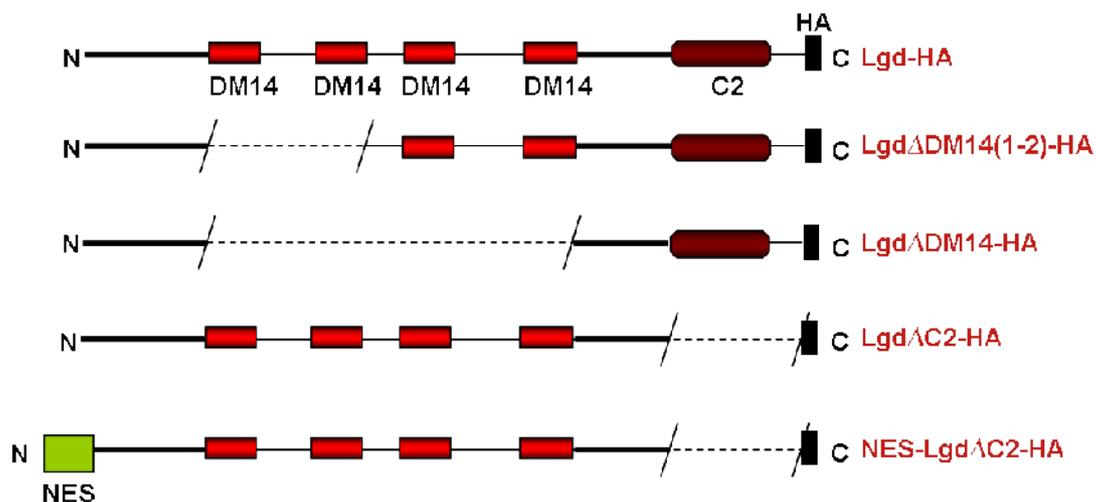


Abbildung 2.10: Deletionskonstrukte des Lgd-Proteins

Diese schematische Darstellung gibt eine Übersicht über die verwendeten Lgd-Konstrukte. DM14-Domänen sind durch rote Rechtecke und die C2-Domäne durch ein dunkelrotes abgerundetes Rechteck dargestellt. Die im jeweiligen Konstrukt deletierten Bereiche sind gestrichelt kenntlich gemacht. Die zusätzlich angefügte nukleäre Exportsequenz (NES) ist als grünes Rechteck dargestellt, während die C-terminale HA-Markierung durch einen schwarzen Balken symbolisiert wird.

Für die Untersuchung der Interaktion zwischen Shrub-GFP und den verschiedenen Lgd-Deletionskonstrukten wurde jedes Deletionskonstrukt zusammen mit Shrub-GFP mit *hsGAL4* koexprimiert. Bei den durchgeführten Koimmunopräzipitationen wurde Shrub-GFP mit einem GFP-Antikörper präzipitiert und das gesamte Eluat auf den Western-Blot aufgetragen. In Abb. 2.11b erkennt man deutlich, dass für die Bindung von Shrub-GFP an das Lgd-Protein die DM14-Domänen unentbehrlich sind. Bei dem Konstrukt $Lgd\Delta DM14(1-2)^{1,2}$ -HA ist nur noch eine sehr schwache Bande zu erkennen (* in Abb. 2.11), während bei $Lgd\Delta DM14^{9,4,2}$ keine Bande detektierbar ist. Da diese beiden Konstrukte im Überstand, der nur 10% des eingesetzten Lysats beträgt, deutlich vorhanden sind, konnten die DM14-Domänen als Vermittler der Bindung zwischen Lgd und Shrub identifiziert werden.

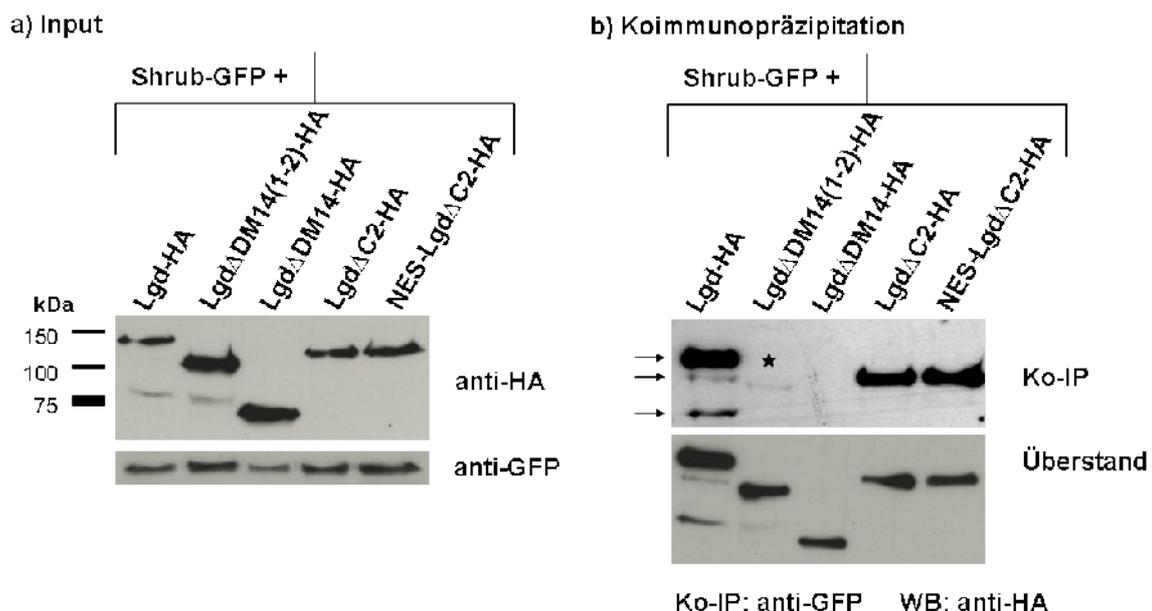


Abbildung 2.11: Interaktion von Shrub-GFP mit Lgd-Deletionskonstrukten

in a) wurden 10% des für die IP eingesetzten Lysats auf eine gleichmäßige Expression der Konstrukte kontrolliert. Die Eluate der Koimmunopräzipitationen sind in b) in oberen Teil zu sehen. Die Überstände mit den nicht-gebundenen Proteinen sind im unteren Teil zu sehen. Beide Blots wurden mit dem HA-Antikörper behandelt, um die Lgd-Proteine zu detektieren. Dabei scheinen die DM14-Domänen essentiell für die Interaktion mit GFP zu sein.

2.1.5 Ermittlung der für die Lgd-Interaktion benötigten Domänen im Shrub-Protein

Da gezeigt werden konnte, dass auf der Seite von Lgd die DM14-Domänen für die Interaktion mit Shrub benötigt werden, sollte weiterhin festgestellt werden, welche

Domänen des Shrub-Proteins für die Interaktion mit Lgd essentiell sind. Dazu wurden zunächst N-terminal Myc-markierte Deletionskonstrukte von Shrub hergestellt. Eine N-terminale Markierung wurde gewählt, weil C-terminale Additionen von Markierungen wie z.B. GFP an die ESCRT-III-Proteine zu dominant-negativen Effekten führen, während dies bei N-terminalen Markierungen nicht vorkommt [Sweeney et al., 2006; Shim et al., 2007]. Normalerweise wechseln die ESCRT-III-Proteine zwischen einer monomeren zytoplasmatischen und einer komplex-bildenden membranösen Form. Hierbei hat die C-terminale Domäne eine autoinhibitorische Funktion, da sie in der zytosolischen Form die Bindungsstellen für die Hetero- oder Homooligomerisierung mit anderen ESCRT-III-Proteinen im N-terminalen Bereich blockiert (siehe Abb. 2.12). Außerdem vermittelt sie über die MIT-Domäne die Interaktion mit dem den ESCRT-III-Komplex deassemblierenden ATPase Vps4. Daher führen C-terminale Markierungen oder Deletionen des C-terminalen Endes zu ESCRT-III-Proteinen, die nur noch an der Membran lokalisiert sind [Shim et al., 2007].

Bei den Deletionskonstrukten wurde einmal die autoinhibitorische (Myc-Shrub Δ auto) und einmal die Core-Region (Myc-Shrub Δ core) entfernt (siehe Abb. 2.12). Dazu wurden die entsprechenden Bereiche aus der Shrub-cDNA per PCR amplifiziert, wobei die N-terminale einfache Myc-Markierung angefügt wurde. Danach wurden die Fragmente über die Schnittstellen *EcoRI* und *XbaI* in den pUAST-Vektor eingefügt, so dass die Konstrukte mithilfe des UAS-GAL4-Systems in der Fliege exprimiert werden konnten. Bei der anschließenden Integration dieser Konstrukte ins Fliegen-genom war der Integrationsort zufällig, wodurch unterschiedlich stark exprimierende Fliegenlinien entstanden.

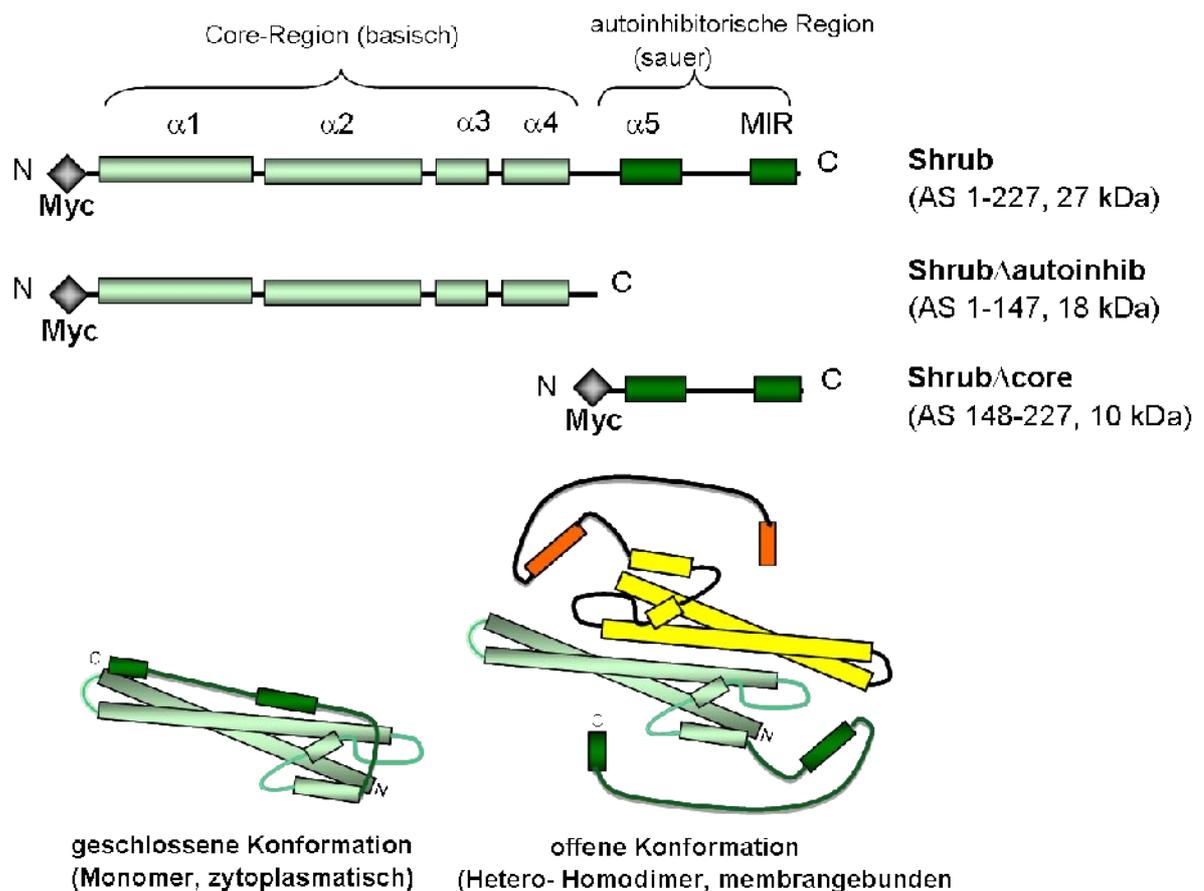


Abbildung 2.12: Aufbau der Shrub-Deletionskonstrukte

Die Abbildung zeigt ein Schema der hergestellten N-terminal Myc-markierten Shrub-Konstrukte. Es wurden zwei Deletionskonstrukte erstellt, bei denen entweder die Core- oder die autoinhibitorische Region entfernt war. Im unteren Teil sind nochmal die beiden Konformationen dargestellt in denen die ESCRT-III-Proteine im Zytoplasma oder an der Membran vorliegen. Deutlich zu erkennen ist die autoinhibitorische Funktion des C-terminalen Endes, der im Zytoplasma die Hetero- oder Homooligomerisierung der ESCRT-III-Proteine verhindert.

Für die Interaktionsstudien wurde diese Konstrukte wieder mit *hsGAL4* exprimiert. Leider konnten diese Konstrukte bisher nicht im Western-Blot nachgewiesen werden, weshalb auch keine Koimmunopräzipitations-Experimente durchgeführt werden konnten.

Um den Effekt einer Überexpression dieser Proteine in der Fliege zu untersuchen, wurden sie mit dem *ptc (patched)*GAL4-Treiber exprimiert. Hierbei wurden die Effekte in der Flügelimaginalscheibe als auch auf den adulten Flügel beobachtet, die in der Tabelle 2.1 zusammengefasst sind.

<i>ptc</i> GAL4	Flügelimaginalscheibe	Flügel
UAS-Myc-Shrub	Zelltod im <i>ptc</i> -Streifen	- Verlust von Flügelgewebe zwischen Flügelvene 3 und 4 inklusive der anterioren Kreuzvene - Bildung zusätzlichen Venenmaterials - Verlust von scutellaren Borsten
UAS-Myc-Shrub Δ auto	---	----
UAS-Myc-Shrub Δ core	kein Effekt	kein Effekt

Tabelle 2.1: Effekte der Expression der UAS-Myc-Shrubkonstrukte mit *ptc*GAL4

In der Tabelle sind die Auswirkungen der Expression der hergestellten Myc-Shrub-Konstrukte mit dem *ptc*GAL4-Treiber in Flügelimaginalscheibe und im adulten Flügel zusammenfassend dargestellt.

Eine Überexpression des vollständigen Shrub-Proteins führte bei Fliegenlinien mit schwacher Expression des Transgens (z.B. UAS-Myc-*shrub*²) zu keinerlei Defekten oder Auswirkungen auf die Notch-Aktivität (siehe Abb.2.13 A-H und Abb. 2.14 C,D). Bei Fliegenlinien mit starker Expression (z.B. UAS-Myc-*shrub*⁴⁷) kam es in der Flügelimaginalscheibe zu einem Zelltod im *ptc*-Streifen (siehe Abb. 2.13 I-L). Dieser zeigte sich im adulten Flügel durch einen Verlust von Flügelgewebe zwischen der dritten und vierten Flügelvene, und im Scutellum durch den Verlust der Borsten, beides Bereiche der *ptc*-Expression (siehe Abb. 2.14 E,F). Da *ptc*GAL4 in der Imaginalscheibe auch an der dorsoventralen Grenze exprimiert wird, die später den Flügelrand bildet und es auch hier zum Zelltod kommt, sind auch Kerben in dieser Region zu beobachten. Außerdem kommt es im anterioren Abschnitt dieses *ptc*-exprimierenden Bereichs zu einer vermehrten Bildung von Flügelvenengewebe, was wie auf die Kerbenbildung auf eine verminderte Notch-Aktivität hindeutet. Aufgrund des verursachten Zelltods konnten die Effekte der UAS-Myc-Shrub-Expression in der Flügelimaginalscheibe aber nicht auf die Notch-Aktivität nicht untersucht werden.

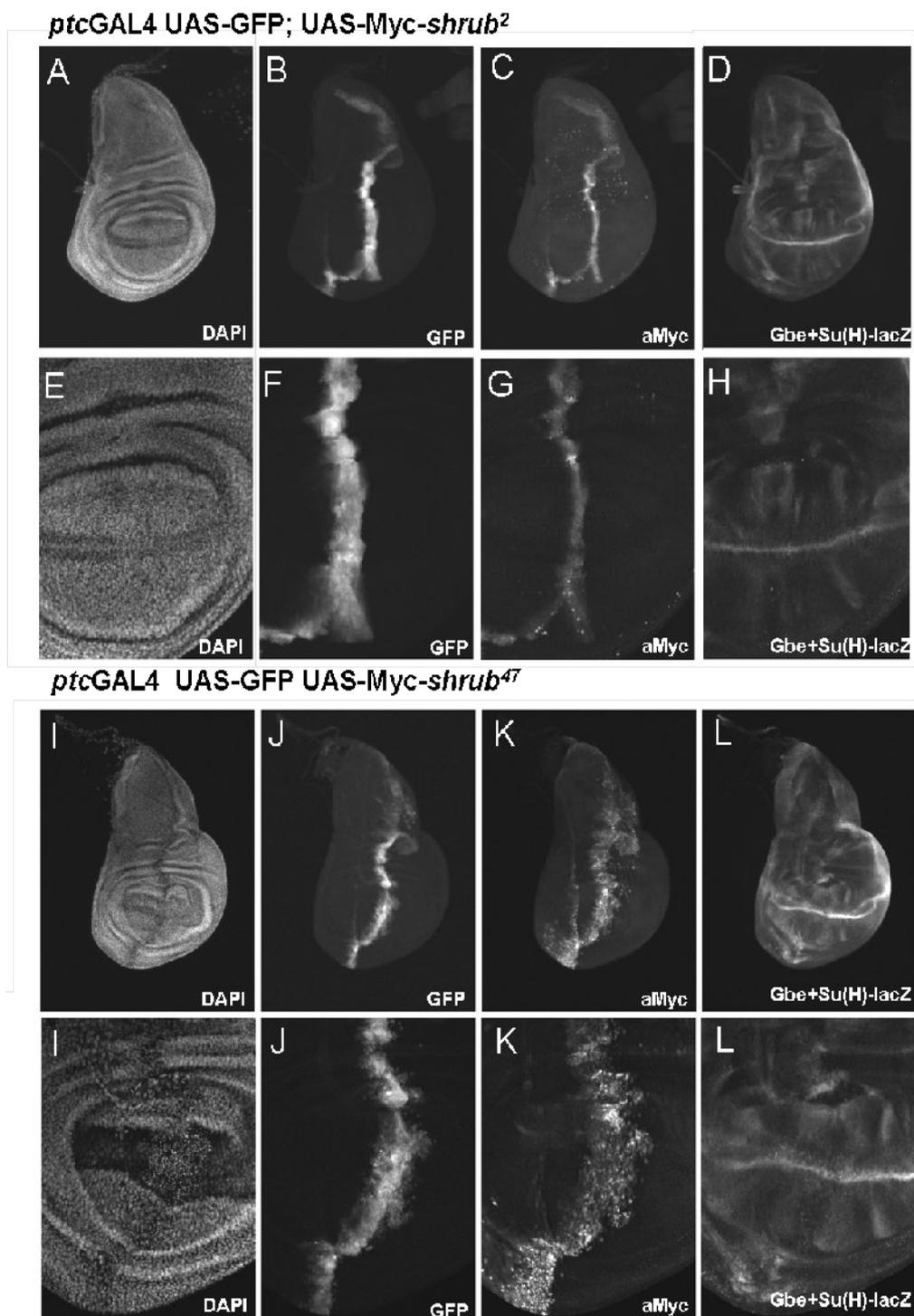


Abbildung 2.13: Expression von UAS-Myc-Shrub mit *ptcGAL4*

Die Abbildung zeigt die Auswirkungen der Expression einer schwachen (*UAS-Myc-shrub²*) (A-H) und einer starken Linie (*UAS-Myc-shrub⁴⁷*) (I-L) mit dem *ptcGAL4*-Treiber. Die Expressionsdomäne von Ptc ist anhand des zusätzlich exprimierten UAS-GFP gut zu erkennen und zeigt auch die schwächere Expression der *UAS-Myc-shrub²*-Linie. Während die Expression dieser Linie keinen Effekt auf das Überleben der Zellen hatte, führte die Expression von *UAS-Myc-shrub⁴⁷* zu einem starken Zelltod im *ptc*-Streifen. E-F und I-L sind Vergrößerungen der darüberliegenden Abbildungen.

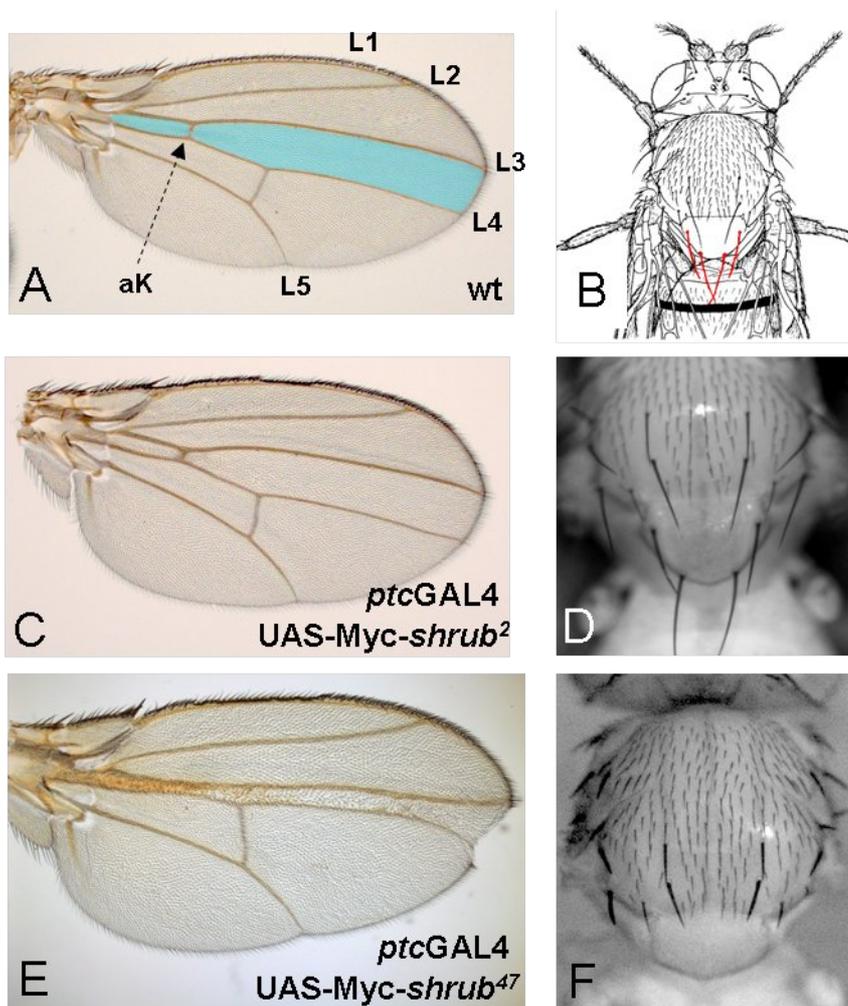


Abbildung 2.14: Flügel und Scutelli nach Expression von UAS-Myc-shrub-Konstrukten mit *ptcGAL4*

In A ist blau unterlegt der Bereich der *ptc*-Expression und in B die Lage der scutellaren Borsten. Die folgenden Bilder zeigen die Effekte der Expression der Myc-Shrub-Konstrukte mit *ptcGAL4* auf den Flügel und die scutellaren Borsten. Während eine schwache Linie *UAS-Myc-shrub²* zu keinerlei Defekten führte (C,D), kam es bei der starken Linie *UAS-Myc-shrub⁴⁷* zu einem starken Verlust von Flügelgewebe zwischen der dritten und vierten Flügelvene, sowie zum Verlust der anterioren Kreuzvene begleitet von zusätzlichem Venenmaterial (E). Außerdem fehlten alle vier scutellaren Borsten (F). Die verkürzten Borsten in F sind auf die Deletion des *Stubble*-Gens durch den verwendeten Marker MKRS zurückzuführen, der aber nicht zum Verlust von scutellaren Borsten führt.

Bei der Überexpression von UAS-Myc-Shrub Δ core zeigten sich weder in der Flügelimaginalscheibe noch später im adulten Flügel Effekte auf das Überleben der Zellen oder die Notch-Aktivität.

Bei Überexpression von UAS-Myc-Shrub Δ auto erreichten die Larven nicht das dritte Larvenstadium, wodurch weder Flügelimaginalscheibe noch Flügel untersucht werden konnten. Deswegen wurde dieses Konstrukt mit einem anderen Treiber *sdGAL4* (*scalloped*) exprimiert, der vorwiegend in der Flügeltasche exprimiert wird. Die Expression mit *sdGAL4* führte zu Larven, die das dritte Larvenstadium erreichten jedoch nicht zu adulten Fliegen. Die Flügelimaginalscheiben zeigten eine starke Überproliferation der Flügeltasche, aber nicht des Notums (Abb.2.15 D-G). Außerdem scheint die epitheliale Organisation komplett verloren gegangen und der Zelltod induziert worden zu sein. Ähnliche Effekte zeigte die Expression von Shrub-GFP mit *sdGAL4* (siehe Abb. 2.15 C).

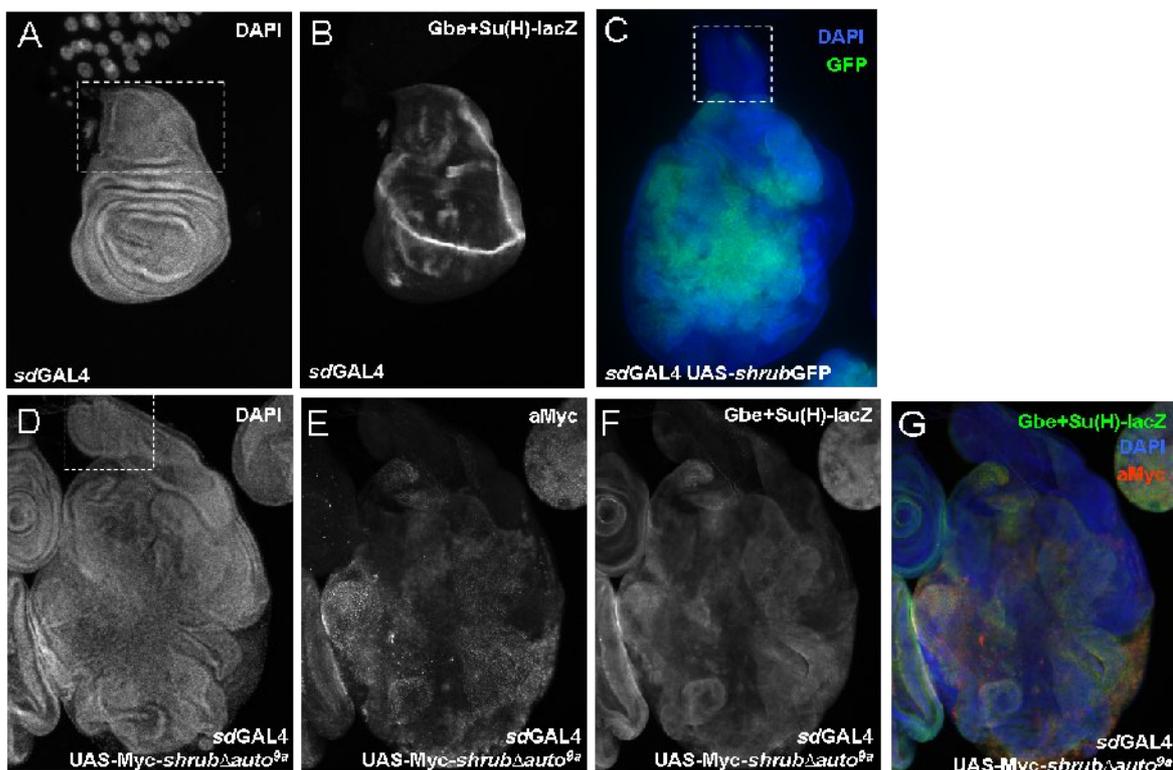


Abbildung 2.15: Expression von UAS-Myc-shrub Δ auto mit *sdGAL4*

A und B zeigen eine Flügelimaginalscheibe der verwendeten *sdGAL4*-Treiberlinie, die keinen Unterschied zum Wildtyp aufweist. D-G zeigen bei gleicher Vergrößerung eine Flügelimaginalscheibe in der das Myc-Shrub Δ auto-Konstrukt mit *sdGAL4* exprimiert wurde. Hier ist eine starke Überproliferation der Flügeltasche mit Verlust der epithelialen Organisation zu erkennen. Das gestrichelte Rechteck zeigt das Notum an. Ein ähnlicher Phänotyp wurde bei der Expression von Shrub-GFP beobachtet (C).

2.1.6 Genetische Interaktion von *Igd* und *shrub*

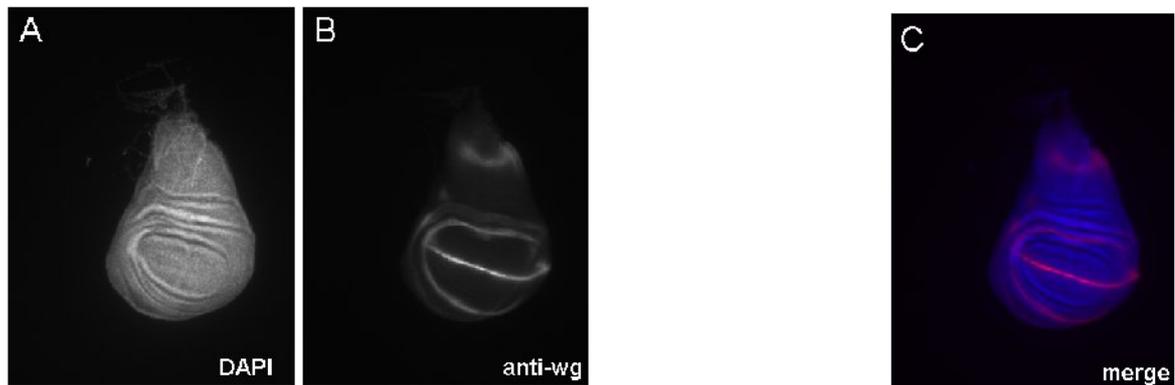
Die Resultate des Flügelscreens und der biochemischen Experimente legten eine Interaktion von *Igd* und *shrub* nahe. Um weitere Bestätigungen für diese Interaktion zu erhalten, sollten die Auswirkungen des Verlustes einer funktionierenden Kopie des *shrub*-Gens auf den *Igd*-Phänotyp in der Flügelimaginalscheibe untersucht werden.

Der Ausfall von *shrub* konnte dabei nur in einem heterozygoten Zustand untersucht werden, da homozygote Fliegen für das Nullallel *shrub*⁴⁻¹ schon in einem späten Embryonalstadium sterben [Sweeney et al., 2006]. Von einer Untersuchung der Reduktion an Shrub-Protein in einem für das Nullallel *Igd*^{d7}-homozygoten Hintergrund wurde abgesehen, da in diesen Flügelimaginalscheiben die Expressionsdomäne der Notch-Zielgene sowieso schon eine sehr starke Verbreiterung erfährt. Zusätzliche Effekte einer reduzierten Shrub-Proteinmenge könnten hier unbemerkt bleiben. Diese Verbreiterung findet man in Flügelimaginalscheiben, die homozygot für das hypomorphe *Igd*^{SH495}-Allel sind, gar nicht und im transheterozygoten Zustand von *Igd*^{d7} mit *Igd*^{SH495} nur sehr leicht. Daher wäre der Effekt einer Reduktion an Shrub-Protein hier sicherlich erkennbar. Da beide Gene auf dem zweiten Chromosom liegen, musste eine Rekombination vorgenommen werden [Bachelor-Arbeit, Aline Hoessler), wobei sich – aus den oben genannten Gründen - für eine Rekombination des Nullallels *shrub*⁴⁻¹ mit dem hypomorphen Allel *Igd*^{SH495} entschieden wurde. Durch entsprechende Kreuzungen der Rekombinanten kann der Ausfall einer *shrub*-Kopie sowohl im homozygoten Hintergrund des *Igd*^{SH495}-Allels als auch im transheterozygoten Zustand mit *Igd*^{d7} untersucht werden.

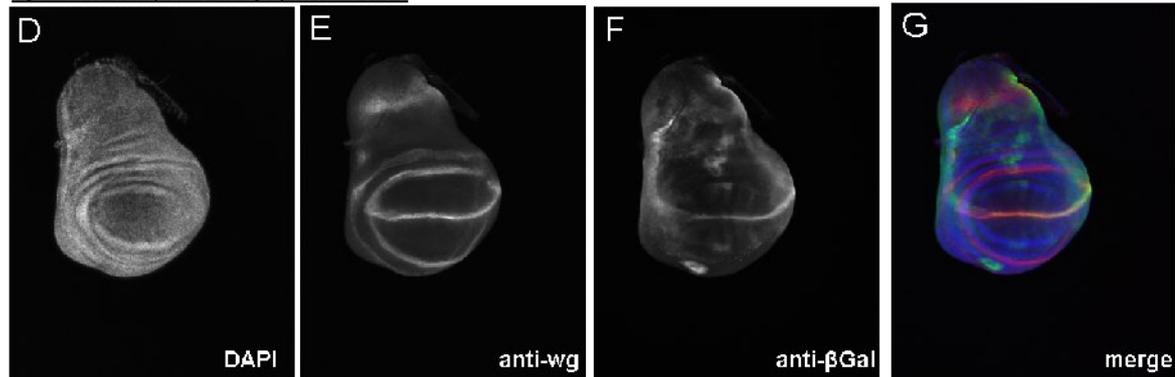
Um zu testen, ob eine Rekombination und damit der gleichzeitige heterozygote Ausfall der beiden Gene überhaupt zu lebensfähigen Nachkommen führt, sollte zunächst der transheterozygote Zustand *Igd*^{d7} / *shrub*⁴⁻¹ untersucht werden. Hierbei stellte sich heraus, dass Fliegen mit einem heterozygoten Ausfall beider Gene lebensfähig sind und keine Veränderung im Vergleich zu wildtypischen Fliegen aufweisen. Auch in den Flügelimaginalscheiben keine Veränderungen der Notch-Aktivität aufweisen (siehe Abb. 2.16). Hierbei wurde neben dem Notch-Zielgen *wingless* auch die lacZ-Expression des synthetischen Gbe+Su(H)m8- Konstrukts untersucht, das einen sehr sensitiven Reporter der Notch-Aktivität darstellt [Furriols

and Bray, 2001]. In diesem Konstrukt wird die Expression des Enzyms β -Galaktosidase durch einen normalerweise ubiquitär aktiven *grainyhead*-Promotor kontrolliert, der hier allerdings vier Su(H)-Bindungsstellen besitzt. Dadurch führt eine Aktivierung des Notch-Signalwegs über die Bindung von Nintra (NICD) an diese Bindungsstellen zu der Expression der β -Galaktosidase, die dann immunhistologisch nachgewiesen werden kann.

FRTG13shrub⁴⁻¹/S6-T6



lqd^{d7}FRT40A; Gbe+Su(H)-lacZ/S6-T6



lqd^{d7}FRT40A / FRTG13shrub4-1; Gbe+Su(H)-lacZ / +

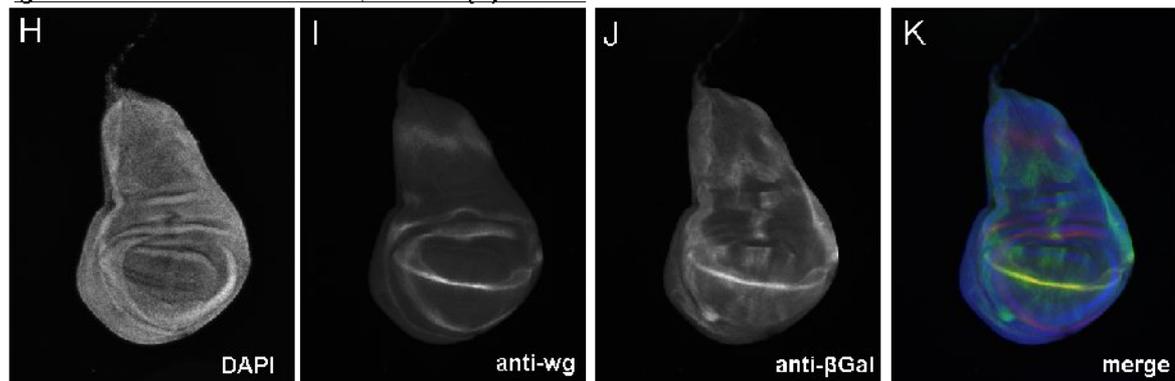


Abbildung 2.16: Auswirkungen des heterozygoten Verlusts der Gene *lqd* und *shrub* auf die Notch-Aktivität in der Flügelimaginalscheibe

Die Abbildung zeigt Antikörperfärbungen von Flügelimaginalscheiben mit heterozygoten Ausfall von *shrub*⁴⁻¹ (A-C) bzw. *lqd*^{d7} (D-G) und dem heterozygoten Ausfall beider Gene *lqd*^{d7}/*shrub*⁴⁻¹ (H-K). Es zeigt sich, dass keiner dieser Genotypen zu Veränderungen der Notch-Aktivität führt.

Da der transheterozygote Zustand der Nullallele beider Gene zu keinerlei Phänotypen führte, waren die erhaltenen *Igd*^{SH495},*shrub*⁴⁻¹-Rekombinanten wie erwartet lebensfähig, fertil und zeigten keinerlei Unterschiede zum Wildtyp.

Diese Rekombinanten wurden anschließend gegen heterozygote *Igd*^{SH495} und *Igd*^{d7}-Fliegen gekreuzt, um die Auswirkungen der reduzierten Shrub-Proteinmenge im homozygoten *Igd*^{SH495} und im transheterozygoten Zustand *Igd*^{d7}/*Igd*^{SH495} zu untersuchen.

Dies führte in beiden Fällen zum Tod und zwar bereits im späten zweiten bzw. frühem dritten Larvenstadium. Wie die Abb. 2.17 zeigt, sind diese Larven außerdem Vergleich zu wildtypischen Larven des gleichen Stadiums sehr dünn. Da der Ausfall einer Kopie von *shrub* in einer Verstärkung des *Igd*-Phänotyps resultiert, liegt neben der biochemischen Interaktion eine funktionelle Beziehung der beiden Gene *in vivo* vor.



Abbildung 2.17: Äußerliche Unterschiede zwischen transheterozygoten *Igd*^{d7}/*Igd*^{SH495}-Larven ohne und bei Ausfall einer Kopie von *shrub*

Die Abbildung zeigt gleichaltrige Larven der Genotypen *Igd*^{d7}/*Igd*^{SH495} (A) und *Igd*^{d7}/*Igd*^{SH495}, *shrub*⁴⁻¹ (B), die zum selben Zeitpunkt aus den bei 25°C angesetzten Kreuzungsröhrchen entnommen wurden. Die Larven, in denen zusätzliche eine *shrub*-Kopie fehlte, starben bereits im späten zweiten bzw. frühem dritten Larvenstadium (B).

2.2 Projekt 2: Knockout der Gene *mlgd1* und *mlgd2* in der Maus

2.2.1 Expression von *mlgd1* und *mlgd2* in der Maus

Um Hinweise auf eine mögliche Redundanz der beiden Gene zu erhalten, wurde zunächst getestet, in welchen Organen die beiden Gene exprimiert werden. Dazu wurde aus verschiedenen Organen adulter Tiere (C57BL/6) RNA isoliert und nach Umwandlung in cDNA eine PCR mit exon-spezifischen Oligonukleotiden durchgeführt. Bei *mlgd1* lagen diese Oligonukleotide im Bereich von Exon 17 bis Exon 23 und deckten einen Bereich von 552 bp ab (entspricht 2352 bp bei genomischer DNA). Bei *mlgd2* sollte ein Fragment mit einer Länge von 566 bp von Exon 19 bis Exon 25 amplifiziert werden (entspricht 1840 bp bei genomischer DNA). Die genomische Region beider Gene ist in Abb. 2.18 a) und b) dargestellt. Außerdem wurde RNA aus murinen embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) gewonnen, um auch hier die Expression der beiden Gene zu untersuchen. Wie in Abb. 2.18 c) zu sehen, werden *mlgd1* und *mlgd2* in ES-Zellen und in allen getesteten Organen exprimiert.

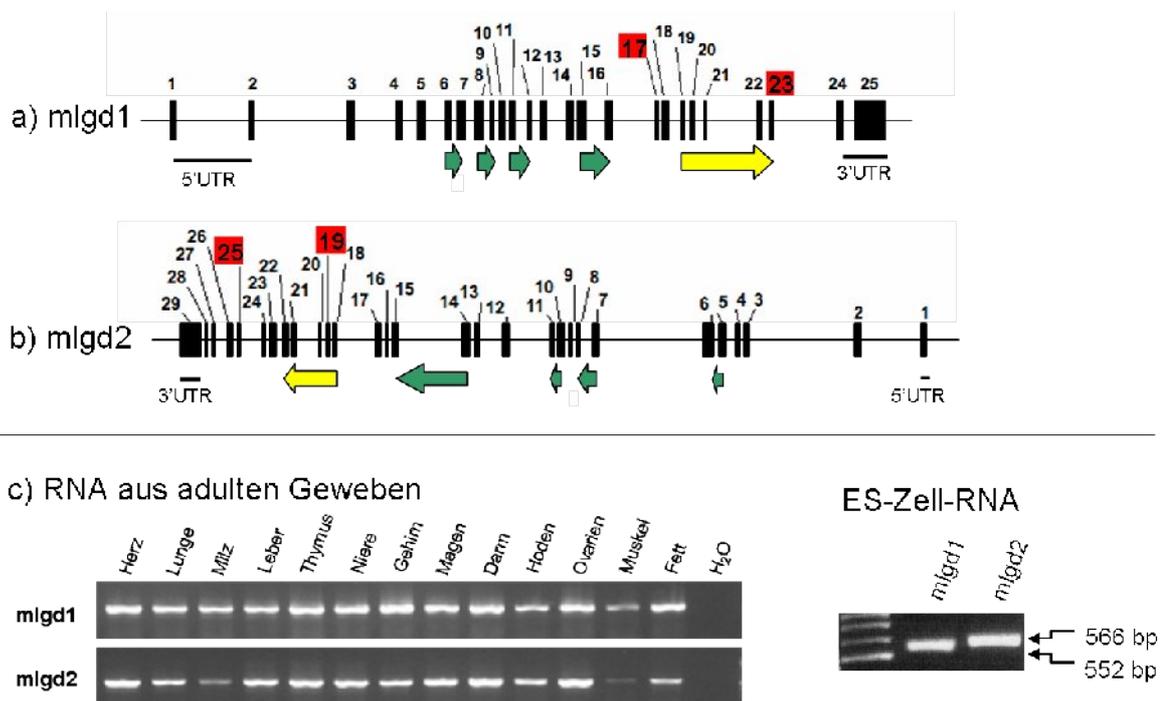


Abbildung 2.18: Expression von *mlgd1* und *mlgd2* in ES-Zellen und in adulten Geweben

Schematische Darstellung des *mlgd1*-(a) bzw. *mlgd2*-Gens (b). Exons sind durch schwarze Balken dargestellt und entsprechend nummeriert. Für den Nachweis der Expression wurde im Falle von *mlgd1* der Bereich von Exon 17-23 und bei *mlgd2* der Bereich von Exon 19-25 von cDNA amplifiziert. Die grünen Pfeile symbolisieren die DM14-Domänen, während die C2-Domänen durch einen gelben Pfeil gekennzeichnet sind. Die unterschiedliche Orientierung der beiden Gene liegt daran, dass *mlgd1* vom Vorwärtsstrang der DNA abgelesen wird, während *mlgd2* vom Komplementärstrang transkribiert wird.

c) Aus ES-Zellen hergestellte cDNA wurde in einer PCR mit den Oligonukleotiden „5Nblot *mlgd1/2*“ und „3Nblot*mlgd1/2*“ (siehe Tab. 4.9) verwendet. Sowohl *mlgd1* (552 bp) als auch *mlgd2* (566 bp) werden in ES-Zellen exprimiert. Die gleiche PCR wie in B) beschrieben wurde mit cDNA aus verschiedenen adulten murinen Geweben durchgeführt. *mlgd1* als auch *mlgd2* scheinen in allen Geweben exprimiert zu werden.

2.2.2 Spezifitätstest eines mLgd2-Antikörpers

Um das mLgd2-Protein im Western-Blot nachweisen zu können, wurde ein Antikörper benötigt, der spezifisch mLgd2 und nicht mLgd1 detektiert. Das Problem der Spezifität ergibt sich bei den beiden Proteinen dadurch, dass sie sich erstens aufgrund ihres berechneten Molekulargewichts nur schwer unterscheiden lassen (mLgd1 = 848 Aminosäuren, 93 kDa; mLgd2 = 943 Aminosäuren, 104 kDa; siehe Abb. 2.19 und 2.22) und es zweitens wahrscheinlich zur Detektion mehrerer spezifischer Banden kommt. Dies war in dieser Arbeit bei der Detektion des Lgd-

Proteins aus *Drosophila* der Fall und wurde auch schon bei der Detektion der Lgd-Orthologen in murinen und humanen Proteinlysaten beobachtet [Basel-Vanagaite et al., 2006; Rogaeva and Albert, 2007].

Zur spezifischen Detektion von mLgd2 sollte zunächst der CC2D1A-Antikörper der Firma Bethyl Laboratories getestet werden. Dieser richtet sich gegen ein Epitop innerhalb der ersten 50 Aminosäuren des humanen mLgd2-Orthologs CC2D1A. Dieser Antikörper wurde ausgewählt, da er sowohl das Wildtyp-Protein als auch das bei dem geplanten Knockout von *mlgd2* möglicherweise entstehende mLgd2-KO-Protein erkennen sollte (siehe Abb. 2.19). Das Knockout-Allel kodiert für ein Protein, bei welchem nach den auch im Wildtyp vorhandenen ersten 244 Aminosäuren, die die erste DM14-Domäne enthalten, 40 Aminosäuren der nicht-synonymen Sequenz folgen, die aus der durch die Deletion verursachten Verschiebung des Leserasters entsteht (siehe Abb. 2.19 und 2.28). Da der CC2D1A-Antikörper innerhalb der ersten 50 Aminosäuren bindet, sollte er aber auch dieses verkürzte mLgd2-KO-Protein mit einem Molekulargewicht von 29,8 kDa detektieren können.

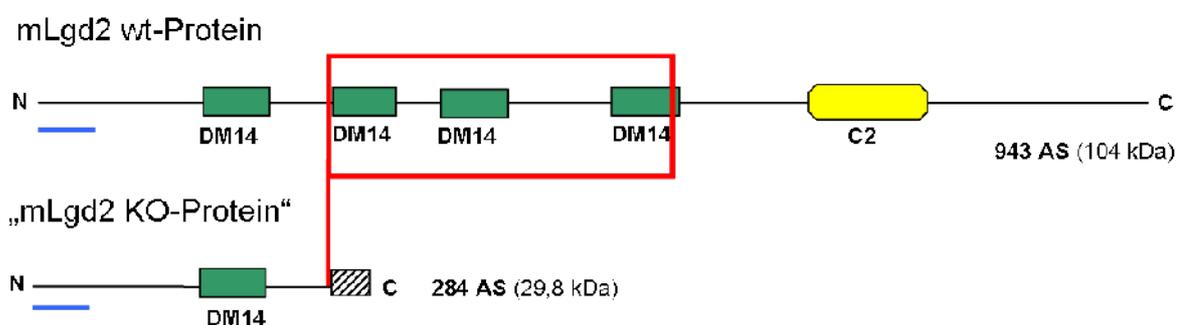


Abbildung 2.19: Detektion von mLgd2-wt und KO-Protein mit dem CC2D1A-Antikörper

Die Darstellung zeigt ein Schema des mLgd2-wt- sowie des KO-Proteins, welches in der Knockout-Maus noch gebildet werden könnte. DM14-Domänen sind durch grüne Rechtecke, die C2-Domäne durch ein abgerundetes gelbes Rechteck symbolisiert. Die schräg markierte Box steht für die 40 Aminosäuren, die von der nicht-synonymen (missense)-Sequenz kodiert werden. Der blaue Balken im N-terminalen Bereich der beiden Proteine stellt den Bindungsbereich des CC2D1A-Antikörpers dar, der beide Proteine erkennen sollte.

Um Hinweise auf die Spezifität dieses Antikörpers für das murine mLgd2-Protein zu erhalten, wurden zunächst die Sequenzen der ersten 50-60 Aminosäuren des humanen Orthologs CC2D1A mit denen der beiden Mausorthologen mLgd1 und mLgd2 sowie des *Drosophila* Lgd-Proteins verglichen (siehe Abb. 2.20).

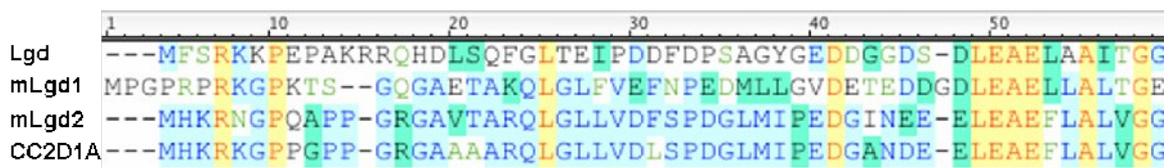


Abbildung 2.20: Vergleich der ersten 50 Aminosäuren der Lgd-Proteine aus verschiedenen Spezies

In dieser Analyse wurden die ersten 50-60 Aminosäuren des Lgd-Proteins aus *Drosophila* und der murinen und humanen Orthologen miteinander verglichen (CC2D1B ist nicht dargestellt). Es wird deutlich, dass in diesem Bereich die Homologie zwischen CC2D1A und mLgd2 am stärksten ist.

Hierbei zeigte sich, dass die Homologie zwischen CC2D1A zu mLgd2 am stärksten ist, weshalb der Antikörper spezifisch mLgd2 und nicht mLgd1 oder das Lgd-Protein aus *Drosophila* erkennen sollte.

Zur Bestätigung dieser Annahme sollte der Antikörper im Western-Blot getestet werden. Ein solcher Spezifitätstest ist mit Proteinlysaten aus der Maus nur schwer möglich, da beide Gene nicht nur - wie in dieser Arbeit gezeigt - in allen Geweben exprimiert werden und somit keine Negativ-Kontrolle zur Verfügung stand.

Da der Antikörper aber das *Drosophila* Lgd-Protein nicht erkennen sollte (Negativ-Kontrolle) und es bereits etablierte Fliegenstämme gab, in denen die cDNAs von *mlgd1* oder *mlgd2* mit dem UAS-GAL4-System exprimiert werden konnten (siehe Dissertation Robert Jaekel), wurde der Spezifitätstest mit Proteinlysaten aus *Drosophila*-Larven durchgeführt.

Für die Expression von UAS-*mlgd1* und UAS-*mlgd2* wurde die *hsGAL4*-Linie verwendet, wodurch die Konstrukte in allen Zellen exprimiert werden. Aus bisher nicht geklärten Gründen war ein Hitzeschock als Induktion der Expression nicht nötig und es wurde bereits eine ausreichende Expression erzielt, wenn die Kreuzungen bei 25°C durchgeführt wurden. Von diesen UAS-*mlgd1* und UAS-*mlgd2* exprimierenden Larven wurden Proteinlysate angefertigt. Als Kontrollen wurde Lysat aus wildtypischen Larven (*w*) hergestellt, die nur das endogene *Drosophila* Lgd-Protein exprimieren als auch von Larven, in denen das *Drosophila* Lgd-Protein noch zusätzlich als UAS-Konstrukt mit *hsGAL4* exprimiert wird. Des weiteren wurden Lysate aus murinen embryonalen Stammzellen und embryonalen Fibroblasten verwendet.

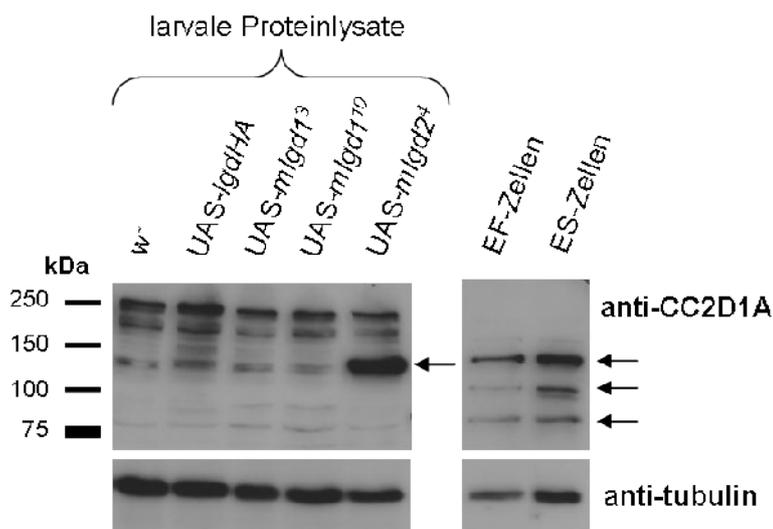


Abbildung 2.21: Test der Spezifität des CC2D1A-Antikörpers

Für diesen Western-Blot wurde das Proteinlysate von je vier Larven bzw. 100 µg Protein aus EF- und ES-Zellen verwendet. Der Blot wurde mit anti-CC2D1A (1:3000) und anti-Tubulin (1:10000 als Ladekontrolle) inkubiert. Die larvalen Proteinlysate wurden aus wildtypischen (*w*-) und aus Larven hergestellt, die entweder UAS-*Igd*-HA, UAS-*mlgd1*³, UAS-*mlgd1*¹⁰ oder UAS-*mlgd2*⁴ unter der Kontrolle des *hsGAL4*-Promotors exprimierten. UAS-*mlgd1*³ und UAS-*mlgd1*¹⁰ unterscheiden sich nur durch den Integrationsort des UAS-*mlgd1*-Konstruktes im *Drosophila*-Genom.

Es stellte sich heraus, dass der anti-CC2D1A-Antikörper in den larvalen Proteinlysaten spezifisch nur das mLgd2-Protein auf der Höhe von ca. 140 kDa erkennt (siehe Abb. 2.21). Auf gleicher Höhe erscheint bei den anderen UAS-Konstrukten zwar auch eine Bande, da diese aber auch in der *w*-Kontrolle (*w*) auftritt, in der kein UAS-Konstrukt exprimiert wurde, handelt es sich hierbei um eine unspezifische Bindung. Die anderen Banden ober- und unterhalb der 140 kDa-Bande sind ebenfalls auf unspezifische Bindungen zurückzuführen, da auch sie in der Kontrolle auftreten. Weiterhin wird deutlich, dass man in embryonalen Fibroblasten- und in embryonalen Stammzellen bis zu drei verschiedene Banden erkennen kann, während bei der Expression der cDNA in *Drosophila* nur eine spezifische Bande entsteht.

Somit konnte gezeigt werden, dass der CC2D1A-Antikörper spezifisch mLgd2 und nicht mLgd1 erkennt und daher für die Untersuchung der mLgd2-Expression in den Knockout-Mäusen verwendet werden kann.

2.2.3 Herstellung eines Antikörpers für mLgd1

Da für mLgd1 kein kommerziell erwerblicher Antikörper vorhanden war, sollte ein eigener Antikörper hergestellt werden. Dazu wurde als einzusetzendes Antigen der Bereich von Aminosäure 1 bis 253 des mLgd1-Proteins ausgewählt. Dieser Bereich des Proteins bleibt auch noch nach Deletion des Knockout-Bereichs erhalten, so dass ein gegen diesen Bereich gerichteter Antikörper das Wildtyp-Protein (848 AS; 93 kDa) als auch das verkürzte Protein (269 AS; 28,6 kDa) detektieren sollte (siehe Abb. 2.22). Hierbei ist allerdings wie bei mLgd2 fraglich, ob dieses verkürzte Protein tatsächlich gebildet wird und stabil ist.

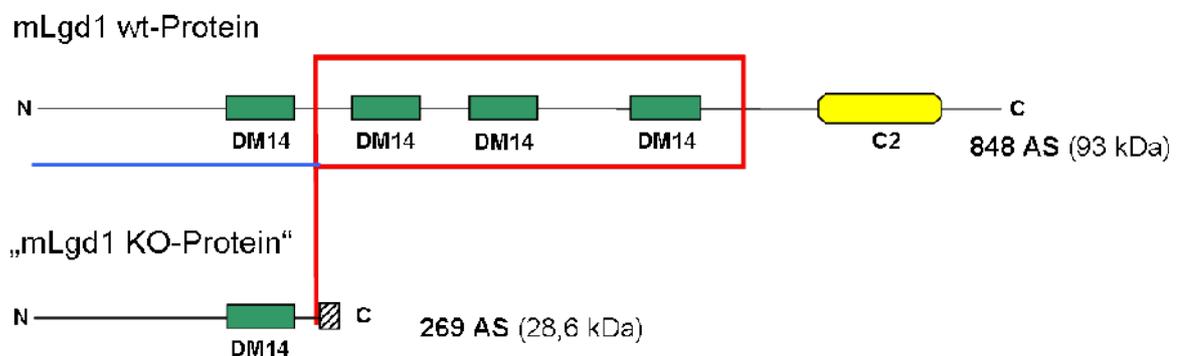


Abbildung 2.22: mLgd1-Protein: Wildtyp und Knockout

Das mLgd2-wt-Protein und das eventuell entstehende mLgd2-KO-Proteins sind in dieser Abbildung schematisch dargestellt. DM14-Domänen sind durch grüne Rechtecke, die C2-Domäne durch ein abgerundetes gelbes Rechteck symbolisiert. Die schräg markierte Box steht für die 16 Aminosäuren, die von der nicht-synonymen (missense)-Sequenz kodiert werden, die durch die Verschiebung des Leserasters im Knockout-Allel hervorgerufen wird (siehe auch Abb. 2.26) Der blaue Balken im N-terminalen Bereich der beiden Proteine stellt den Bindungsbereich des mLgd1-Antikörpers dar, der beide Proteine erkennen sollte. Er richtet sich gegen die ersten 253 Aminosäuren, die nach Deletion der Knockout-Region noch von der verbliebenen wildtypischen Sinn-Sequenz kodiert werden.

Das mLgd1(1-253)-Peptid wurde zunächst als GST-Fusionsprotein in Bakterien exprimiert und über die GST-Markierung aufgereinigt. Nach Abtrennung des GST-Fragments wurde das Peptid zur Immunisierung von Meerschweinchen verwendet – durchgeführt von der Firma Cocalico Biologicals -, deren Blutseren dann spezifische Antikörper gegen dieses Peptid enthalten sollten.

Zur Expression in Bakterien (siehe 4.1.8) wurde die cDNA für das mLgd1 (1-253)-Peptid in den bakteriellen Expressionsvektor pGEX-6P-2 kloniert, wodurch es eine N-terminale GST-Markierung erhält (siehe Abb. 2.23). Zwischen der GST-Markierung und dem Peptid liegt eine Schnittstelle für die PreScission Protease (46 kDa), die

selbst ein Fusionsprotein aus GST und der humanen Rhinovirus-3C-Protease ist. Da die Protease selbst eine GST-Markierung besitzt, bindet sie ebenso wie die GST-markierten mLgd1-Peptide an die zur Aufreinigung verwendeten GST-Sepharose-Beads. Dadurch können die GST-mLgd1-Peptide von dieser ebenfalls GST-markierten Protease von ihrer GST-Markierung abgetrennt werden und finden sich nach Zentrifugation im Überstand wieder, während die GST-markierte Protease an den Beads gebunden bleibt. Dieser Überstand wird im folgenden als „Eluat“ bezeichnet. Zur Aufreinigung wurde die Expression des GST-mLgd1(1-253)-Peptids mit IPTG induziert, die Bakterienzellen aufgeschlossen und die Beads zum Lysat gegeben. Nach der Bindung wurde die PreScission Protease hinzugefügt und die Abtrennung der mLgd1(1-253)-Peptide für 18 h bei 4°C (optimale Temperatur für das Enzym) durchgeführt. Aus allen Einzelschritten der Aufreinigung wurden Proben genommen, um den Ablauf der Aufreinigung zu protokollieren (siehe Abb. 2.23).

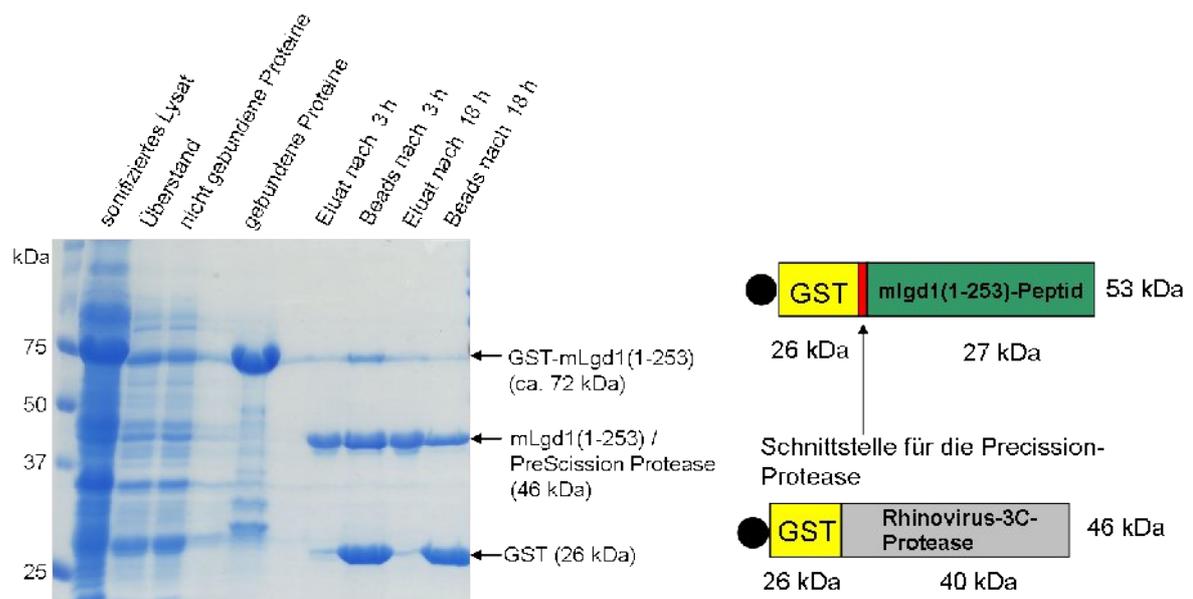


Abbildung 2.23: Aufreinigung des mLgd1(1-253)-Peptids

Im linken Teil der Abbildung ist das Coomassie-gefärbte SDS-Gel gezeigt, mit dem die Aufreinigung des mLgd1(1-253)-Peptids protokolliert wurde. In der Spur „gebundene Proteine“ erkennt man deutlich, dass das exprimierte GST-mLgd1(1-253) von ca. 72 kDa an die Beads bindet. Nach Zugabe der PreScission-Protease (46 kDa) wurde nach 3 h und nach 18 h Proben entnommen und die nach Zentrifugation erhaltenen Eluate und Beads auf das SDS-Gel aufgetragen. In den Spuren „Eluat nach 3 h“ und „Eluat nach 18 h“ erkennt man deutlich das von den Beads und dem GST-tag abgetrennte mLgd1(1-253)-Peptid mit einer Größe von 46 kDa, die genau gleich dem der PreScission-Protease ist. Im rechten Teil ist die Bindung des mLgd1-Peptids und der PreScission-Protease über ihre GST-Markierungen an die Beads (schwarzer Kreis) dargestellt. Die Schnittstelle für die PreScission-Protease im mLgd1-Peptid ist rot markiert.

In der Spur „gebundene Proteine“ ist zu erkennen, dass das exprimierte GST-mLgd1-

Peptid an die Beads bindet und eine Bande von ca. 72 kDa aufweist (oberer Pfeil in Abb. 2.23). Dies ist ein Unterschied von 20 kDa zum errechneten Molekulargewicht von 53 kDa (26 kDa GST-Markierung + 27 kDa mLgd1(1-253)-Peptid). Nach Zugabe der PreScission Protease und daher erfolgte Abtrennung des mLgd1-Peptids von seiner GST-Markierung ist in der Spur „Eluat nach 3h“ eine Bande von ca. 46 kDa zu erkennen (mittlerer Pfeil in Abb. 2.23), die aber auch in den folgenden „Beads“- und „Eluat-Spuren“ zu sehen ist. Diese Bande könnte das mLgd1-Peptid ohne seine GST-Markierung darstellen, obwohl hierfür eigentlich eine Bande von 27 kDa erwartet wurde. Bedenkt man aber den Unterschied von 20 kDa den schon das GST-mLgd1-Peptid im SDS-Gel im Vergleich zu seinem errechneten Molekulargewicht zeigte (70 kDa im Gel, 53 kDa berechnet), könnte es sich bei der 46 kDa-Bande durchaus um das aufgereinigte mLgd1-Peptid handeln. Die 46 kDa großen Bande in den „Beads“-Spuren müsste dann von der PreScission-Protease stammen, wobei diese Größe auch für das Protein erwartet wurde. Allerdings konnte nicht ausgeschlossen werden, dass das in der Eluat-Spur vorhandene 46 kDa mLgd1-Peptid mit der gleichgroßen PreScission Protease verunreinigt ist und somit ein Proteingemisch vorliegt.

Um dies zu testen, wurde die Bande ausgeschnitten und beim ZMMK mittels Peptid-Massen-Fingerabdruck analysiert. Dabei konnte das Peptid eindeutig als das mLgd1(1-253)-Peptid identifiziert werden. Die Bande auf der Höhe von 46 kDa in der Spur „Beads nach 3 h“ wurde ebenfalls ausgeschnitten und konnte als GST und humane Rhinovirus 3C Protease, also als die verwendete ebenfalls 46 kDa große PreScission Protease, identifiziert werden.

Des weiteren wurden Bakterien mit dem unveränderten GST-exprimierenden pGEX-6P-2-Vektor transformiert und die Aufreinigung durchgeführt. Würde etwas von der zugesetzten PreScission Protease im Eluat enthalten sein, müsste auch bei dieser Aufreinigung eine 46 kDa-Bande in der Eluatspur auftreten. Wie man aber in Abb. 2.24 in der Spur „Eluat nach 18 h“ erkennen kann, ist dies nicht der Fall. Daher handelt es sich bei der 46 kDa-Bande in der Eluatspur in Abb. 2.23 wirklich nur um aufgereinigtes mLgd1(1-253)-Peptid.

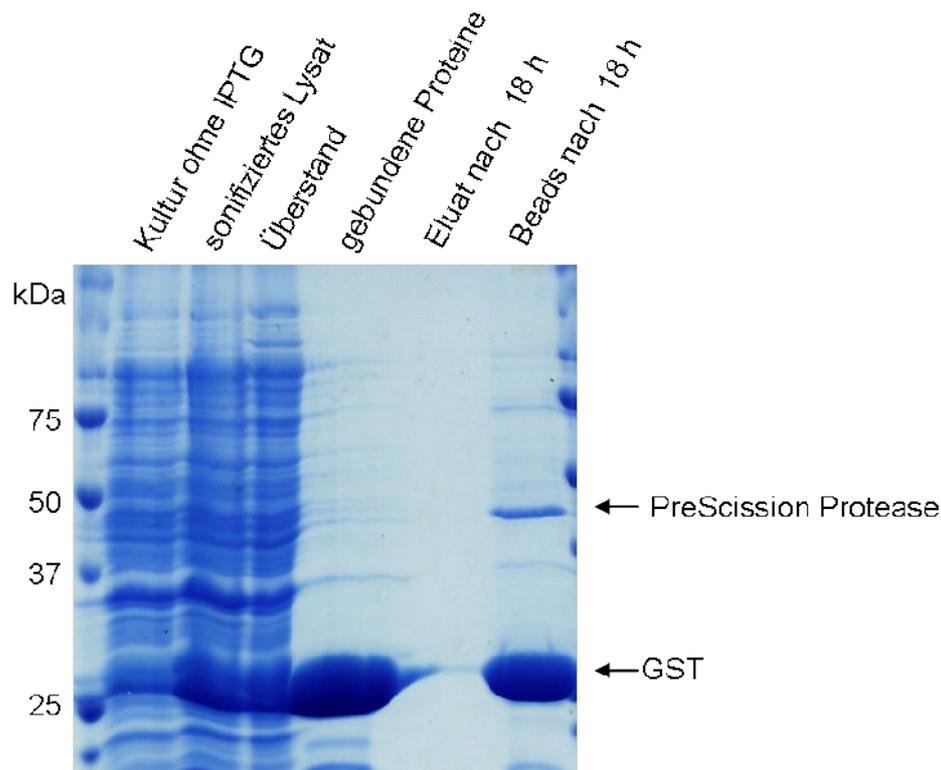


Abbildung 2.24: Aufreinigung ohne GST-markiertes Protein

Dieses kolloidal Coomassie gefärbte Gel zeigt die Aufreinigung von Bakterien, die nur den GST-exprimierenden pGEX-6P-2-Vektor enthielten. In der Spur der „gebundenen Proteine“ erkennt man, dass das GST an die Beads bindet. Vergleicht man die Spur „Eluat nach 18h“ mit den Spuren „Eluat nach 3h“ und „Eluat nach 18h“ aus Abbildung 2.1.14 erkennt man deutlich, dass die PreScission-Protease nicht im Eluat enthalten ist.

Mit je 250 µg aufgereinigtem Peptid wurden von der Firma Cocalico Biologicals Inc. (Reamstown, USA) zwei Meerschweinchen immunisiert. Die aus den Ausblutungen der Tiere erhaltenen Seren konnten bereits im Western-Blot getestet werden.

Dazu wurden wieder die cDNAs von *mlgd1* und *mlgd2* als UAS-Konstrukte mit dem *hsGAL4*-Treiber exprimiert, wobei als Wildtyp-Kontrolle erneut *w*-Larven verwendet wurden. Wie in Abb. 2.25 deutlich zu erkennen, detektiert der Antikörper spezifisch mLgd1 und nicht mLgd2, zeigt aber auch zahlreiche unspezifische Banden. Neben der starken Bande bei 130 kDa tritt bei beiden UAS-*mlgd1*-Konstrukten, die sich nur durch ihren unterschiedlichen Integrationsort im *Drosophila*-Genom unterscheiden, eine weitere Bande bei ca. 60 kDa auf. Außerdem erscheinen bei der Insertion UAS-*mlgd1*¹⁰ zwei weitere Banden im Bereich von 80 kDa. Diese Banden treten bei der Insertion UAS-*mlgd1*³ vielleicht aufgrund einer geringen Expression nicht auf.

Dagegen spricht allerdings, dass die 130 kDa-Bande bei beiden Insertionen eine vergleichbare Stärke zeigt.

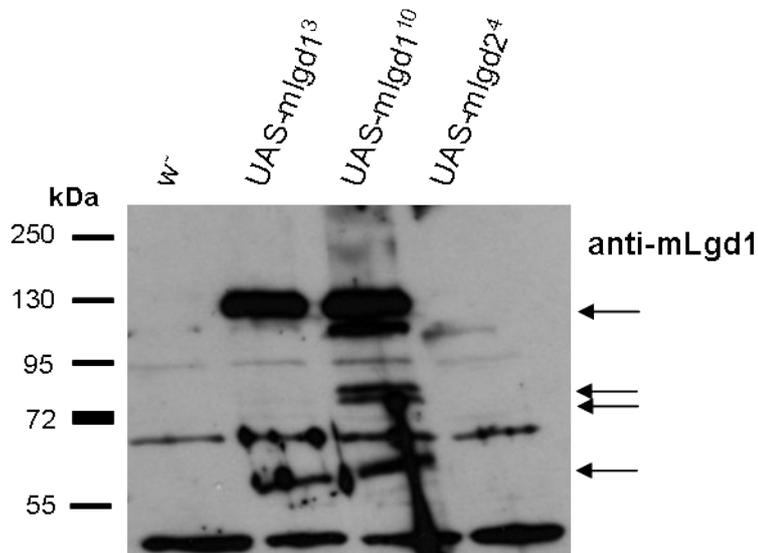


Abbildung 2.25: Test des mLgd1-Antikörpers im Western-Blot

Dieser Western-Blot wurde mit den Lysaten von je zwei Larven pro Genotyp und dem mLgd1-Antikörper (1:3000) angefertigt. Er zeigt deutliche die spezifische Bindung des Antikörpers an das mLgd1-Protein, da keine Bindung an das Lgd-Protein aus *Drosophila* oder an mLgd2 besteht. (Die beiden UAS-*mlgd1*-Konstrukte unterscheiden sich nur in ihrem Integrationsort im Genom.)

2.2.4 Allgemeine Genersatzstrategie für den konditionalen Knockout von *mlgd1* und *mlgd2*

Für das Ausschalten eines Gens ist das Entfernen des Start-Codons ATG am effizientesten. Da jedoch für beide Gene mehrere mögliche Transkriptionsstarts laut der ENSEMBL-Datenbank existieren, konnte diese Methode nicht angewendet werden. Einen Anhaltspunkt zu einer vollständigen Ausschaltung des Gens lieferte die Sequenzierung des Nullallels *lgd^{d7}* in *Drosophila*. Hier verursacht eine Deletion von 2 bp eine Leserasterverschiebung, so dass die Translation nach der ersten DM14-Domäne abbricht [Jaekel and Klein, 2006]. Nach dem Vorbild dieses Nullallels, sollten die Gene *mlgd1* und *mlgd2* in der Maus ebenfalls so modifiziert werden, dass ein Translationsstop nach der ersten DM14-Domäne erfolgt. Der dazu deletierte Bereich (*mlgd1* = Exon 8-16; *mlgd2* = Exon 14-7; siehe Abbildung 2.26 und 2.28)

wird im folgenden als Knockout-Bereich (KO) bezeichnet.

Da eine embryonale Letalität bei einem Ausfall von *mlgd1* und/oder *mlgd2* nicht ausgeschlossen werden konnte, wurde eine konditionale Inaktivierung der Gene geplant. Dadurch können die Gene zeit- und gewebsspezifisch durch Einkreuzung einer entsprechenden Cre-Rekombinase-Linie ausgeschaltet werden.

Für beide Projekte wurden zunächst die Gensatzvektoren kloniert (siehe Abb. 2.27 und 2.29), wobei die einzelnen Fragmente in den pGK12-Vektor eingefügt wurden. In beiden Gensatzvektoren folgt nach dem kurzen Homologiearm (KA) eine loxP- und dann eine von FRT-Stellen eingerahmte Neomycin-Resistenzkassette (neo-Kassette), die für die positive Selektion der korrekt rekombinierten ES-Zellebenötigt wird. Durch die FRT-Stellen kann diese Resistenzkassette durch Verpaarung gegen eine Flp-Rekombinase exprimierende Maus wieder entfernt werden. Nach der neo-Kassette folgt dann der Knockout-Bereich, der am Ende eine loxP-Stelle besitzt. Nach dem folgenden langen Homologiearm (LA) schließt sich das Gen für die Thymidin-Kinase aus dem *Herpes simplex* Virus (HSV-*tk*) an, welches für die negative Selektion benötigt wird.

Um die homologe Rekombination in den ES-Zellen zu ermöglichen, wurden der *mlgd1*- bzw. *mlgd2*-Gensatzvektor mit *NotI* linearisiert, über eine Phenol-Chloroform-Extraktion aufgereinigt und anschließend mittels Elektroporation in ES-Zellen transformiert. Anschließend wurde eine positive (G418) und negative Selektion (Ganciclovir) durchgeführt und doppelt-resistente ES-Zellklone isoliert. ES-Zellklone, in denen die erfolgte Rekombination durch PCR und Southern-Blot nachgewiesen werden konnte, sollten dann zur Herstellung der gewünschten Mauslinien durch Blastozysteninjektion verwendet werden.

2.2.5 Details der Gensatzstrategie für *mlgd1*

Das *mlgd1/CC2D1B/Freud-2* Gen liegt auf Chromosom 4, besitzt eine Größe von 14 kb und liefert ein Transkript mit 25 Exons. Durch die Deletion des Bereichs von Exon 8 bis Exon 16 werden die zweite, dritte und vierte DM14-Domäne entfernt (siehe Abb. 2.26). Nach dem Spleißen von Exon 7 an Exon 17 ergibt sich eine Leserasterverschiebung, wodurch nach 48 bp nicht-synonymer (*missense*) Sequenz insgesamt 16 STOP-Codons eingeführt werden.

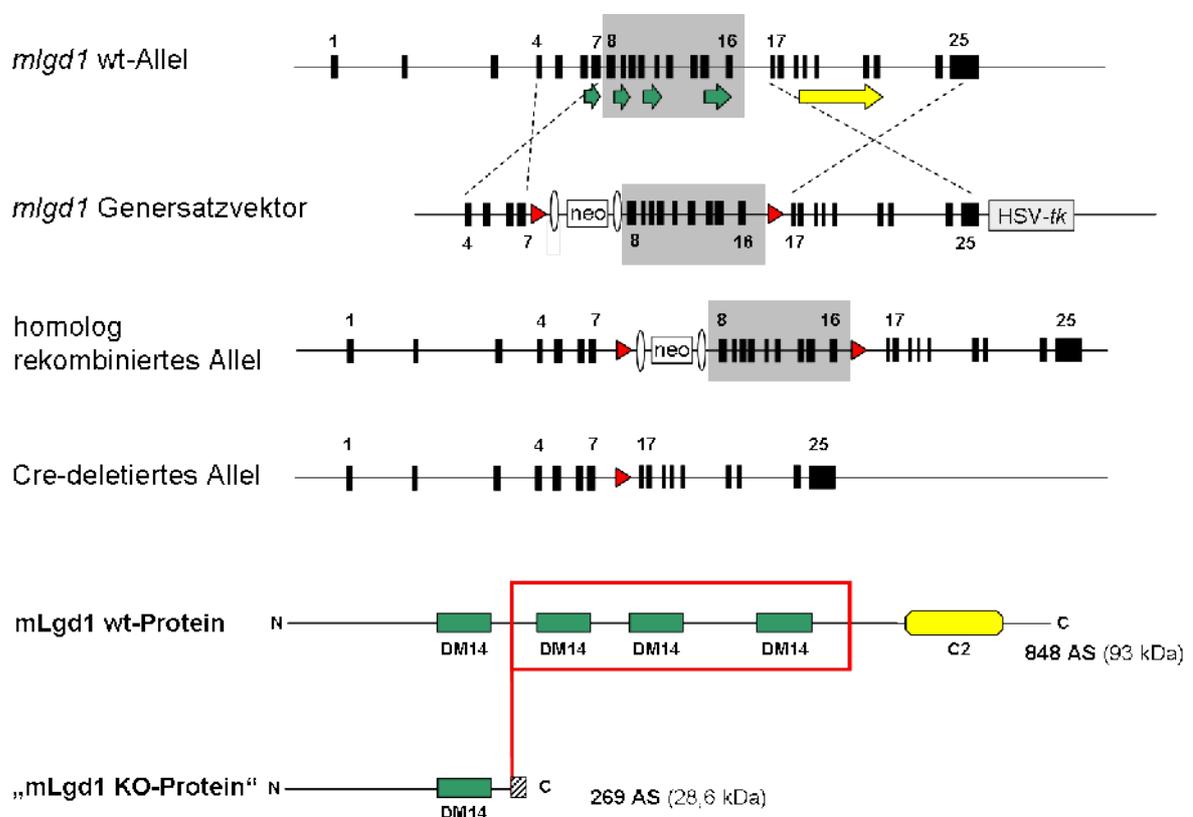


Abbildung 2.26: Strategie für den Knockout von *mlgd1*

Die Darstellung zeigt das endogene Wildtyp-Allel, den *mlgd1*-Gensatzvektor, das Allel nach erfolgter homologer Rekombination und nach Cre-vermittelter Deletion des Knockout-Bereichs. Die Exons sind durch schwarze Balken dargestellt und solche, die den Beginn oder Ende eines Fragments angeben mit den entsprechenden Zahlen nummeriert (kurzer Homologiearm = Exon 4-7; Knockout-Bereich = Exon 8-16; langer Homologiearm = Exon 17-25). Unterhalb des wt-Allels sind die vier DM14-Domänen durch grüne Pfeile und die C2-Domäne durch einen gelben Pfeil dargestellt (DM14-Domäne (1) wird kodiert von Exon 6-7; DM14-Domäne (2) von Exon 8-9, DM14-Domäne (3) von Exon 11-12; DM14-Domäne (4) von Exon 15-16 und die C2 Domäne von Exon 19-23). LoxP-Stellen werden durch rote Dreiecke, FRT-Stellen durch schwarz umrandete weiße Ellipsen symbolisiert.

Im unteren Teil der Abbildung sind das mLgd1 Wildtyp-Protein sowie das evtl. verbleibende (daher in „“ angegeben) Protein nach Cre-vermittelter Deletion dargestellt. DM14-Domäne sind grün und die C2-Domäne gelb markiert. Die durch die Leserasterverschiebung entstandenen STOP-Codons sind durch rote Pfeilspitzen angezeigt.

Falls ein Überspringen von Exons (Exon-Skipping) auftreten sollte, müsste ein Spleißen von Exon 7 an Exon 20 erfolgen, damit ein korrektes Leserasterwiederhergestellt wäre. Das resultierende Protein würde aber nur aus der ersten DM14-Domäne und einer N-terminal verkürzten C2-Domäne bestehen. Nach den Ergebnissen für ein ähnliches Deletionskonstrukt aus *Drosophila* (persönliche Kommunikation Tobias Troost), wäre dieses Protein vermutlich funktionslos. Eine mögliche Funktion in der Maus kann allerdings nicht ausgeschlossen werden.

Zur Klonierung des Genersatzvektors wurden die Fragmente für den kurzen und langen Homologiearm sowie für den Knockout-Bereich (Exon 8-16) von BAC-DNA (RP23-446F20) via PCR amplifiziert (verwendete Oligonukleotide siehe Tabelle 4.4).

Hierbei wurde darauf geachtet, dass die Fragmente immer weit genug von den Exongrenzen entfernt beginnen und enden, um mögliche Spleißdonor- bzw. -akzeptor-Stellen nicht zu verlieren. Außerdem wurden über die Sequenz der Oligonukleotide Restriktionsschnittstellen eingefügt, die für die Klonierung in den pGK12-Vektor oder die spätere Southern-Blot-Analyse benötigt wurden (in Abb. 2.27 mit einem „*“ gekennzeichnet). Nach der PCR wurden die einzelnen Fragmente zunächst in den pGEM-TEasy-Vektor subkloniert und nach erfolgter Sequenzierung in den pGK12-Vektor eingefügt. Hierbei wurde der kurze Homologiearm (KA; Exon 4-7) über die *NotI*- und *SacII*-Schnittstelleer Knockout-Bereich (KO; Exon 8-16) über die Schnittstellen *Ascl* und *MfeI* und der lange Homologiearm (LA; Exon 17-25) über die Schnittstellen *AflII* und *PacI* in den pGK12-Vektor kloniert (siehe Abb. 2.27).

Der fertige Genersatzvektor wurde vor der Transformation in ES-Zellen mit verschiedenen Restriktionen und einer Sequenzierung kontrolliert.

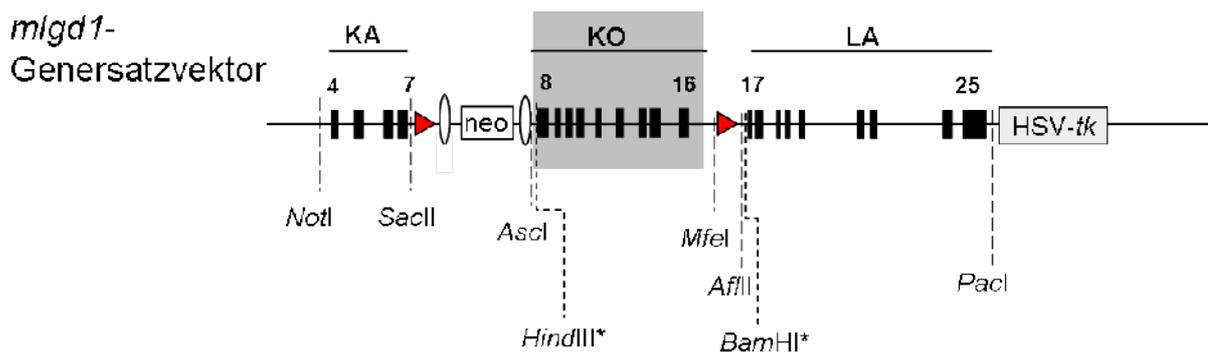


Abbildung 2.27: Klonierung des *mlgd1*-Generersatzvektors

Die Abbildung zeigt die Klonierungsstrategie zur Herstellung des *mlgd1*-Generersatzvektors. Der kurze Homologiearm (KA; Exon 4-7; 2,0 kb) wurde über die *NotI*- und *SacII*-Schnittstelle, der Knockout-Bereich (KO; Exon 8-16; 3,2 kb) über die Schnittstellen *Ascl* und *MfeI* und der lange Homologiearm (LA; Exon 17-25; 4,9 kb) über die Schnittstellen *AflII* und *PacI* in den pGK12-Vektor kloniert. Für die spätere Southern Blot-Analyse folgte im Knockout-Bereich direkt hinter der *Ascl*-Stelle eine *HindIII*-Schnittstelle und im langen Homologiearm direkt hinter der *AflII*-Stelle eine *BamHI*-Schnittstelle. Diese Schnittstellen sind mit einem „*“ gekennzeichnet.

2.2.6 Details der Generersatzstrategie für *mlgd2*

Das 15 kb lange *mlgd2/CC2D1A/Freud-1*-Gen liegt auf Chromosom 8, sein Transkript umfasst 29 Exons und das Gen wird – im Gegensatz zu *mlgd1* – vom Komplementärstrang abgelesen. Der zu deletierende Bereich reicht von Exon 14 bis Exon 7, wodurch es zum Verlust der zweiten und dritten DM14-Domäne, sowie der Hälfte der vierten DM14-Domäne kommt (siehe Abb. 2.28). Das Spleißen von Exon 15 an Exon 6 führt zudem zu einer Verschiebung des Leserasters, so dass nach 120 bp nicht-synonymer (*missense*) Sequenz insgesamt 18 STOP-Codons folgen.

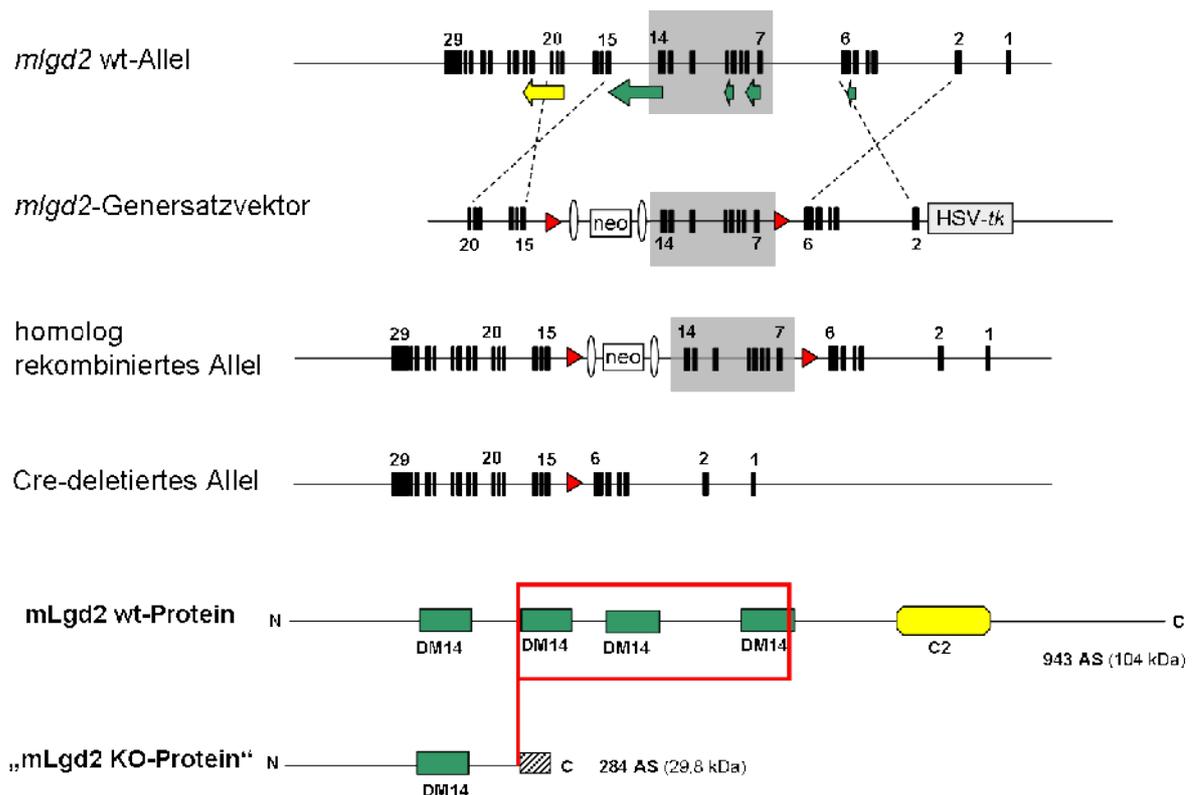


Abbildung 2.28: Strategie für den *mlgd2*-Knockout

Die Darstellung zeigt das endogene Wildtyp-Allel, den *mlgd2*-Genersatzvektor, das Allel nach erfolgter homologer Rekombination und nach Cre-vermittelter Deletion des Knockout-Bereichs. Die Exons sind durch schwarze Balken dargestellt und solche, die den Beginn oder Ende eines Fragments angeben mit den entsprechenden Zahlen nummeriert (kurzer Homologiearm = Exon 20-15; Knockout-Bereich = Exon 14-7; langer Homologiearm = Exon 16-2). Unterhalb des wt-Allels sind die vier DM14-Domänen durch grüne Pfeile und die C2-Domäne durch einen gelben Pfeil dargestellt (DM14-Domäne (1) wird kodiert von Exon 5-6; DM14-Domäne (2) von Exon 7-8, DM14-Domäne (3) von Exon 10-11; DM14-Domäne (4) von Exon 14-15 und die C2 Domäne von Exon 18-22). LoxP-Stellen werden durch rote Dreiecke, FRT-Stellen durch schwarz umrandete weiße Ellipsen symbolisiert.

Im unteren Teil der Abbildung sind das mLgd2 Wildtyp-Protein sowie das evtl. verbleibende (daher in „ angegeben) Protein nach Cre-vermittelter Deletion (rotes Rechteck) dargestellt. DM14-Domäne sind grün und die C2-Domäne gelb markiert. Das schräg gestreifte Rechteck steht für die 40 Aminosäuren, die von der durch die Leserasterverschiebung entstandene nicht-synonyme (*missense*) Sequenz kodiert werden, bevor das erste STOP-Codon auftritt.

Nur ein Spleißen von Exon 19 an Exon 6 würde zu einem korrekten Leseraster führen, wodurch wie bei dem konditionalen *mlgd1*-Knockout ein Protein mit einer DM14 und der C2-Domäne gebildet werden könnte, welches aber vermutlich funktionslos wäre (siehe 2.28).

Als Vorlage zur Amplifikation der Homologiearme und des Knockout-Bereichs (Exon 14-7) diente die BAC-DNA (RP23-298K21) (verwendete Oligonukleotide siehe Tabelle 4.4). Auch hier wurde auf einen sicheren Abstand zu Spleißdonor- und

Spleißakzeptor-Stellen geachtet und über entsprechend hergestellte Oligonukleotide Restriktionsschnittstellen für die Klonierung und die Southern-Blot-Analyse eingefügt (in Abb. 2.29 mit einem „*“ gekennzeichnet). Nach Sequenzierung wurden die Fragmente aus dem pGEM-TEasy- in den pGK12-Vektor umkloniert. Die Klonierung erfolgte bei dem kurzen Homologiearm (KA; Exon 20-15; 2,3 kb) über die *NotI*- und *SacII*-Schnittstelle, bei dem Knockout-Bereich (KO; Exon 14-7; 4 kb) über die Schnittstellen *AscI* und *MfeI* und bei dem langen Homologiearm (LA; Exon 6-2; 5,0 kb) über die Schnittstellen *NheI* und *PacI* (siehe Abb. 2.29).

Die richtige Integration der Fragmente in den pGK12-Vektor konnte durch verschiedene Restriktionen und einer erneuten Sequenzierung bestätigt werden.

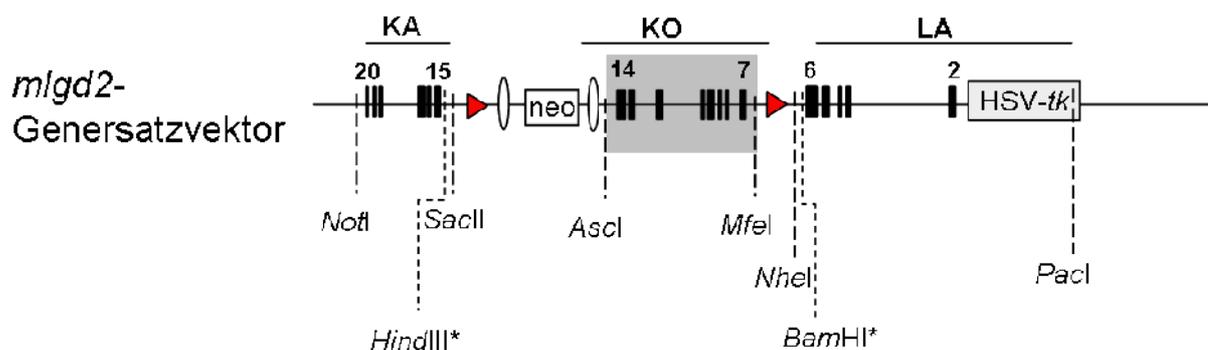


Abbildung 2.29: Klonierung des *mlgd2*-Genersatzvektors

Die Abbildung zeigt die Klonierungsstrategie zu Herstellung des *mlgd2*-Genersatzvektors. Der kurze Homologiearm (KA; Exon 20-15; 2,3 kb) wurde über die *NotI*- und *SacII*-Schnittstelle, der Knockout-Bereich (KO; Exon 14-7; 4 kb) über die Schnittstellen *AscI* und *MfeI* und der lange Homologiearm (LA; Exon 6-2; 5 kb) über die Schnittstellen *NheI* und *PacI* in den pGK12-Vektor kloniert. Um die homologe Rekombination später über Southern Blot nachweisen zu können, folgte im kurzen Homologiearm vor der *SacII*- eine *HindIII*-Schnittstelle und im langen Homologiearm direkt hinter der *NheI*- eine *BamHI*-Schnittstelle (mit einem „*“ gekennzeichnet).

2.2.7 Transfektion der ES-Zellen mit dem Genersatzvektor für *mlgd1* oder *mlgd2*

Nach Linearisierung und Phenol-Chloroform-Extraktion wurde der Genersatzvektor für *mlgd1* oder *mlgd2* mittels Elektroporation in murine ES-Zellen der Linie v6.5 (Referenz) transformiert. Für *mlgd1* wurden drei und für *mlgd2* insgesamt fünf Transfektionen durchgeführt, wobei pro Transfektion je 1×10^7 ES-Zellen mit 40 μg Genersatzvektor transfiziert wurden. Nach positiver und negativer Selektion konnten

im *mlgd1*-Projekt insgesamt 630 potentiell homolog-rekombinante und 970 potentiell homolog-rekombinante ES-Zellen im *mlgd2*-Projekt isoliert werden. Hiervon konnten drei Klone (*mlgd1*-100-A1, *mlgd1*-400-E11 und *mlgd1*-100-D1) als *mlgd1*-korrekt homolog rekombiniert und fünf (*mlgd2*-200-F8, *mlgd2*-200-F12, *mlgd2*-200-A3, *mlgd2*-200-A4 und *mlgd2*-200-F5) als *mlgd2*-korrekt homolog rekombiniert mit Southern-Blot und PCR bestätigt werden.

Die Sonden für die Southern-Blot-Analyse wurden in beiden Projekten mittels PCR hergestellt. Als Quelle genomischer DNA wurde dazu im *mlgd1*-Projekt der BAC-Klon RP23-446F20 und im *mlgd2*-Projekt der Klon RP23-298K21 verwendet. Da im *mlgd1*-Projekt alle getesteten externen Sonden zur Verifizierung einer korrekten Integration des 3'-Endes keine spezifische Bindung zeigten, wurde eine interne Sonde (700 bp) aus dem langen Homologiearm verwendet. Die zum Nachweis der Einzelintegration benötigte neo-Sonde wurde aus der Neomycin-Resistenzkassette des pGK12-Vektors per PCR amplifiziert.

a) Southern-Blot-Analyse von *mlgd1*-Klonen

Um die korrekt erfolgte homologe Rekombination am 5' Ende des Konstrukts zu bestätigen, wurde die externe *mlgd1*-*Hind*III-Sonde (590 bp) verwendet, mit der sich nach einem Verdau der genomischen DNA mit dem Enzym *Hind*III im Wildtyp eine Bande von 8 kb und in homolog rekombinierten Klonen eine Bande von 4,6 kb ergibt (siehe Abb. 2.30). Zur Verifizierung des korrekt integrierten 3' Ende wurde die Sonde aus dem langen Homologiearm (*mlgd1*-LA-Sonde, 700 bp) verwendet. Hiermit wird bei *Bam*HI-verdauter DNA im Southern-Blot im Wildtyp eine 10,7 kb Bande detektiert, während eine 7 kb Bande in rekombinanten Klonen auftritt. Zufällige Integrationen des Gensatzvektors sollten mithilfe einer neo-Sonde (533 bp) nachgewiesen werden, die in der Neomycin-Resistenz-Kassette bindet. Nach *Hind*III-Restriktion sollte mit dieser Sonde in wildtypischen ES-Zellen keine Bande und in homolog rekombinierten nur eine 4,6 kb-Bande detektiert werden. Die Abbildung 2.30 zeigt die verwendete Strategie sowie die Southern-Blot-Analyse für einen der injizierten Klone.

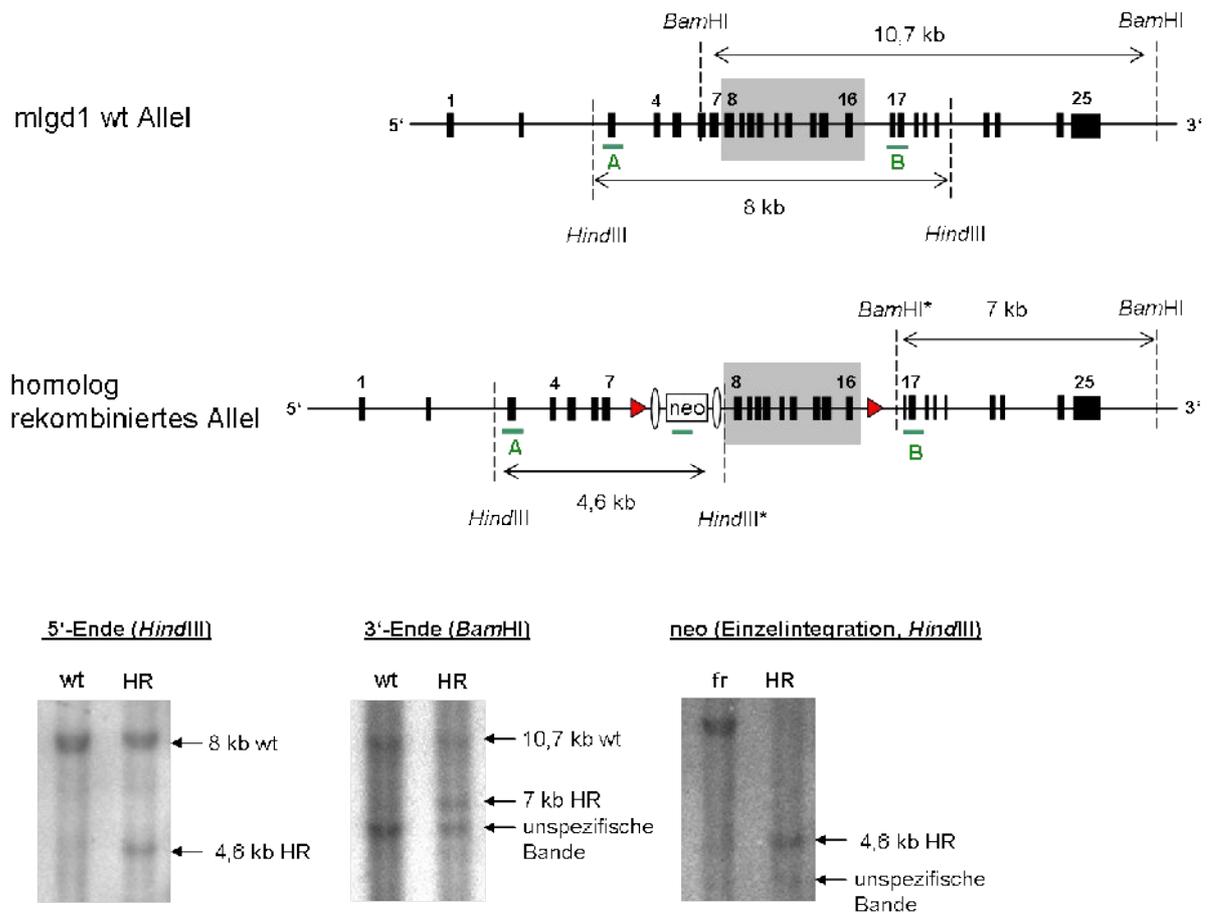


Abbildung 2.30: Southern Blot-Analyse der *mlgd1*-Klone

Die Darstellung zeigt im oberen Bereich das endogene *mlgd1* Wildtyp-Allel und das veränderte Allel nach korrekt erfolgter homologer Rekombination. Die Exons sind durch schwarze Balken dargestellt. Exons, die den Beginn oder Ende eines Fragments angeben (kurzer Homologiearm: Exon 4-7; KO-Bereich: Exon 8-16 und langer Homologiearm: Exon 17-25) sind mit den entsprechenden Zahlen nummeriert. LoxP-Stellen werden durch rote Dreiecke, FRT-Stellen durch schwarz umrandete, weiße Ellipsen dargestellt. Restriktionsschnittstellen sind durch gestrichelte Linien mit dazugehörigem Enzym angegeben, wobei neu eingefügte Restriktionsschnittstellen mit „*“ gekennzeichnet sind. Die drei verwendeten Sonden (durch grüne Linien dargestellt) für die Southern Blot-Analyse sind „*mlgd1*-HindIII-Sonde“ (A), „*mlgd1*-LA-Sonde“ (B) und die neo-Sonde.

Im unteren Bereich sind die Southern Blots abgebildet, die zur Bestätigung der korrekten Integration des 5'- und des 3'-Endes des Genersatzvektors dienen. Außerdem sollte eine falsche oder mehrfache Integration des Konstrukts durch die Hybridisierung mit der neo-Sonde ausgeschlossen werden. Die Spur HR, die immer die korrekte homologe Rekombination darstellt, stammt von dem ES-Zellklon *mlgd1*-100-D1, der später für die Blastozysteninjektion verwendet wurde. wt = wt-Klon, HR= homolog rekombiniert, fr = falsch rekombiniert

b) Southern-Blot-Analyse von *mlgd2*-Klonen

In dem *mlgd2*-Projekt konnten 5'- und 3'-Ende mit externen Sonden bestätigt werden. Da *mlgd2* im Gegensatz zu *mlgd1* vom Komplementärstrang der DNA abgelesen wird, liegt das 5'-Ende hier auf der rechten und das 3'-Ende auf der linken Seite der Abbildung 2.31. Zur Verifizierung des 5' Endes konnte nach *Bam*HI-Restriktion der DNA unter Verwendung der *mlgd2-Bam*HI-Sonde (450 bp) eine 9,3 kb Bande im Wildtyp und eine 5,5 kb Bande in homolog rekombinanten Klonen detektiert werden. Die Bestätigung des 3'-Endes erfolgte mithilfe der *mlgd2-Hind*III-Sonde (600 bp), wodurch sich nach *Hind*III-Restriktion eine 22,4 kb Bande im Wildtyp und eine 15,2 kb Bande nach korrekter homologer Rekombination ergab. Für den Nachweis der Einzelintegration mittels neo-Sonde musste die DNA mit *Spe*I restringiert werden. Das Auftreten von nur einer Bande bei 13,3 kb diente als Nachweis für die Einzelintegration. Die angewendete Strategie zur Southern Blot-Analyse sowie die Ergebnisse für einen später injizierten Klon sind in Abb. 2.31 dargestellt.

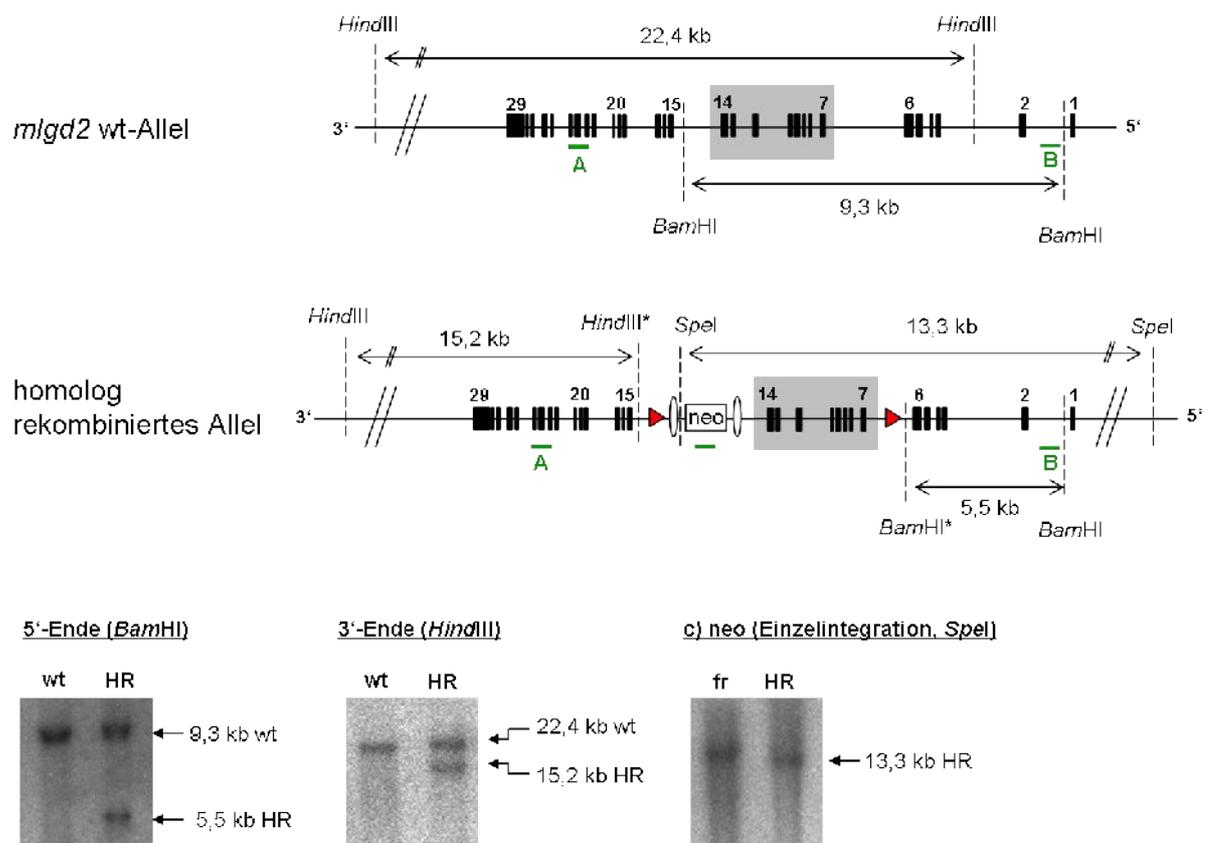


Abbildung 2.31: Southern-Blot Analyse der *mlgd2*-Klone

Das Schemaschema zeigt das endogene *mlgd2* Wildtyp-Allel und das Allel nach erfolgter homologer Rekombination. Im Unterschied zum *mlgd1*-Gen, das vom Vorwärtsstrang der DNA abgelesen wird, wird *mlgd2* vom Komplementärstrang abgelesen. Daher liegt das 5'-Ende in der Darstellung rechts und das 3'-Ende links. Die Exons (schwarze Balken), die den Beginn oder Ende eines Fragments angeben (kurzer Homologiearm: Exon 20-15; KO-Bereich: Exon 14-7 und langer Homologiearm: Exon 6-2) sind mit den entsprechenden Zahlen nummeriert. LoxP-Stellen werden durch rote Dreiecke, FRT-Stellen durch schwarz umrandete, weiße Ellipsen dargestellt. Restriktionsschnittstellen sind durch gestrichelte Linien mit dazugehörigem Enzym angegeben, wobei neu eingefügte Restriktionsschnittstellen mit „*“ gekennzeichnet sind. Die drei verwendeten Sonden (grüne Linien) für die Southern Blot-Analyse sind „*mlgd2*-HindIII-Sonde“ (A), „*mlgd2*-BamHI-Sonde“ (B) und die neo-Sonde.

Der untere Teil der Abbildung zeigt, dass die korrekte Integration des 5'- und 3'- Endes sowie die Einzelintegration für den ES-Zellklon *mlgd2*-200-A3 (Spur HR) über Southern Blots nachgewiesen werden konnte. wt = wt-Klon, HR= homolog rekombiniert, fr = falsch rekombiniert

2.2.8 Nachweis der Funktionalität der verwendeten Gensatzvektoren mittels Cre-vermittelter Rekombination in ES-Zellen

Vor der Injektion von bestätigten, homolog rekombinanten ES-Zellen in Blastozysten sollte die Funktionalität der Konstrukte in Zellkultur getestet werden. Hierbei sollte sichergestellt werden, dass die Aktivität einer Cre-Rekombinase durch die inserierten loxP-Stellen wirklich zu einer Deletion des Knockout-Bereichs führt. Dazu wurden die heterozygoten *mlgd1^{neoflox/+}* bzw. *mlgd2^{neoflox/+}*-ES-Zellen mit einer in PBS gelösten HTN-Cre (5 µM; siehe Material und Methoden 4.4.11) oder nur PBS behandelt und der Erfolg der Cre-vermittelten Deletion nach DNA-Extraktion mittels PCR getestet. Hierbei wird das homolog rekombinierte Allel aufgrund des Vorhandenseins der Neomycin-Resistenzkassette als auch der loxP-Stellen mit „neoflox“ bezeichnet. Das wildtypische Allel wird durch ein „+“ und das Cre-deletierte Allel durch ein „-“ symbolisiert.

Beim *mlgd1*-Projekt wurde eine PCR mit den drei Oligonukleotiden „TYPEAfor“(1), „mlgd1KOseq1rev“(2) und „SAloxfrtREV“(4) (Sequenzen in Tab. 4.6) durchgeführt. Die Abb. 2.32 gibt eine Übersicht über die Bindungsstellen dieser Oligonukleotide in den verschiedenen Allelen. Dies führt im Wildtyp-Allel (*mlgd1⁺*) zu einer Bande von 497 bp, im rekombinanten Allel (*mlgd1^{neoflox}*) zu einer Bande von 283 bp und im deletierten Allel (*mlgd1⁻*) zu keiner Bande. Wie Abbildung 2.23A zeigt, war die rekombinante Bande in den unbehandelten Zellen noch vorhanden, während sie in den Cre-behandelten Zellen fehlte. Damit konnte gezeigt werden, dass die loxP-Stellen funktional sind und somit mit diesen ES-Zellen konditional inaktivierbare *mlgd1*-Mäuse hergestellt werden können. Um den Erfolg der Cre-vermittelten Deletion nochmals positiv zu bestätigen, wurde auch eine PCR mit den Oligonukleotiden „TYPEAfor“(1) und „mlgd1KOloxrev“(3) durchgeführt. Aufgrund der großen Entfernung und der kurzen Elongationszeit in der PCR wird mit diesen Oligonukleotiden im Wildtyp- und im rekombinanten Allel keine Bande gebildet. Durch die Deletion verkürzt sich dieser Abstand, so dass ein Fragment von 222 bp amplifiziert werden konnte (Abb. 2.32B).

Zusammenfassend zeigte der Klon-100-D1 die korrekten Banden in der Southern-Blot-Analyse, enthielt funktionale loxP-Stellen und wurde daher für die Blastozysteninjektion ausgewählt.

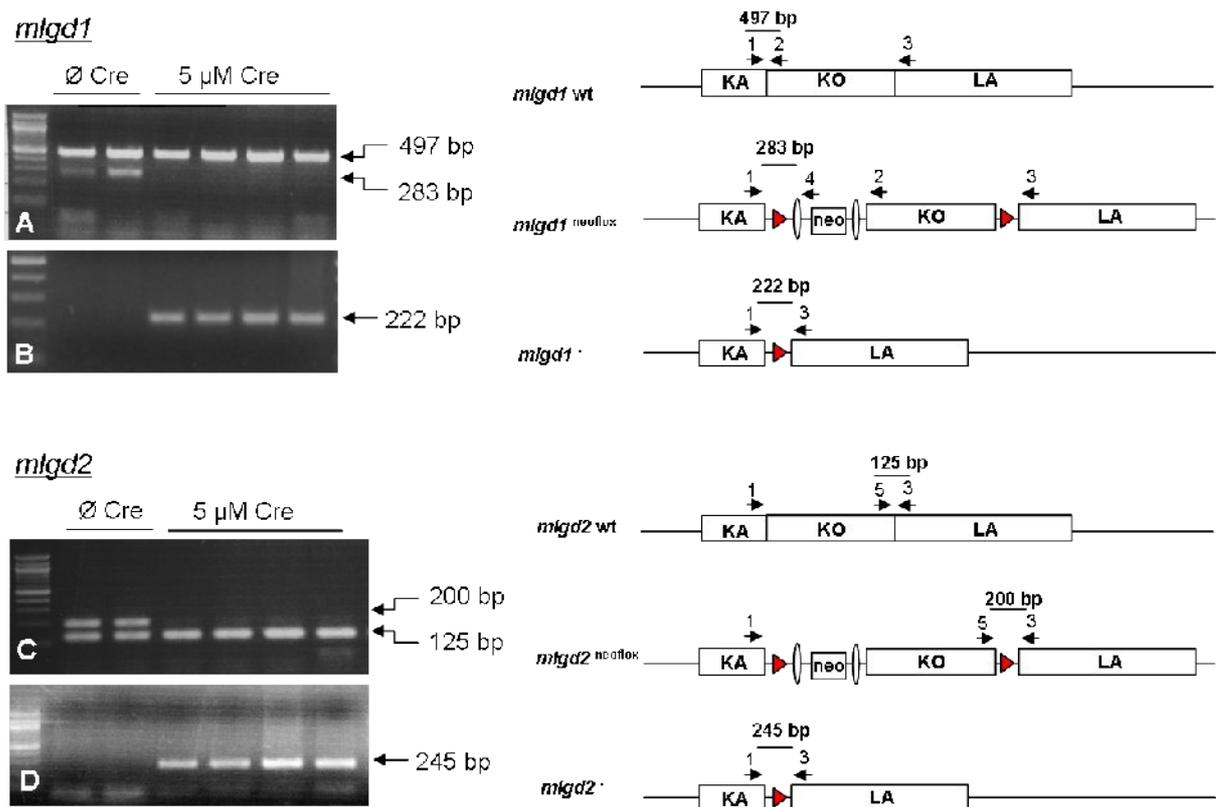


Abbildung 2.32: PCR zum Nachweis der Cre-vermittelten Deletion in ES-Zellen

Heterozygote *mlgd1*^{neoflox/+} (siehe **A** und **B**) bzw. *mlgd2*^{neoflox/+} (siehe **C** und **D**) ES-Zellen wurden mit einer 5 µM HTN-Cre-Lösung bzw. PBS (als Kontrolle) behandelt. In beiden Experimenten ergeben sich die sechs Spuren dadurch, dass je vier Kammern eine 6-Kammerplatte mit HTN Cre und zwei Löcher nur mit PBS behandelt wurden. Die Bindungsstellen der Oligonukleotide in den möglichen Allelen sind auf der rechten Seite der Abbildung durch die Pfeilspitzen angezeigt. Hierbei sind der kurze Homologiearm (KA), die Knockout-Region (KO) und der lange Homologiearm (LA) aus Gründen der Übersichtlichkeit nur als Balken angegeben.

A) Bei einer PCR mit den drei Oligonukleotiden „TYPE5Afor“(1), „mlgd1KOseq1rev“(2) und „SAloxfrtREV“(4) wurde im Wildtyp-Allel ein Fragment von 497 bp (1+2) und im rekombinanten Allel von 283 bp (1+4). Im deletierten Allel konnte mit diesen Oligonukleotiden kein Fragment amplifiziert werden, da die Bindungsstelle für das Oligonukleotid (4) durch die Cre-Deletion ebenfalls entfernt wird. **B)** Bei einer PCR mit den Oligonukleotiden „TYPE5Afor“(1) und „mlgd1KOloxrev“(3) konnte das Vorhandensein des deletierten Allels mit der Bildung des 222 bp Fragments bestätigt werden. Mit diesen Oligonukleotiden kann nämlich - aufgrund der großen Entfernung und der kurzen Elongationszeit in der PCR - nur im deletierten Allel ein Produkt gebildet werden.

C) Mit den Oligonukleotiden „mlgd2KOloxrev“(3) und „mlgd2LAloxforNEU“(5) konnte im Wildtyp-Allel ein Fragment von 125 bp und im rekombinanten Allel von 200 bp gebildet werden. Durch die Cre-vermittelte Deletion wird die Bindungsstelle für das Oligonukleotid (3) entfernt, so dass kein Fragment amplifiziert werden kann. **D)** Der Erfolg der Cre-vermittelten Deletion konnte nochmals durch die Amplifikation eines 245 bp-Fragments gezeigt werden, das mit den Oligonukleotiden „mlgd2TYPE1SAfor“(1) und „mlgd2KOloxrev“(3) nur im deletierten Allel gebildet werden kann.

Beim *mlgd2*-Projekt wurde zunächst eine PCR mit den Oligonukleotiden

„*mlgd2KOloxrev*“(3) und „*mlgd2LAloxforNEU*“(5) durchgeführt, die im Wildtyp eine Bande von 125 bp und im rekombinanten Allel eine Bande von 200 bp bilden. Durch die Deletion des Knockout-Bereichs wird auch die Bindungsstelle für das Oligonukleotid 5 entfernt, so dass im deletierten Allel kein Fragment amplifiziert werden kann. Wie aus Abb. 2.32 C ersichtlich zeigen die Cre-behandelten Zellen im Gegensatz zu den unbehandelten Zellen nur die Wildtyp-Bande, was die erfolgte Cre-vermittelte Deletion anzeigt. Wie bei *mlgd1* wurde auch bei *mlgd2* mit den Oligonukleotiden „*mlgd2TYPE1SAfor*“(1) und „*mlgd2KOloxrev*“(3) eine PCR durchgeführt, die aufgrund der Entfernung der Bindungsstellen und den PCR-Bedingungen nur im deletierten Allel eine Bande von 245 liefert (siehe Abb. 2.32 D). Da der Klon *mlgd2-200-A3* in der Southern Blot-Analyse und in diesem Funktionalitätstest die erwarteten Ergebnisse lieferte, wurde er für die Blastozysteninjektion verwendet.

2.2.9 Injektion von ES-Zellen in Blastozysten und Verpaarung der chimären Mäuse

Die bestätigten, homolog rekombinanten ES-Zellen wurden in Blastozysten von CB20-Mäusen injiziert und in scheinchwangere Ammen implantiert. Die resultierenden chimären Mäuse wurden anschließend mit C57BL/6 Mäusen verpaart. Obwohl in beiden Projekten Mäuse mit einem Chimärismus von 100% entstanden, wurde nur im *mlgd2*-Projekt Keimbahntransmission erzielt (Klon *mlgd2-200-A3*) und damit Mäuse mit dem Genotyp *mlgd2^{neoflox/+}* generiert. Im *mlgd1*-Projekt konnte eine Keimbahntransmission leider nicht nachgewiesen werden, da es Probleme in der Genotypisierung via PCR gab. Während in ES-Zellen mit den verwendeten Oligonukleotiden die erwarteten Fragmente amplifiziert werden konnten (siehe Abbildung 2.32), gelang dies bei den Nachkommen aus zehn Würfen von jeder der drei 100%igen *mlgd1*-Chimären nicht. Im Gegensatz zu den *mlgd2*-Chimären konnte auch in den *mlgd1*-Chimären selbst das homolog rekombinante Allel nicht nachgewiesen werden. Obwohl verschiedene, neue Oligonukleotide ausprobiert wurden, gelang es leider nicht, eine stabil, funktionierende PCR-Strategie für die *mlgd1*-Mäuse zu etablieren. Auch eine Analyse via Southern Blot führte nicht zu einem eindeutigen Ergebnis.

2.2.10 Generierung von *mlgd2^{flox/flox}*-Mäusen

Da gezeigt wurde, dass eine intronische Integration einer Neomycin-Resistenzkassette (mit eigenem PGK-Promotor) zu unerwünschten Nebeneffekten auf das Gen selbst bzw. auf benachbarte Gene haben kann [Pham et al., 1996; Meier et al., 2010], war diese Kassette bereits im pGK12-Vektor von FRT-Stellen flankiert worden, so dass sie mittels FLP-vermittelter Rekombination entfernt werden konnte. Dazu wurden die *mlgd2^{neoflox/+}*-Mäuse mit FLPe-Deleter-Mäusen verpaart, in denen die FLPe-Rekombinase in somatischen Zellen und in den Gameten exprimiert wird (Rodriguez et al., 2000).

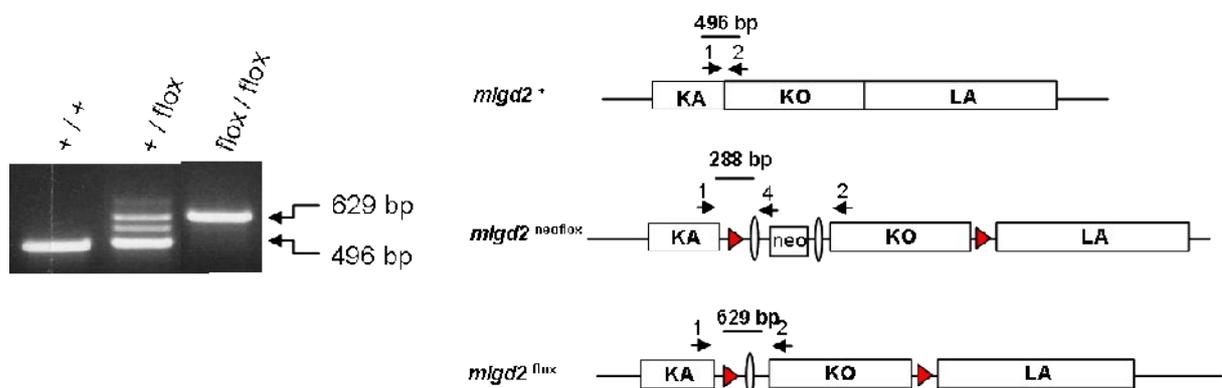


Abbildung 2.33: Genotypisierungs-PCR nach Verpaarung von *mlgd2^{flox/+}*-Tieren

Zur Genotypisierung wurden die Oligonukleotide „*mlgd2*TYPE1SAfor“(1), „*mlgd2*KOseq1REV“(2) und „SAloxfrtREV“(4) verwendet (siehe Tab. 4.6). Aufgrund vorhandener Bindungsstellen und den gewählten PCR-Bedingungen wurde mit dieser PCR im Wildtyp-Allel eine Bande von 496 bp und im FLP-deletierten Allel eine Bande von 629 bp amplifiziert.

Die daraus entstandenen *mlgd2^{flox/+}*-Mäuse wurden mittels PCR mit DNA aus Mausschwanzbiopsien identifiziert. Wie die Abbildung XX zeigt, konnte Verwendung der Oligonukleotide „*mlgd2*TYPE1SAfor“(1), „*mlgd2*KOseq1REV“(2) und „SAloxfrtREV“(4) im wt-Allel eine Bande von 496 bp, im rekombinanten Allel eine Bande von 288 bp (nicht dargestellt) und im FLP-deletierten Allel eine Bande von 629 bp amplifiziert werden. Das Auftreten der zusätzlichen Bande in den *mlgd2^{flox/+}*-Mäusen bei 560 bp (siehe Abb. 2.33) stellt ein PCR-Artefakt dar, da diese Bande in den homozygoten *mlgd2^{flox/flox}*-Mäusen nicht mehr auftritt. Die Verpaarung heterozygoter Tiere führte zu homozygoten *mlgd2^{flox/flox}*-Mäusen (siehe Abb. 2.33), die lebensfähig, fruchtbar und phänotypisch nicht von ihren wildtypischen Geschwistern zu unterscheiden waren.

2.2.11 Generierung von *mlgd2*^{-/-}-Mäusen

Um die Auswirkungen des Genverlustes von *mlgd2* im gesamten Organismus zu untersuchen, wurden *mlgd2*^{fllox/+}-Mäuse mit Cre-Deleter-Mäusen verpaart. Diese Mäuse exprimieren die Cre-Rekombinase in allen Geweben, darunter auch in den Stammzellen [Schwenk et al., 1995]. Eine PCR mit den Oligonukleotiden „*mlgd2*TYPE1SAfor“(1), „*mlgd2*KOloxrev“(3) und „*mlgd2*LAloxforNEU“(5) erzielte im Wildtyp eine Bande von 125 bp, beim rekombinanten Allel ohne Deletion eine Bande von 200 bp und nach erfolgter Deletion eine Bande von 245 bp (siehe Abbildung 2.34).

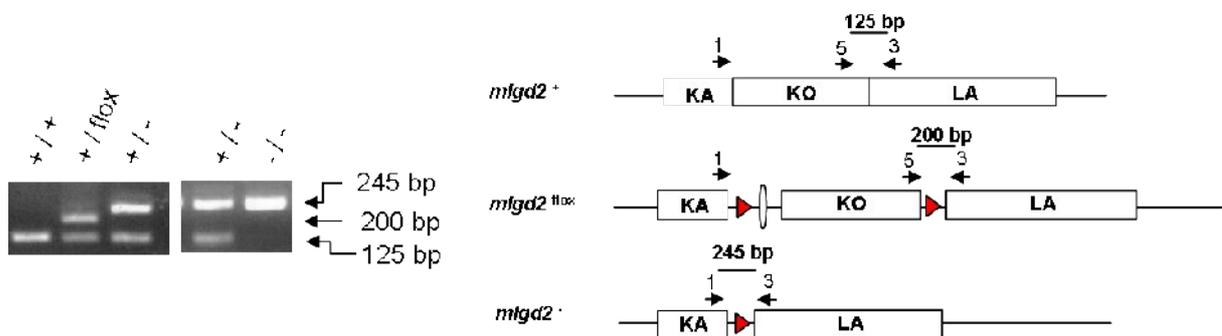


Abbildung 2.34: Genotypisierungs-PCR nach Verpaarung von *mlgd2*^{+/-}-Tieren

Mit den Oligonukleotiden „*mlgd2*TYPE1SAfor“(1), „*mlgd2*KOloxrev“(3) und „*mlgd2*LAloxforNEU“(5) (siehe Tab. 4.6) konnte im Wildtyp-Allel eine Bande von 125 bp, im geflochten rekombinanten Allel eine Bande von 200 bp und im Cre-deletierten rekombinanten Allel eine Bande von 245 bp amplifiziert werden.

Heterozygote *mlgd2*^{+/-}-Mäuse waren lebensfähig, fruchtbar und phänotypisch nicht von ihren Geschwistern zu unterscheiden. Zur Züchtung von homozygoten *mlgd2*^{-/-}-Mäusen wurden heterozygote *mlgd2*^{+/-}-Mäuse untereinander verpaart. Da die Nachkommen dieser Verpaarung im Alter von drei Wochen nur aus heterozygoten (*mlgd2*^{+/-}) und wildtypischen (*mlgd2*^{+/+}) Mäusen bestanden, scheinen die *mlgd2*^{-/-}-Mäuse vor diesem Zeitpunkt zu sterben. Um den Todeszeitpunkt genauer zu bestimmen, wurden die Kreuzungspaare täglich kontrolliert. Hierbei stellte sich heraus, dass alle Knockout-Tiere bereits am Morgen nach ihrer Geburt nur noch tot aufgefunden werden konnten, während der Tod innerhalb des ersten Tages nur bei 15,6% der Wildtypen und bei 8,2% der Heterozygoten der Fall war (siehe Abb.2.35).

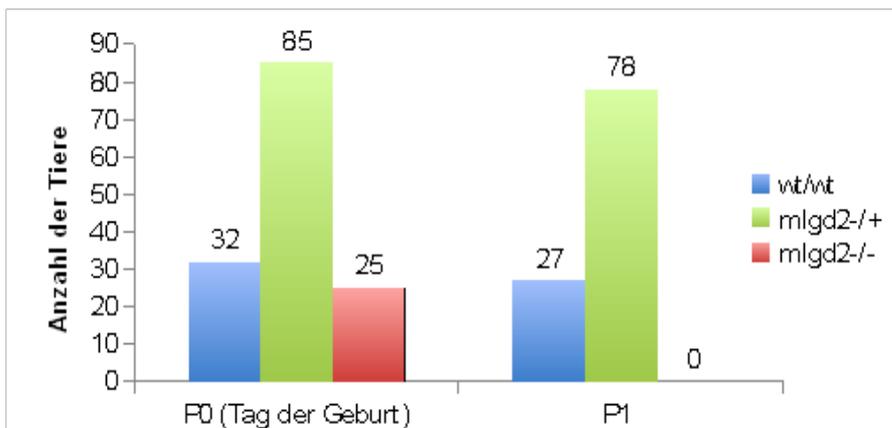


Abbildung 2.35: Graphische Darstellung der Genotypen-Verteilung an Tag P0 und P1

Verteilung der unterschiedlichen Genotypen an Tag P0 und an Tag P1 (n=142). An der y-Achse kann die Anzahl der Tiere der verschiedenen Genotypen, die unterschiedlichen Farben zugeordnet sind, abgelesen werden. Von den 32 geborenen wt-Mäusen starben 5 im Verlauf des ersten Tages (15,6%) und von den 85 geborenen heterozygoten Knockout-Mäusen 7 (8,2%). Von den 25 geborenen homozygoten Knockout-Mäusen überlebte keines den ersten Lebenstag.
n = 142

Die toten *mlgd2*^{-/-}-Neugeborenen unterschieden sich weder in Größe noch Gewicht von ihren Wurfgeschwistern. Die Körperfarbe wurde mit ebenfalls tot aufgefundenen wildtypischen oder heterozygoten Geschwistern verglichen, wobei aber auch keine Unterschiede festgestellt werden konnten. Ebenso zeigte eine Präparation der einzelnen Organe keine augenfälligen Unterschiede.

Da nur tote *mlgd2*^{-/-}-Neugeborenen gefunden wurden, könnten die Knockout-Tiere bereits im Mutterleib sterben und tot geboren werden. Eine dazu durchgeführte Analyse von 37 Embryonen im Alter von E16.5 – E19.5 (E = Tag der Embryonalentwicklung nach Theiler) zeigte jedoch, dass die *mlgd2*^{-/-}-Tiere zu diesem Zeitpunkt noch leben. Da die Tiere bereits um den Tag E21 geboren werden, scheint der Tod der *mlgd2*^{-/-}-Tiere während oder innerhalb von 12 Stunden nach der Geburt aufzutreten.

Um auszuschließen, dass der Tod nicht doch zu einem früheren Zeitpunkt der Embryonalentwicklung erfolgt und daher einige Knockout-Mäuse schon vor der Geburt sterben, wurde das Mendelsche Verhältnis der Nachkommen bestimmt (siehe Abb. 2.36). Dazu wurden die Daten von 198 Mäusen verwendet, wobei es sich um Jungtiere (3 Wochen), verstorbene Neugeborene, direkt nach der Geburt getötete

Neugeborene und vor der Geburt getötete Embryonen (ab E16.5) handelt. Die Analyse ergab, dass die drei verschiedenen Genotypen im erwarteten 1:2:1-Verhältnis auftraten (22% wildtyp, 59% heterozygot, 19% homozygot), weshalb ein früherer Tod wahrscheinlich ausgeschlossen werden kann.

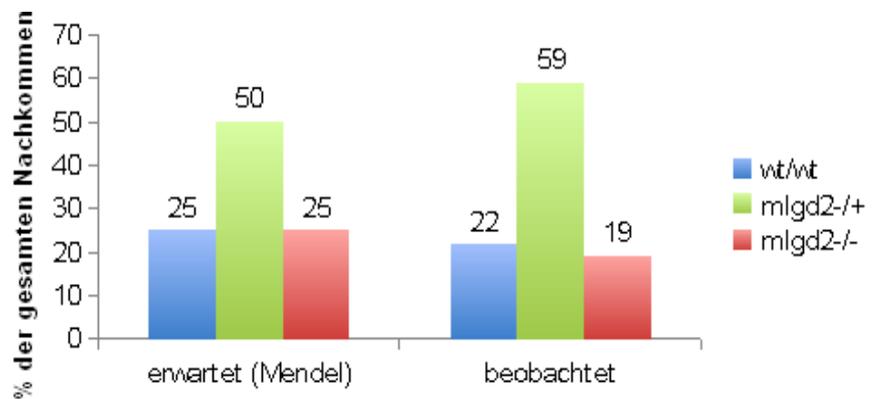


Abbildung 2.36: Grafische Darstellung der Genotypen-Verteilung

Die Grafik zeigt links die nach Mendel erwartete Verteilung der Genotypen und rechts die vorgefundene Verteilung bei insgesamt 198 Mäusen. Auf der y-Achse ist der Anteil des gesamten Nachkommen in % angegeben. Die drei Genotypen werden durch unterschiedliche Farben symbolisiert (siehe Legende).

2.2.12 Bestätigung des *mlgd2*-Knockouts durch Western-Blot-Analyse

Für den Test der mLgd2-Expression wurden Leberlysate von 17,5 Tage alten wildtypischen, heterozygoten und homozygoten Knockout-Embryonen hergestellt. Eine Western-Blot-Analyse mit dem spezifischen CC2D1A-Antikörper zeigte, dass das mLgd2-Protein in diesem Gewebe mindestens zwei Banden von ca. 100 und 120 kDa aufweist (siehe Abb. 2.37). Während in den Heterozygoten die Proteinmenge auf die Hälfte reduziert war, konnte das Protein in den Knockout-Tieren gar nicht nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis muss allerdings noch mit einem anderen Antikörper überprüft werden, da der hier verwendete Antikörper sehr viele, starke unspezifische Banden detektiert. Daher konnte auch nicht festgestellt werden, ob das verkürzte 29,3 kDa mLgd2-Protein noch gebildet wird.

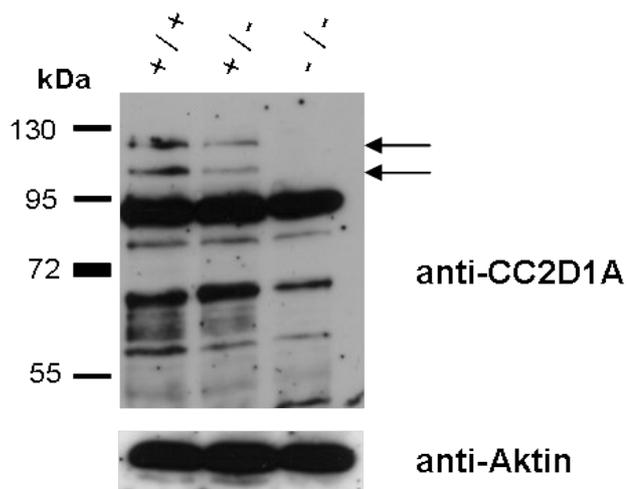


Abbildung 2.37: Western-Blot der *mlgd2*-Knockout-Tiere

Für diesen Western-Blot wurden je 200 μ g Leberprotein von Mäusen der drei Genotypen $mlgd2^{+/+}$, $mlgd2^{+/-}$ und $mlgd2^{-/-}$ per SDS-PAGE aufgetrennt, geblottet und mit dem anti-CC2D1A Antikörper (1:3000) inkubiert. Genauso wurde ein zweiter Blot angefertigt, der aber mit dem anti-Aktin-Antikörper (1:5000) als Ladekontrolle inkubiert wurde. Das mLgd2-Protein läuft dabei in zwei Banden auf der Höhe von 100 und 120 kDa. Man erkennt deutlich die Reduktion der Proteinmenge in der Spur des heterozygoten Tieres und völliges Fehlen des Proteins in der Knockout-Maus.

3. Diskussion

Die Funktionsweise des Lgd-Proteins, das bereits 1971 in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* entdeckt wurde [Bryant and Schubiger, 1971] ist immer noch nicht bekannt. Ein homozygoter Ausfall dieses Proteins führt zum Tod der Larve kurz nach ihrem Eintritt ins Puppenstadium, wobei die larvale Phase verlängert ist und alle Imaginalscheiben stark vergrößert sind. Weitere Untersuchungen ergaben, dass *lgd* in *Drosophila* einen negativen Regulator des Notch-Signalwegs darstellt [Klein, 2003]. Bei Ausfall oder starker Überexpression von *lgd* akkumuliert der vollständige Notch-Rezeptor zusammen mit anderen ubiquitinierten Proteinen in einem späten, endosomalen Kompartiment, wird dort liganden-unabhängig aktiviert, wodurch eine gesteigerte Notch-Aktivität hervorgerufen wird [Jaekel and Klein, 2006]. Obwohl Lgd in *Drosophila* eine Aufgabe beim Transport des Notch-Rezeptors zum Lysosom hat, sind weder mögliche Interaktionspartner noch ist die genaue Funktionsweise des Proteins bekannt. Diese könnte aber über die Identifizierung von Interaktionspartnern aufgeklärt werden.

Die Funktion von Lgd in höheren Metazoen wurde bisher nur in Zellkulturversuchen untersucht, wobei Lgd sehr unterschiedliche Funktionen vom Transkriptionsrepressor des Serotonin-1A-Rezeptors bis zum Gerüstprotein für den EGF-abhängigen PDK1/Akt-Signalweg zugesprochen wurden [Ou et al., 2003; Nakamura et al., 2008]. Die einzigen *in vivo*-Daten stammen aus der Entdeckung einer Mutation im menschlichen Ortholog *CC2D1A*, die in einer schweren, erblichen Form von geistiger Behinderung resultiert [Basel-Vanagaite et al., 2006].

In dieser Arbeit sollten daher in *Drosophila* Interaktionspartner von Lgd gefunden und außerdem die Bedeutung der DM14-Domäne und der C2-Domäne für diese Interaktion analysiert werden. Weiterhin sollten für die *lgd*-Orthologen *mlgd1* und *mlgd2* konditionell inaktivierbare Mauslinien hergestellt und mit einer ersten Analyse begonnen werden.

Projekt 1:**3.1 Lgd interagiert mit der ESCRT-III-Komponente Shrub und vermutlich mit weiteren ESCRT-Proteinen****3.1.1 Biochemischer Nachweis der Lgd-Shrub-Interaktion**

Einen Hinweis auf eine Interaktion von *lgd* und *shrub* lieferte ein genetischer Screen nach Modifikatoren des Überexpressions-Phänotyps von *lgd* im Flügel, der bereits im Vorfeld dieser Arbeit durchgeführt worden war (Diplomarbeit Alexandra Böcke). Außerdem war in einem Yeast-Two-Hybrid Screen eine Interaktion zwischen einem der beiden humanen Lgd-Orthologen CC2D1A (mLgd2 in der Maus) und den Shrub-Homologen CHMP4A, B und C gefunden worden.

Der Nachweis der biochemischen Interaktion zwischen Lgd und Shrub in *Drosophila* wurde in dieser Arbeit über Koimmunopräzipitationen mit Lysaten aus *Drosophila*-Larven erbracht. Hierbei konnte sowohl eine Interaktion zwischen überexprimierten Lgd-HA und Shrub-GFP als auch eine Interaktion zwischen überexprimierten Lgd-HA und endogenem Shrub-Protein gezeigt werden. Die Bestätigung einer Interaktion beider endogener Proteine ist aufgrund der Verfügbarkeit entsprechender Antikörper bisher nicht möglich gewesen. Bei der Präzipitation des HA-markierten Lgd wurde im Lysat mit einem Antikörper gegen das endogene Shrub-Protein [Sweeney et al., 2006] neben der Bande bei 35 kDa noch eine weitere Bande bei ca. 140 kDa detektiert, deren Identität bisher nicht geklärt werden konnte.

Shrub mit einem berechneten Molekulargewicht von 25 kDa zeigte mit einer Bande von 35 kDa das bereits beschriebene verlangsamte Laufverhalten im SDS-Gel [Sweeney et al., 2006]. Auch Lgd zeigte ein unerwartetes Laufverhalten im Western-Blot, da Banden von 140, 120 und 80 kDa detektiert wurden, obwohl das berechnete Molekulargewicht bei 90 kDa liegt. Alternatives Spleißen oder C-terminale Verkürzungen kommen hierbei als Erklärung nicht in Frage, da die *lgd*-cDNA exprimiert wurde und alle drei Varianten über die C-terminale HA-Markierung nachgewiesen werden konnten. N-terminale Verkürzungen sind als Ursache auch auszuschließen, da alle drei Lgd-Banden auch mit einem Antikörper, der den N-Terminus (AS 2-12) erkennt, detektiert werden konnten [Gallagher and Knoblich, 2006]. Daher scheinen vermutlich posttranslationale Modifikationen das

unterschiedliche Laufverhalten hervorzurufen, wobei dies in Form einer Phosphorylierung für CC2D1A/Aki bereits in HeLa-Zellen gezeigt werden konnte [Nakamura et al., 2010]. Diese bisher für das *Drosophila* Lgd-Protein noch nicht identifizierten Modifikationen scheinen die Interaktion mit Shrub allerdings nicht zu beeinträchtigen, da alle drei Varianten an Shrub-GFP binden.

3.1.1.1 Für die Bindung an Shrub sind die DM14-Domänen essentiell

Koimmunopräzipitations-Experimente mit Shrub-GFP und Deletionskonstrukten von Lgd konnten zeigen, dass die DM14-Domänen des Lgd-Proteins für die Interaktion der beiden Proteine essentiell sind. Im Gegensatz dazu ist die C2-Domäne entbehrlich. Somit konnte in dieser Arbeit den DM14-Domänen in *Drosophila* erstmals eine Funktion zugewiesen werden. Dabei ist besonders interessant, dass Lgd in *Drosophila* das einzige Protein mit diesem Domänentyp ist.

Die Deletion der ersten beiden, der insgesamt vier DM14-Domänen [Lgd Δ DM14(1-2)] reichte bereits aus, um die Interaktion mit Shrub stark abzuschwächen, während die Deletion aller DM14-Domänen [Lgd Δ DM14(1-4)] diese Interaktion ganz verhinderte. Diese Ergebnisse stimmen mit der Beobachtung überein, dass ein in die Fliege eingebrachtes *lgd*-Konstrukt, das keine DM14-Domänen besitzt, den *lgd^{d7}*-mutanten Phänotyp in der Flügelimaginalscheibe nicht retten kann. Allerdings rettete ein Konstrukt, in dem nur die letzten beiden Domänen fehlen [Lgd Δ DM14(3-4)] (persönliche Kommunikation Tobias Troost). Diese biochemischen und genetischen Untersuchungen deuten darauf hin, dass für die Funktion des Proteins mindestens zwei DM14-Domänen erforderlich sind. Hierbei wäre es möglich, dass die DM14-Domänen redundant sind und es keinen Unterschied macht, welche genaue Domäne ausfällt, solange zwei Domänen erhalten bleiben. Um dies zu testen, könnte in weiteren Experimenten die Interaktion von Shrub mit Lgd Δ DM14(3-4) untersucht werden, da eine wenn auch sehr schwache Interaktion mit einem Lgd-Protein mit nur zwei DM14-Domänen nur für Lgd Δ DM14(1-2) gezeigt werden konnte. Außerdem sollte man testen, ob die Expression von Lgd Δ DM14(1-2) - wie die von Lgd Δ DM14(3-4) - zur Rettung des *lgd*-Phänotyps führt. Eine Bestätigung von Interaktion und Rettung würde eine funktionelle Redundanz der Domänen zeigen.

3.1.1.2 Herstellung von Shrub-Deletionskonstrukten zur Analyse der für die Interaktion benötigten Domänen im Shrub-Protein

Zur Identifizierung der Domänen im Shrub-Protein, die für die Interaktion mit Lgd verantwortlich sind, wurden drei UAS-Konstrukte mit N-terminalen Myc-Markierungen hergestellt und ins Fliegen-genom integriert. Hierbei handelte es sich um das vollständige Shrub-Protein, als auch um Konstrukte bei denen entweder die N-terminale Core-Region (Myc-Shrub Δ core) oder die C-terminale autoinhibitorische Region (Myc-Shrub Δ auto) deletiert waren.

Für die biochemischen Interaktionsstudien wurden die Konstrukte mit verschiedenen GAL4-Treibern (*hsGAL4*, *ptcGAL4*, *sdGAL4*) exprimiert, konnten bisher jedoch im Western-Blot nicht nachgewiesen werden, obwohl ihre Expression in immunhistochemischen Färbungen von Flügelimaginalscheiben deutlich zu sehen war. Dies liegt vermutlich an der geringen Größe dieser Proteine, die zwischen 10 und 27 kDa liegt und spezielle Elektrophorese- und Blotbedingungen erfordert. Allerdings konnten unter den bisherigen Bedingungen Proteine bis 25 kDa detektiert werden, weshalb bisher unerklärlich ist, warum nicht wenigstens das vollständige Shrub-Proteine mit einer Größe von 27 kDa detektiert werden konnte. Daher sollte die Etablierung geeigneter Blotbedingungen für diese kleinen Proteine ein vorrangiges Ziel in den nächsten Experimenten sein.

3.1.1.3 Probleme beim Nachweis einer direkten Interaktion von Lgd und Shrub

Bei dem biochemischen Nachweis der Interaktion von Lgd und Shrub konnte bisher noch nicht festgestellt werden, ob diese Interaktion indirekt über ein weiteres Protein verläuft oder ob es wirklich zu einem direkten Kontakt der beiden Proteine kommt. Dies liegt daran, dass der Nachweis einer direkten Interaktion durch die hohe Konservierung der ESCRT-Proteine in Hefe und Metazoen erschwert wird, wodurch viele oft verwendete Expressionssysteme (z.B. Hefe) nicht genutzt werden können. In folgenden Experimente könnte man allerdings versuchen, beide Proteine in Bakterien einzeln exprimieren, dann über verschiedene Markierungen (GST, GFP, HA, His) aufzureinigen, die aufgereinigten Proteine zu mischen und dann die Interaktion über einen GST-Pulldown oder eine Koimmunopräzipitation zu

untersuchen. Eine weitere Möglichkeit eine direkte Interaktion nachzuweisen, wäre die FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer)-Methode, da sich die Proteine mit ihren fusionierten Fluorophoren sehr nahe kommen müssen, um ein Signal zu liefern.

3.1.2 Bestätigung der Lgd-Shrub-Interaktion auf genetischer Ebene

Für einen genetischen Nachweis der gefundenen Lgd-Shrub-Interaktion wurde der Ausfall einer funktionalen *shrub*-Kopie im *Igd^{SH495}*-homozygoten oder *Igd^{d7}/Igd^{SH495}*-transheterozygoten Hintergrund untersucht. Homozygote Fliegen für das hypomorphe *Igd^{SH495}*-Allel sterben erst kurz vor dem Schlüpfen und zeigen leichte Effekte einer erhöhten Notch-Aktivität [Jaekel and Klein, 2006]. Auch transheterozygote *Igd^{d7}/Igd^{SH495}*-Fliegen sterben erst am Ende des Puppenstadiums, wobei es aber nie zum Schlupf der Fliegen kommt. Im Vergleich zu *Igd^{SH495}*-homozygoten Fliegen zeigen sie jedoch viel stärkere Effekte einer erhöhten Notch-Aktivität (siehe Einleitung 1.4; [Jaekel and Klein, 2006]).

Die Beobachtung, dass der Ausfall einer funktionierenden *shrub*-Kopie in beiden genetischen Hintergründen zu einem früheren Tod führt - nämlich am Ende des zweiten bzw. Anfang des dritten Larvenstadiums - zeigt deutlich, dass eine funktionale Beziehung zwischen den beiden Genen *in vivo* vorliegt. Leider konnten die Flügelimaginalscheiben dieser Tiere nicht auf Veränderungen der Notch-Aktivität untersucht werden, da die Imaginalscheiben in diesem larvalen Stadium noch aus zu wenig Zellen bestehen.

Eine Möglichkeit Zellen dieser genetischen Konstellation auf ihre Notch-Aktivität zu untersuchen, wäre eine klonale Analyse. Dabei würde man das Überleben der Fliegen durch die Einführung eines endogenen Lgd-Rettungskonstrukt (z.B. Lgd-RFP) sichern und dieses am Übergang zwischen ersten und zweiten Larvenstadium über das FLP/FRT-System wieder entfernen. Im dritten Larvenstadium sollten dann Flügelimaginalscheiben mit Klonen vorhanden sein, die den gewünschten Genotyp (*Igd^{d7}/Igd^{SH495}, shrub⁴⁻¹* oder *Igd^{SH495}/Igd^{SH495}, shrub⁴⁻¹*) tragen. Dieses Experiment sollte möglich sein, da bereits gezeigt werden konnte, dass *Igd^{d7}*-Fliegen, die eigentlich bereits kurz nach der Verpuppung sterben, durch eine annähernd endogene Expression eines Lgd-RFP Proteins bis zum adulten Stadium gerettet

werden können (persönliche Kommunikation Tobias Troost). Eine starke Erhöhung der Notch-Aktivität ist in diesen Klonen zu erwarten, da bereits gezeigt wurde, dass der Ausfall von *shrub* zu einer erhöhten Notch-Aktivität führt [Sweeney et al., 2006].

3.1.3 Mögliche Bedeutung der Lgd-Shrub-Interaktion für Vertebraten

Die hier gezeigte biochemische Interaktion zwischen Lgd und Shrub in *Drosophila* war bereits durch Yeast-Two-Hybrid-Experimente im Menschen angedeutet worden, in denen eine Interaktion zwischen dem humanen Lgd-Ortholog CC2D1A und den Shrub-Orthologen CHMP4A, B und C gezeigt wurde [Tsang et al., 2006]. Daher scheint diese Interaktion auch in höheren Organismen konserviert zu sein und sollte in den nächsten Experimenten durch Koimmunopräzipitationen oder GST-Pulldowns in der Maus bestätigt werden. Da es in *Drosophila* nur ein Lgd- und ein Shrub-Protein gibt, während in der Maus zwei Lgd-Orthologe (mLgd1 und mLgd2) sowie drei Shrub-Orthologe (mSnf7-1, -2, -3) vorliegen, ist die Untersuchung der untereinander vorliegenden Interaktionen besonders interessant.

In dieser Arbeit konnte aber außerdem eine funktionale Beziehung zwischen Lgd und Shrub gezeigt werden, die vermutlich auch auf die Vertebraten übertragen werden kann. Dies liegt nahe, da nicht nur die Struktur sondern auch die Funktion von Lgd und Shrub konserviert zu sein scheint, da die murinen *shrub*- bzw. *lgd*-Orthologe den mutanten Phänotyp von *shrub* bzw. *lgd* in *Drosophila* retten konnten [Sweeney et al., 2006; Jaekel and Klein, 2006]. Sollten eine solche Lgd-Shrub-Interaktion auch in der Maus vorliegen, könnte der Verlust der Lgd-Funktion auch die Funktionen von mSnf7-1, 2 oder 3 beeinträchtigen und damit unter anderem an Prozessen wie der Dendriten-Morphogenese oder der Autophagie beteiligt sein (siehe Einleitung Kapitel 1.2.2).

Die bei *mSnf7-2*- und auch *shrub*-Verlust beobachteten Veränderungen in der Dendriten-Morphologie könnten auch über die Aktivierung des Notch-Signalwegs hervorgerufen werden, die für *shrub* in *Drosophila* bereits gezeigt werden konnte [Vaccari et al., 2009; Sweeney et al., 2006]. Denn eine konstitutive Aktivierung von Notch1 in kortikalen Neuronen der Ratte führte zu verkürzten Dendriten mit einer höheren Anzahl an Verzweigungen (pro Einheit Dendritenlänge) [Redmond et al., 2000]. Auch bei Ausfall von *mSnf-2* wurde eine Retraktion der Dendriten beobachtet,

die von einer Ansammlung von Autophagosomen und dem Zelltod begleitet wurde. Hier wurden allerdings noch keine Untersuchungen zur Notch-Aktivität durchgeführt. Veränderungen der Dendriten könnten also bei Verlust von Lgd über eine dadurch bedingte gesteigerte Notch-Aktivität hervorgerufen werden. Sollte Lgd in der Maus nicht an der Regulation des Notch-Signalwegs beteiligt sein, könnten dendritische Veränderungen aber auch über eine durch Lgd Ausfall verursachte beeinträchtigte Shrub-Funktion verursacht werden, wobei diese aber vermutlich auch in einer Steigerung der Notch-Aktivität resultiert. Ist dies nicht der Fall, könnte die Akkumulation von Autophagosomen der Auslöser für die Retraktion der Dendriten sein und Lgd somit indirekt auch in der Autophagie eine Rolle spielen. Eine Funktion von Lgd im Hinblick auf die Dendritenmorphologie oder andere Bereiche des Neurons liegen nahe, da eine veränderte Struktur der Dendriten im Zusammenhang mit geistiger Behinderung steht und eine Mutation in dem humanen *Igd*-Ortholog *CC2D1A* im Menschen bereits mit einer schweren, erblichen geistigen Behinderung assoziiert werden konnte.

Des weiteren könnte Lgd über seine Interaktion mit Shrub und dessen Beteiligung am Prozess der Autophagie an im Alter auftretenden neurodegenerativen Erkrankungen beteiligt sein.

3.1.4 Auch andere ESCRT-Proteine könnten Interaktionspartner von Lgd sein

Die Verifizierung des im Vorfeld dieser Arbeit durchgeführten genetischen Screens im Flügel von *Drosophila* zeigte, dass die F1-Nachkommen der Kreuzung des *Igd*-Überexpressionsstamms gegen die *shrub*-enthaltenden Defizienzen #3591 und #4966

neben den beschriebenen Defekten im Flügel außerdem einen Verlust der scutellaren Borsten aufwiesen. Dies war unerwartet, da der C5-GAL4-Treiber überwiegend in der Flügeltasche aktiv ist und nur eine sehr schwache Expression im Scutellum zeigt [Quan et al., 2004]. Dies wurde im *Igd*-Überexpressionsstamm sowie nach Kreuzung gegen das *shrub*⁴⁻¹-Allel nicht beobachtet. Daher scheinen andere Gene in dem sich überlappenden Bereich der beiden Defizienzen sowohl für die starke Verkleinerung des Flügels als auch für den scutellaren Borstenverlust, der auf eine Überaktivierung des Notch-Signalwegs hindeutet, verantwortlich zu sein.

Tatsächlich liegen in diesem Bereich die Gene *Rme-8* (*receptor-mediated endocytosis-8*; CG8041) und *lightoid*, die beide Funktionen im endosomalen System haben [Chang et al., 2004; Girard et al., 2005; Fujikawa et al., 2002]. Daher scheinen beide Gene wie *lgd* eine Rolle im endosomalen Transport zu besitzen, tragen vermutlich zu dem beobachteten Phänotyp (stärkere Verkleinerung des Flügels, scutellarer Borstenverlust) bei und stellen daher weitere mögliche Interaktionspartner dar.

Des Weiteren wurden drei neue Defizienzen (#3686, #5601, #9500) gefunden, die den *lgd*-Überexpressionsphänotyp im Flügel verstärken. Dadurch wurde unter anderem das Gen *vps2*-(CG4618) als weiterer möglicher Interaktionspartner identifiziert, welches wie Shrub zu den ESCRT-III-Proteinen gehört. Neben diesem bereits bekannten *vps2*-Gen wurden ähnliche Phänotypen bei Kreuzung gegen Defizienzen, in denen das Gen CG14542 deletiert war, beobachtet. Vergleiche mit Sequenzen aus anderen Organismen zeigten, dass es sich hierbei um ein weiteres *vps2*-Gen handelt. Aufgrund der Sequenzhomologie wurde das bereits bekannte *vps2*-Gen (CG4618) in *vps2B* und das neue gefundene *vps2*-Gen (CG14542) in *vps2A* umbenannt. dass es sich bei CG14542 um ein weiteres *vps2*-Gen handelt, wurde kürzlich durch Arbeiten einer anderen Arbeitsgruppe bestätigt [Vaccari et al., 2009]. Durch die Kreuzung eines von dieser Gruppe erhaltenen Nullallels (*vps2^{PP6}*) konnte gezeigt werden, dass der durch die Defizienzen hervorgerufene Phänotyp aus dem Verlust dieses Gens resultiert. Des Weiteren zeigte auch ein Nullallel von *vps20* (*vps20³*), ebenfalls eine ESCRT-III-Komponente, eine Verstärkung des *lgd*-Phänotyps.

Diese Ergebnisse legen eine weitere Untersuchung der Beziehung zwischen *Lgd* und den ESCRT-Proteinen - besonders denen des ESCRT-III-Komplexes - nahe.

3.2 Funktionsanalyse der Shrub-Deletionskonstrukte

Um die Funktion der N-Terminal-Myc-markierten Deletionskonstrukte von Shrub in *Drosophila* zu untersuchen, wurden sie zunächst mit *ptc*GAL4 exprimiert.

Die Überexpression von UAS-Myc-*shrub* Δ *core* führte dabei zu keinerlei Defekten. In der Flügelimaginalscheibe konnte auch keine veränderte Notch-Aktivität beobachtet werden. Dies war erwartet, da die Bindung der ESCRT-III-Proteine untereinander

über die N-terminale Region erfolgt, die bei diesem Protein nicht mehr vorhanden ist. Daher kann das Myc-Shrub Δ core-Protein nicht an andere ESCRT-III-Proteine binden und ist somit funktionslos.

Im Gegensatz dazu führte die Überexpression von UAS-Myc-*shrub* bei starken Linien zu einem Zelltod innerhalb des kompletten *ptc*-Streifens in der Flügelimaginalscheibe, wodurch es im entsprechenden Bereich des adulten Flügels (zwischen Flügelvene 3 und 4) zu einem Verlust von Flügelgewebe mit Deletion der anterioren Kreuzvene, Kerben am Flügelrand und im proximalen Teil zur Produktion zusätzlichen Venenmaterials kam. Die letztgenannten Phänotypen können durch eine verminderte Notch-Aktivität erklärt werden. Der induzierte Zelltod ist vermutlich eher auf die Expression des Myc-Shrub-Konstruktes zurückzuführen. Die Ursache für diesen Phänotyp liegt vermutlich darin, dass das Myc-Shrub-Konstrukt weiterhin an andere ESCRT-Proteine binden kann. Tritt dieses Protein allerdings in großen Mengen auf, wird vermutlich die Stöchiometrie der ESCRT-III-Komplexe verändert, so dass neben funktionalen auch nicht-funktionale Komplexe entstehen. Hierdurch könnten der endosomale Transport als auch andere Prozesse an denen die ESCRT-Proteine beteiligt sind (z.B. Autophagie) beeinträchtigt sein, was schließlich zum Zelltod führen könnte. Diese Theorie erklärt auch die Beobachtung, dass eine schwache Expression dieses Konstrukts zu keinerlei Defekten führte.

Im Falle von UAS-Myc-*shrub* Δ *auto* führte die Expression mit *ptc*GAL4 dazu, dass die Larven das dritte Larvenstadium, in dem die Untersuchung der Flügelimaginalscheiben erfolgen sollte, nicht erreichten. Dies liegt vermutlich daran, dass *ptc* auch während der Embryonalentwicklung exprimiert wird und eine Überexpression des Myc-*shrub* Δ *auto*-Konstrukt in diesen Phasen scheinbar zum Tode führt. Deswegen wurde dieses Konstrukt mit *sd*GAL4 exprimiert, also wie das *sd* (*scalloped*)-Gen, welches in der gesamten Flügeltasche exprimiert wird und für die Entwicklung des Flügels aber nicht des Embryos verantwortlich ist. Die Expression mit diesem Treiber führte zu Larven, die das dritte Larvenstadium erreichten, jedoch nicht zu adulten Fliegen. Die Flügelimaginalscheiben dieser Tiere zeigten eine starke Überproliferation der Flügeltasche mit Verlust der epithelialen Organisation und Zelltod. Da ein ähnlicher Phänotyp bei der Expression des dominant-negativen UAS-*shrub*-GFP [Sweeney et al., 2006] mit diesem Treiber

erzielt wurde und es bereits bekannt war, dass ESCRT-III-mutante Zellen häufig durch Apoptose sterben, liegt die Vermutung nahe, dass auch die Deletion der autoinhibitorischen Region einen dominant-negativen Effekt hervorruft.

Die Beobachtung, dass die Expression von Myc-shrub Δ auto, einen viel stärkeren Effekt als die von Myc-Shrub hervorruft, lässt sich dadurch erklären, dass dieses Protein ohne autoinhibitorische Domäne an ESCRT-Proteine bindet, aber vermutlich nicht ins Zytoplasma freigesetzt werden kann, da die Interaktion mit der ATPase Vps4 verhindert ist. Dadurch hält es die ESCRT-III-Proteine an der Membran gebunden, wodurch ihre normalen Funktionen verhindert werden. Daher zeigt dieses Konstrukt einen dominant-negativen Effekt wie es für das Shrub-GFP-Protein bereits gezeigt wurde [Sweeney et al., 2006]. Außerdem wird hierdurch die Theorie bestätigt, dass Veränderungen am C-terminalen Ende der ESCRT-III-Proteine durch Deletionen oder der Anbringung großer Markierungen (Tags), die normale Funktion der ESCRT-Proteine verhindern [Shim et al., 2007].

Um die Funktion dieser Konstrukte weiter zu untersuchen, sollte getestet werden, welches der Konstrukte den homozygoten Ausfall von *shrub*, der in embryonaler Letalität resultiert, retten kann und so herausfinden, welche Domänen für eine normale Funktion des Proteins benötigt werden. Aus den bisherigen Beobachtungen und der Literatur würde man hierbei erwarten, dass nur das Myc-Shrub-Konstrukt die normale Funktion ausüben kann.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Lgd in *Drosophila* mit dem ESCRT-III-Protein Shrub interagiert. Für diese Interaktion sind die DM14-Domänen verantwortlich, deren Fehlen auch zum Funktionsverlust des Lgd-Proteins führt. Des weiteren konnten die genetischen Untersuchungen zeigen, dass neben der biochemischen auch eine funktionale Beziehung zwischen Lgd und Shrub vorliegt, die falls sie auch in Vertebraten vorkommt, zur Aufklärung der Ursachen bestimmter Krankheiten beitragen könnte. In *Drosophila* legt diese Interaktion nahe, dass Lgd seine Funktion als Regulator des konstitutiven Transports des vollständigen Notch-Rezeptors zum Lysosom über seine Interaktion mit Shrub und vermutlich weiteren ESCRT-III-Proteinen ausübt.

Projekt 2:**3.3 Konditionale Inaktivierung von *mlgd1* und *mlgd2* in der Maus**

Die Strategie zur Herstellung der konditional inaktivierbaren Knockout-Allele für die Maus-Orthologen *mlgd1* und *mlgd2* wurden dem *Drosophila Igd^{d7}*-Nullallel nachempfunden, so dass im veränderten Allel nach Cre-vermittelter Deletion die Translation nach der ersten DM14-Domäne abbricht. Embryonale Stammzellen mit entsprechendem, homolog rekombiniertem *mlgd1*- oder *mlgd2*-Allel wurden in Blastozysten injiziert und erzeugten 100%ige chimäre Nachkommen. Aufgrund von Problemen bei der Genotypisierung von *mlgd1* konnte die Keimbahntransmission der veränderten Allele nur im *mlgd2*-Projekt nachgewiesen werden. Die so generierten *mlgd2^{neoflox/+}*-Mäuse wurden gegen FLPe-Rekombinase exprimierende Mäuse gekreuzt, um die Neomycin-Resistenz-Kassette zu entfernen. Die resultierenden heterozygoten *mlgd2^{flox/+}*-Mäuse wurden untereinander verpaart, wobei homozygote *mlgd2^{flox}*-Mäusen entstanden, die lebensfähig, fertil und phänotypisch unauffällig waren. Hetero- wie auch homozygote *mlgd2^{flox}*-Mäuse können nun gegen verschiedene Cre-Rekombinase exprimierende Mäuse gekreuzt werden und so die Bedeutung von *mlgd2* in verschiedenen Organen und zu verschiedenen Zeitpunkten untersucht werden.

Des Weiteren konnte in dieser Arbeit die Expression von *mlgd1* und *mlgd2* in allen getesteten Organen und in embryonalen Stammzellen gezeigt werden. Die Expression beider Gene in vielen verschiedenen Organen wurde auch in der Ratte und im Menschen nachgewiesen [Hadjighassem et al., 2009; Ou et al., 2003; Rogaeva and Albert, 2007; Basel-Vanagaite et al., 2006]. Da allerdings keine quantitativen Methoden verwendet wurden, sollte eine möglicherweise unterschiedlich starke Expression der beiden Gene in den verschiedenen Organen in folgenden Experimenten mittels Northern-Blot oder Realtime-PCR untersucht werden.

Außerdem war in dieser Arbeit ein Antikörper für mLgd1 hergestellt worden, der spezifisch für mLgd1 ist.

3.4 Vollständige Inaktivierung von *mlgd2* führt zu einem perinatalen Tod

Durch Kreuzung gegen eine Maus, die die Cre-Rekombinase bereits in den Keimzellen exprimiert, waren in dieser Arbeit heterozygote *mlgd2*^{-/+}-Mäuse gezüchtet worden. Diese waren lebensfähig, fertil und zeigten keinerlei Auffälligkeiten im Vergleich zu ihren wildtypischen Geschwistern. Kreuzung der Heterozygoten führte zu homozygoten *mlgd2*^{-/-}-Mäusen, in denen das *mlgd2*-Gen von Beginn der Entwicklung an ausgeschaltet war. Die neugeborenen *mlgd2*^{-/-}-Mäuse wurden am Morgen nach ihrer Geburt nur noch tot aufgefunden. Da Embryonen an Tag 19.5 ihrer Entwicklung noch lebten, sterben diese Mäuse scheinbar in einem Zeitraum zwischen Tag E19.5 und den ersten zwölf Stunden nach der Geburt. Die Vermutung, dass die Tiere die embryonale Entwicklung überleben und erst um den Zeitpunkt der Geburt sterben, wurde durch die Genotypisierung der lebenden und toten Neugeborenen unterstützt, da die verschiedenen Genotypen im erwarteten Mendelschen Verhältnis vorlagen.

Der Tod der *mlgd2*-Knockout-Mäuse zeigt auch, dass die beiden *Lgd*-Orthologe in Maus und Mensch scheinbar nicht redundant sind, da weder die geistige Behinderung im Menschen (Mutation in CC2D1A, [Basel-Vanagaite et al., 2006]) noch der neonatale Tod in der Maus durch das noch vorhandene Ortholog ausgeglichen werden können. Eine solche Redundanz wurde aufgrund der Expression beider Orthologe in allen getesteten Gewebe vermutet.

3.4.1 Mögliche Ursachen für den perinatalen Tod der *mlgd2*-Knockout-Mäuse

Eine erste Untersuchung der *mlgd2*^{-/-}-Mäuse zeigte keinen Unterschied in Größe, Gewicht oder Morphologie zu den heterozygoten und wildtypischen Geschwistern. Auch eine makroskopische Untersuchung der inneren Organe zeigte ebenfalls keinerlei Auffälligkeiten der oder gar das Fehlen von Organen. Um eine genauere histologische Untersuchung der verschiedenen Gewebe durchzuführen, wurden bereits Paraffin-Schnitte von Embryonen zwischen Tag E16.5 und E19.5 angefertigt, die innerhalb dieser Arbeit nicht mehr ausgewertet werden konnten.

Bisher gibt es also keinen Hinweis auf die Todesursache der *mlgd2*-Knockout-Mäuse. Da der Tod aber scheinbar erst bei oder kurz nach der Geburt eintritt, sind in diesen Mäusen vermutlich Vorgänge gestört, die vom Embryo/Neugeborenen erst nach der Geburt selbständig durchgeführt werden müssen und die für das Überleben des Neugeborenen außerhalb des Mutterleibs essentiell sind. Hierzu zählen z.B. die Atmung, das Saugen oder die Aufrechterhaltung der Homöostase. In den folgenden Abschnitten werden einige dieser Prozesse kurz beschrieben und erläutert, ob ihre Störung die Todesursache für die *mlgd2*-Knockout-Mäuse sein könnte.

Die über die Atmung vermittelte Sauerstoffversorgung des Körpers ist von zahlreichen Faktoren abhängig. Daher können Veränderungen der oberen Atemwegen, der Lunge, des Herzens, des Blutgefäßsystems, des Skeletts (Brustkorb), des Zwerchfells, der Zwischenrippenmuskulatur oder eine gestörte Aktivität des Atemzentrums im Gehirn die Sauerstoffversorgung stören und zum Tod führen. Da die tot aufgefundenen *mlgd2*^{-/-}-Mäuse jedoch keine Anzeichen einer Zyanose zeigten, sind Probleme bei der Atmung als Todesursache vermutlich auszuschließen.

Das Saugen der Muttermilch dient der Aufnahme von Nährstoffen als auch der Aufnahme von Flüssigkeit, wodurch eine Dehydrierung des Neugeborenen verhindert wird. Es konnte gezeigt werden, dass nicht-saugende Neugeborene (durch Trennung von der Mutter) in einem Zeitfenster von 12 bis 24 Stunden nach der Geburt sterben [Kuma et al., 2004]. Ein früherer Tod, wie er bei den *mlgd2*-Knockout-Mäusen auftritt, kann daher eher nicht durch Probleme bei der Nahrungs-/Flüssigkeitsaufnahme verursacht werden.

Die Aufrechterhaltung der Homöostase wird im Mutterleib über die Plazenta gewährleistet. Nach der Geburt müssen u.a. der Elektrolythaushalt, die Körpertemperatur, der Wasserhaushalt oder der Energiehaushalt vom Embryo selbst kontrolliert werden.

Ein wichtiger Aspekt der Homöostase ist kurz nach der Geburt die Regulation des Energiehaushalts und damit verbunden die Versorgung der Zellen mit Nährstoffen. Da die Nährstoffversorgung des Embryos über die Plazenta bei der Geburt abgebrochen wird, müssen Neugeborene den Zeitraum bis zum ersten Saugen der Muttermilch, über die sie dann wieder mit Nährstoffen versorgt werden, überbrücken.

Während dieser Zeit ist die Energiegewinnung durch Glykogenolyse in der Leber besonders wichtig, da die Glukoneogenese zu diesem Zeitpunkt noch nicht ausreichend ist, um den Körper mit Glukose zu versorgen [Girard and Pégrier, 1998].

Neben der Glykogenolyse wird kurz nach der Geburt auch der Prozess der Autophagie zur Energiegewinnung genutzt [Kuma et al., 2004]. Die Autophagie ist ein Vorgang bei dem ein Teil des Zytoplasmas in ein sogenanntes Autophagosom aufgenommen und der Inhalt nach Fusion mit dem Lysosom – also ähnlich wie bei dem endosomalen Transport – abgebaut wird. Die zerlegten Bestandteile, vor allem die Aminosäuren, können dann entweder direkt zur Energiegewinnung eingesetzt oder erst in der Leber zur Glukose umgewandelt werden. Außerdem können die Aminosäuren natürlich direkt für die Herstellung von Proteinen verwendet werden. Zusammengefasst kann sich die Zelle also durch diesen „Selbstverdauungs-Prozess“ ernähren. Bereits 30 min. nach der Geburt wird die basale Rate an Autophagie in vielen Geweben erhöht, erreicht ein Maximum zwischen drei und sechs Stunden nach der Geburt und wird erst nach 1-2 Tagen wieder auf eine normale Rate abgesenkt [Kuma et al., 2004]. Die erhöhte Autophagie wird besonders in den Teilen des Körpers, die nach der Geburt zum ersten mal ihre volle Funktionen erfüllen müssen, gesteigert. Dazu zählen der Herzmuskel, das Zwerchfell, die alveolaren Zellen der Lunge und die Haut [Kuma et al., 2004]. Mäuse, mit Defekten in der Autophagie (z.B. gestörte Bildung von Autophagosomen oder beeinträchtiger Fusion von Autophagosomen mit Lysosomen), wie *Atg5*- oder *Atg7*-Knockout-Mäuse, sterben innerhalb eines Tages. Unter Hungerbedingungen (Trennung von der Mutter) sterben diese Mäuse bereits in einem Zeitraum von 12 Stunden, während ihre wildtypischen oder heterozygoten Geschwister bis zu 20 Stunden überleben. Die *Atg5*- oder *Atg7*-Knockout-Mäuse zeigten des weiteren stark verminderte Mengen an Aminosäuren im Blut und es konnte eine gestörte Bildung von Autophagosomen nachgewiesen werden [Kuma et al., 2004; Komatsu et al., 2005]

Mehrere Studien in *Drosophila* und in der Maus deuten auf eine Beteiligung der ESCRT-Proteine im Prozess der Autophagie hin [Lee et al., 2007; Filimonenko et al., 2007; Nara et al., 2002; Rusten et al., 2007]. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass in *Drosophila* eine Interaktion zwischen Lgd und dem ESCRT-III-Protein Shrub

besteht. Sollte eine solche Interaktion auch in der Maus vorliegen, könnte ein Verlust von *mlgd2* die Funktion von CHMP4A,B und/oder C (Shrub) bei der Autophagie beeinträchtigen und so den Tod der *mlgd2*-Knockout-Mäuse herbeiführen. Ob auch in den *mlgd2*-Knockout-Mäusen Defekte bei der Autophagie auftreten, könnte durch Kreuzung mit GFP-LC3 (Marker für Autophagosomen) exprimierenden Mäusen getestet werden. Außerdem könnte durch Bestimmung der Aminosäurekonzentration im Blutplasma festgestellt werden, ob eine beeinträchtigte Energiegewinnung in dem beschriebenen Zeitraum für den Tod der *mlgd2*-Knockout-Mäuse verantwortlich ist.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die systemische Inaktivierung von *mlgd2* zu einem perinatalen Tod ohne bisher erkennbaren Ursache führt. Aufgrund der in dieser Arbeit in *Drosophila* gefundenen Interaktion und funktionalen Beziehung zwischen Shrub und Lgd, könnte der Ausfall von *mlgd2* auch die Funktion der murinen *shrub*-Orthologen (*mSnf7-1,-2,-3*) und damit verbundener Prozesse - wie z.B. Autophagie - beeinträchtigt werden. Störungen in der Autophagie könnten zum frühen Tod der *mlgd2*-Knockout-Mäuse durch die beschriebenen resultierenden Probleme bei der Energiegewinnung kurz nach der Geburt beitragen. Hierbei ist allerdings zu bedenken, dass eine gestörte Autophagie nicht die alleinige Todesursache sein kann, da Autophagie-defiziente *Atg5*- oder *Atg7*-Knockout-Mäuse unter normalen Nahrungsbedingungen länger – nämlich bis zu einem Tag überleben. Da vermutlich also mehrere Prozesse in den *mlgd2*-Knockout-Mäusen gestört sind, die in additiver Weise zur Letalität führen, kann die genaue Funktion von *mlgd2* durch den vollständigen Knockout nicht analysiert werden. Für die Entschlüsselung der Funktion von *mlgd2* in der Maus und vor allem seinen Einfluss auf den Notch-Signalweg, sollte der Verlust daher in einzelnen Geweben (wie z.B. Darm oder im blutbildenden System) untersucht werden, wofür die bereits hergestellten konditional inaktivierbaren *mlgd2*flox-Mäuse verwendet werden können.

3.4.2 Ausblick

Durch die Herstellung konditional inaktivierbarer *mlgd2*-Mäuse wurden in dieser Arbeit die Grundlagen für die Erforschung der Funktion von *mlgd2* in der Maus gelegt. Die überlebenswichtige Funktion dieses Gens in der Maus konnte bereits durch den beobachteten perinatalen Tod bei seiner systemischen Inaktivierung gezeigt werden.

Die in dieser Arbeit nachgewiesene funktionale Interaktion zwischen Lgd und Shrub und ihre Beziehung zum Notch-Signalweg könnten in zukünftigen Experimenten durch gewebsspezifische Deletionen des *mlgd2*-Gens bestätigt und somit auf Säugetiere übertragen werden. Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass diese Tiere bestimmte Formen von neuronalen Krankheiten oder Krebs, die mit dem Notch- aber auch mit dem ESCRT-Signalweg assoziiert sein könnten, entwickeln. Durch das generierte Mausmodell ließen sich die Ursachen dieser Krankheiten dann näher untersuchen. Aufgrund der evolutionär hohen Konservierung von Lgd, Shrub und Notch sind diese Ergebnisse vermutlich auch auf den Menschen zu übertragen, was durch eine Mutation in dem humanen *mlgd2*-Ortholog CC2D1A, die zu einer schweren, erblichen geistigen Behinderung führt, bereits angezeigt ist.

Um die Auswirkungen des vollständigen Ausfalls von Lgd in der Maus zu untersuchen, sollte die Generierung des Doppelknockouts von *mlgd1* und *mlgd2* ein vorrangiges Ziel sein.

4. Material und Methoden

4.1 Materialien

4.1.1 Chemikalien

Falls nicht anders vermerkt, wurden analysereine Substanzen der folgenden Firmen verwendet: Roth, Sigma-Aldrich, Applichem, Merck, Serva, Normapur, Fluka.

Die Oligonukleotide wurden alle von der Firma Invitrogen bezogen.

α -[³² P]-dCTP	Hartmann Analytic, Braunschweig
Agarose (für Southern-Blots)	Agarose UltraPure, Invitrogen
β -Mercaptoethanol (für Zellkultur)	Gibco, Paisley, UK
Bradfordreagenz	Bio-Rad Laboratories, München
DMEM (4500mg/L Glukose, +L-Glutamin)	Gibco, Paisley, UK
DMEM (+4500mg/L Glukose, +GLUTAMAX)	Gibco, Paisley, UK
ECL Western Blotting Detektionsreagenzien	Amersham, Freiburg
BM Chemiluminescence Western Blotting Substrate	Roche, Mannheim
Fötale Kälberserum (FKS)	Gibco, Paisley, UK
Ganciclovir	Sigma-Aldrich, Steinheim
Gelatine (für Zellkultur)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Geneticin (G418)	Gibco, Paisley, UK
Glutathion Sepharose 4B	GE Healthcare Bio-Sciences, München
Lachssperma-DNA	Sigma-Aldrich, Steinheim
Leukämie inhibierender Faktor (LIF)	von der Arbeitsgruppe Brüning hergestellt
nicht-essentielle Aminosäuren	Gibco, Paisley, UK
Normales Ziegenserum (NGS)	Jackson Immuno Research
Protease-Inhibitor-Cocktail (P8340)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Protein G Sepharose Fast Flow	GE Healthcare Bio-Sciences, München
RPMI 1640 (ohne Phenolrot, ohne Glutamin)	Gibco, Paisley, UK
Spermidine	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trypsin-EDTA	Gibco, Paisley, UK

Vectashield H-1000 mounting medium for fluorescence	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Hoechst No.33258	Sigma-Aldrich, Steinheim

4.1.2 Geräte und Zubehör

Blottingkammer Mini Protean 3 Cell	Bio-Rad Laboratories, München
Elektroporator Gene Pulser™	BioRad Laboratories, München
Fluoreszenz-Mikroskop Imager ZI mit ApoTome	Carl-Zeiss, Jena
Fujifilm Super RX	Fujifilm Medical Systems, Stamford, USA
Gel Doc XR System	BioRad Laboratories, München
Hybridisierungsofen Hybridiser HB-1D	Techne, Duxford, England
Hybond™-N+ bzw. Hybond™-XL	Amersham Bioscience, UK
Hyperfilm™ ECL	Amersham Bioscience, UK
Inkubator Heraeus BBD 6220	Heraeus Instruments, Hanau
Kamera AxioCam MR	Carl-Zeiss, Jena
PCR-Maschine Professional Thermocycler (Gradient)	Biometra, Göttingen
Phosphoimager BAS 1000	Fujifilm Medical Systems, Stamford, USA
Säulen MicroSpin™ S-200 HR	GE Healthcare Bio-Sciences, München
Sterilbank Hera Safe KS 12	Heraeus Instruments, Hanau
Trans-Blot SD Semi Dry Transfer Cell	Bio-Rad Laboratories, München
UltraTurrax Homogenisator	IKA Werke, Staufen
Zentrifuge Heraeus Biofuge pico	Heraeus Instruments, Hanau

4.1.3 Molekularbiologische Kits

Big Dye® Termination v3.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Foster City
pGEM-T Easy Vektor System I	Promega, Mannheim
QUIAEX® II Gelextraction Kit	Quiagen, Hilden
Expand High Fidelity ^{PLUS} PCR System	Roche, Mannheim
SuperScript™ III First-Strand Synthesis System for RT-PCR	Invitrogen, Kalifornien, USA
Rediprime™ II Labelling System	GE Healthcare Bio-Sciences, München

Nucleobond PC100

Macherey-Nagel, Düren

4.1.4 Größenstandards

DNA

λ / *Hind*III-Marker

New England Biolabs, Frankfurt

Hyperladder I

Bioline, Luckenwalde

100bp DNA Ladder

New England Biolabs, Frankfurt

Protein

PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder

MBI Fermentas, St. Leon-Rot

PageRuler™ Prestained Protein Ladder

MBI Fermentas, St. Leon-Rot

Precision Plus Protein Standard, all blue

Bio-Rad Laboratories, München

4.1.5 Enzyme

Alle Restriktionsenzyme wurden von der Firma NEB bezogen.

RNase A, DNase free (10 mg/ml)

MBI Fermentas, St. Leon-Rot

Proteinase K, recombinant, PCRgrade

Roche, Mannheim

T4-DNA-Ligase (400 U/ μ l)

New England Biolabs, Frankfurt

Red Taq DNA Polymerase

Sigma-Aldrich, Steinheim

PreScission™ Protease

GE Healthcare Bio-Sciences,
München

4.1.6 Antikörper

Primäre Antikörper

Antikörper gegen	Herkunft	Verdünnung		Hersteller
		WB	IH	
Aktin	Kaninchen (polyklonal)	1:5000	---	Sigma-Aldrich
CC2D1A	Kaninchen (polyklonal)	1:3000	---	Bethyl Laboratories
β-Galaktosidase	Kaninchen (polyklonal)	---	1:1500	Cappel Research Products
GFP	Kaninchen (polyklonal)	1:2500	---	Torrey Pines Biolabs
HA, high affinity	Ratte (monoklonal)	1:3000	---	Roche
mIgd1	Meerschweinchen (polyklonal)	1:3000	---	selbst hergestellt
Myc	Maus (monoklonal)	1:5000	1:2000	Cell Signaling
Notch (intra)	Maus (monoklonal)	1:1000	---	DSHB
Shrub	Kaninchen (polyklonal)	1:1000	---	Sweeny et al. 2006
β-tubulin	Maus (monoklonal)	1:10000	---	Amersham
Wingless	Maus (monoklonal)	---	1:50	DSHB

Tabelle 4.1: Primäre Antikörper

WB = Western-Blot, IH = Immunhistochemie, DSHB (Developmental Studies Hybridoma Bank)
 --- = nicht verwendet

Sekundäre Antikörper

Die sekundären Antikörper wurden alle von der Firma Dianova bezogen und stammen alle aus der Ziege.

Antikörper gegen	gekoppelt mit	Verdünnung
Meerschweinchen	HRP	1:3000
Maus	HRP	1:1000
Kaninchen	HRP	1:5000
Ratte	HRP	1:5000
Maus	Alexa-568	1:500
Maus	Alexa-647	1:125
Kaninchen	Alexa-568	1:500
Kaninchen	Alexa-647	1:125
Ratte	Alexa-647	1:125

Tabelle 4.2: Sekundäre Antikörper

4.1.7 Plasmide und BACs

pGEM®-TEasy-Vektor	Promega, Mannheim
pGK12	Artemis Pharmaceuticals, Köln
pUAS-T	Brand and Perrimon, 1993
pGEX-6P-2	GE Healthcare Bio-Sciences, München
RIKEN Mouse FANTOM™ Klon A830039804 (enthält die <i>mlgd1</i> cDNA)	Kawai et al., 2001; Okazaki et al., 2002
BAC Nr. RP23-446F20 (enthält <i>mlgd1</i>)*	BACPAC Resources, Oakland, USA
BAC Nr. RP23-298K21 (enthält <i>mlgd2</i>)*	BACPAC Resources, Oakland, USA

* Die beiden BAC-Vektoren stammen aus der RPCI-23 BAC Library der Firma BacPac Resources. Kazutoyo Osoegawa und Minako Tateno isolierten dafür genomische DNA aus Nieren- und Hirngewebe von weiblichen C57BL/6J Mäusen im Alter von drei Wochen. Die DNA wurde mit einer Kombination aus *EcoRI* und *EcoRI* Methylase partiell restringiert und in den pBACe3.6-Vektor über die *EcoRI*-Schnittstellen kloniert.

4.1.8 Bakterien und Zelllinien

Für alle Transformationen wurden die Mach1™-T1 kompetenten Zellen der Firma Invitrogen verwendet.

Genotyp: F- ϕ 80(*lacZ*) Δ M15 Δ *lacX74* *hsdR*(*rk*-, *mk*+) Δ *recA1398* *endA1* *tonA*

Der Bakterienstamm C43 der Firma Overexpress wurde für die Expression des *mlgd1*-Antikörper-Fragments verwendet.

Genotyp: F- *ompT gal hsdS_B* (*r_B⁻m_B⁻*) *dcm lon* λ DE3

Die Transfektionen wurden mit murinen embryonalen Stammzellen der Zelllinie v6.5 [Stamm: C57BL/6 (F) x 129/sv (M) [Eggan et al., 2001] durchgeführt.

Software und Internetdatenbanken

Adobe Photoshop CS4 (Adobe Systems)

Aida Image Analyser Version 3.43 (Raytest)

ENSEMBL-Datenbank (www.ensembl.org)

VectorNTI (Informax/Invitrogen)

AxioVision40 Version 4.7.2.0 (Carl-Zeiss)

4.2 Methoden zur Arbeit mit DNA und RNA

Standardmethoden der Molekularbiologie wurden nach den Angaben von Sambrook et al. (1989) durchgeführt.

4.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde zur *in vitro*-Amplifikation von DNA-Fragmenten eingesetzt. Die entstandenen PCR-Produkte wurden zur Klonierung der beiden Gensatzvektoren, zur Herstellung von Sonden (Southern Blot), zur Generierung des *mlgd1*-Antikörper-Fragments und der Shrub-Deletionskonstrukte benutzt. Außerdem wurde diese Methode zur Genotypisierung von Mäusen verwendet.

Bis auf die Genotypisierungen wurden alle PCRs mit dem Expand High Fidelity^{PLUS} PCR System der Firma Roche durchgeführt. Für die Herstellung der Sonden für den Southern Blot sowie für die Fragmente zur Klonierung der Gensatzvektoren wurde BAC-DNA verwendet (*mlgd1* = RP23-446F20, *mlgd2* = RP23-298K21). Das *mlgd1*-Antikörper-Fragment wurde aus einem Plasmid amplifiziert, welches die *mlgd1* cDNA enthielt.

In den 50 µl-PCR-Ansätzen wurden immer 1 µg BAC- oder Plasmid-DNA, die entsprechenden Oligonukleotide zu einer Endkonzentration von je 1 µM, 200 µM dNTPs, der Reaktionspuffer mit einer finalen Konzentration von 1,5 mM MgCl₂ und 2,5 Units Enzym-Mix (Taq- und Tgo-Polymerase) eingesetzt.

Die verwendeten PCR-Programme für die jeweiligen Fragmente sind in Tabelle 4.3 aufgeführt.

		Fragmente bis 1 kb	Fragmente von 1 - 5 kb
initiale Denaturierung	94 °C	4 min.	4 min.
1. Zyklusperiode (12 Zyklen)			
Denaturierung	94°C	10 sec.	10 sec.
Anlagerung	54°C	45 sec.	45 sec.
Verlängerung	68°C	1 min.	5 min.
2. Zyklusperiode (25 Zyklen)			
Denaturierung	94°C	15 sec.	15 sec.
Anlagerung	54°C	45 sec.	45 sec.
Verlängerung	68°C	1,5 min.	6,5 min.
finale Verlängerung	68°C	10 min.	10 min.

Tabelle 4.3: PCR-Programme zur Amplifikation der einzelnen Fragmente

Die Tabelle zeigt die beiden PCR-Programme, die zur Amplifikation der Fragmente verwendet wurden. Für verschiedene Fragmentlängen wurden dabei unterschiedliche lange Verlängerungs (Elongations)-zeiten verwendet.

Die für die Klonierungen benötigten Oligonukleotide sind in Tabelle 4.4 dargestellt.

Oligonukleotide	Sequenz	Amplifikation von
<i>mlgd1</i>		
5NotI_SAmIgd1	aaagcggccgcaaatgaggaagtaaatctccct	kurzer Homologiearm (KA)
3SacII_SAmIgd1	aaaccgcggttaaggaattcttgagccacc	kurzer Homologiearm (KA)
5AscI_KOmIgd1	aaaggcgcgccaagcttgccagtaagactgggtcc	loxP-flankierter Bereich Exon 8-16 (KO), SB: <i>HindIII</i>
3MfeI_KOmIgd1	aaacaattgcatcagatccgttacctccc	loxP-flankierter Bereich Exon 8-16 (KO)
5AflI_LAmIgd1	aaacttaaggatcctgccgccattctgcaaga	langer Homologiearm (LA); SB: <i>BamHI</i>
3PacI_LAmIgd1	aaattaattaattcccagatcctctgggaa	langer Homologiearm (LA)
5HindIII_mIgd1	aacaatccataactcaagtca	mlgd1-HindIII-Sonde (590 bp)
3HindIII_mIgd1	ctatttacttcgcacacaattc	mlgd1-HindIII-Sonde (590 bp)
5XhoI_mIgd1AKNEU	aaactcgaggcatgccaggccaagacc	mlgd1-Antikörper-Fragment
3NotI_mIgd1AKNEU	aaagcggccgctggctccatggcacagga	mlgd1-Antikörper-Fragment

Oligonukleotide	Sequenz	Amplifikation von
<i>mlgd2</i>		
5NotI_SAmIgd2	aaag cg g cc g cg actgcagaggcatgttgc	kurzer Homologiearm (KA)
3SacII_SAmIgd2	aa accg cg ga ag ctt catggtcttgcgtgatctgc	kurzer Homologiearm (KA); SB: <i>HindIII</i>
5AscI_KOmIgd2	aa aggc g cg cc gg ccacagtaaagtgtggat	loxP-flankierter Bereich Exon 7-14 (KO)
3MfeI_KOmIgd2	aa caatt gagaggacacaggtttgatgtc	loxP-flankierter Bereich Exon 7-14 (KO)
5NheI_LAmIgd2	aa agctag cg gat ccgaaagagcagccagtactc c	langer Homologiearm (LA); SB: <i>BamHI</i>
3PacI_LAmIgd2	aa attaatta attaatgatgagtgacaccttc	langer Homologiearm (LA)
5BamHI_mIgd2	taaccctagatgtgcaaagc	mlgd2-BamHI-Sonde (450 bp)
3BamHI_mIgd2	ctctgtgctcaggttcccc	mlgd2-BamHI-Sonde (450 bp)
5HindIII_mIgd2v2	gcc cag t gac ctg ttt gg	mlgd2-HindIII-Sonde (600 bp)
3HindIII_mIgd2v2	gcc acc gt gg ctt cc gaa	mlgd2-HindIII-Sonde (600 bp)
<i>mlgd1</i> und <i>mlgd2</i> (in beiden Projekten verwendet)		
neo FOR	tgaatgaactgcaggacgaggca	neo-Sonde (533 bp)
neo REV	gccccaagctcttcagcaat	neo-Sonde (533 bp)
Shrub-Deletionskonstrukte		
5EcoRI_MYCShrubΔcore	aa gaattc atggaacagaaattaatttctgaagaa gatttaatgccagtgccattcggcgc	Myc-ShrubΔcore-Konstrukt
5EcoRI_MYCShrub	aa gaattc ATGgaacagaaattaatttctgaaga agatttaatgagttcttcgggaagatg	Myc-Shrub- und Myc- ShrubΔauto-Konstrukt
3XbaIShrub	aa atctag attagttggaccaggataaaaag	Myc-Shrub- und Myc-ShrubΔcore-Konstrukt
3XbaIShrubdelauto	aa atctag attagttcgaaatggcatcgaa	Myc-ShrubΔauto-Konstrukt

Tabelle 4.4: Oligonukleotide zur Herstellung von Fragmenten für die Genersatzvektoren, der Sonden (Southern Blot) und des *mlgd1*-Antikörper-Fragments

Die zur Klonierung eingefügten Restriktionsschnittstellen sind fett gedruckt, während diejenigen, die für die Southern-Blot Analyse benötigt wurden, unterstrichen sind. Die verwendeten Restriktionsstellen für die Klonierung sind dem Namen des Oligonukleotids zu entnehmen, während die für die Southern Blot-Analyse (SB) eingefügten Restriktionsschnittstellen bei der Fragmentbezeichnung angegeben sind.

Myc-Shrub = AS 1-227; Myc-ShrubΔauto = AS 1-147; Myc-ShrubΔcore = AS 148-227

AS = Aminosäure

Zur Genotypisierung von Mäusen wurde die Red Taq Polymerase der Firma Sigma-

Aldrich verwendet. Für einen 25 µl Ansatz wurden dabei ca. 250 ng DNA (aus Schwanzspitze isoliert), Forward- und Reverse-Oligonukleotide zu einer Endkonzentration von je 1 µM, 200 µM dNTPs, 2,5 µl 10x RedTaq-Puffer und 1 µl Red Taq Polymerase eingesetzt. Wenn drei Oligonukleotide verwendet wurden, wurde das dritte Oligonukleotid in einer Konzentration von 2 µM verwendet. Die Abbildung 4.1 zeigt die Strategie für die Genotypisierungen, die für beide Knockout-Strategien gleich verwendet wurde. In Tabelle 4.5 sind die verwendeten Oligonukleotide angegeben.

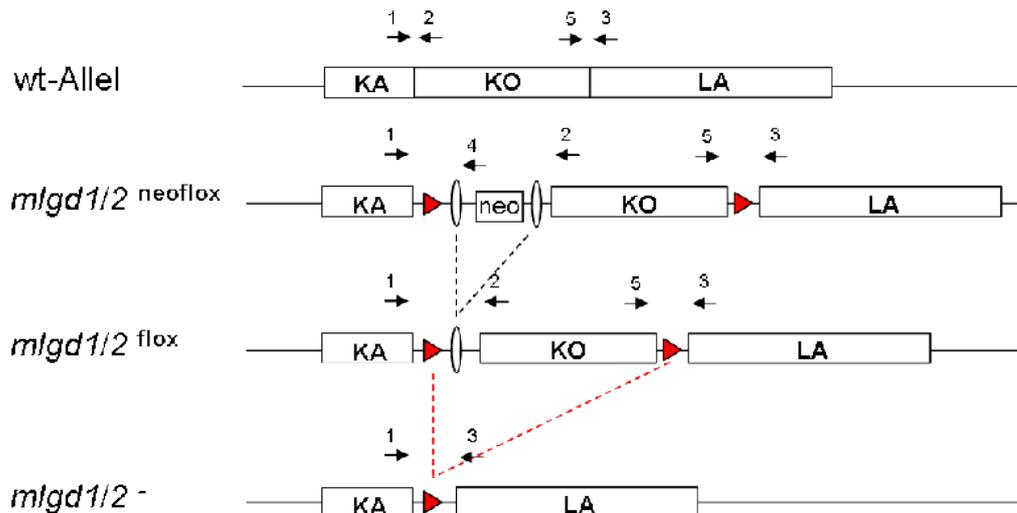


Abbildung 4.1: Strategie zur Genotypisierung der *mlgd1/mlgd2*-Mäuse

Die verschiedenen möglichen Allele sind schematisch dargestellt. Die loxP-Stellen werden durch rote Dreiecke, während die FRT-Stellen durch weiße, schwarz umrandete Ellipsen symbolisiert werden. Die Primer mit ihren jeweiligen Nummern (siehe Tabelle 4.5) werden durch schwarze Pfeile angegeben. KA, kurzer Homologiearm; KO, Knockout-Region; LA, langer Homologiearm,

Oligonukleotide	Sequenz	Oligonukleotid-Nr.
mlgd1		
TYPESAfor	ctgaagacacactatttctag	1
mlgd1KOseq1REV	gacagtaccaaattctctgaa	2
mlgd1KOloxrev	caaatatcaatcgccactgt	3
mlgd1LAlloxfor	tccaatgagccatctctcca	5
mlgd2		
mlgd2TYPE1SAfor	agaccctgtggctggattgt	1
mlgd2KOseq1REV	accatcctttgctgtctc	2
mlgd2KOloxrev	gccagcctggctacaatca	3
mlgd2LAlloxforNEU	cctgacctgagtactggaca	5

Oligonukleotide	Sequenz	Oligonukleotid-Nr.
mlgd1 und mlgd2 (in beiden Projekten verwendet)		
SAloxfrtREV	gcatgctccagactgccttg	4
5CreDel	acctgaagatgttcgcgatta	
3CreDel	accgtcagtacgtgagatatctt	
5FLPdel	gacaagcgttagtaggcacat	
3FLPdel	gagaagaacggcatagtgcgt	

Tabelle 4.5: Oligonukleotide zur Genotypisierung von ES-Zellen und Mäusen

Die Tabelle zeigt die verschiedenen Oligonukleotide, die zur Genotypisierung von ES-Zellen bzw. Mäusen in den beiden Projekten verwendet wurden. Oligonukleotid 4 bindet zwischen der FRT-Stelle und der Neomycin-Resistenz-Kassette und ist daher in beiden Knockout-Projekten vorhanden. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden den Oligonukleotiden verschiedene Nummern zugeordnet, die auch in Abb. 4.1.

		mlgd1_3+5	mlgd1_1+2+4	mlgd2_1+3+5	mlgd2_1+2+4	Cre	Flp
1	94°C	3 min.	3 min.	3 min.	3 min.	4 min.	3 min.
2	94°C	45 sec.	45 sec.	45 sec.	45 sec.	30 sec.	30 sec.
3	X°C	45 sec. X=56	45 sec. = 54	X 45 sec. (X=55)	45 sec. (X=60)	45 sec. (X=57)	30 sec. (X=60)
4	72°C	1 min.	1 min.	1 min.	1 min.	45 sec.	1 min.
5	72°C	10 min.	10 min.	10 min.	10 min.	10 min.	5 min.

Tabelle 4.6: PCR-Programme für die Genotypisierungen

In allen Programmen wurden die Schritte 2-4 insgesamt 35 mal wiederholt. Die verwendeten Oligonukleotide wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit mit Nummern (1,2,3,4,5) versehen und sind der Tabelle 4.5 zu entnehmen.

Bei den PCRs zum Nachweis eines vorhandenen FLPe- oder Cre-Deleter-Allels wurde ein 600 bp (FLP) oder ein 400 bp (CreDel) Fragment erwartet, wenn das Allel vorhanden war. Bei Fehlen des Allels wurde keine Bande erwartet.

4.2.2 Konstruktion der Gensatzvektoren

Für die Herstellung der beiden Gensatzvektoren wurden die in Tabelle 4.4 aufgeführten Oligonukleotide verwendet. Alle durch PCR hergestellten Fragmente wurden zunächst in den pGEM-TEasy Vektor kloniert und sequenziert. Mutationsfreie Fragmente wurden über ihre in der PCR zugefügten Restriktionsschnittstellen in den GK12TK-Vektor umklont. Jeder Gensatzvektor wurde anschließend noch einmal komplett sequenziert, um die richtige Integration der Fragmente und mutationsfreie FRT- bzw. loxP-Stellen zu bestätigen.

4.2.3 DNA-Gelelektrophorese und Gelextraktion

Um DNA-Fragmente nach einer PCR oder einem Restriktionsverdau nach ihrer Größe aufzutrennen, wurde die Gelelektrophorese mit 0,8 – 2%igen Agarosegelen (0,7 µg/ml EtBr) verwendet. Benötigte DNA-Fragmente wurden aus dem Gel ausgeschnitten und mithilfe des QIAEX II Gelextraktion Kit isoliert werden. Dabei wurde die DNA in 20 µl 10 mM Tris-HCl pH 8,5 eluiert.

50x TAE (für 1 Liter; Laufpuffer für DNA-Gelelektrophorese):

242 g Tris; 57,1 ml Eisessig; 100 ml EDTA (0,5 M)

Der pH-Wert wird mit Eisessig auf 8,0 eingestellt.

6x Ladepuffer:

10 mM Tris-HCl (pH 7,6); 0,03 % Bromphenolblau; 0,03 % Xylenecyanol FF; 60% Glycerol; 60 mM EDTA

(Xylenecyanol FF läuft in TAE-Puffer bei 4160 bp und Bromphenolblau bei 370 bp.)

4.2.4 DNA- bzw. RNA-Konzentrationsbestimmung

Zur Bestimmung der DNA- bzw. RNA-Konzentration einer Lösung wurde ihre Extinktion bei 260 nm photometrisch bestimmt. Für doppelsträngige DNA entspricht eine Extinktion von 1 bei 260 nm einer Konzentration von 50 µg/ml. Erreicht eine RNA-Lösung diesen Extinktionswert liegt eine Konzentration von 40 µg/ml vor. Zur Messung wurden geeignete Verdünnungen der zu bestimmenden Lösung mit Wasser angesetzt.

Um die Reinheit der DNA-Lösung zu bestimmen, wurde die Extinktion bei 260 nm und bei 280 nm gemessen, da bei 280 nm das Absorptionsmaximum der meisten Proteine liegt. Der Quotient aus der Extinktion bei 260 nm zu 280 nm sollte im Idealfall bei 1,8 – 2,0 liegen. Niedrigere Werte weisen auf Verunreinigungen mit Proteinen hin.

4.2.5 Ligation

a) Ligationen in den pGEM-T Easy Vektor

Für die Subklonierung von PCR-Fragmenten wurde das pGEM-T Easy Vektor System der Firma Promega verwendet. Für eine Ligation in den pGEM-T Easy Vektor wurden zunächst 10% des Eluats aus der Gelextraktion auf ein 1 % Agarosegel aufgetragen, um das zu verwendende Vektor-Insert-Verhältnis (1:3 bis 1:5) zu bestimmen. Nach 1 h Ligation bei Raumtemperatur wurde die Hälfte des Ligationsansatzes für die Transformation von 50 µl Mach1TM-T1 kompetenter Zellen verwendet.

b) Ligationen in andere Vektoren

Erfolgte die Ligation in andere Vektoren wurde der 10x Ligase-Puffer von NEB und die T4-DNA-Ligase von NEB verwendet. Inkubiert wurde der Ligationsansatz für 1 h bei 20°C und anschließend für weitere 16 h bei 16°C.

4.2.6 Transformation

Zur Transformation von Mach1TM-T1 kompetenten Zellen wurden 50 µl Bakterien mit 100 - 200 ng DNA vermischt und für 20 min. auf Eis inkubiert. Anschließend folgte ein Hitzeschock bei 37°C für 1 min. wodurch die DNA in die Bakterien aufgenommen werden konnte. Nach zwei minütiger Inkubation auf Eis wurden 900 µl vorgewärmtes LB-Medium (ohne Zusatz von Antibiotika) hinzugegeben und die Mischung für 1 h bei 37°C und 300 rpm geschüttelt. Nach kurzer Zentrifugation wurden 900 µl abgenommen und das Bakterienpellet in den restlichen 100 µl resuspendiert. Davon wurden unterschiedliche Mengen auf eine Agarplatte (mit entsprechendem Antibiotikum) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

4.2.7 Präparation von Plasmid-DNA

Die verwendete Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien wurde mit dem Nucleobond PC100-Kit der Firma Macherey-Nagel durchgeführt und beruht auf dem Prinzip der alkalischen Lyse. Bei 100 ml Über-Nacht-Kulturen wurden die mitgelieferten Anionenaustauscher-Säulen verwendet, das DNA-Pellet in 100 µl 10 mM Tris-HCl pH 8,5 resuspendiert und so Ausbeuten von ca. 250 µg Plasmid-DNA erzielt.

Bei 3 ml Über-Nacht-Kulturen wurden nur die Puffer S1 (zur Resuspension mit RNaseA), S2 (Zelllyse) und S3 (Neutralisation) verwendet. Nach der Neutralisation wurden gefällte Proteine und genomische DNA abzentrifugiert und die im Überstand enthaltene Plasmid-DNA mit Isopropanol gefällt. Nach einem Waschschrift mit 70% Ethanol wurde das DNA-Pellet getrocknet und in 50 µl 10 mM Tris-HCl pH 8,5 resuspendiert. Aus 3 ml Bakterienkultur konnten so bis zu 25 µg Plasmid-DNA extrahiert werden.

4.2.8 Sequenzierung

Die in einen Vektor klonierten Fragmente wurden mit dem Big Dye[®] Termination v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) sequenziert, das auf der Abbruchmethode durch fluoreszenzmarkierte dNTPs bei der Strangsynthese basiert. Der Ansatz mit einem Gesamtvolumen von 10 µl enthielt 1 µl Big Dye v3.1 Reaktionsmischung, 1,5 µl Big Dye v3.1 Sequenzierungspuffer, 1 µl Oligonukleotid (10 µM) und 200-300 ng dsDNA. Das Sequenzierungsprogramm bestand nach einer initialen Denaturierung für 5 min. bei 96°C aus 25 Zyklen mit 96°C für 30 sec., 50°C für 15 sec. und 60°C für 4 min. Anschließend wurden 10 µl ddH₂O zum Ansatz gegeben und die Sequenz mit Hilfe des ABI373A und ABI377 Systems automatisiert ermittelt.

Die Tabelle 4.7 zeigt die verschiedenen Oligonukleotide, mit denen, die in bestimmte Vektoren eingeführten, Fragmente sequenziert wurden.

Oligonukleotid	Sequenz	Bindungsstelle
T7	taatacgactcactataggg	pGEM-TEasy
SP6 universal	atctaggtgacactatag	pGEM-TEasy
pGEX-6P-2_5prim	gggctggcaagccacgtttggtg	pGEX-6P-2
pGEX-6P-2_3prim	ccgggagctgcatgttcagagg	pGEX-6P-2
P01	ctgaaatctgccaagaag	pUAST
P02	ggttggaatctaaaatacac	pUAST
SAfor	aggaaacagctatgacatg	pGK12

Oligonukleotid	Sequenz	Bindungsstelle
mlgd1		
SAmlgd1seq1	tgaaggagagaccttctg	SA mlgd1
SAmlgd1seq2	ggtagattaaagaattgt	SA mlgd1
SAmlgd1seq3	gagactccatagctggctg	SA mlgd1
mlgd1SAloxfrtFOR	taaaggtagtgggactgtg	SA mlgd1
mlgd1KOseq1REV	gacagtaccaaactctgaa	KO mlgd1
mlgd1KOseqEx9	agaggagctatacagcacc	KO mlgd1
KOmlgd1seq1	ttcagagatttgactgtc	KO mlgd1
KOmlgd1seq2	aaaggctgaacaagtatcgt	KO mlgd1
KOmlgd1seq3	actgatgaggttctaagc	KO mlgd1
KOmlgd1seq4	attgcagaggcagaactaga	KO mlgd1
KOmlgd1seq5	gtgggataggcatggcccca	KO mlgd1
mlgd1KOloxrev	caaatatcaatgccactgt	KO mlgd1
mlgd1LAlloxfor	tccaatgagccatctcca	LA mlgd1
LAmld1seq1	agaggtagtcaggccttga	LA mlgd1
LAmld1seq2	cttagtgagacatcccagt	LA mlgd1
LAmld1seq3	ggtaggtgctgatagggt	LA mlgd1
LAmld1seq4	caggtgttattaatagtg	LA mlgd1
LAmld1seq5	ttgagtaaagagattgtct	LA mlgd1
LAmld1seq6	aattgaacaagtttcaag	LA mlgd1
LAmld1seq7	cccatgtcatagacggaaga	LA mlgd1
LAmld1seq8	ctgactgccctgccagagg	LA mlgd1
LAmld1seq9	ctaccacccccctctctgt	LA mlgd1
LAmld1seq10	gtcctggagcctcggggcct	LA mlgd1
mlgd1LAseq11	aagatgtaactgtagggatg	LA mlgd1
mlgd2		
mlgd2SAloxfrtFOR	agcactccagggtgagaaga	SA mlgd2
SAmlgd2seq1	taaggaagtcaaagcggac	SA mlgd2
SAmlgd2seq2	cctatgccctggcccttac	SA mlgd2
SAmlgd2seq3	gtgttcccatgcccgtgg	SA mlgd2
SAmlgd2seq4	acaggggacaggacaggga	SA mlgd2
mlgd2SAFRT	ctgaggacagaggaggagg	SA mlgd2
mlgd2KOseq1REV	accatccttgcctgtctc	KO mlgd2
mlgd2KOloxrev	gccagcctggtctacaatca	KO mlgd2
mlgd2LAlloxforNEU	cctgacctgagtactggaca	KO mlgd2
KOmlgd2seq1	gagacaagcaaaggatgggt	KO mlgd2
KOmlgd2seq2	gcgagaggcctctagcatgg	KO mlgd2

Oligonukleotid	Sequenz	Bindungsstelle
KOmlgd2seq3	cctatctctgtcttcaacag	KO mlgd2
KOmlgd2seq4	cgtcgtggttgcaagcctc	KO mlgd2
KOmlgd2seq5	cccgggctgctgttcattcc	KO mlgd2
KOmlgd2seq6	ctagcacagaccttacctgg	KO mlgd2
KOmlgd2seq7	cagcctacctggcctggtga	KO mlgd2
LAmIgd2seq1	aattcttttattagactgt	LA mlgd2
LAmIgd2seq2	ccaatcaatactttgcttag	LA mlgd2
LAmIgd2seq3	cataagtgtctggatctgaa	LA mlgd2
LAmIgd2seq4	gtgtctctatcttttatagc	LA mlgd2
LAmIgd2seq5	gatggggcctccaaggtgcc	LA mlgd2
LAmIgd2seq6	gggttgggggtacaatctgg	LA mlgd2
LAmIgd2seq7	ggtctctcatgcagagccgg	LA mlgd2
LAmIgd2seq8	aacactcatttcttcttat	LA mlgd2
LAmIgd2seq9	agggtaggagatgttatcct	LA mlgd2
LAmIgd2seq10	tacaactaaggctgtgttc	LA mlgd2
mlgd2LAseq11	ccatgtccatcccagtgct	LA mlgd2

Tabelle 4.7: Oligonukleotide für Sequenzierungen

4.2.9 Southern-Blot

Für einen Southern Blot wurden ca. 15 µg DNA über Nacht mit 50-100 Einheiten des jeweiligen Restriktionsenzym verdaut. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in einem 0,8%igen Agarosegel (Agarose UltraPure, Invitrogen) bei 20-30 V über Nacht. Da die Übertragung der DNA vom Gel auf die Membran umso schneller erfolgt, je kleiner die Fragmente sind, wurde das Gel in einer 0,25 M HCl-Lösung für 10 min. depuriniert. An den entstandenen apurinischen Stellen kommt es bei der anschließenden Denaturierung für 10 min. in einer 0,4 M NaOH-Lösung zur Spaltung der Phosphodiesterbindungen und somit zur Entstehung kleinerer Fragmente. Die Übertragung auf eine Nylon-Membran erfolgte mittels Kapillar-Blot, wobei das Gel mit den Taschenöffnungen nach unten geblottet wurde, da die obere Seite des Agarosegels meist kleinere Unebenheiten besitzt, die die Übertragung stören können. Nach dem Blotten wurde die DNA an die Membran durch Erhitzen für 30 min. bei 80°C fixiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit der Prähybridisierungslösung bei 65°C für mindestens vier Stunden, wodurch unspezifische Bindungsstellen durch die in der Lösung enthaltene Lachssperma-DNA

abgesättigt wurden. Nach Hybridisierung mit der radioaktiv markierten Sonde bei 65°C über Nacht wurde die Membran mit 2x SSC/0,1 % SDS bei 65°C gewaschen bis mit dem Geigerzähler nur noch ca. 70 cps (*counts per second*) gemessen werden konnten. Anschließend wurde die Membran in eine Folie eingeschweißt und auf einer Phosphorimager-Platte exponiert. Nach 4 – 48 h konnten die Signale dann mithilfe des Phosphorimagers detektiert werden.

20x SSC:

3 M NaCl; 0,3 M tri-Natrium-Citrat

Der pH-Wert wird auf 7,0 eingestellt.

Prähybridisierungslösung:

1 M NaCl; 50 mM Tris-HCl, pH 7,5; 10 % Dextransulfat; 1 % SDS; 250 µg/ml sonifizierte Lachssperma-DNA (aus 5 mg/ml Stocklösung)

Herstellung der Lachssperma-DNA-Stocklösung (5 mg/ml):

250 mg Lachssperma-DNA werden in 50 ml ddH₂O unter ständigem Rühren erhitzt bis sie sich gelöst hat. Anschließend wird sie für 2 min. sonifiziert und für 5 min. gekocht.

4.2.10 Radioaktivmarkierung der Sonden

Die radioaktive Markierung der Sonden erfolgte mit dem Rediprime II Labeling Kit der Firma Amersham. Nicht eingebaute radioaktiv markierte Nukleotide wurden über eine Säulenaufreinigung mit MicroSpin S-200 HR Säulen der Firma Amersham entfernt. Anschließend wurde die Sonde bei 95°C für 5 min. denaturiert, ebenso lange auf Eis abgekühlt und zur Prähybridisierungslösung gegeben.

4.2.11 Strippen eines Southern-Blots

Um einen Blot mit verschiedenen Sonden hybridisieren zu können, musste die vorherige Sonde entfernt werden. Dazu wurde der Blot drei Mal für je 10 min. in kochendem 0,1 % SDS geschwenkt bis der Geigerzähler nur noch die normaler Hintergrundstrahlung anzeigte.

4.2.12 RNA-Isolierung aus ES-Zellen oder murinen Organen

Die RNA-Isolation aus ES-Zellen oder murinem Gewebe wurde mit dem TriFast-Kit der Firma peqLab durchgeführt. Für die RNA-Isolation aus ES-Zellen wurden Zellen von 2 x 10cm-Platten ohne Fibroblastenschicht verwendet. Für die Isolation aus frischem oder schockgefrorenem murinem Gewebe wurde - wenn möglich - 100 mg Gewebe verwendet. Waren nur geringere Mengen vorhanden (einzelne Organe von Mausembryonen), wurden die im Protokoll angegebenen Mengen entsprechend angepasst.

Das erhaltene RNA-Pellet wurde in einer möglichst geringen Menge DEPC-Wasser aufgenommen, aliquotiert und bei -80°C aufbewahrt. Durch das Aliquotieren sollte ein mehrmaliges Auftauen und Einfrieren vermieden werden, da die RNA hierdurch geschädigt werden kann.

DEPC-Wasser: DEPC zu einer Konzentration von 0,1% (v/v) zugeben und über Nacht zur RNase-Inaktivierung gerührt. Um das DEPC zu entfernen, wurde das Wasser anschließend autoklaviert.

4.2.13 Reverse Transkription

Die Transkription von RNA in cDNA wurde mit dem „SuperScript™ III First-Strand Synthesis System for RT-PCR“ der Firma Invitrogen nach Angaben des Herstellers durchgeführt, wobei 5 µg RNA sowie oligo(dT)-Oligonukleotide eingesetzt wurden. Nach der cDNA-Synthese wurde noch vorhandene RNA durch Zugabe von RNase H entfernt.

Anschließend wurde eine PCR (Programm siehe Tab. 4.8) mit der gewonnenen cDNA durchgeführt, um die Expression von mlgd1/mlgd2 nachzuweisen.

Bei mlgd1 bindet das Oligonukleotid 5Nblotmlgd1 in Exon 17 und das Oligonukleotid 3Nblotmlgd1 in Exon 23, wodurch sich auf cDNA-Ebene ein Fragment von 552 bp ergibt (bei genomischer DNA = 2352 bp). Bei mlgd2 bindet das Oligonukleotid 5Nblotmlgd2 in Exon 19 und das Oligonukleotid 3Nblotmlgd2 in Exon 25, wodurch sich auf cDNA-Ebene ein Fragment von 566 bp ergibt (bei genomischer DNA = 1840 bp).

5Nblotmld1	aagtcctgctattctccaag
3Nblotmld1	ctccatgatctctctgatctc
3Nblotmld2	cttccttctagccgctctt
5Nblotmld2	ggctgtccccagtgacc

Tabelle 4.8: Oligonukleotide für die RT-PCR von *mld1/mld2*

1	94°C	3 min.
2	94°C	45 sec.
3	55°C	45 sec.
4	72°C	45 sec.
5	72°C	10 min.

Tabelle 4.9: PCR-Programm zur Bestätigung der *mld1/mld2*-Expression

Bei dem PCR-Programm, das für den Nachweis von *mld1/mld2*-Expression verwendet wurde, wurde die Schritte 2-4 insgesamt 35 mal wiederholt.

4.3 Proteinbiochemie

4.3.1 Proteinextraktion aus *Drosophila*-Larven

Larven des dritten Larvenstadiums wurden in 1x PBS präpariert, wobei Darm- und Fettgewebe entfernt wurden. Anschließend wurden sie in ein Reaktionsgefäß überführt und in *Drosophila*-Lysepuffer (vorher mit Protease-Inhibitor-Cocktail versetzt) mit einem kleinen Mörser zerkleinert. Dabei wurden je 2 bzw. 5 µl Lysepuffer pro Larve verwendet, je nachdem ob nur ein Western-Blot oder eine Koimmunopräzipitation durchgeführt werden sollte. Nach einer 15 minütigen Inkubation auf Eis wurden die Proteinlysate für 15 min. bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Für die Koimmunopräzipitationen wurde das Lysat bei -80°C bis zur Verwendung gelagert. Für die Verwendung im Western-Blot wurden die Proben mit einer entsprechenden Menge 4x Lämmli-Puffer versetzt und für 10 min. bei 95°C aufgekocht bevor sie bei 80°C eingefroren wurden.

10x PBS

1,37 M NaCl; 27 mM KCl; 100 mM Na₂HPO₄; 20 mM KH₂PO₄

Der pH-Wert wird auf 7,4 eingestellt.

Proteinlysepuffer für *Drosophila*-Larven:

10 % Glycerol; 50 mM HEPES (pH 7,5); 150 mM NaCl; 0,5% Triton-X-100; 1,5 mM MgCl₂, 1 mM EGTA

Vor Benutzung wurden immer 4 µl Protease-Inhibitor-Cocktail (Sigma) pro ml Lysepuffer zugegeben.

4.3.2 Koimmunopräzipitation aus *Drosophila*-Larvenlysaten

Für eine Koimmunopräzipitation wurden die Lysate von 30 Larven benötigt, die in insgesamt 150 µl Lysepuffer (siehe 4.3.1) lysiert wurden. Dieses Lysat wurde zunächst mit 2 µl Antikörper (anti-HA oder anti-GFP, siehe Tabelle 4.1) über Nacht auf einem Rotorrad bei 4°C inkubiert.

Für die Präzipitation aus 150 µl Lysat wurden 18 µl Protein G Sepharose Fast Flow Beads der Firma GE Healthcare verwendet. Hierbei mussten 36 µl aus der Flasche genommen werden, da die Beads in einer 1:1 Mischung mit 20% Ethanol geliefert werden. Die Beads wurden kräftig geschüttelt und dann für 2 min. bei 2500 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Beads mit einer 1% Rinderserumalbumin (BSA)-Lösung für 30 min. auf dem Rotorrad bei Raumtemperatur geblockt. Nach erneuter Zentrifugation für 20 sec. bei 2500 rpm wurden die Beads dreimal mit je 1 ml Lysepuffer gewaschen. Nun wurde das mit dem Antikörper über Nacht versetzte Proteinlysat zu den Beads gegeben und zwei Stunden bei 4°C auf dem Rotorrad inkubiert. Während dieser Zeit sollten die Antikörper mit den daran gebundenen Proteinen an die Beads binden. Danach wurde der Überstand, der alle nicht gebundenen Proteine enthielt, abgenommen und die Beads noch zweimal mit je 500 µl Lysepuffer gewaschen. Zuletzt wurden die Beads mit 20 µl 4x SDS-Puffer versetzt und 10 min. bei 95°C gekocht, wodurch sich präzipitierten Proteine von den Beads trennen sollten. Auf einen weiteren Zentrifugationsschritt wurde verzichtet, da bei der Beladung des Polyacrylamid-Gels eine Nadel verwendet wurde, die die Beads nicht mit aufnimmt. Für einen Western-Blot wurden die gesamten 20 µl geladen.

4.3.3 Proteinextraktion aus murinem Gewebe

Für die Proteingewinnung aus Mausorganen wurden die Organe entweder frisch entnommen oder waren direkt nach der Organentnahme in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C gelagert worden.

Pro 100 mg Organ wurden 500 µl Maus-Lysepuffer (vorher mit Protease-Inhibitor-Cocktail versetzt) zur Lyse verwendet. Die in den Lysepuffer überführten Organe wurden mithilfe eines Dispergiergeräts (UltraTurrax, IKA) zerkleinert. Anschließend wurden die Lysate für 45 min. bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Proteinkonzentration nach der Bradford-Methode (Reagenz und Protokoll der Firma Bio-Rad) bestimmt. Danach wurden die Proben durch Zugabe einer entsprechenden Menge 1x SDS-Puffers auf eine Konzentration von 10 mg/ml gebracht und für 10 min. bei 95°C aufgeköcht. Danach wurden die Lysate bei -80°C eingefroren. Für die Western-Blots wurden je 200 µg Protein verwendet.

Proteinlysepuffer für Mausgewebe:

50 mM HEPES (pH 7,4); 150 mM NaCl; 1 % Triton-X-100; 10 mM NaF; 10 mM EDTA; 10 mM Na₃VO₄

Der pH-Wert wird auf 7,4 eingestellt. Vor Gebrauch wird 1/100 Protease-Inhibitor-Cocktail (Sigma) pro ml Lysepuffer zugegeben.

4.3.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Western-Blot-Analyse

Für die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen wurden 10-15 %ige Polyacrylamidgele verwendet. Die angelegte Spannung wurde von 100 V auf 160 V erhöht, sobald sich die Proteine im Trenngel befanden.

Für einen Western-Blot wurden die Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran per Semi-dry-Blot transferiert (10 V, mA = const, 1 h). Um die Effektivität des Blotvorgangs zu überprüfen, wurden die auf die Membran übertragenen Proteine mit Ponceau-Rot angefärbt. Nach Entfernung des Ponceau-Rots durch mehrmaliges Waschen mit 1x PBS wurde die Membran in 5 % Milchpulver/PBS für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, um unspezifische Proteinbindungsstellen

abzusättigen. Danach wurde die geblockte Membran bei 4°C über Nacht mit dem primären Antikörper inkubiert, der in 2 % Milchpulver/PBS verdünnt wurde. Nach dieser Inkubation folgten drei Waschschrte à 15 min. mit PBT (0,2 % Tween20/PBS), wodurch nicht gebundene Antikörper entfernt wurden. Die Inkubation mit dem sekundären Antikörper, der gegen den ersten Antikörper gerichtet war, wurde für 90 min. bei Raumtemperatur durchgeführt. Zuletzt wurde die Membran wieder dreimal für 15 Minuten mit PBT gewaschen. Da alle verwendeten sekundären Antikörper mit einer Meerrettich-Peroxidase (HRP) gekoppelt waren, konnten die Proteine mithilfe einer ECL-Reaktion auf einem Röntgenfilm detektiert werden.

Transferpuffer (für 1 Liter):

5,82 g Tris; 2,93 g Glycin; 3,75 ml 10% SDS; 200 ml Methanol

4x SDS-Puffer (40 ml):

16 ml 100% Glycerol; 3,2 g SDS; 0,0016 g Bromphenolblau; 9,6 ml 1M Tris-HCl (pH 6,8); 2,4 g DTT

10x Elektrophoresepuffer (für 1 Liter):

10 g SDS; 30,3 g Tris; 144 g Glycin

4.3.5 Strippen eines Western-Blots

Um einen Western-Blot mit verschiedenen Antikörpern behandeln zu können, mussten die gebundenen Antikörper zunächst entfernt werden. Dazu wurde der Blot für 30 min. bei 50°C unter leichtem Schütteln mit der Stripping-Lösung inkubiert. Danach folgten zwei Waschschrte à 10 min. mit PBT (0,2 % Tween20/PBS). Anschließend konnte die Immunodetektion mit dem Blocken begonnen und dann nach Protokoll weiter durchgeführt werden.

Stripping-Lösung (für 100 ml):

700 µl β-Mercaptoethanol (14,2 M); 20 ml 10 % SDS; 6,25 ml 1 M Tris-HCl (pH 6,8)

4.3.6 Kolloidal-Coomassie-Färbung

Zur Visualisierung von Proteinen im SDS-Polyacrylamidgel wurde die kolloidale Coomassie-Färbung verwendet, die in ihrer Sensitivität (ca. 30 ng Protein detektierbar) zwischen einer normalen Coomassie-Färbung (ca. 100 ng) und einer Silberfärbung (ca. 1 ng) liegt. Durch die Anwesenheit von Ammoniumsulfat und Phosphorsäure liegt das Coomassie G250 in einem kolloidalen Zustand vor.

Zur Färbung wurde eine Mischung aus 80% Kolloidal-Coomassie-Stammlösung und 20% Methanol angesetzt (Methanol langsam und unter Rühren hinzugefügt) und das Gel darin bei Raumtemperatur auf einem Schwenker über Nacht inkubiert. Entfärbt wurde das Gel mit einer 40% Methanol-Lösung, die mehrfach gewechselt wurde.

Kolloidal-Coomassie-Stammlösung:

0,08 % Coomassie Brilliant Blue G250; 1,6 % Ortho-Phosphorsäure;
8 % Ammoniumsulfat; 20 % Methanol

Zunächst wurden 16 ml Ortho-Phosphorsäure (H_3PO_4) zu 768 ml destilliertem Wasser gegeben und in dieser Lösung 80 g Ammoniumsulfat ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) gelöst (Lösung 1). 1 g Coomassie Brilliantblau G250 wurde in 20 ml destilliertem Wasser gelöst und davon 16 ml zur Lösung 1 gegeben, so dass sich ein Gesamtvolumen von 800 ml ergab.

Diese Stammlösung konnte für mehrere Wochen bei Raumtemperatur aufbewahrt werden.

4.3.7 Analyse von Proteinbanden mittels Peptidmassen-Fingerabdruck

Nach der Entfärbung des mit kolloidalem Coomassie gefärbten Gels wurde es in eine Folie eingelegt und eingescannt. Anschließend wurden die Proteinbanden mit einem frischen Skalpell so knapp wie möglich ausgeschnitten, um Kontaminationen mit im Gel nicht sichtbaren Proteinen zu vermeiden. Die Analyse der in den Banden enthaltenen Proteine wurde vom Zentrum für Molekulare Medizin Köln (ZMMK) über die Methode des Peptidmassen-Fingerabdrucks durchgeführt.

Diese Methode zur Identifizierung von Proteinen basiert auf dem charakteristischen Muster der Peptide, die durch den Abbau mit einer spezifischen Endoprotease aus

der Proteinprobe gewonnen werden. Meist wird dazu Trypsin verwendet, welches die Peptidbindung spezifisch C-terminal zu Lysin und Arginin hydrolysiert. Um die Massen der einzelnen Peptide dieser Mischung zu bestimmen, wurde MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation Time-Of-Flight Mass Spectrometry) verwendet. Die ermittelten Peptidmassen werden anschließend mit einer Datenbank verglichen, die die theoretisch zu erwartenden Peptidmassen (nach Trypsin-Verdau) für viele verschiedene Proteine angibt. Das ZMMK verwendete dafür die Suchmaschine „MASCOT“ (<http://www.matrixscience.com>).

4.3.8 Expression und Aufreinigung des GST-mLgd1(1-253)-Peptids

Zur Expression des mLgd1(1-253)-Peptids wurde der Bakterienstamm C43 (siehe 4.1.8) verwendet. Alle Zentrifugationsschritte wurden soweit nicht anders beschrieben bei 4°C durchgeführt.

Animpfen der Vorkultur und Induktion der Expression mit IPTG:

Für die Aufreinigung aus 250 ml Bakterienkultur wurden am Vortag 5 ml LB-Medium (100 µg/ml Ampicillin) mit den beschriebenen Bakterien angeimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Mit der gesamten Vorkultur wurden dann 250 ml LB-Medium (100 µg/ml Ampicillin) angeimpft und die Expression bei einer OD₆₀₀ von 0,8 mit einer finalen Konzentration von 1 mM IPTG induziert. Nach weiteren 5 h wurden die Bakterien abzentrifugiert und die erhaltenen Pellets bei -20°C eingefroren.

Vorbereitung der GST-Sepharose-4B-Beads:

Für die Aufreinigung aus einer 250 ml Kultur wurde ein Bett-Volumen von 250 µl GST-Sepharose-4B-Beads benötigt, die in einer Mischung mit 20% Ethanol geliefert werden. Die Beads wurden für 2 min. bei 2500 rpm zentrifugiert. Nach Abgießen des Überstands wurden die Beads noch dreimal mit je 1 ml eiskaltem PBS gewaschen, um das Ethanol vollständig zu entfernen. Zum Schluss wurden die Beads in 250 µl eiskaltem PBS aufgenommen wurden, so dass eine 1:1 Mischung mit PBS entstand.

Zellaufschluss und Bindung der GST-markierten Proteine an die GST-Beads:

Das Bakterienpellet einer 250 ml Kultur wurde in 10 ml Zellaufschlusspuffer

resuspendiert. Nach Überführung in ein 50 ml Reaktionsgefäß erfolgte die Sonifizierung für 1 min. 30 sec. (Puls: 50%, Output control: 7). Anschließend wurden 250 µl 20% Triton-X-100 zugefügt und das Lysat für 20 min. und 10.000 rpm in der Ultrazentrifuge (Rotor SS-34) zentrifugiert. Der Überstand wurde dann mit dem hergestellten 500 µl 50% Beads/PBS-Gemisch versetzt und 30 min. bei Raumtemperatur leicht geschwenkt. In dieser Zeit sollten die GST-markierten Proteine an die Beads binden. Nach einer Zentrifugation von 4 min. bei 2500 rpm wurde der Überstand verworfen und die Beads zweimal mit je 2,5 ml GST-Waschpuffer gewaschen.

Abtrennung des Proteins mithilfe der PreScission-Protease:

Die Beads wurden mit 1 ml PreScission Cleavage Puffer gewaschen, erneut zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurden für das Bett-Volumen von 250 µl Beads 20 µl PreScission Protease mit 230 µl PreScission Cleavage Puffer gemischt und zu den Beads gegeben. Da die PreScission Protease eine optimale Aktivität bei 4°C zeigt, wurden die Proben für 18 h bei 4°C auf dem Rotorrad inkubiert. Während dieser Zeit sollte die Abtrennung des mlgd1-AK-Peptid von seiner GST-Markierung erfolgen. Nach erneutem Zentrifugieren wurde der Überstand, der nun die abgetrennten Proteine enthalten sollte, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und für die SDS-PAGE mit einer entsprechenden Menge 4x SDS-Puffer versetzt, für 10 min. bei 95°C gekocht und entweder direkt geladen oder bei -80°C eingefroren. Um die Effektivität dieses Abtrennungsschritts zu überprüfen wurden die Beads, an denen nur noch GST und die PreScission Protease gebunden sein sollten noch zweimal mit 500 µl PreScission Cleavage Puffer gewaschen und dann in 250 µl 4x SDS-Puffer abgekocht.

Zellaufschlusspuffer (10 ml):

80 µl Protease-Inhibitor-Cocktail und 10 µl 1 M DTT mit PBS auf 10 ml auffüllen

GST-Waschpuffer:

10 µl 1 M DTT mit PBS auf 10 ml auffüllen

PreScission Protease Cleavage Puffer:

50 mM Tris-HCl (pH 7,5); 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1 mM DTT

Der pH-Wert wurde auf 7,5 eingestellt.

4.4 Zellkulturtechniken

4.4.1 Auftauen von Zellen

Die in Kryoröhrchen eingefrorenen Zellen, die entweder bei -80°C oder in flüssigem Stickstoff gelagert worden waren, wurden zunächst mit vorgewärmten Kulturmedium aus dem Kryoröhrchen gespült und in 9 ml Kulturmedium überführt. Dadurch wurde die toxische Konzentration des DMSO von 10% im Einfriermedium auf 1% gesenkt. Anschließend wurden die Zellen 5 min. bei 1200 rpm zentrifugiert, der DMSO-haltige Überstand verworfen, das Pellet in der benötigten Menge Kulturmedium resuspendiert und auf Zellkulturschalen verteilt.

4.4.2 Einfrieren von Zellen

Zum Einfrieren wurden die Zellen trypsinisiert und abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in Einfriermedium (10% DMSO, 90% FKS) aufgenommen, auf Kryoröhrchen verteilt und direkt auf Eis gestellt. Um den Stoffwechsel der Zellen und damit auch die Aufnahme des toxischen DMSO in die Zellen zu verlangsamen, wurden sowohl die Kryoröhrchen als auch das Einfriermedium bis kurz vor Gebrauch auf Eis gekühlt. Die Zellen wurden nun zunächst bei -80°C eingefroren und nach 2-3 Wochen in flüssigen Stickstoff umgelagert.

4.4.3 Passage von Zellen

Die Zellen wurden einmal mit 1x PBS gewaschen und anschließend für 5 min. mit Trypsin bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion mit einer der verwendeten Trypsinmenge entsprechenden Menge Kulturmedium gestoppt und die Zellen durch Auf- und Abpipettieren vereinzelt. Nach Zentrifugation für 5 min. bei 1200 rpm (4°C) wurde das Pellet in einer entsprechenden Menge Kulturmedium resuspendiert und auf neue Zellkulturschalen verteilt.

4.4.4 Kultivierung embryonaler Fibroblasten

Embryonale Fibroblasten (EF-Zellen) wurden vom technischen Personal der Arbeitsgruppe aus 13-14 Tage alten Mausembryonen gewonnen und als sogenannte EF0-Zellen aliquotiert. Ein Aliquot EF0-Zellen wurde auf drei 15 cm Schalen aufgetaut und bis zur Konfluenz expandiert. Diese EF1-Zellen wurden anschließend noch zweimal 1:3 passagiert, so dass letztlich siebenundzwanzig 15 cm Schalen EF3-Zellen aus einem Aliquot EF0-Zellen entstanden. Da EF-Zellen nicht mehr als drei mal passagiert werden sollen, wurden die EF3-Zellen mit Mitomycin C mitotisch inaktiviert und so ein weiteres Wachstum verhindert.

Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37°C, 10% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit. Das Medium wurde alle drei Tage gewechselt.

EF-Zellmedium

DMEM (+4500mg/L Glukose, + GLUTAMAX, -Pyruvat)	500 ml
FKS (für EF-Zellen)	60 ml
Natriumpyruvat (100 mM)	6 ml

4.4.5 Behandlung von embryonalen Fibroblasten mit Mitomycin C (MMC)

Zur Herstellung des Mitomycin C (10 µg/ml) wurden zunächst 2 mg Mitomycin C in 2 ml EF-Medium gelöst, dann 1:100 in EF-Medium verdünnt und steril filtriert. Das so vorbereitete MMC wurde bei -20°C gelagert.

Vor der Behandlung mit MMC wurden die 15 cm Schalen mit EF-Zellen einmal mit 1x PBS gewaschen und anschließend mit je 10 ml MMC pro 15 cm Schale für 2-4 h bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde das MMC abgesaugt und zweimal mit 1x PBS gewaschen. Da die EF-Zellen möglicherweise noch MMC ins Medium abgeben, welches das Wachstum der ES-Zellen hemmen würde, wurden die EF-Zellen für ca. zwei Stunden in EF-Medium inkubiert. Danach wurde das EF-Medium abgesaugt und die ES-Zellen in ES-Medium auf die EF-Zellen gegeben. MMC-behandelte EF-Zellen wurden immer auf gelatinisierte Zellkulturschalen passagiert. Dazu wurden die Zellkulturschalen 5 min. mit 0,1 % Gelatine / PBS bei 37°C inkubiert, die Gelatine anschließend wieder abgesaugt und erst dann die EF-Zellen ausplattiert.

4.4.6 Kultivierung embryonaler Stammzellen

Embryonale Stammzellen wurden bei 37°C, 10% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit auf einer Schicht mitotisch inaktivierter embryonaler Fibroblasten angezogen und das Medium täglich gewechselt. Bei einer Konfluenz von 80% wurden die Zellen passagiert und wieder auf MMC-behandelte EF-Zellen gegeben. In den meisten Fällen wurden die Zellen 1:3 gesplittet.

ES-Medium

DMEM (4500mg/L Glukose, + L-Glutamin, -Pyruvat)	500 ml
FKS (für ES-Zellen)	90 ml
Natriumpyruvat (100 mM)	6 ml
nicht-essentielle Aminosäuren (100x)	6 ml
L-Glutamin (200 mM)	6 ml
Leukämie-inhibierender Faktor (LIF)	2,4 ml
β-Mercaptoethanol (50 mM)	1,2 ml
Penicillin/Streptomycin	6 ml

4.4.7 Transfektion von ES-Zellen mittels Elektroporation

Für die Transfektion von ES-Zellen einer 10 cm Schale (1 x 10⁷ Zellen) wurden 40 µg des Gensatzvektors benötigt, der vorher linearisiert und über Phenol-Chloroform-Extraktion mit anschließender Isopropanol-Fällung aufgereinigt wurde. Außerdem wurden vier 10 cm Schalen mit MMC-behandelten EF3-Zellen vorbereitet. Das nach der Phenol-Chloroform-Extraktion in Ethanol aufbewahrte DNA-Pellet wurde für 5 min. bei 13000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen (dieser Arbeitsschritt erfolgte bereits unter der Sterilbank). Anschließend wurde das Pellet für 15 – 20 min. getrocknet und danach in 400 µl RPMI-Medium (ohne Phenolrot) resuspendiert.

Bei den ES-Zellen einer 10 cm Schale wurden vier Stunden vor der Transfektion das Medium gewechselt, damit sich die Zellen in der Wachstumsphase befinden. Für die Transfektion wurden sie trypsinisiert, abzentrifugiert und das Zellpellet ebenfalls in 400 µl RPMI-Medium (ohne Phenolrot) resuspendiert.

Diese 400 µl ES-Zellsuspension wurde nun mit den 400 µl DNA-Suspension gemischt und der gesamte Ansatz (800 µl) in eine Transfektionsküvette gegeben.

Die Elektroporation erfolgte mittels eines Elektroporators bei 500 μ F und 240 mV. Zur Regeneration wurden die Zellen für 10 min. bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend in 40 ml ES-Medium resuspendiert. Hiervon wurden je 10 ml auf die vier vorbereiteten 10 cm Schalen mit EF3-Zellen gegeben.

4.4.8 Selektion von ES-Zellklonen

Zur Anreicherung von homologen Rekombinanten wurden die transfizierten ES-Zellen sowohl einer positiven als auch einer negativen Selektion unterworfen.

Zur positiven Selektion wurde das Neomycin-Analogon G418 verwendet, welches die Translation in eukaryotischen Zellen durch Interaktion mit der 80S Ribosomenuntereinheit blockiert. Das Neomycin-Resistenzgen (^{neo}) kodiert für eine Aminoglykosid-Phosphotransferase, die G418 durch Phosphorylierung inaktiviert. Daher können nur solche Zellen in G418-haltigem Medium überleben, die das Resistenzgen in ihr Genom integriert haben.

Zur negativen Selektion wurde mit dem Nukleosid-Analogon Ganciclovir gearbeitet. Dieses kann von einer viralen Thymidinkinase in ein Monophosphat und dann durch zelluläre Kinasen zum Triphosphat umgesetzt werden. Ein Einbau dieses Triphosphats bei der DNA-Replikation führt zum Kettenabbruch. Der verwendete Gensatzvektor enthält das Gen für die Thymidinkinase des *Herpes simplex Virus* (HSV-tk). Da sich dieses Gen aber außerhalb des Rekombinationsbereiches befindet, wird es nur bei zufälliger Integration, nicht aber bei homologer Rekombination ins Genom der Zelle integriert. Aus diesem Grunde können nur homologe Rekombinanten, die folglich das Thymidinkinase-Gen nicht enthalten, in Ganciclovir-haltigem Medium wachsen.

Mit der positiven Selektion wurde am zweiten Tag nach der Transfektion begonnen. Für die verwendete Zelllinie v6.5 wurde dabei eine Konzentration von 250 μ g/ml G418 eingesetzt. Am fünften Tag begann die zusätzliche negative Selektion mit 2 μ M Ganciclovir für drei Tage. Danach wurden die Zellen mit G418-haltigem Medium gefüttert, bis die Klone eine ausreichende Größe für die Vereinzelung erreicht hatten. Auch während der Selektion wurde jeden Tag das Medium gewechselt.

4.4.9 Isolation von ES-Zellklonen

Acht bis zehn Tage nach der Transfektion wurden nicht ausdifferenzierte ES-Zellklone von den 10 cm Schalen isoliert. Dazu wurden die Schalen einmal mit kaltem 1x PBS gewaschen und anschließend mit 10 ml kaltem 1x PBS bedeckt. Mithilfe eines Stereobinokulars wurden nun einzelne Kolonien in jeweils ein U-förmiges Loch einer 96-Loch-Platte überführt, das 25 µl 1x Trypsin enthielt. Dazu wurde eine Pipette auf 40 µl eingestellt, die Pipettenspitze dicht an den Klon herangeführt und dann mit einer leichten Vorwärtsbewegung schnell aufgezogen. Das Bestücken der 96-Loch-Platte erfolgte innerhalb von 30 min., um eine Schädigung der Zellen durch das Trypsin zu vermeiden. Die fertig befüllte Platte wurde für 5 min. bei 37°C inkubiert und die Trypsinierung anschließend mit 100 µl ES-Medium gestoppt. Jedes Loch enthielt nun ein Gesamtvolumen von max. 165 µl (40 µl 1x PBS, 25 µl Trypsin, 100 µl ES-Medium). Nach gründlichem Resuspendieren wurden nun je 50 µl von dieser Platte auf drei neue 96-Loch-Platten (mit flachem Boden) gegeben, die vorher mit MMC-behandelten EF-Zellen bestückt worden waren.

4.4.10 Einfrieren und Passagieren der isolierten ES-Zellklone

Nach Kultivierung der isolierten ES-Zellklone für 2-3 Tage wurden zwei der drei 96-Loch-Platten an aufeinanderfolgenden Tagen eingefroren (*). Dazu wurden die Zellen einmal mit 200 µl 1x PBS gewaschen und anschließend bei 37°C mit 50 µl Trypsin behandelt. Die Reaktion wurde mit 50 µl 2x Einfriermedium (80% FKS, 20% DMSO) abgestoppt und die Zellen durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren vereinzelt. Die Platten wurden nun mit Parafilm abgedichtet und bei -80°C gelagert.

Um aus den Klonen DNA für die Southern Blot-Analyse isolieren zu können, wurde die verbliebene 96-Loch-Platte auf drei gelatinisierte 96-Loch-Platten aufgeteilt und solange weiter kultiviert, bis eine vollständige Konfluenz erreicht worden war. Hierbei wurde auf eine Schicht von MMC-behandelten EF-Zellen verzichtet, damit diese – durch zusätzliche Wildtyp-DNA - nicht die Ergebnisse des Southern Blots verfälschen können.

Klone, die bei der Analyse der 96-Loch-Platten als korrekt homolog rekombiniert identifiziert wurden, wurden von einer der beiden eingefrorenen 96-Loch-Platten

(siehe *) in ein Loch einer 24-Loch-Platte aufgetaut und dann über 6-Loch-Platten schließlich auf 10cm -Platten vermehrt. Danach wurden die Klone nochmal mit PCR und Southern Blot-Analyse bestätigt, um mögliche Fehler beim Auftauen von der 96-Loch-Platte auszuschließen.

4.4.11 HTNC-Behandlung von ES-Zellen

Um eine Cre-vermittelte Rekombination in Zellkultur durchführen zu können, wurde mit der zellpermeablen Variante HTN (His-TAT-NLS)-Cre verwendet. Die Zellpermeabilität wird in diesem Fusionsprotein durch ein basisches nukleäres Lokalisationssignal (NLS) und durch ein basisches TAT-Peptid aus dem HIV-Virus verursacht [Peitz et al., 2002].

Für die HTNC-Transduktion wurden je 1×10^5 ES-Zellen pro Loch einer 6-Loch-Platte auf EF-Zellen ausplattiert und für 4 Stunden im Brutschrank inkubiert. Währenddessen wurde eine $5 \mu\text{M}$ HTNC-Lösung in DMEM (ohne Zusätze)/PBS (1:1) angefertigt und sterilfiltriert. Nach einem einmaligen Waschschrift der Zellen mit 1x PBS, wurden je 1 ml der $5 \mu\text{M}$ HTNC-Lösung pro Loch zu den Zellen gegeben. Als Kontrolle diente die Zugabe der reinen DMEM/PBS-Lösung ohne HTNC. Zwanzig Stunden nach der Transduktion wurden die jeweiligen Lösungen abgesaugt, die Zellen zweimal mit 1x PBS gewaschen und anschließend 2 ml Kulturmedium bedeckt. Für weitere Analysen wurde ein Teil der Zellen ohne EF-Zellen weiterkultiviert, da die vorhandenen EF-Zellen das Ergebnis eines Southern Blots oder eine PCR beeinflussen könnten.

4.4.12 DNA-Isolation aus ES-Zellen

a) Isolation aus 6-Loch-Platten:

Zunächst wurden die Zellen zweimal mit 1x PBS gewaschen und danach für 5 min. mit $500 \mu\text{l}$ 1x Trypsin bei 37°C inkubiert. Die Trypsinierung wurde mit $700 \mu\text{l}$ ES-Medium abgestoppt, die Zellsuspension in 2 ml Reaktionsgefäße überführt und für 5 min. bei 4500 rpm zentrifugiert. Die Pellets wurden in je $600 \mu\text{l}$ DNA-Lysepuffer aufgenommen und über Nacht bei 56°C und 400 rpm inkubiert.

Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurden $600 \mu\text{l}$ Isopropanol hinzugegeben und vorsichtig geschwenkt bis die DNA ausfiel. Anschließend wurde die DNA durch eine

Zentrifugation für 30 min. bei 13000 rpm (4°C) pelletiert und anschließend mit Ethanol (70%) gewaschen. Das getrocknete Pellet wurde in einer geeigneten Menge RNase-haltigen TE-Puffers aufgenommen.

Lysepuffer zur DNA-Extraktion aus ES-Zellen:

10 mM Tris-HCl (pH 7,5); 10 mM EDTA; 10 mM NaCl; 0,5 % Lauroylsarcosine

Kurz vor Gebrauch wurde 1/25 Proteinase K (14-22 mg/ml) zu einer Endkonzentration von 0,5-0,8 mg/ml hinzugefügt.

b) Isolation aus 96-Loch-Platten:

Die Zellen wurden zweimal mit 1x PBS gewaschen. Anschließend wurden pro Loch 50 µl DNA-Lysepuffer zugegeben, die Platten mit Parafilm umwickelt und über Nacht bei 56°C in einer feuchten Kammer (Plastikdose mit nassen Papiertüchern) inkubiert.

Die auf Raumtemperatur abgekühlten Platten wurden mit je 200 µl 100% Ethanol versehen und 1 h bei Raumtemperatur inkubiert, währenddessen die DNA ausfiel.

Das Ethanol wurde vorsichtig abgeschüttet und die DNA durch Zugabe von 100 µl 70% Ethanols gewaschen. Die getrockneten DNA-Pellets wurden anschließend direkt mit 35 µl Restriktionsansatz versetzt, wieder mit Parafilm umwickelt und in einer feuchten Kammer über Nacht bei 37°C inkubiert.

Der Restriktionsansatz enthielt neben 100-200 Units des jeweiligen Enzyms und dem entsprechenden Puffer 0,3 mM DTT, Spermidin und RNase A sowie 0,1 mg/ml BSA.

4.4.13 Protein-Extraktion aus ES-Zellen

Zur Proteinisolation wurden die Zellen einer 6-Loch-Platten zunächst mit eiskaltem 1x PBS gewaschen. Anschließend wurden 200 µl Lysepuffer (siehe 4.3.3) pro Loch hinzugegeben, die Zellen mit einem Zellschaber vom Boden gelöst und in ein Reaktionsgefäß überführt. Nach 1 h im Überkopfschüttler bei 4°C wurde für 15 min. bei 13000 rpm (4°C) zentrifugiert und der Überstand bei -80°C eingefroren.

4.5 Fliegen

4.5.1 Anzucht und Haltung von *Drosophila melanogaster*

Die Anzucht und Haltung der Fliegen erfolgte in Plastikröhrchen, die mit einem Stopfen aus Schaumstopf verschlossen wurden. Die Röhrchen waren zu einem Drittel mit Futtermedium befüllt. Die Haltung der Stammlinien erfolgte bei 18°C, während experimentelle Kreuzungen bei 25°C durchgeführt wurden. Dabei wurden jungfräuliche Weibchen mit Männchen verschiedener Altersstufen in einem Verhältnis von 4:1 verpaart. Nach zwei Tagen wurden die Fliegen in ein neues Röhrchen umgesetzt. Die ersten Nachkommen der Kreuzung schlüpften nach 9-10 Tagen.

Herstellung des Futtermediums (für 20 Liter):

100 g Agar-Agar, 190 g Sojamehl, 336 g Trockenhefe, 900 g Malzextrakt, 800 g Rübensirup, 1424 g Maisschrot, 90 l Propionsäure und 30 g Napaginpulver

4.5.2 Verwendete Fliegenstämme

Der Fliegenstamm w^{118} (w^-) wurde als Wildtyp-Kontrolle verwendet.

Bezeichnung/Genotyp	Herkunft
w ; $lf/CyO^{wg-lacZ}$; MKRS/TM6b	Frank Sprenger, $CyO^{wg-lacZ}$: Kassis et al., 1992
w ; lf ;+/SM6a-TM6b	Thomas Klein
w ; $lf/CyO^{wg-lacZ}$; $hsGAL4$ /TM6b	Thomas Klein
$sdGAL4$	Thomas Klein
$ptcGAL4$ UAS-GFP	Wilder and Perrimon, 1995
$w[1]$; $Df(2R)Np5$, $ln(2LR)w45-32n$, $cn[1]/CyO$	Bloomington(#3591)
$w[1]$; $Df(2R)w45-30n$, $cn[1]/CyO$	Bloomington (#4966)
$Df(3L)ZN47$, $ry[506]/TM3$, $Sb[1]$	Bloomington (#3096)
$Df(3L)GN24/TM8$, $l(3)DTS4[1]$	Bloomington (#3686)
$Df(3R)Esp13/TM6C$, $cu[1]$ $Sb[1]$ $Tb[1]$ $ca[1]$	Bloomington (#5601)
$w[1118]$; $Df(3R)BSC140/TM6B$, $Tb[+]$	Bloomington (#9500)
w ; UAS- lgd^{15} ; C5-GAL4/SM6a-TM6b	Thomas Klein

Bezeichnung/Genotyp	Herkunft
<i>w</i> ; FRTG13 <i>shrub</i> ⁴⁻¹ ; + /SM6a-TM6b	Thomas Klein, FRTG13 <i>shrub</i> 4-1: Sweeney et al., 2006
<i>w</i> ; FRT82 <i>vps2</i> ^{PP6} /CyO; MKRS/TM6b	in dieser Arbeit hergestellt; FRT82 <i>vps2</i> ^{PP6} : Vaccari et al., 2009
<i>w</i> ; FRT42 <i>vps20</i> ³ ; CyO (twist-GFP)	Vaccari et al., 2009
<i>w</i> ; <i>Igd</i> ^{SH495} , FRTG13 <i>shrub</i> ⁴⁻¹ ; +/SM6a-TM6b	Rekombination von Aline Hoessler
<i>w</i> ; If/CyO ^{wg-lacZ} ; Gbe+Su(H)-GFP ^{1.0} /TM6b	Markus Schneider
<i>w</i> ; If/CyO ^{wg-lacZ} ; Gbe+Su(H)-lacZ/TM6b	Thomas Klein; Gbe+Su(H)-lacZ: Furriols and Bray, 2001
<i>w</i> ; <i>Igd</i> ^{d7} FRT40A;Gbe+Su(H)-GFP ^{1.0} /SM6a-TM6b	Aline Hoessler; <i>Igd</i> ^{d7} FRT40: Thomas Klein
<i>w</i> ; <i>Igd</i> ^{SH495} ; Gbe+Su(H)-GFP ^{1.0} /SM6a-TM6b	Aline Hoessler
UAS-Myc-ShrubΔcore	in dieser Arbeit hergestellt (siehe auch Tabellenunterschrift)
UAS-Myc-ShrubΔauto	in dieser Arbeit hergestellt (siehe auch Tabellenunterschrift)
UAS-Myc-Shrub	in dieser Arbeit hergestellt (siehe auch Tabellenunterschrift)
<i>w</i> ; UAS- <i>shrub-GFP</i> ; <i>hsGAL4</i> /TM6b	in dieser Arbeit hergestellt, UAS- <i>shrub-GFP</i> : Sweeney et al., 2006
<i>w</i> ; UAS- <i>Igd-HA</i> ; <i>hsGAL4</i> /TM6b	Robert Jaekel
<i>w</i> ; UAS- <i>Igd</i> ΔDM14(1-4) ^{9.4.2} -HA; <i>hsGAL4</i> /TM6b	in dieser Arbeit hergestellt, Deletionskonstrukt von Tobias Troost
<i>w</i> ; UAS- <i>Igd</i> ΔDM14(1-2) ^{1.2} -HA; <i>hsGAL4</i> /TM6b	in dieser Arbeit hergestellt, Deletionskonstrukt von Tobias Troost
<i>w</i> ; UAS- <i>Igd</i> ΔC ⁸ -HA; <i>hsGAL4</i> /TM6b	in dieser Arbeit hergestellt, Deletionskonstrukt von Tobias Troost
<i>w</i> ; UAS- <i>NES</i> <i>Igd</i> ΔC ²³ -HA; <i>hsGAL4</i> /TM6b	in dieser Arbeit hergestellt, Deletionskonstrukt von Tobias Troost

Tabelle 4.10: Verwendete Fliegenstämme

Bei den Myc-Shrub-Konstrukten gab es immer mehrere Insertionen auf den verschiedenen Chromosomen. Diese wurden mit dem Stamm *w*; If/CyO^{wg-lacZ}; MKRS/TM6b balanciert. Die Bloomington-Defizienzen stammen aus der Version von 2006.

4.5.3 Präparation und Antikörperfärbung von Flügelimaginalscheiben

Die Flügelimaginalscheiben wurden immer aus Larven des späten zweiten bis dritten Larvenstadiums präpariert, die das Futtermedium verließen und am Rand des Röhrchens wanderten. Zur Präparation wurden die Larven in ein mit PBS befülltes Dreierblockschälchen gegeben, in der Mitte zerrissen und die vordere Hälfte umgestülpt. Für die folgenden Schritte wurden die umgestülpten Larvenhälften in ein

Siebchen überführt, welches in einem Loch einer 24-Loch-Platte platziert wurde. Alle Schritte wurden zur besseren Durchmischung auf einem Taumler und – falls nicht anders erwähnt – bei Raumtemperatur durchgeführt.

- 30 min. Fixierung mit 4 % Paraformaldehyd
- 3x 10 min. waschen mit 0,3 % PBT
- 30 min. blocken 5 % NGS in 0,3 % PBT (oder über Nacht bei 4°C)
- 90 min. Inkubation mit dem primären Antikörper in 5 % NGS/0,3 % PBT
- 3x 15 min. waschen mit 0,3 % PBT
- 60 min. Inkubation mit dem sekundären Antikörper in 5 % NGS/0,3 % PBT
- 10 min. waschen mit 0,3 % PBT
- 4 min. Inkubation mit Hoechst (zur Kernfärbung)
- 2x 10 min. waschen mit 0,3 % PBT

Anschließend wurden die Imaginalscheiben in Dreierblockschälchen mit 1x PBS von den Larvenhälften abgetrennt und in einen Tropfen Vectashield gegeben. Die Imaginalscheiben wurden dann mit einem Deckgläschen abgedeckt und fotografiert. Die Präparate wurden bei 4°C im Dunkeln gelagert.

4.5.4 Herstellung transgener Fliegenlinien

Transgene Fliegenlinien wurden über die P-Element vermittelte Transformation von *Drosophila*-Embryonen hergestellt [Rubin and Sprading, 1982]. Ein in den pUAST-Vektor [Brand and Perrimon, 1993] kloniertes Transgen wurde dabei stabil ins Fliegen-genom integriert. Eine Mischung aus dem pUAST-Transgen-Plasmid (400 ng/μl) und dem Δ2-3-Transposase-Helferplasmid (100 ng/μl) wurde mit VE-H₂O hergestellt und das A260/A280-Verhältnis (DNA/RNA-Verhältnis) überprüft, welches oberhalb von 1,7-1,8 liegen sollte.

Injektionsverlauf:

- Embryonen aus bis zu 30 min. alten Ablagen dechorionisieren (1 min. mit einer Chlorix-Wasser-Mischung (1:1), 1 min. intensives Waschen mit Wasser)
- Aufreihung der Embryonen auf einem Block aus Apfelagar innerhalb von 15 min. unter Durchlicht zur besseren Abschätzung des Alters und Zustands der Embryonen

- Übertragung der Embryonen auf ein mit Heptan-Kleber bestrichenes Deckgläschen
- Trocknung der Embryonen im Exsikator auf Silikagel (7-11 min.)
- Monitierung des Deckgläschens auf einem Objektträger und Überschichtung mit 10S Voltalev-Öl
- Beladung der Injektionsnadel mit 0,7 µl Injektionsmischung und Injektion in den posterioren Pol der Embryonen mithilfe eine Mikroinjektionsvorrichtung
- Entfernung zu Alter Embryonen, die bereits eine Zellularisierung zeigen
- Überführung des Deckgläschens in eine Schale und Überschichtung mit 3S Voltalev-Öl
- Inkubation der injizierten Embryonen bei 25°C in einer feuchten Kammer über Nacht
- Aufsammeln der schlüpfenden Larven und Überführung in einer kleine Menge frischer Hefe in einem Futterröhrchen
-

Die geschlüpften Larven wurde gegen den Multibalancer-Stamm $w;lf/CyO^{wg-lacZ}; MKRS/TM6b$ ausgekreuzt und wenn möglich Linien auf dem ersten ($UAS-X;lf/CyO^{wg-lacZ}; MKRS/TM6b$), zweiten ($w;UAS-X/CyO^{wg-lacZ}; MKRS/TM6b$) und dritten Chromosom ($w;lf/CyO^{wg-lacZ}; UAS-X/TM6b$) etabliert.

4.6 Mäuse

4.6.1 Tierhaltung und verwendete Mausstämme

Die Maushaltung und -zucht erfolgte in der Tierhaltung der Universität zu Köln (Institut für Genetik) und in der Tierversuchsanlage (TVA) der medizinischen Einrichtungen der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

In dieser Arbeit wurde in Köln die transgene Mauslinie $mlgd2^{neoflox}$ hergestellt, aus welcher durch Verpaarung mit FLPe- [Rodriguez et al., 2000] bzw. Cre-Deleter-Mäusen [Schwenk et al., 1995] die Linien $mlgd2^{flox}$ und $mlgd2^{-}$ entstanden.

Die CB20-Ammen für den Blastozysten transfer, die C57BL/6 N, FLPe und Cre-Deleter Mäuse stammten aus der Tierhaltung der Universität zu Köln.

In Düsseldorf sollten die Tiere nach Überführung in die SPF-Haltung mittels

Embryotransfer zehn mal auf den C57BL/6 N Hintergrund zurückgekreuzt werden, um einen isogenen Hintergrund zu erhalten (zur Herstellung der transgenen Mäuse waren v6.5 ES-Zellen verwendet worden, siehe 4.1.8).

4.6.2 Genotypisierung von Mäusen mittels Schwanzspitzenbiopsie

Die Schwanzspitzen wurden über Nacht bei 56°C und 800 rpm in je 500 µl Lysepuffer (100 mM Tris-HCl, pH 8,5; 5 mM EDTA, pH 8,0; 0,2% SDS; 200 mM NaCl) inkubiert, wobei vorher Proteinase K zu einer Endkonzentration von 400 µg/ml zugegeben wurde. Nach Abkühlung für 30 min. bei 4°C wurden die Haarreste abzentrifugiert und der Überstand mit 500 µl Isopropanol zur Fällung der DNA gemischt. Nach einem Zentrifugationsschritt für 30 min. bei 13000 rpm wurde die DNA mit 70% Ethanol gewaschen. Nach 10 minütiger Zentrifugation für 10 min. bei Raumtemperatur und 13000 rpm wurde die DNA für 15 min. bei 37°C getrocknet. Zuletzt wurde das DNA-Pellet in einer geeigneten Menge TE+RNase A (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 10 µg/ml RNase A; pH 8,5) gelöst.

Zusammenfassung

Das Gen *lethal (2) giant discs* kodiert ein Protein, das im gesamten Tierreich hoch konserviert ist, und in *Drosophila melanogaster* einen negativen Regulator des Notch-Signalwegs darstellt. Hier führt der Ausfall von *lgd* zu einer Akkumulation des vollständigen Notch-Rezeptors und anderer Proteine in einem späten endosomalen Kompartiment in dem eine liganden-unabhängige Aktivierung des Notch-Rezeptors erfolgt. Dies weist darauf hin, dass Lgd am konstitutiven Abbau des nicht-aktivierten Notch-Rezeptors durch das Lysosom beteiligt sein könnte. Eine genaue Regulation des Notch-Signalweges ist in allen Metazoen während der Entwicklung, aber auch im adulten Organismus (in sich selbst-erneuernden Geweben) wichtig, da er an essentiellen Prozessen wie der Zellproliferation, Zelldifferenzierung und dem Zelltod beteiligt ist. Eine Überaktivierung dieses Signalwegs wird auch bei bestimmten Formen von Krebs z.B. Darmkrebs und T-Zell-Leukämie beobachtet.

In dieser Arbeit wurde die genaue Rolle von Lgd im endosomalen Transport des Notch-Rezeptors in *Drosophila melanogaster* und seine Funktion in der Maus untersucht. In *Drosophila melanogaster* konnte eine funktionale Beziehung zwischen Lgd und dem ESCRT-III-Protein Shrub durch genetische und biochemische Experimente gezeigt werden. Für diese Interaktion sind die DM14-Domänen von Lgd essentiell, womit diesem Domämentyp erstmal eine Funktion zugeschrieben werden konnte. Desweiteren wurden andere ESCRT-III-Proteine (Vps2A, Vps2B und Vps20) als mögliche weitere Interaktionspartner von Lgd identifiziert. Daher legt diese Arbeit nahe, dass Lgd den konstitutiven Transport des Notch-Rezeptors zum Lysosom über seine Interaktion mit Shrub und vermutlich weiteren ESCRT-III-Proteinen reguliert.

Zur Analyse der Lgd-Funktion in der Maus wurden ES-Zellen mit konditional inaktivierbaren *mlgd1*- bzw. *mlgd2*-Allelen hergestellt, die im Falle von *mlgd2* zu Generierung einer entsprechenden Mauslinie führten. Die systemische Inaktivierung des *mlgd2*-Gens (Knockout) war zwischen Tag E19.5 und den ersten zwölf Stunden nach der Geburt letal. Die kurze Überlebensdauer dieser Tiere deutet auf eine Störung von Prozessen hin, die für das Überleben des Neugeborenen außerhalb des Mutterleibs essentiell sind. Obwohl *mlgd1* und *mlgd2* in vielen Geweben exprimiert werden, zeigt der perinatale Tod der *mlgd2*-defizienten Maus, dass keine vollständige Redundanz zwischen dem *mlgd1*- und dem *mlgd2*-Gen vorliegt.

Summary

The gene *lethal (2) giant discs (lgd)* encodes a protein which is highly conserved among the animal kingdom and functions as a negative regulator of Notch signaling in *Drosophila melanogaster*. In *Drosophila*, loss of *lgd* causes the accumulation of the full-length Notch receptor and other proteins in a late endosomal compartment where the Notch receptor becomes activated in a ligand-independent manner. This suggests that *lgd* is involved in the constitutive lysosomal degradation of the non-activated Notch receptor. The Notch pathway regulates fundamental processes like cell proliferation, cell differentiation and cell death in all metazoa. Therefore this pathway is not only required during development but also in self-renewing organs in the adult organism. Overactivation of this pathway is associated with different types of cancer like colorectal cancer and T-cell-leukemia.

This thesis analyzed the precise function of Lgd in the endosomal transport of the Notch receptor in *Drosophila* and its function in mice. In *Drosophila* this work revealed a functional relationship between Lgd and the ESCRT-III-component Shrub through biochemical and genetic experiments. The DM14-domains with previously unknown function are essential for this interaction, where the C2 domain is dispensable. Also other ESCRT-III-proteins (Vps2A, Vps2B and Vps20) were identified as potential interaction partners of Lgd. Therefore this study suggests that Lgd regulates the constitutive trafficking of the Notch receptor to the lysosome probably through its interaction with Shrub and also other ESCRT-III-proteins.

For the analysis of *lgd* function in mice, conditional knockout alleles for the two murine orthologues *mlgd1* and *mlgd2* were generated and a conditional *mlgd2* mouse line was established. Homozygous knockout of *mlgd2* was lethal between E19.5 and 12 hours after birth. The short life time after birth suggests that processes are disturbed in these mice, which are essential for survival of the newborn. Although *mlgd1* and *mlgd2* could be shown to be expressed in a variety of tissues, the perinatal death of the *mlgd2*-knockout mice shows that there is no full functional redundancy between *mlgd1* and *mlgd2*.

Literaturverzeichnis

- Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ (1999); *Science*, 284 :770--776. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development.
- Babst M, Wendland B, Estepa EJ, Emr SD (1998); *EMBO J*, 17 :2982--2993. The Vps4p AAA ATPase regulates membrane association of a Vps protein complex required for normal endosome function.
- Babst M, Katzmann DJ, Estepa-Sabal EJ, Meerloo T, Emr SD (2002); *Dev Cell*, 3 :271--282. Escrt-III: an endosome-associated heterooligomeric protein complex required for mvb sorting.
- Babst M (2004); *Nat Cell Biol*, 6 :175--177. GGAing ubiquitin to the endosome.
- Bailey AM, Posakony JW (1995); *Genes Dev*, 9 :2609--2622. Suppressor of hairless directly activates transcription of enhancer of split complex genes in response to Notch receptor activity.
- Bang AG, Hartenstein V, Posakony JW (1991); *Development*, 111 :89--104. Hairless is required for the development of adult sensory organ precursor cells in *Drosophila*.
- Basel-Vanagaite L, Attia R, Yahav M, Ferland RJ, Anteki L, Walsh CA, Olender T, Straussberg R, Magal N, Taub E, Drasinover V, Alkelai A, Bercovich D, Rechavi G, Simon AJ, Shohat M (2006); *J Med Genet*, 43 :203--210. The CC2D1A, a member of a new gene family with C2 domains, is involved in autosomal recessive non-syndromic mental retardation.
- Bergamini E, Cavallini G, Donati A, Gori Z (2004); *Int J Biochem Cell Biol*, 36 :2392--2404. The role of macroautophagy in the ageing process, anti-ageing intervention and age-associated diseases.
- Bishop SA, Klein T, Arias AM, Couso JP (1999); *Development*, 126 :2993--3003. Composite signalling from Serrate and Delta establishes leg segments in *Drosophila* through Notch.
- Blaumueller CM, Qi H, Zagouras P, Artavanis-Tsakonas S (1997); *Cell*, 90 :281--291. Intracellular cleavage of Notch leads to a heterodimeric receptor on the plasma membrane.
- Böcke, A (2007); Diplomarbeit, Universität zu Köln. Die Lokalisation von Notch im endosomalen Transportweg und Proteininteraktionspartner des Tumorsuppressors Lethal (2) giant discs.
- Brand AH, Perrimon N (1993); *Development*, 118 :401--415. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes.
- Brou C, Logeat F, Gupta N, Bessia C, LeBail O, Doedens JR, Cumano A, Roux P, Black RA, Israël A (2000); *Mol Cell*, 5 :207--216. A novel proteolytic cleavage involved in Notch signaling: the role of the disintegrin-metalloprotease TACE.
- Bryant PJ, Schubiger G (1971); *Dev Biol*. 24: 233--263. Giant and duplicated imaginal discs in a new lethal mutant of *Drosophila melanogaster*.
- Bryant PJ (1975); *J Exp Zool*, 193 :49--77. Pattern formation in the imaginal wing disc of *Drosophila melanogaster*: fate map, regeneration and duplication.
- Bulman MP, Kusumi K, Frayling TM, McKeown C, Garrett C, Lander ES, Krumlauf R, Hattersley AT, Ellard S, Turnpenny PD (2000); *Nat Genet*, 24 :438--441. Mutations in the human delta homologue, DLL3, cause axial skeletal defects in spondylocostal dysostosis.
- Buratovich MA, Bryant PJ (1995); *Dev Biol*, 168 :452--463. Duplication of l(2)gd imaginal discs in *Drosophila* is mediated by ectopic expression of wg and dpp.
- Burd CG and Emr SD (1998); *Mol Cell*, 2 :157--162. Phosphatidylinositol(3)-phosphate signaling mediated by specific binding to RING FYVE domains.
- Carlton JG, Martin-Serrano J (2007); *Science*, 316 :1908--1912. Parallels between cytokinesis and retroviral budding: a role for the ESCRT machinery.
- Chang HC, Hull M, Mellman I (2004); *J Cell Biol*. 164 :1055--1064. The J-domain protein Rme-8 interacts with Hsc70 to control clathrin-dependent endocytosis in *Drosophila*.
- Chen MS, Obar RA, Schroeder CC, Austin TW, Poodry CA, Wadsworth SC, Vallee RB (1991); *Nature*, 351 :583--586. Multiple forms of dynamin are encoded by shibire, a *Drosophila* gene involved in endocytosis.
- Conlon RA, Reaume AG, Rossant J (1995); *Development*, 121 :1533--1545. Notch1 is required for the coordinate segmentation of somites.
- Couso JP, Knust E, Martinez Arias A (1995); *Curr Biol*, 5 :1437--1448. Serrate and wingless cooperate to induce vestigial gene expression and wing formation in *Drosophila*.
- Cuervo AM, Dice JF (2000); *Exp Gerontol*, 35 :119--131. When lysosomes get old.
- de Celis JF, Bray SJ (2000); *Development*, 127 :1291--1302. The Abruptex domain of Notch regulates negative interactions between Notch, its ligands and Fringe.

- Di Fiore PP, De Camilli P (2001); *Cell*, 106 :1--4. Endocytosis and signaling. an inseparable partnership.
- Diaz-Benjumea FJ, Cohen SM (1995); *Development*, 121 :4215--4225. Serrate signals through Notch to establish a Wingless-dependent organizer at the dorsal/ventral compartment boundary of the *Drosophila* wing.
- Dierssen M, Ramakers GJ (2006); *Genes Brain Behav*, 5 Suppl 2 :48--60. Dendritic pathology in mental retardation: from molecular genetics to neurobiology.
- Doherty GJ, McMahon HT (2009); *Annu Rev Biochem*, 78 :857--902. Mechanisms of endocytosis.
- Duarte A, Hirashima M, Benedito R, Trindade A, Diniz P, Bekman E, Costa L, Henrique D, Rossant J (2004); *Genes Dev*, 18 :2474--2478. Dosage-sensitive requirement for mouse Dll4 in artery development.
- Dunn KW, Maxfield FR (1992); *J Cell Biol*, 117 :301--310. Delivery of ligands from sorting endosomes to late endosomes occurs by maturation of sorting endosomes.
- Eggan K, Akutsu H, Loring J, Jackson-Grusby L, Klemm M, Rideout WM 3rd, Yanagimachi R, Jaenisch R (2001); *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98 :6209--6214. Hybrid vigor, fetal overgrowth, and viability of mice derived by nuclear cloning and tetraploid embryo complementation.
- Ehebauer M, Hayward P, Martinez Arias A (2006); *Science*, 314 :1414--1415. Notch, a universal arbiter of cell fate decisions.
- Ellisen LW, Bird J, West DC, Soreng AL, Reynolds TC, Smith SD, Sklar J (1991); *Cell*, 66 :649--661. TAN-1, the human homolog of the *Drosophila* notch gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms.
- Falcon-Perez JM, Nazarian R, Sabatti C, Dell'Angelica EC (2005); *J Cell Sci*, 118 :5243--5255. Distribution and dynamics of Lamp1-containing endocytic organelles in fibroblasts deficient in BLOC-3.
- Filimonenko M, Stuffers S, Raiborg C, Yamamoto A, Malerød L, Fisher EM, Isaacs A, Brech A, Stenmark H, Simonsen A (2007); *J Cell Biol*, 179 :485--500. Functional multivesicular bodies are required for autophagic clearance of protein aggregates associated with neurodegenerative disease.
- Fisher RD, Chung HY, Zhai Q, Robinson H, Sundquist WI, Hill CP (2007); *Cell*, 128 :841--852. Structural and biochemical studies of ALIX/AIP1 and its role in retrovirus budding.
- Fleming RJ, (1998); *Semin Cell Dev Biol*, 9 :599--607. Structural conservation of Notch receptors and ligands.
- Fortini E (2002); *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3 :673--684. Gamma-secretase-mediated proteolysis in cell-surface-receptor signalling.
- Fre S, Huyghe M, Mourikis P, Robine S, Louvard D, Artavanis-Tsakonas S (2005); *Nature*, 435 :964--968. Notch signals control the fate of immature progenitor cells in the intestine.
- Fujikawa K, Satoh AK, Kawamura S, Ozaki K (2002); *Zoolog Sci*. 19 :981--993. Molecular and functional characterization of a unique Rab protein, RABRP1, containing the WDIAGQE sequence in a GTPase motif.
- Furriols M, Bray S (2001); *Curr Biol*, 11 :60--64. A model Notch response element detects Suppressor of Hairless-dependent molecular switch.
- Gale NW, Dominguez MG, Noguera I, Pan L, Hughes V, Valenzuela DM, Murphy AJ, Adams NC, Lin HC, Holash J, Thurston G, Yancopoulos GD (2004); *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101 :15949--15954. Haploinsufficiency of delta-like 4 ligand results in embryonic lethality due to major defects in arterial and vascular development.
- Gallagher CM, Knoblich JA (2006); *Dev Cell*, 11 :641--653. The conserved c2 domain protein lethal (2) giant discs regulates protein trafficking in *Drosophila*.
- Gao FB, Brenman JE, Jan LY, Jan YN (1999); *Genes Dev*, 13 :2549--2561. Genes regulating dendritic outgrowth, branching, and routing in *Drosophila*.
- Garrus JE, von Schwedler UK, Pornillos OW, Morham SG, Zavitz KH, Wang HE, Wettstein DA, Stray KM, Côté M, Rich RL, Myszka DG, Sundquist WI (2001); *Cell*, 107 :55--65. Tsg101 and the vacuolar protein sorting pathway are essential for HIV-1 budding.
- Gill DJ, Teo H, Sun J, Perisic O, Veprintsev DB, Emr SD, Williams RL (2007); *EMBO J*, 26 :600--612. Structural insight into the ESCRT-II link and its role in MVB trafficking.
- Gillooly DJ, Morrow IC, Lindsay M, Gould R, Bryant NJ, Gaullier JM, Parton RG, Stenmark H (2000); *EMBO J*, 19 :4577--4588. Localization of phosphatidylinositol 3-phosphate in yeast and mammalian cells.
- Girard M, Poupon V, Blondeau F, McPherson PS (2005); *J Biol Chem*. 280 :40135--40143. The DnaJ-

- domain protein RME-8 functions in endosomal trafficking.
- Gruenberg J (2001); *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2 :721--730. The endocytic pathway: a mosaic of domains.
- Gupta-Rossi N, Six E, LeBail O, Logeat F, Chastagner P, Olry A, Israël A, Brou C (2004); *J Cell Biol*, 166 :73--83. Monoubiquitination and endocytosis direct gamma-secretase cleavage of activated Notch receptor.
- Gustafson K, Boulianne GL (1996); *Genome*, 39 :174--182. Distinct expression patterns detected within individual tissues by the GAL4 enhancer trap technique.
- Hadjighassem MR, Austin MC, Szewczyk B, Daigle M, Stockmeier CA, Albert PR (2009); Mahmoud R Hadjighassem and Mark C Austin and Bernadeta Szewczyk and Mireille Daigle and Craig A Stockmeier and Paul R Albert, *Biol Psychiatry*, 66 :214--222. Human Freud-2/CC2D1B: a novel repressor of postsynaptic serotonin-1A receptor expression.
- Haglund K, Di Fiore PP, Dikic I (2003); *Trends Biochem Sci*, 28 :598--603. Distinct monoubiquitin signals in receptor endocytosis.
- Hamada Y, Kadokawa Y, Okabe M, Ikawa M, Coleman JR, Tsujimoto Y (1999); *Development*, 126 : 3415--3424. Mutation in ankyrin repeats of the mouse Notch2 gene induces early embryonic lethality.
- Hartmann D, de Strooper B, Serneels L, Craessaerts K, Herreman A, Annaert W, Umans L, Lübke T, Lena Illert A, von Figura K, Saftig P (2002); *Hum Mol Genet*, 11 :2615--2624. The disintegrin/metalloprotease ADAM 10 is essential for Notch signalling but not for alpha-secretase activity in fibroblasts.
- Heitzler P, Bourouis M, Ruel L, Carteret C, Simpson P (1996); *Development*, 122 :161--171. 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*.
- Hicke L (2001); *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2 :195--201. Protein regulation by monoubiquitin.
- Hierro A, Sun J, Rusnak AS, Kim J, Prag G, Emr SD, Hurley JH (2004); *Nature*, 431 :221--225. Structure of the ESCRT-II endosomal trafficking complex.
- Hirano S, Kawasaki M, Ura H, Kato R, Raiborg C, Stenmark H, Wakatsuki S (2006); *Nat Struct Mol Biol*, 13 :272--277. Double-sided ubiquitin binding of Hrs-UIM in endosomal protein sorting.
- Hoessler, A (2009); Bachelor-Arbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Untersuchungen zur funktionellen Beziehung zwischen den *Drosophila*-Genen lethal (2) giant discs und shrub.
- Hrabě de Angelis M, McIntyre J 2nd, Gossler A (1997); *Nature*, 386 :717--721. Maintenance of somite borders in mice requires the Delta homologue Dll1.
- Irion U, St Johnston D (2007); *Nature*, 445 :554--558. bicoid RNA localization requires specific binding of an endosomal sorting complex.
- Jaekel R (2006); Dissertation, Universität zu Köln. Regulation des Notch-Signalweges durch Lethal (2) giant discs (Lgd) und durch die Notch-Liganden.
- Jaekel R, Klein T (2006); *Dev Cell*, 11 :655--669. The *Drosophila* Notch inhibitor and tumor suppressor gene lethal (2) giant discs encodes a conserved regulator of endosomal trafficking.
- Jékely G, Rørth P (2003); *EMBO Rep*, 4 :1163--1168. Hrs mediates downregulation of multiple signalling receptors in *Drosophila*.
- Jensen J, Pedersen EE, Galante P, Hald J, Heller RS, Ishibashi M, Kageyama R, Guillemot F, Serup P, Madsen OD (2000); *Nat Genet*, 24 :36--44. Control of endodermal endocrine development by Hes-1.
- Joutel A, Corpechot C, Ducros A, Vahedi K, Chabriat H, Mouton P, Alamowitch S, Domenga V, Cécillion M, Marechal E, Maciazek J, Vayssiere C, Cruaud C, Cabanis EA, Ruchoux MM, Weissenbach J, Bach JF, Bousser MG, Tournier-Lasserre E (1996); *Nature*, 383 :707--710. Notch3 mutations in CADASIL, a hereditary adult-onset condition causing stroke and dementia.
- Kageyama R, Ohtsuka T, Tomita K (2000); *Mol Cells*, 10 :1--7. The bHLH gene Hes1 regulates differentiation of multiple cell types.
- Kao HY, Ordentlich P, Koyano-Nakagawa N, Tang Z, Downes M, Kintner CR, Evans RM, Kadesch T (1998); *Genes Dev*, 12 :2269--2277. A histone deacetylase corepressor complex regulates the Notch signal transduction pathway.
- Kassis JA, Noll E, VanSickle EP, Odenwald WF, Perrimon N (1992); *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89 : 1919--1923. Altering the insertional specificity of a *Drosophila* transposable element.
- Katzmann DJ, Babst M, Emr SD (2001); *Cell*, 106 :145--155. Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-I.

- 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 LM, 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 MF, Brownstein MJ, Bult C, Fletcher C, Fujita M, Gariboldi M, Gustincich S, Hill D, Hofmann M, Hume DA, Kamiya M, Lee NH, Lyons P, Marchionni L, Mashima J, Mazzarelli J, Mombaerts P, Nordone P, Ring B, Ringwald M, Rodriguez I, Sakamoto N, Sasaki H, Sato K, Schönbach C, Seya T, Shibata Y, Storch KF, Suzuki H, Toyo-oka K, Wang KH, Weitz C, Whittaker C, Wilming L, Wynshaw-Boris A, Yoshida K, Hasegawa Y, Kawaji H, Kohtsuki S, Hayashizaki Y; RIKEN Genome Exploration Research Group Phase II Team and the FANTOM Consortium (2001); *Nature* 409, 685–690. Functional annotation of a full-length mouse cDNA collection.
- Kim J, Irvine KD, Carroll SB (1995); *Cell*, 82 :795–802. Cell recognition, signal induction, and symmetrical gene activation at the dorsal-ventral boundary of the developing *Drosophila* wing.
- Klein T, Couso JP, Martinez Arias A (1998); *Curr Biol*, 8 :417–420. Wing development and specification of dorsal cell fates in the absence of apterous in *Drosophila*.
- Klein T (2003); *Dev Biol*, 255 :313–333. The tumour suppressor gene *l(2)giant discs* is required to restrict the activity of Notch to the dorsoventral boundary during *Drosophila* wing development.
- Komada M, Soriano P (1999); *Genes Dev*, 13 :1475–1485. Hrs, a FYVE finger protein localized to early endosomes, is implicated in vesicular traffic and required for ventral folding morphogenesis.
- Komatsu M, Waguri S, Ueno T, Iwata J, Murata S, Tanida I, Ezaki J, Mizushima N, Ohsumi Y, Uchiyama Y, Kominami E, Tanaka K, Chiba T (2005); *J Cell Biol*, 169 :425–434. Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in *Atg7*-deficient mice.
- Kornfeld S, Mellman I (1989); *Annu Rev Cell Biol*, 5 :483–525. The biogenesis of lysosomes.
- Krebs LT, Xue Y, Norton CR, Shutter JR, Maguire M, Sundberg JP, Gallahan D, Closson V, Kitajewski J, Callahan R, Smith GH, Stark KL, Gridley T (2000); *Genes Dev*, 14 :1343–1352. Notch signaling is essential for vascular morphogenesis in mice.
- Krebs LT, Xue Y, Norton CR, Sundberg JP, Beatus P, Lendahl U, Joutel A, Gridley T (2003); *Genesis*, 37 :139–143. Characterization of Notch3-deficient mice: normal embryonic development and absence of genetic interactions with a Notch1 mutation.
- Krempler A, Henry MD, Triplett AA, Wagner KU (2002); *J Biol Chem*, 277 :43216–43223. Targeted deletion of the *Tsg101* gene results in cell cycle arrest at G1/S and p53-independent cell death.
- Kuma A, Hatano M, Matsui M, Yamamoto A, Nakaya H, Yoshimori T, Ohsumi Y, Tokuhisa T, Mizushima N (2004); *Nature*, 432 :1032–1036. The role of autophagy during the early neonatal starvation period.
- Lafourcade C, Sobo K, Kieffer-Jaquinod S, Garin J, van der Goot FG (2008); *PLoS One*, 3 :e2758. Regulation of the V-ATPase along the endocytic pathway occurs through reversible subunit association and membrane localization.
- Lai EC (2004); *Development*, 131 :965–973. Notch signaling: control of cell communication and cell fate.
- Lanzetti L, Di Fiore PP (2008); *Traffic*, 9 :2011–2021. Endocytosis and cancer: an 'insider' network with dangerous liaisons.
- Le Borgne R, Bardin A, Schweisguth F (2005b); *Development*, 132 :1751–1762. The roles of receptor and ligand endocytosis in regulating Notch signaling.
- Lecourtois M, Schweisguth F (1995); *Genes Dev*, 9 :2598–2608. The neurogenic suppressor of hairless DNA-binding protein mediates the transcriptional activation of the enhancer of split complex genes triggered by Notch signaling.
- Lee JA, Beigneux A, Ahmad ST, Young SG, Gao FB (2007); *Curr Biol*, 17 :1561–1567. ESCRT-III dysfunction causes autophagosome accumulation and neurodegeneration.
- Lee JA, Liu L, Gao FB (2009); *Autophagy*, 5 :1070–1072. Autophagy defects contribute to neurodegeneration induced by dysfunctional ESCRT-III.
- Lemmon SK, Traub LM (2000); *Curr Opin Cell Biol*, 12 :457–466. Sorting in the endosomal system in

- yeast and animal cells.
- Levine B, Klionsky DJ (2004); *Dev Cell*, 6 :463--477. Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy.
- Li J, Belogortseva N, Porter D, Park M. (2008); *Cell Cycle*, 7 :2886--2893. Chmp1A functions as a novel tumor suppressor gene in human embryonic kidney and ductal pancreatic tumor cells.
- Li L, Cohen SN (1996); *Cell*, 85 :319--329. Tsg101: a novel tumor susceptibility gene isolated by controlled homozygous functional knockout of allelic loci in mammalian cells.
- Li L, Krantz ID, Deng Y, Genin A, Banta AB, Collins CC, Qi M, Trask BJ, Kuo WL, Cochran J, Costa T, Pierpont ME, Rand EB, Piccoli DA, Hood L, Spinner NB (1997); *Nat Genet*, 16 :243--251. Alagille syndrome is caused by mutations in human Jagged1, which encodes a ligand for Notch1.
- Lieber T, Kidd S, Young MW (2002); *Genes Dev*, 16 :209--221. kuzbanian-mediated cleavage of *Drosophila* Notch.
- Lin Y, Kimpler LA, Naismith TV, Lauer JM, Hanson PI (2005); *J Biol Chem*, 280 :12799--12809. Interaction of the mammalian endosomal sorting complex required for transport (ESCRT) III protein hSnf7-1 with itself, membranes, and the AAA+ ATPase SKD1.
- Liu RT, Huang CC, You HL, Chou FF, Hu CC, Chao FP, Chen CM, Cheng JT (2002); *Oncogene*, 21 :4830--4837. Overexpression of tumor susceptibility gene TSG101 in human papillary thyroid carcinomas.
- Lloyd et al., 2002; Thomas E Lloyd and Richard Atkinson and Mark N Wu and Yi Zhou and Giuseppa Pennetta and Hugo J Bellen, *Cell*, 108 :261--269. Hrs regulates endosome membrane invagination and tyrosine kinase receptor signaling in *Drosophila*.
- Logeat F, Bessia C, Brou C, LeBail O, Jarriault S, Seidah NG, Israël A (1998); *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95 :8108--8112. The Notch1 receptor is cleaved constitutively by a furin-like convertase.
- Louvi A, Artavanis-Tsakonas S (2006); *Nat Rev Neurosci*, 7 :93--102. Notch signalling in vertebrate neural development.
- Lu H, Bilder D (2005); *Nat Cell Biol*, 7 :1232--1239. Endocytic control of epithelial polarity and proliferation in *Drosophila*.
- Luhtala N, Odorizzi G (2004); *J Cell Biol*, 166 :717--729. Bro1 coordinates deubiquitination in the multivesicular body pathway by recruiting Doa4 to endosomes.
- Luzio JP, Rous BA, Bright NA, Pryor PR, Mullock BM, Piper RC (2000); *J Cell Sci*, 113 (Pt 9) :1515--1524. Lysosome-endosome fusion and lysosome biogenesis.
- Matsuda A, Suzuki Y, Honda G, Muramatsu S, Matsuzaki O, Nagano Y, Doi T, Shimotohno K, Harada T, Nishida E, Hayashi H, Sugano S (2003); *Oncogene*, 22 :3307--3318. Large-scale identification and characterization of human genes that activate NF-kappaB and MAPK signaling pathways.
- Matsuo H, Chevallier J, Mayran N, Le Blanc I, Ferguson C, Fauré J, Blanc NS, Matile S, Dubochet J, Sadoul R, Parton RG, Vilbois F, Gruenberg J (2004); *Science*, 303 :531--534. Role of LBPA and Alix in multivesicular liposome formation and endosome organization.
- McCullough J, Row PE, Lorenzo O, Doherty M, Beynon R, Clague MJ, Urbé S, (2006); *Curr Biol*, 16 :160--165. Activation of the endosome-associated ubiquitin isopeptidase AMSH by STAM, a component of the multivesicular body-sorting machinery.
- Meier ID, Bernreuther C, Tilling T, Neidhardt J, Wong YW, Schulze C, Streichert T, Schachner M (2010); *FASEB J*, 24 :1714--1724. Short DNA sequences inserted for gene targeting can accidentally interfere with off-target gene expression.
- Mellman I, Fuchs R, Helenius A (1986); *Annu Rev Biochem*, 55 :663--700. Acidification of the endocytic and exocytic pathways.
- Mellman I (1992); *J Exp Biol*, 172 :39--45. The importance of being acid: the role of acidification in intracellular membrane traffic.
- Mellman I (1996); *Annu Rev Cell Dev Biol*, 12 :575--625. Endocytosis and molecular sorting.
- Micchelli CA, Rulifson EJ, Blair SS (1997); *Development*, 124 :1485--1495. The function and regulation of cut expression on the wing margin of *Drosophila*: Notch, Wingless and a dominant negative role for Delta and Serrate.
- Moberg KH, Schelble S, Burdick SK, Hariharan IK (2005); *Dev Cell*, 9 :699--710. Mutations in erupted, the *Drosophila* ortholog of mammalian tumor susceptibility gene 101, elicit non-cell-autonomous overgrowth.
- Morita E, Sandrin V, Chung HY, Morham SG, Gygi SP, Rodesch CK, Sundquist WI (2007); *EMBO J*, 26 :4215--4227. Human ESCRT and ALIX proteins interact with proteins of the midbody and

- function in cytokinesis.
- Mousavi SA, Malerød L, Berg T, Kjekken R (2004); *Biochem J*, 377 :1--16. Clathrin-dependent endocytosis.
- Mu FT, Callaghan JM, Steele-Mortimer O, Stenmark H, Parton RG, Campbell PL, McCluskey J, Yeo JP, Tock EP, Toh BH (1995); *J Biol Chem*, 270 :13503--13511. EEA1, an early endosome-associated protein. EEA1 is a conserved alpha-helical peripheral membrane protein flanked by cysteine "fingers" and contains a calmodulin-binding IQ motif.
- Mumm JS, Schroeter EH, Saxena MT, Griesemer A, Tian X, Pan DJ, Ray WJ, Kopan R (2000); *Mol Cell*, 5 :197--206. A ligand-induced extracellular cleavage regulates gamma-secretase-like proteolytic activation of Notch1.
- Muziol T, Pineda-Molina E, Ravelli RB, Zamborlini A, Usami Y, Göttlinger H, Weissenhorn W (2006); *Dev Cell*, 10 :821--830. Structural basis for budding by the ESCRT-III factor CHMP3.
- Nakamura A, Naito M, Tsuruo T, Fujita N (2008); *Mol Cell Biol*, 28 :5996--6009. Freud-1/Aki1, a novel PDK1-interacting protein, functions as a scaffold to activate the PDK1/Akt pathway in epidermal growth factor signaling.
- Nakamura A, Arai H, Fujita N (2009); *J Cell Biol*, 187 :607--614. Centrosomal Aki1 and cohesin function in separase-regulated centriole disengagement.
- Nakamura A, Naito M, Arai H, Fujita N (2010); *Biochem Biophys Res Commun*. 393 :872--876. Mitotic phosphorylation of Aki1 at Ser208 by cyclin B1-Cdk1 complex.
- Nalefski EA, Falke JJ (1996); *Protein Sci*, 5 :2375--2390. The C2 domain calcium-binding motif: structural and functional diversity.
- Nara A, Mizushima N, Yamamoto A, Kabeya Y, Ohsumi Y, Yoshimori T (2002); *Cell Struct Funct*, 27 :29--37. SKD1 AAA ATPase-dependent endosomal transport is involved in autolysosome formation.
- Neumann CJ, Cohen SM (1996); *Development*, 122 :3477--3485. A hierarchy of cross-regulation involving Notch, wingless, vestigial and cut organizes the dorsal/ventral axis of the *Drosophila* wing.
- Nichols JT, Miyamoto A, Olsen SL, D'Souza B, Yao C, Weinmaster G (2007); *J Cell Biol*, 176 :445--458. DSL ligand endocytosis physically dissociates Notch1 heterodimers before activating proteolysis can occur.
- Nickerson DP, West M, Odorizzi G (2006); *J Cell Biol*, 175 :715--720. Did2 coordinates Vps4-mediated dissociation of ESCRT-III from endosomes.
- Nickerson DP, Russell MR, Odorizzi G (2007); *EMBO Rep*, 8 :644--650. A concentric circle model of multivesicular body cargo sorting.
- Nicolas M, Wolfer A, Raj K, Kummer JA, Mill P, van Noort M, Hui CC, Clevers H, Dotto GP, Radtke F (2003); *Nat Genet*, 33 :416--421. Notch1 functions as a tumor suppressor in mouse skin.
- Nixon RA (2006); *Trends Neurosci*, 29 :528--535. Autophagy in neurodegenerative disease: friend, foe or turncoat?
- Nixon RA, Wegiel J, Kumar A, Yu WH, Peterhoff C, Cataldo A, Cuervo AM (2005); *J Neuropathol Exp Neurol*, 64 :113--122. Extensive involvement of autophagy in Alzheimer disease: an immunoelectron microscopy study.
- Noguera-Troise I, Daly C, Papadopoulos NJ, Coetzee S, Boland P, Gale NW, Lin HC, Yancopoulos GD, Thurston G (2006); *Nature*, 444 :1032--1037. Blockade of Dll4 inhibits tumour growth by promoting non-productive angiogenesis.
- Oda T, Elkahoul AG, Pike BL, Okajima K, Krantz ID, Genin A, Piccoli DA, Meltzer PS, Spinner NB, Collins FS, Chandrasekharappa SC (1997); *Nat Genet*, 16 :235--242. Mutations in the human Jagged1 gene are responsible for Alagille syndrome.
- Odorizzi G, Babst M, Emr SD (1998); *Cell*, 95 :847--858. Fab1p PtdIns(3)P 5-kinase function essential for protein sorting in the multivesicular body.
- Odorizzi G, Katzmann DJ, Babst M, Audhya A, Emr SD (2003); *J Cell Sci*, 116 :1893--1903. Bro1 is an endosome-associated protein that functions in the MVB pathway in *Saccharomyces cerevisiae*.
- Oh KB, Stanton MJ, West WW, Todd GL, Wagner KU (2007); *Oncogene*, 26 :5950--5959. Tsg101 is upregulated in a subset of invasive human breast cancers and its targeted overexpression in transgenic mice reveals weak oncogenic properties for mammary cancer initiation.
- 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, Schönbach C, Gojobori T, Baldarelli R, Hill DP, Bult C, Hume DA, Quackenbush J, Schriml LM, Kanapin A, Matsuda

- H, Batalov S, Beisel KW, Blake JA, Bradt D, Brusica V, Chothia C, Corbani LE, Cousins S, Dalla E, Dragani TA, Fletcher CF, Forrest A, Frazer KS, Gaasterland T, Gariboldi M, Gissi C, Godzik A, Gough J, Grimmond S, Gustincich S, Hirokawa N, Jackson IJ, Jarvis ED, Kanai A, Kawaji H, Kawasaki Y, Kedzierski RM, King BL, Konagaya A, Kurochkin IV, Lee Y, Lenhard B, Lyons PA, Maglott DR, Maltais L, Marchionni L, McKenzie L, Miki H, Nagashima T, Numata K, Okido T, Pavan WJ, Perteza G, Pesole G, Petrovsky N, Pillai R, Pontius JU, Qi D, Ramachandran S, Ravasi T, Reed JC, Reed DJ, Reid J, Ring BZ, Ringwald M, Sandelin A, Schneider C, Semple CA, Setou M, Shimada K, Sultana R, Takenaka Y, Taylor MS, Teasdale RD, Tomita M, Verardo R, Wagner L, Wahlestedt C, Wang Y, Watanabe Y, Wells C, Wilming LG, Wynshaw-Boris A, Yanagisawa M, Yang I, Yang L, Yuan Z, Zavolan M, Zhu Y, Zimmer A, Carninci P, Hayatsu N, Hirozane-Kishikawa T, Konno H, Nakamura M, Sakazume N, Sato K, Shiraki T, Waki K, Kawai J, Aizawa K, Arakawa T, Fukuda S, Hara A, Hashizume W, Imotani K, Ishii Y, Itoh M, Kagawa I, Miyazaki A, Sakai K, Sasaki D, Shibata K, Shinagawa A, Yasunishi A, Yoshino M, Waterston R, Lander ES, Rogers J, Birney E, Hayashizaki Y; FANTOM Consortium; RIKEN Genome Exploration Research Group Phase I & II Team (2002); *Nature* 420 :563--573. Analysis of the mouse transcriptome based on functional annotation of 60,770 full-length cDNAs.
- Ou XM, Lemonde S, Jafar-Nejad H, Bown CD, Goto A, Rogaeva A, Albert PR (2003); *J Neurosci*, 23 : 7415--7425. Freud-1: A neuronal calcium-regulated repressor of the 5-HT1A receptor gene.
- Overstreet E, Fitch E, Fischer JA (2004); *Development*, 131 :5355--5366. Fat facets and Liquid facets promote Delta endocytosis and Delta signaling in the signaling cells.
- Parks AL, Klueg KM, Stout JR, Muskavitch MA (2000); *Development*, 127 :1373--1385. Ligand endocytosis drives receptor dissociation and activation in the Notch pathway.
- Peitz M, Pfannkuche K, Rajewsky K, Edenhofer F (2002); *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99 :4489--4494. Ability of the hydrophobic FGF and basic TAT peptides to promote cellular uptake of recombinant Cre recombinase: a tool for efficient genetic engineering of mammalian genomes.
- Petcherski AG, Kimble J (2000); *Curr Biol*, 10 :R471--R473. Mastermind is a putative activator for Notch.
- Pham CT, MacIvor DM, Hug BA, Heusel JW, Ley TJ (1996); *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93 :13090--13095. Long-range disruption of gene expression by a selectable marker cassette.
- Ponting CP, Parker PJ (1996); *Protein Sci*, 5 :162--166. Extending the C2 domain family: C2s in PKCs delta, epsilon, eta, theta, phospholipases, GAPs, and perforin.
- Ponting CP, Mott R, Bork P, Copley RR (2001); *Genome Res*, 11 :1996--2008. Novel protein domains and repeats in *Drosophila melanogaster*: insights into structure, function, and evolution.
- Poodry CA (1990); *Dev Biol*, 138 :464--472. shibire, a neurogenic mutant of *Drosophila*.
- Quan XJ, Denayer T, Yan J, Jafar-Nejad H, Philippi A, Lichtarge O, Vleminckx K, Hassan BA (2004); *Development* 131 :1679--1689. Evolution of neural precursor selection: functional divergence of proneural proteins.
- Radtke F, Wilson A, Mancini SJ, MacDonald HR (2004); *Nat Immunol*, 5 :247--253. Notch regulation of lymphocyte development and function.
- Raiborg C, Bache KG, Mehlum A, Stang E, Stenmark H (2001); *EMBO J*, 20 :5008--5021. Hrs recruits clathrin to early endosomes.
- Raiborg C, Bache KG, Gillooly DJ, Madhusu IH, Stang E, Stenmark H, (2002); *Nat Cell Biol*, 4 :394--398. Hrs sorts ubiquitinated proteins into clathrin-coated microdomains of early endosomes.
- Raiborg C, Stenmark H (2009); *Nature*, 458 :445--452. The ESCRT machinery in endosomal sorting of ubiquitylated membrane proteins.
- Raymond CK, Howald-Stevenson I, Vater CA, Stevens TH (1992); *Mol Biol Cell*, 3 :1389--1402. Morphological classification of the yeast vacuolar protein sorting mutants: evidence for a prevacuolar compartment in class E vps mutants.
- Rebay I, Fleming RJ, Fehon RG, Cherbas L, Cherbas P, Artavanis-Tsakonas S (1991); *Cell*, 67 :687--699. Specific EGF repeats of Notch mediate interactions with Delta and Serrate: implications for Notch as a multifunctional receptor.
- Redmond L, Oh SR, Hicks C, Weinmaster G, Ghosh A (2000); *Nat Neurosci*. 3 :30--40. Nuclear Notch1 signaling and the regulation of dendritic development.
- Ridgway J, Zhang G, Wu Y, Stawicki S, Liang WC, Chanthery Y, Kowalski J, Watts RJ, Callahan C, Kasman I, Singh M, Chien M, Tan C, Hongo JA, de Sauvage F, Plowman G, Yan M (2006); *Nature*, 444 :1083--1087. Inhibition of Dll4 signalling inhibits tumour growth by deregulating

- angiogenesis.
- Rodahl LM, Haglund K, Sem-Jacobsen C, Wendler F, Vincent JP, Lindmo K, Rusten TE, Stenmark H (2009a); *PLoS One*, 4 :e4354. Disruption of Vps4 and JNK function in *Drosophila* causes tumour growth.
- Rodman JS, Wandinger-Ness A (2000); *J Cell Sci*, 113 Pt 2 :183--192. Rab GTPases coordinate endocytosis.
- Rodríguez CI, Buchholz F, Galloway J, Sequerra R, Kasper J, Ayala R, Stewart AF, Dymecki SM (2000); *Nat Genet*, 25 :139--140. High-efficiency deleter mice show that FLPe is an alternative to Cre-loxP.
- Rogaeva A, Albert PR (2007); *Eur J Neurosci*, 26 :965--974. The mental retardation gene CC2D1A/Freud-1 encodes a long isoform that binds conserved DNA elements to repress gene transcription.
- Rothman JE, Orci L (1992); *Nature*, 355 :409--415. Molecular dissection of the secretory pathway.
- Roy M, Pear WS, Aster JC (2007); *Curr Opin Genet Dev*, 17 :52--59. The multifaceted role of Notch in cancer.
- Rubin GM, Spradling AC (1982); *Science*, 218 :348--353. Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors.
- Rubinsztein DC (2006); *Nature*, 443 :780--786. The roles of intracellular protein-degradation pathways in neurodegeneration.
- Ruland J, Sirard C, Elia A, MacPherson D, Wakeham A, Li L, de la Pompa JL, Cohen SN, Mak TW (2001); *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98 :1859--1864. p53 accumulation, defective cell proliferation, and early embryonic lethality in mice lacking *tsg101*.
- Rulifson EJ, Blair SS (1995); *Development*, 121 :2813--2824. Notch regulates wingless expression and is not required for reception of the paracrine wingless signal during wing margin neurogenesis in *Drosophila*.
- Rusten TE, Vaccari T, Lindmo K, Rodahl LM, Nezis IP, Sem-Jacobsen C, Wendler F, Vincent JP, Brech A, Bilder D, Stenmark H (2007); *Curr Biol*, 17 :1817--1825. ESCRTs and Fab1 regulate distinct steps of autophagy.
- Sakata T, Sakaguchi H, Tsuda L, Higashitani A, Aigaki T, Matsuno K, Hayashi S (2004); *Curr Biol*, 14 :2228--2236. *Drosophila* Nedd4 regulates endocytosis of notch and suppresses its ligand-independent activation.
- Saksena S, Wahlman J, Teis D, Johnson AE, Emr SD (2009); *Cell*, 136 :97--109. Functional reconstitution of ESCRT-III assembly and disassembly.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989); Cold Spring Harbour Laboratory Press. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*.
- Sasai Y, Kageyama R, Tagawa Y, Shigemoto R, Nakanishi S (1992); *Genes Dev*, 6 :2620--2634. Two mammalian helix-loop-helix factors structurally related to *Drosophila* hairy and Enhancer of split.
- Schwenk F, Baron U, Rajewsky K (1995); *Nucleic Acids Res*, 23 :5080--5081. A cre-transgenic mouse strain for the ubiquitous deletion of loxP-flanked gene segments including deletion in germ cells.
- Scott A, Chung HY, Gonciarz-Swiatek M, Hill GC, Whitby FG, Gaspar J, Holton JM, Viswanathan R, Ghaffarian S, Hill CP, Sundquist WI, (2005); *EMBO J*, 24 :3658--3669. Structural and mechanistic studies of VPS4 proteins.
- Seto ES, Bellen HJ, Lloyd TE (2002); *Genes Dev*, 16 :1314--1336. When cell biology meets development: endocytic regulation of signaling pathways.
- Seugnet L, Simpson P, Haenlin M (1997); *Dev Biol*, 192 :585--598. Requirement for dynamin during Notch signaling in *Drosophila* neurogenesis.
- Sevrioukov EA, Moghrabi N, Kuhn M, Krämer H (2005); *Mol Biol Cell*, 16 :2301--2312. A mutation in dVps28 reveals a link between a subunit of the endosomal sorting complex required for transport-I complex and the actin cytoskeleton in *Drosophila*.
- Shim JH, Xiao C, Hayden MS, Lee KY, Trombetta ES, Pypaert M, Nara A, Yoshimori T, Wilm B, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Hogan BL, Mellman I, Ghosh S (2006); *J Cell Biol*, 172 :1045--1056. CHMP5 is essential for late endosome function and down-regulation of receptor signaling during mouse embryogenesis.
- Shim S, Kimpler LA, Hanson PI (2007); *Traffic*, 8 :1068--1079. Structure/function analysis of four core ESCRT-III proteins reveals common regulatory role for extreme C-terminal domain.
- Sjöström PJ, Rancz EA, Roth A, Häusser M (2008); *Physiol Rev*, 88 :769--840. Dendritic excitability

- and synaptic plasticity.
- Skibinski G, Parkinson NJ, Brown JM, Chakrabarti L, Lloyd SL, Hummerich H, Nielsen JE, Hodges JR, Spillantini MG, Thusgaard T, Brandner S, Brun A, Rossor MN, Gade A, Johannsen P, Sørensen SA, Gydesen S, Fisher EM, Collinge J (2005); *Nat Genet*, 37 :806--808. Mutations in the endosomal ESCRTIII-complex subunit CHMP2B in frontotemporal dementia.
- Slagsvold T, Aasland R, Hirano S, Bache KG, Raiborg C, Trambaiolo D, Wakatsuki S, Stenmark H (2005); *J Biol Chem*, 280 :19600--19606. Eap45 in mammalian ESCRT-II binds ubiquitin via a phosphoinositide-interacting GLUE domain.
- Soldati T, Schliwa M. (2006); *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7: 897--908. Powering membrane traffic in endocytosis and recycling.
- Sorkin A, von Zastrow M (2009); *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10 :609--622. Endocytosis and signalling: intertwining molecular networks.
- Spitzer C, Schellmann S, Sabovljevic A, Shahriari M, Keshavaiah C, Bechtold N, Herzog M, Müller S, Hanisch FG, Hülskamp M (2006); *Development*, 133 :4679--4689. The Arabidopsis elch mutant reveals functions of an ESCRT component in cytokinesis.
- Stenmark H (2009); *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10 :513--525. Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic.
- Stoorvogel W, Strous GJ, Geuze HJ, Oorschot V, Schwartz AL (1991); *Cell*, 65 :417--427. Late endosomes derive from early endosomes by maturation.
- Strack B, Calistri A, Craig S, Popova E, Göttlinger HG (2003); *Cell*, 114 :689--699. AIP1/ALIX is a binding partner for HIV-1 p6 and EIAV p9 functioning in virus budding.
- Struhl G, Adachi A (1998); *Cell*, 93 :649--660. Nuclear access and action of notch in vivo.
- Stuffers S, Brech A, Stenmark H (2009); *Exp Cell Res*, 315 :1619--1626. ESCRT proteins in physiology and disease.
- Sweeney NT, Brenman JE, Jan YN, Gao FB (2006); *Curr Biol*, 16 :1006--1011. The coiled-coil protein shrub controls neuronal morphogenesis in *Drosophila*.
- Swiatek PJ, Lindsell CE, del Amo FF, Weinmaster G, Gridley T (1994); *Genes Dev*, 8 :707--719. Notch1 is essential for postimplantation development in mice.
- Takebayashi K, Akazawa C, Nakanishi S, Kageyama R (1995); *J Biol Chem*, 270 :1342--1349. Structure and promoter analysis of the gene encoding the mouse helix-loop-helix factor HES-5. Identification of the neural precursor cell-specific promoter element.
- Teo H, Perisic O, González B, Williams RL (2004); *Dev Cell*, 7 :559--569. ESCRT-II, an endosome-associated complex required for protein sorting: crystal structure and interactions with ESCRT-III and membranes.
- Thélu J, Rossio P, Favier B. (2002); *BMC Dermatol*, 2 :7. Notch signalling is linked to epidermal cell differentiation level in basal cell carcinoma, psoriasis and wound healing.
- Thompson BJ, Mathieu J, Sung HH, Loeser E, Rørth P, Cohen SM (2005); *Dev Cell*, 9 :711--720. Tumor suppressor properties of the ESCRT-II complex component Vps25 in *Drosophila*.
- Troost, T (2007); Diplomarbeit, Universität zu Köln. Struktur-/ Funktionsanalyse des Tumorsuppressorgens lethal (2) giant discs in *Drosophila melanogaster*.
- Trowbridge IS, Collawn JF, Hopkins CR (1993); *Annu Rev Cell Biol*, 9 :129--161. Signal-dependent membrane protein trafficking in the endocytic pathway.
- Tsang HT, Connell JW, Brown SE, Thompson A, Reid E, Sanderson CM (2006); *Genomics*, 88 :333--346. A systematic analysis of human CHMP protein interactions: additional MIT domain-containing proteins bind to multiple components of the human ESCRT III complex.
- Vaccari T, Bilder D (2005); *Dev Cell*, 9 :687--698. The *Drosophila* tumor suppressor vps25 prevents nonautonomous overproliferation by regulating notch trafficking.
- Vaccari T, Rusten TE, Menut L, Nezis IP, Brech A, Stenmark H, Bilder D (2009); *J Cell Sci*, 122 :2413--2423. Comparative analysis of ESCRT-I, ESCRT-II and ESCRT-III function in *Drosophila* by efficient isolation of ESCRT mutants.
- van de Wetering M, Sancho E, Verweij C, de Lau W, Oving I, Hurlstone A, van der Horn K, Battle E, Coudreuse D, Haramis AP, Tjon-Pon-Fong M, Moerer P, van den Born M, Soete G, Pals S, Eilers M, Medema R, Clevers H (2002); *Cell*, 111 :241--250. The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells.
- van der Blik AM, Meyerowitz EM (1991); *Nature*, 351 :411--414. Dynamin-like protein encoded by the *Drosophila* shibire gene associated with vesicular traffic.
- van Es JH, van Gijn ME, Riccio O, van den Born M, Vooijs M, Begthel H, Cozijnsen M, Robine S, Winton DJ, Radtke F, Clevers H (2005b); *Nature*, 435 :959--963. Notch/gamma-secretase

- inhibition turns proliferative cells in intestinal crypts and adenomas into goblet cells.
- van Ijzendoorn SC (2006); *J Cell Sci*, 119 :1679--1681. Recycling endosomes.
- von Zastrow M, Sorkin A (2007); *Curr Opin Cell Biol*, 19 :436--445. Signaling on the endocytic pathway.
- Wagner KU, Krempler A, Qi Y, Park K, Henry MD, Triplett AA, Riedlinger G, Rucker III EB, Hennighausen L (2003); *Mol Cell Biol*, 23 :150--162. Tsg101 is essential for cell growth, proliferation, and cell survival of embryonic and adult tissues.
- Wang W, Struhl G (2004); *Development*, 131 :5367--5380. Drosophila Epsin mediates a select endocytic pathway that DSL ligands must enter to activate Notch.
- Wang W, Struhl G (2005); *Development*, 132 :2883--2894. Distinct roles for Mind bomb, Neuralized and Epsin in mediating DSL endocytosis and signaling in Drosophila.
- Weng AP, Ferrando AA, Lee W, Morris JP 4th, Silverman LB, Sanchez-Irizarry C, Blacklow SC, Look AT, Aster JC (2004); *Science*, 306 :269--271. Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia.
- Wilder EL, Perrimon N (1995); *Development*, 121 :477--488. Dual functions of wingless in the Drosophila leg imaginal disc.
- Wilkin MB, Carbery AM, Fostier M, Aslam H, Mazaleyra SL, Higgs J, Myat A, Evans DA, Cornell M, Baron M (2004); *Curr Biol*, 14 :2237--2244. Regulation of notch endosomal sorting and signaling by Drosophila Nedd4 family proteins.
- Wilkin MB, Baron M (2005); *Mol Membr Biol*, 22 :279--289. Endocytic regulation of Notch activation and down-regulation.
- Williams RL, Urbé S (2007); *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8 :355--368. The emerging shape of the ESCRT machinery.
- Wollert T, Hurley JH (2010); *Nature*, 464 :864--869. Molecular mechanism of multivesicular body biogenesis by ESCRT complexes.
- Wu L, Aster JC, Blacklow SC, Lake R, Artavanis-Tsakonas S, Griffin JD (2000); *Nat Genet*, 26 :484--489. MAML1, a human homologue of Drosophila mastermind, is a transcriptional co-activator for NOTCH receptors.
- Xu Z, Liang L, Wang H, Li T, Zhao M (2003); *Biochem Biophys Res Commun*, 311 :1057--1066. HCRP1, a novel gene that is downregulated in hepatocellular carcinoma, encodes a growth-inhibitory protein.
- Xue Y, Gao X, Lindsell CE, Norton CR, Chang B, Hicks C, Gendron-Maguire M, Rand EB, Weinmaster G, Gridley T (1999); *Hum Mol Genet*, 8 :723--730. Embryonic lethality and vascular defects in mice lacking the Notch ligand Jagged1.
- Yamada M, Ishii N, Asao H, Murata K, Kanazawa C, Sasaki H, Sugamura K (2002); *Mol Cell Biol*, 22 :8648--8658. Signal-transducing adaptor molecules STAM1 and STAM2 are required for T-cell development and survival.
- Yang Q, Bermingham NA, Finegold MJ, Zoghbi HY (2001); *Science*, 294 :2155--2158. Requirement of Math1 for secretory cell lineage commitment in the mouse intestine.
- Yu WH, Cuervo AM, Kumar A, Peterhoff CM, Schmidt SD, Lee JH, Mohan PS, Mercken M, Farmery MR, Tjernberg LO, Jiang Y, Duff K, Uchiyama Y, Näslund J, Mathews PM, Cataldo AM, Nixon RA (2005); *J Cell Biol*, 171 :87--98. Macroautophagy--a novel Beta-amyloid peptide-generating pathway activated in Alzheimer's disease.
- Zamborlini A, Usami Y, Radoshitzky ST, Popova E, Palu G, Göttlinger H (2006); *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103 :19140--19145. Release of autoinhibition converts ESCRT-III components into potent inhibitors of HIV-1 budding.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Protein-Transport im endosomalen System	2
Abbildung 1.2: Funktion der ESCRT-Komplexe bei der Sortierung ubiquitiniertes Membranproteine in intraluminale Vesikel.....	6
Abbildung 1.3: Aufbau und Konformationsänderung der ESCRT-III-Proteine.....	8
Abbildung 1.4: Aktuelles Modell zur Funktion der ESCRTs bei der Bildung intraluminale Vesikel.....	9
Abbildung 1.5: Zellautonomer Effekt von <i>shrub</i> in der Dendriten-Morphogenese.....	16
Abbildung 1.6: Topologische Ähnlichkeit der MVB-Bildung, der Zytokinese und der Virenknospung	17
Abbildung 1.7: Der Notch-Signalweg.....	19
Abbildung 1.8: Verschiedene Effekte des Notch-Signalwegs	23
Abbildung 1.9: <i>Igd</i> -mutante Fliegen zeigen in verschiedenen Organen Effekte einer gesteigerten Notch-Aktivität	26
Abbildung 1.10: Verbreiterte Expression des Notch-Zielgens <i>wingless (wg)</i> in <i>Igd</i> - mutanten Flügelimaginalscheiben.....	27
Abbildung 1.11: Hohe Konservierung der Proteinstruktur von Lgd	31
Abbildung 1.12: Rettung des <i>Igd</i> -Phänotyps durch die murinen Orthologe <i>mlgd1</i> und <i>mlgd2</i>	31
Abbildung 1.13: Schematische Darstellung der Funktion von Aki1/Freud-1 als Gerüstprotein für PDK1 und Akt im EGF-Signalweg.....	34
Abbildung 2.1: Koimmunopräzipitation von Lgd-HA und Notch.....	37
Abbildung 2.2: Schematische Darstellung der Flügelimaginalscheibe und des adulten Flügels.....	38
Abbildung 2.3: Flügel der Nachkommen aus den Kreuzungen des <i>Igd</i> - Überexpressionsstamms gegen <i>shrub</i> -enthaltende Defizienzen oder das <i>shrub⁴⁻¹</i> -Allel.....	40
Abbildung 2.4: Scutellarer Borstenverlust nach Kreuzung der Defizienzen #3591 und #4966 gegen den <i>Igd</i> -Überexpressionsstamm.....	41
Abbildung 2.5: Flügel der Nachkommen aus den Kreuzungen des <i>Igd</i> - Überexpressionsstamms gegen Defizienzen, die <i>vps2</i> (CG4618) deletieren.....	42

Abbildung 2.6: Flügel der Nachkommen aus den Kreuzungen des <i>lgd</i> - Überexpressionsstamms gegen <i>vps2</i> (CG14542)-enthaltende Defizienzen oder das <i>vps2^{PP6}</i> -Allel.....	44
Abbildung 2.7: Flügel der Nachkommen aus den Kreuzungen des <i>lgd</i> - Überexpressionsstamms gegen das <i>vps20³</i> -Allel.....	45
Abbildung 2.8: Nachweis der Interaktion von Lgd-HA mit endogenem Shrub mittels Koimmunopräzipitation.....	46
Abbildung 2.9: Koimmunopräzipitation von Lgd-HA und Shrub-GFP.....	47
Abbildung 2.10: Deletionskonstrukte des Lgd-Proteins.....	48
Abbildung 2.11: Interaktion von Shrub-GFP mit Lgd-Deletionskonstrukten.....	49
Abbildung 2.12: Aufbau der Shrub-Deletionskonstrukte	51
Abbildung 2.13: Expression von UAS-Myc-Shrub mit <i>ptcGAL4</i>	53
Abbildung 2.14: Flügel und Scutelli nach Expression von UAS-Myc- <i>shrub</i> - Konstrukten mit <i>ptcGAL4</i>	54
Abbildung 2.15: Expression von UAS-Myc- <i>shrubΔauto</i> mit <i>sdGAL4</i>	55
Abbildung 2.16: Auswirkungen des heterozygoten Verlusts der Gene <i>lgd</i> und <i>shrub</i> auf die Notch-Aktivität in der Flügelimaginalscheibe.....	57
Abbildung 2.17: Äußerliche Unterschiede zwischen transheterozygoten <i>lgd^{Id7}/lgd^{SH495}</i> -Larven ohne und bei Ausfall einer Kopie von <i>shrub</i>	58
Abbildung 2.18: Expression von <i>mlgd1</i> und <i>mlgd2</i> in ES-Zellen und in adulten Geweben.....	60
Abbildung 2.19: Detektion von mLgd2-wt und KO-Protein mit dem CC2D1A- Antikörper.....	61
Abbildung 2.20: Vergleich der ersten 50 Aminosäuren der Lgd-Proteine aus verschiedenen Spezies.....	62
Abbildung 2.21: Test der Spezifität des CC2D1A-Antikörpers.....	63
Abbildung 2.22: mLgd1-Protein: Wildtyp und Knockout.....	64
Abbildung 2.23: Aufreinigung des mLgd1(1-253)-Peptids.....	65
Abbildung 2.24: Aufreinigung ohne GST-markiertes Protein.....	67
Abbildung 2.25: Test des mLgd1-Antikörpers im Western-Blot.....	68
Abbildung 2.26: Strategie für den Knockout von <i>mlgd1</i>	70
Abbildung 2.27: Klonierung des <i>mlgd1</i> -Genersatzvektors.....	72

Abbildung 2.28: Strategie für den <i>mlgd2</i> -Knockout.....	73
Abbildung 2.29: Klonierung des <i>mlgd2</i> -Gensatzvektors.....	74
Abbildung 2.30: Southern Blot-Analyse der <i>mlgd1</i> -Klone.....	76
Abbildung 2.31: Southern-Blot Analyse der <i>mlgd2</i> -Klone.....	78
Abbildung 2.32: PCR zum Nachweis der Cre-vermittelten Deletion in ES-Zellen.....	80
Abbildung 2.33: Genotypisierungs-PCR nach Verpaarung von <i>mlgd2^{flox/+}</i> -Tieren.....	82
Abbildung 2.34: Genotypisierungs-PCR nach Verpaarung von <i>mlgd2^{+/-}</i> -Tieren.....	83
Abbildung 2.35: Graphische Darstellung der Genotypen-Verteilung an Tag P0 und P1.....	84
Abbildung 2.36: Grafische Darstellung der Genotypen-Verteilung.....	85
Abbildung 2.37: Western-Blot der <i>mlgd2</i> -Knockout-Tiere.....	86
Abbildung 4.1: Strategie zur Genotypisierung der <i>mlgd1/mlgd2</i> -Mäuse.....	111

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1: Charakteristische Eigenschaften der verschiedenen endosomalen Kompartimente.....	4
Tabelle 1.2: Nomenklatur der ESCRT-Proteine in verschiedenen Organismen.....	10
Tabelle 1.3: Letalität von ESCRT-Mutanten in Drosophila und Maus.....	11
Tabelle 2.1: Effekte der Expression der UAS-Myc-Shrubkonstrukte mit <i>ptc</i> GAL4.....	52
Tabelle 4.1: Primäre Antikörper.....	106
Tabelle 4.2: Sekundäre Antikörper.....	106
Tabelle 4.3: PCR-Programme zur Amplifikation der einzelnen Fragmente.....	109
Tabelle 4.4: Oligonukleotide zur Herstellung von Fragmenten für die Gensatzvektoren, der Sonden (Southern Blot) und des mLgd1- Antikörper-Fragments.....	110
Tabelle 4.5: Oligonukleotide zur Genotypisierung von ES-Zellen und Mäusen.....	112
Tabelle 4.6: PCR-Programme für die Genotypisierungen.....	112
Tabelle 4.7: Oligonukleotide für Sequenzierungen.....	117
Tabelle 4.8: Oligonukleotide für die RT-PCR von <i>mlgd1/mlgd2</i>	120
Tabelle 4.9: PCR-Programm zur Bestätigung der <i>mlgd1/mlgd2</i> -Expression	120
Tabelle 4.10: Verwendete Fliegenstämme.....	135

Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäuren
aK	anteriore Kreuzvene
bp	Basenpaare
CHMP	charged multivesicular protein / chromatin-modifying protein
DAPI	4'-6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EF	embryonale Fibroblasten
ES	embryonale Stammzellen
ESCRT	<i>endosomal sorting complex required for transport</i>
FKS	fötale Kälberserum
FRT	<i>flippase recognition target</i>
G418	Geneticin
h	<i>hour</i> (Stunde)
HSV	<i>Herpes simplex Virus</i>
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid
KA	kurzer Homologiearm
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
KO	Knockout-Bereich
LA	langer Homologiearm
LB	Luria Bertani
loxP	<i>locus of X-over of P1</i>
M	molar
MVB	<i>multivesicular body</i> (multivesikuläres Kompartiment)
min.	Minuten
pK	posteriore Kreuzvene
VPS	<i>vacuolar protein sorting</i>
wt	Wildtyp

Erklärung

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

Köln, April 2010

Sandra Jäckel

Teilpublikationen im Rahmen dieser Arbeit:

Lebenslauf

Persönliche Informationen

Name: Sandra Jäckel
Geburtsdatum: 05.11.1979
Geburtsort: Gummersbach
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch
Wohnort: Rheinaustr. 15-17
50676 Köln

Ausbildung

08 / 1986 – 06 / 1990 Gemeinschaftsgrundschule Gummersbach-Körnerstraße

08 / 1990 – 05 / 1999 Städtisches Gymnasium Moltkestraße
Abschluß: Abitur Mai 1999

07 / 1999 – 09 / 2000 Ausbildung zur Tierarzhelferin
(tierärztliche Gemeinschaftspraxis Dr. H. Lüttgenau)
Abbruch der Lehre zur Aufnahme des Biologie-Studiums

10 / 2000 – 11 / 2005 Studium der Biologie an der Universität zu Köln

 Diplomarbeit unter der Betreuung von Prof. Dr. Jens
 Brüning am Institut für Genetik der Universität zu Köln

 Titel der Diplomarbeit:
 „TAP-tag Markierung der Protein-Arginin-
 Methyltransferase CARM1 in vivo“

 Diplomprüfungen im Hauptfach Genetik und in den
 Nebenfächern Zoologie und Biochemie

seit 01 / 2006 Promotion bei Prof. Dr. Jens Brüning und Prof. Dr.
 Thomas Klein zum Thema
 „Identifizierung eines Interaktionspartners von
 Lethal (2) giant discs (Lgd) in *Drosophila melanogaster*
 und konditionale Inaktivierung der *lgd*-Orthologen in der
 Maus“

Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Thomas Klein für die Bereitstellung des interessanten Projektes und die gute Betreuung bedanken.

Herrn Prof. Dr. Jens Brüning danke ich für die Übernahme des Koreferats und Herrn Prof. Dr. Siegfried Roth für die Übernahme des Vorsitzes bei der Disputation.

Bei Herrn Dr. Thomas Wunderlich möchte ich mich ganz besonders für die Hilfe bei der Planung der Genersatzstrategien sowie für die unzähligen Tips zur ES-Zellkultur bedanken, die für das Gelingen dieser Arbeit unabdingbar waren.

Mein Dank gilt außerdem allen technischen Assistenten/Assistentinnen aus Köln und Düsseldorf, die mich während meiner Arbeit unterstützt haben.

Der gesamten Arbeitsgruppe Klein (Köln/Düsseldorf) danke ich für die fachliche Hilfe und die gute Zusammenarbeit. Besonders bedanken möchte ich mich bei Robert Jaekel, Tobias Troost, Jahan Yousefian, Katharina Schulz für die lustigen Unterhaltungen, die den Laboralltag bei allen Mißerfolgen und Schwierigkeiten immer wieder erhellen.

Desweiteren danke ich besonders meiner Kollegin und Freundin Nora Redemann, die mich die ganze Jahre unterstützt und immer wieder aufgemuntert hat.

Ganz besonderer Dank gilt meinem Freund Andreas Nohl für das Korrekturlesen dieser Arbeit, zahllose Bildbearbeitungen und besonders dafür, daß er mir immer zur Seite gestanden, mich unterstützt und aufgemuntert hat. Ohne Dich wäre das alles nicht möglich gewesen.

„Derjenige, der etwas zerbricht, um herauszufinden, was es ist, hat den Pfad der Weisheit verlassen.“

J. R. R. Tolkien