

Aus dem Institut für Genetik
der Universität Hohenheim
Lehrstuhl für allgemeine Genetik
Frau Prof. Dr. A. Preiss

**Die Rolle von *H* in der Vernetzung des *N*-Signalweges
mit anderen Signalwegen während der Flügelentwicklung
von *Drosophila melanogaster* (Meigen)**

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

vorgelegt der Fakultät II – Biologie
der Universität Hohenheim

von
Bernd Johannes
aus Tübingen
Stuttgart, 2002

Die vorliegende Arbeit wurde am 02.04.2002 von der
Fakultät II – Biologie der Universität Hohenheim als
„Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der
Naturwissenschaften“ angenommen.

Tag der mündlichen Prüfung: 13.05.2002

Dekan: Herr Prof. Dr. Andreas Kuhn

Berichterstatter, 1. Prüfer: Frau Prof. Dr. Anette Preiss

Berichterstatter, 2. Prüfer: Herr Priv. Doz. Dr. Wolfgang Staiber

3. Prüfer: Herr Prof. Dr. Uwe Walldorf

Berichte aus der Biologie

Bernd Johannes

**Die Rolle von *H* in der Vernetzung
des *N*-Signalweges mit anderen Signalwegen
während der Flügelentwicklung von
Drosophila melanogaster (Meigen)**

D 100 (Diss. Universität Hohenheim)

Shaker Verlag
Aachen 2003

Die Deutsche Bibliothek - CIP-Einheitsaufnahme

Johannes, Bernd:

Die Rolle von *H* in der Vernetzung des *N*-Signalweges mit anderen Signalwegen während der Flügelentwicklung von *Drosophila melanogaster* (Meigen) / Bernd Johannes.

Aachen : Shaker, 2003

(Berichte aus der Biologie)

Zugl.: Hohenheim, Univ., Diss., 2002

ISBN 3-8322-1274-4

Copyright Shaker Verlag 2003

Alle Rechte, auch das des auszugsweisen Nachdruckes, der auszugsweisen oder vollständigen Wiedergabe, der Speicherung in Datenverarbeitungsanlagen und der Übersetzung, vorbehalten.

Printed in Germany.

ISBN 3-8322-1274-4

ISSN 0945-0688

Shaker Verlag GmbH • Postfach 101818 • 52018 Aachen

Telefon: 02407 / 95 96 - 0 • Telefax: 02407 / 95 96 - 9

Internet: www.shaker.de • eMail: info@shaker.de

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Anette Preiss für die Betreuung und Unterstützung sowie auch für ihre Geduld während des gesamten Zeitraums dieser Dissertation. Der konstruktive Dialog, und vor allem die Ermunterung während der schwierigen und berufsbedingt langatmigen Endphase hat entscheidend zur Motivation und zum Erfolg der Arbeit beigetragen. Und da gab es natürlich noch diverse Motivatoren, die zur Homöostasis des Doktoranden beitragen – und dabei mithelfen Reservepolster für Notzeiten einzurichten. Hoffen wir, das wir sie nie brauchen.

Mein Dank gilt Herrn PD. Dr. Wolfgang Staiber für die Übernahme des Koreferates, sowie für seine unermüdliche Hilfsbereitschaft bei allen Dingen des täglichen Laborlebens – aber vor allem bei allen Dingen, die in irgend einer Form mit Licht und Photographie zusammenhingen.

Bei Frau Dr. Nagel möchte ich mich für die Zusammenarbeit und vielfältige Anregungen bedanken, nicht zuletzt auch für die hilfsbereite Erledigung der unzähligen „kleinen“ Gefallen, die ich des öfteren an sie herantrug. Und natürlich auch für das geduldige Erleiden meiner (unerfragten) Kommentare zu allen Dingen des Lebens...

Herrn Prof. Dr. Uwe Walldorf und bei Herrn Dr. Dieter Maier möchte ich mich für die vielen Tipps, cDNA's, Antikörper, die eine oder andere kulinarische Unterstützung, sowie auch Hilfestellungen bei besonderen Anliegen bedanken.

Bei Frau Dr. Irmgard Wech bedanke ich mich für die gute und geduldige Zusammenarbeit, vielfältige Hilfestellungen, überlassene Lösungen, einfach alles, was ein zerstreuter Doktorand gerade dringend braucht, aber vergessen hat vorzubereiten – und was Frau Wech meistens doch aus dem Hut zaubern konnte. Und auch, zusammen mit Frau Beck, für die unterhaltsamen „Sitzungen“ im Fliegenlabor.

Bei meinen Kollegen, vor allem Frau Dr. Simone Schreiber, möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit bedanken. Auch hier hat der, mitunter intensive, Gedankenaustausch entscheidend zum Verlauf der Doktorarbeit beigetragen.

Meinen Weggefährten in der Genetik seit Studienbeginn, vor allem Lars Kammermeier, Britta Nixdorf und Andrea Kiewe möchte ich mich – natürlich auch für die gute Zusammenarbeit, aber auch für die Zeit, die wir gerade nicht im Labor zugebracht haben herzlich bedanken.

Und da gibt es noch die Weggefährten, die nie ein Labor (außer zu Besuchszwecken) betreten haben, und in *Drosophila* allenfalls lästige Küchenbewohner sehen. Bei der ganzen Rasselbande, vor allem bei meiner WG (Holger, Marcus und Robert) möchte ich mich bedanken. Ihr wißt selbst, was ihr zu dieser Arbeit beigetragen habt – zwar kein Wort, aber doch sehr viel in nicht faßbaren Maßeinheiten.

Zuletzt und doch zuerst geht mein Dank an meine Eltern, die immer mit Interesse, und manchmal auch mit mahnendem Blick (Erziehung wirkt auch jenseits von 30) den Fortgang der Arbeit verfolgt haben. Ihr habt das Fundament gelegt, auf dem Andere den Rest erbauen konnten.

Abkürzungen

a	anti
Abb.	Abbildung
A/P	anterior/posterior
bp ; kbp	Basenpaar(e) ; Kilo-Basenpaare
bHLH	basische Helix-Loop-Helix Protein-Domäne
BrdU	Bromodesoxyuridin
cDNA	copy-DNA
C-terminal	Carboxy-terminal
<i>D. mel.</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
DABCO	1,4-Diazabicyclo[2.2.2]Oktan
DIG	Digoxigenin
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure, Englische Schreibweise
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
D/V	dorso/ventral
E. coli	Escherichia coli
ER	endoplasmatisches Reticulum
<i>et al.</i>	<i>et aliter</i>
flp	Flipase (Hefeenzym; Rekombinase)
FRT	flipase recognition target sequence (Flipase-Zielsequenz)
hs	Hitzeschock
mRNA	messenger RNA (Boten-RNA)
NBT	4-Nitroblau-tetrazoliumchlorid
neo	Neomycin
NGS	normal goat serum (Ziegen Serum)
N-terminal	Amino-terminal
ORF	open reading frame (offener Leserahmen)
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PNS	peripheres Nervensystem
RNA	Ribonukleinsäure (englische Schreibweise)
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SOP	Sensory organ precursor
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
t-RNA	transfer-RNA
Tween20	Polyoxyethylensorbitanmonolaureat
UAS	Upstream activation sequences (GAL4 Zielsequenz)
ü. N.	über Nacht
WT	Wildtyp; wildtypisch
X-Phosphat	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphat
ZNS	zentrales Nervensystem

SI-Einheiten

g	Gramm
h	Stunde(n)
l	Liter
m	Milli-
min	Minute
μ	Mikro-
M	Mol
n	nano-
sec	Sekunde
°C	Grad Celsius

häufig verwendete Anglizismen

Balancer	dominant markiertes, rezessiv letales Chromosom mit sehr geringer Rekombinationsfrequenz
Enhancer	cis-regulatorische Abschnitte eines Gens, die die Aktivität des Promotors steuern
Insert	Fremd-DNA bzw. DNA-Abschnitt, das in einen Vektor eingesetzt wurde
Marker	genetische Markierung
Screen	Durchmusterung

Genbezeichnung

Die Genbezeichnungen folgen den nomenklaturischen Vorgaben nach Lindsley und Zimm (1992). Die verwendeten Gensymbole folgen den Bezeichnungen der Flybase (Hauptbezeichnung oder Synonym). Flybase-Referenznummern sind nicht angegeben, da sich diese bei Datenreorganisationen ändern und daher keine Aussagekraft haben. Die Kombination aus Gen- und Allelbezeichnung sind eindeutig und ausreichend zur Beauskunftung.

verwendete Internet-Datenquellen

Name	Nutzung	URL
BDGP	Sequenzdaten, P-Element-Karten, BLAST	http://www.fruitfly.org/
flybase (mirror)	Gen- und Alleldaten, Aberrationsdaten	http://fly.ebi.ac.uk:7081/
EBI	Hauptportal des European Bioinformatics Inst.	http://www.ebi.ac.uk/
EMBL	Hauptportal des European Molecularbiology Lab.	http://www.embl.org/
SRS	Sequence Retrieval System (Sequenzsuche)	http://srs6.ebi.ac.uk/

Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG	1
1.1 DIE FRÜHE FLÜGELENTWICKLUNG IM EMBRYO UND DEN ERSTEN LARVENSTADIEN	1
1.2 DIE VORGÄNGE WÄHREND DER METAMORPHOSE ZUM ADULTEN FLÜGEL	5
1.3 DIE ENTWICKLUNG DER FLÜGELVENEN	9
1.4 DIE ROLLE VON <i>ve</i> – EIN MODIFIKATOR DES <i>EGF</i> -SIGNALWEGS	13
1.5 DER NOTCH-SIGNALWEG	15
1.6 KOMPONENTEN DER INTERVENENSPEZIFIKATION	19
1.7 ERGEBNISSE DER DIPLOMARBEIT	22
1.7 ZIELE DER ARBEIT	25
2. MATERIAL UND METHODEN	27
2.1 VERWENDETE LÖSUNGEN UND MATERIALIEN	27
2.2 VERWENDETE PROTOKOLLE	31
2.3 FLIEGENZUCHT UND KREUZUNGEN	39
3. ERGEBNISSE	47
3.1 DER H-C2 PHÄNOTYP IST UNABHÄNGIG VON SU(H)	47
3.2 VERGLEICH DER REAKTION VON DL, N UND M β AUF H UND H-C2 ÜBEREXPRESSION	48
3.3 PRÜFUNG DES EINFLUSSES VON DL AUF DIE WIRKUNG VON H-C2	55
3.4 <i>SU(H)</i> UND H-C2 WIRKEN ANTAGONISTISCH	56
3.5 <i>E(SPL)</i> -M β KANN DIE WIRKUNG VON H-C2 NICHT UNTERDRÜCKEN	59
3.6 IMMUNOHISTOCHEMISCHE ANALYSE ZU DEN KOEXPRESSIONEN	60
3.7 MOSAIKANALYSEN MIT ELEMENTEN DES <i>E(SPL)</i> -C	64
3.8 FRT-ANALYSE WEITERER NOTCH-KOMPONENTEN	67
3.9 APOPTOSIS UND PROLIFERATION, UNTERSCHIEDE ZWISCHEN H UND H-C2	69
3.10 ERWEITERTE DURCHMUSTERUNG NACH DOMINANTEN MODIFIKATOREN	74
3.11 ANALYSE DER EPISTASISBEZIEHUNG ZWISCHEN H-C2 UND EGF-SIGNALWEG	78
3.12 DIE REAKTION DER <i>ve</i> -EXPRESSION AUF H UND H-C2 ÜBEREXPRESSION	83
3.13 BLISTERED WIRD DURCH H-C2 NICHT REPRIMERT	86
3.14 KOEXPRESSION VON BS MIT H UND H-C2	89
3.15 DIE WIRKUNG DES NOTCH-SIGNALS AUF DIE <i>BLISTERED</i> -EXPRESSION	92
3.16 EPISTATISCHE BEZIEHUNGEN ZWISCHEN NOTCH- UND EGF-SIGNALLEN	94
3.17 NOTCH-SIGNALE INDUZIEREN FLÜGELVENEN	98
3.18 <i>NET</i> UND <i>NOTCH</i> REGULIEREN <i>ve</i> IN SEQUENZIELLER ABFOLGE	100
3.19 EKTOPISCHES L(1)SC BEEINFLUßT DIE VENENENTWICKLUNG	108

3.20	<i>LACE</i> IST EIN STARKER MODIFIKATOR UND INTERAGIERT MIT <i>E(spl)-C</i>	115
3.21	EMS-MUTAGENESE UND DURCHMUSTERUNG IM SENSITIVEN HINTERGRUND	121
4.	DISKUSSION	123
4.1	H-C2 IST UNABHÄNGIG VON <i>Su(H)</i> , WIRD ABER VON <i>NOTCH</i> BEEINFLUßT	124
4.2	DIE DOMINANTEN MODIFIKATOREN VON H-C2	126
4.3	<i>NOTCH</i> UND DER <i>EGF</i> -SIGNALWEG: DIE EPISTASIS-KASKADE	130
4.4	<i>BLISTERED</i> , <i>NOTCH</i> UND H-C2	133
4.5	<i>NET</i> , <i>NOTCH</i> UND <i>L'sc</i>	135
4.6	DER <i>NOTCH</i> -SIGNALWEG ALS VENENINDUKTOR	140
4.7	AUSBlick	143
5.	ZUSAMMENFASSUNG	147
6.	LITERATUR	149
	ANHANG	165