

**Funktion und Regulation von
D- und E-Typ-Cyclin-Cdk-Komplexen
während der Entwicklung von *Drosophila***

**Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften
der Universität Bayreuth**

**vorgelegt von
Claas Aiko Meyer
Bayreuth 2002**

Diese Arbeit wurde von August 1997 bis August 2002 am Lehrstuhl für Genetik der Universität Bayreuth unter der Anleitung von Prof. Dr. Christian F. Lehner angefertigt.

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften der Universität Bayreuth zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften genehmigte Dissertation.

Promotionsgesuch eingereicht am: 16.8.2002

Tag der mündlichen Prüfung: 20.12.2002

Erstgutachter: Prof. Dr. Christian F. Lehner

Zweitgutachter: Prof. Dr. Gerhard Krauss

Inhaltsverzeichnis:

1	Zusammenfassung	1
2	Summary	3
3	Einleitung	5
3.1	Musterbildung während der Embryogenese von <i>Drosophila</i>	5
3.2	Der Zellzyklus während der Entwicklung von <i>Drosophila</i>	7
3.3	Modell des G ₁ /S-Übergangs in Vertebraten	10
3.4	Problemstellung	12
4	Ausführliche Zusammenfassung der Ergebnisse	14
4.1	Cdk4 assoziiert mit Cyclin D	14
4.2	Cdk4 ist nicht essentiell für die Zellproliferation	14
4.3	Cdk4 reguliert das Wachstum	17
4.4	Hierarchie von D- und E-Typ-Cyclin-Cdk-Komplexen	18
4.5	Der rechtzeitige Austritt aus dem Zellzyklus erfolgt unabhängig von Cyclin D-Cdk4-Aktivität	19
4.6	Die Expression von <i>dap</i> ist unabhängig vom Durchlaufen des Zellzyklus	19
4.7	Determinanten des Zellschicksals regulieren die Expression von <i>dap</i>	20
4.8	Die Expression von <i>dap</i> wird durch eine komplexe 5'-Kontrollregion reguliert	21
4.9	ABD-B bindet direkt an die 5'-Kontrollregion von <i>dap</i>	21
5	Diskussion	23
5.1	Die Bedeutung von Cyclin D-Cdk4-Komplexen in der Embryogenese	23
5.2	Koordination von Wachstum und Zellproliferation	24
5.3	Implikationen für die Tumorigenese	26
5.4	Unterschiede von Cyclin D-Cdk4-Komplexen in Vertebraten und <i>Drosophila</i>	27
5.5	Kontrolle des Austritts aus der Zellproliferation	28

6	Literaturverzeichnis	31
7	Teilarbeiten	35
7.1	Teilarbeit A	35
7.2	Teilarbeit B	35
7.3	Teilarbeit C	35
8	Darstellung des Eigenanteils	36
8.1	Darstellung des Eigenanteils an Teilarbeit A	36
8.2	Darstellung des Eigenanteils an Teilarbeit B	36
8.3	Darstellung des Eigenanteils an Teilarbeit C	36
9	Genbezeichnungen	37

1 Zusammenfassung

Die Embryonalentwicklung eines Vielzellers beginnt im allgemeinen mit einer Phase exponentieller Zellproliferation. Anschließend erfolgt in den meisten Zellen ein Zellproliferationsarrest und die terminale Zelldifferenzierung. Hierbei muss das Ausmaß der Zellproliferation mit anderen Entwicklungsvorgängen wie Musterbildung und Wachstum abgestimmt werden.

Der G₁/S-Übergang im Zellzyklus ist ein wichtiger Kontrollpunkt für die Zellproliferation. Hier wird in der Zelle entschieden, ob die DNA in einer S-Phase repliziert und ein weiterer Zellteilungszyklus durchlaufen wird. Die Aktivität von Cyclin E-Cdk(Cyclin-dependent kinase)2-Proteinkomplexen ist essentiell für den Eintritt in die S-Phase. Umgekehrt erfordert der Austritt aus der Zellproliferation zum korrekten Zeitpunkt in der Entwicklung die Inaktivierung von Cyclin E-Cdk2-Komplexen.

Es wird allgemein angenommen, dass Cyclin E-Cdk2-Komplexe durch Cyclin D-Cdk4-Komplexe reguliert werden. So phosphorylieren Cyclin D-abhängige Kinasen das Retinoblastoma-Protein Rb, wodurch die Repression von Klasse I-Zielgenen des Rb-Signalwegs, wie *Cyclin E*, beendet wird. Anschließend kommt es infolge der *Cyclin E*-Aktivierung zur Hyperphosphorylierung von Rb durch Cyclin E-Cdk2-Komplexe. Dies bewirkt die Freisetzung und Aktivierung von E2F-Transkriptionsfaktoren, welche die Expression von S-Phasen-Genen kontrollieren.

Um die funktionelle Bedeutung von Cyclin D-Cdk4-Komplexen während der Entwicklung zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit eine *Cdk4*-Nullmutation in *Drosophila melanogaster* charakterisiert. Überraschenderweise entwickeln sich adulte Fliegen auch in Abwesenheit jeglicher Cdk4-Funktion. *Cdk4*-Mutanten sind allerdings von reduzierter Größe und eingeschränkter Fertilität. *Cdk4* ist daher nicht essentiell für die Zellproliferation. Vielmehr konnte gezeigt werden, dass Cyclin D-Cdk4-Komplexe eine wachstumsstimulatorische Funktion besitzen und für das Wachstum sowohl der einzelnen Zelle als auch des gesamten Organismus benötigt werden.

Konditionale Überexpression von *Cyclin D* und *Cdk4* zeigt, dass Cyclin D-Cdk4-Komplexe im Rb-Signalweg wirken und unabhängig von *Cyclin E* die Transkription von *RnrS* in physiologischer Stärke induzieren. *RnrS* kodiert für die kleine Untereinheit der Ribonukleotidreduktase und ist ein bekanntes Zielgen von E2F-Transkriptionsfaktoren. Die Überexpression von *Cyclin D-Cdk4* in der embryonalen Epidermis kann jedoch den rechtzeitigen Austritt aus dem Zellzyklus nicht verhindern. Cyclin D-Cdk4-Komplexe sind daher keine Entscheidungsträger über Ein- und Austritt aus der Zellproliferation.

Im Gegensatz zu Cyclin D-Cdk4-Komplexen müssen Cyclin E-Cdk2-Komplexe inhibiert werden, um einen rechtzeitigen Zellproliferationsarrest sicher-

zustellen. Für die rechtzeitige Inhibition wird beginnend in der G₂-Phase vor der terminalen Mitose das *dacapo(dap)*-Gen exprimiert. DAP-Protein bindet an Cyclin E-Cdk2-Komplexe und inhibiert diese.

In dieser Arbeit wurde untersucht, welche Mechanismen die embryonale Expression von *dap* und damit den Austritt aus dem Zellzyklus steuern. Die Analyse verschiedener Mutanten hat gezeigt, dass *dap*-Expression auch unabhängig vom vollständigen Ablauf des Zellproliferationsprogramms direkt durch Zellschicksalsdeterminanten reguliert wird. Eine Analyse der genomischen 5'-Kontrollregion von *dap* mit Hilfe von Deletions- und Reporterkonstrukten ergab, dass die Expression von *dap* in verschiedenen Geweben durch unabhängige Enhancermodule gesteuert wird. An einem dieser Enhancer wirkt der HOX-Transkriptionsfaktor Abdominal B (ABD-B), der eine zentrale Bedeutung für die Spezifizierung von Entwicklungsschicksalen besitzt. Die 5'-Kontrollregion von *dap* spielt daher eine wichtige Rolle bei der Koordination von Entwicklungsschicksal und Zellproliferation.

2 Summary

The embryonic development of a multicellular organism usually begins with a phase of exponential cell proliferation. Subsequently most cells stop proliferation and enter terminal differentiation. The extent of cell proliferation must be precisely co-ordinated with developmental processes such as pattern formation and growth.

The G₁/S-transition of the cell cycle is an important decision point for cell proliferation. At this point it is decided whether the DNA is to be replicated during S-phase and consequently, if the cell should enter another division cycle. The activity of Cyclin E-Cdk(Cyclin-dependent kinase)2-protein complexes is essential for the entry into S-phase. Conversely, timely proliferation arrest during development requires the inactivation of Cyclin E-Cdk2 complexes.

It is generally thought that Cyclin E-Cdk2 complexes are regulated by Cyclin D-Cdk4 complexes. Cyclin D-dependent kinases phosphorylate the Retinoblastoma protein Rb, thereby terminating the repression of class I genes such as *Cyclin E*. *Cyclin E* activation leads to pRb hyperphosphorylation by Cyclin E-Cdk2 complexes. This then activates E2F transcription factors that regulate expression of S-phase genes.

In this work a *Cdk4* loss of function mutant was characterized in *Drosophila melanogaster* to investigate the functional significance of Cyclin D-Cdk4 complexes during development. Surprisingly adult flies develop in the absence of *Cdk4* function, though they are of reduced size and fertility. Thus *Cdk4* is not essential for cell proliferation. However, it could be shown that Cyclin D-Cdk4 complexes stimulate growth at the level of the individual cell and also of the organism.

Conditional overexpression of *Cyclin D* and *Cdk4* demonstrates that Cyclin D-Cdk4 complexes act in the pRb pathway and can induce the transcription of *RnrS* to physiological levels independently of *Cyclin E*. *RnrS* codes for the small subunit of the ribonucleotide reductase and is a known target of E2F transcription factors. Nevertheless, overexpression of *Cyclin D-Cdk4* does not prevent the timely exit from the cell cycle in the embryonic epidermis. Therefore, Cyclin D-Cdk4 complexes are not master regulators of cell cycle entry and exit.

In contrast to Cyclin D-Cdk4 complexes, Cyclin E-Cdk2 complexes have to be inhibited to ensure timely cell proliferation arrest. This requires *dacapo* (*dap*) gene expression beginning at the G₂-Phase of the final mitosis. The DAP protein binds to and inhibits Cyclin E-Cdk2 complexes.

Mechanisms which control embryonic expression of *dap* and thus facilitate the exit from the cell cycle were investigated in this work. Analysis of different mutants demonstrated that *dap* expression is independent of the completion of the

cell division program and that it is regulated directly by cell fate determinants. Analysis of the genomic 5' control region of *dap* using deletion and reporter constructs revealed that expression of *dap* is controlled by distinct enhancer modules in different tissues. The HOX-transcription factor Abdominal B (ABD-B) acts directly on one of these enhancers. This transcription factor is of central importance for the specification of developmental fate. Thus the *dap* 5'-control region plays an important role in the co-ordination of developmental fate and cell proliferation.

3 Einleitung

Im Gegensatz zu Einzellern, deren Zellteilungsaktivität durch Umweltbedingungen bestimmt wird, muss während der Entwicklung eines Vielzellers die Teilung von Zellen und das Wachstum eines Gewebes in einem definierten räumlichen und zeitlichen Muster erfolgen. In vielen differenzierten Zelltypen von Vielzellern ist Zellteilung inkompatibel mit der ausgeprägten Zellspezialisierung. Während der Entwicklung erfolgt deshalb zunächst eine Phase der Zellvermehrung, gefolgt von einer Phase der Zelldifferenzierung. Zu einem definierten Zeitpunkt muss daher die Zellproliferation beendet werden, damit der Eintritt in die terminale Differenzierung erfolgen kann.

Viele der grundlegenden Mechanismen, welche den Ablauf des Zellteilungszyklus regulieren, wurden zunächst durch Untersuchungen in Hefen aufgeklärt (Übersicht in Nurse, 1994; Mendenhall und Hodge, 1998). Untersuchungen von kultivierten Säugerzellen haben anschließend gezeigt, dass die Hauptregulatoren der Zellproliferation evolutionär konserviert sind. Vor allem cyclinabhängige Proteinkinasen, die Cdks (Cyclin-dependent kinases), sind wichtige Regulatoren des Zellzyklus. Die Aktivität von Cdks wird positiv über die Heterodimerisierung mit Cyclinen gesteuert. Cyclin-Cdk-Komplexe regulieren den Eintritt in die einzelnen Phasen des Zellzyklus (Übersicht in Nigg, 1995). Die Mitose (M-Phase) wird durch die Aktivität von Cdk1 eingeleitet. Cdk1 bindet an die mitotischen Cycline (A- und B-Typ-Cycline) und die Aktivität der resultierenden Cyclin-Cdk1-Komplexe wird weiter durch Cdk1-Phosphorylierungen reguliert. Die CDC25-Phosphatasen, die diese inhibitorischen Phosphorylierungen wieder entfernen, sind für den Eintritt in die Mitose entscheidend (Übersicht in King et al., 1994). Der Eintritt in die S-Phase (DNA-Replikation) wird in tierischen Zellen durch Cdk4 beziehungsweise Cdk6 im Komplex mit D-Typ-Cyclinen und Cdk2 im Komplex mit E-Typ-Cyclinen gesteuert. Die Aktivität dieser Komplexe wird durch CKIs (Cyclin-dependent Kinase Inhibitor) inhibiert (Übersicht in Ekholm und Reed, 2000).

In der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* sind die Hauptregulatoren des Zellzyklus konserviert (eine Gegenüberstellung der homologen Gene in *Drosophila* und Vertebraten findet sich in Kapitel 10 dieser Arbeit). Dies ermöglicht die Untersuchung des Zellzyklus im Rahmen der Entwicklung eines Vielzellers.

3.1 Musterbildung während der Embryogenese von *Drosophila*

Während der *Drosophila*-Entwicklung entsteht innerhalb von 24 Stunden aus einer großen Eizelle eine Larve. Die Zygote wird dabei sukzessiv in immer kleinere

Zellen unterteilt. Wachstum findet hierbei im eigentlichen Sinn nicht statt, da der Embryo keine Nahrung aufnimmt und nur die von der Mutter gelieferten und in der Eizelle deponierten Nährstoffe für seine Entwicklung verwendet. Vom Genom der Mutter abgeleitete RNA und Proteine bezeichnet man als maternale Kontribution.

Die Musterbildung des *Drosophila*-Embryos erfolgt durch maternale Determinanten, die ein orthogonales Koordinatensystem aufbauen und so im Ei Positionsinformation festlegen (St Johnston und Nüsslein-Volhard, 1992). Die Determinanten bilden dabei eine anterior-posteriore und eine dorso-ventrale Achse aus Proteingradienten (Abb.1). Diese Proteingradienten führen zu unterschiedlicher Aktivierung von zygotischen Genen entlang der Achsen. Dadurch wird der Embryo in definierte Bereiche aufgeteilt, die ein spezifisches Muster von zygotischer Genaktivität aufweisen. Entlang der anterior-posterioren Achse wird dabei eine Kaskade von Transkriptionsfaktoren zygotisch exprimiert und der Embryo in immer kleinere Domänen weiter unterteilt. So werden letztendlich durch die sequentielle Aktivität von Lückengenen, Paarregelgenen und Segmentpolaritätsgenen die Segmente des Embryos festgelegt (Wolpert et al., 1998). Die etablierte positionelle Information wird genutzt, um Zellschicksalsdeterminanten zu exprimieren, meist Transkriptionsfaktoren, die dann kombinatorisch weitere Differenzierungsprozesse einleiten.

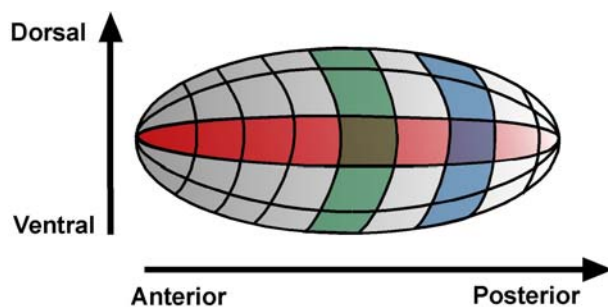


Abb. 1: Musterbildung im Embryo von *Drosophila* (nach Wolpert et al., 1998)
Schematische Darstellung eines *Drosophila*-Embryos. Die maternale Kontribution von Determinanten im *Drosophila*-Ei etabliert ein orthogonales Koordinatensystem, das die anterior-posteriore und dorso-ventrale Achse des Embryos bestimmt. Diese Positionsinformation führt zur Aktivierung zygotischer Gene, die den Embryo immer feiner unterteilen und schließlich zur Bildung von Segmenten und spezifischen Geweben führen.

Die Lücken- und Paarregelgene führen auch zur Expression von homöotischen Selektorgenen entlang der anterior-posterioren Achse. Homöotischen Selektorgene kodieren für HOX-Transkriptionsfaktoren, die in jeweils mehreren Segmenten entlang der anterior-posterioren Achse exprimiert werden. Die Kombination der Aktivität verschiedener *hox*-Gene legt die Identität eines Segments fest. Die Aktivität der Selektorgene wird, wenn sie einmal etabliert wurde, in der weiteren

Entwicklung aufrechterhalten und bestimmt so das spätere Entwicklungsschicksal eines Segmentes (Lawrence und Morata, 1994).

Die Musterbildung legt auch die Differenzierung, Morphogenese und das Wachstum verschiedener Teile der Fliege fest. Die Zellproliferation muss strikt mit diesen Entwicklungsvorgängen koordiniert werden. Die Musterbildungsprozesse müssen also während der Entwicklung den Eintritt und den Austritt aus dem Zellzyklus steuern. Sie wirken dabei letztendlich auf die Aktivität der Cdks, welche den Eintritt in S- und M-Phase des Zellzyklus regulieren (Übersicht in Edgar und Lehner, 1996).

3.2 Der Zellzyklus während der Entwicklung von *Drosophila*

In der durch die Musterbildung festgelegten Entwicklung eines *Drosophila*-Embryos werden mehrere verschiedene Typen von Zellzyklen durchlaufen (Übersicht in Orr-Weaver, 1994; Vidwans und Su, 2001). Die ersten 13 Zellzyklen im *Drosophila*-Embryo beinhalten nur Kernteilungen. Die Zytokinese unterbleibt. Im Zytoplasma des frühen Embryos wird das Genom durch Replikation verdoppelt und anschließend durch Mitosen in verschiedene Zellkerne getrennt. Diese synchron verlaufenden Zellzyklen führen so zu einem exponentiellen Anstieg von Zellkernen innerhalb der synzytialen Eizelle. Da ein synzytialer Zyklus nur 9 bis 12 Minuten dauert, kommt es zu einer extrem schnellen Vervielfachung des Genoms.

Cdk1, Cdk2, die Cycline und die String(STG)/CDC25-Phosphatase werden in Form von RNA und Protein als maternale Kontribution während der Oogenese von der Mutter im Ei deponiert. Maternal deponierte STG/CDC25-Phosphatase ermöglicht durch Aktivierung von Cdk1 den Eintritt in die Mitose (Edgar und O'Farrell, 1989; Edgar et al., 1994b). Nach einer durchlaufenen Mitose treten die Zellen wegen der ebenfalls vorhandenen Aktivität von maternalen Cyclin E-Cdk2-Komplexen sofort wieder in eine S-Phase ein (Abb.2 A).

Nach Mitose 13 werden die Vorräte an maternal gespeichertem *stg* abgebaut (Edgar und Datar, 1996). Mit der gleichzeitig einsetzenden Zellularisierung kommt es dadurch erstmals zu einer Pause nach der S-Phase, einer sogenannten Gap-Phase (G_2 -Phase) (Abb.2 B). Für weitere Mitosen in den postblastodermalen Zyklen ist die zygotische Transkription des *stg*-Gens nötig (Edgar und O'Farrell, 1989). Die *stg*-Expression unterliegt einer zeitlich und örtlich exakt differenzierten transkriptionellen Kontrolle. Die *stg*-Expression wird durch Gene reguliert, die auch das Entwicklungsschicksal festlegen (Edgar et al., 1994a; Lehman et al., 1999). Das komplexe Expressionsmuster von *stg* bestimmt dabei das Muster der embryonalen Zellteilungen (Edgar und O'Farrell, 1989; Foe, 1989). Im Gegensatz zur entwicklungsabhängigen Regulation der Mitosen erfolgt der Eintritt in die S-Phase

sofort ohne erkennbare G₁-Phase, da maternales Cyclin E weiterhin in ausreichendem Maße vorhanden ist (Knoblich et al., 1994).

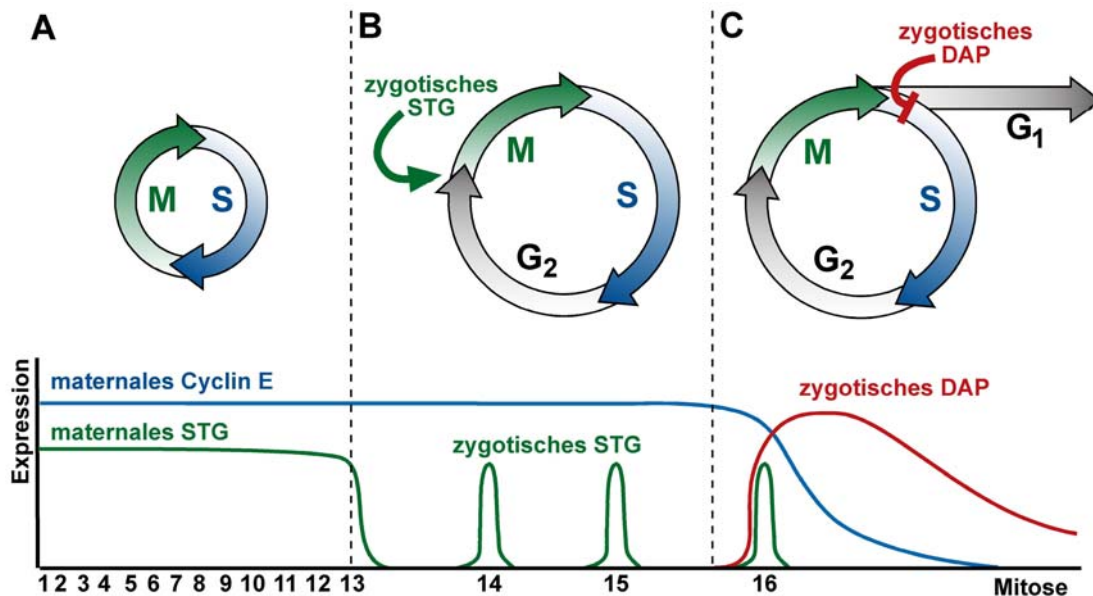


Abb. 2: Embryonale Zellzyklen in *Drosophila* (modifiziert nach Edgar und Lehner, 1996)
 A: Synzytiale Kernteilungen aus aufeinanderfolgenden S-Phasen (S) und Mitosen (M) werden durch maternales Cyclin E und STG getrieben.
 B: Nach der Zellularisierung werden Zyklus 14-16 durch zygotisch transkribiertes *stg* gesteuert, wodurch es erstmals zur Einführung einer Gap-Phase (G₂) vor der Mitose kommt.
 C: Nach Auslaufen der maternalen Cyclin E-Kontribution und transkriptioneller Aktivierung von *dap* wird der Zellzyklus verlassen und die Zellen werden in einer G₁-Phase quieszent. (Maternale *dap*- und zygotische *Cyclin E*-Expression sind in dieser Darstellung ausgelassen.)

Nach der Zellularisierung teilen sich die meisten Zellen des Embryos noch dreimal, um dann nach Mitose 16 aus dem Zellzyklus auszutreten. Dabei treten die Zellen zum ersten Mal in eine G₁-Phase ein, in der die terminale Differenzierung erfolgt (Abb. 2C). Die molekularen Mechanismen des Zellzyklusarrestes sind am besten in der embryonalen Epidermis untersucht worden, da sich die epidermalen Zellen relativ synchron teilen (Foe, 1989). In der Epidermis muss für den terminalen Austritt aus dem Zellzyklus nach Mitose 16 *Cyclin E* herunterreguliert werden. Dazu wird die zygotische Transkription von *Cyclin E* in der Epidermis beendet und zugleich läuft die maternale Kontribution an *Cyclin E*-mRNA aus (Knoblich et al., 1994).

Nach Mitose 16 ist zwar keine *Cyclin E*-mRNA, sehr wohl aber noch das stabilere Cyclin E-Protein in der Epidermis vorhanden. Um Cyclin E-Protein nach Mitose 16 zu inaktivieren, wird erstmals *dacapo* (*dap*), ein spezifischer Inhibitor der Cdk2-Kinase, zygotisch transkribiert. DAP ist ein zu den CIP/KIP-Inhibitoren aus Vertebraten homologes Protein, das an Cyclin E-Cdk2-Komplexe bindet und

diese dadurch inhibiert. In *dap*-Mutanten kann die Inhibition von Cyclin E nicht mehr erfolgen. In der Epidermis kommt es nach Mitose 16 daher zu einer ektopischen Zellteilung (de Nooij et al., 1996; Lane et al., 1996).

Ein Großteil der Zellen des Embryos verlässt zur gleichen Zeit in der Entwicklung wie die epidermalen Zellen den Zellzyklus und wird quieszent. Allerdings teilen sich Zellen des Nervensystems auch noch zu späteren Zeitpunkten. Bei diesen Teilungen handelt es sich meist um asymmetrische Teilungen von Neuroblasten, die aus dem Ektoderm schon während früherer Zyklen hervorgegangen sind. Diesen Teilungen geht zygotische Expression von *Cyclin E* und auch *stg* voraus (Richardson et al., 1993; Edgar et al., 1994a; Lehman et al., 1999; Jones et al., 2000). Die zygotische Expression von *Cyclin E* ist essentiell für diese späten S-Phasen, da sie in *Cyclin E*-Mutanten ausbleiben (Knoblich et al., 1994). Die genaue Anzahl und das Muster der Teilungen im sich bildenden Nervensystem sind jedoch oft nicht bekannt.

Des Weiteren findet vor allem in der Larve Endoreplikation statt, eine besondere Art des Zellzyklus, die bei Pflanzen und Tieren, jedoch nicht bei Vertebraten, weit verbreitet ist (Übersicht in Edgar und Orr-Weaver, 2001). In Endoreplikationszyklen wird die DNA wiederholt repliziert, ohne dass Mitosen durchlaufen werden und Zellteilung erfolgt. Das Ausbleiben von M-Phasen während der Endoreplikation wird erreicht, indem die mitotischen Regulatoren *stg*, *Cyclin A* und *Cyclin B* herunterreguliert werden (Sigrist und Lehner, 1997). Zygotische Expression von *Cyclin E* ist auch essentiell für die S-Phasen der Endoreplikationszyklen (Knoblich et al., 1994).

Die meisten Zellen der Larve entstehen bereits in der Embryogenese. Dennoch vergrößern Larven ihre Masse innerhalb von vier Tagen um etwa das zweihundertfache, während sie sich auf die Metamorphose zur adulten Fliege vorbereiten. Endoreplikation ist vermutlich ein einfacher Weg, um die nötige Gendosis für das rapide Wachstum der Larve bereitzustellen, ohne dass die Teilung terminal differenzierter Zellen erforderlich wäre (Edgar und Orr-Weaver, 2001). Endoreplikationszyklen finden jedoch auch schon vor der larvalen Entwicklung, während der Embryogenese statt. In der späten Embryogenese endoreplizieren bestimmte Zellgruppen in einem definierten Muster, beginnend mit der Speicheldrüse, dann dem anterioren und posterioren Darm und danach dem zentralen Mitteldarm (Smith und Orr-Weaver, 1991).

Schließlich werden bereits während der Entwicklung der Larve auch die Imaginalscheiben gebildet, aus denen später die Imago, die adulte Fliege, hervorgeht. Aus den 10 bis 50 Zellen einer Imaginalscheibe in einer frisch geschlüpften Larve entstehen bis zur Verpuppung bis zu 100 000 Zellen. Diese Zellen differenzieren während der Verpuppung zu Geweben wie Flügel oder Auge. Bei der Vermehrung

der imaginalen Zellen während der Larvalstadien wird sowohl die Zellzahl als auch die Zellmasse vergrößert. Diese imaginalen Zellzyklen sind durch eine G₁-Phase vor der S-Phase und eine G₂-Phase vor der Mitose gekennzeichnet und entsprechen dem „klassischen“ Zellzyklus, wie er aus Vertebraten bekannt ist. Expression von *Cyclin E* und *stg* regulieren auch hier den Eintritt in S- und M-Phase (Richardson et al., 1995; Johnston und Edgar, 1998; Neufeld et al., 1998).

3.3 Modell des G₁/S-Übergangs in Vertebraten

Basierend auf Untersuchungen in Säugern wurde ein Modell für den Eintritt in die S-Phase nach sequentieller Aktivierung von D- und E-Typ-Cyclin-Cdk-Komplexen im sogenannten Rb-Signalweg aufgestellt (Übersicht in Harbour und Dean, 2000) (Abb. 3). Dabei spielen das Retinoblastoma-Protein (Rb) und seine Homologe p107 und p130 eine entscheidende Rolle, indem sie den Übergang von der G₁- in die S-Phase reprimieren. Sie binden und inhibieren Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie, die zusammen mit ihren Partnern, den DP-Transkriptionsfaktoren, die Expression von S-Phasen-Genen aktivieren.

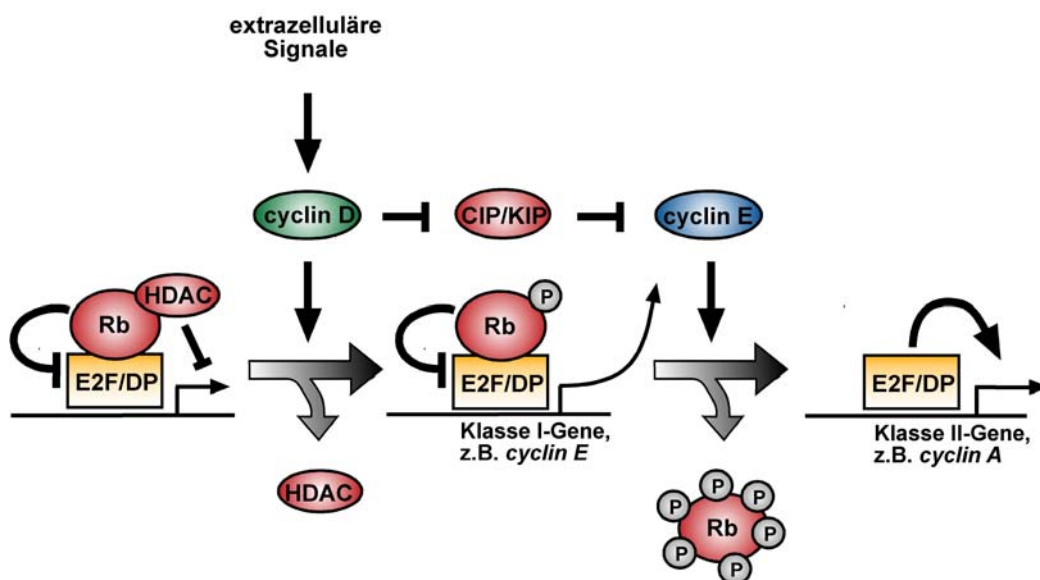


Abb. 3: Aktivierung von E2F-Zielgenen durch sequentielle Phosphorylierung von Rb (modifiziert nach Sherr und Roberts, 1999; Harbour und Dean, 2000)

Mitogene Signale induzieren *cyclin D*. Initiale Phosphorylierung von Rb durch cyclin D-cdk4/6-Komplexe hebt die aktive Repression von Klasse I-Zielgenen, wie zum Beispiel *cyclin E*, durch Dissoziation von HDAC auf. D-Typ-Cyclin-Cdk-Komplexe rekrutieren zusätzlich CIP/KIP-Typ-Inhibitoren und erhöhen so die cyclin E-Aktivität. Hyperphosphorylierung von Rb durch cyclin E-cdk2-Komplexe hebt anschließend durch Freisetzung von Rb dessen inhibitorischen Effekt auf E2F-Transkriptionsfaktoren auf.

Die Reprimierung von E2F-Zielgenen erfolgt über mehrere Mechanismen. Zum einen rekrutiert Rb Enzyme, welche die Chromatinstruktur modifizieren und somit die Initiation der Transkription verhindern, wie zum Beispiel Histondeacetylasen (HDAC) und Swi/Snf-Komplexe (Brehm et al., 1998; Magnaghi-Jaulin et al., 1998; Zhang et al., 2000). So entfernen HDACs Acetylgruppen von Histonoktameren und kondensieren dadurch das Chromatin, so dass es für die Transkription weniger zugänglich wird (Kingston und Narlikar, 1999). Außerdem verhindert die Bindung von Rb an E2F/DP-Transkriptionsfaktoren deren Fähigkeit, die Transkription von Zielgenen zu aktivieren (Chellappan et al., 1991).

In Säugerzellen werden als Folge von mitogenen Signalen D-Typ-Cycline (cyclin D1, D2, D3) und ihre Kinasepartner cdk4 und cdk6 transkriptionell hochreguliert (Sherr, 1993). D-Typ-Cyclin-Cdk-Komplexe phosphorylieren dann Rb und bewirken so die Dissoziation von HDAC und Rb, wodurch die aktive Repression der sogenannten Klasse I-Zielgene beendet wird (Harbour et al., 1999; Zhang et al., 1999; Zhang et al., 2000). Zu den Klasse I-Zielgenen gehört auch *cyclin E*. Die initiale Phosphorylierung von Rb durch D-Typ-Cyclin-Cdk-Komplexe führt also zur Induktion von cyclin E, einer regulatorischen Untereinheit von cdk2. Anschließende Hyperphosphorylierung von Rb durch cyclin E-cdk2-Komplexe hebt die inhibitorische Bindung von Rb an die E2F/DP-Transkriptionsfaktoren auf (Lundberg und Weinberg, 1998; Harbour et al., 1999). Die Freisetzung von E2F/DP-Transkriptionsfaktoren führt schließlich zur Transkription von Klasse II-Genen, wie zum Beispiel *cyclin A* (Zhang et al., 2000). Sequentielle Aktivität von cyclin D- und cyclin E-abhängigen Kinasen bewirkt damit die Steuerung der zeitlichen Abfolge des G1/S-Übergangs.

Zusätzlich wird cyclin E-Aktivität auch noch durch einen weiteren Mechanismus reguliert. cyclin E-cdk2-Komplexe werden durch Bindung von CKIs inhibiert. In Vertebraten interagieren drei CKIs, p21^{CIP1}, p27^{KIP1} und p57^{KIP2}, mit D-Typ-Cyclin-Cdk-Komplexen und mit cyclin E-cdk2-Komplexen (Übersicht in Sherr und Roberts, 1999). Dabei führt die Induktion von D-Typ-Cyclin-Cdk-Komplexen zu einer Titration der p21^{CIP1} und p27^{KIP1} Inhibitoren, so dass sich die Menge an freien cyclin E-cdk2-Komplexen erhöht. Die zweifache Funktion von D-Typ-Cyclin-Cdk-Komplexen besteht damit einerseits in der Induktion der *cyclin E*-Transkription über die inhibitorische Phosphorylierung von Rb und andererseits in der Titration von CIP/KIP-Inhibitoren.

Dieses molekulare Modell wird durch genetische Experimente gestützt. Ein starker Hinweis, dass *cyclin E* ein Hauptziel von D-Typ-Cyclinen ist, stammt aus Untersuchungen an Knockin-Mäusen (Geng et al., 1999). Um die Funktion von *cyclin D1* und *cyclin E* zu untersuchen, wurden Mäuse erzeugt, in denen die kodierende Region von *cyclin D1* durch die des *cyclin E*-Gens ersetzt wurde. *cyclin E*

steht in derartigen Mäusen also unter transkriptioneller Kontrolle des genomischen *cyclin D1*-Lokus. Die Expression von *cyclin E* im Muster von *cyclin D1* vermag die Defekte der *cyclin D1*-Nullmutante zu revertieren. Eine Erklärung hierfür ist, dass die Aufgabe von *cyclin D1* vor allem darin besteht, *cyclin E*-Expression zu induzieren.

Eine Reihe von weiteren genetischen Untersuchungen ist in Zusammenhang mit dem vorgestellten Modell von Interesse. Wenn D-Typ-Cyclin-Cdk-Komplexe an der Spitze einer regulatorischen Kaskade stehen, die in allen Zellen den Eintritt in die S-Phase steuert, sollten in *cyclin D*-Mutanten keine S-Phasen stattfinden und es damit auch keine Entwicklung mehr geben. Von den drei D-Typ-Cyclinen sind Mutanten von *cyclin D1* und *cyclin D2* erzeugt worden. Mäuse, in denen das *cyclin D1*-Gen deletiert wurde, haben spezifische Defekte, unter anderem verringerte Proliferation von Zellen der Brustdrüsen während der Schwangerschaft und Proliferationsdefekte in der Entwicklung der Retina. Außerdem zeigen *cyclin D1*-Mutanten vermindertes Wachstum (Fantl et al., 1995; Sicinski et al., 1995). *cyclin D2*-Knockout-Mäuse erscheinen phänotypisch normal, wobei jedoch mutante Weibchen steril sind (Sicinski et al., 1996). Ebenso wie die bisher untersuchten Knockouts von D-Typ-Cyclinen verhindert Verlust von *cdk4* nicht, dass sich lebensfähige Mäuse entwickeln, obwohl *cdk4*-Knockout-Mäuse klein und unfruchtbar sind (Rane et al., 1999; Tsutsui et al., 1999). Es kommt also weder in den *cyclin D1* und den *cyclin D2*- noch in *cdk4*-Knockout-Mäusen zu einem totalen Ausfall von Zellproliferation. Dies könnte daran liegen, dass essentielle Funktionen durch redundante Cycline oder Kinasen ersetzt werden können, welches nur durch die Analyse der Tripelmutante aller drei D-Typ-Cycline oder der Doppelmutante von *cdk4* und *cdk6* gezeigt werden könnte.

3.4 Problemstellung

Der Zeitpunkt des Zellproliferationsarrestes vor der terminalen Differenzierung muss mit anderen Entwicklungsvorgängen abgestimmt werden. Der zentrale Kontrollpunkt für den Ein- und Austritt aus dem Zellzyklus ist der G₁/S-Übergang. Hier wird entschieden, ob ein weiterer Zyklus durchlaufen oder ob die Zelle quieszent wird. In *Drosophila* lässt sich der Zellzyklus genetisch analysieren, wobei die essentielle Funktion von *Cyclin E* für den G₁/S-Übergang bereits gezeigt werden konnte (Knoblich et al., 1994). Eine zentrale Fragestellung dieser Arbeit war daher, wie Cyclin E-Aktivität in der Entwicklung gesteuert wird. Untersuchungen in Vertebraten legen nahe, dass Cyclin E-Aktivität vor allem durch D-Typ-Cyclin-Cdk-Komplexe reguliert wird.

Um die Bedeutung von Cyclin D-Cdk4-Komplexen in *Drosophila* zu untersuchen, wurde eine *Cdk4*-Nullmutante hergestellt. Mit Hilfe dieser Mutante wurde die Funktion von Cyclin D-Cdk4-Komplexen in *Drosophila* untersucht (Teilarbeit A). Außerdem wurde die hierarchische Stellung von Cyclin D-Cdk4-Komplexen im Rb-Signalweg im Hinblick auf die Induktion von E2F-Zielgenen und S-Phasen getestet. Insbesondere wurde auch die Notwendigkeit der Inaktivierung von Cyclin D-Cdk4-Komplexen für das Verlassen des Zellzyklus untersucht (Teilarbeit B). Schließlich wurde die transkriptionelle Regulation des CKIs DAP, der Cyclin E-Cdk2-Komplexe inhibiert, während des Austritts aus der Zellproliferation analysiert (Teilarbeit C).

4 Ausführliche Zusammenfassung der Ergebnisse

4.1 Cdk4 assoziiert mit Cyclin D

Bei der Charakterisierung der Cdk-Genfamilie in *Drosophila* wurde auch das *Cdk4*-Gen identifiziert (Sauer et al., 1996). Um zu zeigen, dass *Drosophila Cdk4* analog zu den Homologen aus Vertebraten (Matsushima et al., 1992; Meyerson et al., 1992) mit D-Typ-Cyclinen assoziiert, wurden Koimmunopräzipitationsexperimente durchgeführt.

In diesen Experimenten wurde das Gal4/UAS-System verwendet (Brand und Perrimon, 1993). Dabei werden Fliegen einer „Gal4-Treiberlinie“, welche den Gal4-Transkriptionsfaktor der Hefe unter Kontrolle eines gewebespezifischen Enhancers exprimieren, mit Fliegen gekreuzt, die ein „UAS(Upstream Activating Sequence)-Transgen“ besitzen. Im UAS-Transgen finden sich mehrere UAS-Bindungsstellen für den Gal4-Transkriptionsfaktor unmittelbar vor einem basalen Promotor. Für die Koimmunopräzipitationsexperimente wurde *arm-Gal4* als Treiberlinie verwendet, die im Embryo früh und stark exprimiert. Als UAS-Transgen wurde *UAS-Cdk4-myc* verwendet, um C-terminal mit dem humanen myc-Epitop markierte Cdk4 überzuexprimieren. Überexprimiertes Cdk4-myc-Protein wurde mit Antikörpern gegen das myc-Epitop präzipitiert und im Immunoblot kopräzipitierte Proteine mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen.

So konnte gezeigt werden, dass Cdk4 *in vivo* an Cyclin D bindet (Teilarbeit A, Abb. 1). Mit weiteren analogen Experimenten wurde gezeigt, dass Cdk4 weder andere Cycline noch den CKI DAP bindet. Cdk4 ist also auch in *Drosophila* eine mit Cyclin D assoziierte Cdk.

4.2 Cdk4 ist nicht essentiell für die Zellproliferation

Um die Funktion von Cyclin D-Cdk4-Komplexen in der Regulation der Zellproliferation zu untersuchen, wurde eine Nullmutante von *Cdk4* erzeugt (Teilarbeit A, Abb. 2). Interessanterweise ist die intragene Deletion *Cdk4*³, welche auch wichtige Teile des katalytischen Zentrums betrifft, nicht letal. Allerdings sind *Cdk4*³-Mutanten kleiner und von verminderter Fertilität. Wenn Cyclin D-Cdk4-Komplexe für den Eintritt in die S-Phase und damit für die Proliferation essentiell wären, sollten sich *Cdk4*³-Fliegen jedoch überhaupt nicht entwickeln. Im Gegensatz zu *Cdk4* ist *Cdk2*, die Partnerkinase von *Cyclin E*, absolut essentiell sowohl für den Eintritt in die S-Phase als auch für das Überleben des Organismus (Lane et al., 2000). Ebenso ist die mitotische Kinase *Cdk1* ein essentielles Gen (Stern et al., 1993).

Der milde Phänotyp der *Cdk4*³-Mutante wirft daher die Frage nach genetischer Redundanz auf. Im Prinzip könnten, wie bei Vertebraten, auch in *Drosophila* mehrere durch Cyclin D regulierte Kinasen existieren. Die genetische Elimination einer einzigen Partnerkinase müsste sich in diesem Fall nicht notwendigerweise phänotypisch manifestieren, da die verbleibenden Cyclin D-Cdk-Komplexe funktionell ausreichend sein könnten.

Mehrere Gründe sprechen jedoch dafür, dass Cdk4 die einzige Cyclin D-assoziierte Kinase in *Drosophila* ist und der Verlust von *Cdk4* zu einem vollständigen Ausfall von Cyclin D-assoziiierter Kinaseaktivität führt. In der Sequenz des *Drosophila*-Genoms konnte keine weitere nah verwandte Kinase identifiziert werden (Adams et al., 2000). Zusätzliche Evidenz konnte durch Überexpression von dominant negativer Kinase mit Hilfe des Gal4/UAS-Systems erhalten werden. Dominant negative Kinasen sind durch Punktmutationen im aktiven Zentrum (*UAS-Cdk4*^{K55M}-*myc* und *UAS-Cdk4*^{D175N}-*myc*) katalytisch inaktiv, vermögen aber noch Cyclin D zu binden (Teilarbeit A, Abb.1). Eine solche dominant negative Kinase kann dann nach Überexpression Cyclin D austitrieren. Cyclin D steht dadurch weder der endogenen Cdk4 noch möglichen weiteren mit Cyclin D assoziierenden Kinasen zur Verfügung. Überexpression von dominant negativer Kinase in wildtypischen Embryonen führt zu einer Verringerung der Größe, also einer Phänotypie des *Cdk4*³-Phänotyps (Teilarbeit A, Tabelle 1 und Abb. 3G). In *Cdk4*³-Mutanten hat eine solche Überexpression keine Verstärkung des Phänotyps zur Folge (Teilarbeit A, Tabelle 1 und Abb. 3H,I). Gäbe es weitere redundante Kinasen, die Cyclin D in *Cdk4*³-Mutanten effizient bindet, müsste die Überexpression von dominant negativer *Cdk4* insbesondere in *Cdk4*³-Mutanten eine negative Auswirkung haben. Dies wurde jedoch nicht beobachtet. Cdk4 ist daher wohl die einzige Cyclin D-assoziierte Cdk in *Drosophila*.

Angesichts des milden Phänotyps von *Cdk4*-Mutanten stellt sich die Frage nach der Funktion von Cyclin D-Cdk4-Komplexen im Rb-Signalweg. In Säugerzellen wird D-Typ-Cyclinen eine essentielle Funktion im Rb-Signalweg und diesem Signalweg wird eine entscheidende Rolle beim G₁/S-Übergang und der Kontrolle der Zellproliferation zugeschrieben. Der Rb-Signalweg ist auch in *Drosophila* funktionell (Duronio et al., 1995; Du et al., 1996; Duronio et al., 1998; Sawado et al., 1998). Das Homolog der Fliege zu Rb ist das Gen *Rbf* und *Rbf*-Nullmutationen sind embryonal letal (Du und Dyson, 1999). Um zu untersuchen, ob *Cdk4* in *Drosophila* im Rb-Signalweg wirkt, wurden genetische Interaktionstests zwischen *Cdk4* und *Rbf* durchgeführt. Wird in *Cdk4*³-Mutanten die Dosis an funktionellen *Rbf*-Genkopien halbiert, indem eine Nullmutation (*Rbf*¹¹ oder *Rbf*¹⁴) eingekreuzt wird, so erhöht sich die Fertilität von *Cdk4*³-Weibchen (Teilarbeit A, Abb. 5). Die Fertili-

tätsprobleme von *Cdk4*³-Weibchen beruhen daher wenigstens zum Teil auf einer RBF-Überfunktion. Eine Funktion von Cdk4 ist daher die Inhibition von RBF.

Evidenz für eine Funktion von Cyclin D-Cdk4-Komplexen im Rb-Signalweg wurde auch durch Untersuchungen von E2F-Zielgenen, die durch Rb und Cyclin D-Cdk4-Komplexe reguliert werden, erhalten. Es konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von *UAS-Cyclin D* und *UAS-Cdk4* ausreicht, um ein bekanntes Zielgen von E2F-Transkriptionsfaktoren, *RnrS*, zu induzieren (Teilarbeit B, Abb. 1). Generell wurde in den Überexpressionsexperimenten ein Effekt nur dann beobachtet, wenn *UAS-Cdk4* zusammen mit *UAS-Cyclin D* exprimiert wurde, nicht aber, wenn nur einer der beiden Partner exprimiert wurde. Deswegen wurde in weiteren Überexpressionsexperimenten *UAS-Cyclin D* zusammen mit *UAS-Cdk4* verwendet.

Ein weiterer Hinweis darauf, dass Cyclin D-Cdk4-Komplexen in *Drosophila* im Rb-Signalweg wirken, konnte durch Analyse des Phosphorylierungsgrades von Rb erhalten werden. Bei diesen Experimenten wurde das Maushomolog (*UAS-mRb*) in *Drosophila*-Embryonen mit dem Gal4/UAS-System überexprimiert. mRb-Protein verändert im Gegensatz zu RBF-Protein in der denaturierenden Gelelektrophorese sein Laufverhalten in Abhängigkeit vom Phosphorylierungsgrad. mRb kann als Reporter für Rb-Phosphorylierung genutzt werden, da eine Veränderung der Cyclin E-Aktivität durch Überexpression von *UAS-Cyclin E* oder *UAS-dap* einen deutlichen Effekt auf den Phosphorylierungsgrad und damit auf das Laufverhalten von mRb in der Gelelektrophorese hat (Teilarbeit A, Abb. 6). Überexpression von *UAS-Cyclin D* und *UAS-Cdk4* führt zu einer Erhöhung der hyperphosphorylierten Form von mRb.

Obwohl eine direkte Phosphorylierung von RBF durch Cyclin D-Cdk4 nicht gezeigt werden konnte, sprechen diese Ergebnisse für eine Funktion von *Cdk4* im Rb-Signalweg. Es ist wahrscheinlich, dass Cyclin D-Cdk4-Komplexe RBF direkt phosphorylieren.

Obgleich Cyclin D-Cdk4-Komplexe im Rb-Signalweg agieren, bewirkt der Verlust von Cyclin D-Cdk4-Aktivität nicht, dass der Eintritt in die S-Phase ausbleibt. Vielmehr können sich adulte Fliegen ohne Cdk4-Funktion entwickeln (Teilarbeit A). Bei genauerer Analyse von S-Phasen in *Cdk4*³ mutanten Embryonen zeigte sich, dass die späten Endoreplikationszyklen im Darm des Embryos mit Verzögerung erfolgen (Teilarbeit B, Abb. 2). Es muss aber betont werden, dass auch ohne *Cdk4* der Großteil der S-Phasen in der Entwicklung normal verläuft. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass Cyclin D-Cdk4-Komplexe keine essentielle Funktion beim Eintritt in die S-Phase in *Drosophila* haben.

4.3 Cdk4 reguliert das Wachstum

*Cdk4*³-Fliegen sind etwa 20% kleiner als wildtypische Fliegen (Teilarbeit A, Abb. 3 und Tabelle 1). Der Wachstumsdefekt von *Cdk4*³-Mutanten lässt sich auch auf zellulärer Ebene beobachten (Teilarbeit A, Abb. 4). Durch mitotische Rekombination in proliferierenden Zellen der Imaginalscheiben können Zellklone erzeugt werden. In Folge des induzierten Rekombinationsereignisses entstehen hierbei zwei genetisch unterschiedliche Tochterzellen. Durch Zellproliferation dieser Tochterzellen entstehen schließlich zwei Klone, die, je nachdem auf welche der zwei Tochterzellen sie zurückgehen, entweder homozygot für *Cdk4*³ oder wildtypisch sind (Twin Spots). Bei den hier durchgeführten Experimenten wurde genutzt, dass die mutanten Zellen durch den Verlust eines Markerproteins (GFP) identifiziert werden können. Mit Hilfe eines Zellsortierers (FACS, Fluorescence Activated Cell Sorter) können so die mutanten Zellen herausortiert und in ihrer Größe und ihrem Zellzyklusprofil mit den wildtypischen verglichen werden.

*Cdk4*³-Zellen zeigten keine Veränderung im Zellzyklusprofil, das heißt, der relative Anteil von Zellen in der G₁-, S- und G₂/M-Phase ist im Vergleich zum Wildtyp unverändert. Insbesondere zeigten sie keinen G₁-Arrest, wie für den Fall, dass *Cdk4* eine wichtige regulatorische Funktion beim Eintritt in die S-Phase ausübt, zu erwarten gewesen wäre. Allerdings nehmen *Cdk4*³-Zellklone im Epithel der Imaginalscheiben eine kleinere Fläche ein als die gleichzeitig induzierten wildtypischen Zellklone. Sie sind im Vergleich zu den wildtypischen Klonen weniger gewachsen und haben folglich weniger Zellmasse akkumuliert (Teilarbeit A, Abb. 4). Die Größe der einzelnen Zellen ist aber unverändert. *Cdk4*³-Zellklone haben also weniger Zellen von wildtypischer Größe. Aus diesen Experimenten folgt, dass *Cdk4* mutante Zellen eine reduzierte Wachstumsrate haben, die sich auf alle Phasen des Zellzyklus gleichermaßen auswirkt.

Der Effekt der reduzierten Wachstumsrate wird auch in der adulten Fliege beobachtet. Die Ober- und Unterseite des Flügels wird aus je einem einschichtigen Epithel gebildet. Jede der Zellen dieses Epithels bildet genau eine Borste. Die Anzahl der Zellen, welche die Fläche des Flügels ausfüllen, lässt sich deshalb leicht durch Zählen der Borsten bestimmen. Analog zu den Experimenten mit *Cdk4*³-Zellklonen ist auch im adulten Flügel die Gesamtzellzahl geringer. Dabei kann auf der Ebene der einzelnen Zelle kein signifikanter Größenunterschied zum Wildtyp festgestellt werden (Teilarbeit A, Tabelle 1).

Cdk4 ist also für das Wachstum von Zelle und Organismus notwendig. Da dieser Effekt auch auf Ebene einzelner Zellen beobachtet wird, ist er zellautonom und deshalb nicht die Folge einer Funktion von *Cdk4* in einem speziellen Organ, welches für die Größe der Fliege von Bedeutung ist.

4.4 Hierarchie von D- und E-Typ-Cyclin-Cdk-Komplexen

Obwohl die Hauptfunktion von *Cdk4* in der Kontrolle von Zellwachstumsraten liegt, wirkt *Cdk4* eindeutig auch im Rb-Signalweg. Um die allgemeine Gültigkeit des Modells der sequentiellen Induktion von E2F-Zielgenen in *Drosophila* zu testen, wurden *UAS-Cyclin D* und *UAS-Cdk4* im Embryo mit dem *prd-Gal4*-Treiber überexprimiert und eine eventuelle transkriptionelle Induktion potentieller Zielgene mit Hilfe der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung überprüft.

prd-Gal4 führt zur alternierenden ektopischen Expression von *UAS*-Transgenen in 7 der 14 Rumpsegmente des Embryos. Aufgrund der unmittelbaren Nachbarschaft von Streifen mit ektopischer Expression und Streifen ohne ektopische Expression innerhalb des gleichen Embryos lassen sich klare Aussagen über die Induktion von Zielgenen treffen. So konnte gezeigt werden, dass ektopische Expression von *UAS-Cyclin D* und *UAS-Cdk4* zur Induktion von *RnrS* führt. Eine ektopische Induktion von *Cyclin E* oder *Cyclin A* konnte aber nicht nachgewiesen werden (Teilarbeit B). Die Expression von *UAS-Cyclin D* und *UAS-Cdk4* induziert *RnrS* auch in *Cyclin E* mutanten Embryonen (Teilarbeit B, Abb. 1). Cyclin D-Cdk4-Komplexe induzieren also *RnrS* nicht indirekt durch vorherige Aktivierung von *Cyclin E*. Überexpression von *UAS-Cyclin E* führt in *Drosophila* ebenfalls zur Induktion von *RnrS* (Duronio und O'Farrell, 1994). Interessanterweise erfolgt dies wenigstens teilweise unabhängig von *Cdk4*-Aktivität, da auch in Fliegen, die weder maternales noch zygotisches *Cdk4* besitzen, die Induktion von *RnrS* durch Cyclin E stattfindet (Teilarbeit B, Abb. 3).

Zusätzlich zu den Überexpressionsexperimenten wurde auch die endogene Expression der E2F-Zielgene *RnrS* und des möglichen Zielgens *Cyclin E* in *Cdk4*³-Mutanten analysiert. Die Transkription von *RnrS* und *Cyclin E* ist nicht absolut abhängig von *Cdk4*-Funktion, da in *Cdk4*³-Mutanten die Expression von *RnrS* und *Cyclin E* in den meisten Geweben in normalem Muster erfolgt (Teilarbeit B, Abb. 2). In *Cdk4*³-Mutanten sind *RnrS*- und *Cyclin E*-Transkriptmengen vor allem in endoreplizierenden Geweben wie dem Darm reduziert (Teilarbeit B, Abb. 2). Mit der verringerten Expression von *Cyclin E* geht auch eine Verzögerung der S-Phasen in der zentralen Domäne des Mitteldarms (CMG) einher.

Diese Ergebnisse widersprechen einem Modell, in dem Phosphorylierung von Rb durch Cyclin D-Typ-Kinasen Voraussetzung für eine weitere Phosphorylierung durch Cyclin E-Typ-Kinasen ist. Das in der Einleitung vorgestellte Modell der sequentiellen Induktion von E2F-Zielgenen kann demnach die Verhältnisse in *Drosophila* nicht beschreiben.

4.5 Der rechtzeitige Austritt aus dem Zellzyklus erfolgt unabhängig von Cyclin D-Cdk4-Aktivität

Überexpression von *UAS-Cyclin D* und *UAS-Cdk4* führt ebenso wie Überexpression von *UAS-Cyclin E* nach Mitose 16 zur Induktion von *RnrS*. Zu diesem Zeitpunkt verlassen in der normalen Entwicklung des Embryos die Zellen der Epidermis den Zellzyklus und werden quieszent. Dieser Arrest des Zellzyklus benötigt die Herunterregulation von Cyclin E-Aktivität. Überexpression von *UAS-Cyclin E* mit dem ubiquitären Treiber *da-Gal4* interferiert mit einem terminalen Arrest der Zellproliferation, so dass in der Epidermis die meisten Zellen in eine ektopische S-Phase 17 eintreten (Knoblich et al., 1994; Teilarbeit B, Abb. 4). Im Gegensatz dazu ist Überexpression von *UAS-Cyclin D* zusammen mit *UAS-Cdk4* nach Mitose 16 nicht ausreichend, um eine zusätzliche S-Phase auszulösen und den Eintritt in die Quieszenz zu verhindern (Teilarbeit B, Abb. 4). Es ist folglich nicht nötig, die Aktivität von Cyclin D-Cdk4-Komplexen herunterzuregulieren, um den Zellzyklus zu verlassen. Dieses Ergebnis ist konsistent mit der Beobachtung, dass *Cyclin E*-Transkription durch *Cyclin D-Cdk4*-Überexpression nicht in physiologischem Maße induziert werden kann.

In der Embryogenese sind Cyclin D-Cdk4-Komplexe also nicht erforderlich für den Eintritt in die S-Phase noch ist es nötig, sie zu inaktivieren, um den Zellzyklus während der Entwicklung rechtzeitig zu verlassen. Vermutlich werden weite Teile der S-Phasen durch *Cyclin E*-Expression unabhängig von Cyclin D-Cdk4 reguliert. Cyclin D- und Cdk4-Protein und die entsprechenden RNAs sind im Embryo zwar präsent (Teilarbeit B, Supplement-Abb. 1 und 2), aber werden nicht wie *Cyclin E* dynamisch vor S-Phasen transkriptionell hochreguliert (Teilarbeit B, Abb. 2).

Obwohl die Überexpression von *UAS-Cyclin D* und *UAS-Cdk4* nicht ausreicht, um ektopische S-Phasen direkt nach Mitose 16 auszulösen, führt die Überexpression über eine längere Periode in quieszenten Zellen in einigen dieser Zellen zu ektopischen S-Phasen. Das Aufrechterhalten der Quieszenz wird also in diesen Zellen durch Überexpression von *UAS-Cyclin D* und *UAS-Cdk4* verhindert (Teilarbeit B, Abb 4). Zusammenfassend lässt sich jedoch feststellen, dass in der Embryogenese Cyclin D-Cdk4-Komplexe keine Entscheidungsträger für den Eintritt in und den Austritt aus der Proliferation sind.

4.6 Die Expression von *dap* ist unabhängig vom Durchlaufen des Zellzyklus

Für einen rechtzeitigen Austritt aus dem Zellzyklus ist es essentiell, die Aktivität von Cyclin E herunterzuregulieren. Dies geschieht nicht als Folge einer Inaktivie-

nung von Cyclin D-Cdk4-Komplexen, wie in den vorherigen Abschnitten dargelegt wurde. Vielmehr ist die Induktion des Cyclin E-Cdk2-Inhibitors DAP essentiell für diesen Zellzyklusarrest (de Nooij et al., 1996; Lane et al., 1996).

Expression von *dap* beginnt in vielen Geweben des Embryos während des letzten Zellteilungszyklus. In der Epidermis ist dies Zyklus 16. Es wäre deshalb plausibel, wenn die *dap*-Expression nach einer gewebespezifisch determinierten Anzahl von Teilungen aktiviert würde. In *Drosophila* können Embryonen zu verschiedenen Stadien der Entwicklung im Zellzyklus arretiert werden. Zum Beispiel arretieren *stg*-Embryonen vor Mitose 14, während *Cyclin A, Cyclin B* doppelmutante Embryonen vor Mitose 15 arretieren (Edgar und O'Farrell, 1989; Knoblich und Lehner, 1993). Trotzdem erfolgt in diesen Mutanten die Expression von *dap* zum korrekten Zeitpunkt in der Embryogenese, obwohl drei beziehungsweise zwei Mitosen weniger durchlaufen wurden (Teilarbeit C, Abb. 1). Deshalb ist *dap*-Expression nicht einfach die Folge des Durchlaufens einer definierten Anzahl von Zellzyklen.

4.7 Determinanten des Zellschicksals regulieren die Expression von *dap*

Das embryonale Muster der Mitosen und der *dap*-Expression korreliert mit dem Entwicklungsschicksal eines Gewebes (Foe, 1989; Arora und Nüsslein-Volhard, 1992). Die Differenzierung der Zelle geht einher mit einem Austritt aus dem Zellzyklus. *dap*-Expression ist der früheste bekannte Marker für den Austritt aus dem Zellzyklus. Die charakteristische Expression von *dap* beginnt in der Epidermis zuerst in den Tracheengruben und den posterioren Spirakeln, gefolgt von einer anschließenden Expression in der gesamten Epidermis (de Nooij et al., 1996; Lane et al., 1996).

Die Entstehung der Tracheengruben erfordert die auf die Tracheengruben beschränkte Expression der Zellschicksaldeterminanten *ventral veins lacking* (*vvl*) und *trachealess* (*trh*). Dies wird durch positionelle Information über den *wingless*(*wg*)- und den *decapentaplegic*(*dpp*)-Signalweg erreicht (Boube et al., 2000). In *vvl*- und *trh*-Mutanten bleibt die Expression von *dap* spezifisch in den Tracheengruben aus (Teilarbeit C, Abb. 2). Die Expression von *dap* wird in den sich bildenden Tracheengruben also durch die Transkriptionsfaktoren VVL und TRH reguliert.

4.8 Die Expression von *dap* wird durch eine komplexe 5'-Kontrollregion reguliert

Gibt es einen übergeordneten Faktor, der beim Austritt aus dem Zellzyklus die Expression von *dap* hoch- und die von *Cyclin E* herabreguliert? Die beobachtete Gewebespezifität der *dap*-Expression und des Zellproliferationsarrestes könnte erreicht werden, wenn solch ein Faktor durch Zellschicksalsdeterminanten wie zum Beispiel VVL oder TRH gesteuert würde. Für die korrekte Expression von *dap* würde dann ein einziges Element in der genomischen Kontrollregion ausreichen, welches von dem postulierten Faktor erkannt würde. Andererseits könnten gewebespezifische Determinanten wie VVL und TRH auch direkt die *dap*-Expression anschalten. In diesem Fall wäre jedoch eine komplexe regulatorische Region zu erwarten, da eine Vielzahl verschiedener gewebespezifischer Faktoren an sie binden müsste.

Um diese Möglichkeiten zu unterscheiden und Faktoren, welche die Expression von *dap* vermitteln, zu identifizieren, wurde die genomische 5'-Kontrollregion von *dap* untersucht. Die endogene Expression von *dap* kann durch ein Transgen, welches 6 kb der 5'-Kontrollregion enthält, in fast allen Aspekten reproduziert werden (Teilarbeit C, Abb. 4). Durch Analyse von Transgenen mit sukzessiv verkürzter 5'-Kontrollregion konnten DNA-Bereiche identifiziert werden, die für die spezifische Expression in der Epidermis benötigt werden (Teilarbeit C, Abb. 5).

Um zu testen, ob diese für epidermale Expression von *dap* nötigen Bereiche auch ausreichend sind, wurden Transgene untersucht, in denen Teile der 5'-Kontrollregion von *dap* vor einen basalen Promotor gefolgt von dem *lacZ*-Reporter gen fusioniert wurden. Das Ergebnis dieser Analysen zeigt, dass die *dap*-5'-Kontrollregion in unabhängige Enhancerbereiche unterteilt werden kann, die für eine Expression von *dap* in verschiedenen Geweben ausreichen (Teilarbeit C, Abb. 4 und 6). Dabei wurden unabhängige Enhancer für Teile des zentralen Nervensystems (CNS), des peripheren Nervensystems (PNS), der Epidermis und des Darms identifiziert. Die Expression von *dap* wird daher wohl durch mehrere unabhängige Faktoren und nicht durch einen übergeordneten Faktor gesteuert.

4.9 ABD-B bindet direkt an die 5'-Kontrollregion von *dap*

Auch innerhalb eines Gewebes wie der Epidermis wird die Expression von mindestens drei unabhängigen modularen Elementen gesteuert. Die frühe Expression in der epidermalen Region der Tracheengruben sowie die frühe Expression in den zukünftigen posterioren Spirakeln als auch die spätere Expression in der restlichen Epidermis werden von unterschiedlichen Enhancern reguliert (Teilarbeit C,

Abb. 4 und 6). Im Fall der Expression in den posterioren Spirakeln konnte ein beteiligter Transkriptionsfaktor identifiziert werden. Das Reporterkonstrukt *dap-15l* exprimiert in einem Teil des abdominalen Segmentes 8, aus dem später die posterioren Spirakeln hervorgehen. Beim Vergleich der Sequenz des Reporters *dap-15l* mit dem homologen Abschnitt des Kontrollbereichs von *dap* aus der Fliege *Drosophila virilis* konnte ein 59 bp umfassendes konserviertes Element identifiziert werden. Dieser konservierte Block (A8) enthält zwei Bindungsstellen für den Transkriptionsfaktor Abdominal B (ABD-B). Fehlen diese Bindungsstellen durch eine Deletion des konservierten Blocks A8 (*dap-15l-A8*), kommt es zum Verlust der Reporterexpression in Segment A8. Interessanterweise hat der HOX-Transkriptionsfaktor ABD-B eine dominierende Rolle bei der regulatorischen Kaskade, welche die posterioren Spirakeln in Segment A8 spezifiziert (Hu und Castelli-Gair, 1999).

Um zu testen, ob ABD-B die Expression des Reporters *dap-15l* induzieren kann, wurde *UAS-Abd-B* ektopisch mit *prd-Gal4* überexprimiert (Teilarbeit C, Abb. 6). Überexpression von *UAS-Abd-B* ist ausreichend, um die Expression des Reporterkonstrukts *dap-15l* zu induzieren. Auch die Expression von endogenem *dap* kann durch *Abd-B*-Überexpression ektopisch induziert werden. Überexpression von *Abd-B* führt allerdings auch zu einer Umspezifizierung der Epidermis von *Drosophila*, da eine Reihe von weiteren Zielgenen aktiviert wird. Die Induktion der *dap*-Transkription könnte daher eine indirekte Folge der Umspezifizierung sein. Um die direkte Bindung von ABD-B an den konservierten Block A8 zu zeigen, wurden Gelretardationsexperimente durchgeführt. Diese zeigen, dass ABD-B spezifisch den Block A8 *in vitro* binden kann (Teilarbeit C, Abb. 7). Somit ist eine direkte Regulation der *dap*-Expression durch Binden von ABD-B an die *dap*-5'-Kontrollregion naheliegend.

An diesem Beispiel zeigt sich also die direkte transkriptionelle Regulation eines Zellzyklusgens, *dap*, durch eine Zellschicksalsdeterminante, den Transkriptionsfaktor ABD-B. Allerdings müssen noch weitere Faktoren die Regulation von *dap* durch ABD-B beeinflussen, da die Expressionsmuster von *Abd-B* und *dap* nicht vollständig übereinstimmen (Celniker et al., 1989; de Nooij et al., 1996; Lane et al., 1996).

5 Diskussion

In dieser Arbeit wurden zwei Gene, *Cdk4* und *dap*, untersucht, die an der Regulation des G₁/S-Überganges beteiligt sind. Die Kenntnisse über Mechanismen der Regulation des G₁/S-Übergangs durch Kinasen wie Cdk4 und Inhibitoren wie DAP sind aufgrund einer Vielzahl molekularer und biochemischer Studien in Vertebraten weit fortgeschritten. Die Analyse der biologischen Funktionen mit genetischen Mitteln in *Drosophila* hat dabei neue Aspekte dieser in allen Eukaryoten konservierten Regulatoren aufgedeckt.

5.1 Die Bedeutung von Cyclin D-Cdk4-Komplexen in der Embryogenese

Die Zugänglichkeit von *Drosophila* für genetische Fragestellungen ermöglicht es, die regulatorische Signifikanz von Cyclin D-Cdk4-Komplexen in der Entwicklung eines Vielzellers zu testen. Überraschenderweise ist *Cdk4* in *Drosophila* nicht essentiell für den Eintritt in die S-Phase. So entwickeln sich adulte Fliegen in Abwesenheit von Cdk4-Aktivität fast normal. Die Analyse von *Cdk4*-Mutanten hat jedoch gezeigt, dass Cyclin D-Cdk4-Komplexe eine wichtige Funktion in der Regulation des Zellwachstums haben (Teilarbeit A).

Das Wachstum eines Organismus wird bestimmt durch Umweltbedingungen, wie zum Beispiel die Verfügbarkeit von Nährstoffen, und durch intrinsische genetische Faktoren. Die embryonale Zellproliferation vor dem Schlüpfen der *Drosophila*-Larve ist relativ unabhängig von der Verfügbarkeit von Nährstoffen, da maternal abgeleitete Produkte im Ei vorhanden sind. Die Zellgröße verringert sich zunächst mit jeder Teilung. Die frühen Zellzyklen besitzen noch keine G₁-Phase, die vermutlich für die Kopplung von Zellwachstum und Zellteilung genutzt wird. Die embryonale Zellproliferation in *Drosophila* verläuft weitgehend unabhängig von Cyclin D-Cdk4-Aktivität. Auch in anderen Organismen ist Cdk4 zumindest für die frühe embryonale Zellproliferation nicht essentiell. In dem Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* wurde ebenfalls ein Gen für Cdk4 (*cdk-4*) und ein Gen für Cyclin D (*cyd-1*) identifiziert. *cdk-4* und *cyd-1* sind für die frühe embryonale Proliferation nicht nötig (Park und Krause, 1999; Boxem und van den Heuvel, 2001). Auch embryonale Stammzellen der Maus haben einen sehr kurzen Zellzyklus ohne G₁-Phase (Savatier et al., 1996). D-Typ-Cycline sind in ihnen ebenso wie in der inneren Zellmasse des Präimplantationsembryos nicht nachweisbar und werden erstmals während der Gastrulation exprimiert. Frühe Proliferation des Mausembryos scheint also ebenfalls ohne Cyclin D-assoziierte Kinaseaktivität auszukommen (Savatier et al., 1996).

5.2 Koordination von Wachstum und Zellproliferation

Der einzige Zellzyklusdefekt von *Cdk4* mutanten *Drosophila*-Embryonen wurde in Zellen des zentralen Mitteldarms beobachtet, in denen die Endoreplikationszyklen verzögert ablaufen (Teilarbeit B). Von den später in der Larve stattfindenden Endoreplikationszyklen ist bekannt, dass sie durch die Verfügbarkeit von Nährstoffen kontrolliert werden (Britton und Edgar, 1998). Eine Funktion von *Cdk4* in den Endoreplikationszyklen des Embryos könnte deshalb darin begründet sein, dass im Embryo die Endoreplikationszyklen des Darms bereits wachstumskontrolliert sind, zumal Dotterproteine vom Darm aufgenommen werden. Die Endoreplikation in der Speicheldrüse der Larve kann durch Überexpression von *Cyclin D-Cdk4* stimuliert werden (Datar et al., 2000). Damit geht eine Vergrößerung der Speicheldrüse einher. Die kausalen Zusammenhänge zwischen Stimulierung der Endoreplikation und Stimulierung von Wachstum nach Überexpression von *Cyclin D-Cdk4* sind hierbei nicht geklärt.

Zusätzlich zu den wachstumskontrollierten Endoreplikationszyklen der Larve kommt es in der Entwicklung in den Imaginalscheiben zu weiterer wachstumskontrollierter Zellproliferation. Die imaginalen Zellzyklen mit einem „klassischen“ Zellzyklusprofil aus G₁-, S-, G₂- und M-Phase sind in der frühen Phase der exponentiellen Proliferation vor allem durch Wachstum kontrolliert und werden erst gegen Ende der Entwicklung durch Musterbildungsprozesse mit der Differenzierung koordiniert (Johnston und Edgar, 1998). Die Zellteilung kann in den Imaginalscheiben ähnlich wie in Zellzyklusmutanten in der Hefe vom Wachstum entkoppelt werden (Weigmann et al., 1997; Neufeld et al., 1998). Der Teilung von Hefen muss ein Mindestmaß von Wachstum, also der Akkumulation von Zellmasse, vorausgehen. Untersuchungen in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* (Johnston et al., 1977) und der Spalthefe *Schizosaccharomyces pombe* (Nurse, 1975) haben gezeigt, dass Wachstum und Zellteilung genetisch teilweise unabhängig reguliert werden. Wird in *Saccharomyces cerevisiae* der Zellzyklus durch eine Mutation in einem wichtigen regulatorischen Gen angehalten, findet trotzdem weiter Wachstum statt. Wird aber Wachstum blockiert oder reduziert, dauert es länger, bis die Hefe in die S-Phase eintritt und sich teilt, das heißt die Zellteilungsrate verlangsamt sich. Wachstum geht also der Zellteilung voraus und ist im Einzeller vor allem durch die Verfügbarkeit von Nährstoffen limitiert.

In den Imaginalscheiben von *Drosophila* lassen sich auf ähnliche Weise Wachstum und Zellteilung entkoppeln. Ektopische Expression von *Cyclin E* in Zellklonen in den Flügelimaginalscheiben führt zu einem verfrühten Eintritt in die S-Phase. Die Zellteilungsrate bleibt jedoch unverändert, da die verkürzte G₁-Phase durch einen späteren Eintritt in die Mitose ausgeglichen wird. Überexpres-

sion von *stg* führt analog zu verfrühtem Eintritt in die Mitose, wobei gleichfalls die Zellteilungsrate unverändert bleibt, da der Eintritt in die S-Phase verzögert erfolgt. Gleichzeitige Expression von *stg* und *Cyclin E* erhöht allerdings die Zellteilungsrate. Die Fläche, die der Klon einnimmt, bleibt aber unverändert, da die Wachstumsrate nicht beeinflusst wird. Folglich werden Zellen, die *stg* und *Cyclin E* überexprimieren, kleiner. Wird umgekehrt die Zellteilungsrate reduziert, indem *Rbf* überexprimiert wird, werden die Zellen größer. In beiden Fällen wird weder die totale Akkumulation von Masse des gesamten Klons noch die Musterbildung gestört. Die Klongröße bleibt somit konstant, wobei jedoch Zellzahl und Zellgröße drastisch variieren (Neufeld et al., 1998).

Im Gegensatz dazu führt Überexpression von *Cyclin D-Cdk4* in Flügelimaginalscheiben zur gleichzeitigen Erhöhung der Wachstums- und der Zellteilungsrate, so dass der Klon absolut größer wird, ohne dass sich das Zellzyklusprofil oder die Größe der einzelnen Zelle verändert (Datar et al., 2000). Umgekehrt führt der Verlust von *Cdk4* zu verringerten Wachstums- und Zellteilungsraten, so dass *Cdk4* mutante Klone kleiner werden, wobei wiederum die Größe der einzelnen Zellen wildtypisch bleibt (Teilarbeit A). In beiden Fällen sind alle Phasen des Zellzyklus in gleichem Maße betroffen. Insbesondere kommt es im Vergleich zu den anderen Phasen des Zellzyklus nicht zu einer spezifischen Veränderung der G₁-Phase. Dies zeigt, dass Cyclin D-Cdk4-Komplexe anders als Cyclin E-Komplexe nicht alleinig den Übergang von der G₁- in die S-Phase katalysieren. Vielmehr haben sie eine zellautonome wachstumsstimulatorische Funktion auf die Zelle in allen Phasen des Zellzyklus und beschleunigen alle Phasen des Zellzyklus gleichermaßen. Die Stimulierung der Zellzyklusprogression könnte dabei eine indirekte Folge der wachstumsstimulatorischen Wirkung sein.

Eine Funktion von Cyclin D-Cdk4-Komplexen könnte darin bestehen, Wachstumssignale zu vermitteln und mit dem Zellzyklus zu koordinieren. In *Drosophila* sind eine Reihe von Signalwegen die Wachstum regulieren bekannt. Der Insulinrezeptor-Signalweg beeinflusst in Abhängigkeit von der Verfügbarkeit von Nährstoffen das Wachstum (Britton und Edgar, 1998). Dabei wirkt der Insulinrezeptor-Signalweg vor allem auf die basale Translationsmaschinerie, scheint aber auch mit dem Transkriptionsfaktor MYC, dem Homologen des *myc*-Protoonkogens der Vertebraten, bei der Stimulation von Zellwachstum zu kooperieren (Übersicht in Johnston und Gallant, 2002).

Ähnlich zu Fliegen ohne *Cdk4* führt ein Verlust von Komponenten des Insulinrezeptor-Signalwegs oder die Reduzierung von MYC-Aktivität zu einer verringerten Größe der Fliege (Johnston et al., 1999; Kozma und Thomas, 2002). Allerdings ist im Gegensatz zu *Cdk4*-Mutanten die Zeitdauer der Entwicklung vom Ei zur Fliege deutlich verlängert. Außerdem führt ektoische Aktivierung des Insulin-

rezeptor-Signalweges oder Überexpression von *myc* in Klonen, anders als dies *Cyclin D-Cdk4* der Fall ist, zu verstärktem Wachstum, ohne dabei die Zellteilungsrate zu erhöhen, so dass die einzelne Zelle größer wird (Johnston et al., 1999). Diese Signalwege induzieren also ausschließlich Wachstum, ohne gleichzeitig die Zellteilungsrate zu beeinflussen, und wirken deshalb anscheinend anders als Cyclin D-Cdk4-Komplexe.

In Vertebraten sind sowohl *cyclin D2* als auch *cdk4* direkte transkriptionelle Ziele von *myc* (Hermeking et al., 2000; Bouchard et al., 2001). Daher wurde in *Drosophila*-Embryonen untersucht, ob sich MYC und Cyclin D-Cdk4 gegenseitig transkriptionell aktivieren können (Teilarbeit C). Dies konnte jedoch nicht gezeigt werden. Es ist deshalb gut möglich, dass verschiedene wachstumsregulatorische Faktoren wie MYC, Komponenten des Insulinrezeptor-Signalwegs und Cyclin D-Cdk4 in parallelen Signalwegen wirken, um das Wachstum der Zelle zu steuern. Anders als beim Insulinrezeptor-Signalweg gibt es jedoch keine Hinweise, dass Cyclin D-Cdk4-Komplexe die Verfügbarkeit von Nährstoffen signalisieren.

Eine offene Frage ist, wie die wachstumsstimulatorische Wirkung von Cyclin D-Cdk4-Komplexen erzielt wird und welche Prozesse durch Cyclin D-Cdk4 reguliert werden. Ein Substrat von Cyclin D-Cdk4-Komplexen ist sicherlich RBF. Die Überexpression von *Cyclin D-Cdk4* in der Epidermis führt zum gleichen Phänotyp wie der Verlust von *Rbf*. In beiden Fällen können einige Zellen, die den Zellzyklus verlassen haben, die Quieszenz nicht aufrechterhalten (Du et al., 1996). Auch ein Teil der wachstumsstimulatorischen Wirkung von überexprimiertem Cyclin D-Cdk4 kann durch RBF-Phosphorylierung vermittelt werden, wie in Flügelimaginalscheiben gezeigt wurde (Xin et al., 2002). Allerdings erfolgt der wachstumsstimulatorische Effekt von Cyclin D-Cdk4-Komplexen nicht ausschließlich über RBF, da in postmitotischen Zellen unabhängig von RBF Wachstum stimuliert werden kann (Datar et al., 2000; Xin et al., 2002). Es muss also weitere Substrate von Cyclin D-Cdk4-Komplexen geben.

5.3 Implikationen für die Tumorigenese

Cyclin D-Cdk4-Aktivität scheint durch bestimmte Musterbildungsprozesse reguliert zu werden. Die Zellproliferation wird in der späten Phase der Entwicklung der Imaginalscheiben durch Musterbildungsgene koordiniert (Johnston und Edgar, 1998). Der *Hedgehog(hh)*-Signalweg wirkt direkt über *cubitus interruptus (ci)*, einen Transkriptionsfaktor der Gli-Familie, auf die Transkription von *Cyclin E*, um eine letzte S-Phase in der Augenimaginalscheibe auszulösen. Gleichzeitig ist Cyclin D-Cdk4-Aktivität nötig, um einen wachstumsstimulatorischen Effekt dieses Signalweges zu vermitteln (Duman-Scheel et al., 2002). Interessanterweise wird

der Hedgehog-Signalweg in Vertebraten genau wie die D-Typ-Cycline mit einer Reihe von Syndromen sowie Krebs in Verbindung gebracht (Ruiz i Altaba, 1999).

Die Tatsache, dass in *Drosophila* Cyclin D-Cdk4-Komplexe, aber auch die Protoonkogene RAS1 und MYC (Johnston et al., 1999; Prober und Edgar, 2000) als Zellwachstumsregulatoren wirken, deutet darauf hin, dass Zellwachstumsstimulation ein integraler Bestandteil ihrer onkogenen Wirkung ist. Viele der Gene, welche sehr früh beim Eintritt in den Zellzyklus agieren, wie zum Beispiel *cyclin D*, *Rb*, und *p16^{INK4a}* wurden als Onkogene und Tumorsuppressorgene identifiziert (Übersicht in Malumbres und Barbacid, 2001). Ursprünglich wurde ihre onkogene Wirkung vor allem mit einer Funktion in der Katalyse des G₁/S-Übergangs erklärt. Die in dieser Arbeit beschriebenen Resultate zeigen, dass Cyclin D-Cdk4-Komplexe in *Drosophila* vor allem Wachstum stimulieren und nicht nur den G₁/S-Übergang katalysieren. Die wachstumstimulatorische Wirkung ist dabei zellautonom.

Auch in Vertebraten gibt es Hinweise für eine wachstumsstimulatorische Wirkung von D-Typ-Cyclin abhängigen Kinasen. Knockout-Mäuse, in denen frühe Regulatoren des G₁/S-Übergangs wie *cyclin D1* und *cdk4* deletiert wurden, zeigen ebenfalls verringertes Wachstum (Sicinski et al., 1995; Rane et al., 1999; Tsutsui et al., 1999). Es ist jedoch nicht klar, ob dies durch einen Defekt in einem wachstumsregulierenden Organ verursacht wird oder ob es sich hierbei um zellautonome Proliferationsdefekte in allen Geweben handelt. *cdk4* mutante Mäuse entwickeln Diabetes wegen einer Reduktion der β -Zellen der Langerhansschen Inseln der Bauchspeicheldrüse. Dies wird als mögliche Ursache für die verringerte Größe angeführt.

Es ist daher möglich, dass in Vertebraten Cyclin D-Cdk4-Komplexe ebenfalls wachstumsstimulierend wirken. Die häufige Erhöhung von Cyclin D-Aktivität in Tumoren mag deshalb vielleicht daran liegen, dass unkontrollierte Zellproliferation hauptsächlich durch Hyperstimulation von Zellwachstum gekoppelt mit erhöhter Zellteilungsaktivität entsteht.

5.4 Unterschiede von Cyclin D-Cdk4-Komplexen in Vertebraten und *Drosophila*

Insgesamt deuten alle Ergebnisse in *Drosophila* auf eine Funktion von Cyclin D-Cdk4 vor allem in der Stimulierung von Zellwachstum. Die Stimulierung der Zellzyklusprogression erscheint sekundär zu dieser wachstumsstimulatorischen Wirkung. Dies wirft die Frage auf, inwieweit die Situation in *Drosophila* ein Spezialfall ist. Ein Unterschied von *Drosophila* Cyclin D-Cdk4-Komplexen zu den Homologen aus Vertebraten ist, dass sie nicht in der Lage sind, den CKI DAP zu binden (Teil-

arbeit A). In Vertebraten ist eine positive Funktion der Assoziation von D-Typ-Cyclin-Cdk-Komplexen mit den CIP/KIP-Typ-Inhibitoren beim Auslösen von S-Phasen beschrieben (Übersicht in Sherr und Roberts, 1999). Induktion von D-Typ-Cyclin-Cdk-Komplexen führt zu einer Rekrutierung von CIP/KIP-Typ-Inhibitoren und dadurch zur Aktivierung von cyclin E-cdk2. Diese Regulation der Aktivität von Cyclin E scheint in *Drosophila* ausgeschlossen, da Cyclin D-Cdk4-Komplexe nicht an den CIP/KIP-Typ-Inhibitor DAP binden.

In *Drosophila* wird *Cyclin E* vielmehr direkt transkriptionell unabhängig von Cyclin D-Cdk4-Komplexen kontrolliert. Ähnlich zu der in dieser Arbeit beschriebenen Regulation des CKIs *dap* erfolgt diese Regulation von *Cyclin E* durch eine komplexe 5' Kontrollregion mit gewebespezifischen Enhancern (Jones et al., 2000). Die Kontrolle des Eintritts in die S-Phase scheint in *Drosophila* vor allem durch direkte transkriptionelle Aktivierung von *Cyclin E* zu erfolgen, während in anderen Spezies Aktivierung von *Cyclin E* strikter von Cyclin D-Cdk4 abhängt, zum Beispiel über transkriptionelle Aktivierung im Rb-Signalweg und Sequestration von Inhibitoren.

5.5 Kontrolle des Austritts aus der Zellproliferation

Der exakte Zeitpunkt des Austritts aus dem Zellzyklus muss genau reguliert werden. Grundsätzlich kann der Zeitpunkt des Austritts durch die genetische Festlegung der erlaubten Anzahl von Teilungen über einen sequentiellen oder zyklischen Mechanismus bestimmt werden (das „Zähl“-Modell). Alternativ könnte die Zeit in der Entwicklung auch durch sukzessiven Abbau einer instabilen Komponente gemessen werden (das „Sanduhr“-Modell) (Übersicht in Johnson und Day, 2000).

Ein einfaches Maß für die Anzahl der embryonalen Furchungsteilungen in dem Krallenfrosch *Xenopus laevis* und der Kernteilungen der synzytialen Zyklen in *Drosophila* ist das Verhältnis von Zytoplasma zur genomischen DNA (Newport und Kirschner, 1982; Yasuda et al., 1991). Ist ein kritisches Verhältnis erreicht, kommt es erstmals zur Transkription von zygotischen Genen, und, wie im Falle von *stg* in der Einleitung dargelegt, zu einer Kontrolle der Zellproliferation durch diese Faktoren.

Für den terminalen Arrest im weiteren Verlauf der Embryogenese von *Drosophila* sind dann zwei Ereignisse nötig. Zum einen ist das Abschalten der *Cyclin E*-Expression erforderlich zum anderen muss *dap* zygotisch transkribiert werden. Die Inaktivierung von Cyclin E ist nicht die Folge einer Inaktivierung von Cyclin D-Cdk4-Komplexen, wie in den vorherigen Abschnitten dargelegt worden ist. Der Verlust von Cyclin E-Aktivität ist aus methodischen Gründen relativ schwierig zu

untersuchen. Im Gegensatz dazu kann die Aktivierung der Expression von *dap* gut analysiert werden. Deshalb wurde untersucht, welche Faktoren die *dap*-Expression vermitteln.

In den postblastodermalen Teilungen der Epidermis kann der Mechanismus des Zählens einer definierten Anzahl an Teilungen (das „Zähl-Modell“) nicht zutreffen, da in *Drosophila*-Mutanten, die im Zellzyklus vorzeitig arretiert sind, die *dap*-Expression zum korrekten Zeitpunkt in der Entwicklung erfolgt (Teilarbeit C).

Es wurde vorgeschlagen, dass das Auslaufen der Cyclin E-Aktivität (das „Sanduhr“-Modell) während der Entwicklung letztendlich auch für die Aktivierung der Expression von *dap* ursächlich ist (de Nooij et al., 2000) und dass damit also zellzyklusintrinsic Rückkopplungsmechanismen die *dap*-Expression steuern. *dap*-Expression wäre damit die Folge einer Regulation des Zellzyklus auf anderer Ebene. Ektopisches Cyclin E kann in der Tat in geringem Ausmaß Transkription von *dap* induzieren und *dap*-Transkripte sind in *Cyclin E*-Mutanten verringert (Teilarbeit C; de Nooij et al., 2000). Dieses Modell kann aber keineswegs alle Aspekte und das dynamische Muster der *dap*-Expression in der Embryogenese erklären.

Vielmehr wurde in Teilarbeit C gezeigt, dass Zellschicksalsdeterminanten wie der HOX-Transkriptionsfaktor ABD-B und vermutlich auch TRH und VVL direkt an die 5'-Kontrollregion von *dap* binden können. Die 5'-Kontrollregion von *dap* besteht aus vielen modularen Elementen, die vermutlich durch verschiedene gewebespezifische Faktoren erkannt werden. Diese Form der transkriptionellen Regulation der Zellproliferation ist vor allem am Ende der Proliferation wichtig, in der die Musterbildung und die Differenzierung sehr genau mit der Zellproliferation koordiniert werden müssen.

Das direkte Binden eines HOX-Transkriptionsfaktors an die 5'-Kontrollregion von *dap* lässt sich gut mit neueren Modellen der Wirkung von HOX-Transkriptionsfaktoren in Einklang bringen (Akam, 1998). Obwohl HOX-Transkriptionsfaktoren eine homöotische Funktion haben, also die Identität eines Organs festlegen, wirken sie nicht nur auf einige wenige Zielgene an der Spitze einer transkriptionellen Kaskade, die dann zur weiteren Differenzierung führt. Vielmehr beeinflussen sie die Expression einer Vielzahl von Genen, die für die Differenzierung verschiedener Zelltypen benötigt werden. Es ist deshalb nicht verwunderlich, dass sie auch direkt an der Regulation des Austritts aus dem Zellzyklus, der mit der Differenzierung einhergeht, beteiligt sind.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Regulation der Zellproliferation in einem Vielzeller nicht über einen universellen Mechanismus erfolgt. In der Evolution sind vielmehr eine Vielzahl verschiedener Wege entstanden, die den Zellzyklus regulie-

ren und ihn an die speziellen Erfordernisse von Wachstum, Morphogenese und Differenzierung optimal anpassen.

6 Literaturverzeichnis

- Adams, M.D. et al. 2000. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* **287**: 2185-95.
- Akam, M. 1998. Hox genes: from master genes to micromanagers. *Curr Biol* **8**: R676-8.
- Arora, K. und C. Nüsslein-Volhard. 1992. Altered mitotic domains reveal fate map changes in *Drosophila* embryos mutant for zygotic dorsoventral patterning genes. *Development* **114**: 1003-24.
- Boube, M., M. Llimargas und J. Casanova. 2000. Cross-regulatory interactions among tracheal genes support a co-operative model for the induction of tracheal fates in the *Drosophila* embryo. *Mech Dev* **91**: 271-8.
- Bouchard, C., O. Dittrich, A. Kiermaier, K. Dohmann, A. Menkel, M. Eilers und B. Luscher. 2001. Regulation of cyclin D2 gene expression by the Myc/Max/Mad network: Myc-dependent TRRAP recruitment and histone acetylation at the cyclin D2 promoter. *Genes Dev* **15**: 2042-7.
- Boxem, M. und S. van den Heuvel. 2001. lin-35 Rb and cki-1 Cip/Kip cooperate in developmental regulation of G1 progression in *C. elegans*. *Development* **128**: 4349-59.
- Brand, A.H. und N. Perrimon. 1993. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* **118**: 401-15.
- Brehm, A., E.A. Miska, D.J. McCance, J.L. Reid, A.J. Bannister und T. Kouzarides. 1998. Retinoblastoma protein recruits histone deacetylase to repress transcription. *Nature* **391**: 597-601.
- Britton, J.S. und B.A. Edgar. 1998. Environmental control of the cell cycle in *Drosophila*: nutrition activates mitotic and endoreplicative cells by distinct mechanisms. *Development* **125**: 2149-58.
- Celniker, S.E., D.J. Keelan und E.B. Lewis. 1989. The molecular genetics of the bithorax complex of *Drosophila*: characterization of the products of the Abdominal-B domain. *Genes Dev* **3**: 1424-36.
- Chellappan, S.P., S. Hiebert, M. Mudryj, J.M. Horowitz und J.R. Nevins. 1991. The E2F transcription factor is a cellular target for the RB protein. *Cell* **65**: 1053-61.
- Datar, S.A., H.W. Jacobs, A.F. de la Cruz, C.F. Lehner und B.A. Edgar. 2000. The *Drosophila* cyclin D-Cdk4 complex promotes cellular growth. *EMBO J* **19**: 4543-54.
- de Nooij, J.C., K.H. Graber und I.K. Hariharan. 2000. Expression of the cyclin-dependent kinase inhibitor Dacapo is regulated by cyclin E. *Mech Dev* **97**: 73-83.
- de Nooij, J.C., M.A. Letendre und I.K. Hariharan. 1996. A cyclin-dependent kinase inhibitor, Dacapo, is necessary for timely exit from the cell cycle during *Drosophila* embryogenesis. *Cell* **87**: 1237-47.
- Du, W. und N. Dyson. 1999. The role of RBF in the introduction of G1 regulation during *Drosophila* embryogenesis. *EMBO J* **18**: 916-25.
- Du, W., M. Vidal, J.E. Xie und N. Dyson. 1996. RBF, a novel RB-related gene that regulates E2F activity and interacts with cyclin E in *Drosophila*. *Genes Dev* **10**: 1206-18.
- Duman-Scheel, M., L. Weng, S. Xin und W. Du. 2002. Hedgehog regulates cell growth and proliferation by inducing Cyclin D and Cyclin E. *Nature* **417**: 299-304.
- Duronio, R.J., P.C. Bonnette und P.H. O'Farrell. 1998. Mutations of the *Drosophila* dDP, dE2F, and cyclin E genes reveal distinct roles for the E2F-DP transcription factor and cyclin E during the G1-S transition. *Mol Cell Biol* **18**: 141-51.
- Duronio, R.J. und P.H. O'Farrell. 1994. Developmental control of a G1-S transcriptional program in *Drosophila*. *Development* **120**: 1503-15.
- Duronio, R.J., P.H. O'Farrell, J.E. Xie, A. Brook und N. Dyson. 1995. The transcription factor E2F is required for S phase during *Drosophila* embryogenesis. *Genes Dev* **9**: 1445-55.
- Edgar, B.A. und S.A. Datar. 1996. Zygotic degradation of two maternal Cdc25 mRNAs terminates *Drosophila*'s early cell cycle program. *Genes Dev* **10**: 1966-77.

- Edgar, B.A., D.A. Lehman und P.H. O'Farrell. 1994a. Transcriptional regulation of string (*cdc25*): a link between developmental programming and the cell cycle. *Development* **120**: 3131-43.
- Edgar, B.A. und C.F. Lehner. 1996. Developmental control of cell cycle regulators: a fly's perspective. *Science* **274**: 1646-52.
- Edgar, B.A. und P.H. O'Farrell. 1989. Genetic control of cell division patterns in the *Drosophila* embryo. *Cell* **57**: 177-87.
- Edgar, B.A. und T.L. Orr-Weaver. 2001. Endoreplication cell cycles: more for less. *Cell* **105**: 297-306.
- Edgar, B.A., F. Sprenger, R.J. Duronio, P. Leopold und P.H. O'Farrell. 1994b. Distinct molecular mechanisms regulate cell cycle timing at successive stages of *Drosophila* embryogenesis. *Genes Dev* **8**: 440-52.
- Ekhholm, S.V. und S.I. Reed. 2000. Regulation of G(1) cyclin-dependent kinases in the mammalian cell cycle. *Curr Opin Cell Biol* **12**: 676-84.
- Fantl, V., G. Stamp, A. Andrews, I. Rosewell und C. Dickson. 1995. Mice lacking cyclin D1 are small and show defects in eye and mammary gland development. *Genes Dev* **9**: 2364-72.
- Foe, V.E. 1989. Mitotic domains reveal early commitment of cells in *Drosophila* embryos. *Development* **107**: 1-22.
- Geng, Y., W. Whoriskey, M.Y. Park, R.T. Bronson, R.H. Medema, T. Li, R.A. Weinberg und P. Sicinski. 1999. Rescue of cyclin D1 deficiency by knockin cyclin E. *Cell* **97**: 767-77.
- Harbour, J.W. und D.C. Dean. 2000. The Rb/E2F pathway: expanding roles and emerging paradigms. *Genes Dev* **14**: 2393-409.
- Harbour, J.W., R.X. Luo, A. Dei Santi, A.A. Postigo und D.C. Dean. 1999. Cdk phosphorylation triggers sequential intramolecular interactions that progressively block Rb functions as cells move through G1. *Cell* **98**: 859-69.
- Hermeking, H., C. Rago, M. Schuhmacher, Q. Li, J.F. Barrett, A.J. Obaya, B.C. O'Connell, M.K. Mateyak, W. Tam, F. Kohlhuber, C.V. Dang, J.M. Sedivy, D. Eick, B. Vogelstein und K.W. Kinzler. 2000. Identification of CDK4 as a target of c-MYC. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 2229-34.
- Hu, N. und J. Castelli-Gair. 1999. Study of the posterior spiracles of *Drosophila* as a model to understand the genetic and cellular mechanisms controlling morphogenesis. *Dev Biol* **214**: 197-210.
- Johnson, M.H. und M.L. Day. 2000. Egg timers: how is developmental time measured in the early vertebrate embryo? *Bioessays* **22**: 57-63.
- Johnston, G.C., J.R. Pringle und L.H. Hartwell. 1977. Coordination of growth with cell division in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Exp Cell Res* **105**: 79-98.
- Johnston, L.A. und B.A. Edgar. 1998. Wingless and Notch regulate cell-cycle arrest in the developing *Drosophila* wing. *Nature* **394**: 82-4.
- Johnston, L.A. und P. Gallant. 2002. Control of growth and organ size in *Drosophila*. *Bioessays* **24**: 54-64.
- Johnston, L.A., D.A. Prober, B.A. Edgar, R.N. Eisenman und P. Gallant. 1999. *Drosophila* myc regulates cellular growth during development. *Cell* **98**: 779-90.
- Jones, L., H. Richardson und R. Saint. 2000. Tissue-specific regulation of cyclin E transcription during *Drosophila melanogaster* embryogenesis. *Development* **127**: 4619-30.
- King, R.W., P.K. Jackson und M.W. Kirschner. 1994. Mitosis in transition. *Cell* **79**: 563-71.
- Kingston, R.E. und G.J. Narlikar. 1999. ATP-dependent remodeling and acetylation as regulators of chromatin fluidity. *Genes Dev* **13**: 2339-52.
- Knoblich, J.A. und C.F. Lehner. 1993. Synergistic action of *Drosophila* cyclins A and B during the G2-M transition. *EMBO J* **12**: 65-74.
- Knoblich, J.A., K. Sauer, L. Jones, H. Richardson, R. Saint und C.F. Lehner. 1994. Cyclin E controls S phase progression and its down-regulation during *Drosophila* embryogenesis is required for the arrest of cell proliferation. *Cell* **77**: 107-20.

- Kozma, S.C. und G. Thomas. 2002. Regulation of cell size in growth, development and human disease: PI3K, PKB and S6K. *Bioessays* **24**: 65-71.
- Lane, M.E., M. Elend, D. Heidmann, A. Herr, S. Marzodko, A. Herzig und C.F. Lehner. 2000. A screen for modifiers of cyclin E function in *Drosophila melanogaster* identifies Cdk2 mutations, revealing the insignificance of putative phosphorylation sites in Cdk2. *Genetics* **155**: 233-44.
- Lane, M.E., K. Sauer, K. Wallace, Y.N. Jan, C.F. Lehner und H. Vaessin. 1996. Dacapo, a cyclin-dependent kinase inhibitor, stops cell proliferation during *Drosophila* development. *Cell* **87**: 1225-35.
- Lawrence, P.A. und G. Morata. 1994. Homeobox genes: their function in *Drosophila* segmentation and pattern formation. *Cell* **78**: 181-9.
- Lehman, D.A., B. Patterson, L.A. Johnston, T. Balzer, J.S. Britton, R. Saint und B.A. Edgar. 1999. Cis-regulatory elements of the mitotic regulator, string/Cdc25. *Development* **126**: 1793-803.
- Lundberg, A.S. und R.A. Weinberg. 1998. Functional inactivation of the retinoblastoma protein requires sequential modification by at least two distinct cyclin-cdk complexes. *Mol Cell Biol* **18**: 753-61.
- Magnaghi-Jaulin, L., R. Groisman, I. Naguibneva, P. Robin, S. Lorain, J.P. Le Villain, F. Troalen, D. Trouche und A. Harel-Bellan. 1998. Retinoblastoma protein represses transcription by recruiting a histone deacetylase. *Nature* **391**: 601-5.
- Malumbres, M. und M. Barbacid. 2001. To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nature Rev Cancer* **1**: 222-31.
- Matsushime, H., M.E. Ewen, D.K. Strom, J.Y. Kato, S.K. Hanks, M.F. Roussel und C.J. Sherr. 1992. Identification and properties of an atypical catalytic subunit (p34PSK-J3/cdk4) for mammalian D type G1 cyclins. *Cell* **71**: 323-34.
- Mendenhall, M.D. und A.E. Hodge. 1998. Regulation of Cdc28 cyclin-dependent protein kinase activity during the cell cycle of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 1191-243.
- Meyerson, M., G.H. Enders, C.L. Wu, L.K. Su, C. Gorka, C. Nelson, E. Harlow und L.H. Tsai. 1992. A family of human cdc2-related protein kinases. *EMBO J* **11**: 2909-17.
- Neufeld, T.P., A.F. de la Cruz, L.A. Johnston und B.A. Edgar. 1998. Coordination of growth and cell division in the *Drosophila* wing. *Cell* **93**: 1183-93.
- Newport, J. und M. Kirschner. 1982. A major developmental transition in early *Xenopus* embryos: II. Control of the onset of transcription. *Cell* **30**: 687-96.
- Nigg, E.A. 1995. Cyclin-dependent protein kinases: key regulators of the eukaryotic cell cycle. *Bioessays* **17**: 471-80.
- Nurse, P. 1975. Genetic control of cell size at cell division in yeast. *Nature* **256**: 547-51.
- Nurse, P. 1994. Ordering S phase and M phase in the cell cycle. *Cell* **79**: 547-50.
- Orr-Weaver, T.L. 1994. Developmental modification of the *Drosophila* cell cycle. *Trends Genet* **10**: 321-7.
- Park, M. und M.W. Krause. 1999. Regulation of postembryonic G(1) cell cycle progression in *Caenorhabditis elegans* by a cyclin D/CDK-like complex. *Development* **126**: 4849-60.
- Prober, D.A. und B.A. Edgar. 2000. Ras1 promotes cellular growth in the *Drosophila* wing. *Cell* **100**: 435-46.
- Prober, D.A. und B.A. Edgar. 2001. Growth regulation by oncogenes--new insights from model organisms. *Curr Opin Genet Dev* **11**: 19-26.
- Rane, S.G., P. Dubus, R.V. Mettus, E.J. Galbreath, G. Boden, E.P. Reddy und M. Barbacid. 1999. Loss of Cdk4 expression causes insulin-deficient diabetes and Cdk4 activation results in beta-islet cell hyperplasia. *Nat Genet* **22**: 44-52.
- Richardson, H., L.V. O'Keefe, T. Marty und R. Saint. 1995. Ectopic cyclin E expression induces premature entry into S phase and disrupts pattern formation in the *Drosophila* eye imaginal disc. *Development* **121**: 3371-9.

- Richardson, H.E., L.V. O'Keefe, S.I. Reed und R. Saint. 1993. A Drosophila G1-specific cyclin E homolog exhibits different modes of expression during embryogenesis. *Development* **119**: 673-90.
- Ruiz i Altaba, A. 1999. Gli proteins and Hedgehog signaling: development and cancer. *Trends Genet* **15**: 418-25.
- Sauer, K., K. Weigmann, S. Sigrist und C.F. Lehner. 1996. Novel members of the cdc2-related kinase family in Drosophila: cdk4/6, cdk5, PFTAIRE, and PITSLRE kinase. *Mol Biol Cell* **7**: 1759-69.
- Savatier, P., H. Lapillonne, L.A. van Grunsven, B.B. Rudkin und J. Samarut. 1996. Withdrawal of differentiation inhibitory activity/leukemia inhibitory factor up-regulates D-type cyclins and cyclin-dependent kinase inhibitors in mouse embryonic stem cells. *Oncogene* **12**: 309-22.
- Sawado, T., M. Yamaguchi, Y. Nishimoto, K. Ohno, K. Sakaguchi und A. Matsukage. 1998. dE2F2, a novel E2F-family transcription factor in Drosophila melanogaster. *Biochem Biophys Res Commun* **251**: 409-15.
- Sherr, C.J. 1993. Mammalian G1 cyclins. *Cell* **73**: 1059-65.
- Sherr, C.J. und J.M. Roberts. 1999. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* **13**: 1501-12.
- Sicinski, P., J.L. Donaher, Y. Geng, S.B. Parker, H. Gardner, M.Y. Park, R.L. Robker, J.S. Richards, L.K. McGinnis, J.D. Biggers, J.J. Eppig, R.T. Bronson, S.J. Elledge und R.A. Weinberg. 1996. Cyclin D2 is an FSH-responsive gene involved in gonadal cell proliferation and oncogenesis. *Nature* **384**: 470-4.
- Sicinski, P., J.L. Donaher, S.B. Parker, T. Li, A. Fazeli, H. Gardner, S.Z. Haslam, R.T. Bronson, S.J. Elledge und R.A. Weinberg. 1995. Cyclin D1 provides a link between development and oncogenesis in the retina and breast. *Cell* **82**: 621-30.
- Sigrist, S.J. und C.F. Lehner. 1997. Drosophila fizzy-related down-regulates mitotic cyclins and is required for cell proliferation arrest and entry into endocycles. *Cell* **90**: 671-81.
- Smith, A.V. und T.L. Orr-Weaver. 1991. The regulation of the cell cycle during Drosophila embryogenesis: the transition to polyteny. *Development* **112**: 997-1008.
- St Johnston, D. und C. Nüsslein-Volhard. 1992. The origin of pattern and polarity in the Drosophila embryo. *Cell* **68**: 201-19.
- Stern, B., G. Ried, N.J. Clegg, T.A. Grigliatti und C.F. Lehner. 1993. Genetic analysis of the Drosophila cdc2 homolog. *Development* **117**: 219-32.
- Tsutsui, T., B. Hesabi, D.S. Moons, P.P. Pandolfi, K.S. Hansel, A. Koff und H. Kiyokawa. 1999. Targeted disruption of CDK4 delays cell cycle entry with enhanced p27(Kip1) activity. *Mol Cell Biol* **19**: 7011-9.
- Vidwans, S.J. und T.T. Su. 2001. Cycling through development in Drosophila and other metazoa. *Nat Cell Biol* **3**: E35-9.
- Weigmann, K., S.M. Cohen und C.F. Lehner. 1997. Cell cycle progression, growth and patterning in imaginal discs despite inhibition of cell division after inactivation of Drosophila Cdc2 kinase. *Development* **124**: 3555-63.
- Wolpert L, R. Beddington, J. Brockes, T. Jessell, P. Lawrence und E. Meyerowitz. 1998. Principles of Development. Oxford University Press, London.
- Xin, S., L. Weng, J. Xu und W. Du. 2002. The role of RBF in developmentally regulated cell proliferation in the eye disc and in Cyclin D/Cdk4 induced cellular growth. *Development* **129**: 1345-56.
- Yasuda, G.K., J. Baker und G. Schubiger. 1991. Temporal regulation of gene expression in the blastoderm Drosophila embryo. *Genes Dev* **5**: 1800-12.
- Zhang, H.S., M. Gavin, A. Dahiya, A.A. Postigo, D. Ma, R.X. Luo, J.W. Harbour und D.C. Dean. 2000. Exit from G1 and S phase of the cell cycle is regulated by repressor complexes containing HDAC-Rb-hSWI/SNF and Rb-hSWI/SNF. *Cell* **101**: 79-89.
- Zhang, H.S., A.A. Postigo und D.C. Dean. 1999. Active transcriptional repression by the Rb-E2F complex mediates G1 arrest triggered by p16INK4a, TGFbeta, and contact inhibition. *Cell* **97**: 53-61.

7 Teilarbeiten

7.1 Teilarbeit A

Claas A. Meyer, Henning W. Jacobs, Sanjeev A. Datar, Wei Du, Bruce A. Edgar and Christian F. Lehner (2000)

***Drosophila* Cdk4 is required for normal growth and is dispensable for cell cycle progression.**

EMBO J. **19**, 4533-4542

7.2 Teilarbeit B

Claas A. Meyer, Henning W. Jacobs and Christian F. Lehner (2002)

Cyclin D-Cdk4 is not a master regulator of cell multiplication in *Drosophila* embryos.

Curr Biol., **12**, 661-666

7.3 Teilarbeit C

Claas A. Meyer, Ina Kramer, Rainer Dittrich, Sandra Marzodko, Jan Emmerich and Christian F. Lehner (2002)

***Drosophila* p27^{Dacapo} expression during embryogenesis is controlled by a complex regulatory region independent of cell cycle progression.**

Development, **129**, 319-328

8 Darstellung des Eigenanteils

8.1 Darstellung des Eigenanteils an Teilarbeit A

Die Charakterisierung der *Cdk4*-Mutante wurde von mir durchgeführt (Tabelle I; Abb. 1; Abb. 2 C,D; Abb. 3; Abb. 5; Abb. 6). Die ursprüngliche Identifizierung und Erzeugung der *Cdk4*-Mutante, die Isolierung der *Cyclin D*-cDNA, die Herstellung der *Cyclin D*-Transgenkonstrukte und die Charakterisierung der Fertilität von *Cdk4*-Mutanten erfolgte durch H. Jacobs (Abb. 2 A,B; Supplement Abb. 1). Die klonale Analyse in Imaginalscheiben wurde durch S. Datar und B. Edgar durchgeführt (Abb. 4). Von W. Du wurden Antikörper und Fliegen zur Verfügung gestellt. Die Publikation wurde von Christian Lehner, Henning Jacobs und mir verfasst.

8.2 Darstellung des Eigenanteils an Teilarbeit B

Die Experimente zu Abb. 1, 2, 3 sowie S1 und S2 des Supplements wurden von mir durchgeführt. Die Abb. 4 zugrundeliegenden Experimente erfolgten durch Henning Jacobs. Die Publikation wurde von Christian Lehner und mir verfasst.

8.3 Darstellung des Eigenanteils an Teilarbeit C

Die Untersuchung der *dap*-Expression in Zellzyklusmutanten erfolgte durch Ina Kramer und mich (Abb. 1). Die Expression von *dap* in den Tracheengruben wurde von Jan Emmerich unter meiner Anleitung analysiert (Abb. 2). Der Vergleich von *dap* aus *Drosophila melanogaster* und *Drosophila virilis* erfolgte durch mich (Abb. 4). Die *dap*-Deletionskonstrukte wurden von Rainer Dittrich, Ina Kramer und mir untersucht (Abb. 5 A-F). Die Reporterkonstrukte (Abb. 6) und die Gelretardationsexperimente (Abb. 7) wurden von mir erstellt und analysiert. Die *Drosophila virilis* *dap*-Sequenzen wurden von Sandra Marzodko isoliert. Die Analysen der *dap*-Expression im Nervensystem erfolgten durch Rainer Dittrich (Abb. 3 und Abb. 5 G, H). Die Publikation wurde von Christian Lehner und mir verfasst.

9 Genbezeichnungen

Gegenüberstellung der verwendeten Genbezeichnungen aus *Drosophila* und, sofern bekannt, von Homologen aus Vertebraten:

Drosophila

Vertebraten

<i>Abd-B</i> (<i>Abdominal-B</i>)	<i>hox9-13</i>
<i>arm</i> (<i>armadillo</i>)	<i>β-catenin</i>
<i>Cdk1</i> (<i>Cyclin-dependent kinase 1</i>)	<i>cdk1</i>
<i>Cdk2</i> (<i>Cyclin-dependent kinase 2</i>)	<i>cdk2</i>
<i>Cdk4</i> (<i>Cyclin-dependent kinase 4</i>)	<i>cdk4, cdk6</i>
<i>ci</i> (<i>cubitus interruptus</i>)	<i>gli1, gli2, gli3</i>
<i>Cyclin A</i>	<i>cyclin A1, cyclin A2</i>
<i>Cyclin B</i> ,	<i>cyclin B1, cyclin B2,</i>
<i>Cyclin B3</i>	<i>cyclin B3</i>
<i>Cyclin D</i>	<i>cyclin D1, cyclin D2, cyclin D3</i>
<i>Cyclin E</i>	<i>cyclin E1, cyclin E2</i>
<i>da</i> (<i>daughterless</i>)	bHLH-Transkriptionsfaktor
<i>dap</i> (<i>dacapo</i>)	<i>p21^{CIP1}, p27^{KIP1}, p57^{KIP2}</i>
<i>DP1</i>	<i>DP1, DP2</i>
<i>dpp</i> (<i>decapentaplegic</i>)	TGF-β/BMP-Familie
<i>E2F1, E2F2</i>	<i>E2F1-E2F6</i>
<i>hh</i> (<i>hedgehog</i>)	<i>shh, ihh, dhh</i>
<i>myc</i>	<i>c-myc</i>
<i>prd</i> (<i>paired</i>)	<i>pax3, pax7</i>
<i>Ras1</i>	<i>c-ras</i>
<i>Rbf</i>	<i>Rb, p107, p130</i>
<i>RnrS</i> (<i>Ribonucleotidreductase Small subunit</i>)	<i>rnr2</i>
<i>stg</i> (<i>string</i>)	<i>cdc25C</i>
<i>trh</i> (<i>trachealess</i>)	POU-Domänen-Transkriptionsfaktor
<i>vvl</i> (<i>ventral veins lacking</i>)	bHLH/PAS-Transkriptionsfaktor
<i>wg</i> (<i>wingless</i>)	WNT-Familie

Danke

Christian Lehner danke ich für die erstklassige Ausbildung und für seine großartige Unterstützung, vor allem auch in „harten“ Zeiten.

Henning Jacobs danke ich für die „Henning´sche Schule“ und Jan Emmerich für den Spass, ihn zu betreuen.

Den „Hilfskräften“, allen voran Brigitte Jaunich und Petra Helies, danke ich für ihre oft unsichtbare Unterstützung.

Oliver, Alf, Carsten, Hubert, Joachim und all die anderen waren gute Mitstreiter im Labor, ebenso wie im lieblichen Bayreuth.

Stefan und Doris möchte ich für viele schöne Abende (und die „Einführung“ ins babysitten) danken.

Und am Ende doch nicht zuletzt möchte ich Ina, Christel und Meinert dafür danken, das sie immer für mich da sind und mir viel Mut gemacht haben.

Erklärung

Hiermit versichere ich, die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt zu haben.

Ferner erkläre ich, dass ich weder an der Universität Bayreuth, noch an einer anderen Hochschule versucht habe, eine Dissertation einzureichen, oder mich einer Promotionsprüfung zu unterziehen.

Claas Meyer

Bayreuth, 16.8.2002