

Aus dem Bereich Entwicklungsbiologie
Theoretische Medizin und Biowissenschaften
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

**Analyse von Wechselwirkungen der Homeodomän-
interagierenden Proteinkinase (Hipk) in *Drosophila
melanogaster* unter besonderer Berücksichtigung des
Interaktionspartners Spenito (Nito)**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2014

Vorgelegt von Denise Nicole Dewald
Geboren am 28. August 1984 in Saarbrücken-Dudweiler

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
ad	auffüllen auf
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat
BiFC	Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation
BL	Bloomington Stock Center (Stammbezeichnung: + Nummer)
bp	Basenpaare
bezgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
C	Cytosin
CaCl ₂	Calciumchlorid
Ci	Curie
cDNA	komplementäre DNA (copy DNA)
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Cre	cyclisches AMP-Response Element
C-terminal	carboxyterminal (Protein)
CYFP	C-terminales Fragment von YFP
CyO	Curly of Oster
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
DGRC	Drosophila Genomics Resource Center
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DIC	Differentieller Interphasenkontrast, Nomarski-Kontrast

Dig	Digoxigenin
d.h.	das heißt
deion.	deionisiertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DSHB	Developmental Studies Hybridoma Bank
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dUTP	Desoxyuraciltriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(β -aminoethylether)N,N,N',N'-Tetraessigsäure
<i>et al.</i>	et alii / et aliae (lat. "und andere")
F1	1. Filialgeneration
F2	2. Filialgeneration
Flp	Flipase
FRT	Flp Rekombinase Target
g (Normwert)	Erdbeschleunigung ($g = 9.80665 \text{ m/s}^2$)
g	Gramm
γ	Gamma-
G	Guanin
G0	G0-Generation, Ausgangsgeneration
GFP	Green Fluorescent Protein
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde(n)
H ₂ O	Wasser
HCl	Salzsäure
HybMix	Hybridisierungsmix
Ig	Immunglobulin
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalaktopyranosid
IRD	Infrared Dye
kb	Kilobasenpaare
KCl	Kaliumchlorid

kDa	Kilodalton
l	Liter
lacZ	Beta-Galaktosidase-Gen
LB	Luria Bertani Medium
LiCl	Lithiumchlorid
M	Molarität
μ	mikro-
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
MARCM	Mosaic Analysis with a Repressible Cell Marker
max.	maximal
Mb	Megabasenpaare
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
mM	Millimolarität
min	Minute(n)
ml	Milliliter
MnCl ₂	Manganchlorid
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	messenger-RNA
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ HPO ₄ (2H ₂ O)	di-Natirumhydrogenphosphat-Dihydrat
NaH ₂ PO ₄ (H ₂ O)	Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat
NaOH	Natriumhydroxid
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ng	Nanogramm
NHS	normales Pferdeserum (normal horse serum)
nm	Nanometer
N-terminal	aminoterminal (Protein)
NYFP	N-terminales Fragment von YFP
OD	Optische Dichte (Wellenlänge in nm tiefgestellt angegeben)
³² P	Phosphorisotop ³² P, radioaktiv

PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate Buffered Saline
PBL	Phosphate Buffered Lysin
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEG	Polyethylenglykol
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
pg	Pikogramm
pH	Pondus hydrogenii; $\text{pH} = -\log c(\text{H}_3\text{O}^+)$
PIPES	Piperazin-N,N'-bis(2-ethansulfonsäure)
pmol	Pikomol
Pro	Prolin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RbCl ₂	Rubidiumchlorid
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz (<i>RNA-Silencing</i>)
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute)
RRM	RNA-Erkennungsmotiv (RNA recognition motif)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
Sb	Stubble (kurze Borsten)
Sco	Scutoid (fehlende Borsten)
SD	Selective Dropout (Hefe-Selektion)
SDS	Natriumdodecylsulfat (Sodiumdodecylsulfat)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Ser	Serin
Ser	Serrate (gekerbte Flügel)
SOC	Super Optimal broth with Catabolite repression (Kulturmedium)
SPOC	Spen paralog and ortholog c-terminal domain
SSC	Standard-Saline-Citrat-Puffer
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>

Tb	Tubby (Larven und Fliegen sind kleiner und dicker)
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tertramethylethylendiamin
Thr	Threonin
TM3	Third multiple 3 (<i>Drosophila</i> -Balancer, 3.Chromosom)
TM6	Third multiple 6 (<i>Drosophila</i> -Balancer, 3.Chromosom)
Tris	α,α,α -Tris-(hydroxymethyl)-methylamin
Tris (-HCl)	Tris-Base (mit HCl auf den notwendigen pH-Wert eingestellt)
Triton X-100	Octoxinol-9
Tween20	Polyoxyethylen-20-sorbitanmonooleat
UAS	Upstream Activating Sequence
U	Unit(s) (Enzymeinheit)
UV	ultraviolettes Licht
V	Volt
vgl.	vergleiche
VDRC	Vienna <i>Drosophila</i> RNAi Center
W	Watt
wt	Wildtyp
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-Galaktopyranosid
Y2H	Yeast-Two-Hybrid
YFP	Yellow Fluorescent Protein
YNB	Yeast Nitrogen Base
YPD	Yeast Peptone Dextrose, Kulturmedium für Hefen
yw	<i>yellow-white</i>
z.B.	zum Beispiel
%	Prozent
% (w/v)	Gewichtsprozent (weight per volume)
% (v/v)	Volumenprozent (volume per volume)
~	ungefähr
∞	unendlich
♀	weiblich
♂	männlich
°C	Grad Celsius

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	1
1.1 Analyse von Wechselwirkungen der Homeodomän-interagierenden Proteinkinase (Hipk) in <i>Drosophila melanogaster</i> unter besonderer Berücksichtigung des Interaktionspartners Spenito (Nito)	1
1.2 Analysis of interactions of the homeodomain interacting protein kinase (Hipk) in <i>Drosophila melanogaster</i> in special consideration of the interaction partner Spenito (Nito)	2
2. Einleitung	4
2.1 Die Fruchtfliege <i>Drosophila melanogaster</i> als Modellorganismus.....	4
2.2 Die Homeodomän-interagierende Proteinkinase (Hipk)	6
2.3 Das SPOC-Protein Spenito (Nito)	10
2.4 Die Homeodomän-Transkriptionsfaktoren Empty spiracles (Ems) und Muscle segment homeobox (Msh)	12
2.5 Zielsetzung der Arbeit	15
3. Material und Methoden	16
3.1 Material	16
3.1.1 Antikörper.....	16
3.1.1.1 primäre Antikörper	16
3.1.2.1 sekundäre Antikörper.....	16
3.1.2 verwendete Mikroorganismen	16
3.1.2.1 Bakterienstämme	16
3.1.2.2 Hefestämme	17
3.1.3 Fliegenstämme.....	17
3.1.4 DNA-Klone.....	18
3.1.5 Vektoren	19
3.1.6 Oligonukleotide (Primer).....	21
3.1.7 Lösungen und Puffer.....	25
3.1.8 Medien	29
3.1.9 Kits.....	31
3.1.10 Geräte.....	31
3.1.11 Bezugsquellen.....	32

3.2 Methoden.....	33
3.2.1 Herstellung chemisch kompetenter Zellen (Rubidiumchlorid-Methode).....	33
3.2.2 Restriktionsverdau	33
3.2.3 Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten in Agarosegelen	34
3.2.4 DNA-Isolierung aus Agarosegelen.....	34
3.2.5 Dephosphorylierung mit rAPid Alkaline Phosphatase	34
3.2.6 Ligation.....	35
3.2.7 Transformation von chemisch kompetenten Bakterien mit Plasmid-DNA.....	35
3.2.8 Klonierung mit dem TOPO [®] TA Cloning [®] Kit (Invitrogen).....	35
3.2.9 Klonierung mit dem TOPO [®] XL PCR Cloning Kit (Invitrogen)	36
3.2.10 Klonierung mit dem pCR [®] 8/GW/TOPO [®] TA Cloning Kit (Invitrogen).....	36
3.2.11 Klonierung mit dem Gateway [®] LR Clonase [™] II Enzym Mix (Invitrogen).....	37
3.2.12 Plasmid-Isolierung mittels alkalischer Lyse	38
3.2.13 Plasmid-Isolierung mittels peqGold Plasmid Miniprep Kit	38
3.2.14 Plasmid-Isolierung mittels QIAGEN Plasmid Midi Kit.....	38
3.2.15 Isolierung genomischer DNA aus Fliegen.....	38
3.2.16 Polymerasekettenreaktion (PCR).....	39
3.2.16.1 Standard-PCR	39
3.2.16.2 Splicing by overlap extension (SOE)-PCR.....	40
3.2.16.3 Anfügen von 3'-A-Überhängen	40
3.2.17 Sequenzierung von DNA	41
3.2.18 Herstellung einer Digoxigenin-markierten DNA-Sonde	42
3.2.19 Kontrolle der Sonden im Dot Blot.....	42
3.2.20 Expression und Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen.....	43
3.2.21 Expression und Aufreinigung von Hipk als GST-Fusionsprotein.....	43
3.2.22 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	44
3.2.23 Phosphorylierungsassay.....	45
3.2.24 Lithium-Acetat-Transformation in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	45
3.2.25 Mating verschiedener Paarungstypen von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	46
3.2.26 Colony-lift Filter-Assay	46
3.2.27 Fliegenzucht.....	47
3.2.28 Absammeln von virginellen Weibchen (Jungfrauen) für Kreuzungen.....	47

3.2.29 Phänotypische Bewertung	47
3.2.30 Rekombination.....	47
3.2.31 P-Element-vermittelte Keimbahntransformation bei <i>Drosophila melanogaster</i>	48
3.2.32 Keimbahntransformation bei <i>Drosophila melanogaster</i> mittels PhiC31-Integrase ..	49
3.2.33 Durchführung Keimbahntransformation	50
3.2.33.1 Injektionsmaterial	50
3.2.33.2 Absammeln, Dechorionieren und Aufreihen von Embryonen	50
3.2.33.3 Injektion.....	50
3.2.33.4 Behandlung injizierter Embryonen.....	51
3.2.33.5 Selektion von Transformanten.....	51
3.2.33.6 Balancierung transgener Fliegen	51
3.2.34 „Ends-Out Gene Targeting“: Mobilisierung eines Donor-Konstrukts	52
3.2.35 MARCM-Analysen.....	54
3.2.36 Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (BiFC) in <i>Drosophila melanogaster</i> ...	55
3.2.37 Antikörperfärbungen an <i>Drosophila</i> -Embryonen.....	56
3.2.38 Antikörperfärbungen an larvalen Geweben von <i>Drosophila melanogaster</i>	57
3.2.39 Whole Mount <i>in situ</i> Hybridisierung an <i>Drosophila</i> -Embryonen.....	57
3.2.40 <i>in situ</i> Hybridisierung an larvalen Geweben von <i>Drosophila melanogaster</i>	58
3.2.41 Kernfärbung mit DAPI (4',6-Diamidin-2-Phenylindol).....	59
3.2.42 Lichtmikroskopie	60
3.2.43 Fluoreszenzmikroskopie	60
3.2.44 Konfokale Mikroskopie	60
4. Ergebnisse	61
4.1 Untersuchung der Interaktion zwischen Nito und Hipk	61
4.1.1 Colokalisation der Expression von <i>nito</i> und <i>hipk</i>	61
4.1.2 <i>in vitro</i> Phosphorylierungsanalysen.....	63
4.1.2.1 Nachweis von Nito als Hipk-Substrat.....	63
4.1.2.2 Eingrenzung der phosphorylierten Regionen von Nito	65
4.1.2.3 Bestimmung der Phosphorylierungsstellen von Nito durch <i>in vitro</i> Mutagenese .	67
4.1.3 <i>in vivo</i> Analyse der Interaktion zwischen Hipk und Nito.....	72
4.1.3.1 Yeast-Two-Hybrid(Y2H)-Analysen	72
4.1.3.2 Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (BiFC) in <i>Drosophila</i> <i>melanogaster</i>	76
4.1.4 Fehlexpressionsanalysen und RNA-Interferenz-Studien.....	81

4.1.4.1 Herstellung transgener Fliegen zur ektopischen Expression von <i>nito</i>	81
4.1.4.2 Überexpression von <i>nito</i>	82
4.1.4.3 Reduktion der <i>nito</i> -Gendosis durch RNA-Interferenz.....	84
4.1.4.4 Einfluss von <i>hipk</i> auf <i>nito</i> -abhängige Phänotypen	86
4.1.5 <i>in vivo</i> Analyse von <i>nito</i> -Phosphomutanten	89
4.1.5.1 Erzeugung transgener Linien zur Expression von <i>nito</i> -Phosphomutanten.....	89
4.1.5.2 Ektopische Expression der <i>nito</i> -Phosphomutanten	92
4.2 Weiterführende Analyse des SPOC-Proteins Nito	94
4.2.1 Untersuchung der Expression von Nito auf Proteinebene	94
4.2.1.1 Herstellung eines Antikörpers gegen Nito.....	94
4.2.1.2 Die Expression von Nito auf Proteinebene.....	95
4.2.1.3 Colokalisations-Analysen	98
4.2.2 Erzeugung einer <i>nito</i> -Mutante durch „Ends-Out Gene Targeting“	101
4.2.2.1 Klonierung und Injektion des pW25 <i>nito</i> HomAHomB Targeting-Konstrukts ...	101
4.2.2.2 Mobilisierung des Targeting-Konstrukts.....	103
4.2.2.3 Verifizierung der homologen Rekombination.....	104
4.2.2.4 Letalitätsanalyse des Stamms <i>nito</i> ^{GT}	105
4.2.3 MARCM-Analysen.....	106
4.2.3.1 Erzeugung mutanter <i>nito</i> -Klone	107
4.2.3.2 Weitere Analyse larvaler <i>nito</i> ^{GT} -Klone	109
4.2.3.3 Analyse adulter <i>nito</i> ^{GT} -Klone	111
4.3 Untersuchung der Homeodomän-Transkriptionsfaktoren Msh und Ems	114
4.3.1 Colokalisation der Expression von <i>hipk</i> und <i>msh</i> bzw. <i>ems</i>	114
4.3.2 <i>in vitro</i> Phosphorylierungsanalysen von Msh.....	116
4.3.2.1 Nachweis von Msh als Hipk-Substrat.....	116
4.3.2.2 Eingrenzung der phosphorylierten Regionen von Msh	117
4.3.2.3 Bestimmung der Phosphorylierungsstellen von Msh durch <i>in vitro</i> Mutagenese	119
4.3.3 <i>in vitro</i> Phosphorylierungsanalysen von Ems.....	121
4.3.3.1 Nachweis von Ems als Hipk-Substrat.....	121
4.3.3.2 Eingrenzung der phosphorylierten Regionen von Ems	122
4.3.3.3 Bestimmung der Phosphorylierungsstellen von Ems durch <i>in vitro</i> Mutagenese	125

5. Diskussion	127
5.1 Die Interaktion zwischen Hipk und Nito	127
5.1.1 <i>in vitro</i> Analyse der Interaktion zwischen Hipk und Nito	127
5.1.2 <i>in vivo</i> Analyse mittels BiFC	129
5.1.3 Die funktionale Bedeutung der Interaktion zwischen <i>hipk</i> und <i>nito</i>	130
5.1.4 <i>in vivo</i> Analyse der Nito-Phosphomutanten	132
5.1.5 Die mögliche Konservierung der Interaktion	133
5.2 Die weitere Analyse von Nito.....	135
5.2.1 Die Expression von Nito.....	135
5.2.2 Herstellung und Analyse einer <i>nito</i> -Mutante.....	136
5.3 Hipk phosphoryliert die Homeodomän-Transkriptionsfaktoren Msh und Ems	138
5.3.1 Hipk phosphoryliert Msh.....	139
5.3.2 Hipk phosphoryliert Ems	141
5.4 Entwurf eines Konsensusmotivs für die Hipk-abhängige Phosphorylierung	142
5.5 Ausblick.....	145
6. Literaturverzeichnis.....	147
7. Anhang	163
8. Publikationen.....	165
9. Danksagung.....	166
10. Lebenslauf	167

1. Zusammenfassung

1.1 Analyse von Wechselwirkungen der Homeodomän-interagierenden Proteinkinase (Hipk) in *Drosophila melanogaster* unter besonderer Berücksichtigung des Interaktionspartners Spenito (Nito)

Die Homeodomän-interagierende Proteinkinase (Hipk) in *Drosophila melanogaster* gehört zu einer Familie von nukleären Serin-/Threonin-Kinasen, die ursprünglich anhand ihrer Interaktion mit Homeodomän-Transkriptionsfaktoren identifiziert wurden. Mittlerweile ist eine Beteiligung der Hipk-Familie an einer Vielzahl entwicklungsbiologischer und pathologischer Prozesse bekannt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden einzelne Wechselwirkungen bzw. Wechselwirkungspartner von Hipk näher untersucht. Dabei konnte das kleine SPOC-Familien-Protein Spenito (Nito) durch *in vitro* Phosphorylierungsanalysen als Substrat der Kinase identifiziert und eine Phosphorylierung an sechs Zielsequenzen genauer kartiert werden. Die Bestätigung der Interaktion *in vivo* erfolgte mittels Bimolekularer Fluoreszenzkomplementation („Bimolecular Fluorescence Complementation“, BiFC) in Imaginalscheiben des dritten Larvalstadium von *Drosophila*, während zugleich mit dem bekannten Hipk-Substrat Groucho eine Hipk-spezifische Positivkontrolle für diese Untersuchungsmethode etabliert wurde. Zur Untersuchung der funktionalen Bedeutung der nachgewiesenen Wechselwirkung wurden genetische Analysen bezüglich der phänotypischen Auswirkungen einer Veränderung der Gendosen von *hipk* und *nito* durchgeführt. Weiterhin wurden ausgehend von den kartierten Phosphorylierungsstellen verschiedene transgene Fliegenlinien zur ektopischen Expression diverser Nito-Phosphomutanten erzeugt. Die damit durchgeführten Studien lieferten erste Hinweise auf die Relevanz der Hipk-vermittelten Phosphorylierung von Nito, wobei die C-terminalen Zielsequenzen den stärkeren Einfluss auszuüben schienen. Finale Aussagen zu den bestehenden funktionalen Zusammenhängen waren aufgrund der allgemein extrem starken *nito*-spezifischen Phänotypen jedoch nicht möglich.

Zur weiteren Analyse von Nito wurde ein polyklonaler Antikörper gegen den C-terminalen Bereich des Proteins erzeugt und zur Darstellung des Expressionsmusters auf Proteinebene eingesetzt. Dabei zeigte sich eine relativ ubiquitäre Expression, die in frühen Embryonalstadien beginnt und mindestens bis ins dritte Larvalstadium persistiert. Colokalisationsstudien bestätigten die Expression von Nito in embryonalen und larvalen Neuronen. Eine Expression in Gliazellen war hingegen in erster Linie larval feststellbar. Da

bisher keine Nullmutante für *nito* verfügbar war, wurde eine entsprechende Fliegenlinie (*nito*^{GT}) mittels Ends-out Gene-Targeting im Rahmen dieser Arbeit selbst hergestellt. Erste Untersuchungen zeigten eine homozygote Letalität der Mutante in späten Embryonal- und frühen Larvalstadien, die zusammen mit dem mehr oder weniger ubiquitären Expressionsmuster auf eine entscheidende Rolle von *nito* während der *Drosophila*-Entwicklung hindeutet. Zur Untersuchung der *nito*-Nullmutante in späteren Entwicklungsstadien wurden mit Hilfe des MARCM-Systems (Mosaic Analysis with a Repressible Cell Marker) mutante Zellklone erzeugt. Konkrete phänotypische Auswirkungen der Mutante waren jedoch nur in geringem Maße feststellbar.

Neben Nito wurden in dieser Arbeit auch die Homeodomän-Transkriptionsfaktoren Empty spiracles (Ems) und Muscle segment homeobox (Msh) hinsichtlich einer *in vitro* Phosphorylierung durch Hipk untersucht. In beiden Fällen konnte eine Enzym-Substrat-Beziehung festgestellt werden. Die phosphorylierten Bereiche wurden kartiert und für jedes Protein auf drei Zielsequenzen eingegrenzt. Anhand der für Nito, Ems und Msh ermittelten Daten konnten unter Berücksichtigung weiterer, bereits bekannter Hipk-Substrate vorläufige Konsensusmotive für eine Hipk-vermittelte Substratphosphorylierung abgeleitet werden.

1.2 Analysis of interactions of the homeodomain interacting protein kinase (Hipk) in *Drosophila melanogaster* in special consideration of the interaction partner Spenito (Nito)

The homeodomain interacting protein kinase (Hipk) of *Drosophila melanogaster* belongs to a family of serine-/threonine kinases, which was originally identified by their interaction with homeodomain transcription factors. By now, the Hipk family is known to participate in a variety of developmental and pathological processes.

During the course of this work, individual interactions and interaction partners of Hipk were analyzed in more detail, respectively. In doing so, the small SPOC family protein Spenito (Nito) could be identified as a substrate of the kinase by *in vitro* phosphorylation assays and the phosphorylation itself could be closely mapped to six target sequences. The interaction was confirmed *in vivo* by Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC) in *Drosophila* third instar imaginal discs. At the same time, a Hipk-specific positive control for this assay was established by the use of the known Hipk substrate Groucho. To investigate the functional importance of the shown interaction, genetic analyses were done with respect to the effects of changes in gene doses of *hipk* and *nito*. Furthermore, based on the mapped phosphosites, several transgenic fly stocks were generated to ectopically express diverse phosphomutants of

Nito protein. The conducted studies with these fly strains provided first cues to the relevance of a Hipk-mediated phosphorylation of Nito, whereupon the C-terminal target sequences seemed to exert a bigger influence. However, a final statement considering the actual functional relationship was impossible to be made because of the in general extremely strong *nito*-specific phenotypes.

For a further analysis of Nito a polyclonal antibody against the C-terminal part of the protein was generated and used to illustrate the expression pattern on protein level. Thereby, a rather ubiquitous expression appeared, which begins in early embryonic stages and lasts at least until third instar larval stage. Colocalization studies confirmed the expression of Nito in embryonic and larval neurons. Expression in glial cell types was detectable mostly at the larval stage. As there had been no null mutation available for *nito* so far, a respective fly strain (*nito*^{GT}) was generated by ends-out gene targeting during this work. First analyses revealed homozygous lethality of the mutant in late embryonic and early larval stages. In combination with the more or less ubiquitous expression pattern, this points to an essential role of *nito* during the course of *Drosophila* development. To investigate the *nito* null mutant in later stages of development, mutant cell clones were generated via the MARCM system (Mosaic Analysis with a Repressible Cell Marker). Though, explicit phenotypic effects could only be detected to a minor degree.

In addition to Nito, the homeodomain transcription factors Empty spiracles (Ems) and Muscle segment homeobox (Msh) were analyzed in this work with respect to an *in vitro* phosphorylation by Hipk. In both cases an enzyme-substrate-relationship could be proven. The phosphorylated regions were mapped and localized to three target sequences for each protein, respectively. By using the data from Nito, Ems and Msh and under consideration of further known substrates of Hipk, it was possible to define preliminary consensus motifs for Hipk-mediated phosphorylation.

2. Einleitung

2.1 Die Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* als Modellorganismus

Beschränkte sich die Relevanz der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* zum Ende des neunzehnten Jahrhunderts noch in erster Linie auf ein Dasein als beliebtes Futtertier für andere, zu dieser Zeit in der Forschung präsenste Organismen wie beispielsweise Planarien (Gilbert, 2006), so wurde sie nur wenige Jahre später vor allem durch die Experimente von Thomas Hunt Morgan zu einem der wichtigsten Modellorganismen der klassischen Genetik. Schon zu dieser Zeit war es aufgrund einer Vielzahl natürlich vorkommender, unterscheidbarer Mutanten möglich, über Rekombinationsanalysen erste Kartierungen des *Drosophila*-Genoms vorzunehmen (Sturtevant, 1913). Mit zunehmendem wissenschaftlichem Fortschritt ergaben sich immer vielfältigere Möglichkeiten zum Einsatz der Fruchtfliege in der Forschung, wodurch ihre Bedeutung in der Entwicklungsbiologie rasant zunahm und bis heute ungebrochen ist. Die praktischen Vorteile der Art trugen ein Übriges dazu bei. So kann die Fruchtfliege durch ihre geringe Größe und relative anspruchslosigkeit bezüglich der Kulturbedingungen in großer Anzahl kostengünstig gehalten werden. Eine kurze Generationszeit (10 bis 12 Tage bei 24°C) sowie eine hohe Fertilität (mehrere hundert Nachkommen pro Weibchen) ermöglichen die Untersuchung einer großen Anzahl an Tieren innerhalb kurzer Zeit. Da sich die Embryonen außerhalb des mütterlichen Körpers entwickeln, sind auch frühe Entwicklungsstadien der Fruchtfliege für Untersuchungen zugänglich.

Das ca. 180Mb umfassende Genom ist vollständig sequenziert (Adams et al., 2000), beinhaltet ca. 13600 Gene und verteilt sich auf 4 Chromosomenpaare. Chromosomenpaar 1 stellt dabei die Geschlechtschromosomen (XX bzw. XY) dar, während es sich bei Paar 2-4 um Autosomen handelt. Balancerchromosomen, d.h. Chromosomen-Derivate mit optisch selektierbaren Markern, vereinfachen die stabile Haltung letaler Allele und ihre Identifikation in Kreuzungsanalysen. Trotz des evolutionär großen Abstandes zeigt *Drosophila* große Homologien zum menschlichen Genom. So konnten 75% der etwa 2300 identifizierten humanen Krankheitsgene verwandte Gene zugeordnet werden, von denen ca. 700 ausreichend stark konserviert sind, um in *Drosophila* analysiert zu werden (Bier, 2005). Neben „klassischen“ Entwicklungsdefekten sind diese Gene auch neurodegenerativen Erkrankungen oder der Krebsentstehung zuzuordnen (Reiter et al., 2001; Bier, 2005), wodurch die Fruchtfliege zusätzliche Bedeutung als Modell für genetisch bedingte Krankheiten erlangte.

Der Forschung stehen heute vielfältige Methoden zur genetischen Manipulation in *Drosophila* zur Verfügung. Ein Beispiel hierfür ist die vergleichsweise einfache Erzeugung transgener

Linien durch Keimbahntransformation. Dabei wird die Fremd-DNA mit Hilfe eines speziellen Transformationsvektors vor der Keimzellbildung in *Drosophila*-Embryonen eingebracht und während der Reifung in das Genom integriert. Die Integration erfolgt bei Verwendung von P-Elementen ungerichtet (Rubin und Spradling, 1982), kann aber durch das neu entwickelte PhiC31-System auch gerichtet vorgenommen werden (Groth et al., 2004).

Neben der direkten Veränderung des genetischen Aufbaus bietet *Drosophila* auch die Möglichkeit, Gene mit Hilfe des UAS-Gal4-Systems zeit- und ortsspezifisch zu exprimieren bzw. durch Expression von shRNAs in ihrer Dosis zu reduzieren (Brand und Perrimon, 1993; Duffy 2002).

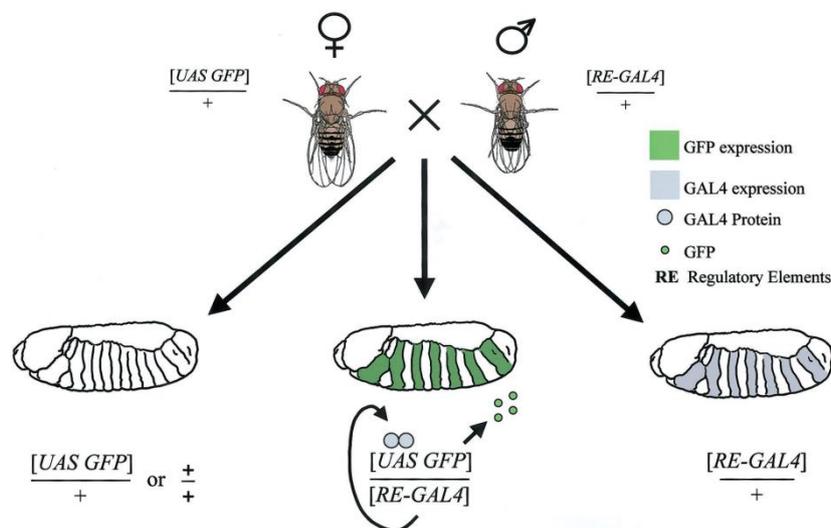


Abb.2.1. Funktionsweise des UAS-Gal4-Systems. Durch das Kreuzen von Treiberlinie und Testerlinie werden die beiden Komponenten des Systems in einer Fliege zusammengebracht und das gewünschte Protein, in diesem Fall GFP, im Muster des eingesetzten regulatorischen Elementes exprimiert. (aus Duffy, 2002)

Abbildung 2.1 zeigt das Funktionsprinzip des UAS-Gal4-Systems am Beispiel des Reporterproteins GFP. Es handelt sich dabei um ein Zwei-Komponenten-System basierend auf dem ursprünglich aus Hefen stammenden Transkriptionsfaktor Gal4 und den zugehörigen responsiven Elementen, den sogenannten UAS-Sequenzen (Upstream Activating Sequences). Gal4 bindet spezifisch an diese Regionen und aktiviert dadurch die Expression nachgeschalteter Gene. Zur Anwendung in *Drosophila* wird in einem als Treiberlinie bezeichneten Fliegenstamm der Gal4-Transkriptionsfaktor unter die Kontrolle eines spezifischen regulatorischen Elementes gestellt. Das zu exprimierende Gen bzw. die shRNA liegt in einem zweiten Fliegenstamm, der Testerlinie, unter der Kontrolle der UAS-Sequenzen vor. Durch das Kreuzen von Treiber- und Testerlinie werden die Komponenten in einer Fliege zusammengebracht und das gewünschte Konstrukt im Muster des gewählten regulatorischen Elementes exprimiert. Die Aufteilung des Systems in zwei getrennte Fliegenstämme erlaubt

dabei ein größtmögliches Maß an Kombinatorik, da auf diese Art beliebige Expressionsmuster für ein Tester-Element ausgewählt werden können. Auch die Kombination mehrerer transgener Konstrukte zur zeitgleichen ektopischen Expression oder shRNA-vermittelten Dosisreduktion verschiedener Gene ist möglich.

2.2 Die Homeodomän-interagierende Proteinkinase (Hpk)

Phosphorylierung durch Proteinkinasen gilt als verbreitetster und beststudierter Signalmechanismus in eukaryotischen Organismen (Johnson und Hunter, 2005). Bei dieser Form der posttranslationalen Modifikation wird eine γ -Phosphatgruppe von ATP als Donor durch ein Enzym, die Kinase, auf die Hydroxylgruppe eines Substratproteins kovalent übertragen. Die Größe der Phosphatgruppe und ihre stark negative Ladung führen dabei zu Veränderungen in den sterischen und physiko-chemischen Eigenschaften des Substrates, die unter anderem mit Konformationsänderungen oder veränderter Affinität zu anderen Molekülen einhergehen können. Die große Relevanz der Proteinkinasen zeigt sich unter anderem darin, dass ca. 30% aller zellulären Proteine an mindestens einer Position phosphoryliert werden und dass Gene, die für Kinasen codieren, ca. 2% aller Gene ausmachen (Ubersax und Ferrell, 2007). Dem menschlichen Genom konnten über 500 solcher Gene zugeordnet werden, dem der Fruchtfliege 240 (Manning et al., 2002).

Kinasen unterscheiden sich in ihrer Spezifität und werden abhängig von der Akzeptor-Aminosäure ihres Substrats in die Großgruppen der Tyrosin-, Serin-/Threonin- oder dualspezifischen Kinasen unterteilt (Lindberg et al., 1992). Auch die Anzahl der Substratproteine variiert zwischen den einzelnen Kinasen. Während einige Vertreter eine eher geringe Anzahl an Substratproteinen erkennen, phosphorylieren andere eine große Bandbreite verschiedenster Proteine, wodurch sie Einfluss auf eine große Zahl intra- und interzellulärer Signalwege ausüben können (Ubersax und Ferrell, 2007). Die Auswirkungen der Phosphorylierung auf das jeweilige Substrat können dabei verschiedener Art sein. In einigen Fällen markiert beispielsweise die Phosphorylierung ein Protein für den Proteasom-vermittelten Abbau, in anderen wird eben dieser Abbau verhindert und das Protein stabilisiert, indem eine veränderte Konformation oder Ladung dazu führen, dass eine Erkennung durch proteolytische Enzyme nicht mehr möglich ist (Lin und Desiderio, 1993; Yaglom et al., 1995; Yanagawa et al., 2002). Auch die Substraterkennung einiger Kinasen ist Phosphat-gekoppelt, d. h. sie erkennen ein Protein erst als Substrat, wenn es bereits durch eine andere Kinase phosphoryliert wurde. Ein Beispiel hierfür ist die bevorzugte Phosphorylierung eines Substratproteins durch die Glycogen-Synthase-Kinase 3 (GSK3), wenn dieses bereits durch die Casein-Kinase II (CKII)

als sogenannte Priming-Kinase vor-phosphoryliert wurde (Picton et al., 1982; Fiol et al., 1987). Gleichmaßen kann das Substrat selbst durch eine Phosphorylierung in seiner Funktion aktiviert oder deaktiviert werden (Hsiao et al., 2001; Doble und Woodgett, 2003; Huang et al., 2005).

Die Homeodomän-interagierenden Proteinkinasen (HIPKs) sind Vertreter einer neuen Familie von nukleären Serin-/Threonin-Kinasen. Drei Mitglieder dieser Familie (HIPK1-3) wurden in Säugern im Rahmen eines Yeast-Two-Hybrid-Screens zur Identifikation von Wechselwirkungspartnern verschiedener NK-Homeodomän-Transkriptionsfaktoren identifiziert (Kim et al., 1998). Eine vierte Kinase (HIPK4) kam aufgrund ihrer Sequenzhomologie im Laufe des Humanen Genom-Projektes hinzu (Manning et al., 2002).

HIPK's sind evolutionär konserviert und an vielen entwicklungsbiologischen und pathologischen Prozessen beteiligt (Rinaldo et al., 2007a). Ihr Aufbau ist schematisch in Abbildung 2.2A dargestellt. N-terminal befinden sich die katalytisch aktive Kinasedomäne und eine Interaktionsdomäne, welche die Bindung vieler, jedoch nicht aller Substrate vermittelt. Es folgt eine Domäne mit einer PEST-Sequenz. Während dieses Motiv in vielen Proteinen als allgemeines Signal für proteolytischen Abbau betrachtet wird (Rechsteiner und Rogers, 1996), ist es hier jedoch nicht zwingend relevant für die Degradation, sondern vermittelt vielmehr die Bindung verschiedener Interaktionspartner, wie z.B. p53 oder HMGA1 (Pierantoni et al., 2001; Rinaldo et al., 2007a, Rinaldo et al., 2007b). C-terminal folgt schließlich eine konservierte Tyrosin- und Histidin-reiche Domäne, deren Funktion bisher noch nicht abschließend geklärt werden konnte.

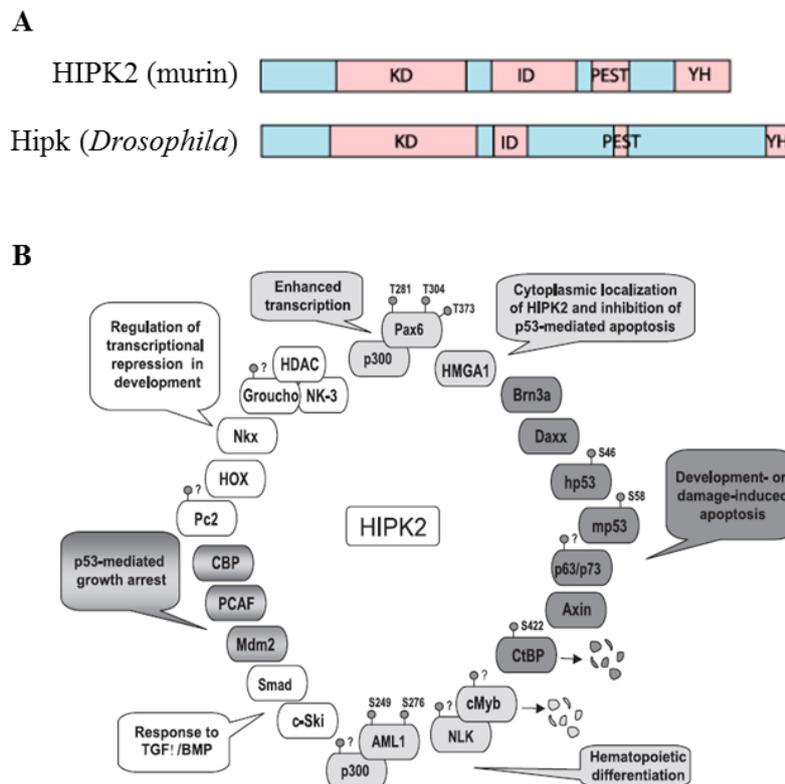


Abb.2.2. Evolutionäre Konservierung und Substrate von HIPK2. (A) Die murine Kinase HIPK2 und ihr Homolog in *Drosophila melanogaster* zeigen einen hohen Grad an Konservierung. KD: Kinasedomäne, ID: Interaktionsdomäne, PEST: Domäne mit PEST-Motiv, YH: Tyrosin- und Histidin-reiche, konservierte Domäne (verändert aus Dewald, 2008). (B) HIPK2 phosphoryliert in Säugern eine Vielzahl von Substraten (aus Rinaldo et al., 2007a).

HIPK2 stellt das am besten erforschte Mitglied dieser Kinasefamilie dar. Eine Übersicht über eine Auswahl wichtiger Substrate ist in Abbildung 2.2B zu sehen. In den letzten Jahren konnte in Vertebraten ein Einfluss von HIPK2 auf verschiedene Ebenen des Wnt-Signalweges gezeigt werden. So phosphoryliert die Kinase den Wnt-Effektor β -catenin, wodurch dieser in Abhängigkeit von den zur Untersuchung verwendeten Zelllinien und Kulturbedingungen stabilisiert (Lee et al., 2009b), respektive für den Proteasom-vermittelten Abbau markiert und verstärkt degradiert wird (Puca et al., 2008, Kim et al., 2010). Über die Phosphorylierung des transkriptionellen Aktivators LEF1 sowie des Repressors TCF3 trägt HIPK2 ebenfalls zur differentiellen Regulation der Wnt-vermittelten Signalübertragung bei (Hikasa et al., 2010; Hikasa und Sokol, 2011). Auch für HIPK1 konnte eine Beteiligung an der Steuerung dieses essentiellen Signalwegs gezeigt werden (Louie et al., 2009; Marinaro et al., 2012). Ein weiteres Beispiel für den Einfluss Homeodomän-interagierender Kinasen auf basale Entwicklungsprozesse stellt die Regulation der Augengröße, Linsenbildung und retinalen Morphogenese durch HIPK1 und HIPK2 dar (Inoue et al., 2010). Hier zeigt sich eine überlappende Funktionalität der beiden Kinasen, wie sie in ähnlicher Form bereits für ihre

Rolle in der Wachstumskontrolle als Antwort auf morphogenetische und genotoxische Signale beschrieben wurde (Isono et al., 2006).

Im Hinblick auf pathologische Prozesse ist HIPK2 neben einer Rolle bei der Entstehung fibrotischer Erkrankungen (Jin et al., 2012; Ricci et al., 2013) vor allem aufgrund ihrer Beteiligung an verschiedenen Krebsformen von großem Interesse (Wei et al., 2007; D'Orazi et al. 2010; Lavra et al., 2011; Soubeyran et al., 2011). Es konnte gezeigt werden, dass HIPK2 im Rahmen der zellulären Antwort auf DNA-Schäden durch die ATM-Checkpoint-Kinase stabilisiert und aktiviert wird (Dauth et al., 2007), woraufhin sie ihrerseits den essentiellen, proapoptischen Tumorsuppressor p53 phosphoryliert und aktiviert (D'Orazi et al., 2002; Hofmann et al., 2002; Rui et al., 2004; D'Orazi et al., 2012, Hofmann et al., 2013). HIPK2 stellt damit einen entscheidenden Regulator der schadensabhängigen Zellzykluskontrolle dar.

Neben Vertebraten verfügt auch die Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* über eine Homeodomän-interagierende Proteinkinase, die aufgrund ihrer großen Homologie zu HIPK2 als Hipk2 (Choi et al., 2005) oder schlicht als Hipk (Link et al., 2007) bezeichnet wird. Mit nur einem Vertreter dieser Kinasefamilie ist *Drosophila* gut geeignet für die Untersuchung der Funktion von Hipk in Entwicklungsprozessen, da hier keine Redundanzeffekte zum Tragen kommen, wie sie für das Säuger-System beschrieben werden (Isono et al., 2006; Rinaldo et al., 2007a; Inoue et al., 2010). Neben der strukturellen Homologie (Abbildung 2.2) sind auch funktionale Übereinstimmungen zwischen Hipk und HIPK2 zu beobachten. So phosphorylieren beide unter anderem den transkriptionellen Corepressor Groucho (Choi et al., 1999, Choi et al., 2005; Rinaldo et al., 2007a; Lee et al., 2009a). Auch eine Beteiligung an der Augenentwicklung ist in *Drosophila* zu beobachten. So konnte unter anderem ein Einfluss von Hipk auf die Augengröße durch Verstärkung des Notch-Signalweges beobachtet werden (Lee et al., 2009a). Zudem besteht eine direkte Enzym-Substrat-Beziehung zwischen Hipk und den Pax6-Homologen Eyeless und Twin of eyeless (Choi et al., 2005; Laupsien, 2007). Weiterhin zeigt Hipk auch in der Fruchtfliege eine Beteiligung an der Regulation apoptotischer Prozesse, insbesondere an der Kontrolle der Zellzahl im Flügelepithel aber auch im sich entwickelnden Nervensystem (Link et al., 2007).

In den vergangenen Jahren gewann Hipk zusätzliche Bedeutung als Regulator verschiedener Signalwege. Ähnlich der Prozesse in Säugern, phosphoryliert Hipk das β -catenin-Homolog Armadillo und interagiert mit dem Transkriptionsfaktor Tcf. Damit wirkt die Kinase als positiver Regulator des Wnt-Signalwegs (Lee et al., 2009b). Weiterhin kann Hipk die Aktivität der E3 Ubiquitin-Ligase SCF ^{β -TrCP/Slimb} blockieren, so dass durch Stabilisierung sowohl von Armadillo als auch von Cubitus interruptus (Ci), dem Effektor des Hedgehog-

Signalwegs, die jeweiligen Signale verstärkt und die Signalwege möglicherweise integriert werden (Swarup und Verheyen, 2011, Verheyen et al., 2012). Kürzlich wurde Hipk zudem durch verschiedene Arbeitsgruppen als positiver Regulator der Aktivität von Yorkie und damit des Hippo-abhängigen Gewebewachstums identifiziert (Chen und Verheyen, 2012; Poon et al., 2012).

Insgesamt konnte die Homeodomän-interagierende Proteinkinase also verschiedensten Signalwegen zugeordnet werden, auf die sie nicht selten auf mehreren Ebenen einwirkt. Um die Bedeutung von Hipk in den einzelnen Prozessen aufklären zu können, ist es erforderlich, möglichst viele Substrate der Kinase zu identifizieren. Während jedoch für einige andere Kinasen, wie z.B. die Proteinkinase A oder bestimmte Cyclin-abhängige Kinasen, bereits Konsensusmotive für phosphorylierte Zielsequenzen bekannt sind und die *in silico*-Suche nach potentiellen Substraten erleichtern (Songyang et al., 1994; Neuberger et al., 2007), konnte im Fall der Hipk noch kein solches Motiv definiert werden. Bisher ist lediglich bekannt, dass es sich um eine Prolin-geführte Kinase handelt (Kim et al., 2006). Daher ist es notwendig, auf anderem Wege Kandidaten für eine Interaktion zu bestimmen, z.B. indem man sich an strukturellen Ähnlichkeiten zu bereits bekannten Substraten orientiert, gezielt ein Protein von Interesse untersucht oder großangelegt mit Hilfe genomweiter Screens nach potentiellen Wechselwirkungspartnern sucht. Ein solcher Screen wurde für Hipk im Vorfeld dieser Arbeit in der Arbeitsgruppe durchgeführt. Dabei wurde im System des Komplexauges von *Drosophila* ein Hipk-spezifischer, genetisch sensitiver Hintergrund in Form einer reduzierten Augengröße erzeugt. Im Zuge eines Enhancer-Suppressor-Screens wurden Defizienzen, Einzelgenmutanten bzw. Fehlexpressionskonstrukte eingekreuzt und anhand von Veränderungen des Phänotyps mögliche Interaktionspartner bestimmt (Steinmetz, 2006; Dewald, 2008).

2.3 Das SPOC-Protein Spenito (Nito)

SPOC-Proteine sind gekennzeichnet durch einen Aufbau mit 3 RNA-Erkennungsmotiven („RNA recognition motifs“, RRM) und der charakteristischen C-terminalen SPOC-Domäne („Spen paralogue and orthologue C-terminal domain“) (Wiellette et al., 1999; Kuang et al., 2000). Anhand ihrer Größe werden sie in zwei Klassen, große und kleine SPOC-Proteine, eingeteilt. Die Klasse der großen SPOC-Proteine beinhaltet in Säugern das humane SHARP und das murine MINT (Shi et al., 2001; Ariyoshi und Schwabe, 2003) sowie das Protein Split ends (Spen) in *Drosophila* (Wiellette et al., 1999; Rebay et al., 2000). Die Klasse der kleinen SPOC-Proteine umfasst OTT/RBM15 in Säugern (Ma et al., 2001; Mercher et al., 2001) und

Spenito (Nito) in *Drosophila* (Jemc und Rebay, 2006; Chang et al., 2008). Abbildung 2.3 zeigt eine schematische Gegenüberstellung der *Drosophila*-SPOC-Proteine Spen und Nito.



Abb.2.3. Die SPOC-Proteine in *Drosophila*. Die beiden SPOC-Proteine Spen und Nito verfügen jeweils über 3 N-terminal gelegene RNA-Erkennungsmotive („RNA recognition motifs“, RMMs; blau) sowie die namensgebende SPOC-Domäne (rot). Dargestellt ist zudem die Position eines Proteinfragments (SD17134), das in vorhergehenden Analysen als Substrat von Hipk identifiziert werden konnte (Dewald, 2008).

Im Rahmen des zuvor erwähnten Enhancer-Suppressor-Screens konnte Split ends als Interaktionspartner von Hipk identifiziert und durch *in vitro* Phosphorylierungsassays, insbesondere des C-terminalen Bereichs (Proteinfragment SD17134, Abb.2.3), als Substrat zugeordnet werden (Steinmetz, 2006; Dewald, 2008). Aufgrund seiner strukturellen Ähnlichkeit, sowie einer bereits beschriebenen, zu Spen antagonistischen Wirkung in der Augenentwicklung (Jemc und Rebay, 2006) erschien auch Nito als geeigneter Kandidat für eine Interaktion mit Hipk, was durch Kreuzungsanalysen bekräftigt werden konnte (Dewald, 2008). Durch seine geringere Größe erlaubt Nito im Falle eines positiven Substratnachweises eine möglichst vollständige Kartierung der durch Hipk phosphorylierten Zielsequenzen.

SPOC-Proteine zeigen eine Beteiligung an verschiedenen Prozessen, bei denen auch Hipk eine Rolle spielt. Spen stellt dabei den wesentlich besser untersuchten Vertreter dieser Proteinfamilie dar und wurde als Signalintegrator unter anderem mit dem EGFR/MAPK-Signalweg sowie dem Notch-Signalweg in Verbindung gebracht (Doroquez et al., 2007). Über Nito hingegen ist bis dato vergleichsweise wenig bekannt. Neben der bereits genannten Rolle bei der Augenentwicklung, wurde Nito zusammen mit Spen eine Funktion im Wingless-Signalweg zugeordnet. Nito wirkt dabei unterhalb oder parallel zum Wg-Effektor Armadillo als Regulator verschiedener Zielgene wie z. B. *naked cuticle* (*nkd*) oder *crumbs* (*crb*) (Chang et al., 2008). Der Wingless-Signalweg konnte in Säugern mit Prozessen der Krebsentstehung in Zusammenhang gebracht werden (Clevers, 2006) und stellt aufgrund der zuvor beschriebenen Beteiligung von Hipk bzw. HIPK2 einen möglichen Interaktionsbereich für Nito und Hipk dar. Eine weitere Verbindung mit onkogenen Prozessen liefert das Säuger-Homolog OTT/RBM15 durch Auftreten eines RBM15-Fusionsproteins in einer Translokation, die mit akuter megakaryoblastischer Leukämie einhergeht (Ma et al., 2001; Mercher et al., 2001). Der Leukämie auslösende Mechanismus ist bisher nicht vollständig aufgeklärt, es konnte jedoch eine Funktion von RBM15 als Faktor im Kernexport von

mRNAs sowie als Regulator der Notch-vermittelten transkriptionellen Zielgen-Aktivierung während der Hämatopoese in Mäusen nachgewiesen werden (Lindtner et al., 2006; Ma et al., 2007; Zolotukhin et al., 2009).

2.4 Die Homeodomän-Transkriptionsfaktoren Empty spiracles (Ems) und Muscle segment homeobox (Msh)

Die Familie der Homeodomän-interagierenden Proteinkinasen wurde ursprünglich in einem Screen zur Suche nach Interaktionspartnern von NK-Homeodomän-Transkriptionsfaktoren identifiziert (Kim et al., 1999). Zusätzlich konnte in weiteren Arbeiten bereits eine Enzym-Substrat-Beziehung zwischen Hipk und dem Homeodomän-Protein Homeobrain nachgewiesen werden (Dewald, 2008). Daher sind Homeodomän-Transkriptionsfaktoren *per se* als potentielle Substrate von Hipk von großem Interesse.

Unter der Homeodomäne versteht man eine evolutionär konservierte 60 Aminosäuren lange Proteinsequenz, die durch einen 180 Basenpaare umfassenden Genabschnitt, die sogenannte Homeobox, codiert wird (McGinnis et al., 1984, Gehring, 1987). Die Domäne faltet sich zu einer charakteristischen Sekundärstruktur aus 4 α -Helices, von denen Helix II und III ein Helix-Turn-Helix-Motiv bilden, welches eine sequenzspezifische DNA-Bindung vermittelt (Otting et al., 1988; Qian et al., 1989; Affolter et al., 1990, Noyes et al., 2008).

Verschiedene Homeodomän-Proteine verfügen zusätzlich über eine N-terminal zur Homeodomäne gelegene, konservierte Oktapeptidsequenz (Burri et al., 1989; Schneitz et al., 1993), die als transkriptioneller Repressor fungiert (Smith und Jaynes, 1996). Eine solche Domäne findet sich auch in dem bereits genannten Hipk-Substrat Homeobrain (Walldorf et al., 2000), ebenso wie in den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Homeodomän-Transkriptionsfaktoren Empty spiracles (Ems) und Muscle segment homeobox (Msh) (Dalton et al., 1989; Robert et al., 1989; Walldorf und Gehring, 1992; Lord et al., 1995). Abbildung 2.4 zeigt eine schematische Darstellung des Aufbaus der beiden Proteine.

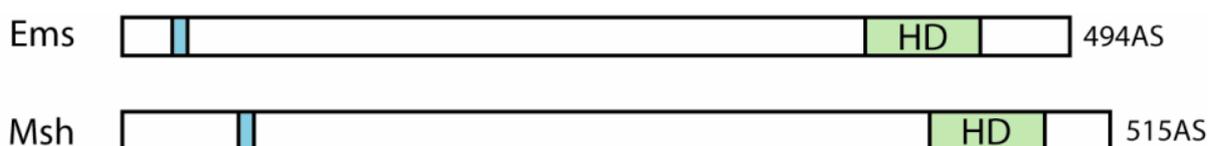


Abb.2.4. Schematischer Aufbau der untersuchten Homeodomän-Transkriptionsfaktoren. Die Transkriptionsfaktoren Ems und Msh haben mit einer Länge von 494 bzw. 515 Aminosäuren eine vergleichbare Größe. Beide tragen eine konservierte Oktapeptidsequenz (blau) sowie eine Homeodomäne (HD; grün).

Empty Spiracles

Das Homeoboxgen *empty spiracles* wurde unabhängig in zwei Arbeitsgruppen durch Kreuzhybridisierung mit Homeobox-spezifischen Sonden verschiedener Gene identifiziert. Es codiert für einen Transkriptionsfaktor, der aufgrund der Kontrolle seiner frühen Expression durch das maternale Gen *bicoid* sowie seines Expressionsmusters als Kopflückengen zugeordnet wurde und essentiell für die Entwicklung verschiedener Kopfstrukturen sowie der Filzkörper innerhalb der posterioren Spirakel ist (Dalton et al., 1989; Walldorf und Gehring, 1992). *Ems* spielt eine wichtige Rolle bei der Entwicklung der Gehirnsegmente im *Drosophila*-Embryo, insbesondere der regionalisierten Neurogenese in den Anlagen für Deuto- und Tritocerebrum (Hirth et al., 1995; Hartmann et al., 2000). Die Expression von *Ems* wird dabei unter anderem durch das Lückengen *tailless* negativ reguliert, was historisch betrachtet den ersten Nachweis für eine direkte transkriptionelle Regulation zwischen zwei Kopflückengenen darstellt (Hartmann et al., 2001). Im ventralen Nervensystem konnte zudem eine Beteiligung an der axonalen Wegfindung spezifischer Interneurone gezeigt werden (Hartmann et al., 2000). Neben seiner Rolle in der embryonalen Nervensystementwicklung erfüllt *Ems* in späteren Entwicklungsstadien Funktionen in der Spezifikation und Wegfindung olfaktorischer Interneurone und Projektionsneurone im Gehirn sowie bei der Entwicklung der larvalen und adulten olfaktorischen Sinnesorgane (Das et al., 2008; Lichtneckert et al., 2008; Sen et al., 2010).

Evolutionär scheinen verschiedene Funktionen von *Ems*, insbesondere im Hinblick auf olfaktorische Gewebe, konserviert zu sein. So wurden 1992 die *ems*-Homologe *Emx1* und *Emx2* aus humanem sowie murinem Gewebe kloniert und ihre Expression in Strukturen des Vorderhirns und Anlagen des olfaktorischen Systems nachgewiesen (Simeone et al., 1992a und b). Spätere Untersuchungen legten vor allem für *EMX2* eine Beteiligung an der Proliferationskontrolle kortikaler Neuroblasten sowie an der Migration kortikaler Neurone nahe (Cecchi et al., 2000). Die graduelle Verteilung des *EMX2*-Proteins deutet dabei auf eine Rolle in der regionalen Musterbildung innerhalb des zerebralen Cortex hin (Cecchi und Boncinelli, 2000). In weiteren Analysen konnte für *EMX1* eine partielle funktionale Redundanz und kooperative Wirkung mit *EMX2* in der Regulation der Größe des zerebralen Cortex, Größe und Organisation des Bulbus olfactorius sowie der Bildung des Hippocampus festgestellt werden (Bishop et al., 2003).

Muscle segment homeobox

Das Homeoboxgen *muscle segment homeobox* (*msh*) wurde 1989 als *Drosophila*-Homolog des murinen Gens *Hox7* zugeordnet (Robert et al., 1989). Sechs Jahre später wurde seine codierende Sequenz kloniert und die embryonale Expression im Neuroektoderm und später im zentralen Nervensystem sowie in Zellen des somatischen Mesoderms beschrieben. Aufgrund seines Aufbaus als Homeodomän-Protein, des mesodermalen Expressionsmusters und der beobachteten Phänotypen bei mesodermaler Überexpression wurde Msh als Transkriptionsfaktor eingestuft, der über untergeordnete Zielgene die Differenzierung und/oder Musterbildung somatischer Muskelzellen reguliert (Lord et al., 1995). Nose et al. konnten in diesem Zusammenhang die Notwendigkeit von *msh* für die regionale Spezifikation lateraler und dorsaler Muskelvorläuferzellen nachweisen (Nose et al., 1998). Eingehende Untersuchungen der Nervensystem-spezifischen Expression lieferten Hinweise auf eine Funktion von Msh in der dorsoventralen Musterbildung des Neuroektoderms und der Neuroblastenspezifikation. Kontrolliert wird die *msh*-Expression dabei durch die Segmentpolaritätsgene *wingless* (*wg*) und *hedgehog* (*hh*) sowie Komponenten des EGFR-Signalwegs (D'Alessio und Frasch, 1996). Die Analyse verschiedener Funktionsverlust-Mutanten und Fehlexpressionen zeigte schließlich eine Beteiligung von *msh* in der Festlegung der Neuroblastenidentität (Buescher und Chia, 1997; Isshiki et al., 1997). Von Ohlen und Doe konnten die neurogene Rolle von *msh* weiter präzisieren und das Gen zusammen mit *ventral nervous system defective* (*vnd*) und *intermediate neuroblasts defective* (*ind*) in die Musterbildung der ventralen, intermediären und dorsalen Zellgruppen des Neuroektoderms einordnen. Msh bestimmt dabei die dorsale Zellgruppe in einer durch Repression definierten Expressionsdomäne (Von Ohlen und Doe, 2000). Neben den embryonalen Funktionen kann *msh* auch mit Phänotypen des adulten Auges in Verbindung gebracht werden. So ist zwar keine konkrete Expression von *msh* während der Augenentwicklung nachweisbar, jedoch führt die Expression einer dominant-negativen Mutante (*Drop*, *Dr*) zu einem Anhalten der Wanderung der morphogenetischen Furche und einer starken Reduktion der resultierenden Augen (Mozer, 2001).

Wie viele andere Homeoboxgene ist auch *msh* evolutionär konserviert. Säuger verfügen über drei Homologe (*Msx1-3*), die in ihrem Expressionsmuster zum Teil dem von *msh* in *Drosophila* ähneln, jedoch auch deutliche Säuger-spezifische Expressionsanteile zeigen (Davidson, 1995; Wang et al., 1996; Alappat et al., 2003). Einige funktionale Aspekte sind innerhalb der *msh*/*Msx*-Genfamilie dennoch konserviert. So erfüllen *Msx*-Gene beispielsweise Funktionen in der dorsalen Musterbildung des Neuralrohrs ähnlich *msh* in der

Musterbildung des Neuroektoderms (Liu et al., 2004; Ramos und Robert, 2005). Weiterhin konnte auch bei Vertebraten eine Beteiligung dieser Gene an Musterbildungsprozessen in der Augenentwicklung gezeigt werden (Monaghan et al., 1991; Foerst-Potts und Sadler, 1997)

2.5 Zielsetzung der Arbeit

Nachdem in einem zuvor durchgeführten Enhancer-Suppressor-Screen das SPOC-Protein Nito als potentieller Interaktionspartner der Homeodomän-interagierenden Proteinkinase (Hipk) identifiziert wurde, sollte diese Wechselwirkung, insbesondere im Hinblick auf eine mögliche Enzym-Substrat-Beziehung, näher untersucht werden. Nachdem die Phosphorylierung von Nito durch Hipk bestätigt werden konnte, sollten die Phosphorylierungsstellen möglichst vollständig kartiert werden. Eine Prüfung der Interaktion zwischen Hipk und Nito sollte zusätzlich durch *in vivo* Analysen erfolgen. Im Zuge dessen sollte die Methode der Bimolekularen Fluoreszenzkomplementation in *Drosophila* für die Analyse Hipk-spezifischer Interaktionen etabliert werden. Weiterhin sollten transgene Fliegen zur Expression von Nito-Phosphomutanten erzeugt werden, um Informationen über die funktionale Bedeutung der Phosphorylierung durch Hipk zu erhalten.

Da zu Beginn der Arbeit nur wenig über *nito* bekannt war, bestand ein zusätzlicher Schwerpunkt in der weitergehenden Untersuchung dieses Gens. Zur Bestimmung des Expressionsmusters auf Proteinebene sollte ein Antikörper gegen Nito hergestellt werden. Mittels „Ends-Out Gene Targeting“ sollte eine Mutante für *nito* erzeugt, verifiziert und auf ihre Letalität und mögliche Phänotypen untersucht werden. MARCM-Analysen sollten Einblicke in die Auswirkung mutanter *nito*-Klone auf spätere Stadien der Entwicklung erlauben.

Eine weitere Zielsetzung der Arbeit bestand in der Untersuchung der Homeodomän-Transkriptionsfaktoren Empty spiracles (Ems) und Muscle segment homeobox (Msh) hinsichtlich einer Hipk-vermittelten Phosphorylierung. Auch hier sollten die Phosphorylierungsstellen soweit wie möglich kartiert werden. Die Analyse einer größeren Anzahl an Zielsequenzen sollte dabei im Idealfall weitere Rückschlüsse auf ein Konsensus-Motiv für die Phosphorylierung durch Hipk zulassen.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Antikörper

3.1.1.1 primäre Antikörper

Antigen	Spezies und Isotyp	Verdünnung	Bezugsquelle/Referenz
Armadillo (Arm)	Maus IgG, monoklonal	1:4	DSHB
Dachshund (Dac)	Maus IgG, monoklonal	1:10	DSHB
Digoxigenin (Dig)	Schaf Fab-Fragment, polyklonal	1:2000	Roche
Embryonic lethal abnormal vision (Elav)	Ratte IgG, monoklonal	1:30	DSHB
Eyes absent (Eya)	Maus IgG, monoklonal	1:5	DSHB
GFP	Kaninchen IgG, polyklonal	1:2000	Molecular Probes
Neurotactin (Nrt)	Maus IgG, monoklonal	1:20	DSHB
Retinal homeobox (Rx)	Kaninchen IgG, polyklonal	1:400	U. Walldorf
Reversed polarity (Repo)	Maus IgG, monoklonal	1:20	DSHB
Twin of eyeless (Toy)	Meerschweinchen IgG, polyklonal	1:500	U. Walldorf
Wingless (Wg)	Maus IgG, monoklonal	1:4	DSHB

3.1.1.2 sekundäre Antikörper

Antigen	Konjugation	Spezies und Isotyp	Verdünnung	Bezugsquelle
Kaninchen IgG	Alexa Fluor [®] 488	Ziege IgG	1:1000	Molecular Probes
Maus IgG	Alexa Fluor [®] 568	Ziege IgG	1:1000	Molecular Probes
Meerschweinchen IgG	Alexa Fluor [®] 568	Ziege IgG	1:1000	Molecular Probes
Ratte IgG	Alexa Fluor [®] 568	Ziege IgG	1:1000	Molecular Probes

3.1.2 verwendete Mikroorganismen

3.1.2.1 Bakterienstämme

Bei allen verwendeten Wirtsbakterien handelt es sich um Derivate von *E. coli K-12*.

BL21 (DE3): (hsdS gal (lclts857 ind1 Sam7 nin5 lac UV5-T7 gene 1))

Verwendet für die Expression von Fusionsproteinen (Sambrook und Russell, 2001).

DH5 α : (supE44 Δ lac U169 (Φ 80lacZ) Δ M15 hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1)

Verwendet für die Transformation von Plasmidvektoren (Hanahan, 1983).

One Shot[®] ccdB Survival[™] 2 T1^R (Invitrogen): (F⁻ mcrA Δ(mrr-hsdRMA-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araΔ139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str^R) ensA1 nupG fhuA::IS2)

Verwendet für die Amplifikation von Vektoren mit dem Letalfaktor *ccdB* (Bernard und Couturier, 1992).

3.1.2.2 Hefestämme

Bei allen verwendeten Hefelinien handelt es sich um Derivate von *Saccharomyces cerevisiae*

AH109: MATa, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4Δ, gal80Δ, LYS2::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3, GAL2_{UAS}-GAL2_{TATA}-ADE2, URA3::MEL1_{UAS}-MEL1_{TATA}-lacZ
(James et al., 1996)

Y187: MATα, ura3-52, his3-200, ade2-101, trp1-901, leu2-3, 112, gal4Δ, met⁻, gal80Δ, URA3::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-lacZ
(Harper et al., 1993)

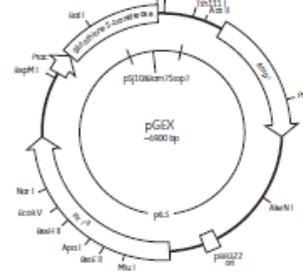
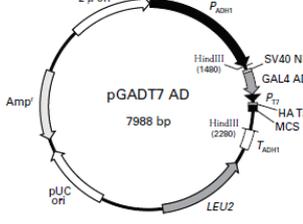
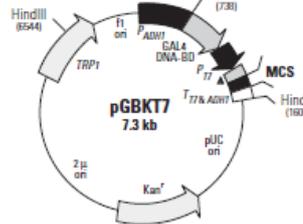
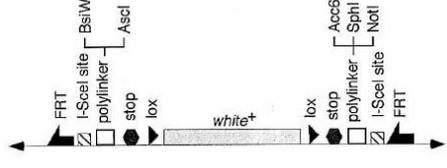
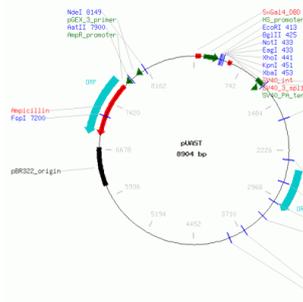
3.1.3 Fliegenstämme

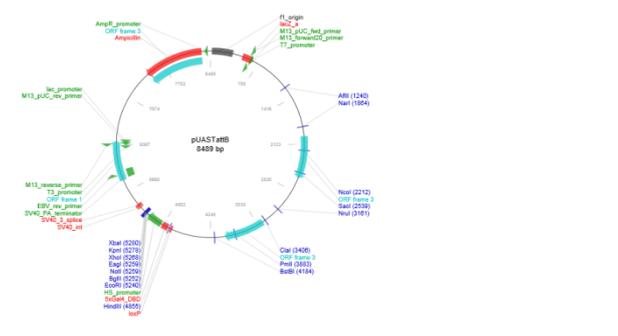
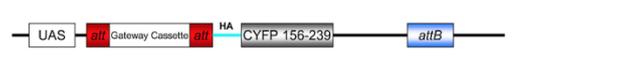
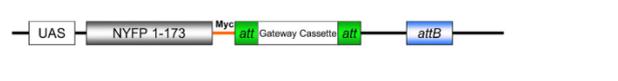
Stamm	Beschreibung	Herkunft
yw ^{67c23}	Stamm für P-Element-vermittelte Keimbahntransformation; Wildtyp-Kontrolle	U. Walldorf
BL24871: y ¹ M{vas-int.Dm}ZH-2A w*; PBac{y[+]-attP-3B}VK00033	Stamm für PhiC31-vermittelte Keimbahntransformation	J. Bischof und K. Basler
yw ¹¹¹⁸ ; Sco/CyO; +/+	Balancer 2. Chromosom	U. Walldorf
w ¹¹¹⁸ ; +/+; TM6B Tb/TM3 Sb	Balancer 3. Chromosom	U. Walldorf
w; 70-Flp 70-I- <i>SceI</i> /TM3 Ser	Stamm zur Mobilisierung des Targeting-Konstrukts beim "Gene Targeting"	K. Golic
TUG G13: yw hsFLP; FRTG13, tubP-GAL80; tubP-GAL4, UAS-mCD8::GFP /TM6 Tb, Hu	MARCM-Treiberlinie	B. Bello
BL1956: w*; P{FRT(w ^{hs})G13	FRT-Stelle in der 42B-Region	N. Perrimon
UAS-Hipk-HA1M	Stamm für Fehlexpression von Hipk, 2.Chromosom	Lee et al., 2009a

UAS-Hipk-HA3M	Stamm für Fehlexpression von Hipk, 3.Chromosom	Lee et al., 2009a
71B-Gal4 (BL1747)	Treiberlinie	Andrea Brand
<i>bs</i> -Gal4 (BL6354)	Treiberlinie	Gerhard Technau
<i>cut</i> -Gal4 (BL27327)	Treiberlinie	Garielle Boulianne
<i>en</i> -Gal4 (BL6356)	Treiberlinie	Joe Duffy
<i>ey</i> -Gal4	Treiberlinie	Hazelett et al., 1998
GMR-Gal4 (BL9146)	Treiberlinie	Laurent Theodore
MS1096-Gal4 (BL8860)	Treiberlinie	Michael Ashburner
<i>ptc</i> -Gal4 (BL2017)	Treiberlinie	Norbert Perrimon
20942 <i>nito</i> -RNAi	UAS-RNAi-Linie	VDRC (Dietzl et al., 2007)
109436 <i>nito</i> -RNAi	UAS-RNAi-Linie	VDRC (Dietzl et al., 2007)
108254 <i>hipk</i> -RNAi	UAS-RNAi-Linie	VDRC (Dietzl et al., 2007)

3.1.4 DNA-Klone

Klon	Gen	Größe	Bezugsquelle/Referenz
SD05876 (cDNA-Klon)	<i>hipk</i>	~6.2kb	DGRC
pGEX-4T-1 dHipk2FL4k (Expressionskonstrukt)	<i>hipk</i>	~ 4kb	U. Walldorf
pTRI-EX1-Flag-HIPK2 (Expressionskonstrukt)	Humane HIPK2	~ 3.6kb	Hofmann et al., 2005
pGADT7-Hipk (Y2H-Konstrukt)	<i>hipk</i>	~4kb	U. Walldorf (unveröffentlicht)
pBSgro (cDNA-Klon)	<i>gro</i>	~ 2.1kb	Nagel et al., 2005
GH11110 (cDNA-Klon)	<i>nito</i>	~3.1kb	DGRC
msh pS135-4 (cDNA-Klon)	<i>msh</i>	~2.6kb	B. Jacq und W.J. Gehring (unveröffentlicht)
pGEX-2T msh1.3 (Expressionskonstrukt)	<i>msh</i>	~1.3kb	U. Walldorf (unveröffentlicht)
pGEX-2T msh0.6 (Expressionskonstrukt)	<i>msh</i>	~0.6kb	U. Walldorf (unveröffentlicht)
pGEX-5X-1 mshNA (Expressionskonstrukt)	<i>msh</i>	~0.3kb	Brofman Epelbaum, 2011
pGEX-5X-1 mshNB (Expressionskonstrukt)	<i>msh</i>	~0.5kb	Brofman Epelbaum, 2011
cW13/7 (cDNA-Klon)	<i>ems</i>	~2.4kb	Walldorf und Gehring, 1992
pGADT7-T (Y2H-Konstrukt, Positivkontrolle)	SV40 großen T-Antigen	~1.9kb	Clontech

<p>pGEX-5X-Serie (GE Healthcare)</p>	<p>pGEX-5X-1 [27-4584-01] Factor Xa Ile Glu Gly Arg Gly Ile Pro Gly Phe Pro Gly Arg Leu Glu Arg Pro His Arg Asp ATC GAA GGT CGT GGG ATC CCC GAA TTC CCG GGT CGA CTC GAG CGG CCG CAT CCG GAC TGA BamHI EcoRI SmaI SalI XhoI NotI Stop codons</p> <p>pGEX-5X-2 [27-4585-01] Factor Xa Ile Glu Gly Arg Gly Ile Pro Gly Ile Pro Gly Ser Thr Arg Ala Ala Ser ATC GAA GGT CGT GGG ATC CCC GAA ATT CCG GGG TCG ACT TGA GCG GCC GCA TCG TGA BamHI EcoRI SmaI SalI XhoI NotI Stop codon</p> <p>pGEX-5X-3 [27-4586-01] Factor Xa Ile Glu Gly Arg Gly Ile Pro Arg Asn Ser Arg Val Asp Ser Ser Gly Arg Ile Val Thr Asp ATC GAA GGT CGT GGG ATC CCC AGG AAT TCC CGG GTC GAC TCG AGC GCG CCG ATC GGG ACT GAC TGA BamHI EcoRI SmaI SalI XhoI NotI Stop codons</p> 	<p>Expression von GST-Fusionsproteinen</p>
<p>pGADT7 AD (Clontech)</p>		<p>Yeast-Two-Hybrid-Analyse</p>
<p>pGBKT7 (Clontech)</p>		<p>Yeast-Two-Hybrid-Analyse</p>
<p>pW25 (DGRC)</p>		<p>Gene Targeting</p>
<p>pUAST (DGRC)</p>		<p>Fehlexpression in <i>Drosophila</i></p>

<p>pUASTattB (DGRC)</p>		<p>Fehlexpression in <i>Drosophila</i> bei PhiC31-vermittelter Integration</p>
<p>pUAST-RfB-HA-CYFP-attB (Gohl et al., 2010)</p>		<p>BiFC in <i>Drosophila</i></p>
<p>pUAST-RfB-Myc-NYFP-attB (Gohl et al., 2010)</p>		<p>BiFC in <i>Drosophila</i></p>
<p>pUAST-NYFP-Myc-RfB-attB (Gohl et al., 2010)</p>		<p>BiFC in <i>Drosophila</i></p>

3.1.6 Oligonukleotide (Primer)

Angefügte Schnittstellen sind durch Unterstreichung gekennzeichnet. Zum leichteren Direkt-Verdau des PCR-Produktes wurden zum Teil Linker-Sequenzen vor den Schnittstellen angefügt. Die Schmelztemperaturen wurden unter Ausschluss der artefiziell angefügten Sequenzen anhand der „2°C+4°C-Regel“ berechnet. Für alle Mutagenese-Primer wurde in den durchgeführten PCR-Reaktionen eine pauschale Schmelztemperatur von 55°C angenommen, da diese in ausreichender Frequenz die gewünschten Basenfehlpaarungen erlaubt.

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Schmelztemperatur (2°C+4°C-Regel)
A1aMut1_F	CACAACATGAAGCGTGCCGCCGCGCGGCCCGGGCCCCG GCCTCC	162°C (55°C)
A1aMut1_R	GGAGGCCGGGCCCGGGGCGCGCGGCGGCACGCTTCAT GTTGTG	162°C (55°C)
A1aMut2_R	GGGAATTCGGCTTGCCAAAGCGGCCCTGGCGGCCGGGCC CGG	148°C (55°C)
A2_2Mut1F	ACCGCGCGCCGGCTCGTTATGGCTCCCCGCACC	116°C (55°C)
A2_2Mut1F-Bam	<u>GGATCC</u> GCATGCGACGTCGATTGGACCGCGCGCCGGCTC GTTATGGCTCCCCG	170°C (55°C)
A2_2Mut1R	CGGGGAGCCATAACGAGCCGCGCGCGGTCCAATCGACG TCGCATGC	170°C (55°C)
A2_2Mut2F	CCGACTATGAACGTTACCACTACGCGAGGGCCCCCTATG GGACAAGG	150°C (55°C)
A3Mut1FBam	<u>GGATCCC</u> GACTATGAACGTTACCACTACGCGAGGGCCCC CTATGGGACAAGG	146°C (55°C)
Bam-nito1	<u>GGATCCCC</u> ATGAGTAGTCATCGAGAC	60°C
Bam-nito3	<u>GGATCCC</u> ATTGCATCATGACTATCCTC	60°C

Bam-nitoA1f	<u>GGATCCCCTCCAGGAGCAGTTTGTC</u>	60°C
Bam-nitoA2f	<u>GGATCCGCATGCGACGTCGATTGGAC</u>	64°C
Bam-nitoA3f	<u>GGATCCC GGACTATGAACGTTACCAC</u>	60°C
Bam-nitoC3f	<u>GGATCCCCAATTGCGACGATGCCAG</u>	60°C
C2_1Mut1R	GCGAGCCCGCTTCAATGGGGCTCTAGCACGAGCGCGTTC TACACCAGG	158°C (55°C)
C2_2Mut1F	GATCCCCGAATTCCGCGCTCGTGCTAGAGCCCCATTGAA GCGGGCTC	154°C (55°C)
C2_2Mut1F-B	CCCCATTGAAGCGGGCTCGCGCTCCCGGAGCTGATGCTG ACACCTCGACTC	170°C (55°C)
C2_2Mut2F	CATTGAAGCGGGCTCGCGCTCCCGGAGCTGATGCTGACA CCTCGACTC	158°C (55°C)
C2_2Mut2R	GAGTCGAGGTGTCAGCATCAGCTCCGGGAGCGCGAGCCC GCTTCAATG	158°C (55°C)
DBiFC_gro1F	ATGTATCCCTCACCGGTGCG	64°C
DBiFC_gro2R	ATAAATAACTTCGTAGACAGTAG	60°C
DBiFC_hipk1F	ATGAAAACGTCCTACCCCCCA	64°C
DBiFC_hipk2R	CTCAGCCCCATACCATATGTT	62°C
DBiFC_nito1F	ATGAGTAGTCATCGAGACGG	60°C
DBiFC_nito2R	GGCCGTTCCGCCGCGCAC	66°C
DBiFC-ems1F	ATGACTAAGATGATTCCGCCG	62°C
DBiFC-ems2R	GTGGCTGGCGTCCAGCTCG	62°C
DBiFC-msh1F	ATGTTAAAGCTCAGCCCAGC	60°C
DBiFC-msh2R	TCCCAGGTGCATCAGGCTC	62°C
Eco-nito10	<u>GAATTCATGAGTAGTCATCGAGACGGA</u>	62°C
Eco-nito8f	<u>GAATTCCTGTACCGCGAGTACAAGAAG</u>	64°C
Eco-nitoA2f	<u>GAATTCGCATGCGACGTCGATTGGAC</u>	64°C
Eco-nitoC2f	<u>GAATTCGCTCTCGTTCTAGATCCC</u>	60°C
ems10	<u>GGATCCGCCATGATGCATCCCGGAGG</u>	66°C
ems11	<u>GGATCCCACCACAATGCCGCCATGG</u>	62°C
ems11B	ATAT <u>GAATTC</u> ACCACAATGCCGCCATGG	62°C
ems12	<u>CTCGAGCCATGGCGGCATTGTGGTG</u>	62°C
ems13	ATAT <u>GAATTC</u> AGCCCTCGTCTTCGCCAC	64°C
ems14	TATA <u>CTCGAG</u> GGGCTGCGAGGACTGGGGG	68°C
ems15	ATAT <u>GAATTC</u> GTGGCAATGATGTCAGCAC	62°C
ems16	TATA <u>CTCGAG</u> GTGCTGACATCATTGCCAC	62°C
ems17	ATAT <u>GAATTC</u> GCGAGCGCAATGTGCCCG	66°C
ems18	TATA <u>CTCGAG</u> CGGGCACATTGCGCTCGCC	66°C
ems19	TATA <u>CTCGAG</u> GTTCCCCTTGAGGGAGAC	62°C
ems1B	ATAT <u>GAATTC</u> ATGACTAAGATGATTCCGCCG	62°C

ems1NB1mut1R	TATA <u>CTCGAG</u> CGGGCACATTGCGCTCGCCGGGCGGCGGA GCCTGGGGACCGGCTAGATCGGGCG	192°C (55°C)
ems1NB2mut1F	ATATGA <u>AATTC</u> GGCGAGCGCAATGTGCCCGGTGCGCCGCC CCAAGCGCCACCAGCC	160°C (55°C)
ems2NNmut1F	ATATGA <u>AATTC</u> ACGGAGCAGCCCCAGATGGCCGTCTCCCT CAAGCGGGAACGCGCACCTGC	170°C (55°C)
ems2-Xho	TATA <u>CTCGAG</u> TGGCTGGATGCGCTGGGC	62°C
ems3-EcoB	ATATGA <u>AATTC</u> ACGGAGCAGCCCCAGATGG	64°C
ems7	<u>GGATCC</u> GCCACGGACTGCCCTATC	64°C
ems8	<u>CTCGAG</u> GATAGGGCAGTCCGTGGGC	64°C
ems8B	TATA <u>CTCGAG</u> GATAGGGCAGTCCGTGGGC	64°C
ems9	<u>CTCGAG</u> CAGCTCCTCCGGGATGCATC	66°C
emsE1	<u>GGATCC</u> ATGACTAAGATGATTCCGCCG	62°C
emsE2	<u>CTCGAG</u> TGGCTGGATGCGCTGGGC	62°C
emsE3	<u>GGATCC</u> ACGGAGCAGCCCCAGATGG	64°C
emsE4	<u>CTCGAG</u> TTTGCGGAACGGGGGCACC	64°C
emsE5	<u>GGATCC</u> CAGGAGGATGAGAAGGGCG	62°C
emsE6	<u>CTCGAG</u> TCAGTGGCTGGCGTCCAGC	64°C
groBiFCseq1	GACATCAAGCCGACGGGTC	62°C
groBiFCseq2	GACGCGTTGGTGGGTGTTG	62°C
hipkBiFCseq1	CGACTACCAGCTGGTGCAG	62°C
hipkBiFCseq2	CCACAGAGCACATGCTGAAC	62°C
hipkBiFCseq3	CCATGCAGCCACCGTTGCAG	62°C
hipkBiFCseq4	CTGGAGGAGCTCAGGTACC	62°C
Kpn-nito11	<u>GGTACCT</u> CAGCCGTTCCGCCGCGCAC	74°C
msh1F_Eco	<u>GAATTC</u> GGCTTTATGTTAAAGCTCAGC	60°C
msh1F_EcoMut	<u>GAATTC</u> GGCTTTATGTTAAAGCTCGCCCCAGCGGCCATG ACAGTTACAGG	136°C (55°C)
msh2F_Eco	<u>GAATTC</u> CCTGCAGCAGCACCAGCAAC	62°C
msh2F-EcoB	ATATGA <u>AATTC</u> CCTGCAGCAGCACCAGCAAC	62°C
msh2R_Xho	<u>CTCGAG</u> GTTGCTGGTGCTGCTGCAG	62°C
msh3R_B	TATA <u>CTCGAG</u> GGATCCCAGTGGCGTGGAG	64°C
msh3R_Xho	<u>CTCGAG</u> GGATCCCAGTGGCGTGGAG	64°C
msh4F-Eco	<u>GAATTC</u> GCCAACACCTTCCATCCCG	62°C
msh4R_Xho	<u>CTCGAG</u> CGGGATGGAAGGTGTTGGC	62°C
msh5F-Eco	<u>GAATTC</u> CAACCAGGCGGCGGATGGAC	68°C
msh5R-Xho	<u>CTCGAG</u> GTCCATCCGCCGCTGGTTG	68°C
msh6R-Xho	TATA <u>CTCGAG</u> GTCCGCCAGGAGAGAGGCC	66°C
msh7	ATATGA <u>AATTC</u> CACATGCCAGCACCAGGC	64°C

mshNB-N1mut1R	<u>CTCGAGCCTGGTTGGGTGGCGCTCTGGGCCTCGCGTCCGC</u> CAGGAGAGAG	152°C (55°C)
mshNB-N2Amut1R	<u>CTCGAGCGGCGGAGGCGGCGGCGGCGGCGGCCTGGG</u> AGATGGG	146°C (55°C)
nito16mutII_F	CCGAGTCGTTATGGCGCCCCGCACCGGGAGC	108°C (55°C)
nito16mutII_R	CATGTAGGGCTCCCGGTGCGGGGCGCCATAACGACTCGG	132°C (55°C)
nito2	CATGGCCATGGAGGTGATG	60°C
nito4	GCCTATGCACGTCGTTGTG	60°C
nito9	CGGGAAAGTGACTCCGGCAAC	68°C
nitoA1r	GACAAACTGCTCCTGGAGG	60°C
nitoA2_2r	GTGGTAACGTTTCATAGTCCGG	64°C
nitoA2r	GTCCAATCGACGTCGCATG	60°C
nitoBiFCseq1	CATTGCATCATGACTATCCTC	60°C
nitoBiFCseq2	CTCCGTATCCACCTAGGGG	62°C
nitoGT0	GTTGGACACCCGCTCCTTGG	66°C
nitoGT1	<u>CGTACGTAGCGGGTGGGATCGCTGCTG</u>	70°C
nitoGT2	<u>GGCGCGCCGTTTCATGGTATCGAGCCATATTTG</u>	68°C
nitoGT3	<u>GGTACCGCCATTGCATCATGACTATC</u>	62°C
nitoGT4	<u>GCGGCCGCAGATATCGCTACATAGTGCTGGTC</u>	70°C
nitoseq1	GCTGCCAGTCGAGCTGAG	60°C
nitoseq2	CTATTGCTATCGCTATCAGCCG	66°C
nitoseq3	GGAGTGGAGTCATAGGTAAGG	64°C
nitoseq4	CCTCGTTTTCTATGTGCACC	60°C
nitoseq5	CAGCTTCACATTGGGCAGG	60°C
nitoY1	CATGAGTAGTCATCGAGACG	60°C
Not-nitoC1r	<u>GCGGCCGCGATCTAGAACGAGAGCGTTC</u>	60°C
pW25II	CGTGCTCATCGCGAGTACG	62°C
Sal-nito5	<u>GTCGACGAAGAGGAAGAGGCATGTAC</u>	60°C
Xho-nito6	<u>CTCGAGCTACAGTTTGTCTCCCATC</u>	60°C
Xho-nito7r	<u>CTCGAGCTTCTTGTACTCGCGGTACAG</u>	64°C
Xho-nitoA2_2r	<u>CTCGAGGTGGTAACGTTTCATAGTCCGG</u>	64°C
Xho-nitoC2r	<u>GAGCTCCATCGTCGCAATTGGTGTCG</u>	62°C

Sequenzierprimer	Sequenz (5' → 3')	Schmelztemperatur (2°C+4°C-Regel)
M13-20 IRD700	GTAAAACGACGGCCAGT	44°C
M13-RP IRD 800	GGAAACAGCTATGACCATG	56°C
pGEX3 IRD 700	CCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGG	76°C
pGEX5 IRD 800	GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG	76°C

3.1.7 Lösungen und Puffer

Alle mit * markierten Lösungen wurden autoklaviert. Lösungsmittel ist, sofern nicht anders angegeben, H₂O_{deion}.

APS-Lösung:

10% (w/v) APS (4°C)

Canadabalsam-Salicylat-Gemisch:

2 Teile Canadabalsam + 1 Teil Methylsalicylat

Coomassie-Färbelösung:

0.2% (w/v) Brilliant Blue R250, 0.01% (w/v) Brilliant Blue G250, 50% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Eisessig, 40% (v/v) H₂O_{deion}

DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) – Stammlösung:

1mg/ml DAPI (4°C)

Elektrophoresepuffer (SDS-PAGE) (10x):

250mM Tris, 1.9M Glycin, 1% (w/v) SDS

Elutionspuffer (Proteinaufreinigung):

50mM Tris-HCl (pH 8.0)*, 10mM Glutathion

Embryonenwaschlösung:

0.7% (w/v) NaCl, 0.03% (v/v) TritonX-100

Entfärbepuffer (SDS-PAGE):

70% (v/v) H₂O, 10% (v/v) Eisessig, 20% (v/v) Methanol

Ethidiumbromid-Stammlösung:

10mg/ml in H₂O (4°C, lichtgeschützt)

Färbepuffer für *in situ* Hybridisierung:

100mM NaCl*, 50mM MgCl₂*, 100mM Tris-HCl (pH 9.5)*, 1mM Levamisol, 0.1% (v/v) Tween20

Fixativ für *in situ* Hybridisierung auf Embryonen:

1xPBS, 10% Formaldehyd, 50mM EGTA

GTE-Lösung*:

50mM Glucose, 25mM Tris-HCl (pH 8.0), 10mM EDTA

Hybridisierungslösung (HybMix):

50% (v/v) deionisiertes Formamid, 5xSSC, 100µg/ml sonifizierte, gekochte Lachssperma-DNA, 100µg/ml tRNA *E. coli*, 50µg/ml Heparin, 0.1% (v/v) Tween20

Hypochloridlösung:

1.4% (w/v) Natriumhypochlorid in H₂O

Kaliumacetat-Lösung, 5M (alkalische Lyse)*:

29.5ml Eisessig, H₂O_{deion} zugeben, mit KOH auf pH 4.8 einstellen, ad 100ml

Kinasepuffer:

50mM Tris (pH 7.5)*, 100mM NaCl*, 10mM MgCl₂*

Lithiumacetat (10x)*:

1M Lithiumacetat, pH 7.5

Lithiumacetat/TE:

10% (v/v) 10x TE-Puffer_{Hefe}*, 10% (v/v) 10x Lithiumacetat*, 80% (v/v) H₂O_{deion}*

Lithiumchlorid/Kaliumacetat-Lösung (genomische DNA aus Fliegen):

1 Teil 5M Kaliumacetat, 2.5 Teile 6M Lithiumchlorid

Lysepuffer (Proteinaufreinigung):

1xPBS_{Protein}*, 1mg/ml Lysozym, 1 Tablette „Complete Protease Inhibitor“ (Roche) pro 20 ml

Lysispuffer (genomische DNA aus Fliegen):

100mM Tris-HCl (pH 7.5)*, 100mM EDTA*, 100mM NaCl*, 0.5% (w/v) SDS

NaOH/SDS-Lösung:

0.2M NaOH, 1% (w/v) SDS

NHS:

4% Normal Horse Serum in PBX_{0.1%}

PBL (sterilfiltriert):

100mM Lysin-HCl, 50mM Natrium-Phosphat-Puffer pH 7.4 (4°C)

PBS_{Ak} (10x)*:

1.75M NaCl, 18.6mM NaH₂PO₄(H₂O), 84.1mM Na₂HPO₄(2H₂O), pH 7.4

PBS_{in situ} (10x)*:

1.3M NaCl, 30mM NaH₂PO₄(H₂O), 70mM Na₂HPO₄(2H₂O), pH 7.4

PBS_{Protein} (10x)*:

1.54M NaCl, 23mM NaH₂PO₄(H₂O), 10mM Na₂HPO₄(2H₂O), pH 7.3

PBS(KM):

1xPBS*, 1mM MgCl₂, 3mM KCl, pH 7.3

PBS(KM)T:

1xPBS*, 1mM MgCl₂, 3mM KCl, 0.1% (v/v) Tween 20, pH 7.3

PBT_{in situ}:

1xPBS_{in situ}, 0.1% (v/v) Tween 20

PBX_{0.1%}:

1xPBS_{Ak}, 0.1% (v/v) TritonX-100

PBX_{0.5%}:

1xPBS_{Ak}, 0.5% (v/v) TritonX-100

50% PEG*:

50% (w/v) PEG-4000 (Polyethylenglykol)

PEG-Lösung:

80% (v/v) 50% PEG, 10% (v/v) 10x TE-Puffer_{Hefe}, 10% (v/v) 10x Lithiumacetat

PEM*:

100mM PIPES, 1mM EGTA, 1mM MgCl₂, pH 7.1

Puffer 1 für die Herstellung kompetenter Bakterien (sterilfiltriert):

100mM RbCl₂, 30mM Kaliumacetat, 10mM CaCl₂, 50mM MnCl₂ (Zugabe erst nach Einstellen des pH-Wertes), 15% (v/v) Glycerin (Zugabe erst nach Einstellen des pH-Wertes); pH 5.8 mit verdünnter Essigsäure einstellen

Puffer 2 für die Herstellung kompetenter Bakterien (sterilfiltriert):

10mM MOPS, 75mM CaCl₂, 10mM RbCl₂, 15% (v/v) Glycerin (Zugabe erst nach Einstellen des pH-Wertes); pH 6.5 mit verdünnter KOH einstellen

Puffer PI (Dot Blot)*:

150mM NaCl, 100mM Tris-HCl (pH 7.5)

Puffer PII (Dot Blot):

0.5% Blocking-Reagenz (gelöst in 10% Maleinsäurepuffer, autoklaviert, Lagerung bei -20°C) in Puffer PI bei 60°C gelöst

Puffer PIII (Dot Blot)*:

100mM NaCl, 50mM MgCl₂, 100mM Tris-HCl (pH 9.5)

SDS-Probenpuffer (5x) (Laemmli, 1970):

10% (w/v) SDS, 500mM DTT, 300mM Tris-HCl (pH 6.8)*, 25mM β-Mercaptoethanol, 50% (v/v) Glycerin, 0.05% (w/v) Bromphenolblau

SSC (20X)*:

3M NaCl, 0.3M Natriumcitrat, pH 7.0

Stopp-Lade-Puffer (6x):

10mM Tris-HCl (pH 8.0)*, 1mM EDTA*, 0.1% (w/v) SDS, 30% (v/v) Glycerin, 0.17% (w/v) Bromphenolblau, 0.17% (w/v) Xylencyanol

TAE-Puffer (10X):

400mM Tris-HCl (pH 7.4), 200mM Natriumacetat, 10mM EDTA

TBE-Puffer (10x)*:

900mM Tris-HCl, 150mM Natriumtetraborat-Decahydrat, 20mM EDTA, pH 8.3

TE-Puffer_{DNA} (1x)*:

10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0

TE-Puffer_{Hefe} (10x) *:

10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 7.5

X-Gal-Stammlösung (Hefe-Filter-Assays):

20mg/ml X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-Galaktopyranosid)
gelöst in N,N-Dimethylformamid

Z-Puffer*:

60mM Na₂HPO₄(7H₂O), 40mM NaH₂PO₄(H₂O), 10mM KCl, 1mM MgSO₄(7H₂O), pH 7.0

Z-Puffer/X-Gal-Lösung:

100ml Z-Puffer, 0.27ml β -Mercaptoethanol, 1.67ml X-Gal-Stammlösung

3.1.8 Medien

Alle mit * markierten Medien wurden autoklaviert. Lösungsmittel ist, sofern nicht anders angegeben, H₂O_{deion}

Antibiotikastammlösungen:

Ampicillin: 100mg/ml Ampicillin-Natriumsalz in H₂O_{deion}

Kanamycin: 100mg/ml Kanamycinsulfat in H₂O_{deion}

Spectinomycin: 100mg/ml Spectinomycindihydrochloridpentahydrat in H₂O_{deion}

Apfelsaftagarplatten:

8g Agar-Agar in 250ml H₂O aufschwemmen und autoklavieren;

8g Zucker durch aufkochen in 80ml Apfelsaft lösen und mit dem gelösten Agar vermischen.

Gegossene Platten können bei 4°C gelagert werden.

***Drosophila*-Standardfuttermedium:**

64g Fadenagar in 5 Liter kochendem H₂O lösen, anschließend 176g Rübensirup und 640g Malzextrakt zugeben. 144g Trockenhefe, 80g Sojamehl und 640g Maismehl in 3l H₂O vermischen, zum Fadenagar-Rübensirup-Malzextrakt-Gemisch geben und aufkochen. Auf ca. 60°C abkühlen lassen, 50ml Propionsäure und 24g Nipagin (4-Hydroxybenzoesäuremethylester) zugeben und abfüllen. Die Lagerung erfolgt bei 18°C.

SD-Medium für Hefe:

0.67% YNB (aminosäurefrei), 10% 10x Drop-out-Mix, (optional für Platten 1.5% Bacto-Agar); nach Autoklavieren Zugabe von 2% (w/v) Glucose

10x Drop-out-Mix*:

0.2g/l Adenin, 0.2g/l Arginin, 0.2g/l Histidin, 0.3g/l Isoleucin, 1g/l Leucin, 0.3g/l Lysin, 0.2g/l Methionin, 0.5g/l Phenylalanin, 2g/l Threonin, 0.2g/l Tryptophan, 0.3g/l Tyrosin, 0.2g/l Uracil, 1.5g/l Valin

Je nach gewünschter Zusammensetzung werde(n) die entsprechende(n) Aminosäure(n) bzw. Nukleinsäurebase(n) ausgelassen.

LB-Medium*:

1% (w/v) NaCl, 1% (w/v) Trypton, 0.5% (w/v) Hefeextrakt

LB-Agarplatten*:

1.5% (w/v) Bacto-Agar in LB-Medium

Bei Bedarf vor dem Gießen der Platten Zugabe von Antibiotikastammlösungen in gewünschter Konzentration.

SOC-Medium:

10mM NaCl, 10mM MgCl₂, 10mM MgSO₄, 2.5mM KCl, 0.5% (w/v) Hefeextrakt, 2% (w/v) Trypton; nach Autoklavieren Zugabe von 20mM Glucose

YPD-Medium:

2% (w/v) Difco Pepton, 1% (w/v) Hefeextrakt, (optional für Platten 1.5% (w/v) Bacto-Agar); nach Autoklavieren Zugabe von 2% (w/v) Glucose

3.1.9 Kits

Bezeichnung	Bezugsquelle
QIAGEN Plasmid Midi Kit	Qiagen GmbH (Hilden)
peqGold Plasmid Miniprep Kit	Peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen)
Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit	Geneaid Biotech Ltd. (New Taipei City, Taiwan)
DNA Cycle Sequencing Kit	Jena Bioscience GmbH (Jena)
TOPO [®] TA Cloning [®] Kit	Invitrogen GmbH (Darmstadt)
TOPO [®] XL PCR Cloning [®] Kit	Invitrogen GmbH (Darmstadt)
pCR [®] 8/GW/TOPO [®] TA Cloning Kit	Invitrogen GmbH (Darmstadt)
Gateway [®] LR Clonase [™] II Enzym Mix	Invitrogen GmbH (Darmstadt)

3.1.10 Geräte

Bezeichnung	Bezugsquelle
Binokular Stemi 2000	Zeiss (Oberkochen)
Biometra Tpersonal Thermocycler	Biometra GmbH (Göttingen)
Bio-rad Mini-Protean [®]	Bio-rad (München)
Bio-rad My cycler [™] Thermal Cycler	Bio-rad (München)
Bio-rad Photometer SmartSpec [™] 3000	Bio-rad (München)
Bio-rad Power-Supply	Bio-rad (München)
Brutschrank	Memmert (Schwabach)
Curix-60 Fotomaschine	AGFA (Bonn)
Eppendorf FemtoJet	Eppendorf (Hamburg)
Eppendorf 5415R Kühlzentrifuge	Eppendorf (Hamburg)
Eppendorf Concentrator 5301	Eppendorf (Hamburg)
Eppendorf Mastercycler Personal	Eppendorf (Hamburg)
Eppendorf miniSpin plus Tischzentrifuge	Eppendorf (Hamburg)

Eppendorf Zentrifuge 5702	Eppendorf (Hamburg)
Gel-Elektrophorese-System	Peqlab (Erlangen)
Geltrockner (Typ G2000)	Fröbel-Labor Technik (Lindau)
Gyro Mini Nutating Mixer	Labnet International Inc. (Oakham, Rutland, UK)
Heidolph Rotamax 120	Heidolph (Kelheim)
Heizschrank Celsius 2000	Memmert (Schwabach)
Kamera U-CMAD3(CC-12 soft imaging system)	Olympus (Hamburg)
Konfokalmikroskop LSM710	Zeiss (Oberkochen)
Konfokalmikroskop SP5	Leica (Wetzlar)
LI-COR 4300 DNA-Analyzer	LI-COR (Bad Homburg)
Mikromanipulator	Leitz (Wetzlar)
Mikroskop Axiovert 25	Zeiss (Oberkochen)
Mikroskop BX 61	Olympus (Hamburg)
Mikroskop SZX 12	Olympus (Hamburg)
Magnetheizgerät („Nadelzieher“)	GETRA (München)
Peqlab Multi-Shaker Rotator RS-24	Peqlab (Erlangen)
Rollmischer RM5-V	CAT (Staufen)
Schüttelinkubator Unitron	INFORS (Einsbach)
Sonifier® Cell Disruptor B-12	Branson Sonic Power Company (Danbury)
Sorvall® Evolution RC-Kühlzentrifuge	Sorvall (Langenselbold)
UV-Crosslinker	Biostep (Jahnsdorf)
UV-Gel-Dokumentationssystem Intas Gel Jet Imager	Intas (Göttingen)

3.1.11 Bezugsquellen

Chemikalien

Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe), Becton, Dickinson and Co. (Heidelberg), Sigma Aldrich GmbH (Seelze)

Enzyme und Feinchemikalien

Fermentas GmbH (St. Leon-Rot), Geneaid Biotech Ltd. (New Taipei City, Taiwan), GenScript (Piscataway, New Jersey), Hartmann Analytic GmbH (Braunschweig), Invitrogen GmbH (Darmstadt), Jena Bioscience (Jena), Lonza Group Ltd. (Ratingen), Peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen), Qiagen GmbH (Hilden), Roche Applied Science (Mannheim), VectorLabs Inc. (Burlingame, CA)

3.2 Methoden

Arbeiten mit DNA

3.2.1 Herstellung chemisch kompetenter Zellen (Rubidiumchlorid-Methode)

Bakterienzellen der verwendeten *E. coli*-Stämme wurden mit der nachfolgenden Methode behandelt, um ihnen die Fähigkeit zu verleihen, Plasmid-DNA aus der sie umgebenden Lösung aufzunehmen.

10ml LB-Medium wurden mit einer Einzelkolonie einer Ausstrichplatte der jeweiligen Zellen inokuliert und bei 37°C und 200rpm über Nacht geschüttelt. Mit 2ml dieser Kultur wurden 200ml LB-Medium angeimpft und unter gleichen Bedingungen bis zu einer optischen Dichte OD₆₀₀ von 0.5 bis 0.7, entsprechend der logarithmischen Wachstumsphase der Bakterien, inkubiert. Nach dem Überführen in vorgekühlte Zentrifugenbecher wurden die Zellen 5min auf Eis gekühlt und anschließend 5min bei 4°C 6000xg (Sorvall Evolution RC, SLA-1500-Rotor) abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Bakterienpellet in 80ml kaltem Puffer 1 resuspendiert und für 5min auf Eis inkubiert. Es folgte ein erneuter Zentrifugationsschritt (5min, 6000xg, 4°C). Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 8ml kaltem Puffer 2 resuspendiert. Die Zellsuspension wurde zu je 250µl in vorgekühlte Reaktionsgefäße aliquotiert, sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Kompetenzkontrolle der Bakterien, gemessen in Kolonienzahl/µg DNA:

Zur Transformation von je 100µl Zellen wurden verschiedene Verdünnungsstufen (10ng, 1ng, 100pg und 10pg) einer Plasmid-DNA eingesetzt und die Transformationsansätze auf antibiotikumhaltigen Agarplatten (entsprechend der Resistenz des Plasmids) ausplattiert. Weitere 100µl Zellen wurden ohne Plasmid-DNA als Negativkontrolle mitgeführt. Am nächsten Tag erfolgte das Auszählen der Kolonien; eine Transformationseffizienz von beispielsweise 1×10^7 Kolonien/µg DNA lag vor, wenn bei 10pg DNA ~100 Kolonien gezählt werden konnten.

3.2.2 Restriktionsverdau

Für alle Restriktionsverdau wurden Restriktionsenzyme der Firma Fermentas verwendet. Da die optimalen Reaktionsbedingungen für jedes Enzym spezifisch sind, wurden Pufferzusammensetzung und Inkubationstemperatur dem jeweiligen Enzym bzw. der

Enzymkombination angepasst. Die Inkubationszeit lag bei 1h für Testverdaus und bei 3h für präparative Verdaus von bis zu 1µg DNA.

Erzeugen von „Blunt Ends“

Restriktionsenzyme erzeugen Fragmente mit spezifischen 5'-Überhängen, 3'-Überhängen oder sogenannten „Blunt Ends“ ohne Überhang. Sollten nach einem Restriktionsverdaus Fragmente mit verschiedenen Überhängen zusammengefügt werden, mussten die Enden der Fragmente im Anschluss an den Restriktionsverdaus durch Auffüllen der 5'-Überhänge bzw. Abbau der 3'-Überhänge „gebluntet“ werden. Dies erfolgte mit Hilfe von T4-DNA-Polymerase (Fermentas) nach Angaben des Herstellers.

3.2.3 Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten in Agarosegelen

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA erfolgte ausschließlich in 1%igen Agarosegelen. Zur Gelherstellung wurde die Agarose in 1xTAE aufgeköcht, leicht abgekühlt und luftblasenfrei in eine vorbereitete Kammer gegossen. Nach dem Auspolymerisieren wurde das Gel mit 1xTAE überschichtet und mit den vorbereiteten DNA-Proben (DNA + 1/5 Volumen 6xStopp-Lade-Puffer) beladen; als Marker wurde „GeneRuler™ 1kb DNA ladder“ der Firma Fermentas verwendet. Die Auftrennung erfolgte bei konstanter Spannung, die in Abhängigkeit von der Gelgröße zwischen 80V und 150V gewählt wurde. Anschließend wurde das Gel für 15min in Ethidiumbromid-Lösung (0.1% (v/v) Ethidiumbromid-Stammlösung in 1xTAE) gefärbt und mit einem Intas-Geldokumentationssystem unter UV-Licht fotografiert und ausgewertet.

3.2.4 DNA-Isolierung aus Agarosegelen

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde mit Hilfe des „Gel/PCR Fragments Extraction Kit“ (Geneaid) gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt.

3.2.5 Dephosphorylierung mit rAPid Alkaline Phosphatase

Um während der Ligation mit Fremd-DNA eine Religation der linearisierten Vektor-DNA zu vermeiden, wurde diese einer Dephosphorylierung unterzogen. Die Reaktion wurde wie folgt angesetzt: xµl linearisierte Vektor-DNA (bis zu 1µg), 2 µl 10x rAPid AP-Phosphatasepuffer, 1µl rAPid Alkaline Phosphatase, ad 20µl H₂O_{deion.} Nach einer dreißigminütigen Inkubation bei 37°C wurde die Reaktion durch Erhitzen auf 75°C für 3min abgestoppt und konnte direkt zur Ligation eingesetzt werden.

3.2.6 Ligation

Für die enzymatische Verknüpfung (Ligation) der DNA-Moleküle wurde linearisierte, dephosphorylierte Vektor-DNA mit aufgereinigter Fremd-DNA sowie 1µl 10xLigasepuffer und 1µl T4-DNA-Ligase versetzt. Die Reaktion erfolgte in einem Gesamtvolumen von 10µl für 3h bei 24°C. Nach Inaktivierung der Ligase für 10min bei 65°C wurde der gesamte Ansatz zur Transformation chemisch kompetenter Bakterien eingesetzt.

3.2.7 Transformation von chemisch kompetenten Bakterien mit Plasmid-DNA

Pro Transformationsansatz wurden 100µl bei -80°C gelagerte, kompetente Bakterienzellen auf Eis aufgetaut, vorsichtig mit einem Ligationsansatz (10µl) oder einem Aliquot ringgeschlossener Plasmid-DNA (2µl DNA + 8µl H₂O_{deion}) vermischt und 30min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock von 90s bei 42°C zum Einschleusen der DNA. Anschließend wurden die Zellen sofort 5min auf Eis gekühlt. Nach Zugabe von 250µl SOC-Medium wurde der Ansatz bei 37°C und 200rpm für 1h geschüttelt. Die Zellen wurden auf antibiotikumhaltige Agarplatten (entsprechend der Resistenz des Plasmids) ausplattiert und die Platten über Kopf bei 37°C im Brutschrank über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag konnten Einzelklone in Flüssigkultur angezogen und nachfolgend analysiert werden.

3.2.8 Klonierung mit dem TOPO[®] TA Cloning[®] Kit (Invitrogen)

Das TOPO[®] TA Cloning[®] Kit der Firma Invitrogen erlaubt es, PCR-Produkte mit 3'-A-Überhängen ohne weitere Modifikation oder Aufreinigung direkt aus der PCR-Reaktion heraus in den linearisiert vorliegenden Vektor pCR[®]2.1 zu klonieren. Dazu wurde folgender Ansatz vorbereitet und über Nacht bei 14°C inkubiert: 0.5 bis 4µl PCR-Amplifikat, 1µl Vektor pCR[®]2.1 (25ng/µl), 1µl 10x Ligationspuffer, 1µl T4-DNA-Ligase, ad 10 µl H₂O_{deion}. Am folgenden Tag wurden 2µl des Ansatzes zu 100µl *E. coli* DH5α-Zellen gegeben, sanft vermischt und 30min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock von 30s bei 42°C wurden die Zellen kurz auf Eis abgekühlt, mit 250µl SOC-Medium versetzt und 1h bei 37°C und 200rpm im horizontal befestigten Reaktionsgefäß geschüttelt. Anschließend wurde der Ansatz auf Kanamycin-haltigen Agarplatten (50µg/ml) ausplattiert und über Kopf bei 37°C im Brutschrank über Nacht inkubiert.

Die Spezifikation des pCR[®]2.1-Vektors erlaubt bei Vorbereitung der Selektionsplatten mit IPTG (100mM, 40µl/Platte) und X-Gal (40mg/ml in DMSO, 40µl/Platte) eine Farbselektion, bei der Klone mit integrierter Fremd-DNA hellblau bis weiß erscheinen, während

Leervektoren zu einer kräftigen Blaufärbung der Bakterienkolonie führen. Daher wurden für weitere Analysen ausschließlich hellblaue/weiße Klone verwendet.

3.2.9 Klonierung mit dem TOPO[®] XL PCR Cloning Kit (Invitrogen)

Für die Klonierung größerer PCR-Produkte mit 3'-A-Überhängen wurde das TOPO[®] XL PCR Cloning Kit verwendet. Der pCR[®]-XL-TOPO[®]-Vektor trägt an seinen 3'-Enden kovalent gebunden das Enzym Topoisomerase I, welches eine direkte Ligation des PCR-Amplifikats mit dem Vektor ohne Zugabe weiterer Enzyme erlaubt (Shuman, 1994).

Zunächst wurde das PCR-Produkt in einem Kristallviolettgel aufgetrennt, die entsprechende Bande aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA reisoliert. Die Durchführung erfolgte hierbei mit Kit-Materialien nach Angaben des Herstellers. 4 µl des Reisolats wurden anschließend mit 1 µl pCR[®]-XL-TOPO[®]-Vektor vorsichtig gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Durch Zugabe von 1 µl 6xTOPO[®] Cloning Stop-Solution wurde die Reaktion abgestoppt. 2 µl des Reaktionsansatzes wurden dann zur Transformation von 100 µl *E. coli* DH5α-Zellen eingesetzt; die Durchführung erfolgte wie für das TOPO[®] TA Cloning[®] Kit (3.2.8) beschrieben.

Bei Verwendung des pCR[®]-XL-TOPO[®]-Vektors erfolgt eine direkte Selektion rekombinanter Klone, da der Vektor als Fusion an den C-Terminus des LacZα-Fragments das letale *E. coli*-Gen *ccdB* trägt (Bernard et al., 1994). Dessen Protein interferiert mit der DNA-Gyrase (Bernard und Couturier, 1992), was das Wachstum der meisten *E. coli*-Stämme hemmt. Wird nun ein großes DNA-Fragment in den Vektor integriert, verhindert das die Expression des LacZα-CcdB-Fusionsproteins, so dass nur rekombinante Klone wachsen. Klone mit Leervektoren sind nicht lebensfähig.

3.2.10 Klonierung mit dem pCR[®]8/GW/TOPO[®] TA Cloning Kit (Invitrogen)

Der in diesem Kit enthaltene Vektor pCR[®]8/GW/TOPO[®] erlaubt die Klonierung von PCR-Produkten mit 3'-A-Überhängen und trägt *attL1*- und *attL2*-Sites flankierend zu seiner Multiple Cloning Site, wodurch er als Ausgangsvektor für restriktionsunabhängige Gateway-Klonierungen in verschiedenste Zielvektoren geeignet ist.

Das Klonierungsprinzip entspricht dem des TOPO[®] XL PCR Cloning Kit (3.2.9); die Durchführung erfolgte analog. Aufgrund der Amplifikat-Größen wurde teilweise die Reaktionszeit auf 7 min verlängert, um eine höhere Zahl an rekombinanten Klonen zu erzielen. Als Selektionsmedium wurden Agarplatten mit Spectinomycin (100 µg/ml) gewählt.

Eine Selektion auf rekombinante Klone ist im Fall des pCR[®]8/GW/TOPO[®]-Vektors nicht möglich.

3.2.11 Klonierung mit dem Gateway[®] LR Clonase[™] II Enzym Mix (Invitrogen)

Bei der Gateway-Technologie handelt es sich um eine restriktionsunabhängige Klonierungsmethode auf Basis der sequenz-spezifischen Rekombination des Lambda-Phagen (Landy, 1989; Hartley, 2000). Kernkomponente dieser Technik sind die sogenannten attachment (*att*)-Sites (Rekombinationssequenzen) und die Enzyme, welche die Rekombination an den *att*-Sites katalysieren (Clonase-Mix). Die wildtypischen Komponenten des Lambda-Rekombinations-Systems wurden modifiziert, um Spezifität und Effizienz der Gateway-Technologie zu steigern (Bushman et al., 1985).

Der LR-Clonase[™]-Enzym-Mix katalysiert eine Rekombination zwischen den *attL*-Sites des Entry-Klons und den *attR*-Sites des Zielvektors unter Bildung von *attB*-Sites. Der Expressionsklon trägt dann das gewünschte Gen im Zielvektor (Abb.3.1).

Viele Gateway-Zielvektoren tragen das letale *ccdB*-Gen (3.2.9) zwischen den *attL*-Sites und erlauben so eine Selektion. Kommt es zu einer Rekombination zwischen Entry-Klon und Zielvektor, wird das *ccdB*-Gen gegen das Gen von Interesse ausgetauscht, so dass die resultierenden rekombinanten Klone lebensfähig sind.



Abb.3.1. LR-Clonase-Reaktion. Die LR-Clonase-Reaktion bedingt eine enzymvermittelte Rekombination zwischen den *attL*-Sites des Entry-Klons und den *attR*-Sites des Zielvektors. Dabei entsteht ein Expressionsklon, der das gewünschte Gen im Zielvektor trägt, flankiert von den neu entstandenen *attB*-Sites. Als Nebenprodukt bildet sich eine Kombination aus dem Entry-Klon und dem *ccdB*-Gen. (aus Gateway[®]Technology, VersionE, Mai 2010, Invitrogen)

Die in dieser Arbeit verwendeten Entry-Klone wurden ausschließlich mit Hilfe des pCR[®]8/GW/TOPO[®] TA Cloning Kit (Invitrogen) erzeugt. Zielvektoren waren pUAST-RfB-HA-CYFP-*attB*, pUAST-RfB-Myc-NYFP-*attB* und pUAST-NYFP-Myc-RfB-*attB* (Gohl et al., 2010).

Folgende Clonase-Reaktion wurde angesetzt: 1µl Entry-Klon (50ng/µl), 1µl Zielvektor (250ng/µl), ad 4µl 1xTE (pH 8.0), 1µl LR Clonase[™] II Enzym-Mix. Die Reaktion wurde 1h bei 24°C inkubiert und anschließend durch Zugabe von 0.5µl ProteinaseK (2µg/µl) und 10min Inkubation bei 37°C abgestoppt. 3µl der Reaktion wurden für die Transformation von

100µl *E. coli* DH5α-Zellen eingesetzt; die Durchführung erfolgte wie für das TOPO[®] TA Cloning[®] Kit (3.2.8) beschrieben. Als Selektionsmedium wurden Agarplatten mit Ampicillin (100µg/ml) gewählt. Alle Zielvektoren trugen das *ccdB*-Gen, so dass eine Selektion auf rekombinante Klone möglich war.

3.2.12 Plasmid-Isolierung mittels alkalischer Lyse

2ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum wurden mit einer Bakterienkolonie inokuliert und über Nacht bei 37°C und 200rpm inkubiert. 1.5ml dieser Kultur wurden in ein Reaktionsgefäß überführt, 60s bei 13000rpm pelletiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 100µl GTE-Lösung resuspendiert. Anschließend wurden 200µl NaOH/SDS zugegeben, gut gemischt und der Ansatz 5min bei RT inkubiert, um die bakteriellen Zellwände aufzubrechen und die DNA freizusetzen. Zur Präzipitation von Zelltrümmern und chromosomaler DNA erfolgte die Zugabe von 150µl 5M Kaliumacetat (pH 4.8). Nach gründlichem Vermischen bis zur Homogenität der Lösung wurde der Ansatz 5min auf Eis inkubiert und für 10min bei 13000rpm in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und mit 800µl 100% Ethanol gemischt. Es folgte eine erneute Zentrifugation für 5min bei 13000rpm. Das DNA-Pellet wurde mit 500µl 70% Ethanol versetzt, 5min bei 13000rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach dem Trocknen im Rotationsverdampfer (Eppendorf Concentrator 5301) wurde das Pellet in 20µl H₂O_{deion} aufgenommen.

3.2.13 Plasmid-Isolierung mittels peqGold Plasmid Miniprep Kit

Zur Gewinnung reiner DNA wurde diese mit Hilfe des peqGold Plasmid Miniprep Kit (Peqlab) nach Herstellerangaben aus 5ml einer Übernachtskultur isoliert.

3.2.14 Plasmid-Isolierung mittels QIAGEN Plasmid Midi Kit

Für den Erhalt großer Mengen reiner DNA wurde diese mittels eines Plasmid Midi Kits (Qiagen) nach Herstellerangaben aus 100ml einer Übernachtskultur isoliert.

3.2.15 Isolierung genomischer DNA aus Fliegen

Pro Ansatz wurden 15 mit CO₂ betäubte Fliegen in einem Reaktionsgefäß auf Eis gesammelt. Nach Zugabe von 200µl Lysispuffer wurden die Fliegen mit einem Mikropistill homogenisiert und für 30min bei 65°C inkubiert. Anschließend wurden 400µl frisch ansetzte Lithiumchlorid/Kaliumacetat-Lösung zugegeben, gründlich gemischt und der Ansatz 10min

auf Eis inkubiert. Durch Zentrifugation für 15min bei 13000rpm wurden grobe Bestandteile (Chitinhülle, Präzipitate) abgetrennt. Der Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und die enthaltene genomische DNA durch Zugabe von 300µl Isopropanol, Mischen und erneutes Zentrifugieren (15min, 13000rpm) ausgefällt. Das DNA-Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen, im Rotationsverdampfer (Eppendorf Concentrator 5301) getrocknet und in 50µl 1xTE-Puffer_{DNA} (pH8.0) aufgenommen.

3.2.16 Polymerasekettenreaktion (PCR)

3.2.16.1 Standard-PCR

Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion wurden DNA-Abschnitte *in vitro* amplifiziert. Als DNA-Polymerase wurde, sofern nicht anders gekennzeichnet, die *Taq*-Polymerase aus *Thermus aquaticus* verwendet. Da diese jedoch eine vergleichsweise hohe Fehlerrate von 2×10^{-4} /Base aufweist, wurde für Anwendungen, die eine hohe Lesegenauigkeit erfordern, die *Pfu*-Polymerase aus *Pyrococcus furiosus* eingesetzt, da letztere über eine Proofreading-Funktion verfügt.

Ansatz:

1µg Template-DNA

5µl 10xPCR-Puffer (GenScript) bzw. 5µl 10x Pfu-Puffer (Fermentas)

1µl dNTP-Mix (10mM, GenScript)

1µl Primer 1 (50pmol/µl)

1µl Primer 2 (50pmol/µl)

1µl *Taq*-DNA-Polymerase (5U/µl, GenScript) bzw. *Pfu*-Polymerase (2.5U/µl, Fermentas)

H₂O_{deion} ad 50µl Gesamtvolumen

Reaktionsbedingungen:

Ereignis	Zeit	Temperatur	Zyklen
Denaturierung	3min	95°C	1
Denaturierung	1min	95°C	} 30
Annealing	1min	X°C	
Elongation	1min/kb (<i>Taq</i> -Polymerase) 3min/kb (<i>Pfu</i> -Polymerase)	72°C (<i>Taq</i> -Polymerase) 68°C (<i>Pfu</i> -Polymerase)	
Finale Elongation	10min	72°C bzw. 68°C	1
Lagerung	∞	4°C	1

Die Annealing-Temperatur X war abhängig von der Schmelztemperatur der jeweils verwendeten Primer. Zur *in vitro* Mutagenese wurden Primer mit spezifischen Basenfehlpaarungen verwendet; um eine ausreichende Anlagerung der Primer zu gewährleisten wurde eine nieder-stringente Annealing-Temperatur von 55°C gewählt. Zur Durchführung der Reaktionen wurden entweder der Bio-rad My cyclerTM Thermal Cycler, der Eppendorf Mastercycler Personal oder der Biometra Tpersonal Thermocycler eingesetzt.

3.2.16.2 Splicing by overlap extension (SOE)-PCR

Verschiedene Mutagenesekonstrukte konnten nicht im Rahmen einer einzelnen PCR erzeugt werden, da die zu mutierende Position zu weit im Zentrum des Konstrukts lag, um mit einem terminalen Primer abgedeckt zu werden. Daher wurden zunächst zwei entsprechende Teilfragmente mit überlappenden Mutagenese-Primern und jeweils einem randständigen Primer amplifiziert. Die entstehenden PCR-Produkte wurden aufgereinigt und in gleichen Mengen als Template für eine zweite PCR mit den beiden randständigen Primern eingesetzt, in deren Verlauf nun das komplette mutierte Konstrukt amplifiziert werden konnte (Abb.3.2). Die Reaktionsbedingungen entsprachen dabei denen einer einfachen Mutagenese-PCR.

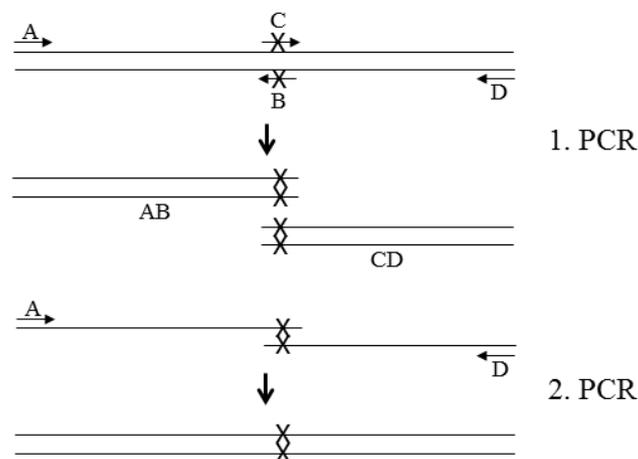


Abb.3.2. SOE-PCR. Mit Hilfe der randständigen Primer A und D sowie der überlappenden Primer B und C, welche die gewünschte Mutation tragen, werden die beiden mutierten Teilfragmente AB und CD amplifiziert. Diese dienen in einer zweiten PCR als Template zur Amplifikation des mutierten Gesamtkonstrukts.

3.2.16.3 Anfügen von 3'-A-Überhängen

Proofreading-Polymerasen wie die in dieser Arbeit verwendete *Pfu*-Polymerase verfügen über eine $3' \rightarrow 5'$ -Exonuklease-Aktivität, die es ihnen ermöglicht, fehlerhaft eingebaute Nukleotide zu erkennen und zu entfernen. Aufgrund dieser Aktivität erzeugen sie im Gegensatz zur *Taq*-Polymerase in einer PCR jedoch „Blunt End“-Fragmente. Um solche Amplifikate dennoch in TOPO-Vektoren klonieren zu können, müssen 3'-A-Überhänge nachträglich angefügt

werden. Dazu wurde der gesamte Reaktionsansatz nach Beendigung der PCR mit 1µl 10mM dATP und 1µl Taq-Polymerase (5U/µl, GenScript) für 10min bei 72°C inkubiert.

3.2.17 Sequenzierung von DNA

Plasmid-DNA wurde nach der Kettenabbruch-Methode (Sanger et al., 1977) sequenziert. Die Sequenzierreaktionen wurden mit Hilfe des DNA Cycle Sequencing Kit (Jena Bioscience) unter Verwendung fluoreszenzmarkierter Primer durchgeführt.

Für jeden Ansatz wurden 4 Reaktionsgefäße vorbereitet, in denen je 4µl G-, A-, T- bzw. C-Terminationsmix vorgelegt wurde. Anschließend wurde ein Mastermix aus 100ng Template-DNA, 4µl 10xSequenzierpuffer, 1µl Primer IRD800 (2pmol/µl), 1µl Primer IRD700 (2pmol/µl) und 1µl Sequencing Polymerase hergestellt und mit H₂O_{deion} auf 20µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Je 4µl des Mastermixes wurden zu den einzelnen Terminationsmischen gegeben.

Reaktionsbedingungen:

Ereignis	Zeit	Temperatur	Zyklen
Denaturierung	2min	95°C	1
Denaturierung	30s	95°C	} 25
Annealing	30s	X°C	
Elongation	60s	72°C	

Zur Durchführung der Reaktionen wurden entweder der Bio-rad My cyclerTM Thermal Cycler oder der Biometra Tpersonal Thermocycler eingesetzt. Die Annealing-Temperatur X wurde in Abhängigkeit von der Schmelztemperatur der verwendeten Primer gewählt. Nach Abschluss der PCR wurden jedem Ansatz 4µl Stop Solution zugefügt, die DNA 2min bei 90°C denaturiert und auf ein Polyacrylamid-Sequenziergel aufgetragen.

Zur Herstellung des Sequenziergels wurden 25.2g Harnstoff mit 6ml 10xTBE und 6ml LongRangerTM Gel Solution (Lonza) in H₂O_{deion} gelöst und auf 60ml Gesamtvolumen aufgefüllt. Die Gel-Mischung wurde filtriert und unmittelbar vor dem Gießen mit 400µl APS und 40µl TEMED versetzt, um ein Auspolymerisieren der Gelmatrix auszulösen.

Die Elektrophorese erfolgte bei 1500V/50W in 1xTBE-Laufpuffer über max. 10h in einem Sequenzierautomaten (LI-COR 4300 DNA-Analyzer). Die Auswertung der Sequenzen erfolgte mit Hilfe der LI-COR-Software („e-Seq“) oder manuell.

Mit dieser Ausstattung waren Leseweiten von ~400bp mit hinreichender Qualität erreichbar. DNAs, für deren Sequenzierung eine große Leseweite erforderlich war, wurden extern über die Firma StarSeq (Mainz) sequenziert.

3.2.18 Herstellung einer Digoxigenin-markierten DNA-Sonde

Für die Sondenherstellung wurden 100ng einer reisolierten cDNA mit 5µl Random Primer p(dN)₆ (0.2mg/ml) in einem Gesamtvolumen von 12µl 5min aufgekocht und danach sofort im Eiswasserbad abgekühlt. Anschließend wurde ein Mastermix, bestehend aus 2µl Klenow-Puffer, 2µl 10x dATP dCTP dGTP (alle 1mM), 1.3µl 10x dTTP (1mM), 0.7µl dig-UTP, 0.5µl H₂O_{deion} und 1.5µl Klenow-Fragment (2U/µl, Fermentas), zugegeben und über Nacht bei 14°C inkubiert.

Am nächsten Tag wurde 1µl Klenow-Fragment zugegeben und der Ansatz weitere 4h bei RT inkubiert. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte durch Hinzufügen von EDTA zu einer Endkonzentration von 50mM mit anschließender 10minütiger Inkubation bei 65°C. Durch Zugabe von 40µg Glycogen, 1/10 Volumen 3M LiCl und 3 Volumen 100% Ethanol (eiskalt) wurde die DNA über Nacht bei -20°C ausgefällt. Der Ansatz wurde 30min bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert, das DNA-Pellet mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und schließlich in 100µl HybMix aufgenommen.

3.2.19 Kontrolle der Sonden im Dot Blot

Vor dem Einsatz in einer *in situ* Hybridisierung wurde eine neu hergestellte Sonde (3.2.18) in einem Dot Blot auf ihre ordnungsgemäße Digoxigenin-Markierung geprüft. Dazu wurde die Sonde in 2xSSC 1:10, 1:100 und 1:1000 verdünnt. Von der unverdünnten Sonde sowie jeder dieser Verdünnungsstufen wurde 1µl auf eine Nylonmembran aufgebracht, getrocknet und durch 2min UV-Crosslinken fest mit der Membran verbunden.

Die Membran wurde zunächst kurz in Puffer PI gewaschen, 30min in Puffer PII inkubiert und erneut in Puffer PI gewaschen. Die Inkubation mit einem AP-gekoppelten Anti-Dig-Antikörper (1:2000 in Puffer PI) erfolgte für 30min. Nach 2x15min waschen in Puffer PI wurde die Membran für 2min in Puffer PIII äquilibriert und anschließend in Puffer PIII mit NBT (10mg/ml, 4.5µl/ml Puffer) und BCIP (50mg/ml, 3.5µl/ml Puffer) bis zur Farbentwicklung inkubiert.

Im Fall einer guten Sonde ist nach 5min in allen Verdünnungen ein Signal zu erkennen.

Arbeiten mit Proteinen

3.2.20 Expression und Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen

Die Expression rekombinanter Proteine als GST-Fusionsproteine erfolgte in dieser Arbeit über Vektoren aus der pGEX-5X-Serie in *E. coli*-Wirtszellen des Stamms BL21. Unter diesen Bedingungen stand die Expression der Fusionsproteine unter der Kontrolle des *lac*-Operons und konnte durch Zugabe des Lactose-Analogons Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) induziert werden. Nach dem Zellaufschluss mittels Ultraschall wurden die Fusionsproteine über Affinitätschromatographie aufgereinigt.

25ml LB-Medium mit Ampicillin (100 μ g/ml) wurden mit einer Einzelkolonie der gewünschten Bakterien (BL21 + rekombinantes Konstrukt) angeimpft und über Nacht bei 37°C und 200rpm geschüttelt. Mit dieser Kultur wurden 250ml LB-Medium mit Ampicillin auf eine OD₆₀₀ von 0.3 eingestellt und unter gleichen Bedingungen bis zu einer OD₆₀₀ von 1.0 inkubiert. Anschließend wurde die Proteinexpression durch Zugabe von 1mM IPTG induziert. Die Ernte der Zellen erfolgte nach 3.5h durch 10min Zentrifugation bei 5000rpm und 4°C (Sorvall Evolution RC, SLA-1500-Rotor). Das Zellpellet wurde in 20ml Lysepuffer resuspendiert und die Zellen danach durch Ultraschallbehandlung (10 Intervalle zu 20s) auf Eis aufgeschlossen. Die Zelldebris wurde durch 30min Zentrifugation bei 7500rpm und 4°C (Sorvall Evolution RC, SA-600-Rotor) abgetrennt, so dass sich das Protein in einem klaren Überstand befand.

Zur Vorbereitung der Aufreinigung wurden 500 μ l einer Glutathion-Agarose-Matrix (GenScript) 5-mal in 10 Volumen 1xPBS_{Protein} gewaschen. Der Überstand aus der Zentrifugation wurde zugegeben und das Gemisch zur Bindung des GST-Fusionsproteins an die Matrix für 30min bei RT auf dem Rollmischer inkubiert. Anschließend wurde die Matrix 4-mal mit 10 Volumen 1xPBS_{Protein} gewaschen. Die Elution des Fusionsproteins erfolgte in 4 Fraktionen. Dabei wurde die Matrix jeweils 10min bei RT mit 1 Volumen Elutionspuffer auf dem Taumler inkubiert und anschließend sedimentiert. Der Überstand konnte nun über SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese analysiert werden. Fraktionen, die das gewünschte Protein enthielten, wurden bei -80°C gelagert.

3.2.21 Expression und Aufreinigung von Hipk als GST-Fusionsprotein

Die Expression und Aufreinigung von Hipk als GST-Fusionsprotein basiert auf dem gleichen Prinzip wie unter 3.2.20 für beliebige GST-Fusionsproteine beschrieben. Der Bedarf einer größeren Proteinmenge und die Notwendigkeit des Erhalts einer ausreichenden

Kinaseaktivität erforderten jedoch Veränderungen in der Durchführung, die daher in diesem Abschnitt gesondert dargestellt wird.

Aus einer Einzelkolonie *E. coli* BL21/(dHipk2FL4k) wurde in 250ml LB-Medium mit Ampicillin (100µg/ml) bei 37°C und 200rpm über Nacht eine Vorkultur angezogen. Mit dieser wurden 800ml LB-Medium mit Ampicillin auf eine OD₆₀₀ von 0.3 eingestellt und bei 30°C und 200rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 1.0 geschüttelt. Anschließend wurden 200ml kaltes LB-Medium mit Ampicillin (4°C) zugegeben und die Kultur weitere 30min bei 18°C und 200rpm inkubiert. Die Induktion der Proteinexpression erfolgte durch Zugabe von 1mM IPTG und 21ml 100% Ethanol. Die Zellen wurden über Nacht bei 18°C und 200rpm geschüttelt und am darauffolgenden Tag durch 10min Zentrifugation bei 5000rpm und 4°C (Sorvall Evolution RC, SLA-1500-Rotor) geerntet. Das Pellet wurde in 20ml Lysepuffer resuspendiert, durch Ultraschallbehandlung (10 Zyklen zu 20s) auf Eis aufgeschlossen und die Zelldebris durch 30min Zentrifugation bei 13000rpm und 4°C (Sorvall Evolution RC, SA-600-Rotor) abgetrennt. Nach Zugabe von 5µl 1M DTT folgte eine 10minütige Zentrifugation unter gleichen Bedingungen.

Zur Vorbereitung der Aufreinigung wurde ein Aliquot Glutathion-Agarose-Matrix (GenScript) 5-mal in 10 Volumen 1xPBS_{Protein} gewaschen und schließlich in 5 Volumen PBS(KM)T aufgenommen. Der Überstand aus der Zentrifugation wurde zugegeben und das Gemisch zur Bindung des GST-Fusionsproteins an die Matrix über Nacht bei 4°C auf dem Rollmischer inkubiert. Die Matrix wurde auf eine Säule (Econo Column[®]; BioRad) aufgebracht und mit 40ml PBS(KM)T sowie 20ml PBS(KM) gewaschen. Die Elution erfolgte mit 10ml Elutionspuffer in Fraktionen zwischen 250µl und 1ml, abhängig von der zu erwartenden Proteinmenge. Die Fraktionen wurden über SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese analysiert und die stärksten Fraktionen in einem *in vitro* Phosphorylierungsassay (3.2.23) mit dem bekannten Hipk-Substrat Groucho (Choi et al., 2005; Lee et al., 2009a) auf ihre Kinaseaktivität geprüft. Aufgereinigte Kinase wurde in Aliquots von 100µl bei -80°C gelagert.

3.2.22 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

In dieser Arbeit kam zur Auftrennung von Proteinen ausschließlich die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese zur Anwendung (Laemmli, 1970). Standardmäßig wurden 10%ige Gele eingesetzt, lediglich für Phosphorylierungsassays wurde auf 12,5%ige Gele zurückgegriffen. Sowohl zum Gießen der Gele als auch zur Elektrophorese wurden

Gelsysteme der Firma Bio-rad verwendet. Als Marker diente, sofern nicht anders angegeben, „PageRuler Unstained Protein Ladder“ der Firma Fermentas.

Die zu analysierenden Proben wurden vor dem Auftrag mit SDS-Probenpuffer (5xLaemmli) versetzt und 15min bei 95°C denaturiert. Die Auftrennung erfolgte bei konstanter Spannung von 130V. Danach wurden die Gele 30min in Coomassie-Färbelösung gefärbt, anschließend in Entfärbelösung bis zu einer guten Sichtbarkeit der Banden entfärbt, gewaschen und getrocknet.

3.2.23 Phosphorylierungsassay

Zum Nachweis eines Proteins als Substrat von Hipk wurden in dieser Arbeit *in vitro* Phosphorylierungsanalysen durchgeführt auf Basis der enzymvermittelten Übertragung eines radioaktiv markierten (γ -) Phosphatrestes von ATP auf das potentielle Substrat.

Dazu wurden X μ l aufgereinigtes Protein (Menge abhängig von der Stärke der eingesetzten Fraktion) mit 5 μ l Hipk zu einem Gesamtvolumen von 20 μ l mit Kinasepuffer aufgefüllt. Nach Zugabe von 3 μ Ci [γ -³²P]-ATP folgte eine Inkubation von 3h bei 20°C (RT). Durch Zugabe von SDS-Probenpuffer und 10min Denaturierung bei 95°C wurde die Reaktion abgestoppt. Die Ansätze wurden in einer SDS-PAGE (3.2.22) aufgetrennt, das Gel getrocknet und radioaktiv markierte Proteine mittels Autoradiografie sichtbar gemacht. Die Entwicklung der Röntgenfilme (X-OMAT AR Film, XAR-5 (13x18); Kodak) erfolgte mit der Curix-60 Fotomaschine von AGFA.

Arbeiten mit Hefen

3.2.24 Lithium-Acetat-Transformation in *Saccharomyces cerevisiae*

Aus einer Einzelkolonie der Hefestämme *S. cerevisiae* AH109 bzw. Y187 wurde in 2ml YPD-Medium bei 30°C und 200rpm eine Übernachtskultur angezogen. 1ml dieser Kultur wurde 5min bei 8000rpm in einer Tischzentrifuge pelletiert und die Zellen mit 500 μ l Lithiumacetat/TE gewaschen. Anschließend wurde das Pellet in 100 μ l Lithiumacetat/TE resuspendiert. Nach Zugabe von 2 μ l Plasmid der Ziel-DNA, 10 μ l Carrier-DNA (denaturierte Lachssperma-DNA), 3 μ l 10xLithiumacetat und 600 μ l PEG-Lösung wurden die Zellen 30min horizontal bei 30°C und 200rpm geschüttelt. Es folgte ein Hitzeschock von 15min bei 42°C zum Einschleusen der DNA. Danach wurde der Ansatz 1min bei 13000rpm zentrifugiert und das Pellet 2x mit 500 μ l 1xTE-Puffer_{Hefe} gewaschen. Die Zellen wurden in 300 μ l 1xTE-Puffer_{Hefe} aufgenommen und auf den entsprechenden SD-Agarplatten ausplattiert. Die

Auswahl der Selektionsbedingungen erfolgte hierbei in Abhängigkeit von den Eigenschaften des eingebrachten Plasmids und des Hefestamms. Nach einer dreitägigen Inkubation bei 30°C konnten Einzelkolonien weiterbearbeitet werden.

3.2.25 Mating verschiedener Paarungstypen von *Saccharomyces cerevisiae*

Haploide Zellen von *S. cerevisiae* verfügen über zwei Paarungstypen (Mating-Typen), MATa und MAT α , die eine Fusion zu einer diploiden Zelle ermöglichen (Herskowitz, 1988). Das Mating von Hefen bietet eine praktische Alternative zur Co-Transformation, um zwei verschiedene Plasmide in eine Wirtszelle einzubringen (Bendixen et al., 1994; Finley und Brent, 1994; Harper et al., 1993).

In dieser Arbeit wurde das Plasmid pGADT7-Hipk in Y187 (MAT α) mit pGBKT7-Nito in AH109 (MATa) für Yeast-Two-Hybrid-Analysen kombiniert. Als Kontrollen wurden Kombinationen mit Leervektoren durchgeführt. Dazu wurden Einzelkolonien der beiden Paarungspartner in einem 1.5ml-Reaktionsgefäß in 500 μ l YPD-Medium resuspendiert und die Zellen bei 30°C und 200rpm über Nacht geschüttelt. Am folgenden Tag wurden 50 μ l des Ansatzes auf SD-Agarplatten ausplattiert. Zur Selektion diploider Zellen wurden bei der Wahl des Selektionsmediums die Spezifikationen beider Plasmide berücksichtigt. Nach dreitägiger Inkubation bei 30°C konnten die Platten für weitere Analysen verwendet werden.

3.2.26 Colony-lift Filter-Assay

Der Colony-lift Filter-Assay wurde im Rahmen von Yeast-Two-Hybrid-Analysen zum Nachweis einer möglichen physischen Interaktion zwischen Hipk und Nito eingesetzt. Die Proteine wurden in Form einer Fusion an die Aktivierungs- (Nito) bzw. DNA-Bindedomäne (Hipk) des Hefetranskriptionsfaktors GAL4 in diploiden Zellen gemeinsam exprimiert. Im Falle einer Interaktion sollten die GAL4-Komponenten zusammengebracht werden, so dass der Transkriptionsfaktor in einen funktionalen Zustand überführt wird und die Expression von β -Galaktosidase aktiviert.

Zum Nachweis der β -Galaktosidase-Aktivität wurde zunächst mit einem Whatman-Filter ein Abklatsch von einer frischen Platte mit zu analysierenden diploiden Zellen genommen. Zur Permeabilisierung der Zellen wurde der Filter 3-mal in flüssigem Stickstoff schockgefroren und wieder aufgetaut. Anschließend wurde der Abklatsch-Filter auf einem mit Z-Puffer/X-Gal-Lösung getränkten Filter für mehrere Stunden inkubiert.

Aktive β -Galaktosidase führt dabei durch Umsetzung des Substrates X-Gal zur Blaufärbung der Kolonien.

Arbeiten mit *Drosophila melanogaster*

3.2.27 Fliegenzucht

Die Haltung der verschiedenen *Drosophila*-Stämme erfolgte auf Standardfuttermedium bei 18°C und ca. 65% Luftfeuchtigkeit, wobei die Generationszeit bei durchschnittlich 21 Tagen liegt. Zur Verkürzung der Generationszeit auf 10-12 Tage wurden Fliegen, die für Experimente genutzt wurden, bei 24°C und 80% Luftfeuchtigkeit gehalten.

3.2.28 Absammeln von virginellen Weibchen (Jungfrauen) für Kreuzungen

Zum gezielten Absammeln von Jungfrauen für Kreuzungen wurden die adulten Fliegen der entsprechenden Stämme durch Abschütteln entfernt und die Zuchtbehälter mit den darin verbleibenden Larven und Puppen bei 24°C und ca. 80% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Frisch geschlüpfte Weibchen wurden nach maximal 12h Stunden abgesammelt, bevor die männlichen Tiere fertil wurden. Männliche Tiere wurden entfernt.

Gekreuzt wurde je eine Fliege des einen Geschlechts mit drei Fliegen des anderen Geschlechts; die Haltung einer Kreuzung erfolgte 14 Tage bei 24°C und ca. 80% Luftfeuchtigkeit.

3.2.29 Phänotypische Bewertung

Fliegen, die einer phänotypischen Bewertung unterzogen werden sollten, wurden, wenn möglich, zunächst anhand optisch erkennbarer Marker nach dem gewünschten Genotyp selektiert. Handelte es sich dabei um die F1-Generation aus Kreuzungen basierend auf dem UAS-Gal4-System (Brand und Perrimon, 1993), beschränkte sich die Betrachtung des Phänotyps auf die durch den jeweiligen Treiberstamm betroffenen Körperstrukturen. Im Falle definierter Stämme wurde der gesamte Habitus betrachtet.

Zur Dokumentation von Phänotypen der Komplexaugen wurden Einzelfliegen immobilisiert und die Augen bei 48-facher Vergrößerung fotografiert. Zu analysierende Flügel wurden zunächst präpariert, in 100% Ethanol gespült und in Aquatex[®] Mounting Medium (VWR) eingedeckt. Die Dokumentation erfolgte bei 40-facher Vergrößerung.

3.2.30 Rekombination

In der weiblichen Keimbahn von *D. melanogaster* kommt es von Natur aus zu Rekombinationsereignissen (Morgan, 1914). Dies kann man sich zu Nutze machen, um

verschiedene genetische Elemente, die auf dem gleichen Chromosom vorliegen, dauerhaft zu koppeln.

Zu diesem Zweck wurden Fliegen mit den gewünschten Elementen gekreuzt, ihre Nachkommen (F1) auf das Vorhandensein beider Elemente selektiert und Jungfrauen mit yw^{67c23} -Fliegen rückgekreuzt. Dabei wurden in den meisten Fällen die Elemente wieder getrennt. Kam es jedoch zur Rekombination, konnten beide Elemente in Tieren der F2-Generation nachgewiesen werden. Zur Erzeugung einer stabilen Linie wurden entsprechende F2-Männchen für das Chromosom von Interesse balanciert, wie unter 3.2.33.6 beschrieben.

3.2.31 P-Element-vermittelte Keimbahntransformation bei *Drosophila melanogaster*

Die P-Element-Transformation ist eine Methode zur Erzeugung transgener *Drosophila*-Stämme, bei der Fremd-DNA in Form spezifisch klonierter Transformationskonstrukte stabil in die Keimbahn von *D. melanogaster* eingebracht wird (Rubin und Spradling, 1982). Die Integration in das Fliegen-genom erfolgt dabei zufällig und ungerichtet.

Hierfür verwendete Transformationsvektoren müssen über die notwendigen Spezifikationen für eine Klonierung in *E. coli* verfügen. Zusätzlich müssen sie als essentielle Komponenten eines P-Elementes die typischen terminalen invertierten Sequenzwiederholungen („inverted repeats“) besitzen, die eine Integration in das Genom der Fliege ermöglichen. Als fliegenspezifischen Selektionsmarker tragen sie eine wildtypische Kopie des *white*⁺-Gens, so dass bei einer Keimbahntransformation in yw^{67c23} -Fliegen, denen eine solche Genkopie fehlt und die daher weiße Augen haben, Transformanten leicht an ihren rot gefärbten Augen zu erkennen sind.

Im Gegensatz zu ursprünglichen P-Elementen verfügen Transformationsvektoren nicht über eine eigene Transposase-Aktivität und benötigen daher für die Integration ein *trans*-aktives Helfer-Plasmid. Verwendet wurde hier das $\Delta 2-3$ Helfer-Plasmid mit einer Deletion des Introns zwischen dem zweiten und dritten Exon (Laski et al., 1986). Aufgrund einer Inaktivierung der terminalen „inverted repeats“ kann es zwar aktive Transposase produzieren, jedoch nicht selbst ins Genom integrieren. Werden Transformationsvektor und Helfer-Plasmid co-injiziert, kann eine stabile Integration des Vektors in das Fliegen-genom erreicht werden. Abbildung 3.3 zeigt das Prinzip der P-Element-vermittelten Keimbahntransformation in *D. melanogaster*.

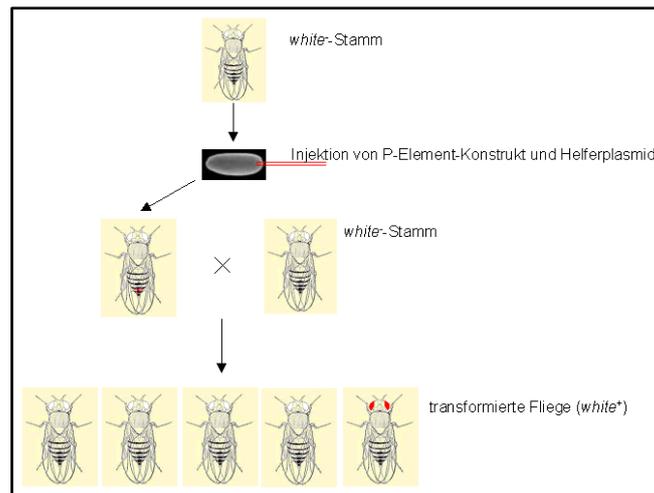


Abb.3.3. P-Element-vermittelte Keimbahntransformation bei *Drosophila melanogaster*. Das P-Element-Konstrukt wird zusammen mit dem Helfer-Plasmid in den posterioren Pol von ca. 30min alten Embryonen des Stammes *yw* (*white*⁻, weiße Augen) injiziert und in einigen Fällen in das Genom der Keimzellen integriert. Die resultierenden chimären Fliegen werden mit dem Ausgangsstamm rückgekreuzt. Bei erfolgreicher Transformation sind unter den Nachkommen rotäugige Fliegen (*white*⁺) zu finden, die das transgene Konstrukt in allen Zellen tragen (aus Kaspar, 2008).

3.2.32 Keimbahntransformation bei *Drosophila melanogaster* mittels PhiC31-Integrase

Ein Nachteil der P-Element-vermittelten Keimbahntransformation (3.2.31) liegt in der zufälligen und ungerichteten Integration des Transformationskonstrukts in das Fliegen-genom. Das neu entwickelte PhiC31-System hingegen erlaubt eine effiziente, gerichtete Keimbahntransformation (Groth et al., 2004). Der Bakteriophage PhiC31 codiert für eine Integrase, die eine Rekombination zwischen bakteriellen „attachment sites“ (*attB*) und Phagen-spezifischen „attachment sites“ (*attP*) vermittelt und somit stabile Rekombinanten erzeugt (Thorpe und Smith, 1998). Das *Drosophila*-Genom verfügt zwar über „Pseudo *attP* sites“, es konnte jedoch keine Integration an diesen Positionen festgestellt werden (Groth et al., 2004). Es wurden Fliegenstämme erzeugt, die „*attP*-Sites“ an verschiedenen Stellen im Genom tragen. Eine weitere Verbesserung des Systems wurde durch die Entwicklung einer endogenen PhiC31-Integrase-Quelle unter der Kontrolle des *nanos*-Promotors erzielt (Bischof et al., 2007). Daher ist nun eine große Auswahl von Fliegenstämmen erhältlich, die sowohl „*attP*-Sites“ an verschiedenen Positionen im Genom tragen als auch über eine endogene PhiC31-Integrase-Quelle verfügen. Ein Helfer-Plasmid ist daher also nicht erforderlich. Bei der Transformation in solche Fliegenstämme ist jedoch zu beachten, dass der verwendete Transformationsvektor neben einem selektierbaren Marker auch eine „*attB*-Site“ aufweisen muss.

3.2.33 Durchführung Keimbahntransformation

3.2.33.1 Injektionsmaterial

Hochreine DNA des Transformationskonstrukts wurde in $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion}}$ aufgenommen (ca. $0.5\mu\text{g}/\mu\text{l}$). Bei P-Element-vermittelter Keimbahntransformation enthielt die Injektionslösung zusätzlich $0.1\text{-}0.2\mu\text{g}/\mu\text{l}$ des $\Delta 2\text{-}3$ Helfer-Plasmids. Vor der Injektion wurde die Lösung 15min bei $13000\times g$ und 4°C abzentrifugiert (Eppendorf 5415R Kühlzentrifuge).

3.2.33.2 Absammeln, Dechorionieren und Aufreihen von Embryonen

Zum Absammeln von Embryonen wurden die Fliegen in luftdurchlässigen Gelegebechern auf mit Hefe bestrichene Apfelsaftplatten gesetzt. Alle 30min wurden die Platten abgenommen, die Embryonen mit Hypochlorid-Lösung dechorioniert, in ein Netzchen überführt und mit Embryonenwaschlösung mehrmals gespült. Die Embryonen wurden dann unter einem Binokular mit Hilfe einer Präpariernadel auf dem Rand einer Apfelsaftplatte so aufgereiht, dass der anteriore Teil der Embryonen zum Rand der Platte zeigte. Mit doppelseitigem Klebeband (Tesa Photo Film Tape, 12mm breit) wurden die Embryonen auf ein Deckglas transferiert und dieses auf einen Objektträger gelegt. Anschließend wurden die Embryonen für 8-10min in einer Kammer mit Silikagel (orange) getrocknet und schließlich mit Voltalef[®] 10S-Öl dünn überschichtet, damit sie im weiteren Verlauf nicht austrockneten.

3.2.33.3 Injektion

Die Injektion wurde unter einem inversen Mikroskop (Zeiss Axiovert 25), kombiniert mit einem Mikromanipulator (Leitz), durchgeführt. Als Injektionsnadeln wurden Glaskapillaren (\varnothing 1mm, WPI) verwendet, die mit Hilfe eines Magnetheizgerätes der Firma GETRA (Einstellungen: Magnet: 210, Heizung: 250°C) gezogen wurden. Mit Hilfe einer Microloader-Spitze (Eppendorf) wurden $2\mu\text{l}$ Injektionsmaterial in die Spitze der Injektionsnadel gefüllt und diese in den Mikromanipulator eingesetzt. Der Objektträger mit den aufgereihten Embryonen wurde auf dem Objektisch positioniert und vorsichtig gegen die Injektionsnadel bewegt, um diese an der Spitze abzubrechen und dadurch zu öffnen bzw. zu schärfen. Anschließend wurde eine kleine DNA-Menge in den posterioren Pol des Embryos injiziert. Das Injektionsvolumen wurde über den aufgebauten Druck des Injektionsgeräts (Eppendorf FemtoJet) reguliert, so dass eine definierte Menge an DNA in die Embryonen eingebracht wurde. Nachdem alle Embryonen eines Objektträgers injiziert waren, wurde dieser in eine feuchte Kammer gelegt und über Nacht bei 24°C inkubiert.

3.2.33.4 Behandlung injizierter Embryonen

Am nächsten Tag wurde das Deckglas mit den Embryonen auf eine Apfelsaftplatte gelegt, die in der Mitte dünn mit Hefe bestrichen war. Bei Bedarf wurden die Embryonen erneut mit Voltalef® 10S-Öl überschichtet. Die Platten wurden bei 24°C und 80% Luftfeuchtigkeit inkubiert und die in den folgenden Tagen geschlüpften Larven mit einem Platinspatel in ein Futterröhrchen überführt und bei 24°C und 80% Luftfeuchtigkeit weiter aufgezogen.

3.2.33.5 Selektion von Transformanten

Frisch geschlüpfte Fliegen (G0-Generation) wurden mit *yw*-Fliegen des jeweils anderen Geschlechts rückgekreuzt und bei 24°C und 80% Luftfeuchtigkeit gehalten. Erst bei den Nachkommen dieser Kreuzung (F1-Generation) zeigten sich im Fall einer erfolgreichen Transformation rotäugige Fliegen, da jetzt das *white*⁺-Markergen des (in der G0 in die Keimbahn integrierten) Transformationsvektors exprimiert wurde. Um getrennte Linien zu erhalten, wurden die F1-Transformanten erneut mit *yw*-Fliegen gekreuzt. Die folgende Generation F2 wurde mit Fliegen von Balancerstämmen verpaart um einen stabilen Stamm zu erzeugen und gleichzeitig die chromosomale Lokalisation des P-Element-Transformationsvektors festzustellen. Im Fall der PhiC31-vermittelten Keimbahntransformation musste lediglich mit einem Balancerstamm gekreuzt werden, da hier die chromosomale Lokalisation der „*attP*-Site“ bekannt war.

3.2.33.6 Balancierung transgener Fliegen

Unter Balancieren versteht man die heterozygote Stabilisierung von Mutationen, Deletionen oder P-Element-Insertionen. Die dabei verwendeten Balancerchromosomen verfügen über vielfache Inversionen, die eine Rekombination unterdrücken. Sie tragen ein oder mehrere selektierbare, dominante Markergene und besitzen einen rezessiven Letalfaktor.

Um die Lokalisation von Insertionen auf dem zweiten oder dritten Chromosom nachzuweisen bzw. zu stabilisieren, wurden unabhängige Transformanten mit einem zweitchromosomalen Balancerstamm *yw*; *Sco*/*CyO*; *+/+*; und einem drittchromosomalen Balancerstamm *w*¹¹¹⁸; *+/+*; *TM6BTb*/*TM3Sb* gekreuzt. In der F1-Generation erfolgte die Selektion auf eine Kombination von Markern des Transformationsvektors (rote Augen) mit nach oben gebogenen Flügeln (*CyO*) für eine Insertion auf dem zweiten Chromosom bzw. kurzen Borsten (*TM3Sb*) für eine Insertion auf dem dritten Chromosom. Solche Fliegen wurden dann jeweils untereinander gekreuzt („Selbstung“), so dass in der F2-Generation alle Fliegen das P-Element tragen: Zum einen heterozygote Fliegen, die das P-Element über Balancer tragen, zum anderen Fliegen, die

homozygot für das P-Element sind (falls diese Fliegen lebensfähig sind). Fliegen, in denen der Balancer homozygot vorliegt, können aufgrund der rezessiven Letalfaktoren nicht auftreten. Abbildung 3.4 zeigt ein exemplarisches Kreuzungsschema.

Testkreuzung mit dominantem Marker für das 2.Chromosom

Testkreuzung mit dominantem Marker für das 3.Chromosom

1.) Einkreuzen des Balancers in die heterozygote Linie:

1.) Einkreuzen des Balancers in die heterozygote Linie:

$$\frac{yw}{yw} ; \frac{P[w^+]}{+} \times \frac{yw}{yw} ; \frac{CyO}{Sco}$$

$$\frac{yw}{yw} ; \frac{P[w^+]}{+} \times \frac{w^{1118}}{w^{1118}} ; \frac{CxD}{TM3Sb}$$

$$\frac{yw}{yw} ; \frac{P[w^+]}{Sco} \quad \frac{yw}{yw} ; \frac{+}{CyO}$$

$$\frac{w^{1118}}{yw} ; \frac{P[w^+]}{CxD} \quad \frac{w^{1118}}{yw} ; \frac{+}{CxD}$$

$$\frac{yw}{yw} ; \frac{+}{Sco} \quad \boxed{\frac{yw}{yw} ; \frac{P[w^+]}{CyO}}$$

Phänotyp: rote Augen,
nach oben gebogene Flügel

$$\frac{w^{1118}}{yw} ; \frac{+}{TM3Sb} \quad \boxed{\frac{w^{1118}}{yw} ; \frac{P[w^+]}{TM3Sb}}$$

Phänotyp: rote Augen,
kurze Borsten

2.) Selbstung der merkmalsstragenden Nachkommenschaft:

2.) Selbstung der merkmalsstragenden Nachkommenschaft:

$$\boxed{\frac{yw}{yw} ; \frac{P[w^+]}{CyO}} \quad \boxed{\frac{yw}{yw} ; \frac{P[w^+]}{CyO}}$$

$$\boxed{\frac{w^{1118}}{yw} ; \frac{P[w^+]}{TM3Sb}} \quad \boxed{\frac{w^{1118}}{yw} ; \frac{P[w^+]}{TM3Sb}}$$

$$\frac{yw}{yw} ; \frac{P[w^+]}{CyO} \quad \frac{yw}{yw} ; \frac{P[w^+]}{P[w^+]}$$

$$\frac{yw/w^{1118}}{yw/w^{1118}} ; \frac{P[w^+]}{TM3Sb} \quad \frac{yw/w^{1118}}{yw/w^{1118}} ; \frac{P[w^+]}{P[w^+]}$$

Phänotyp: rote Augen,
nach oben gebogene Flügel

Phänotyp: rote Augen

Phänotyp: rote Augen,

kurze Borsten

Phänotyp: rote Augen

Abb.3.4. Kreuzungsschema für die Balancierung transgener Fliegen. Die Fliegen werden sowohl mit einem zweitchromosomalen Balancerstamm (z. B. *yw*; *Sco*/*CyO*) als auch mit einem Balancerstamm für das dritte Chromosom (z. B. *w¹¹¹⁸*; *CxD*/*TM3Sb*) gekreuzt. In der F1-Generation werden Fliegen selektiert, die eine Kombination von Markern des Transformationsvektors (rote Augen, *P*[*w⁺*]) und des jeweiligen Balancerchromosoms (2. Chromosom: nach oben gebogene Flügel (*CyO*), 3. Chromosom: kurze Borsten (*TM3Sb*)) tragen. Diese Fliegen werden jeweils untereinander weiter gekreuzt. Wurde der Transformationsvektor in das 2. Chromosom integriert, treten in der F2-Generation der entsprechenden Kreuzung ausschließlich rotäugige Fliegen auf, die entweder geradeflügelig sind (homozygot für das P-Element) oder den *CyO*-Marker tragen (heterozygot für das P-Element). Wurde der Transformationsvektor in das 3. Chromosom integriert, treten in der F2-Generation der entsprechenden Kreuzung nur rotäugige Fliegen auf, die entweder normal lange Borsten besitzen (homozygot) oder den *Sb*-Marker tragen (heterozygot).

3.2.34 „Ends-Out Gene Targeting“: Mobilisierung eines Donor-Konstrukts

Die Methode des „Ends-Out Gene Targeting“ erlaubt den gezielten Knockout eines Gens von Interesse. Zu diesem Zweck wird zunächst ein spezielles Targeting-Konstrukt (Donor-Konstrukt) über P-Element-vermittelte Keimbahntransformation ungerichtet in das Fliegen-genom eingebracht. Die Mobilisierung des Konstrukts erfolgt durch Einkreuzen eines Fliegenstammes, der die Gene der Flp-Rekombinase und des Enzyms *I-SceI* unter Kontrolle eines Hitzeschockpromotors trägt (*70-Flp 70-I-SceI*), so dass die Expression der beiden Enzyme gezielt induziert werden kann. Liegt die Zielsequenz für die homologe

Rekombination, in diesen Fall eine Sequenz im Bereich des Gens *nito*, auf dem 2.Chromosom, so wählt man dafür einen Fliegenstamm, der die Flp-Rekombinase und das I-*SceI*-Gen auf dem 3.Chromosom trägt. Befindet sich das Donor-Konstrukt nicht auf dem gleichen Chromosom wie die Zielsequenzen für die homologe Rekombination, erleichtert dies den späteren Nachweis der Mobilisierung. Die Lage des Donorkonstrukts beeinflusst auch die Effizienz des „Ends-Out Gene Targeting“ (Rong et al., 2002), so dass nach Möglichkeit mehrere unabhängige Transformanten für die Durchführung verwendet werden.

Abbildung 3.5 zeigt das genaue Kreuzungsschema. Nach der Kreuzung von Fliegen mit X-chromosomalem Donor-Konstrukt mit Fliegen, in denen 70-Flp 70-I-*SceI* auf dem 3.Chromosom vorliegt, wurden die Nachkommen dreimal - am 3., 4. und 5. Tag nach Eiablage - einem Hitzeschock von jeweils 1h bei 37°C unterzogen. Dabei wurden die Flp-Rekombinase und das Enzym I-*SceI* aktiviert und katalysierten das Ausschneiden und Linearisieren des Donor-Konstrukts. Weibliche Nachkommen der F1-Generation, die nicht den Marker Ser (eingekerbte Flügel) trugen, wurden mit *yw*-Fliegen rückgekreuzt. Die Auswahl von weiblichen Tieren erfolgte, da die weibliche Keimbahn eine höhere Effizienz für homologe Rekombination zeigt (Rong und Golic, 2000; Rong et al., 2002). Die Nachkommen dieser 2. Kreuzung wurden nun auf *white*⁺-Fliegen selektiert. *white*⁻-Fliegen wurden verworfen, da bei diesen das Konstrukt zwar ausgeschnitten, jedoch nicht durch homologe Rekombination wieder ins Genom integriert wurde. Für das Auftreten von *white*⁺-Fliegen kommen mehrere Ursachen in Frage. Zum einen könnte das Donor-Konstrukt gar nicht mobilisiert worden sein, weshalb es auch zu keiner homologen Rekombination kommen konnte; es handelt sich also um die Ausgangsfliegen. Dieser Fall tritt jedoch sehr selten auf, da die Effizienz der Flp-Rekombinase bei mehr als 99% liegt (Golic und Golic, 1996). Eine zweite Erklärung ist das sogenannte „non-targeted event“, also die Rekombination des Donor-Konstrukts an einer nicht-homologen Position. Die dritte Möglichkeit ist die homologe Rekombination an der gewünschten Stelle im Genom. Die *white*⁺-Fliegen wurden mit *yw*-Fliegen rückgekreuzt und über Balancierung (3.2.33.6) eine stabile Linie erzeugt sowie die Lokalisierung des Konstrukts verifiziert.

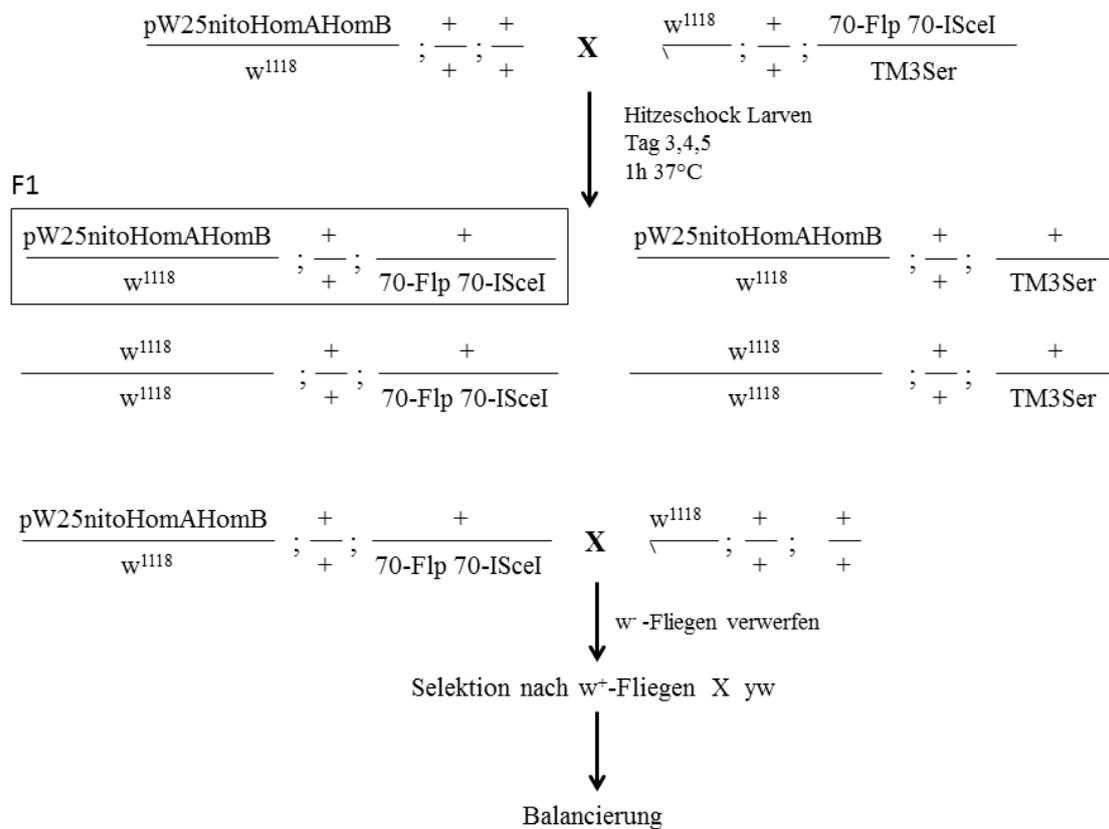


Abb.3.5. Kreuzungsschema „Ends-Out Gene Targeting“. In der 1. Kreuzung werden Fliegen mit X-chromosomalem Donor-Konstrukt pW25/nitoGT mit Fliegen gekreuzt, die die Gene Flp und I-SceI unter Kontrolle eines Hitzeschockpromotors (70-Flp 70-I-SceI) auf dem 3. Chromosom tragen. Larven dieser Kreuzung werden drei Hitzeschocks von jeweils einer Stunde bei 37°C ausgesetzt. Weibliche Nachkommen, die nicht den Marker Ser (eingekerbte Flügel, durch Kasten hervorgehoben) tragen, werden mit yw-Fliegen rückgekreuzt. Bei deren Nachkommen erfolgt eine Selektion auf white⁺ Fliegen; diese werden zunächst mit yw rückgekreuzt und anschließend balanciert, um einen Transfer des white⁺ Markers vom Donor-Chromosom auf das Zielchromosom nachzuweisen

3.2.35 MARCM-Analysen

Das 1999 von Lee und Luo entwickelte MARCM- (Mosaic Analysis with a Repressible Cell Marker) System, eine Kombination aus UAS-Gal4-System, Gal80-Repressor und Flp/FRT-System, ermöglicht die positive Markierung kleiner Populationen wildtypischer oder mutanter Zellen bei *D. melanogaster* (Lee und Luo, 1999; Lee und Luo, 2001; Wu und Luo, 2006). Dabei werden durch mitotische Rekombination homozygot mutante Zellen aus heterozygoten Vorläufern erzeugt.

Der verwendete MARCM-Treiberstamm TUG G13 (B. Bello, unveröffentlicht) enthält folgende Komponenten: hs-Flp (Flp unter Kontrolle eines Hitzeschockpromotors), FRTG13 (FRT-Stellen auf dem rechten Arm des 2.Chromosoms in der 42B1-Region), tubP-Gal80 (Gal80 unter Kontrolle des tubulin-Promotors), tubP-Gal4 (Gal4 unter Kontrolle des tubulin-Promotors), UAS-mCD8::GFP (membrangebundenes GFP als Marker).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Auswirkung einer homozygoten Mutation des Gens *nito* untersucht werden. Zur Herstellung eines mutanten Effektorstammes wurde daher der Stamm FRT G13 (BL1956, FRT-Stellen in Region 42B) mit der Targeting-Mutante *nito*^{GT} rekombiniert (3.2.30). Dieser rekombinante Stamm wurde mit dem TUG G13-Treiberstamm gekreuzt, um mutante Zellklone zu erzeugen (Abbildung 3.6).

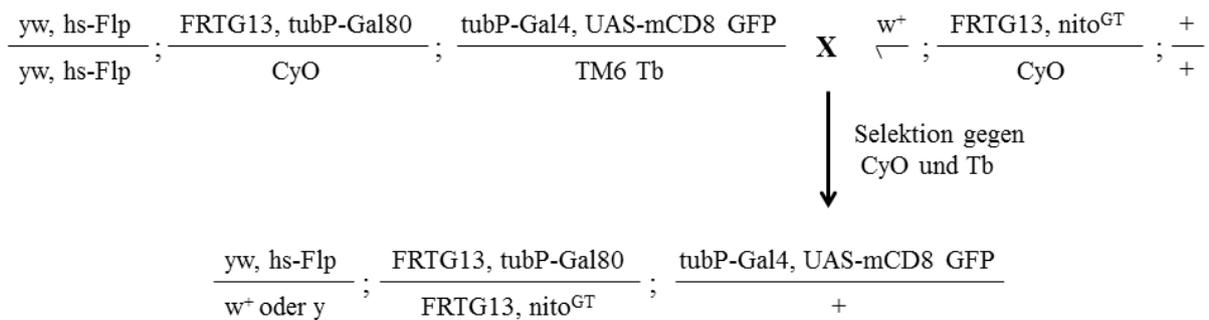


Abb.3.6. Kreuzungsschema MARCM-Analyse. Kreuzung zwischen MARCM-Treiberstamm und mutantern FRT/*nito*^{GT}-Stamm für das zweite Chromosom. In der F1-Generation wird gegen die Marker CyO und Tb selektiert.

Nachkommen dieser Kreuzung wurden gegen die Marker CyO und Tb selektiert und in einer Selbstungs-Kreuzung verpaart. Zur Eiablage wurden die Fliegen 8h in Gelegebecher mit Apfelsaftplatten gesetzt und die Platten mit den Embryonen anschließend für 39h bei 24°C inkubiert. Die Larven wurden dann einem einstündigen Hitzeschock bei 37°C im Wasserbad ausgesetzt, nach einer Erholungsphase in Zuchtbehälter überführt und bei 24°C weiter inkubiert. Zur Untersuchung larvaler Effekte wurden Larven des dritten Larvalstadiums auf eine GFP-Expression selektiert, die Gewebe von Interesse präpariert, fixiert und zur Antikörperfärbung (3.2.38) eingesetzt. Um die Auswirkungen mutanter *nito*-Klone im adulten Tier zu analysieren, wurde im Larval- bzw. Pupalstadium auf eine GFP-Expression selektiert, die ausgewählten Tiere in frische Zuchtbehälter überführt und die resultierenden Fliegen phänotypisch bewertet (3.2.29).

3.2.36 Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (BiFC) in *Drosophila melanogaster*

Die Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation erlaubt den Nachweis physikalischer Wechselwirkungen zwischen zwei Proteinen in ihrem endogenen Kontext, basierend auf der Fusion der beiden Proteine an zwei nicht-fluoreszierende Fragmente eines geteilten Fluoreszenzproteins (Kerppola, 2008). Werden diese Fragmente durch eine Interaktion ihrer Fusionspartner in räumliche Nähe gebracht, wird das Fluoreszenzprotein wieder hergestellt. Durch Gohl et al. (2010) wurde diese Methode weiterentwickelt, so dass mit Hilfe der

Gateway-Technologie BiFC-Vektoren für eine PhiC31-vermittelte Keimbahntransformation in *D. melanogaster* hergestellt werden konnten. Unter Nutzung des UAS-Gal4-Systems kann die Interaktion zwischen *Drosophila*-spezifischen Proteinen nun direkt in der lebenden Fliege untersucht werden.

Unter Verwendung des pCR[®]8/GW/TOPO[®] TA Cloning Kit (3.2.10) wurden Entry-Klone mit den codieren Sequenzen der zu untersuchenden Gene hergestellt. Anschließend folgte die Clonase-vermittelte Übertragung (3.2.11) in die Zielvektoren pUAST-RfB-HA-CYFP-attB, pUAST-RfB-Myc-NYFP-attB und pUAST-NYFP-Myc-RfB-attB (Gohl et al., 2010). Diese wurden durch PhiC31-vermittelte Keimbahntransformation in eine „attP-Site“ auf dem 3. Chromosom (BL24871) in das *Drosophila*-Genom eingebracht (3.2.32). Mit Hilfe des UAS-GAL4-Systems wurden die gewünschten Transgenkombinationen im Muster verschiedener flügel-spezifischer Treiberstämme ektopisch exprimiert. Zur Analyse wurden Flügel-Imaginalscheiben aus Larven des dritten Larvalstadiums freipräpariert, fixiert und das rekonstituierte YFP mittels Antikörperfärbung (3.2.38) nachgewiesen.

Histologische Methoden

3.2.37 Antikörperfärbungen an *Drosophila*-Embryonen

Zum Absammeln von Embryonen wurden die Fliegen in luftdurchlässigen Gelegebechern auf mit Hefe bestrichene Apfelsaftplatten gesetzt. Die Platten wurden anschließend von toten Fliegen befreit, für ca. 2min mit 50% Hypochlorid-Lösung überschichtet und dadurch das Chorion entfernt. Danach wurden die dechorionierten Embryonen in ein Netzchen überführt und mit Embryonenwaschlösung mehrmals gespült. Die Fixierung erfolgte in einem Reaktionsgefäß mit einem Zwei-Phasengemisch aus 700µl PEM mit 3.7% Formaldehyd und 700µl Heptan für 12min unter schneller Rotation (Peqlab Multi-Shaker Rotator RS24). Beide Phasen wurden abgenommen und durch 700µl Heptan sowie 700µl Methanol ersetzt. Durch 2min kräftiges Schütteln wurde die Vitellinmembran zerstört. Die Embryonen wurden dreimal mit Methanol gewaschen und konnten dann bei -20°C gelagert oder direkt zu Antikörperfärbung eingesetzt werden.

Fixierte Embryonen wurden durch dreimaliges Spülen in PBX_{0.1%} rehydriert. Alle weiteren Schritte wurden auf dem Taumler unter sanfter Bewegung durchgeführt. Nach 4x 30min Waschen in PBX_{0.1%} wurden unspezifische Bindungsstellen durch 30min Inkubation mit NHS abgeblockt. Die Inkubation mit dem primären Antikörper, verdünnt in NHS (siehe 3.1.1), erfolgte bei 4°C über Nacht. Am folgenden Tag wurden die Embryonen erneut 3x gespült und

5x 30min mit PBX_{0,1%} gewaschen. Die Inkubation mit dem fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörper wurde analog durchgeführt. Nach 3maligen Spülen und 7x30min Waschen in PBX_{0,1%} wurden die Embryonen in Vectashield[®] Mounting Medium (VectorLabs) aufgenommen und eingedeckt. Die Auswertung und Dokumentation erfolgte wie unter 3.2.43 bzw. 3.2.44 beschrieben; die Zuordnung der Embryonalstadien erfolgte nach Campos-Ortega und Hartenstein (1997).

3.2.38 Antikörperfärbungen an larvalen Geweben von *Drosophila melanogaster*

Flügel-Imaginalscheiben, Augen-Antennen-Scheiben und Gehirne von Larven des dritten Larvalstadiums wurden in 1xPBS_{AK} präpariert und auf Eis gesammelt. Die Fixierung erfolgte in einem Gemisch aus 3 Volumen PBL und einem Volumen 8%iger Paraformaldehyd-Lösung für 1h bei RT oder über Nacht bei 4°C. Anschließend wurden die Präparate 3x mit 1xPBS_{AK} gespült und 3x 5min mit Methanol gewaschen. Danach konnten die fixierten Gewebe direkt zur Antikörperfärbung eingesetzt oder bei -20°C gelagert werden.

Die Färbung der Gewebe-Präparate erfolgte analog zur Färbung von Embryonen (3.2.37), wobei für alle Spül- und Waschschrte PBX_{0,5%} verwendet und auf stetige Bewegung auf dem Taumler verzichtet wurde. Nach dem letzten Waschschrte wurden die Präparate zur Verringerung der Detergenz-Konzentration einmal mit 1xPBS_{AK} gespült und anschließend in Vectashield[®] Mounting Medium (VectorLabs) eingebettet. Die Auswertung und Dokumentation erfolgte wie unter 3.2.43 bzw. 3.2.44 beschrieben.

3.2.39 Whole Mount *in situ* Hybridisierung an *Drosophila*-Embryonen

Zum Absammeln von Embryonen wurden die Fliegen in luftdurchlässigen Gelegebechern auf mit Hefe bestrichene Apfelsaftplatten gesetzt. Die Platten wurden anschließend von toten Fliegen befreit und für ca. 2min mit 50% Hypochlorid-Lösung überschichtet. Danach wurden die dechorionierten Embryonen in ein Netzchen überführt und mit Embryonenwaschlösung mehrmals gespült. Die Fixierung erfolgte in einem Reaktionsgefäß mit einem Zwei-Phasengemisch aus 700µl Fixativ *in situ* und 700µl Heptan für 15min unter schneller Rotation (Peqlab Multi-Shaker Rotator RS24). Beide Phasen wurden abgenommen und durch 700µl Heptan sowie 700µl Methanol ersetzt. Durch 3min kräftiges Schütteln wurde die Vitellinmembran zerstört. Die Embryonen wurden dreimal mit Methanol gewaschen und konnten dann bei -20°C gelagert oder direkt zur *in situ* Hybridisierung eingesetzt werden.

Fixierte Embryonen wurden einmal in Methanol gespült und durch zweimaliges Spülen in 50%Methanol/50%PBT_{insitu} rehydriert. Anschließend wurden die Embryonen 20min in

PBT_{insitu} mit 5% Formaldehyd fixiert und 3x 5min in PBT_{insitu} gewaschen. Um die Embryonen für die Sonde zu permeabilisieren, folgte ein 3minütiger Verdau mit ProteinaseK (50µg/ml) bei 37°C, der durch zweimaliges Spülen mit Glycinpuffer (2mg/ml in PBT_{insitu}) abgestoppt wurde. Nach 2x 5min Waschen in PBT_{insitu} wurde die aufgelockerte Zellstruktur durch 20min Inkubation in PBT_{insitu} mit 5% Formaldehyd stabilisiert. Anschließend wurden die Embryonen 5x 5min in PBT_{insitu} gewaschen. Ein Aliquot derart behandelter Embryonen wurde über Nacht bei 4°C mit einem Alkalische-Phosphatase- (AP-) gekoppelten Anti-Digoxigenin-Antikörper (1:200 in PBT_{insitu} verdünnt) inkubiert, um den Antikörper zu präadsorbieren und dabei unspezifische Bindungen abzufangen. Die Embryonen für die Hybridisierung wurden ihrerseits 2x 10min in 50%PBT_{insitu}/50%HybMix sowie einmal 10min in HybMix gewaschen und anschließend 2h in 100µl HybMix bei 48°C (Wasserbad) prähybridisiert. Dig-markierte Sonden (3.2.18) wurden durch 15minütiges Aufkochen im Wasserbad denaturiert, zügig im Eis-Wasser-Bad abgekühlt, 1:10 mit HybMix verdünnt und zu den prähybridisierten Embryonen gegeben. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 48°C.

Am nächsten Tag wurden die Embryonen 2x 2min und einmal 20min in HybMix, 20min in 50%HybMix/50%PBT_{insitu} und 4x 20min in PBT_{insitu} bei 48°C und weitere 20min in PBT_{insitu} bei RT gewaschen. Es folgte die Inkubation mit dem präadsorbierten AP-gekoppelten Anti-Dig-Antikörper (1:2000 in PBT_{insitu}) für 2h bei RT. Anschließend wurden die Embryonen einmal 2min, einmal 10min und 3x 20min in PBT_{insitu} gewaschen, 2x 2min in Färbepuffer äquilibriert und bis zu einer ausreichenden Farbentwicklung in 1ml Färbepuffer mit 4.5µl NBT (10mg/ml) und 3.5µl BCIP (50mg/ml) inkubiert. Danach wurde die Reaktion durch dreimaliges Spülen mit PBT_{insitu} abgestoppt und die Embryonen durch Spülen in einer aufsteigenden Ethanolreihe (30%, 50%, 70%, 90%, 100%) dehydriert. Die Embryonen wurden in einem Canadabalsam-Salicylat-Gemisch aufgenommen und eingedeckt. Die Auswertung und Dokumentation erfolgte bei Differentiellem Interphasenkontrast (DIC) wie unter 3.2.42 beschrieben; die Zuordnung der Embryonalstadien erfolgte nach Campos-Ortega und Hartenstein (1997).

3.2.40 *in situ* Hybridisierung an larvalen Geweben von *Drosophila melanogaster*

Die anterioren Hälften von Larven des dritten Larvalstadiums wurden in 1xPBS_{insitu} umgestülpt, Fettkörper, Speicheldrüsen und Darm entfernt, die Präparate auf Eis gesammelt und 20min in 4% Paraformaldehyd in 1xPBS_{insitu} unter Schütteln fixiert. Nach 5min Waschen in 1xPBS_{insitu} folgte ein weiterer Fixierschritt in 0.5% Glutaraldehyd in 1xPBS_{insitu} für 2min auf Eis. Anschließend wurden die Präparate 3x mit 1xPBS_{insitu} gespült und 3x 5min mit

Methanol gewaschen. Die Gewebepreparate konnten nun direkt zur *in situ* Hybridisierung eingesetzt oder bei -20°C gelagert werden.

Die Präparate wurden durch dreimaliges Spülen mit PBT_{insitu} rehydriert und 2x 5min in PBT_{insitu} gewaschen. Um die Gewebe für die Sonde zu permeabilisieren, folgte ein 2minütiger Verdau mit ProteinaseK (50µg/ml) bei 37°C, der durch zweimaliges Spülen mit Glycinpuffer (2mg/ml in PBT_{insitu}) abgestoppt wurde. Nach 2x 5min Waschen in PBT_{insitu} wurden die Präparate erneut in 4% Paraformaldehyd in PBS_{insitu} fixiert, um die aufgelockerte Zellstruktur zu konservieren. Die Präparate wurden 5x 5min Waschen in PBT_{insitu}, 10min in 50%PBT_{insitu}/50%HybMix und 10min in HybMix gewaschen und anschließend 1-2 Stunden in 100µl HybMix bei 45°C prähybridisiert. Dig-markierte Sonden (3.2.18) wurden 15min durch Aufkochen im Wasserbad denaturiert, zügig im Eis-Wasser-Bad abgekühlt, 1:10 mit HybMix verdünnt und zu den prähybridisierten Gewebe-Preparaten gegeben. Die Hybridisierung erfolgte bei 45°C über Nacht.

Am nächsten Tag wurden die Präparate einmal 2min in HybMix und anschließend jeweils 20min in einer absteigenden HybMix-Reihe (80%, 60%, 40%, 20%, 0% in PBT_{insitu}) bei 45°C gewaschen. Nach weiteren 20min Waschen mit PBT_{insitu} bei RT folgte die Inkubation mit dem AP-gekoppelten Anti-Dig-Antikörper (1:2000 in PBT_{insitu}) für 2h bei RT. Anschließend wurden die Präparate 4x 20min in PBT_{insitu} gewaschen, 2x 2min in Färbepuffer äquilibriert und bis zu einer Farbentwicklung in 1ml Färbepuffer mit 4.5µl NBT (10mg/ml) und 3.5µl BCIP (50mg/ml) inkubiert. Nach erfolgter Farbentwicklung wurde die Reaktion durch 5x Spülen in PBT_{insitu} abgestoppt. Die Präparate wurden 30 min in 50% Glycerol (in PBT_{insitu}) inkubiert, anschließend wurden Gehirne, Flügel-Imaginalseiben und Augen-Antennenscheiben in 80% Glycerol (in PBT_{insitu}) freipräpariert und eingebettet. Die Auswertung und Dokumentation erfolgte wie unter 3.2.42 beschrieben.

3.2.41 Kernfärbungen mit DAPI (4',6-Diamidin-2-Phenylindol)

DAPI kann aufgrund seiner DNA-interkalierenden Eigenschaften zur Färbung von Zellkernen verwendet werden und zeigt bei Anregung im UV-Bereich eine cyanblaue Fluoreszenz.

Kernfärbungen wurden im Anschluss an die finalen Waschschritte einer Antikörperfärbung durchgeführt. Die zu färbenden Embryonen/ larvalen Gewebe wurden 2min mit DAPI-Lösung (1µg/ml) inkubiert, 5x mit PBX gespült und 30min in PBX gewaschen. Anschließend wurden die Präparate in Vectashield[®] Mounting Medium (VectorLabs) eingebettet. Die Auswertung und Dokumentation erfolgte wie unter 3.2.43 beschrieben.

Mikroskopie

3.2.42 Lichtmikroskopie

Für Hellfeld- und DIC- (differentieller Interphasenkontrast) Aufnahmen wurden die Mikroskope BX61 (Hellfeld und DIC) und SZX12 (Hellfeld) mit der Kamera CC12 und der Software „CellP“ der Firma Olympus verwendet. Die weitere Bildbearbeitung erfolgte mit der Software „ImageJ“ (nih.gov) und „Corel PaintShop Pro X5“.

3.2.43 Fluoreszenzmikroskopie

Für Fluoreszenzaufnahmen wurde das Mikroskop BX61 (Olympus) mit der unter 3.2.42 genannten Ausstattung und Bildbearbeitung verwendet.

3.2.44 Konfokale Mikroskopie

Zur Aufnahme von hochauflösenden Bildstapeln mit unterschiedlichen Fokusebenen in definierten Abständen (Z-Stapel) wurden folgende Konfokal-Mikroskope eingesetzt: LSM710 (Zeiss) und SP5 (Leica). Die Analyse der Z-Stapel erfolgte mit der Software „ImageJ“ (nih.gov), wobei die Stapel zu Einzelbildern mit optimierter Schärfe und Auflösung kombiniert wurden. Die weitere Bildbearbeitung wurde mit der Software „Corel PaintShop Pro X5“ durchgeführt.

4. Ergebnisse

4.1. Untersuchung der Interaktion zwischen Nito und Hipk

Die Homeodomän-interagierende Proteinkinase (Hipk) steht in Wechselwirkung mit einer Vielzahl von Proteinen, wodurch sie, oft auf mehreren Ebenen, direkten, aber auch indirekten Einfluss auf unterschiedlichste Signalwege in entwicklungsbiologischen sowie pathologischen Prozessen ausübt. In vorhergehenden Arbeiten konnte eine Interaktion zwischen Hipk und Mitgliedern der Familie der SPOC-Proteine nachgewiesen werden. Zunächst wurde dabei im Rahmen eines Enhancer-Suppressor-Screens im augenspezifischen Hintergrund das große SPOC-Protein Split ends (Spen) als Interaktionspartner der Kinase identifiziert und in weiterführenden *in vitro* Analysen als direktes Hipk-Substrat bestätigt (Steinmetz, 2006; Dewald, 2008). Das kleine SPOC-Protein Spenito (Nito) wird in der Literatur kontextabhängig als Antagonist bzw. Synergist zu Split ends beschrieben (Jemc und Rebay, 2006; Chang et al., 2008). Aufgrund dieser Interaktionen zwischen Spen und Nito sowie des ähnlichen Aufbaus als SPOC-Proteine lag es nahe, dass auch Nito mit Hipk interagiert und durch die Kinase phosphoryliert wird. Unterstützt wurde diese Vermutung durch Kreuzungsanalysen entsprechend dem genannten Screen mit Defizienzstämmen, in denen unter anderem der genomische Bereich von *nito* deletiert ist (Dewald, 2008). Da solche Defizienzen allerdings eine größere Anzahl von Genen betreffen und zu diesem Zeitpunkt noch keine *nito*-Einzelgenmutanten verfügbar waren, konnte bisher lediglich festgestellt werden, dass die deletierte genomische Region mindestens einen Hipk-Interaktionspartner umfasst, dessen phänotypischer Effekt im Screen den für Nito aufgestellten Erwartungen entspricht – Nito selbst jedoch konnte noch nicht zweifelsfrei als dieser Interaktionspartner zugeordnet werden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte nun die Beziehung von Hipk und Nito weitergehend untersucht werden. Mangels ausreichend aussagekräftiger genetischer Daten wurde der Schwerpunkt hierbei zunächst auf den *in vitro* Nachweis einer möglichen Enzym-Substrat-Beziehung und die Kartierung potentieller Phosphorylierungsstellen gelegt. Im Erfolgsfall sollte die Interaktion anschließend durch *in vivo* Analysen weitergehend charakterisiert werden.

4.1.1 Colokalisation der Expression von *nito* und *hipk*

Jegliche experimentell nachweisbare Interaktion zweier Proteine ist funktionell nur dann von Relevanz, wenn beide Interaktionspartner in ihrem Herkunftsorganismus unter natürlichen

Bedingungen zumindest einmal im Verlauf der Entwicklung zur gleichen Zeit am gleichen Ort exprimiert werden. Daher sollten auch Hipk und Nito hinsichtlich einer Colokalisation zu verschiedenen Zeitpunkten der *Drosophila*-Entwicklung untersucht werden. Die essentielle Frage nach dem Vorkommen im gleichen Zellkompartiment konnte dabei bereits aus der Literatur beantwortet werden; beide wurden als vorwiegend nukleär lokalisierte Faktoren beschrieben (Kim et al., 1998; Chang et al., 2008).

Zur Analyse der gewebespezifischen Colokalisation werden in der Regel beide Komponenten im gleichen Präparat mit immunhistochemischen Methoden sichtbar gemacht. Da in diesem Fall jedoch keine qualitativ ausreichenden Antikörper zur gleichzeitigen Anfärbung von Hipk und Nito vorhanden waren, musste auf den Nachweis der Expression auf Transkriptebene zurückgegriffen werden. Dazu wurden, ausgehend von den jeweiligen cDNA-Klonen, DNA-Sonden gegen den codierenden Bereich von *hipk* und *nito* hergestellt (3.2.18) und zur *in situ* Hybridisierung an wildtypischen Embryonen und verschiedenen larvalen Geweben des dritten Larvalstadiums eingesetzt (3.2.39, 3.2.40).

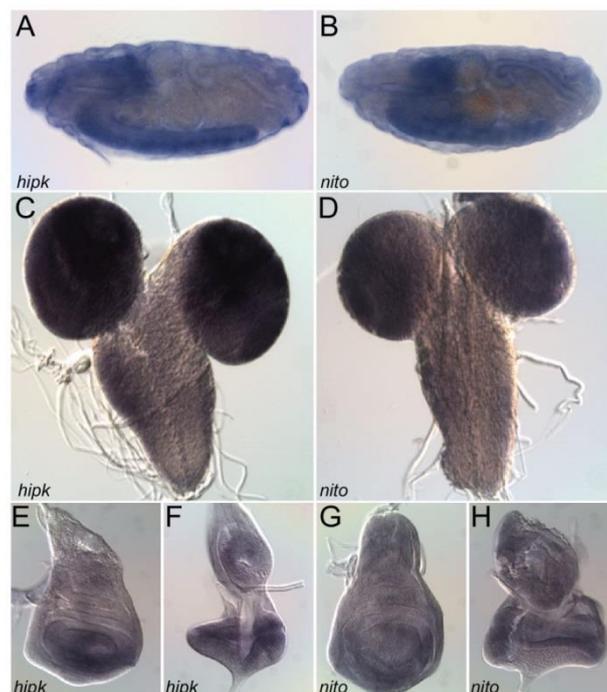


Abb.4.1. Expressionsmuster der mRNA von *hipk* und *nito*. Dargestellt sind lichtmikroskopische Aufnahmen mit DIC-Filter von *in situ* Hybridisierungen mit DNA-Sonden gegen *hipk* bzw. *nito* an wildtypischen Embryonen und larvalen Geweben. (A,B) Embryonen in Stadium 17 (nach Campos-Ortega und Hartenstein, 1997), laterale Ansicht; der anteriore Pol ist nach links orientiert, die Dorsalseite liegt oben. (C,D) Larvale Gehirne des dritten Larvalstadiums. Zu sehen sind die lateral angeordneten Hemisphären mit dem darunterliegenden Ventralganglion. (E,G) Flügelscheiben des dritten Larvalstadiums; die Orientierung ist anterior nach links, Dorsalseite nach oben. (F,H) Augen-Antennenscheiben des dritten Larvalstadiums; die Augenscheibe befindet sich unten, die Antennenscheibe oben.

Abbildung 4.1 zeigt eine exemplarische Auswahl der Ergebnisse. Ein Vergleich der mRNA-Expressionsmuster ist hier nur indirekt möglich, da die für diese Art der *in situ* Hybridisierung zur Verfügung stehende Nachweismethodik nur die sichere Detektion einer Sonde pro Präparat erlaubt. Wie der Darstellung zu entnehmen ist, zeigen *hipk* und *nito* sowohl embryonal als auch larval deutliche Ähnlichkeiten im Muster ihrer mRNA-Expression. So verfügen beide im Embryo über eine basale ubiquitäre Expression mit einer starken Anreicherung im zentralen Nervensystem (Abb.4.1A,B). Im larvalen Gehirn ist die Expression beider Transkripte in den Hemisphären verstärkt, während im Ventralganglion nur ein schwaches Signal nachgewiesen werden kann (Abb.4.1C,D). Weniger übereinstimmende, jedoch klar überlappende Expressionsmuster ergeben sich bei der Betrachtung der untersuchten Imaginalscheiben (Abb.4.1E-H). So zeigt *nito* eine mehr oder weniger gleichförmige ubiquitäre Expression mit punktuellen Anreicherungen sowohl in der Flügel- als auch in der Augen-Antennenscheibe, während *hipk* verstärkt im ventralen Bereich der Flügelscheibe sowie in der Augenscheibe exprimiert wird. Zusammenfassend lässt sich also eine zeitliche und räumliche Coexpression von *hipk* und *nito* insbesondere in neuronalen Geweben feststellen.

4.1.2 *in vitro* Phosphorylierungsanalysen

4.1.2.1 Nachweis von Nito als Hipk-Substrat

In einem nächsten Schritt sollte nun geprüft werden, ob es sich bei Nito um ein Substrat von Hipk handelt. Dazu sollte Nito als GST-Fusionsprotein rekombinant exprimiert, aufgereinigt und einem *in vitro* Kinaseassay mit gereinigter Hipk unterzogen werden.

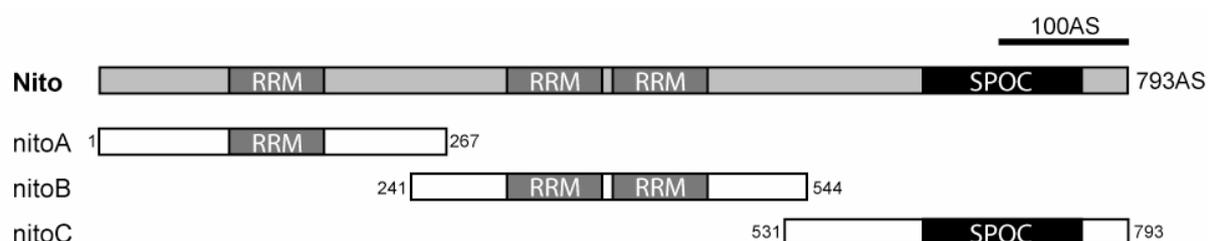


Abb.4.2. Schematischer Aufbau der Konstrukte zur Untersuchung von Nito auf eine Phosphorylierung durch Hipk. Das SPOC-Protein Nito hat eine Länge von 793 Aminosäuren und verfügt über 3 RNA-Erkennungsmotive („RNA recognition motifs“, RRM) sowie eine C-terminal gelegene SPOC-Domäne („Spent paralog and ortholog C-terminal domain“). Dargestellt sind die Konstrukte nitoA, nitoB und nitoC mit ihrer Position in Relation zum Gesamtprotein inklusive der Positionszahl der jeweils terminalen Aminosäuren.

Zur vereinfachten Handhabung und um gegebenenfalls bereits eine vorläufige Kartierung der Phosphorylierung zu erhalten, wurde Nito hierfür in drei überlappende Fragmente unterteilt, wobei eine Unterbrechung der RNA-Erkennungsmotive (RRMs) oder der SPOC-Domäne vermieden wurde (Abb.4.2). Mit Hilfe der in Tabelle 4.1 angegebenen Primer wurden die Konstrukte nitoA, nitoB und nitoC über PCR aus dem *nito*-cDNA-Klon GH11110 (DGRC) amplifiziert (3.2.16) und in den Vektor pCR[®]2.1 (Invitrogen) zwischenkloniert (3.2.8).

Tab.4.1. Verwendete Primer zur Klonierung der ersten Nito-Konstrukte. Als Template diente der *nito*-cDNA-Klon GH11110.

Konstrukt	Primer1	Primer2
nitoA	Bam-nito1	nito2
nitoB	Bam-nito3	nito4
nitoC	Sal-nito5	Xho-nito6

Anschließend wurden nitoA und nitoB über die Restriktionsenzyme *Bam*HI und *Eco*RI sowie nitoC über *Sal*I und *Xho*I leserasterspezifisch in Expressionsvektoren der pGEX-5X-Serie einkloniert (3.2.2-3.2.7). Abbildung 4.3 zeigt den Nachweis der *nito*-Inserts (jeweils zwischen 0.8 und 0.9kb) im Zielvektor.

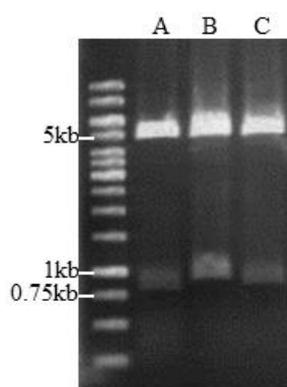


Abb.4.3. Kontrollverdau der pGEX-Konstrukte nitoA, nitoB, nitoC. Zum Nachweis der Integration der *nito*-Sequenzen in die pGEX-Vektoren wurde die DNA der Konstrukte mit *Bam*HI und *Eco*RI (A und B) bzw. *Bam*HI und *Xho*I (C) verdaut, anschließend in einem 1%igen TAE-Agarosegel aufgetrennt, mit Ethidiumbromid angefärbt und über ein INTAS-Geldokumentationssystem detektiert. Marker: GeneRuler[™] 1kb DNA ladder (Fermentas).

Nach erfolgreicher Klonierung wurden die Expressionskonstrukte in *E. coli* zur Expression gebracht, die Proteine aufgereinigt (3.2.20) und in einem *in vitro* Kinaseassay analysiert (3.2.23). Dazu wurden die potentiellen Substrate mit aufgereinigter Kinase und radioaktiv

markiertem $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ als Phosphatquelle inkubiert und in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Mit Hilfe eines Autoradiogramms wurde schließlich die erfolgreiche Übertragung des radioaktiven Phosphats sichtbar gemacht (Abb.4.4). Dabei ergaben sich eine starke Phosphorylierung im N-terminalen Bereich von Nito (nitoA) sowie eine etwas schwächere Phosphorylierung der C-terminalen Region (nitoC). Aufgrund der ähnlichen Konstruktgrößen wären beide Signale im Autoradiogramm auf einer vergleichbaren Höhe zu erwarten, die der Auftrennung nach dem Molekulargewicht der eingesetzten Proteine entspricht. Das Signal von nitoA erscheint jedoch erkennbar tiefer, da das Protein während der Aufreinigung stark degradiert. Für den mittleren Proteinbereich (nitoB) konnte keine Phosphorylierung nachgewiesen werden. Nito verfügt also insgesamt über mindestens zwei durch Hipk phosphorylierbare Zielsequenzen. Als Positivkontrolle wurde das bekannte Hipk-Substrat Groucho mitgeführt (Choi et al., 2005; Lee et al., 2009a).

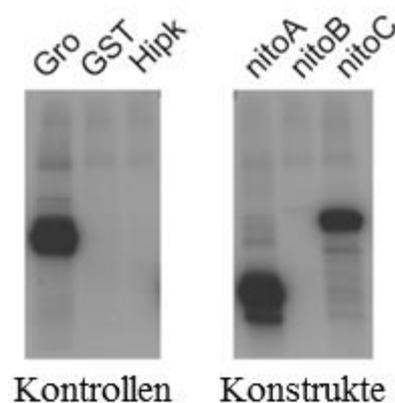


Abb.4.4. Nachweis der Phosphorylierung von Nito durch Hipk. Dargestellt sind Autoradiogramme von *in vitro* Kinaseassays der Konstrukte nitoA, nitoB und nitoC sowie verschiedene Kontrollen. Das bekannte Hipk-Substrat Groucho (Gro) diente als Positivkontrolle, GST-Tag ohne fusioniertes Substrat als Negativkontrolle. Ein Reaktionsansatz mit Hipk, aber ohne Substrat, diente zur Darstellung der Kinase-spezifischen Autophosphorylierung. Diese zeigt sich in Form zusätzlicher Banden insbesondere im oberen Drittel der Autoradiogramme. Die Phosphorylierungssignale von nitoA und nitoC sollten aufgrund vergleichbarer Konstruktgrößen auf etwa gleicher Höhe liegen, nitoA degradiert jedoch während der Aufreinigung und läuft daher im SDS-Polyacrylamidgel bei einem niedrigeren Molekulargewicht.

4.1.2.2 Eingrenzung der phosphorylierten Regionen von Nito

Nachdem Nito als Substrat von Hipk nachgewiesen werden konnte, sollten nun die phosphorylierten Regionen genauer kartiert werden. Dazu wurde eine Reihe von verkürzten Subkonstrukten für die im Kinaseassay positiven Konstrukte nitoA und nitoC entwickelt (Abb.4.5). Die Unversehrtheit des N-terminalen RNA-Erkennungsmotivs und der SPOC-Domäne wurde dabei aufgegeben.

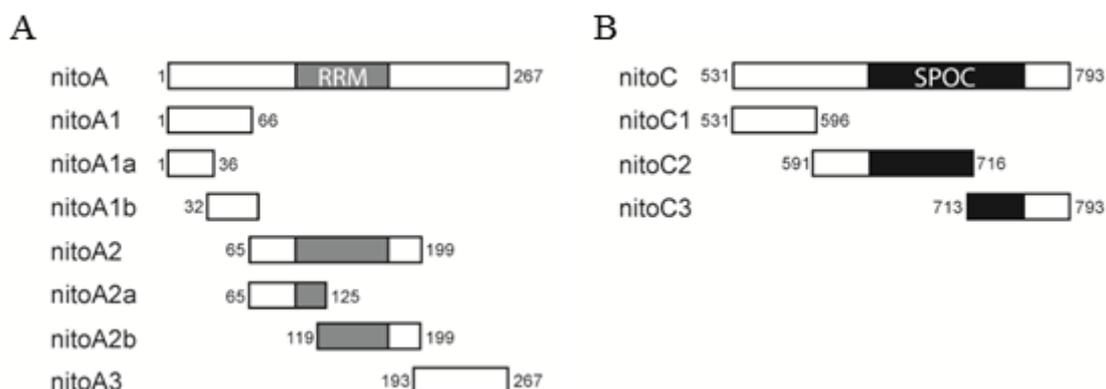


Abb.4.5. Schematische Darstellung der Konstrukte zur Eingrenzung der phosphorylierten Regionen von Nito. Gezeigt ist die Position der Subkonstrukte in Relation zum jeweils übergeordneten Konstrukt mit Angabe der Positionszahl der jeweils terminalen Aminosäuren. (A) Darstellung der Subkonstrukte zur Kartierung der Phosphorylierung innerhalb des Konstrukts nitoA. (B) Darstellung der Subkonstrukte zur Kartierung der Phosphorylierung innerhalb des Konstrukts nitoC.

Die jeweiligen Konstrukte wurden unter Verwendung der in Tabelle 4.2 aufgeführten Primer amplifiziert und wie unter 4.1.2.1 beschrieben kloniert, wobei die Auswahl der verwendeten Restriktionsenzyme von den artefiziell an die Primer angefügten Schnittstellen abhängig war. Wurde an einen Primer keine Schnittstelle angefügt, so wurde diese Seite des Konstrukts über *EcoRI* vom Vektor pCR[®]2.1 abgetrennt. Eine Ausnahme von diesem Vorgehen bildete nitoA1, welches durch die Trunkierung von nitoA mittels Restriktionsverdau mit den Enzymen *PaeI* und *XhoI* erzeugt wurde (3.2.2, 3.2.6). Die Expression und Untersuchung der Proteine im *in vitro* Kinaseassay erfolgte ebenfalls analog zu 4.1.2.1.

Tab.4.2. Verwendete Primer zur Klonierung der Nito-Eingrenzungskonstrukte. Als Template diente der *nito*-cDNA-Klon GH11110.

Konstrukt	Primer1	Primer2
nitoA1	Erzeugt aus nitoA mittels Verdau mit <i>PaeI</i> und <i>XhoI</i>	
nitoA1a	Bam-nito1	nitoA1r
nitoA1b	Bam-nitoA1f	nitoA2r
nitoA2	Bam-nitoA2f	nitoA2_2r
nitoA2a	Eco-nitoA2f	Xho-nito7r
nitoA2b	Eco-nito8f	Xho-nitoA2_2r
nitoA3	Bam-nitoA3f	nito2
nitoC1	Sal-nito5	Not-nitoC1r
nitoC2	Eco-nitoC2f	Xho-nitoC2r
nitoC3	Bam-nitoC3f	Xho-nito6

Bei der Betrachtung der Autoradiogramme der Eingrenzungskonstrukte zeigt sich, dass Nito an mindestens fünf Positionen durch Hipk erkannt und phosphoryliert wird (Abb.4.6). Dabei verteilt sich die Phosphorylierung am N-Terminus auf alle drei größeren Subkonstrukte nitoA1, nitoA2 und nitoA3 (Abb.4.6A). Im C-terminalen Bereich wurden nur die Subkonstrukte nitoC1 und nitoC2 phosphoryliert (Abb.4.6B). Wie bereits in den vorangegangenen Untersuchungen, weisen auch hier die N-terminalen Konstrukte eine höhere Signalstärke auf, d.h. der N-Terminus von Nito scheint insgesamt stärker durch Hipk phosphoryliert zu werden. Innerhalb der Subkonstrukte nitoA1 bzw. nitoA2 konnte die Zielregion auf die untergeordneten Konstrukte nitoA1a bzw. nitoA2a weiter eingegrenzt werden. Auffällig ist dabei die Diskrepanz in der Signalstärke zwischen nitoA2 und nitoA2a. Da beide Konstrukte die gleichen Phosphorylierungsstellen enthalten (nitoA2b ist nicht phosphoryliert), ist die Ursache hierfür vermutlich vor allem in einer veränderten Zugänglichkeit der Zielsequenzen aufgrund der unterschiedlichen Proteingrößen zu suchen.

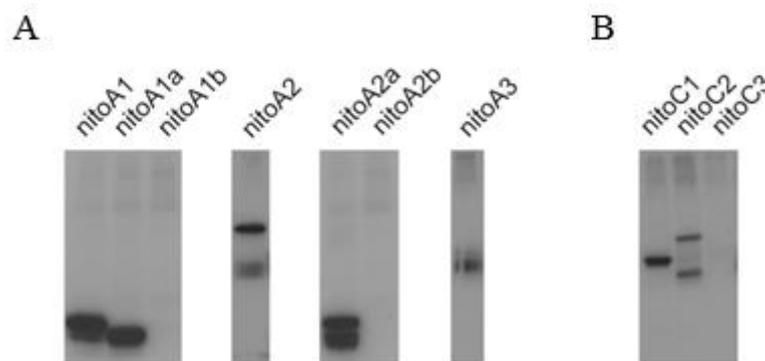


Abb.4.6. Untersuchung der Phosphorylierung der Nito-Eingrenzungskonstrukte. Dargestellt sind Autoradiogramme von *in vitro* Kinaseassays der Eingrenzungskonstrukte aus Abb.4.5. Als Positivkontrollen dienten die zugehörigen übergeordneten Konstrukte (nicht gezeigt). Die Autophosphorylierung von Hipk zeigt sich in Form zusätzlicher Banden insbesondere im oberen Drittel der Autoradiogramme. (A) Eingrenzungskonstrukte für nitoA. (B) Eingrenzungskonstrukte für nitoC.

4.1.2.3 Bestimmung der Phosphorylierungsstellen von Nito durch *in vitro* Mutagenese

Mit Hilfe der bisher beschriebenen Konstrukte konnte die Phosphorylierung von Nito auf relativ kleine Proteinregionen eingegrenzt werden. Für eine genauere Kartierung erschien die Erzeugung noch kleinerer Konstrukte jedoch ungeeignet, so dass für die weitere Analyse auf eine *in vitro* Mutagenese der bestehenden Konstrukte zurückgegriffen wurde (für eine Übersicht über diese Konstrukte siehe Abb.4.7). Dazu wurden spezifische Mutageneseprimer entwickelt, die durch definierte Basenfehlpaarungen einen gerichteten Austausch einer oder mehrerer potentiell phosphorylierter Kandidaten-Aminosäuren, in diesem Fall von Serin, zu

einem nicht phosphorylierbaren Alanin erlauben. Wird dabei eine tatsächliche Ziel-Aminosäure ausgeschaltet, ist der Verlust der Phosphorylierbarkeit des Proteins im Autoradiogramm durch eine Abschwächung oder sogar den vollständigen Wegfall des Signals nachweisbar.

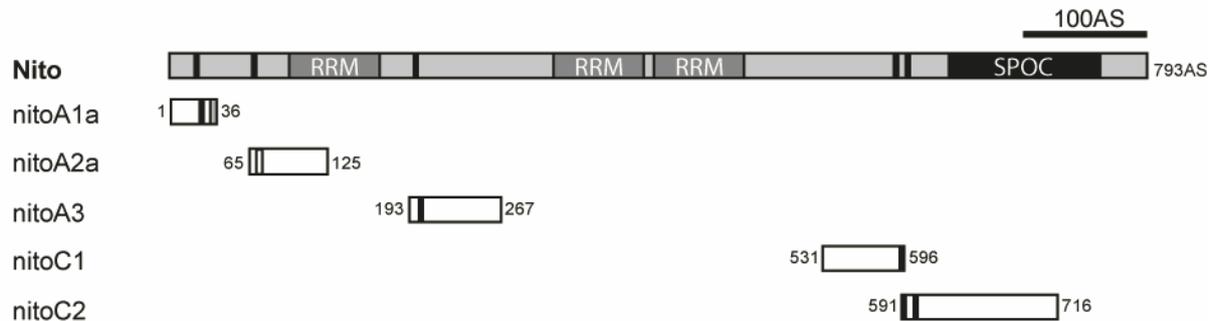


Abb.4.7. Schematische Darstellung der Mutagenesekonstrukte zur Bestimmung der phosphorylierten Motive von Nito. Gezeigt sind die mutierten Konstrukte mit ihrer Position in Relation zum Gesamtprotein inklusive der Positionsanzahl der jeweils terminalen Aminosäuren. Schwarze Balken markieren durch Mutagenese untersuchte, phosphorylierte Bereiche. Der graue Balken in nitoA1a entspricht einem durch Mutagenese untersuchten, jedoch nicht phosphorylierten Sequenzbereich. Die beiden Phosphorylierungsstellen von nitoA2a sind im Gesamtprotein in Form eines einzelnen Balkens dargestellt, da eine maßstabsgetreue getrennte Darstellung nicht möglich war. Innerhalb des entsprechenden Subkonstrukts sind beide Positionen zur besseren Nachvollziehbarkeit nicht-maßstabsgetreu getrennt gekennzeichnet. Der phosphorylierte Bereich am C-Terminus von nitoC1 wurde durch die Überlappung mit nitoC2 abgedeckt und daher für nitoC1 nicht noch einmal gesondert analysiert.

Die Klonierung der Konstrukte und Analyse der gereinigten Proteine erfolgte wie bereits beschrieben (4.1.2.1). Eine Auflistung der zur Klonierung eingesetzten Primer findet sich in Tabelle 4.3. Konstrukte, für die vier Primer aufgeführt sind, erforderten zur Einführung der gewünschten Mutation eine schrittweise Amplifikation mittels SOE-PCR (3.2.16.2). Dabei wurden zunächst in einer ersten PCR zwei kleinere, im zu mutierenden Bereich überlappende, Fragmente amplifiziert und anschließend im Rahmen einer zweiten PCR zu dem gewünschten Gesamtkonstrukt fusioniert.

In einem ersten Ansatz wurde zunächst das kleinste Konstrukt nitoA1a durch Mutation zweier Kandidatenregionen modifiziert. Die entsprechenden Konstrukte werden als nitoA1amut1 bzw. nitoA1amut2 bezeichnet (Position: Abb.4.7), die jeweils veränderte Sequenz ist in Abbildung 4.8A dargestellt. Im Autoradiogramm konnte für nitoA1amut1 ein vollständiger Ausfall des Phosphorylierungs-Signals nachgewiesen werden (Abb.4.8B), d.h. die durch Hipk phosphorylierte/n Aminosäuren wurden durch diese Mutation zerstört. Damit konnte die

Proteinsequenz MKRS²³AS²⁵RS²⁷PGPA erfolgreich als Hipk-Zielsequenz identifiziert werden.

Tab.4.3. Verwendete Primer zur Klonierung der Nito-Mutageneseonstrukte. Als Template diente, sofern nicht anders angegeben, der *nito*-cDNA-Klon GH11110. Diejenigen Konstrukte, für die vier Primer angegeben sind, wurden in zwei Schritten mittels SOE-PCR amplifiziert.

Konstrukt	Primer1	Primer2	Primer3	Primer4
nitoA1aMut1	Bam-nito1	A1aMut1R	A1aMut1F	nitoA1r
nitoA1aMut2	Bam-nito1	A1aMut2R		
nitoA2AMut1	A2_2Mut1F-Bam	Xho-nito7r		
nitoA2AMut2	Eco-nitoA2f	nito16mutII_R	nito16mutII_F	Xho-nito7r
nitoA3Mut1	A3Mut1FBam	nito2		
nitoC2Mut1	C2_2Mut1F	Xho-nitoC2r		
nitoC2Mut2	Eco-nitoC2f	C2_2Mut2R	C2_2Mut2F	Xho-nitoC2r
nitoC2Mut3	C2_2Mut1F	Xho-nitoC2r	Auf nitoC2Mut2 als Template	

Über Hipk ist bekannt, dass es sich um eine Prolin-geführte Serin/Threonin-Kinase handelt (Kim et al., 2006). Ein konkretes Konsensusmotiv für die Hipk-vermittelte Phosphorylierung von Substratproteinen konnte bisher jedoch nicht zugeordnet werden. Da die weiteren Eingrenzungskonstrukte von Nito eine Vielzahl von Serinen und Threoninen in räumlicher Nähe zu einem Prolinrest aufweisen, wurde vor deren Analyse die Proteinsequenz aus nitoA1aMut1 mit bereits bekannten Zielsequenzen anderer Hipk-Substrate (Abb.4.9A) verglichen, mit dem Ziel mögliche Übereinstimmungen aufzuspüren und die Identifikation der verbleibenden Phosphorylierungsstellen von Nito zu erleichtern. Verglichen wurden sowohl *Drosophila*- (Groucho, Homeobrain) als auch Vertebraten-Proteine (Pax6, HMGA1). Dabei zeigte sich, dass in Vertebraten eher einzelne Aminosäuren phosphoryliert werden, während phosphorylierte Sequenzen in *Drosophila* bevorzugt als Cluster aus zwei bis drei nicht zusammenhängenden Resten aufzutreten scheinen. Das die Kinase führende Prolin liegt direkt benachbart zu einem der phosphorylierten Reste, wobei es keine Rolle zu spielen scheint, ob sich das Prolin am Anfang, am Ende oder innerhalb des Clusters befindet. Eine formelle Darstellung der resultierenden Motive ist in Abbildung 4.9B zu sehen.

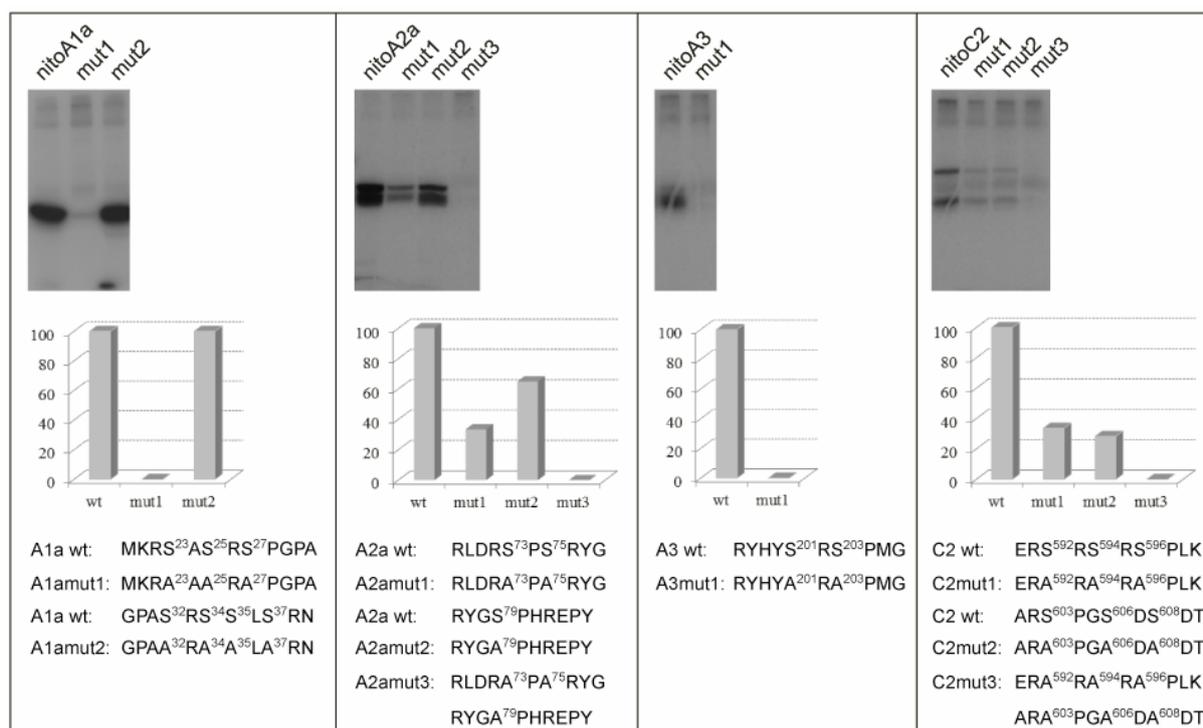


Abb.4.8. Analyse der Nito-Mutagenesekonstrukte. Dargestellt sind Autoradiogramme von *in vitro* Kinaseassays der mutierten Proteinkonstrukte im Vergleich mit ihren wildtypischen Entsprechungen. Die einzelnen Diagramme zeigen die Quantifizierung der zugehörigen Signalstärken mit Hilfe der Software „ImageJ“ (NCBI). Eine Gegenüberstellung der wildtypischen und mutierten Sequenzbereiche findet sich jeweils im unteren Teil der Abbildung.

Ausgehend von den beschriebenen Motiven wurden die Konstrukte nitoA2a, nitoA3, nitoC1 und nitoC2 in Hinblick auf dazu passende Sequenzen geprüft. In den Proteinsequenzen von nitoA2, nitoA3 und nitoC2 wurden Entsprechungen gefunden und mit Hilfe analog zu nitoA1a mutierter Proteine analysiert (Abb.4.8). In allen Fällen führte der Aminosäureaustausch zu einer Reduktion (nitoA2a mut1, nitoC2 mut1 und nitoC2 mut2) bzw. einem vollständigen Verschwinden (nitoA3) des Phosphorylierungssignals. nitoA2a mut1 ergab dabei ein deutlich reduziertes, aber immer noch klar erkennbares Signal, obwohl es sich hierbei um die einzige zu den beschriebenen Motiven passende Sequenz handelt. Innerhalb des Proteins nitoA2a musste also eine weitere Phosphorylierungsstelle mit abweichender Sequenzstruktur zu finden sein. Mit Hilfe des Mutagenesekonstrukts nitoA2a mut2, welches im Kinaseassay ebenfalls eine Abschwächung des Signals bewirkt, konnte diese identifiziert werden. Auffällig sind die Unterschiede im Ausmaß der Signalreduktion zwischen den beiden untersuchten Mutagenesekonstrukten. Diese legen den Schluss nahe, dass es sich bei RLDRS⁷³PS⁷⁵RYG (identifiziert über nitoA2a mut1) um die Haupt-Phosphorylierungsstelle innerhalb des Konstrukts handelt, während RYGS⁷⁹PHREPY (nitoA2a mut2) eine

nachgeordnete Rolle zu spielen scheint. Mit dem Konstrukt nitoA2amut3, in dem beide Phosphorylierungsstellen mutiert vorlagen und das im Kinaseassay nicht phosphoryliert wurde, konnte sichergestellt werden, dass alle relevanten Phosphorylierungsstellen innerhalb von nitoA2a identifiziert wurden. Für das Protein nitoA3 hingegen wurde mit der in nitoA3mut1 untersuchten Sequenz die einzige Phosphorylierungsstelle dieses Konstrukts, RYHYS²⁰¹RS²⁰³PMG, abgedeckt. Das Protein nitoC2 verfügte über zwei den gesuchten Motiven entsprechende Sequenzbereiche, ERS⁵⁹²RS⁵⁹⁴RS⁵⁹⁶PLK (nitoC2mut1) und ARS⁶⁰³PGS⁶⁰⁶DS⁶⁰⁸DT (nitoC2mut2), deren Mutation jeweils zu einer deutlichen Signalreduktion führte. Da die Signalstärke bei beiden Konstrukten ähnlich ausfiel, scheint es sich hier um gleichberechtigte Phosphorylierungsstellen zu handeln. Um auch in diesem Fall sicherzugehen, dass alle relevanten Phosphorylierungsstellen für nitoC2 gefunden wurden, wurde eine dritte Mutante nitoC2mut3 erzeugt, in der beide Sequenzabschnitte mutiert vorlagen. Deren Analyse ergab ein vollständiges Verschwinden des Signals und bestätigte damit die beiden Phosphorylierungsstellen. Für nitoC1 konnte kein passender Sequenzbereich zugeordnet werden. Das Konstrukt weist zwar eine Überlappung mit der N-terminalen phosphorylierten Region von nitoC2 auf, jedoch fehlt in nitoC1 das Hipk-führende Prolin, so dass dieser Bereich nicht für das Phosphorylierungssignal im Kinaseassay verantwortlich sein kann. Alle weiteren Serine innerhalb des Konstrukts befinden sich nicht in direkter Nachbarschaft zu einem Prolin (Threonine kommen in diesem Konstrukt nicht vor), so dass eine gezielte Auswahl einzelner Kandidaten-Aminosäuren anhand der für Hipk verfügbaren Informationen nicht möglich war und auf eine genauere Kartierung dieses Konstrukts verzichtet wurde.

Zusammengenommen geben die untersuchten Mutagenesekonstrukte begründeten Anlass zu der Annahme, dass es sich bei den in Abbildung 4.9B entworfenen Motiven tatsächlich um Konsensusmotive für eine Hipk-vermittelte Substratphosphorylierung handelt. Die erhaltenen Daten zeigen allerdings auch, dass es sich hierbei nur um einen vorläufigen Konsensus handelt, der nicht alle Zielsequenzen abdeckt, da beispielweise nitoA2 eine nicht den Motiven entsprechende Phosphorylierungsstelle aufweist und die Phosphorylierung von nitoC1 sogar von der für Hipk üblichen Prolin-Führung abzuweichen scheint. Für eine genauere Beschreibung eines Konsensusmotivs ist daher die Analyse weiterer Hipk-Substrate erforderlich (siehe auch 4.3).

A	B
Gro(Dmel): RSTPS ²⁹⁷ LKT ³⁰⁰ KDMEKPG	
Hbn(Dmel): VQES ²⁸ PVS ³¹ RPR	
Hbn(Dmel): KRMYT ⁵⁴ PS ⁵⁶ EVL	
Pax6: QASNT ²⁸¹ PSHIPISSSF	P – S/T – X – (X) – S/T
Pax6: T ³⁰⁴ PPHMQTHM	S/T – X – (X) – S/T – P
Pax6: QPIPQPTT ³⁷³ PVSSF	S/T – (X) – P – (X) – S/T
HMGA1: KQPPVS ³⁵ PGTALVGSQK	
HMGA1: EPSEVPT ⁵² PK	
HMGA1: KTTTT ⁷⁷ PGR	

Abb.4.9. Ableitung möglicher Konsensusmotive für eine Hipk-vermittelte Substratphosphorylierung. (A) Bekannte, durch Hipk bzw. HIPK2 phosphorylierte Proteinsequenzen (aus: Choi et al., 2005; Dewald, 2008; Kim et al., 2006; Zhang und Wang, 2007). (B) Vorläufige Konsensusmotive für eine Phosphorylierung durch Hipk, abgeleitet aus den unter (A) gezeigten Sequenzen und den phosphorylierten Motiven von Nito.

4.1.3 *in vivo* Analyse der Interaktion zwischen Hipk und Nito

4.1.3.1 Yeast-Two-Hybrid(Y2H)-Analysen

Mit Hilfe der zuvor beschriebenen Kinaseassays konnte Nito als Substrat von Hipk identifiziert und eine Phosphorylierung an sechs Positionen genauer kartiert werden. Da diese Daten jedoch auf *in vitro* Untersuchungen basieren und damit nur begrenzte Rückschlüsse auf eine tatsächliche Interaktion zulassen, sollte die Wechselwirkung zwischen Hipk und Nito in einem nächsten Schritt durch *in vivo* Analysen bestätigt werden. Eine Möglichkeit hierzu bietet das Yeast-Two-Hybrid-System, welches die Analyse einer Protein-Protein-Interaktion im eukaryotischen, also ursprungsnahen, Hintergrund erlaubt und gleichzeitig die zeitlichen und technischen Vorteile der Arbeit mit Hefen mit sich bringt. Abbildung 4.10 verdeutlicht das Funktionsprinzip. Grundlage des Systems ist die Unterteilbarkeit des Hefe-Transkriptionsfaktors Gal4 in eine DNA-Bindedomäne (BD) und eine Aktivierungsdomäne (AD). Zur Untersuchung der Wechselwirkung zweier Proteine wird jeweils eine Domäne mit einem der Interaktionspartner als Fusionsprotein in *S. cerevisiae* zur Expression gebracht. Alleine sollten die einzelnen Fusionsproteine nicht in der Lage sein, als Transkriptionsfaktor zu funktionieren und die Expression eines oder mehrerer nachgeschalteter Reportergene zu aktivieren. Nur im Falle einer Interaktion zwischen den zu untersuchenden Proteinen gelangen die Gal4-Domänen in ausreichende räumliche Nähe um die Funktion des Transkriptionsfaktors wiederherzustellen. So kann schließlich die Interaktion anhand der Reportergenexpression nachgewiesen werden.

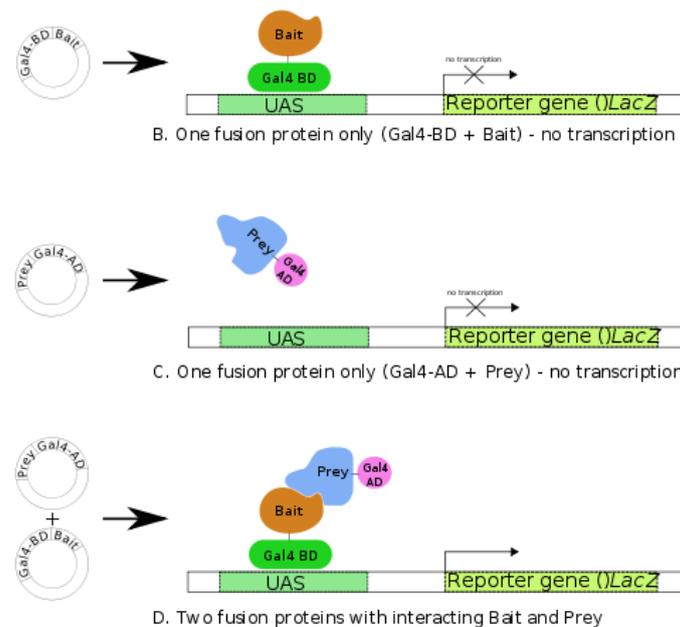


Abb.4.10. Funktionsprinzip der durchgeführten Yeast-Two-Hybrid-Analyse. Bei der Yeast-Two-Hybrid-Analyse wird *in vivo* die Wechselwirkung zweier potentiell interagierender Proteine nachgewiesen. Dazu wird einer der beiden Interaktionspartner als Fusion mit der DNA-Bindedomäne (BD), der zweite Partner als Fusion mit der Aktivierungsdomäne (AD) des Hefe-Transkriptionsfaktors Gal4 in *S. cerevisiae* zur Expression gebracht. Einzeln ist keines der Fusionsproteine in der Lage, die Funktion des Transkriptionsfaktors auszuüben und die Expression eines nachweisbaren Reportergens zu aktivieren. Werden beide Fusionskonstrukte in der gleichen Zelle exprimiert und es kommt zu einer Interaktion der zu untersuchenden Proteine, so gelangen die beiden Gal4-Domänen in eine ausreichende räumliche Nähe, um die Funktion des Transkriptionsfaktors wiederherzustellen und die Reporter-genexpression zu aktivieren (Abbildung verändert nach Wikipedia.org).

Ein Konstrukt zur Expression von Hipk als Gal4-AD-Fusionsprotein (pGADT7-Hipk) in Hefen war bereits in der Arbeitsgruppe vorhanden. Zur Herstellung eines Nito-Gal4-BD-Fusionskonstrukts wurde die kodierende Sequenz von *nito* mit Hilfe der Primer nitoY1 und Xho-nito6 ausgehend vom cDNA-Klon GH11110 unter Verwendung von *Pfu*-Polymerase amplifiziert, in den Vektor pCR[®]2.1 zwischenkloniert und schließlich in den Yeast-Two-Hybrid-Vektor pGBKT7 eingebracht. Abbildung 4.11A zeigt einen Kontrollverdau zum Nachweis der erfolgreichen Klonierung des ~2.4kb großen Inserts. Anschließend wurden beide Konstrukte in verschiedene Stämme von *S. cerevisiae* eingebracht; pGADT7-Hipk wurde in den Stamm Y187 transformiert, pGBKT7-Nito in AH109 (3.2.24). Die verwendeten Hefelinien unterscheiden sich hinsichtlich ihres Paarungstyps (Mating-Typ), d. h. sie können innerhalb eines sogenannten Mating-Ansatzes zu diploiden Zellen mit den kombinierten Eigenschaften der haploiden Einzelstämme fusionieren (3.2.25). Dies erlaubt eine freie Kombination verschiedener Konstrukte und Kontrollen innerhalb der rekombinanten Hefestämme, ohne für jeden Ansatz eine Cotransformation vornehmen zu müssen. Y187

pGADT7-Hipk und AH109 pGBKT7-Nito wurden nun miteinander „verpaart“ und zusammen mit verschiedenen Kontrollansätzen in Colony-lift Filter-Assays auf eine Aktivierung des β -Galaktosidase-Reporters und damit auf eine Interaktion zwischen Hipk und Nito geprüft (3.2.26). Aktive β -Galaktosidase zeigte sich dabei durch eine Farbreaktion der untersuchten Hefe-Kolonien.

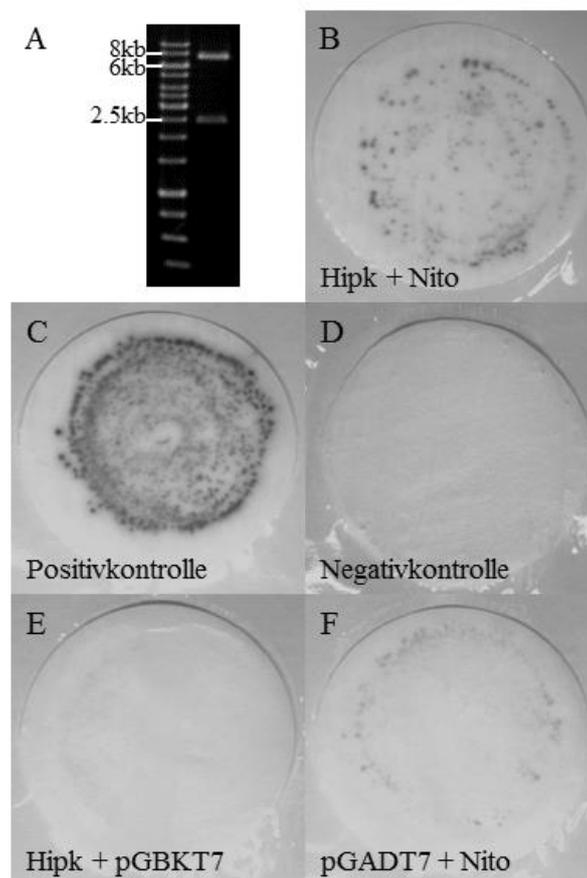


Abb.4.11. Analyse der Interaktion zwischen Hipk und Nito mittels Yeast-Two-Hybrid-Analyse. (A) Kontrollverdau des neu klonierten Y2H-Konstrukts pGBKT7-nito mit *EcoRI*. Die verdaute DNA wurde in einem 1%igen TAE-Agarosegel aufgetrennt, mit Ethidiumbromid angefärbt und über ein INTAS-Geldokumentationssystem detektiert. Marker: GeneRuler™ 1kb DNA ladder (Fermentas). (B-F) Colony-lift Filter-Assays zum Nachweis der lacZ-Expression im Rahmen der Yeast-Two-Hybrid-Analyse. (B) Hipk-AD + Nito-BD. (C) Positivkontrolle: SV40T-Antigen-AD + murines p53-BD. (D) Negativkontrolle: AD + BD ohne potentielle Interaktionsvermittler. (E) Kontrolle auf Eigeneffekt von Hipk: Hipk-AD + BD ohne Interaktionsvermittler. (F) Kontrolle auf Eigeneffekt von Nito: AD ohne Interaktionsvermittler + Nito-BD.

In Abbildung 4.11 sind die Ergebnisse der durchgeführten Colony-lift Filter-Assays dargestellt. Zur Verifizierung der Nachweismethodik wurden eine Kombination aus SV40T-Antigen und murinem p53 als vom Hersteller empfohlene Positivkontrolle (Abb.4.11C) sowie eine Kombination der Leervektoren als Negativkontrolle (Abb.4.11D) mitgeführt

(Matchmaker™ GAL4 Two-Hybrid System 3 and Libraries User Manual, Clontech). Die Coexpression von Hipk-Gal4-AD und Nito-Gal4-BD (Abb.4.11B) zeigte eine deutliche Verfärbung der Kolonien als Nachweis der β -Galaktosidase-Reportergen-Aktivität. Um sicherzustellen bzw. zu überprüfen, dass es sich hierbei tatsächlich um das Resultat einer Interaktion zwischen Hipk und Nito und nicht um Einzeleffekte der jeweiligen Proteine in Kombination mit den Gal4-Fragmenten handelt, wurde jedes Fusionsprotein zusätzlich zusammen mit dem jeweils gegensätzlichen Leervektor, also mit der zugehörigen nicht fusionierten Gal4-Domäne, coexprimiert (Abb. 4.11E,F). Dabei verhielt sich Hipk unauffällig, während Nito jedoch einen klar erkennbaren Eigeneffekt aufwies. Dieser könnte auf einer Bindung von Nito an die freie Aktivierungsdomäne von Gal4 beruhen oder Nito selbst könnte innerhalb des Fusionsproteins als eine Art Aktivierungsdomäne fungieren. Die Farbreaktion bei Kombination von Hipk und Nito erscheint stärker als diejenige für Nito allein, was auf eine verstärkte Reportergenaktivierung in Anwesenheit von Hipk hindeutet. Da der Colony-lift Filter-Assay jedoch keine quantitative Nachweismethode darstellt (Yeast Protocols Handbook, Clontech), liefern die erhaltenen Ergebnisse lediglich einen Hinweis bezüglich einer *in vivo* Interaktion zwischen Hipk und Nito. Ein eindeutiger Beweis ist auf diesem Wege jedoch nicht möglich.

Neben β -Galaktosidase verfügt das Yeast-Two-Hybrid-System über weitere Reportergene, die Zellen mit aktiver Gal4-Funktion die eigenständige Produktion bestimmter essentieller Aminosäuren oder Nukleinsäurebasen erlauben. So kann eine Interaktion auch über das Wachstum diploider Hefeklone auf spezifischen Mangelmedien nachgewiesen werden. Entsprechende Versuche wurden durchgeführt, um nach Möglichkeit den zuvor beschriebenen Eigeneffekt von Nito durch erhöhten Selektionsdruck zu minimieren oder, wenn möglich, ganz zu unterdrücken. Unter allen Bedingungen, die noch das Wachstum von Zellen mit der Hipk-Nito-Kombination erlaubten, war jedoch auch ein Wachstum von Zellen mit der Nito-Leervektor-Kombination detektierbar. Auch in einem anschließend mit diesen Kolonien durchgeführten Colony-lift Filter-Assay wurde der Nito-Effekt reproduziert (nicht gezeigt). Eine Reduktion des Eigeneffekts unter die Nachweisgrenze bei Erhaltung des eigentlichen Interaktionseffekts war also nicht möglich. Zusammenfassend lässt sich damit feststellen, dass die durchgeführten Yeast-Two-Hybrid-Untersuchungen zwar auf eine Interaktion zwischen Hipk und Nito unter *in vivo* Bedingungen hindeuten, der konkrete Nachweis jedoch auf anderem Wege erfolgen muss.

4.1.3.2 Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (BiFC) in *Drosophila melanogaster*

Eine weitere Möglichkeit zum Nachweis der Interaktion zweier Proteine *in vivo* stellt die Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (Bimolekularer Fluoreszenz Complementation, BiFC) dar. Ursprünglich in *E. coli* entwickelt (Ghosh et al., 2000), hat sich die Fluoreszenzkomplementation rasch verbreitet und kommt heute in verschiedensten Zellkulturen, aber auch in gesamtorganismischen Ansätzen zum Einsatz (Kerppola, 2009). Ähnlich dem Yeast-Two-Hybrid-System besteht die funktionale Grundlage auch hier in der Zerteilung eines Proteins und der anschließenden Rekonstitution seiner nachweisbaren Funktion, wobei in diesem Fall kein Transkriptionsfaktor sondern ein fluoreszierendes Protein, wie beispielsweise YFP, verwendet wird (Abb.4.12A,B).

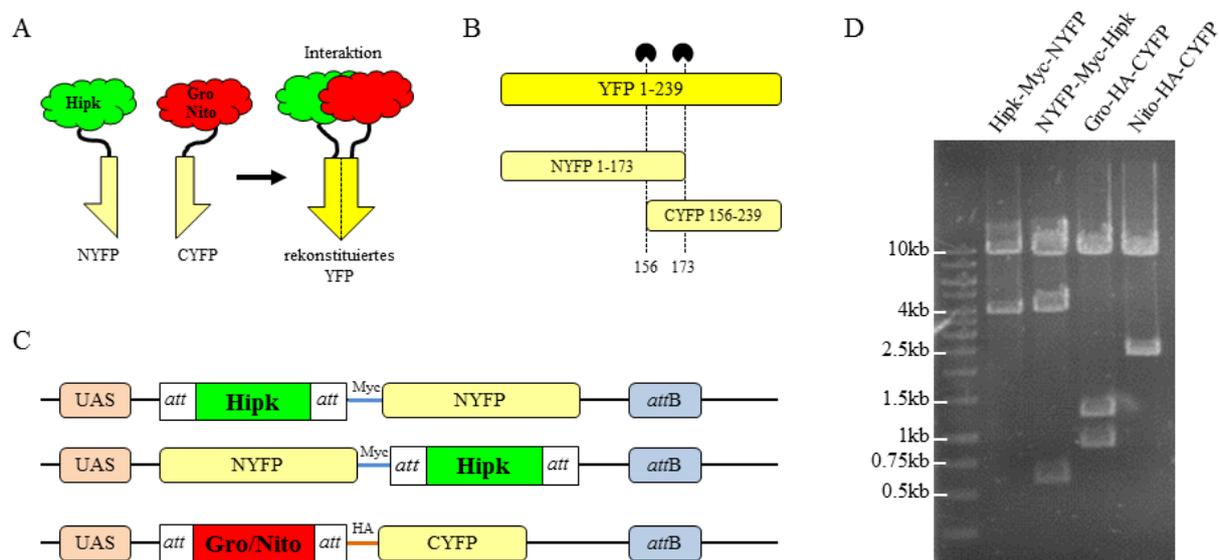


Abb.4.12. Erzeugung von Transformationskonstrukten zur Analyse von Hipk-Interaktionen mittels Bimolekularer Fluoreszenzkomplementation. (A) Funktionsprinzip der Bimolekularen Fluoreszenzkomplementation. Hipk und die potentiellen Interaktionspartner werden als Fusionsproteine mit nicht-fluoreszierenden YFP-Fragmenten exprimiert. Kommt es zur Interaktion, wird das YFP-Protein rekonstituiert und die Fluoreszenz detektierbar. (B) YFP kann in zwei überlappende, nicht fluoreszierende Fragmente geteilt werden: „NYFP“ von Aminosäure 1-173 und „CYFP“ von Aminosäure 156-239 (nach Gohl et al., 2010). (C) Schematische Darstellung des Aufbaus der hergestellten Transformationskonstrukte. Hipk wurde sowohl als N-terminale als auch als C-terminale Fusion mit NYFP konzipiert. Die Interaktionspartner wurden N-terminal an CYFP gekoppelt. Die Klonierungen erfolgten über das Gateway-System, das zwischengeschaltete Myc- bzw. HA-Tag fungiert jeweils als Linker. (D) Kontrollverdau der Transformationskonstrukte mit *EcoRI*. Die verdaute DNA wurde in einem 1%igen TAE-Agarosegel aufgetrennt, mit Ethidiumbromid angefärbt und über ein INTAS-Geldokumentationssystem detektiert. Marker: GeneRuler™ 1kb DNA ladder (Fermentas).

Vor einigen Jahren wurde die Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation auch in *Drosophila* etabliert (Gohl et al., 2010), so dass Interaktionsstudien an *Drosophila*-Proteinen nun direkt im ursprünglichen Hintergrund durchgeführt werden können. Damit erschien diese Methode besonders geeignet um die Interaktion zwischen Hipk und Nito zu untersuchen, da eine Analyse im Herkunftsorganismus störende Kreuzreaktionen der Einzelkomponenten mit dem Wirtssystem (siehe 4.1.3.1) bestmöglich umgehen sollte. Da bisher keine Hipk-spezifische Positivkontrolle für diesen Assay etabliert wurde, wurde das bereits bekannte Hipk-Substrat Groucho (Choi et al., 2005; Steinmetz, 2006) als intrinsische Kontrolle mitgeführt.

Die Untersuchung von Hipk und Nito bzw. Groucho mittels BiFC in *Drosophila* erforderte die Generierung geeigneter transgener Fliegenstämme (3.2.32, 3.2.33). Dazu wurden die vollständigen codierenden Sequenzen der drei Gene mit den in Tabelle 4.4 aufgeführten Primern mittels *Pfu*-Polymerase aus den entsprechenden cDNA-Klonen amplifiziert, in den Gateway-Entry-Vektor pCR[®]8/GW/TOPO[®] zwischenkloniert (3.2.10) und durch Sequenzierung auf ihre Korrektheit überprüft (3.2.17, Tab.7.1). Anschließend wurden die Konstrukte durch Clonase-vermittelte Rekombination in die Transformationsvektoren pUAST-RfB-HA-CYFP-attB, pUAST-RfB-Myc-NYFP-attB und pUAST-NYFP-Myc-RfB-attB (Gohl et al., 2010) übertragen (3.2.11). Für Nito und Groucho wurden Konstrukte generiert, in denen das Zielprotein N-terminal an CYFP (C-terminales Fragment von YFP) fusioniert ist. Da es sich bei Hipk um ein vergleichsweise großes Protein handelt, wurde sowohl eine N-terminale als auch eine C-terminale Fusion an NYFP (N-terminales Fragment von YFP) konzipiert, um damit eventuelle sterische Probleme zu vermeiden, welche in Komplementationsassays vor allem bei großen Proteinen verstärkt auftreten können. Eine schematische Darstellung der klonierten Transformationskonstrukte findet sich in Abbildung 4.12C. Zum Nachweis der erfolgreichen Rekombination wurden die codierenden Sequenzen mittels *Eco*RI-Restriktionsverdau aus den Zielvektoren ausgeschnitten (Abb.4.12D). Die zusätzliche Bande von ~0.6kb bei NYFP-Myc-Hipk resultiert dabei aus einer weiteren *Eco*RI-Schnittstelle in dem für dieses Konstrukt verwendeten Vektor pUAST-NYFP-Myc-RfB-attB. Innerhalb der codierenden Sequenz von *groucho* befindet sich ebenfalls eine *Eco*RI-Schnittstelle, so dass das Insert in zwei Fragmenten aus dem Vektor ausgeschnitten wird.

Tab.4.4. Verwendete Primer zur Klonierung der BiFC-Transformationskonstrukte. Als Template wurden die jeweiligen cDNAs verwendet. Hipk: SD05876, Gro: pBSgro, Nito: GH11110

Konstrukt	Primer1	Primer2
pUAST Hipk-Myc-NYFP attB	DBiFC_hipk1F	DBiFC_hipk2R
pUAST NYFP-Myc-Hipk attB	DBiFC_hipk1F	DBiFC_hipk2R
pUAST Gro-HA-CYFP attB	DBiFC_gro1F	DBiFC_gro2R
pUAST Nito-HA-CYFP attB	DBiFC_nito1F	DBiFC_nito2R

Die hergestellten Transformationskonstrukte pUAST Hipk-Myc-NYFP attB, pUAST NYFP-Myc-Hipk attB, pUAST Gro-HA-CYFP attB und pUAST-Nito-HA-CYFP attB wurden anschließend über PhiC31-vermittelte Keimbahntransformation in Fliegen des Stammes BL24871 eingebracht (3.2.32, 3.2.33). Dieser Stamm erlaubt die gerichtete Integration der Konstrukte in das Fliegen genom über eine „attP-Site“ an der chromosomalen Position 65B2. Dadurch werden Divergenzen in den Positionseffekten, wie sie bei ungerichteter Integration üblich sind, umgangen, so dass alle Konstrukte in vergleichbarer Stärke exprimiert werden. Tabelle 4.5 zeigt eine Statistik über die durchgeführten Injektionen. Für alle Konstrukte konnten mehrere unabhängige Transformanten erzeugt und die Integration in der gewünschten „attP-Site“ mittels PCR bestätigt werden (Tab.7.2).

Tab.4.5. Injektion der BiFC-Transformationskonstrukte in BL24871-Embryonen. Aufgelistet sind die Zahl der injizierten Embryonen, der daraus hervorgehenden Larven und Fliegen, der erhaltenen unabhängigen Transformanten sowie die sich daraus ergebende Transformationseffizienz.

Konstrukt	pUAST Hipk-Myc-NYFP attB	pUAST NYFP-Myc-Hipk attB	pUAST Gro-HA-CYFP attB	pUAST Nito-HA-CYFP attB
Anzahl Embryonen	1018	642	1049	1136
Anzahl Larven	360	149	456	312
% Larven	35.4%	23.2%	43.5%	27.5%
Anzahl Fliegen	258	85	263	190
% Fliegen	25.3%	13.2%	25.1%	16.7%
Anzahl ♂ Fliegen	134	40	124	96
% ♂ Fliegen	13.2%	6.2%	11.8%	8.5%
Unabhängige Transformanten	18	3	4	5
Transformationseffizienz bezgl. Embryonen	1.77%	0.5%	0.4%	0.4%
Transformationseffizienz bezgl. ♂ Fliegen	13.4%	7.5%	3.2%	5.2%

Zur eigentlichen BiFC-Analyse wurden mit Hilfe des UAS-Gal4-Systems die *groucho*- und *nito*-Transgene jeweils zusammen mit einem der *hipk*-Konstrukte im Muster der flügel-spezifischen Treiberlinien *en*-Gal4, *ptc*-Gal4 sowie MS1096-Gal4 ektopisch exprimiert. Der Treiber *en*-Gal4 führt dabei zu einer Expression im posterioren Flügelkompartiment, die *ptc*-Gal4-Expressionsdomäne befindet sich an der anterior-posterioren Kompartimentsgrenze und MS1096-Gal4 aktiviert die Genexpression im weiten Teilen der Flügelscheibe, insbesondere im dorsalen Bereich des späteren Flügels („wing pouch“). Anschließend sollte das im Falle einer Wechselwirkung von Hipk und Gro bzw. Hipk und Nito rekonstituierte YFP in präparierten Flügel-Imaginalscheiben des dritten Larvalstadiums nachgewiesen werden (3.2.36). Eine direkte Detektion des YFP-Signals war aufgrund der geringen Signalstärke nicht möglich, so dass auf eine Antikörperfärbung mit einem anti-GFP-Antikörper zur Erhöhung der Signalintensität zurückgegriffen wurde (3.2.38). Dabei zeigte sich, dass nur die Verwendung der C-terminalen Hipk-Fusion zu einer erfolgreichen Komplementation des YFP-Proteins führte (Abb.4.13), während für die N-terminale Fusion kein wiederhergestelltes YFP nachweisbar war (nicht gezeigt).

Im Zuge der durchgeführten Untersuchung konnte in allen drei Expressionsmustern bei Coexpression von NYFP-Myc-Hipk und Gro-HA-CYFP rekonstituiertes YFP und damit die *in vivo* Interaktion zwischen Hipk und Groucho nachgewiesen werden (Abb.4.13A-C). Groucho stellt damit eine adäquate Positivkontrolle für die BiFC-Analyse von Hipk-Interaktionen dar. Weiterhin lieferte auch die Coexpression von NYFP-Myc-Hipk und Nito-HA-CYFP für alle verwendeten Treiber ein positives Signal (Abb.4.13D-F). Somit konnte nun auch die Interaktion von Hipk und Nito *in vivo* bestätigt werden.

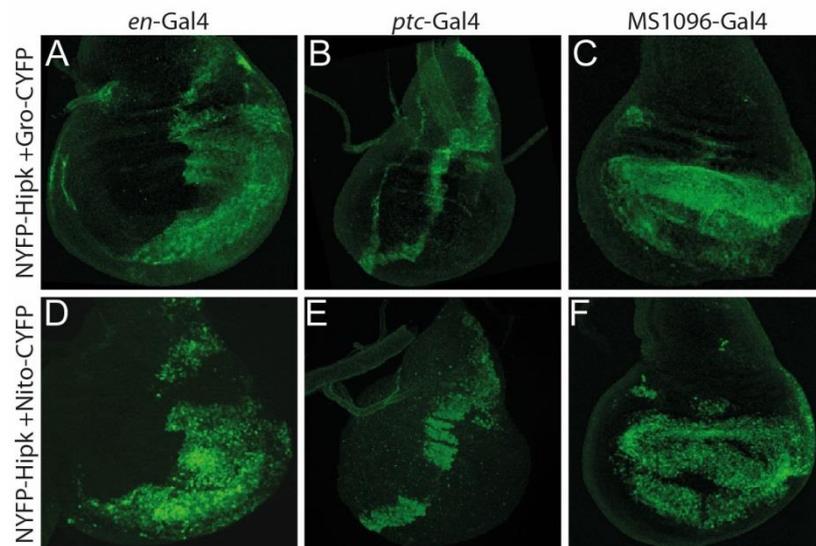


Abb.4.13. Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation zum Nachweis der Interaktion zwischen Hipk und Nito. Dargestellt sind Flügelscheiben des dritten Larvalstadiums, die im Muster der Treiber *en-Gal4* (A,D), *ptc-Gal4* (B,E) bzw. *MS1096-Gal4* (C,F) die BiFC-Konstrukte NYFP-Hipk und Gro-CYFP (A-C) bzw. NYFP-Hipk und Nito-CYFP (D-F) coexprimieren. *en-Gal4* aktiviert die Genexpression im posterioren Flügelkompartiment, *ptc-Gal4* an der anterior-posterioren Kompartimentsgrenze und *MS1096-Gal4* großräumig in weiten Teilen des späteren Flügels. Alle Scheiben sind so orientiert, dass die anteriore Seite nach links gerichtet ist und die Dorsalseite nach oben. Das durch die Fluoreszenzkomplementation wiederhergestellte YFP wurde durch Antikörperfärbung sichtbar gemacht.

Um sicherzugehen, dass positive Signale in der Antikörperfärbung nicht das Resultat einer unspezifischen Anfärbung der einzelnen YFP-Fragmente (NYFP und CYFP) sind, wurden die YFP-Fusionskonstrukte auch einzeln ektopisch exprimiert und analog untersucht. Dabei konnte für keines der Konstrukte eine falsch-positive Färbung detektiert werden (nicht gezeigt). Solche Tests stellen zwar eine technische, jedoch keine funktionale Negativkontrolle im eigentlichen Sinne dar. Diese könnte nur durch analoge Untersuchungen mit mutierten Fusionsproteinen gewährleistet werden, bei denen die Interaktion über gerichtete Aminosäureaustausche in jeweils einem der beiden Proteine verhindert wird (Kodama und Hu, 2012). Da im Falle der hier untersuchten Wechselwirkungen zwischen Hipk und Groucho bzw. Hipk und Nito jedoch noch keine konkreten, spezifisch diese Interaktion vermittelnden Domänen bekannt sind, war der Einsatz einer entsprechenden Kontrolle nicht möglich.

4.1.4 Fehlexpressionsanalysen und RNA-Interferenz-Studien

Nach dem erfolgreichen Nachweis einer Interaktion zwischen Hipk und Nito sollte im weiteren Verlauf der Arbeit die funktionale Relevanz dieser Wechselwirkung untersucht werden. Ein gängiger Ansatz hierfür ist die gewebespezifische Veränderung der Genexpression der Interaktionspartner durch ektope (Über-)Expression oder RNA-Interferenz (RNAi). Das UAS-Gal4-System bietet dabei eine große Auswahl an ansteuerbaren Geweben sowie die Möglichkeit der fast beliebigen Kombination von Fehlexpressions- und RNAi-Konstrukten.

4.1.4.1 Herstellung transgener Fliegen zur ektope Expression von *nito*

Um *nito* über das UAS-Gal4-System ektope exprimieren zu können, musste zunächst eine entsprechende Fliegenlinie erzeugt werden. Dazu wurde die vollständige *nito*-cDNA inklusive der untranslatierten Bereiche aus dem Klon GH11110 in den Transformationsvektor pUAST umkloniert. Aufgrund der verfügbaren Restriktionsschnittstellen musste die Klonierung in zwei Schritten erfolgen. Zuerst wurde ein ~0.8kb großes *EcoRI-XhoI*-Fragment gerichtet in den Zielvektor eingebracht. In einem zweiten Schritt wurden dann die noch fehlenden ~2.3kb der Sequenz über *XhoI* hinter das erste Fragment gesetzt (Abb.4.14A). Da dieser Klonierungsschritt ungerichtet erfolgte, musste die Orientierung des *XhoI*-Fragments mit Hilfe eines spezifischen Richtungsverdau mit *BamHI* und *KpnI* überprüft werden (Abb.4.14B). Bei korrekter Orientierung sind Fragmente von ~0.7kb, ~0.9kb und ~2.6kb zu erwarten, andernfalls ergäben sich Fragmente von ~0.7kb, ~1.4kb und ~2kb. Abbildung 4.14C zeigt die durchgeführten Kontrollverdau zur Verifizierung des hergestellten Konstrukts. Bei einem Verdau mit *EcoRI* und *XhoI* werden die beiden Klonierungsfragmente von ~0.8kb bzw. ~2.3kb ausgeschnitten. Der Orientierungsverdau mit *BamHI* und *KpnI* liefert bei korrektem Einbau des *XhoI*-Fragments die errechneten Bandengrößen von ~0.7kb, ~0.9kb und ~2.6kb. Das fertige Konstrukt wurde zur P-Element-vermittelten Keimbahntransformation durch die Firma BestGene in *yw*-Embryonen injiziert. Die erhaltenen transgenen Fliegen wurden balanciert und zu stabilen Linien amplifiziert. Für die nachfolgenden Kreuzungsanalysen waren damit eine X-chromosomale, 5 zweichromosomale sowie 3 drittchromosomale transgene UAS-*nito*-Linien verfügbar.

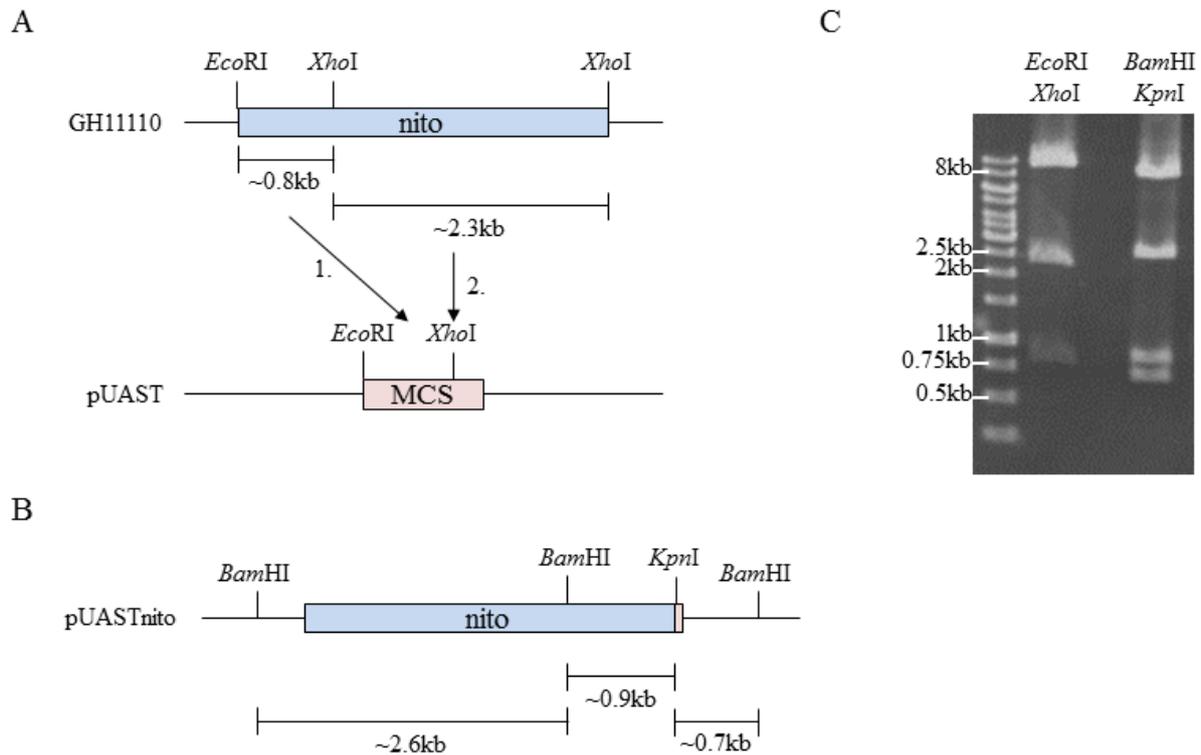


Abb.4.14. Klonierung eines Konstrukts zur Erzeugung einer UAS-*nito*-Linie. (A) Schematische Darstellung der schrittweisen Klonierung der *nito*-cDNA in den Vektor pUAST. Zunächst wurde das ~0.8kb große *EcoRI*-*XhoI*-Fragment einkloniert, anschließend das Konstrukt mit *XhoI* geöffnet und das ~2.3kb große *XhoI*-Fragment eingebracht. (B) Schematische Darstellung der Position verschiedener Schnittstellen mit den Größen der resultierenden Fragmente für einen Orientierungsverdau zur Bestimmung der korrekten Orientierung des ungerichtet einklonierten *XhoI*-Fragments. (C) Kontrollverdau von pUAST-*nito* mit *EcoRI* und *XhoI* zur Bestätigung der einklonierten Fragmente sowie mit *BamHI* und *KpnI* zur Bestimmung der korrekten Orientierung des *XhoI*-Fragments. Die verdauete DNA wurde in einem 1%igen TAE-Agarosegel aufgetrennt, mit Ethidiumbromid angefärbt und über ein INTAS-Geldokumentationssystem detektiert. Marker: GeneRuler™ 1kb DNA ladder (Fermentas).

4.1.4.2 Überexpression von *nito*

Vor der Analyse einer potentiellen funktionalen Beziehung zwischen *hipk* und *nito* wurde der Effekt einer alleinigen Veränderung der Gendosis von *nito* in adulten Fliegen untersucht. Ziel war es dabei einerseits, aus den beobachteten Phänotypen Rückschlüsse auf die Bedeutung von *nito* zu ziehen, aber auch das am besten geeignete Gewebe als Hintergrund für die Untersuchung des Einflusses von *hipk* zu finden. Idealerweise verursacht die veränderte *nito*-Gendosis in einem solchen Gewebe einen Phänotyp mittelstarker Ausprägung, so dass ein gewisser Spielraum für eine Verstärkung oder Abschwächung des Phänotyps bei gleichzeitiger Veränderung der *hipk*-Dosis besteht.

Zunächst wurde *nito* mit Hilfe der neu erzeugten Fliegenstämme im Muster verschiedener Treiber sowohl im Auge als auch im Flügel überexprimiert (Abb.4.15). Dabei war insgesamt eine Tendenz zu stark ausgeprägten Phänotypen zu verzeichnen. So führte die Expression im Muster von *ey-Gal4* zu einer extremen Reduktion der adulten Kopfstrukturen, die mit puppaler Letalität einhergeht (Abb.4.15B). Eine Dokumentation des Phänotyps war erst nach dem Freipräparieren der Fliege aus der Puppenhülle möglich. Der Treiber *ey-Gal4* aktiviert die Zielgenexpression in der gesamten Augenscheibe bereits vor der Ausbildung der morphogenetischen Furche (Hazelett et al., 1998), also zu einem sehr frühen Stadium der Augenentwicklung. Die Verwendung eines augenspezifischen Treibers mit einem räumlich begrenzteren und/oder zeitlich später gelegenen Expressionsmuster erschien daher als geeignete Option, um *nito* in diesem Gewebe ektopisch zu exprimieren ohne dabei derart massive Schäden zu verursachen. Eine Möglichkeit hierfür bot der Treiber *GMR-Gal4*, der erst in Zellen hinter der morphogenetischen Furche aktiv ist (Freeman, 1996). Die Expression über *GMR-Gal4* führte wie erhofft zu einer weniger starken phänotypischen Veränderung als über *ey-Gal4*, da hier trotz geschädigter Augen die Kopfstrukturen weitgehend erhalten blieben. Der Phänotyp selbst unterlag in seiner Ausprägung jedoch einer starken Streuung, so dass die Bandbreite von reduzierten Augen mit schlecht differenzierter Ommatidienstruktur unterschiedlichen Ausmaßes (Abb.4.15C,D) bis hin zu puppaler Letalität mit ebenfalls erkennbar geschädigten Augen reichte.

Ähnlich schwere Phänotypen ergaben sich auch für die ektopische Expression von *nito* im Flügel. Der Treiber *MS1096-Gal4* aktiviert die Zielgenexpression in weiten Bereichen der Flügelscheiben, insbesondere im dorsalen Teil des zukünftigen Flügels sowie in etwas schwächerer Form auch im ventralen Bereich und im dorsalen Flügelgelenk (Capdevilla und Guerrero, 1994; Neumann und Cohen, 1996). Im Fall der Expression über *MS1096-Gal4* war die Lebensfähigkeit der Tiere insgesamt stark beeinträchtigt. Es konnten nur wenige weibliche Tiere beobachtet werden, die eine starke Reduktion der Flügel aufwiesen. Zudem erschienen die Flügel zerknüllt und es war gelegentlich eine Blasenbildung zwischen den Epithelschichten zu erkennen. Männliche Tiere des entsprechenden Genotyps konnten weder als Adulte beobachtet noch aus den Puppen freipräpariert werden. Hier musste es also zu einem Absterben bereits vor dem Puppenstadium kommen. Die Fehlexpression über *en-Gal4* betrifft durch die Beschränkung auf das posteriore Kompartiment einen kleineren Bereich des Flügelgewebes und führte dadurch, wie erhofft, zu einem weniger extremen Phänotyp (Johnson et al., 1995). Hier erschienen die Flügel zerknittert und leicht gebogen, bei gelegentlichen Defekten im Flügelrand und der Venenstruktur. Auffällig ist jedoch, dass sich

der Phänotyp nicht dem Muster des Treibers entsprechend auf das posteriore Kompartiment beschränkte, sondern sich auch auf anteriore Flügelbereiche ausdehnte. Ursache hierfür könnten nicht-zellautonome Effekte sein, wie sie beispielsweise auch bei der *en*-Gal4 getriebenen Expression von *ptc* auftreten (Johnson et al., 1995).



Abb.4.15. Phänotypen bei ektopischer Expression von *nito*. (A) Wildtypisches Fliegenauge. (B) Fehlexpression von *nito* über *ey*-Gal4. Fliegen dieses Genotyps können die Puppenhülle nicht selbständig verlassen und müssen freipräpariert werden. (C,D) Fehlexpression von *nito* über GMR-Gal4. Dargestellt sind verschieden starke Ausprägungen des resultierenden Phänotyps. (E) Wildtypischer Flügel. (F) Fehlexpression von *nito* über MS1096-Gal4. (G) Fehlexpression von *nito* über *en*-Gal4.

4.1.4.3 Reduktion der *nito*-Gendosis durch RNA-Interferenz

Eine weitere Möglichkeit zur Veränderung der Expression eines Gens ist die Reduktion der Gendosis durch RNA-Interferenz. Dabei werden genspezifische, doppelsträngige „hairpin“-RNAs über das UAS-Gal4-System im gewünschten Gewebe exprimiert, wo sie dann einen Abbau der endogenen mRNA des betroffenen Gens auslösen (Duffy, 2002; Paddison et al., 2002; Dietzl et al., 2007). Entsprechende Fliegenstämme sind mittlerweile für eine Vielzahl von Genen erhältlich. Zur Untersuchung von *nito* wurden in dieser Arbeit die RNAi-Linien 20942 (VDRC, P-Element-Linie) und 109436 (VDRC, PhiC31-integrierte Linie) verwendet und mit den bereits unter 4.1.4.2 eingesetzten Treiberstämmen zur Expression gebracht (Abb.4.16).

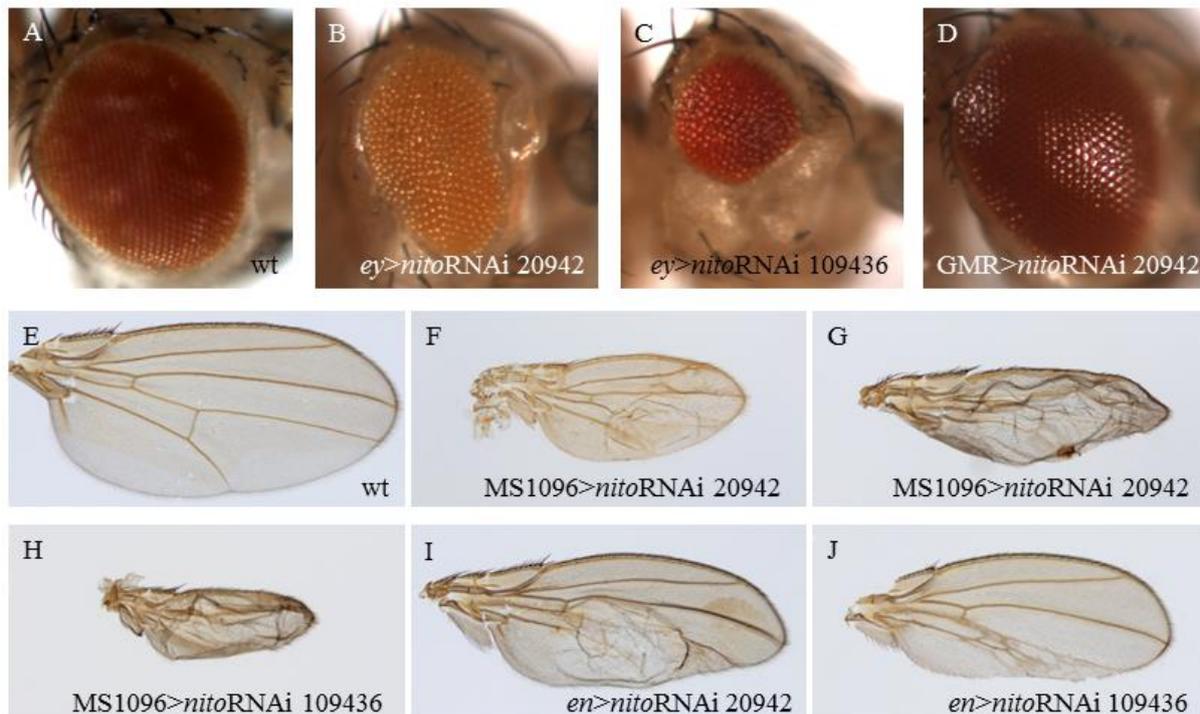


Abb.4.16. Phänotypen bei Reduktion der *nito*-Gendosis durch RNA-Interferenz. (A) Wildtypisches Fliegenauge. (B) Reduktion der Gendosis über *ey*-Gal4 durch die RNAi-Linie 20942. (C) Reduktion der Gendosis über *ey*-Gal4 durch die RNAi-Linie 109436. (D) Reduktion der Gendosis über GMR-Gal4 durch die RNAi-Linie 20942. (E) Wildtypischer Flügel. (F,G) Reduktion der Gendosis über MS1096-Gal4 durch die RNAi-Linie 20942. Dargestellt sind verschieden starke Ausprägungen des resultierenden Phänotyps. (H) Reduktion der Gendosis über MS1096-Gal4 durch die RNAi-Linie 109436. (I) Reduktion der Gendosis über *en*-Gal4 durch die RNAi-Linie 20942. (J) Reduktion der Gendosis über *en*-Gal4 durch die RNAi-Linie 109436.

Die Reduktion der Gendosis von *nito* verursachte in den untersuchten Geweben meist weniger dramatische Phänotypen als die ektopische Expression. Auffällig war hier jedoch, dass die Phänotypen trotz der schwächeren Ausprägung in der grundlegenden Tendenz oft klare Übereinstimmungen zu den für die Fehlexpression beobachteten Phänotypen aufwiesen (4.1.4.2). So führte beispielweise auch die RNA-Interferenz über *ey*-Gal4 zu einer aufgerauten Augenoberfläche und einer Reduktion der Augengröße, wobei diese bei Verwendung des Stamms 109436 deutlich stärker ausfiel, allerdings nur in Ausnahmefällen letal war (Abb.4.16B,C). Die Expression der RNAi-Konstrukte über den später aktiven Treiber GMR-Gal4 verursachte lediglich minimale Veränderungen der Augenform und -struktur (Abb.4.16D). Eine Streuung zwischen den beiden RNAi-Stämmen war in diesem Fall nicht zu beobachten.

Die Reduktion der *nito*-Gendosis im Muster des flügelspezifischen Treibers MS1096 verursachte einen sowohl zwischen als auch innerhalb der RNAi-Linien stark streuenden Phänotyp ähnlich dem der Überexpression (Abb.4.16 F-H). Dabei kam es stets zu einer

Reduktion der Flügelgröße bei gelegentlicher Blasenbildung zwischen den Epithelschichten, Störungen der Venenstruktur und einem mehr oder weniger ausgeprägter, zerknüllten Erscheinungsbild der Flügel. Wie bereits zuvor beschrieben, führte auch hier die Verwendung des Treibers *en-Gal4* zu einem weniger massiven Phänotyp, der im Vergleich mit der Fehlexpression von *nito* im selben Muster jedoch stärker erscheint (Abb.4.16I,J). Neben allgemeinen Störungen der Venenstruktur und Schäden im posterioren Flügelrand zeigten sich in Abhängigkeit vom verwendeten RNAi-Stamm zusätzlich vermehrte Blasenbildung (20942, Abb.4.16I) bzw. gehäuftes Auftreten von zusätzlichem Venenmaterial (109436, Abb.4.16J). Im Gegensatz zur Fehlexpression beschränkte sich die Ausprägung des Phänotyps in diesem Fall auf das tatsächliche Muster des verwendeten Treibers, also auf das posteriore Flügelkompartiment.

4.1.4.4 Einfluss von *hipk* auf *nito*-abhängige Phänotypen

Nach der ersten Dokumentation der *nito*-abhängigen Phänotypen sollte nun der Einfluss von *hipk* auf diese untersucht werden, indem *hipk* wahlweise im gleichen Muster fehlexprimiert oder die Gendosis durch RNAi (Stamm 1084254) reduziert wurde. Angesichts der starken phänotypischen Streuung mit partieller Letalität bei UAS-*nito* und des vernachlässigbaren Phänotyps bei RNA-Interferenz wurde auf eine weitere Analyse im GMR-Muster komplett verzichtet. Untersuchungen im *ey-Gal4*-Muster wurden zwar vorgenommen, lieferten jedoch insbesondere aufgrund der persistierenden Letalität bei entsprechender Fehlexpression von *nito* keine verwertbaren Ergebnisse. Daher wurde der Schwerpunkt der folgenden Analysen auf eine mögliche Interaktion im flügel-spezifischen Hintergrund gelegt. Um die notwendigen Kreuzungen zu vereinfachen und die phänotypische Streuung durch kreuzungsbedingte Varianzen in der genomischen Zusammensetzung der Fliegen zu reduzieren, wurden zunächst Rekombinationen der Effektorstrukturen vorgenommen (3.2.30, Tab.7.3). Die rekombinanten Stämme UAS-*nito*/UAS-*hipk*, UAS-*nito*/*hipk*RNAi108254, *nito*RNAi20942/UAS-*hipk* und *nito*RNAi20942/*hipk*RNAi108254 wurden anschließend mit den Treiberlinien MS1096-Gal4 und *en-Gal4* gekreuzt.

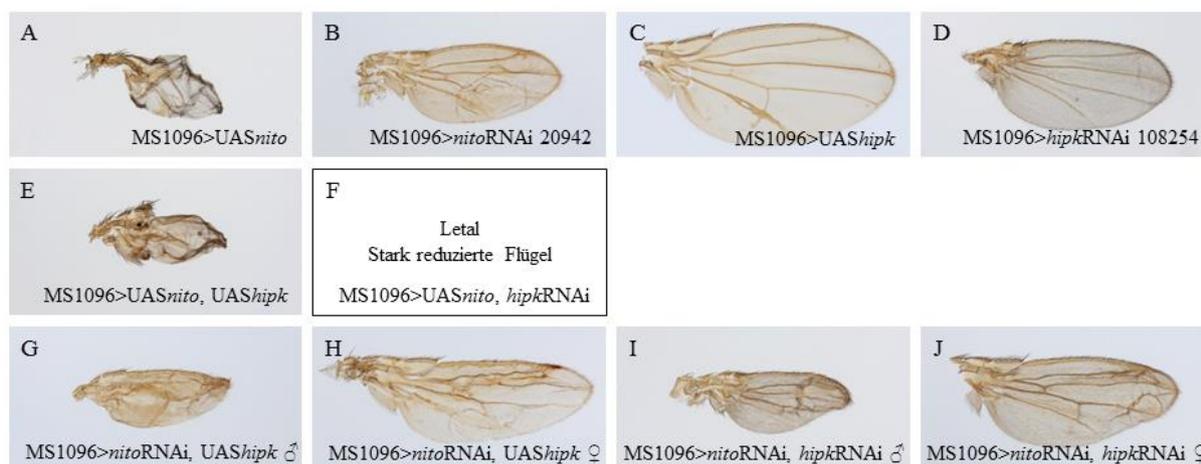


Abb.4.17. Einfluss der Gendosis von *hipk* auf *nito*-abhängige Phänotypen bei Expression der jeweiligen Konstrukte über MS1096-Gal4. (A) Überexpression von *nito*. (B) Reduktion der *nito*-Gendosis durch RNAi. (C) Überexpression von *hipk*. (D) Reduktion der *hipk*-Gendosis durch RNAi. (E) Zeitgleiche Überexpression von *nito* und *hipk* (UAS-*nito*/UAS-*hipk*). (F) Überexpression von *nito* bei Reduktion der *hipk*-Gendosis (UAS-*nito*/*hipk*RNAi108254). (G,H) Reduktion der *nito*-Gendosis bei Überexpression von *hipk* (*nito*RNAi20942/UAS-*hipk*). Männliche (G) und weibliche (H) Tiere zeigen eine unterschiedliche Ausprägung des Phänotyps. (I,J) Zeitgleiche Reduktion der Gendosis von *nito* und *hipk* (*nito*RNAi20942/*hipk*RNAi108254). Männliche (I) und weibliche (J) Tiere zeigen eine unterschiedliche Ausprägung des Phänotyps.

Abbildung 4.17 zeigt eine Zusammenstellung repräsentativer Phänotypen bei Verwendung des MS1096-Gal4-Treibers. In der oberen Reihe (Abb.4.17A-D) sind neben den bereits beschriebenen *nito*-abhängigen Phänotypen auch die vergleichsweise leichten Effekte einer Veränderung der Gendosis von *hipk* dargestellt. Die Fehlexpression von *hipk* führte zu einer rundlicheren Flügelform in Verbindung mit dem Auftreten von ektopischem Venenmaterial, während die RNAi-vermittelte Reduktion der Gendosis eine Reduktion der Flügelgröße sowie das Fehlen der anterioren und posterioren Querven („Crossveins“) zur Folge hatte.

Betrachtet man nun die Phänotypen der rekombinierten Stämme, so zeigt sich im Falle einer Überexpression von *nito* nur ein marginaler Einfluss der *hipk*-Dosis (Abb.4.17.E,F). Die ektopische Expression von *hipk* führt dabei nicht zu einer erkennbaren Veränderung der stark reduzierten Flügel, während die *hipk*-Reduktion die vollständige Letalität der entsprechenden Fliegen zufolge hat – der Effekt scheint hier also verstärkt zu werden. Da die Fehlexpression von *nito* alleine allerdings bereits eine sehr hohe Letalitätsrate bewirkt, ist die Signifikanz dieser Veränderung kritisch zu bewerten. Für die Untersuchung bei reduzierter *nito*-Gendosis ergab sich ein auffälliger Geschlechtsdimorphismus. So zeigten männliche Tiere insgesamt eine wesentlich stärkere Ausprägung der Phänotypen (Abb.4.17G-J). In Kombination mit der starken Streuung der Einzelphänotypen erlaubt es dieser Dimorphismus nicht, eine gesicherte

Aussage über den Einfluss von *hipk* zu treffen, da der *nito*-Effekt in männlichen Tieren eher verstärkt, in weiblichen jedoch eher abgemildert erscheint.

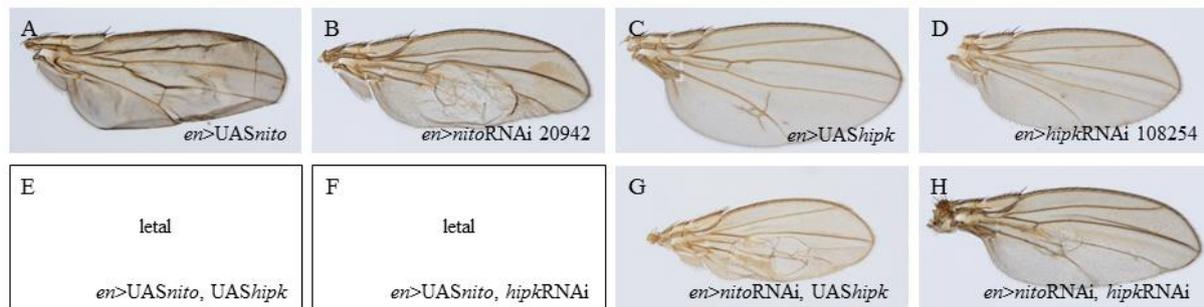


Abb.4.18. Einfluss der Gendosis von *hipk* auf *nito*-abhängige Phänotypen bei Expression der jeweiligen Konstrukte über *en*-Gal4. (A) Überexpression von *nito*. (B) Reduktion der *nito*-Gendosis durch RNAi. (C) Überexpression von *hipk*. (D) Reduktion der *hipk*-Gendosis durch RNAi. (E) Zeitgleiche Überexpression von *nito* und *hipk* (*UAS-nito/UAS-hipk*). (F) Überexpression von *nito* bei Reduktion der *hipk*-Gendosis (*UAS-nito/hipkRNAi108254*). (G) Reduktion der *nito*-Gendosis bei Überexpression von *hipk* (*nitoRNAi20942/UAS-hipk*). (H) Zeitgleiche Reduktion der Gendosis von *nito* und *hipk* (*nitoRNAi20942/hipkRNAi108254*).

Abbildung 4.18 zeigt eine analoge Darstellung der mit dem *en*-Gal4-Treiber durchgeführten Kreuzungsanalyse. Neben den *nito*-spezifischen Einzelphänotypen sind auch hier die alleinigen Effekte einer veränderten *hipk*-Gendosis gezeigt (Abb.4.18A-D). Die Überexpression von *hipk* führte zu einer Verbreiterung des Flügels im posterioren Kompartiment, Unterbrechungen in der posterioren Quervene sowie dem sporadischen Auftreten von ektopischem Venenmaterial. Wurde die Gendosis durch RNAi reduziert, war ein meist vollständiger Verlust beider Querven zu beobachten.

Die nachfolgende Analyse der rekombinanten Stämme lieferte Hinweise auf einen Einfluss von *hipk* auf die *nito*-abhängigen Phänotypen. So führte jede Veränderung in der *hipk*-Gendosis bei Überexpression von *nito* zur Letalität. Da jedoch sowohl Erhöhung als auch Reduktion das gleiche Resultat bewirken, scheint es sich hierbei möglicherweise nicht um einen flügel-spezifischen Effekt, sondern vielmehr um Auswirkungen der *en*-Gal4-vermittelten Expression in früheren Entwicklungsphasen zu handeln. Wurde die Gendosis von *nito* reduziert und *hipk* gleichzeitig überexprimiert, kam es zu einer etwas stärkeren Reduktion der Flügelgröße, der Phänotyp erschien also leicht verstärkt. *hipk*-RNAi hingegen führte zu einer etwas abgeschwächten Blasenbildung, schien also den Phänotyp dem Normalzustand anzunähern. Da es sich hierbei nur um geringfügige Veränderungen handelte und eine gewisse Streuung vorlag, konnte auch in diesem Fall keine eindeutige Hypothese zur funktionalen Beziehung von *hipk* und *nito* aufgestellt werden.

4.1.5 *in vivo* Analyse von *nito*-Phosphomutanten

Um weitere Hinweise auf die funktionale Relevanz einer Hipk-abhängigen Phosphorylierung von Nito zu erhalten, sollten transgene Fliegen zur ektopischen Expression von *nito*-Konstrukten erzeugt werden, in denen wahlweise N-terminale oder C-terminale Phosphorylierungsstellen bzw. Phosphorylierungsstellen an beiden Termini von Nito durch Mutagenese ausgeschaltet sind. Der Ansatz erfolgte parallel zur *in vitro* Kartierung der Substratregionen, so dass lediglich die zum entsprechenden Zeitpunkt bekannten Phosphorylierungsstellen berücksichtigt wurden. Die Konstrukte sollten durch PhiC31-vermittelte Keimbahntransformation gerichtet an der gleichen Stelle ins Fliegen-genom integriert und dadurch eine vergleichbare Expressionsstärke gewährleistet werden. Als Referenz wurde ein wildtypisches *nito*-Konstrukt mitgeführt.

4.1.5.1 Erzeugung transgener Linien zur Expression von *nito*-Phosphomutanten

Die Herstellung der Transformationskonstrukte zur Expression von *nito*-Phosphomutanten erfolgte in mehreren Schritten. Zunächst wurden mit Hilfe der in Tabelle 4.6 aufgelisteten Primer verschiedene mutante PCR-Fragmente generiert und sukzessive via SOE-PCR miteinander verknüpft (Abb.4.19, 3.2.16.2). Auf diese Weise entstanden die Fragmente L (N-terminal mutiert) und I (C-terminal mutiert).

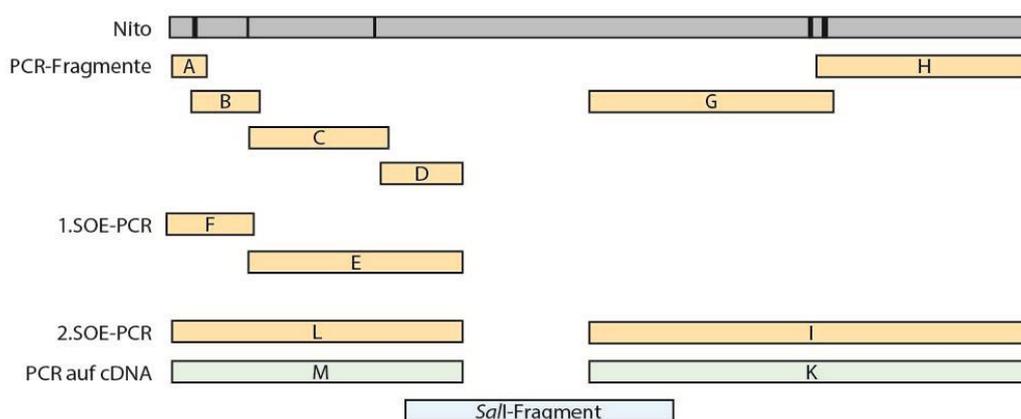


Abb.4.19. Schematische Darstellung der Generierung verschiedener Konstrukte zur Erzeugung von *nito*-Phosphomutanten. Gezeigt ist die Größe und Position der erzeugten Fragmente (farbig) in Relation zur *nito*-cDNA (grau). Mutante PCR-Produkte sind orange eingefärbt, wildtypische PCR-Produkte sowie das für alle Konstrukte als Mittelstück verwendete *SaII*-Fragment sind blau dargestellt. Schwarze Balken markieren die mutierten Sequenzabschnitte. Hergestellt wurden Konstrukte mit den Kombinationen der terminalen Fragmente M+K, M+I, L+K und L+I.

Die wildtypischen Fragmente M (N-terminaler Bereich) und K (C-terminaler Bereich) wurden jeweils in einer einzelnen PCR amplifiziert (Abb.4.19, Tab.4.6). Anschließend wurden die Fragmente in den Vektor pCR[®]2.1 zwischenkloniert und ihre Sequenz geprüft (3.2.17). Die in späteren Bezeichnungen auftretenden Nummern entsprechen der Kennziffer des jeweils verwendeten Klons.

Tab.4.6. Verwendete Primer zur Herstellung verschiedener *nito*-Phosphomutanten. Die als Template verwendete DNA ist für jedes Konstrukt gesondert angegeben.

Konstrukt	Primer1	Primer2	Template
A	Eco-nito10	A1aMut1R	GH11110 (<i>nito</i> cDNA)
B	A1aMut1F	A2_2Mut1R	GH11110 (<i>nito</i> cDNA)
C	A2_2Mut1F	A2_2Mut2R	GH11110 (<i>nito</i> cDNA)
D	A2_2Mut2F	nito2	GH11110 (<i>nito</i> cDNA)
E	A2_2Mut1F	nito2	Konstrukte C + D
F	Eco-nito10	A2_2Mut1R	Konstrukte A + B
M (N-Terminus wt)	Eco-nito10	nito2	GH11110 (<i>nito</i> cDNA)
L (N-Terminus mutiert)	Eco-nito10	nito2	Konstrukte E + F
G	nito9	C2_1Mut1R	GH11110 (<i>nito</i> cDNA)
H	C2_2Mut1F-B	Kpn-nito11	GH11110 (<i>nito</i> cDNA)
K (C-Terminus wt)	nito9	Kpn-nito11	GH11110 (<i>nito</i> cDNA)
I (C-Terminus mutiert)	nito9	Kpn-nito11	Konstrukte G,H

Die Kombination der hergestellten Elemente erfolgte durch Umklonieren von jeweils einem N-terminalen und einem C-terminalen Fragment in den Vektor pBS. Dazu wurden die N-terminalen Fragmente mit *EcoRI* und *SalI*, die C-terminalen mit *SalI* und *KpnI* aus dem Ausgangsvektor ausgeschnitten und beide gemeinsam in den über *EcoRI* und *KpnI* geöffneten Zielvektor eingebracht. Zur Ergänzung des noch fehlenden Mittelstücks wurden die Konstrukte über *SalI* geöffnet und mit einem *SalI*-Fragment aus dem *nito*-cDNA Klon GH11110 komplettiert (Abb.4.19). Nach der Verifizierung der Orientierung des *SalI*-Inserts wurden die Konstrukte über *EcoRI* und *KpnI* in den finalen Zielvektor pUASTattB eingebracht. Abbildung 4.20 zeigt einen Kontrollverdau der ~2.4kb großen *nito*-Konstrukte im Transformationsvektor. Hergestellt wurden folgende vier Transformationskonstrukte: M12K3 (N wildtypisch, C wildtypisch), M12I6 (N wildtypisch, C mutant), L5K3 (N mutant, C wildtypisch) und L5I6 (N mutant, C mutant).

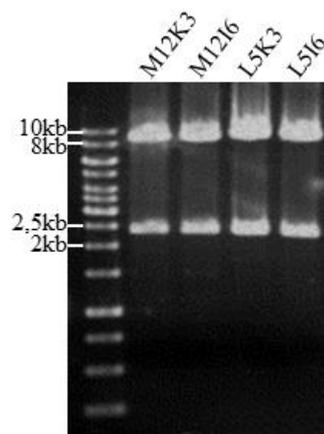


Abb.4.20. Kontrollverdau der Transformationskonstrukte zur Erzeugung von *nito*-Phosphomutanten.

Zum Nachweis der Integration der *nito*-Sequenzen in den Vektor pUASTattB wurde die DNA der Konstrukte M12K3, M12I6, L5K3 sowie L5I6 mit *EcoRI* und *KpnI* verdaut, anschließend in einem 1%igen TAE-Agarosegel aufgetrennt, mit Ethidiumbromid angefärbt und über ein INTAS-Geldokumentationssystem detektiert. Marker: GeneRuler™ 1kb DNA ladder (Fermentas).

Die fertigen Konstrukte wurden durch Injektion in Embryonen des Stammes BL24871 über PhiC31-vermittelte Keimbahntransformation in eine „*attP*-Site“ in der chromosomalen Region 65B2 integriert (3.2.32, 3.2.33). Tabelle 4.7 zeigt die Statistik der durchgeführten Injektionen. Für alle Konstrukte konnte mindestens eine Transformante erzeugt und die Integration in der gewünschten „*attP*-Site“ mittels PCR bestätigt werden (Tab.7.2).

Tab.4.7. Injektion der Konstrukte zur ektopischen Expression von *nito*-Phosphomutanten in BL24871-Embryonen. Aufgelistet sind die Zahl der injizierten Embryonen, der daraus hervorgehenden Larven und Fliegen, der erhaltenen unabhängigen Transformanten sowie die sich daraus ergebende Transformationseffizienz.

Konstrukt	pUASTattB nitoM12K3	pUASTattB nitoM12I6	pUASTattB nitoL5K3	pUASTattB nitoL5I6
Anzahl Embryonen	878	1234	864	621
Anzahl Larven	303	266	266	191
% Larven	34.5%	21.6%	30.8%	30.8%
Anzahl Fliegen	206	150	176	138
% Fliegen	23.5%	12%	20.4%	22.2%
Anzahl ♂ Fliegen	87	69	96	71
% ♂ Fliegen	10%	5.6%	11.1%	11.4%
Unabhängige Transformanten	2	1	1	14
Transformationseffizienz bezgl. Embryonen	0.2%	0.08%	0.12%	2.2%
Transformationseffizienz bezgl. ♂ Fliegen	2.3%	1.4%	1%	19.7%

4.1.5.2 Ektopische Expression der *nito*-Phosphomutanten

Über das UAS-Gal4-System wurden die vier *nito*-Varianten im Muster verschiedener Treiber exprimiert und hinsichtlich ihres adulten Phänotyps bewertet. Eine Übersicht über die Ergebnisse ist in Tabelle 4.8 dargestellt. Insgesamt erwies sich die ektopische Expression der Konstrukte in fast allen Fällen unabhängig vom erreichbaren Phosphorylierungszustand als letal, so dass mit Hilfe der entsprechenden Treiberlinien keine sinnvolle Aussage zur Bedeutung der Hipk-vermittelten Phosphorylierung von Nito getroffen werden konnte. Lediglich die Expression über *bs*-Gal4 und GMR-Gal4 führte überhaupt zu einer signifikanten Anzahl lebensfähiger adulter Fliegen. Für *bs*-Gal4 konnten jedoch keine eindeutigen phänotypischen Unterschiede zwischen den Konstrukten festgestellt werden. Im Fall von GMR-Gal4 allerdings zeigten die überlebenden Fliegen zwar einen ähnlichen Phänotyp, es war jedoch ein deutlicher Gradient in der generellen Überlebensrate zu beobachten. So führte die Fehlexpression von wildtypischem *nito* zum höchsten Anteil puppaler Letalität, während die Überlebensfähigkeit durch die verschiedenen Mutanten partiell gerettet werden konnte. Die Letalitätseinstufung der Konstrukte lässt sich wie folgt darstellen: Wildtyp (80-90%) > N-terminale Mutante (50-60%) > C-terminale Mutante (30%) > N- und C-terminale Mutante (10-20%). Das Ausschalten der C-terminalen Phosphorylierungsstellen führte dabei zu einer stärkeren Rettung als das der N-terminalen und der größte Effekt wurde durch die

Kombination der mutanten Termini bewirkt. Eine vollständige Rettung der Lebensfähigkeit konnte jedoch nicht erreicht werden. Ursache hierfür könnte einerseits die inkomplette Abdeckung aller Phosphorylierungsstellen sein, andererseits könnte die GMR-abhängige Überexpression von Nito auch im dephosphorylierten Zustand immer noch Einfluss auf die Augenentwicklung und damit die Lebensfähigkeit der Fliegen haben. In Anbetracht dieser Daten scheint die Phosphorylierung durch Hipk direkten Einfluss auf die Funktion von Nito zu nehmen. Unglücklicherweise war es aufgrund der verbreiteten Letalität nicht möglich, diese Schlussfolgerung mit Hilfe der anderen untersuchten Treiber zu verifizieren.

Tab.4.8. Ergebnisse der ektopischen Expression der *nito*-Phosphomutanten. Aufgelistet sind die phänotypischen Beobachtungen bei ektopischer Expression der erzeugten Konstrukte im Muster verschiedener Treiber.

Treiber	nitoM12K3 (wildtyp. <i>nito</i>)	nitoM12I6 (C-term. Mutante)	nitoL5K3 (N-term. Mutante)	nitoL5I6 (C- u. N-term. Mut.)
MS1096-Gal4	pupal letal, reduzierte Flügel	Fliegen sterben direkt nach Schlupf, reduzierte Flügel	pupal letal, reduzierte Flügel	pupal letal, reduzierte Flügel
<i>en</i> -Gal4	letal	letal	letal	letal
<i>ey</i> -Gal4	pupal letal, z.T. kopflös, z.T. einzelnes Auge	pupal letal, z.T. kopflös	pupal letal, z.T. kopflös oder reduzierter Kopf	pupal letal, z.T. kopflös oder reduzierte Augen
<i>ptc</i> -Gal4	letal	letal	letal	letal
GMR-Gal4	Fliegen sterben direkt nach Schlupf, ~80-90% pupal letal	reduzierte Augen, „rough eye“, Pigmentverlust, ~30% pupal letal	reduzierte Augen, „rough eye“, Pigmentverlust, ~50-60% pupal letal	reduzierte Augen, „rough eye“, Pigmentverlust, ~10-20% pupal letal
<i>cut</i> -Gal4	letal in L2	letal in L2	letal in L2	letal in L2
<i>bs</i> -Gal4	Einzelne mit leicht angekrümpelten Flügeln, z.T. pupal letal	Einzelne mit leicht angekrümpelten Flügeln	einzelne mit leichter Blisterbildung im Flügel	Einzelne mit leicht angekrümpelten Flügeln
71B-Gal4	pupal letal	pupal letal	pupal letal	pupal letal

4.2 Weiterführende Analyse des SPOC-Proteins Nito

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit existierten nur zwei Veröffentlichungen, die sich näher mit Nito befassten (Jemc und Rebay, 2006; Chang et al., 2008), so dass insgesamt wenig über dieses Protein und seine Funktion bekannt war. Ein Ziel dieser Arbeit war daher eine weiterführende Charakterisierung von Nito. Dazu sollte unter anderem ein Antikörper gegen Nito hergestellt und das embryonale und larvale Expressionsmuster genauer bestimmt werden. Da zu diesem Zeitpunkt keine mutante Fliegenlinie verfügbar war, sollte zur weiteren funktionalen Analyse mittels „Ends-Out Gene-Targeting“ eine Nullmutante für *nito* erzeugt werden.

4.2.1 Untersuchung der Expression von Nito auf Proteinebene

4.2.1.1 Herstellung eines Antikörpers gegen Nito

Um die Expression von Nito auch auf Proteinebene untersuchen und gegebenenfalls Colokalisationsstudien anstellen zu können, sollte im Rahmen dieser Arbeit ein entsprechender Antikörper hergestellt und für erste Analysen eingesetzt werden. Als Antigen wurde ein C-terminales Fragment mit einer Länge von 263 Aminosäuren ausgewählt, welches bereits in den Phosphorylierungsstudien Verwendung fand („nitoC“, 4.1.2.1). Das Protein wurde in großem Maßstab aufgereinigt (3.2.20) und zur Antikörperproduktion in Kaninchen injiziert (Arbeitsgruppe Jung, Medizinische Biochemie und Molekularbiologie, Universität des Saarlandes). Der Aufbau der Immunantwort erfolgte dabei kontinuierlich durch Antigeninjektionen im Zwei-Wochen-Rhythmus. Zur Überwachung der Antikörperproduktion wurden jeweils eine Woche nach der Injektion Serumproben entnommen (Arbeitsgruppe Jung, Medizinische Biochemie und Molekularbiologie, Universität des Saarlandes) und zur Antikörperfärbung von wildtypischen Embryonen eingesetzt (3.2.37). Bereits die zweite Serumprobe zeigte dabei erste Anzeichen einer ubiquitären Färbung mit Signalverstärkung im ventralen Nervensystem, wie sie aus der *in situ* Hybridisierung bekannt war (Abb.4.1B). Ab der vierten Probe erschien das Signal stabil mit geringem Hintergrund und konnte in einer Verdünnung von 1:100 bis 1:150 bereits für erste Färbungen eingesetzt werden. Zur Erhöhung der Antikörperkonzentration im Serum wurde die Produktion für weitere zwei Zyklen fortgesetzt und das Tier anschließend terminal entblutet. Alle Seren ab Probe fünf sind in einer Verdünnung von mindestens 1:200 bis 1:250 einzusetzen.

Als Ergänzung zu den erkennbaren Übereinstimmungen der Antikörperfärbung mit den Daten aus *in situ* Hybridisierungen sollte die Spezifität des neu hergestellten Antikörpers zusätzlich

verifiziert werden. Dazu wurde durch Expression der RNAi-Linie 20942 im Muster des Treibers *ptc*-Gal4 die Expression von Nito in einem dorsoventralen Streifen entlang der anterior-posterioren Kompartimentsgrenze innerhalb der Flügelimaginalscheiben spezifisch reduziert und das verbleibende Protein mit Hilfe des neuen Antikörpers angefärbt (3.2.38). Das Ergebnis ist in Abbildung 4.21 dargestellt. Innerhalb der ubiquitär gefärbten Flügelscheibe (vgl. auch Abb.4.1G) ist ein dorsoventral verlaufender Streifen mit deutlicher Signalreduktion zu erkennen, der dem Bereich der RNAi-Expression und damit der verringerten Proteinmenge entspricht. Der in dieser Arbeit hergestellte Antikörper ist also in der Lage, Nito spezifisch zu markieren.

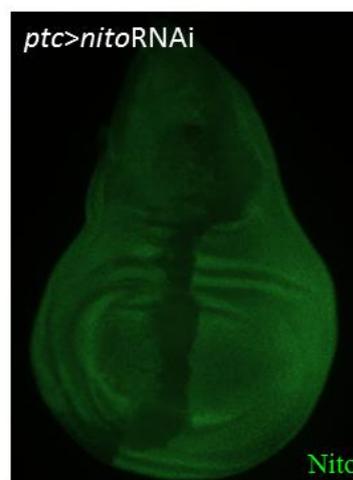


Abb.4.21. Verifizierung der Spezifität des hergestellten anti-Nito-Antikörpers. Dargestellt ist eine Flügelscheibe des dritten Larvalstadiums in der Orientierung anterior nach links, Dorsalseite nach oben. Die Gendosis von *nito* wurde im Muster von *ptc*-Gal4 reduziert und das verbleibende Nito mit dem neu hergestellten Antikörper angefärbt.

4.2.1.2 Die Expression von Nito auf Proteinebene

Mit Hilfe des neu hergestellten Antikörpers sollte nun das Expressionsmuster von Nito auf Proteinebene sichtbar gemacht werden. Dazu wurden zunächst wildtypische Embryonen einer entsprechenden Antikörperfärbung unterzogen (3.2.37) und durch Konfokalmikroskopie dokumentiert. Abbildung 4.22 zeigt repräsentative Aufnahmen verschiedener Embryonalstadien. Die Zuordnung der Stadien erfolgte hier sowie in allen weiteren Abbildungen nach Campos-Ortega und Hartenstein (1997). Eine ubiquitär erscheinende Expression von Nito ist bereits in frühen Stadien der Embryonalentwicklung nachweisbar (Abb.4.22A,B) und persistiert im weiteren Entwicklungsverlauf (Abb.4.22C-D). In späteren Stadien ist zusätzlich eine Anreicherung von Nito im kondensierten Nervensystem sowohl im ventralen Nervenstrang als auch im Gehirn zu erkennen (Abb.4.22E,F).

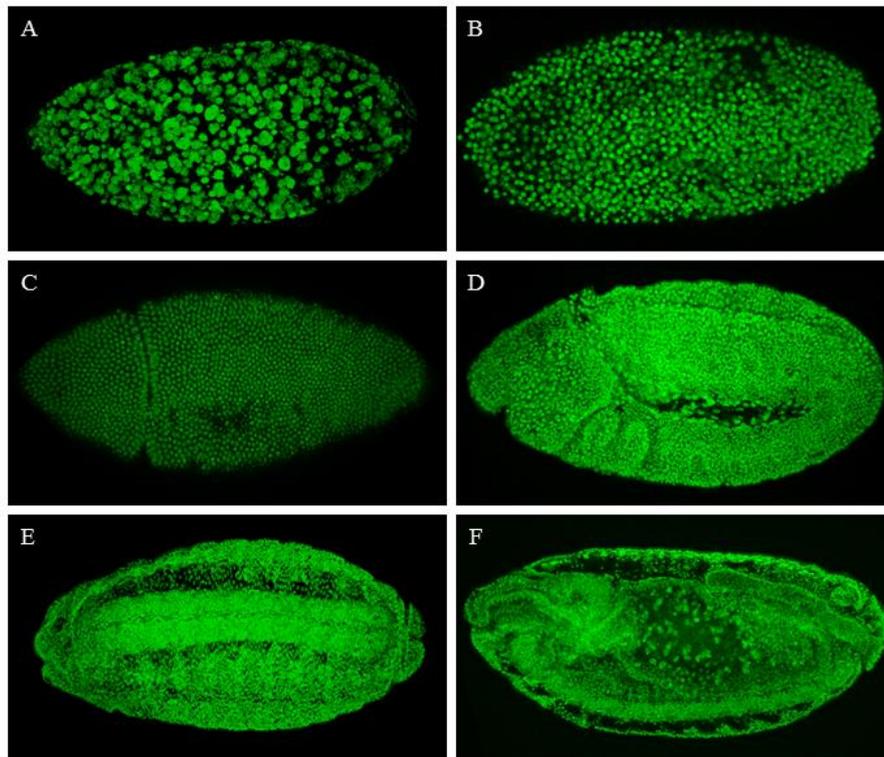


Abb.4.22. Das embryonale Expressionsmuster von Nito. Dargestellt sind konfokale Aufnahmen von anti-Nito-Antikörperfärbungen an Wildtyp-Embryonen. Alle Embryonen sind so orientiert, dass der anteriore Pol nach links zeigt. In den Lateralansichten ist die Dorsalseite nach oben orientiert. (A) Stadium 2, Lateralansicht. (B) Stadium 3-4, Lateralansicht. (C) Stadium 6-7, ventrolaterale Ansicht. (D) Stadium 8-9, Lateralansicht. (E) Stadium 15-16, Ventralansicht. (F) Stadium 15-16, Lateralansicht.

Neben der embryonalen sollte auch die larvale Expression von Nito dokumentiert werden. Daher wurden entsprechende Antikörperfärbungen auch an verschiedenen Geweben des dritten Larvalstadiums durchgeführt (3.2.38). Abbildung 4.23 zeigt exemplarische Darstellungen der untersuchten Gewebe. Dabei konnte sowohl im Gehirn als auch in Augen-Antennen und Flügelscheiben eine ubiquitär erscheinende Expression von Nito nachgewiesen werden. Im Vergleich mit den Ergebnissen der *in situ* Hybridisierung zeigten die erhaltenen Daten im Fall der Imaginalscheiben (Abb.4.1G,H und Abb.4.23B,C) eine relativ gute Übereinstimmung, wiesen jedoch für die Expression im larvalen Gehirn erkennbare Abweichungen auf. So ergab sich für Nito auf Proteinebene eine ähnlich ausgeprägte Expression sowohl in den Gehirnhemisphären als auch im Ventralganglion (Abb.4.23A), während auf Transkriptebene eine deutlich stärkere Expression in den Hemisphären zu verzeichnen war (Abb.4.1.D). Ursache hierfür kann neben gewebespezifischen Unterschieden in der Translationsrate oder im Proteinumsatz auch ein optischer Effekt basierend auf Unterschieden in der Gewebedichte zwischen Hemisphären und Ventralganglion in Kombination mit der Farbstoffanreicherung bei der *in situ* Hybridisierung sein.

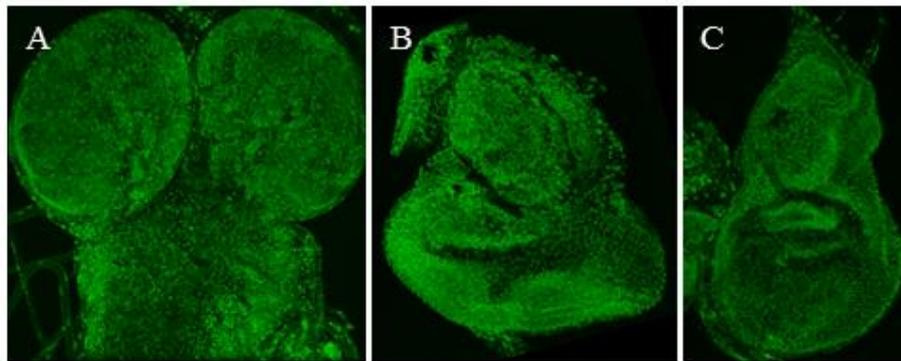


Abb.4.23. Die larvale Expression von Nito. Konfokale Aufnahmen von anti-Nito-Antikörperfärbungen an verschiedenen wildtypischen Geweben des dritten Larvalstadiums. (A) Larvales Gehirn. (B) Augen-Antennenscheibe. (C) Flügelscheibe; Orientierung anterior nach links, Dorsalseite nach oben.

Neben der zeitlichen und räumlichen Expression eines Proteins innerhalb des Organismus oder einzelner Gewebe ist auch seine subzelluläre Lokalisation von großem Interesse, da sie in direkter Verbindung zu funktionalen Eigenschaften stehen kann. So können beispielsweise zwei Proteine nur dann direkt interagieren, wenn sie sich im gleichen Zellkompartiment befinden. Nito konnte über Zellkultur-Analysen bereits als überwiegend nukleär exprimiert beschrieben werden, was durch seine Beteiligung am Spliceosom-Komplex unterstützt wird (Chang et al., 2008, Herold et al., 2009). Mit Hilfe des neu hergestellten anti-Nito-Antikörpers sollte die Kernlokalisierung von Nito nun auch durch Antikörperfärbungen direkt am *Drosophila*-Embryo gezeigt werden (Abb.4.24). Dazu wurden wildtypische Embryonen einer Doppelfärbung mit dem anti-Nito-Antikörper und einem anti-Neurotactin(Nrt)-Antikörper unterzogen (3.2.37). Neurotactin ist ein Transmembran-Glykoprotein, das vom zellulären Blastodermstadium bis zum Beginn der Neurogenese in einem breiten Muster in allen Zelltypen exprimiert wird und daher in frühen Embryonalstadien als membranspezifischer Marker verwendet werden kann (Piovant und Lena, 1988; Hortsch et al., 1990). In einer nachfolgenden DAPI-Färbung wurde die DNA angefärbt, um zusätzlich die einzelnen Zellkerne darzustellen (3.2.41). Wie erwartet zeigte sich eine weitgehende Übereinstimmung der Signale für Nito mit denen der Kernfärbung (Abb.4.24A,B,D,F). Das Zytoplasma, erkennbar als Bereich zwischen Nrt-Signal und Kernfärbung, erschien weitgehend frei von Nito (Abb.4.24A,C,E,F).

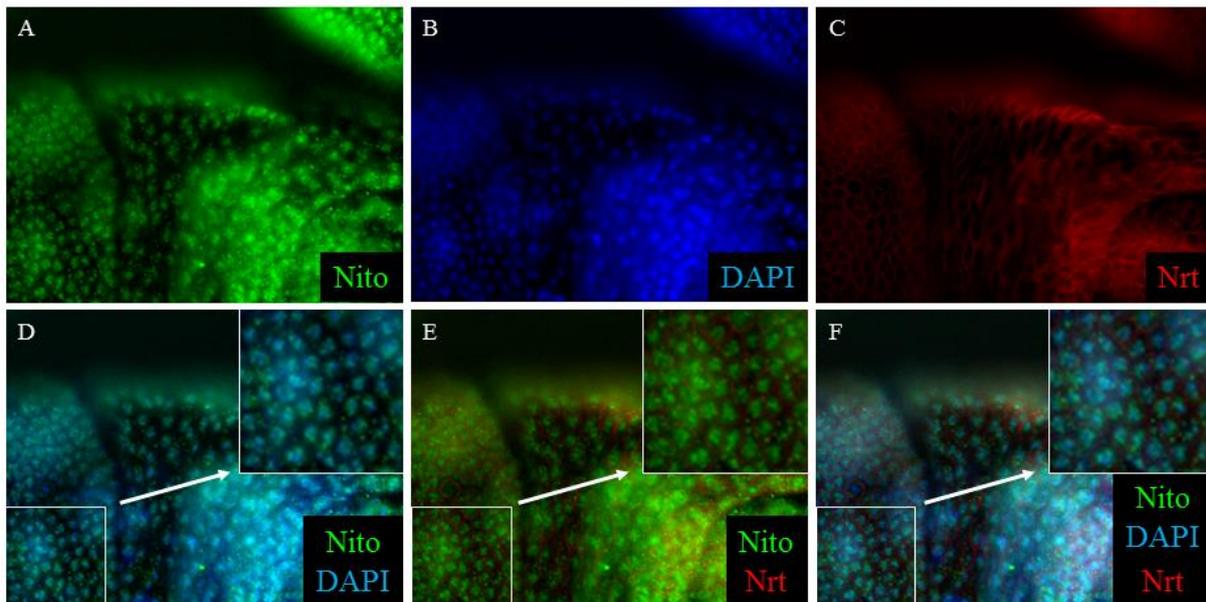


Abb.4.24. Die intrazelluläre Lokalisation von Nito. Dargestellt sind Ausschnitte fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen von Antikörperfärbungen an Wildtyp-Embryonen mit anti-Nito- und anti-Neurotactin(Nrt)-Antikörpern sowie einer Kernfärbung mit DAPI. (A-C) Einzelaufnahmen der jeweiligen Färbungen. (D) Überlagerung der anti-Nito-Färbung mit der DAPI-Färbung. (E) Überlagerung der anti-Nito- und anti-Nrt-Färbung. (F) Überlagerung aller drei Färbungen. (D-F) Dargestellt sind der ursprüngliche Bildausschnitt sowie eine Vergrößerung des jeweils markierten Bereichs.

4.2.1.3 Colokalisations-Analysen

Da für Nito eine Anreicherung im zentralen Nervensystem beobachtet werden konnte, sollte im weiteren Verlauf genauer untersucht werden, ob Nito in Neuronen, Gliazellen oder beiden Zellgruppen exprimiert wird. Zu diesem Zweck wurden Doppelfärbungen mit für die jeweiligen Zelltypen spezifischen Markern durchgeführt. Neurone können durch Anfärben des RNA-bindenden Proteins Elav („Embryonic lethal abnormal vision“) sichtbar gemacht werden, welches in neuronalen Zellen aller Entwicklungsstadien exprimiert wird (Robinow und White, 1988; Robinow und White, 1991). Als Marker für Gliazellen diente das spezifisch in diesem Zelltyp exprimierte Homeodomänprotein Repo („Reversed polarity“) (Xiong et al., 1994).

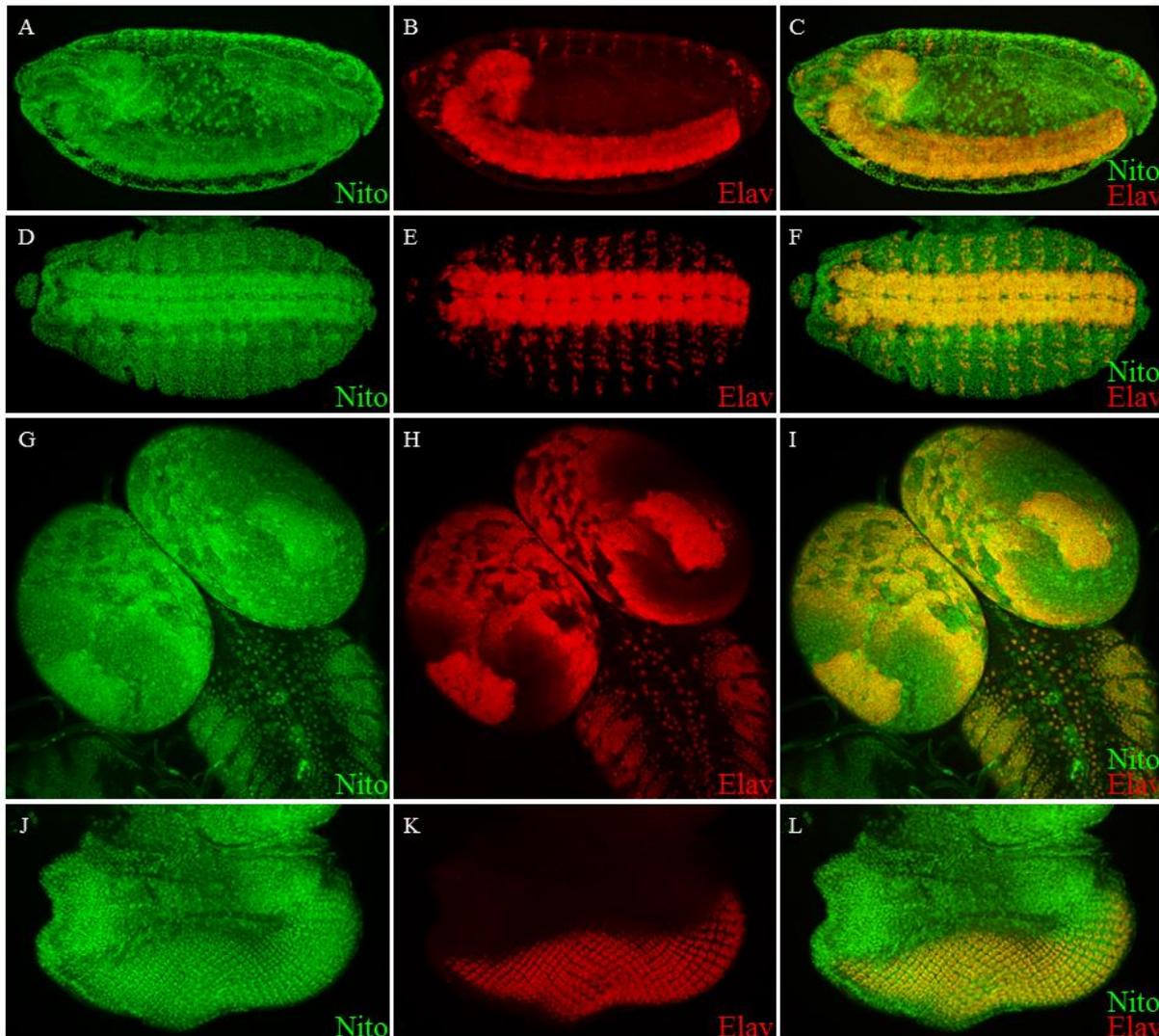


Abb.4.25. Colokalisationsstudien mit dem neuronalen Marker Elav. Konfokale Aufnahmen von Doppel-Antikörperfärbungen an wildtypischen Embryonen und larvalen Geweben. Die erste Spalte (A,D,G,J) zeigt die Färbung mit dem anti-Nito-Antikörper, die zweite Spalte (B,E,H,K) die Färbung mit einem anti-Elav-Antikörper und in der dritten Spalte (C,F,I,L) ist die Überlagerung der Signale dargestellt. (A-C) Embryo Stadium 15, laterale Ansicht, anterior nach links, Dorsalseite nach oben. (D-F) Embryo Stadium 14, ventrale Ansicht, anterior nach links. (G-I) Larvales Gehirn, drittes Larvalstadium. (J-L) Augen-Imaginalscheibe, drittes Larvalstadium.

Abbildung 4.25 zeigt die Ergebnisse der durchgeführten Untersuchungen hinsichtlich einer neuronalen Expression von Nito. Im Embryo ergab sich eine weitreichende Colokalisation mit Elav im ventralen Nervensystem und Gehirn sowie in weiten Teilen des peripheren Nervensystems (Abb.4.25A-F). Auch im larvalen Gehirn war eine großräumige Übereinstimmung der Expressionsmuster in den Hemisphären, aber auch im Ventralganglion nachweisbar. Zusätzlich wurde die Expression in den ausdifferenzierten Photorezeptor-Neuronen der Augen-Imaginalscheibe untersucht, wo ebenfalls eine ausgeprägte Colokalisation beobachtet werden konnte. Zusammengefasst zeigen die beschriebenen

Daten, dass Nito sowohl im Embryo als auch in der Larve in vielen, eventuell sogar in allen, Neuronen exprimiert wird.

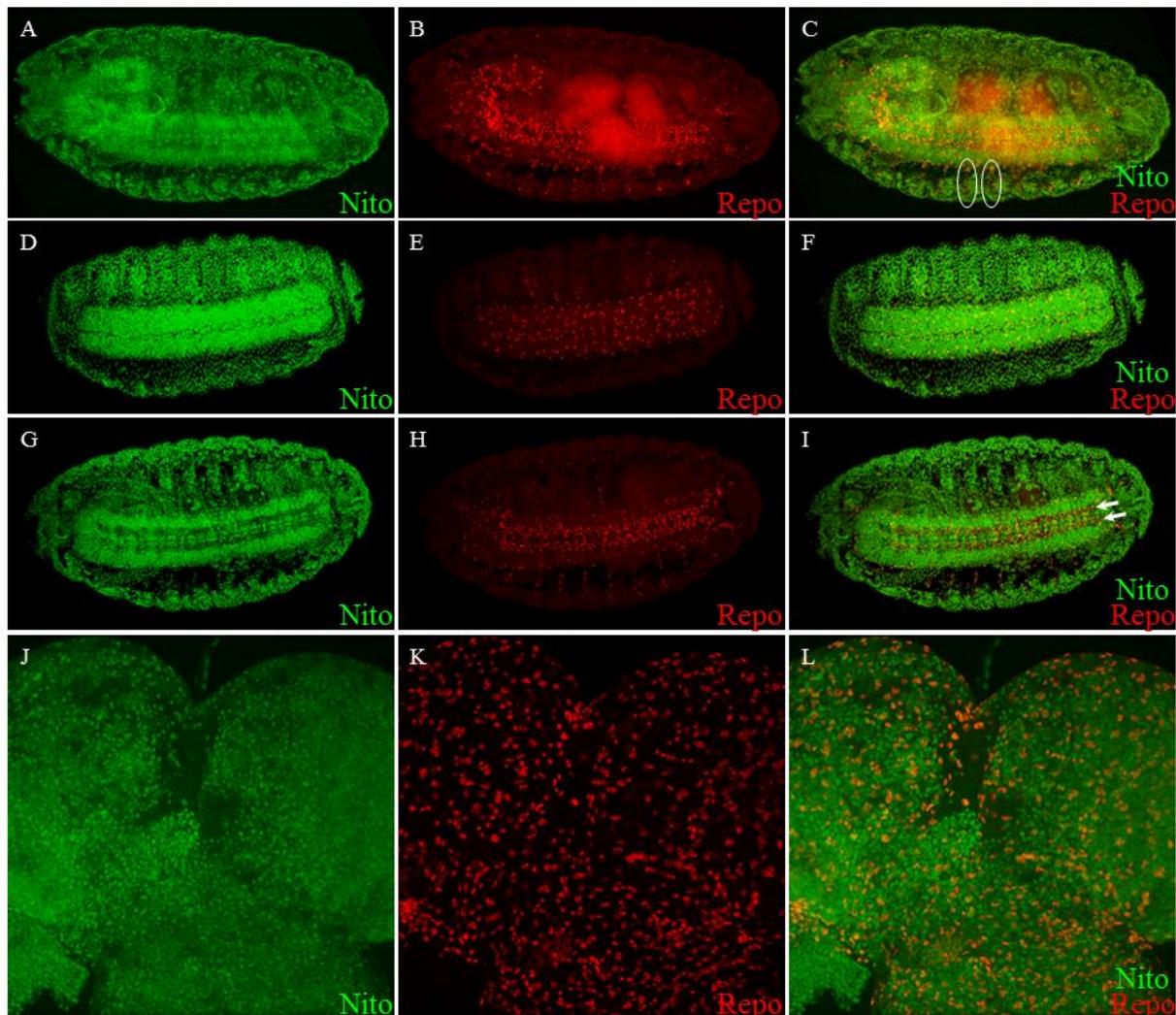


Abb.4.26. Colokalisationsstudien mit dem Glia-Zellmarker Repo. Konfokale Aufnahmen von Doppel-Antikörperfärbungen an wildtypischen Embryonen und larvalen Gehirnen. Die erste Spalte (A,D,G,J) zeigt die Färbung mit dem anti-Nito-Antikörper, die zweite Spalte (B,E,H,K) die Färbung mit einem anti-Repo-Antikörper und in der dritten Spalte (C,F,I,L) ist die Überlagerung der Signale dargestellt. (A-C) Embryo Stadium 16-17, laterale Ansicht, anterior nach links, Dorsalseite nach oben. Die Markierungen kennzeichnen exemplarisch Repo-positive, Nito-negative Bereiche. (D-I) Embryo Stadium 16, ventrale Ansicht, anterior nach links. (D-F) und (G-I) entsprechen unterschiedlichen Schärfeebenen innerhalb des gleichen Embryos zur Fokussierung verschiedener Repo-positiver Zellpopulationen. Die Pfeile markieren die auffälligsten Bereiche fehlender Colokalisation. (J-L) Larvales Gehirn, drittes Larvalstadium.

In Abbildung 4.26 sind die Ergebnisse der Doppelfärbungen zur Untersuchung der Expression von Nito in Gliazellen dargestellt. Für die embryonale Colokalisation von Nito und Repo kann jedoch keine pauschale Aussage getroffen werden, da in einigen Repo-positiven Zellen

auch Nito exprimiert wird, in vielen anderen jedoch nicht (Abb.4.26A-I). Einzelne Bereiche peripherer Glia ohne signifikante Expression von Nito sind in Abbildung 4.26C exemplarisch markiert. Pfeile in Abbildung 4.26I kennzeichnen die auffälligsten Domänen Nito-negativer Glia im ventralen Nervensystem. Betrachtet man hingegen die beiden Expressionsmuster im larvalen Gehirn, so ist hier eine weitaus größere Übereinstimmung zu verzeichnen (Abb.4.26J-L). Zusammen ergeben diese Daten das Bild eines zunächst eher seltenen Vorkommens von Nito in embryonalen Gliazellen, welches im weiteren Verlauf der Entwicklung an Häufigkeit zunimmt, bis Nito in einer Vielzahl von Gliazellen im larvalen Gehirn nachweisbar ist.

4.2.2 Erzeugung einer *nito*-Mutante durch „Ends-Out Gene Targeting“

Da zum Zeitpunkt der Durchführung der vorliegenden Arbeit keine Nullmutante für *nito* verfügbar war, sollte zur weiteren funktionalen Analyse ein solches Allel mittels „Ends-Out Gene Targeting“ erzeugt werden (Rong und Golic, 2000; Rong und Golic, 2001; Gong und Golic 2004). Dazu wurden zunächst über P-Element-vermittelte Keimbahntransformation transgene Fliegen hergestellt, die ein spezielles Targeting-Konstrukt ungerichtet im Genom tragen (4.2.2.1). Dieses wurde anschließend mobilisiert (4.2.2.2) und bewirkte durch homologe Rekombination die vollständige Entfernung der ersten drei Exons von *nito* im Austausch gegen ein nachweisbares Markergen.

4.2.2.1 Klonierung und Injektion des pW25*nito*HomA*HomB* Targeting-Konstrukts

Vor der Herstellung eines *nito*-spezifischen Targeting-Konstrukts wurde der zu entfernende genomische Bereich festgelegt, in diesem Fall der 5'-Bereich des Gens mit den ersten drei Exons inklusive Translationsstart (Abb.4.27, rot markiert). Jeweils 5' und 3' von diesem Bereich wurden sogenannte Homologiearme für die spätere Rekombination definiert und über PCR mit den in Abbildung 4.27 dargestellten Primern amplifiziert (3.2.16). Die Amplifikate wurden in den Vektor pCR[®] XL-TOPO[®] zwischenkloniert (3.2.8) und auf eine korrekte Sequenz überprüft (3.2.17). Anschließend erfolgte die serielle Klonierung in die beiden Polylinker-Regionen des spezifischen Targeting-Vektors pW25 (Abb.4.27). Die Reihenfolge der Klonierung wurde dabei in Abhängigkeit von internen Restriktionsschnittstellen innerhalb der Homologiearme gewählt.

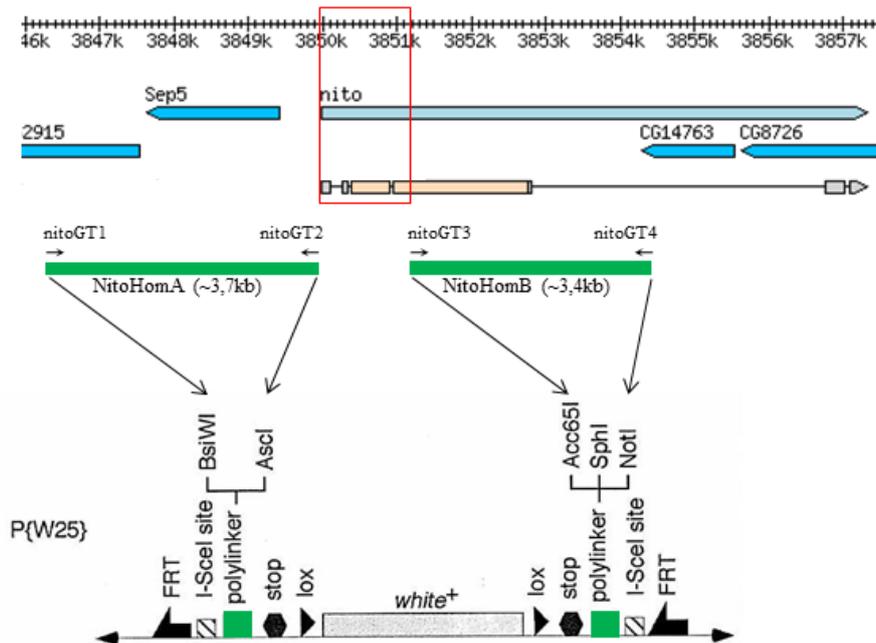


Abb.4.27. Schematische Darstellung zum Aufbau des *nito*-Targeting-Konstrukts. Gezeigt ist die betroffene genomische Region (verändert nach flybase.org) mit der Exon-Intron-Struktur von *nito* (grau: untranslatiert, orange: translatiert) sowie der Position der klonierten Homologiearme NitoHomA und NitoHomB. Der zu entfernende Bereich ist rot markiert. Im unteren Bildbereich ist zusätzlich der Aufbau des Targeting-Vektors pW25 dargestellt, in den die Homologiearme seriell inkloniert wurden.

Das fertige Konstrukt wurde durch Injektion in *yw*-Embryonen über P-Element-vermittelte Keimbahntransformation ungerichtet in das Fliegen-genom integriert (3.2.31, 3.2.33). Tabelle 4.9 zeigt die zugehörige Statistik. Es konnten vier unabhängige Transformanten („Donorlinien“) erzeugt werden, von denen zwei das Targeting-Konstrukt auf dem X-Chromosom und jeweils eine auf dem zweiten bzw. dritten Chromosom tragen.

Tab.4.9. Injektion des Konstrukts pW25nitoHomAHomB in *yw*-Embryonen. Aufgelistet sind die Zahl der injizierten Embryonen, der daraus hervorgehenden Larven und Fliegen, der erhaltenen unabhängigen Transformanten sowie die sich daraus ergebende Transformationseffizienz.

Konstrukt	pW25nitoHomAHomB
Anzahl Embryonen	1109
Anzahl Larven	354
% Larven	31.9%
Anzahl Fliegen	188
% Fliegen	17%
Unabhängige Transformanten	4
Transformationseffizienz bezgl. Embryonen	0.4%
Transformationseffizienz bezgl. Fliegen	3%

4.2.2.2 Mobilisierung des Targeting-Konstrukts

Nachdem das *nito*-Targeting-Konstrukt erfolgreich in das Fliegen-genom eingebracht wurde, musste es nun für das eigentliche Targeting-Ereignis mobilisiert werden (3.2.34). Ermöglicht wird dies durch die spezifischen Eigenschaften des Vektors pW25, der speziell für diese Form des Gene Targeting entwickelt wurde. Eine schematische Darstellung des Vektors findet sich in Abbildung 4.27. Neben den primären Komponenten eines P-Elements mit dem selektierbaren Marker *white*⁺ verfügt der Vektor über FRT-Sequenzen, die den eigentlichen Konstrukt-Komplex flankieren und durch Einkreuzen der Flp-Rekombinase eine Mobilisierung des Konstrukts in Form eines extrachromosomalen Rings vermitteln. In dieser Form ist jedoch keine Rekombination möglich, das Konstrukt muss zunächst linearisiert werden. Dies geschieht über zwei vektorspezifische I-*Sce*I-Restriktionsschnittstellen, die im *Drosophila*-Genom ansonsten nicht vorkommen. Das Restriktionsenzym I-*Sce*I wird zusammen mit der Flp-Rekombinase eingekreuzt, so dass Mobilisierung und Linearisierung in direkter Folge ablaufen können. Eine Mobilisierung des Donorkonstrukts ist dabei am Verlust der durch den *white*⁺-Marker bedingten Augenfarbe zu erkennen. In der Keimbahn erfolgt anschließend die homologe Rekombination zwischen den Homologiearmen und der genomischen DNA, infolge dessen der gewünschte genomische Bereich durch das Markergen ersetzt wird. Eine Re-Integration des Konstrukts ist daher in der nachfolgenden Generation an der Rekonstitution der roten Augenfarbe sichtbar. Sollte dies für weitere Untersuchungen notwendig sein, kann die Augenfarbe der resultierenden Fliegenstämme wieder in den mutanten Zustand (*white*⁻) zurückgesetzt werden, da der *white*⁺-Marker im verwendeten Vektor von loxP-Sequenzen flankiert wird, so dass das Gen durch Einkreuzen einer Cre-Rekombinase entfernt werden kann.

Zur Durchführung der Targeting-Kreuzungen wurden die X-chromosomalen Donorlinien 10.32 und 17.93.1 verwendet (3.2.34). In beiden Fällen konnte das Donorkonstrukt mit hoher Effizienz mobilisiert werden. Die anschließenden Kreuzungen der F1-Fliegen ergaben für Stamm 10.32 vier rotäugige Fliegen aus 89 Einzelkreuzungen und für Stamm 17.93.1 fünf rotäugige Fliegen aus 66 Einzelkreuzungen. Bei erfolgreicher Rekombination am *nito*-Locus sollte das Targeting-Konstrukt nun durch Balancierung auf dem zweiten Chromosom nachweisbar sein. Dies war jedoch nur bei zwei der 10.32-basierten Linien möglich, in allen anderen Fliegen musste die Re-Integration auf einem anderen Chromosom stattgefunden haben. Da durch die Balancierung nur die chromosomale Lokalisation, aber nicht die korrekte intrachromosomale Position des Konstrukts ermittelt werden konnte, sollte dies durch einen molekularen Nachweis erfolgen.

4.2.2.3 Verifizierung der homologen Rekombination

Bisher wurde für zwei Fliegen nach der Mobilisierung des Targeting-Konstrukts eine Re-Integration auf dem Zielchromosom nachgewiesen. Ob es sich dabei tatsächlich um eine homologe Rekombination am *nito*-Locus handelte, sollte nun mittels PCR auf die genomische DNA der entsprechenden Fliegen überprüft werden (3.2.15, 3.2.16).

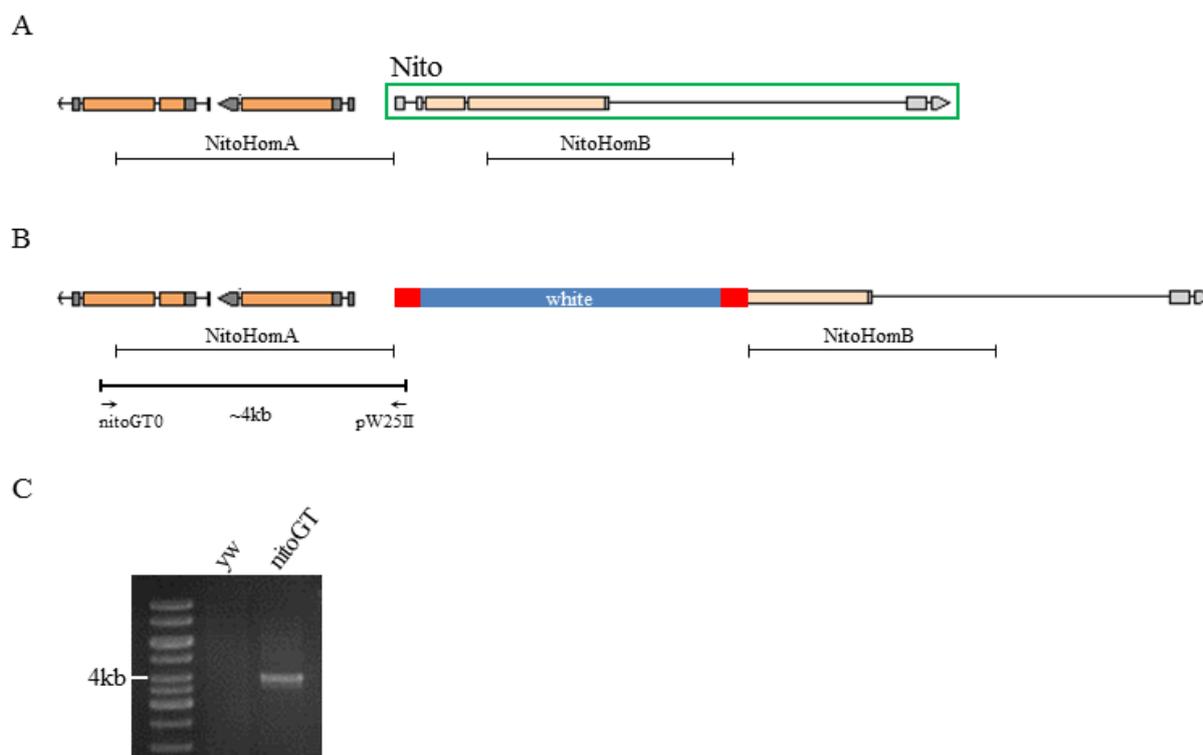


Abb.4.28. Schema und Nachweis der homologen Rekombination. (A) Darstellung der Position der klonierten Homologiearme in Relation zur Exon-Intron-Struktur von *nito* sowie 5' gelegener Genbereiche. (B) Struktureller Aufbau der Genregion nach dem Targeting-Ereignis. Der 5'-Bereich von *nito* wurde durch das Reporter-gen *white* (blau) und angrenzende *loxP*-Sequenzen (rot) ersetzt. Der Nachweis der homologen Rekombination erfolgte durch eine PCR mit einem vektorspezifischen Primer (*pW25II*) und einem Primer 5' des Homologiearms *HomA* (*nitoGT0*) auf die genomische DNA des Fliegenstamms *nito*^{GT}. Als Negativkontrolle wurde genomische DNA von *yw*-Fliegen verwendet. (C) Jeweils 5µl der PCR-Produkte wurden in einem 1%igen TAE-Agarosegel aufgetrennt; anschließend wurde die DNA mit Ethidiumbromid angefärbt und über ein INTAS-Geldokumentationssystem detektiert. Marker: GeneRuler™ 1kb DNA ladder (Fermentas).

Abbildung 4.28 zeigt den strukturellen Aufbau von *nito* vor (A) und nach (B) dem Targeting-Ereignis. Für die PCR wurden ein genomischer Primer (*nitoGT0*) 5' des Homologiearms *NitoHomA* und ein vektorspezifischer Primer (*pW25II*) innerhalb der 5' gelegenen *loxP*-Sequenz ausgewählt (Abb.4.28B). Damit konnte nur bei korrekter Rekombination ein spezifisches Amplifikat erzeugt werden. Als Kontrolle wurde dieselbe PCR auf genomische DNA von *yw*-Fliegen durchgeführt, die das Targeting-Konstrukt nicht enthalten und daher

auch kein entsprechendes PCR-Produkt liefern sollten. Für die beiden untersuchten Fliegenlinien konnte lediglich in einem Fall (Linie 10.32.42) eine erfolgreiche Rekombination am *nito*-Locus bestätigt werden. Diese Linie trägt damit eine Nullmutation von *nito* und wird im weiteren Verlauf als „*nito*^{GT}“ bezeichnet. Abbildung 4.28C zeigt den Nachweis des ~4kb großen Amplifikats für *nito*^{GT}, während die *yw*-Kontrolle wie erwartet negativ ausfiel.

4.2.2.4 Letalitätsanalyse des Stamms *nito*^{GT}

Nachdem mittels Gene-Targeting eine Nullmutante für *nito* erzeugt werden konnte, sollte diese nun hinsichtlich ihrer Eigenschaften untersucht werden. Ein wichtiger Aspekt hierbei war die Prüfung auf eine mögliche Letalität des Allels und gegebenenfalls die Feststellung des Letalitätszeitpunkts. Zu diesem Zweck wurden 200 Embryonen des Stamms *nito*^{GT} separiert und die daraus hervorgehenden Larven, Puppen und Fliegen gezählt und daraus die Letalitätsraten zu den jeweiligen Entwicklungszeitpunkten berechnet (Tab.4.10). Bei der Bewertung der Daten ist zu beachten, dass der Stamm *nito*^{GT} über einem Balancer gehalten wird. Daher tragen 25% der Nachkommen homozygot das Balancer-Allel, was aufgrund der spezifischen Eigenschaften des Balancers mit embryonaler Letalität einhergeht. In weiteren 50% der Tiere liegt das *nito*^{GT}-Allel heterozygot über dem Balancer vor, so dass lediglich die verbleibenden 25% homozygot für *nito*^{GT} sind. Bei Letalität der Mutante wäre also eine Gesamt-Letalität von etwa 50% zu erwarten.

Tab.4.10. Letalitätsanalyse des Stamms *nito*^{GT}. Ausgehend von 200 Embryonen wurden die resultierenden Larven, Puppen und Fliegen ausgezählt und die prozentuale Letalitätsrate zu den verschiedenen Entwicklungszeitpunkten bestimmt.

Stamm	<i>nito</i> ^{GT}
Anzahl Embryonen	200
Anzahl Larven	136
Anteil Larven	68%
Embryonale Letalität	32%
Anzahl Puppen	73
Anteil Puppen	36.5%
Larvale Letalität	31.5%
Anzahl Fliegen	71
Anteil Fliegen	35.5%
Puppale Letalität	1%
Gesamt-Letalität	64.5%

Betrachtet man nun die Ergebnisse der Analyse (Tab.4.10), so ergab sich eine embryonale Letalität von 32%, d.h. die Letalitätsrate war gegenüber der reinen Balancer-vermittelten Letalität bereits erhöht. Weiterhin waren 31.5% larvale und 1% puppale Letalität zu beobachten, wobei letztere im Rahmen der natürlichen Streuung liegt und zu vernachlässigen ist. Der Letalitätszeitpunkt konnte hier nicht exakt bestimmt werden, da es sowohl zu embryonaler als auch zu larvaler Letalität kam, wobei das Absterben im Larvalstadium den größeren Anteil ausmachte. Insgesamt legen die ermittelten Daten den Schluss nahe, dass homozygot mutante Tiere vor allem im späten Embryonal- und frühen Larvalstadium bzw. dem Übergang zwischen beiden Phasen absterben. Die Gesamt-Letalität des untersuchten Stamms lag mit 64.5% deutlich über der zu erwartenden Letalitätsrate von ~50% bei einer homozygot letalen Mutation, es scheint also eine partielle Haploinsuffizienz vorzuliegen. Eine morphologische Ursache der Letalität konnte im Rahmen bisher durchgeführter Untersuchungen nicht festgestellt werden (nicht gezeigt).

4.2.3 MARCM-Analysen

Da die Mutante *nito*^{GT} bereits zu einem frühen Entwicklungszeitpunkt einer hohen Letalitätsrate unterliegt, ist es nicht möglich, mutante Tiere in späteren Entwicklungsstadien phänotypisch zu untersuchen. Eine Möglichkeit, die Auswirkungen der Mutation dennoch zu analysieren, bot die Erzeugung markierter, mutanter Zellklone mit Hilfe des MARCM-Systems, da hier das vorzeitige Absterben der Tiere umgangen wird (Lee und Luo, 1999; Lee und Luo, 2001, Wu und Luo, 2006). Das Funktionsprinzip dieses Systems als Kombination aus der Gal4-vermittelten Expression eines GFP-Reportergens mit dem Gal80-Repressor und dem Flp/FRT-System ist in Abbildung 4.29 schematisch dargestellt. Ausgangspunkt sind Fliegen, in deren Zellen *Gal80* und die zu untersuchende Mutation distal zu einer FRT-Sequenz in *trans*-Position vorliegen. Der Gal80-Repressor unterdrückt in dieser Konfiguration die Gal4-abhängige Expression von GFP. Durch thermische Aktivierung der Flp-Rekombinase kommt es zur mitotischen Rekombination zwischen den FRT-Sequenzen, was in Tochterzellen resultiert, die entweder für *Gal80* oder die Mutation homozygot sind. Der Wegfall von Gal80 in den homozygot mutanten Zellen erlaubt schließlich die Gal4-vermittelte GFP-Expression, wodurch die mutanten Zellen und ihre Nachkommen („Zellklone“) positiv markiert sind.

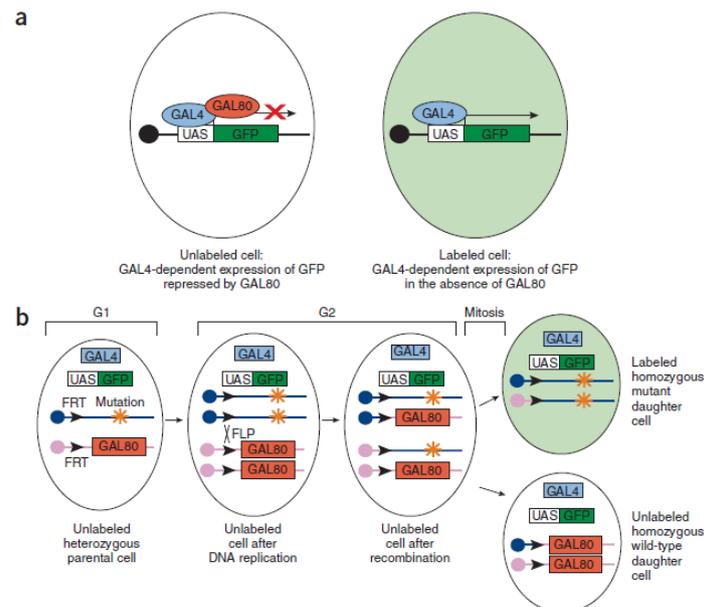


Abb.4.29. Funktionsweise des MARCM-Systems. (a) In Zellen, die das Gal80-Protein enthalten, wird die Gal4-vermittelte Expression UAS-gekoppelter Gene (hier GFP) reprimiert. Ohne Gal80 hingegen kann die Expression von UAS-GFP durch Gal4 aktiviert werden. (b) Das MARCM-System erfordert: 1. FRT-Sequenzen an der gleichen Position auf beiden homologen Chromosomen, 2. *Gal80* distal zu einer der FRT-Sequenzen, 3. *FLP*-Rekombinase, 4. *Gal4*, 5. einen UAS-gekoppelten Marker (hier GFP), sowie 6. die zu untersuchende Mutation distal zu einer FRT-Sequenz in *trans*-Position zu *Gal80*. Mitotische Rekombination an den FRT-Sequenzen führt zu zwei Tochterzellen, von denen jede für den chromosomalen Arm distal der FRT-Sequenz homozygot ist. In einer der Tochterzellen reprimiert Gal80 die Gal4-vermittelte Expression des Reportergens. In der zweiten, homozygot mutanten, Tochterzelle führt der Verlust von Gal80 zu einer Aktivierung der Gal4-abhängigen Reporter(GFP)-Expression, wodurch die mutante Zelle positiv markiert wird (aus Wu und Luo 2006).

4.2.3.1 Erzeugung mutanter *nito*-Klone

Um überhaupt mutante *nito*-Klone erzeugen zu können, wurde zunächst die Nullmutante *nito*^{GT} unter Verwendung des Stamms FRT G13 (BL1956) mit einer FRT-Sequenz in der 42B-Region des zweiten Chromosoms rekombiniert (3.2.30). Anschließend konnten mit Hilfe des MARCM-Treiberstamms TUG G13 (B.Bello, unveröffentlicht) mutante Klone in verschiedenen Geweben induziert werden (3.2.35). Erste Analysen erfolgten im dritten Larvalstadium. Dazu wurden die Larven auf die Expression von GFP vorselektiert, präpariert, fixiert und einer Antikörperfärbung mit dem anti-Nito-Antikörper unterzogen (3.2.38). Das als klonaler Marker exprimierte GFP bleibt bei der angewandten Fixierungsmethode stabil und musste daher nicht mit einem zusätzlichen Antikörper sichtbar gemacht werden.

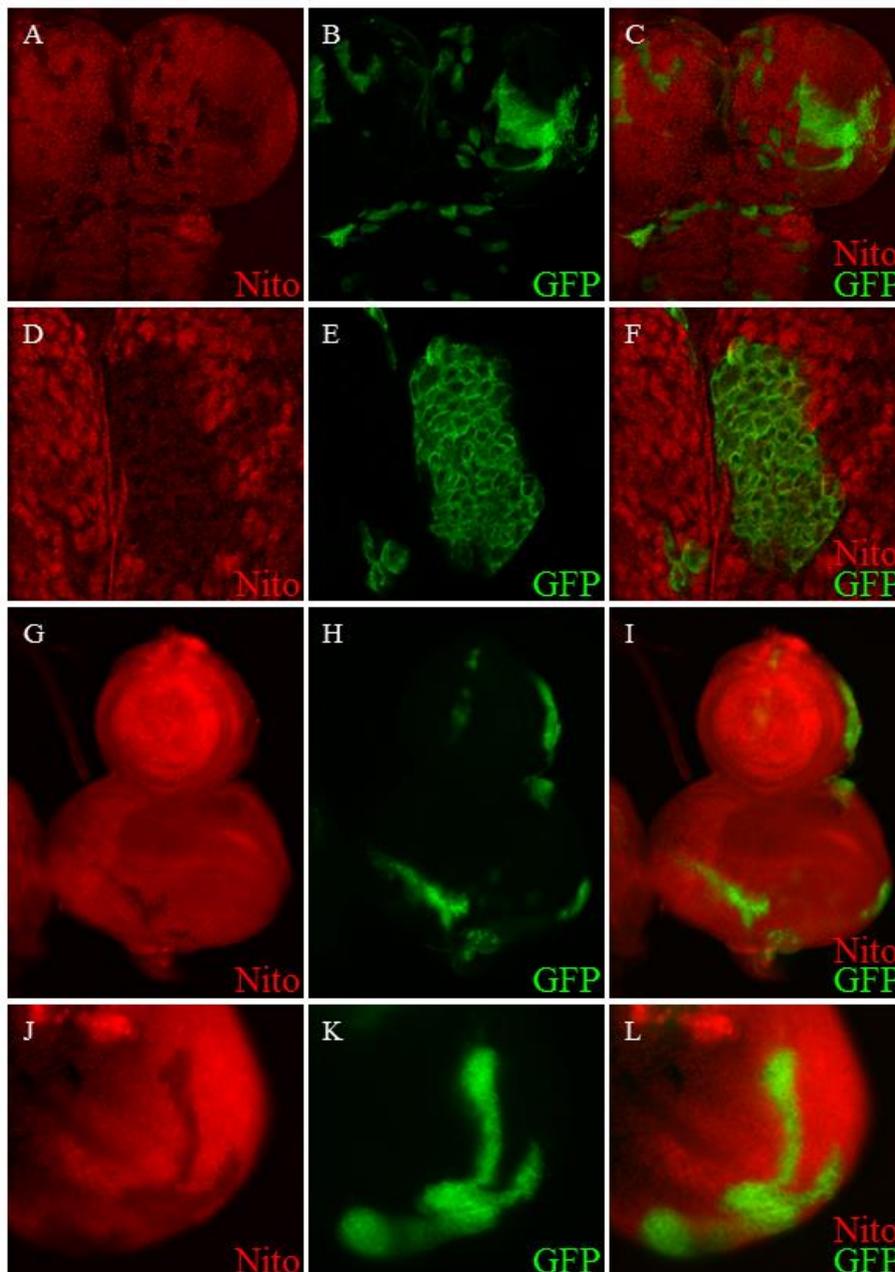


Abb.4.30. Nachweis der mittels MARCM erzeugten mutanten *nito*-Klone. Larvale Gewebe des dritten Larvalstadiums von *nito*^{GT}-MARCM-Fliegen wurden mit einem anti-Nito-Antikörper gefärbt. Die erste Spalte (A,D,G,J) zeigt jeweils die anti-Nito-Färbung, die zweite (B,E,H,K) das GFP-Signal der MARCM-Klone und die dritte (C,F,I,L) die Überlagerung der beiden Signale. (A-C) Konfokale Aufnahmen eines larvalen Gehirns. (D-F) Konfokale Aufnahme eines MARCM-Klons im larvalen Gehirn bei stärkerer Vergrößerung. (G-I) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer Augen-Antennenscheibe. (J-L) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines Ausschnitts einer Flügelscheibe.

Abbildung 4.30 zeigt eine Auswahl larvaler *nito*^{GT}-Klone in verschiedenen Geweben. Durch die relativ ubiquitäre Expression von Nito sind die meisten Klone auch unabhängig von ihrer GFP-Markierung am weitgehenden Wegfall der Nito-Färbung zu erkennen. Ein vollständiger Verlust der Färbung ist bei dieser Darstellungsform jedoch nicht zu erreichen, da aufgrund der

Gewebestruktur und –dicke stets ein gewisses Maß an Restsignal aus nicht betroffenen Gewebeschichten zu erkennen ist. Es konnten in ausreichender Frequenz erfolgreich Klone in den Gehirnhemisphären (Abb.4.30A-F) und im Ventralganglion (Abb.4.30A-C) sowie in Augen-Antennenscheiben (Abb.4.30G-I) und Flügelscheiben (Abb.4.30J-L) erzeugt werden. Offensichtliche morphologische Veränderungen, wie beispielsweise eine starke Überproliferation innerhalb der für *nito* mutanten Zellpopulationen, waren jedoch nicht zu beobachten.

4.2.3.2 Weitere Analyse larvaler *nito*^{GT}-Klone

Da sich bei der ersten optischen Bewertung der in larvalen Geweben erzeugten *nito*^{GT}-Klone keine morphologischen Veränderungen zeigten, sollte nun durch verschiedene Antikörperfärbungen nach phänotypischen Effekten des *nito*-Knockouts gesucht werden. Abbildung 4.31 zeigt exemplarisch die Ergebnisse der durchgeführten Analyse mit einem Antikörper gegen den pan-neuralen Marker Elav. Gezeigt sind Klone im larvalen Gehirn (Abb.4.31A-F) mit einer detaillierteren Ansicht eines Ventralganglions (Abb.4.31D-F) und in den Photorezeptoren verschiedener Augen-Imaginalscheiben (Abb.4.31G-L). In keinem der untersuchten Gewebe konnten allerdings Musterausfälle oder –veränderungen der Antikörperfärbung innerhalb der mutanten Zellpopulationen festgestellt werden. Zwar scheint der Ausfall von Nito in einigen Klonen (Abb.4.31D-F) zu einer leichten Verstärkung des Elav-Signals zu führen, in anderen Klonen (4.31A-C) sind jedoch keine entsprechenden Signalveränderungen feststellbar. Da ähnliche Veränderungen nicht mit einer signifikanten Häufigkeit beobachtet werden konnten, scheint es sich hier eher um einen technisch bedingten Effekt als um eine tatsächliche Veränderung der Expressionsstärke von Elav zu handeln.

Neben Elav wurden auch Antikörperfärbungen gegen andere in den untersuchten Geweben, insbesondere im Gehirn und den Augenscheiben, gut nachweisbare Proteine durchgeführt. Als Schlüsselkomponenten des unter anderem an der Augenentwicklung beteiligten Wg-Signalwegs wurden das sezernierte Glykoprotein Wingless und der transkriptionelle Coaktivator Armadillo untersucht (Legent und Treisman, 2008). Von besonderer Bedeutung für die Entwicklung des optischen Systems sind auch die Faktoren des Retinalen Determinations-Gen-Netzwerks (RDGN). Die zugehörigen Homeodomän-Transkriptionsfaktoren Twin of eyeless (Toy) und Dachshund (Dac) sowie die Phosphatase Eyes absent (Eya) wurden als Repräsentanten verschiedener Ebenen dieses Netzwerks ebenfalls analysiert (Silver und Rebay, 2005; Kumar 2009). Zusätzlich wurde ein möglicher Einfluss des *nito*-

Knockouts auf die Expression des für die Gehirnentwicklung essentiellen Homeodomän-Transkriptionsfaktors Retinal Homeobox (Rx) geprüft (Eggert et al., 1998; Davis et al., 2003). Allerdings war es im Rahmen der durchgeführten Untersuchungen nicht möglich, für eines der genannten Proteine eine Veränderung des Expressionsmusters innerhalb der mutanten Zellpopulationen nachzuweisen (nicht gezeigt).

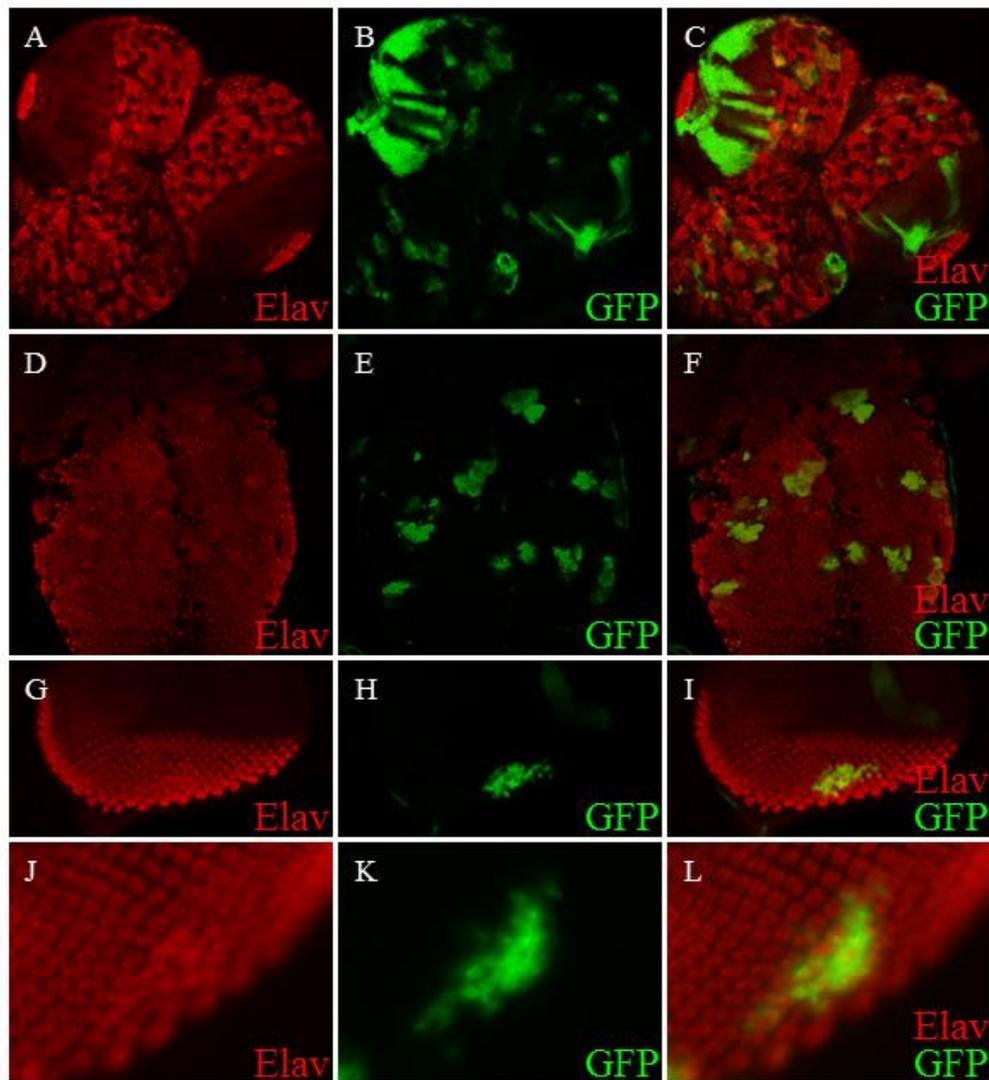


Abb.4.31. Colokalisationsstudien mutanter *nito*-Klone mit Elav. Larvale Gewebe des dritten Larvalstadiums von $nito^{GT}$ -MARCM-Fliegen wurden mit einem anti-Elav-Antikörper gefärbt. Die erste Spalte (A,D,G,J) zeigt jeweils die anti-Elav-Färbung, die zweite (B,E,H,K) das GFP-Signal der MARCM-Klone und die dritte (C,F,I,L) die Überlagerung der beiden Signale. (A-C) Konfokale Aufnahme eines larvalen Gehirns. (D-F) Konfokale Aufnahme des Ventralganglions eines larvalen Gehirns. (G-I) Konfokale Aufnahme einer Augen-Imaginalscheibe. (J-L) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines Ausschnitts einer Augen-Imaginalscheibe bei stärkerer Vergrößerung.

4.2.3.3 Analyse adulter $nito^{GT}$ -Klone

Da sowohl die ektopische Expression als auch die Reduktion der Gendosis von *nito* zu adulten Phänotypen geführt haben (4.1.4.2, 4.1.4.3), sollten nun auch mutante MARCM-Klone hinsichtlich ihrer phänotypischen Effekte untersucht werden. Die Induktion der Klone wurde durchgeführt wie unter 4.2.3.1 beschrieben. Zur einfacheren Handhabung wurde im Larval- und Pupalstadium auf die Expression von GFP vorselektiert und die entsprechenden Tiere in gesonderte Zuchtbehälter überführt, so dass nur Fliegen, die tatsächlich $nito^{GT}$ -Klone aufwiesen, in die endgültige Auswertung gelangten. Als zu untersuchende Strukturen wurden die Augen und Flügel ausgewählt, da hier bereits in den zuvor erwähnten Kreuzungsstudien phänotypische Effekte zu beobachten waren. Weiterhin erschien in diesen Geweben eine Beeinträchtigung der Identifikation des klonspezifischen GFP-Signals durch den relativ undurchsichtigen Chitinpanzer der Fliegen am unwahrscheinlichsten.

Betrachtete man nun die Augen der $nito^{GT}$ -MARCM-Fliegen, so konnten zwar erfolgreich Klone mit erkennbarem GFP-Signal erzeugt werden, jedoch war deren dreidimensionale Ausdehnung ohne Beschädigung des Auges nicht feststellbar. Es konnte also nicht mit Sicherheit bestimmt werden, welche Gewebeschichten durch die Klone betroffen waren. Mit lichtmikroskopischen Methoden war es nicht möglich, innerhalb der angenommenen klonalen Bereiche Veränderungen in der Ommatidienstruktur oder -verteilung nachzuweisen (nicht gezeigt). Daher wurde die weitere Analyse auf eine phänotypische Bewertung mutanter Klone im Flügel beschränkt. Da das Flügelgewebe nur wenige Zellschichten umfasst, sollte hier auch die Dreidimensionalität der Klone kein Problem darstellen.

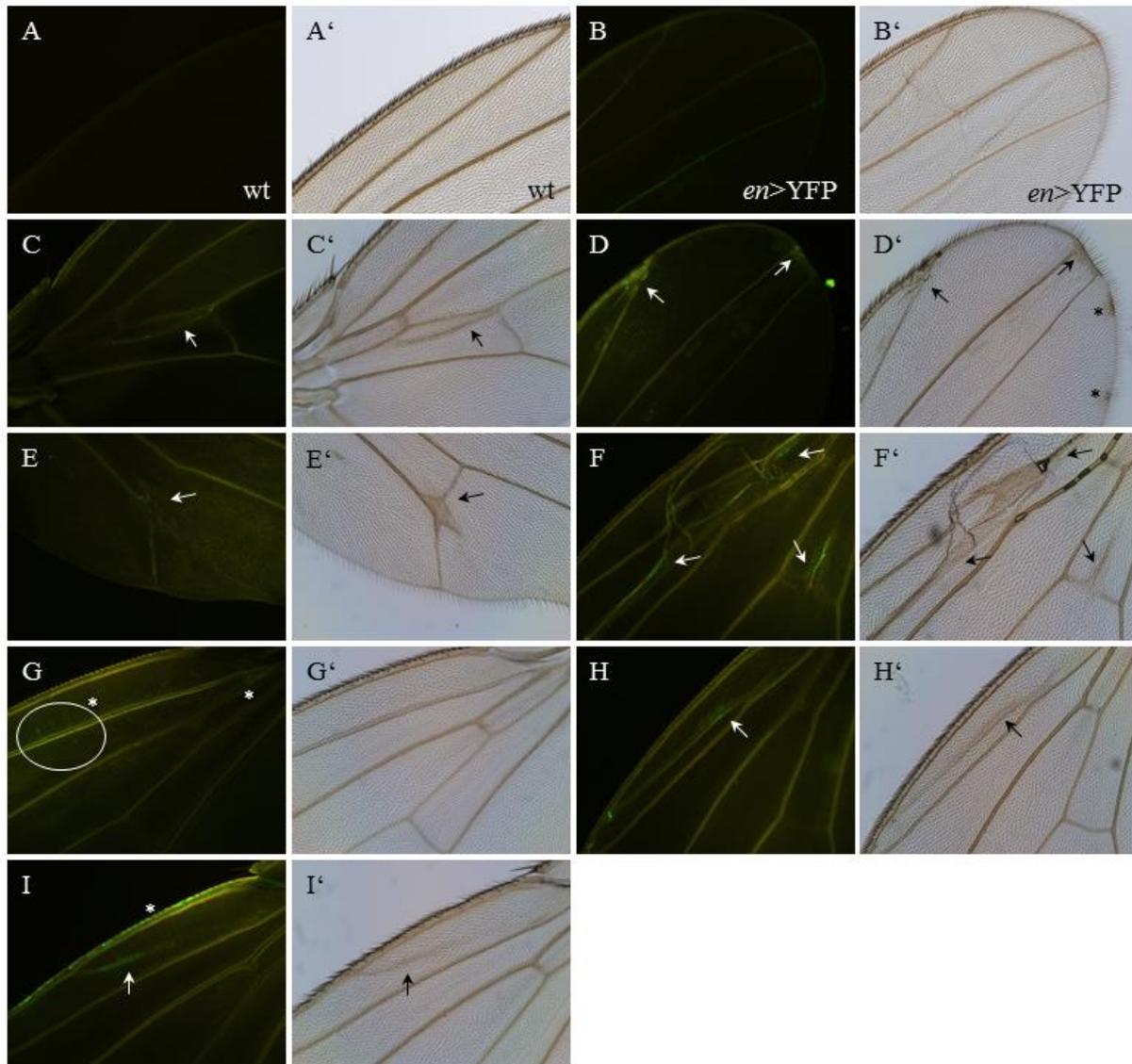


Abb.4.32. Analyse mutanter *nito*-Klone im adulten Flügel. Fluoreszenzmikroskopische (A-I) und lichtmikroskopische (A'-I') Aufnahmen repräsentativer Bereiche adulter Flügel. (A, A') Wildtypischer Flügel. (B,B') Flügel mit ectopischer Expression von YFP im Muster von *en*-Gal4. (C,C'-I,I') Flügel von *nito*^{GT}-MARCM-Fliegen mit nachweisbaren *nito*^{GT}-Klonen. Pfeile kennzeichnen Klone mit korrelierten Veränderungen im Phänotyp. Sterne (*) markieren in den Fluoreszenzaufnahmen mutante Klone ohne erkennbaren phänotypischen Einfluss sowie in den lichtmikroskopischen Aufnahmen phänotypische Anomalien ohne zuzuordnenden GFP-positiven Klon. Die kreisförmige Markierung in (G) umfasst klonales Gewebe im Flügelepithel außerhalb der Venenstruktur.

Abbildung 4.32 zeigt Ausschnittsaufnahmen ausgewählter Flügel. Dargestellt sind jeweils eine fluoreszenzmikroskopische und eine lichtmikroskopische Aufnahme des gleichen Flügelausschnitts. Zum Ausschluss artefizieller Fluoreszenzsignale durch eventuelle Autofluoreszenz wurden auch wildtypische Flügel untersucht (Abb.4.32.A,A'). Als Vergleich für die Stärke von Fluoreszenzsignalen in dieser Gewebestruktur wurden Flügel herangezogen, in denen YFP im *en*-Gal4-Muster konstitutiv exprimiert wurde

(Abb.4.32B,B'). Hierbei offenbarten sich prinzipielle Schwierigkeiten beim Nachweis und der Dokumentation von Fluoreszenzsignalen im adulten Flügel, da die Signalstärke bereits bei konstitutiver und großräumiger Expression eines Fluoreszenzproteins starken Schwankungen unterworfen war. Vergleichbare Probleme waren daher auch bei der Analyse räumlich begrenzterer klonaler Signale zu erwarten. In der Tat gestaltete sich die Identifikation konkreter Klone als schwierig, da die Signalstärke insgesamt gering war und bei längeren Belichtungszeiten mit einem basalen Hintergrundsignal einherging (Abb.4.32C-I). Sicher identifizierte Klone sind in den jeweiligen Abbildungsteilen der Fluoreszenzaufnahmen gekennzeichnet. Beim Abgleich mit den lichtmikroskopischen Entsprechungen (Abb.4.32C'-I') konnten verschiedenen Klonen leichte phänotypische Veränderungen des Flügels vor allem in Form von zusätzlichem Venenmaterial oder verbreiterten Venen zugeordnet werden (Pfeile). Allerdings traten auch Klone auf, die keinen erkennbaren Einfluss auf den Phänotyp aufwiesen (weiße Sterne). Gleichzeitig konnten phänotypische Veränderungen beobachtet werden, denen kein erkennbarer mutanter Zellklon zugrunde lag (schwarze Sterne). Somit lieferte die durchgeführte Analyse zwar Hinweise auf phänotypische Auswirkungen der *nito*-defizienten Klone, eine eindeutige Korrelation zwischen den *nito*^{GT}-Klonen und definierten Phänotypen konnte nicht hergestellt werden.

4.3 Untersuchung der Homeodomän-Transkriptionsfaktoren Msh und Ems

Die Homeodomän-interagierenden Proteinkinasen wurden ursprünglich anhand ihrer Wechselwirkung mit Homeodomän-Transkriptionsfaktoren identifiziert (Kim et al., 1999). Auch in *Drosophila* konnte bereits eine Enzym-Substrat-Beziehung zwischen Hipk und dem Homeodomän-Protein Homeobrain nachgewiesen werden (Dewald, 2008). Daher war es naheliegend, auch weitere Homeodomän-Transkriptionsfaktoren hinsichtlich einer Phosphorylierung durch Hipk zu untersuchen und gegebenenfalls die phosphorylierten Bereiche zu kartieren. Damit sollten weitere Zielsequenzen von Hipk identifiziert werden, die dann zur Verfeinerung der entworfenen Konsensusmotive für eine Hipk-vermittelte Phosphorylierung (4.1.2.3, Abb.4.9) beitragen könnten.

Für eine weitere Untersuchung wurden die Homeodomän-Transkriptionsfaktoren Msh und Ems ausgewählt. Wie das bereits bekannte Hipk-Substrat Homeobrain verfügen sie über eine konservierte Oktapeptidsequenz (siehe auch 2.4) und auch ihre Funktionen in der Entwicklung insbesondere des Nervensystems von *Drosophila* machen sie zu geeigneten Kandidaten. So spielt Ems beispielsweise eine wichtige Rolle in der regionalisierten Neurogenese sowie der axonalen Wegfindung (Hirth et al., 1995; Hartmann et al., 2000). Msh wird eine Beteiligung an der Definition der Neuroblastenidentität zugeschrieben und auch ein Einfluss auf die Augenentwicklung wird in der Literatur diskutiert (Buescher und Chia, 1997; Isshiki et al., 1997; Mozer, 2001). Diese Funktionen erscheinen passend für mögliche Substrate einer Kinase, der selbst unter anderem bereits eine Beteiligung an der Kontrolle der Zellzahl im Nervensystem und Funktionen in der Augenentwicklung zugeordnet werden konnten (Link et al., 2007, Lee et al., 2009a).

4.3.1 Colokalisation der Expression von *hipk* und *msh* bzw. *ems*

Wie bereits bei der Analyse von Nito (4.2.1) sollte auch im Fall von Msh und Ems die gemeinsame Expression mit Hipk betrachtet werden. Da es sich bei beiden Proteinen um Transkriptionsfaktoren handelt und auch Hipk als überwiegend nukleär exprimiert beschrieben wird, konnte von einer Lokalisation im gleichen Zellkompartiment, dem Nukleus, ausgegangen werden (Walldorf und Gehring, 1992; Lord et al., 1995; Kim et al., 1999). Die Analyse der gewebespezifischen Colokalisation wurde im Embryo durchgeführt. Auch hier mussten die Expressionsmuster auf Transkriptebene mittels *in situ* Hybridisierung (3.2.39) sichtbar gemacht werden, da eine gemeinsame Anfärbung von Hipk und jeweils einem der zu untersuchenden Faktoren in Ermangelung eines anti-Hipk-Antikörpers ausreichender Qualität

nicht möglich war. Der Vergleich der Expression konnte also nur indirekt durch den Vergleich separater Embryonen erfolgen.

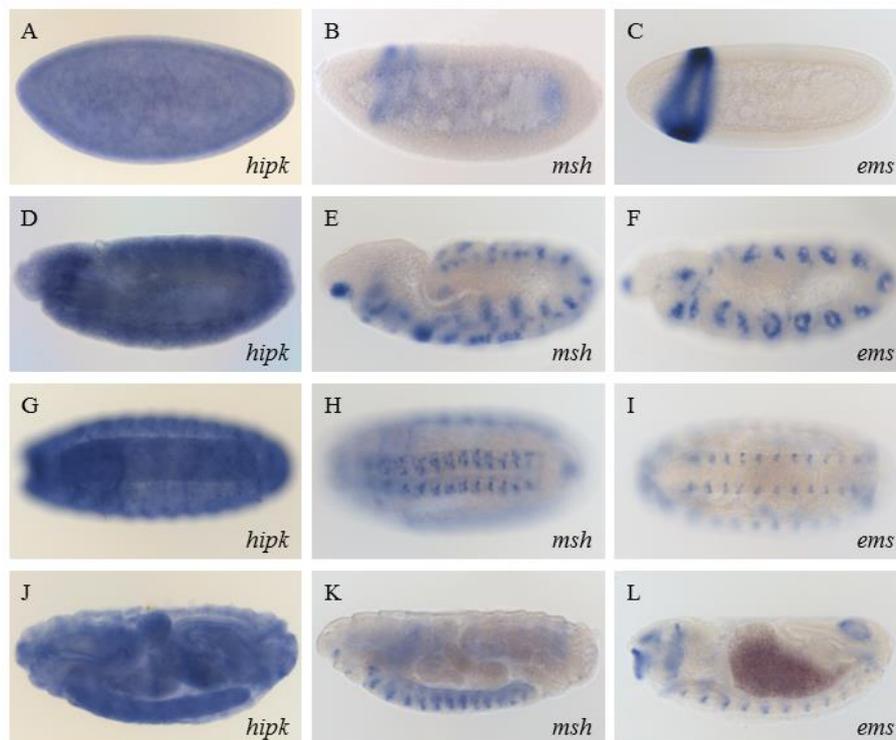


Abb.4.33. Vergleich der mRNA-Expression von *hipk* und *msh* bzw. *ems*. Dargestellt sind lichtmikroskopische Aufnahmen mit DIC-Filter von *in situ* Hybridisierungen mit DNA-Sonden gegen *hipk* (A,D,G,J), *msh* (B,E,H,K) und *ems* (C,F,I,L) an Wildtyp-Embryonen. Alle Embryonen sind anterior nach links orientiert. (A-C) Stadium 5-6, laterale Ansicht. (D-F) Stadium 9, laterale Ansicht. (G-I) Stadium 16-17, ventrale Ansicht. (J,K) Stadium 16-17, laterale Ansicht.

Abbildung 4.33 zeigt eine Gegenüberstellung der Transkriptexpression von *hipk*, *msh* und *ems* zu verschiedenen Stadien der Embryonalentwicklung. Auffällig ist die ubiquitär erscheinende Expression von *hipk* im Vergleich mit den räumlich deutlich begrenzteren Expressionsmustern von *msh* und *ems* über den gesamten Verlauf der Entwicklung, was eine Colokalisation von *hipk* und *msh* bzw. *hipk* und *ems* sehr wahrscheinlich macht. Dennoch soll an dieser Stelle kurz auf die jeweiligen Gewebe mit einer möglichen Colokalisation der Faktoren eingegangen werden.

msh zeigt in frühen Stadien eine Expression in der Anlage des prozephalischen Ektoderms (Abb.4.33B), die zwangsläufig mit der ubiquitären Expression von *hipk* zusammenfällt (Abb.4.33A). Während der Keimstreifenausstreckung in Stadium 9 ist eine Anfärbung von *msh* in Vorläuferzellen des ventralen Nervensystems, des Rumpfmesoderms und des ventralen

Ektoderms zu beobachten (Abb.4.33E). In diesen Bereichen kommt es auch zu einer Anreicherung der *hipk*-mRNA (Abb.4.33D). Zum Ende der Embryonalentwicklung kann sowohl für *msh* als auch für *hipk* eine Expression in Zellen des kondensierten Ventralnervensystems nachgewiesen werden (Abb.4.33G,H,J,K).

Die Expression von *ems* entspricht in frühen Stadien dem typischen Expressionsmuster eines Kopflückengens in Form eines einzelnen Streifens im anterioren Drittel des Embryos (Abb.4.33C). Auch hier kommt es quasi automatisch zu einer Colokalisation mit dem ubiquitär vorhandenen *hipk*-Transkript (Abb.4.33A). Zum Zeitpunkt der Keimstreifenausstreckung ist die mRNA von *ems* in Primordien des prozephalischen Ektoderms und des Clypeolabrum sowie den Anlagen des Tracheensystems nachweisbar (Abb.4.33F). Aufgrund der ubiquitären Expression von *hipk* mit Anreicherung entlang des Keimstreifs kann auch hier eine Colokalisation angenommen werden (Abb.4.33D). In späteren Stadien ist *ems* in Teilen des embryonalen Gehirns sowie der Tracheensystems exprimiert (Abb.4.33I,L). Eine verstärkte Expression im Gehirn konnte auch für *hipk* nachgewiesen werden (Abb.4.33G).

4.3.2 *in vitro* Phosphorylierungsanalysen von Msh

4.3.2.1 Nachweis von Msh als Hipk-Substrat

Der Nachweis der Phosphorylierung von Msh durch Hipk mit einer ersten Kartierung des phosphorylierten Bereichs wurde im Rahmen einer zu dieser Arbeit assoziierten Bachelorarbeit durchgeführt (Brofman Epelbaum, 2011). Abbildung 4.34 zeigt eine schematische Darstellung der dort untersuchten Msh-Konstrukte (Abb.4.34A) sowie die zugehörigen Autoradiogramme der durchgeführten *in vitro* Phosphorylierungsassays (Abb.4.34B). Die Phosphorylierung von Msh durch Hipk wurde zunächst mit Konstrukt *msh1,3* bewiesen und durch Untersuchung dreier Subkonstrukte auf den von Konstrukt *mshNB* abgedeckten Bereich eingegrenzt.

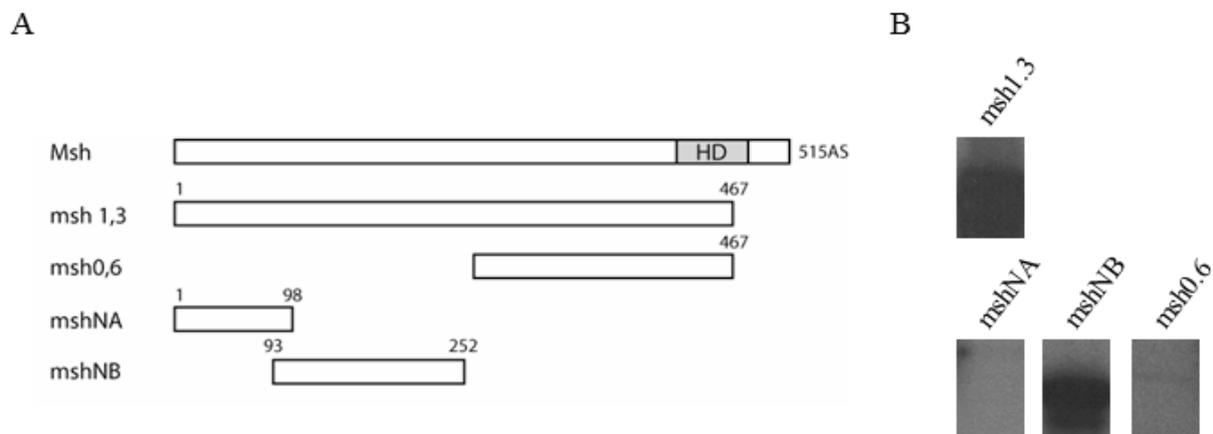


Abb.4.34. Msh wird durch Hipk phosphoryliert. (A) Das Protein Msh hat eine Länge von 515 Aminosäuren und verfügt über eine C-terminal gelegene Homeodomäne (HD). Dargestellt sind die bisher auf eine Phosphorylierung durch Hipk untersuchten Msh-Konstrukte mit ihrer Position in Relation zum Gesamtprotein inklusive der Positionszahl der jeweils terminalen Aminosäuren. (B) Autoradiogramme von *in vitro* Kinaseassays der analysierten Msh-Konstrukte. Da die verwendete Kinase und ihre Degradationsprodukte eine starke Autophosphorylierung zeigen, wurden die Autoradiogramme zur besseren Übersicht auf die Bereiche der Proteine von Interesse zugeschnitten (verändert aus Brofman Epelbaum, 2011).

4.3.2.2 Eingrenzung der phosphorylierten Regionen von Msh

Nachdem Msh von R. Brofman Epelbaum als Hipk-Substrat identifiziert wurde (Brofman Epelbaum, 2011), sollte nun die Phosphorylierung innerhalb von Konstrukt mshNB weiter eingegrenzt werden. Das prinzipielle Vorgehen entsprach dabei dem für die Kartierung der Nito-Phosphorylierung (4.1.2).

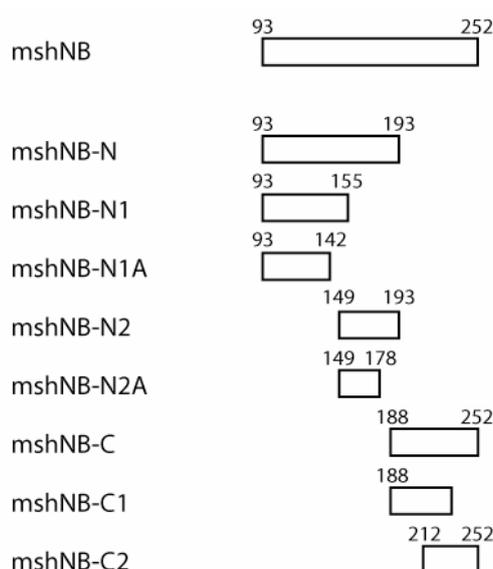


Abb.4.35. Schematische Darstellung der Konstrukte zur Eingrenzung der phosphorylierten Bereiche von Msh. Gezeigt ist die Position der Subkonstrukte in Relation zum übergeordneten Konstrukt mshNB mit Angabe der Positionszahl der jeweils terminalen Aminosäuren.

Ausgehend von mshNB wurden verschiedene, sukzessive verkürzte Subkonstrukte entworfen (Abb.4.35), mit Hilfe der in Tabelle 4.11 angegebenen Primer amplifiziert und wie zuvor beschrieben kloniert (4.1.2). Lediglich die Konstrukte mshNB-N2A und mshNB-C1 wurden durch restriktionsenzymatische Trunkierung der jeweils übergeordneten Konstrukte über *NaeI* und *NotI* bzw. *SmaI* und *NotI* hergestellt. Anschließend wurden die Proteine rekombinant exprimiert, aufgereinigt und im *in vitro* Kinaseassay analysiert (3.2.23).

Tab.4.11. Verwendete Primer zur Klonierung der Msh-Eingrenzungskonstrukte. Als Template diente der cDNA-Klon msh pS135-4.

Konstrukt	Primer1	Primer2
mshNB-N	msh2F_Eco	msh4R_Xho
mshNB-N1	msh2F_Eco	msh5R-Xho
mshNB-N1A	msh2F-EcoB	msh6R-Xho
mshNB-N2	msh5F-Eco	msh4R_Xho
mshNB-N2A	Erzeugt aus mshNB-N2 mittels Verdau mit <i>NaeI</i> und <i>NotI</i>	
mshNB-C	msh4F-Eco	msh3R_Xho
mshNB-C1	Erzeugt aus mshNB-C mittels Verdau mit <i>SmaI</i> und <i>NotI</i>	
mshNB-C2	msh7	msh3R-B

Betrachtet man die Autoradiogramme der durchgeführten *in vitro* Kinaseassays, so konnte die Phosphorylierung von Msh in mehreren hierarchischen Schritten auf drei Kandidatenregionen eingegrenzt werden (Abb.4.36). Die Untersuchung der Subkonstrukte mshNB-N und mshNB-C ergab dabei zunächst mindestens zwei Substratbereiche, die mit Hilfe der nachgeordneten Konstrukte (mshNB-N1, mshNB-N2, mshNB-C1 und mshNB-C2) auf drei erweitert werden konnten. Für den N-terminalen Bereich von mshNB konnte die Zuordnung durch Analyse noch kleinerer Konstrukte (mshNB-N1A und mshNB-N2A) weiter verfeinert werden. Zusammengefasst erlaubten diese Daten die direkte Zuordnung der Phosphorylierung von Msh zu den Sequenzen der jeweils phosphorylierten Konstrukte mshNB-N2A und mshNB-C2. Der C-terminale Bereich von mshNB-N2 wurde als Substratregion ausgeschlossen, da hier keine der Prolin-geführten Phosphorylierung durch Hipk entsprechende Aminosäurekombination enthalten ist (Kim et al., 2006). Indirekt konnte auch der C-terminale Bereich von mshNB-N1 als Phosphorylierungsziel identifiziert werden, da dieses Konstrukt phosphoryliert wurde, das untergeordnete, verkürzte Konstrukt mshNB-N1A jedoch nicht.

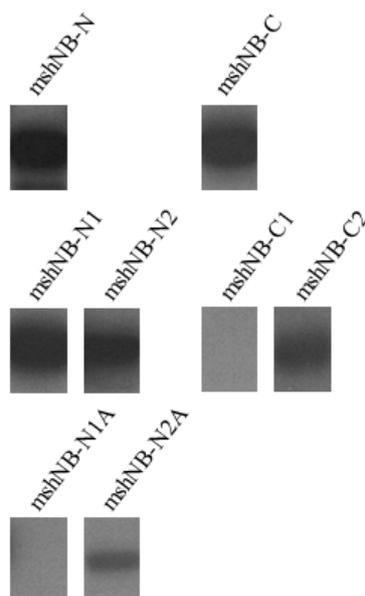


Abb.4.36. Untersuchung der Phosphorylierung der Msh-Eingrenzungskonstrukte. Dargestellt sind Autoradiogramme von *in vitro* Kinaseassays der Eingrenzungskonstrukte aus Abb.4.35. Als Positivkontrolle diente das zugehörige übergeordnete Konstrukt (nicht gezeigt). Da die verwendete Kinase und ihre Degradationsprodukte eine starke Autophosphorylierung zeigen, wurden die Autoradiogramme zur besseren Übersicht auf die Bereiche der Proteine von Interesse zugeschnitten.

4.3.2.3 Bestimmung der Phosphorylierungsstellen von Msh durch *in vitro* Mutagenese

Nachdem die Phosphorylierung von Msh auf die drei Subkonstrukte mshNB-N1, mshNB-N2A und mshNB-C2 festgelegt werden konnte, sollten die tatsächlichen Zielsequenzen nun durch *in vitro* Mutagenese final kartiert werden, indem in spezifischen Mutagenesekonstrukten potentiell phosphorylierte Serin- oder Threoninreste durch nicht phosphorylierbare Alanine ersetzt wurden. Auch hier erfolgte das prinzipielle Vorgehen analog zur Analyse von Nito (4.1.2.3). Abbildung 4.37 zeigt eine schematische Übersicht über die mit Hilfe der in Tabelle 4.12 aufgeführten Primer hergestellten Konstrukte.

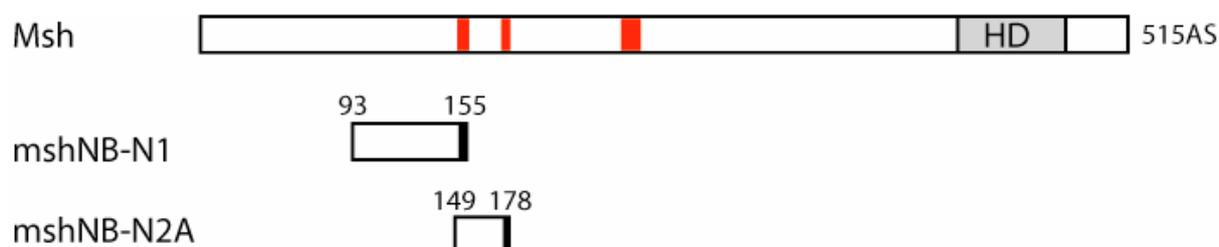


Abb.4.37. Schematische Darstellung der Mutagenesekonstrukte zur Bestimmung der phosphorylierten Motive von Msh. Gezeigt sind die mutierten Konstrukte mit ihrer Position in Relation zum Gesamtprotein inklusive der Positionsanzahl der jeweils terminalen Aminosäuren. Schwarze Balken markieren durch Mutagenese untersuchte Bereiche. Rote Balken kennzeichnen tatsächlich phosphorylierte Sequenzbereiche.

Es wurden zwei Sequenzbereiche durch Einführen einer Mutation analysiert. Für Konstrukt mshNB-C2 wurde aus technischen Gründen auf die Konzeption eines Mutagenesekonstrukts verzichtet, da die einzige Kandidatenregion innerhalb dieses Konstrukts aus einem großräumigen Ser/Thr-Cluster um Pro²⁴⁵ besteht. Der Cluster wurde als einzelne Phosphorylierungsstelle eingestuft und ist in Abbildung 4.37 mit einem roten Balken gekennzeichnet.

Tab.4.12. Verwendete Primer zur Klonierung der Msh-Mutagenesekonstrukte. Als Template diente der *msh*-cDNA-Klon msh pS135-4.

Konstrukt	Primer1	Primer2
mshNB-N1mut1	msh2F_Eco	mshNB-N1mut1R
mshNB-N2Amut1	msh5F-Eco	mshNB-N2Amut1R

Abbildung 4.38 zeigt die jeweils durch Mutagenese veränderten Sequenzbereiche (Abb.4.38A) sowie die Autoradiogramme der zugehörigen *in vitro* Kinaseassays (Abb.4.38B). Den wildtypischen Konstrukten sind jeweils ihre mutanten Entsprechungen gegenübergestellt. Sowohl bei mshNB-N1mut1 als auch bei mshNB-N2Amut1 konnte durch den Aminosäureaustausch eine Phosphorylierung durch Hipk verhindert werden, d.h. die eingeführten Mutationen betreffen jeweils die einzigen durch Hipk phosphorylierbaren Bereiche der beiden Konstrukte. Somit konnten die Sequenzen LADT¹⁴³RPRT¹⁴⁷PP (mshNB-N1) und SQAS¹⁷²S¹⁷³T¹⁷⁴PPPP (mshNB-N2A) als weitere Phosphorylierungsstellen von Msh identifiziert werden.

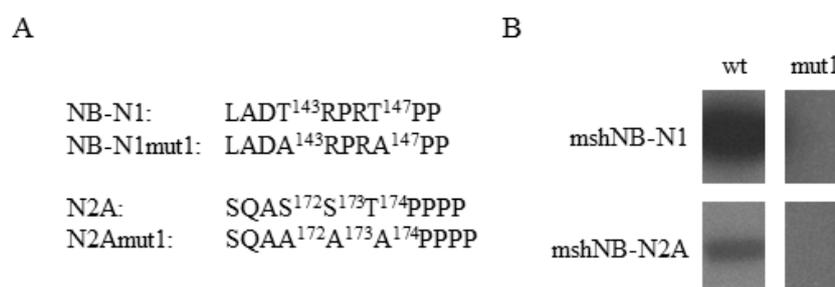


Abb.4.38. Analyse der Msh-Mutagenesekonstrukte. (A) Gegenüberstellung der wildtypischen und mutierten Proteinsequenzen. (B) Autoradiogramme von *in vitro* Kinaseassays der mutierten Proteinkonstrukte im Vergleich mit ihren wildtypischen Entsprechungen. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Autoradiogramme auf den Bereich der Proteine von Interesse zugeschnitten.

4.3.3 *in vitro* Phosphorylierungsanalysen von Ems

4.3.3.1 Nachweis von Ems als Hipk-Substrat

Die Überprüfung von Ems auf eine Phosphorylierung durch Hipk erfolgte analog zur Untersuchung von Nito bzw. Msh (4.1.2, 4.3.2). Zur vereinfachten Handhabung und gegebenenfalls ersten Kartierung wurde das Protein in drei Fragmente unterteilt, die mit Hilfe der in Tabelle 4.13 angegebenen Primer kloniert wurden (Abb.4.39).

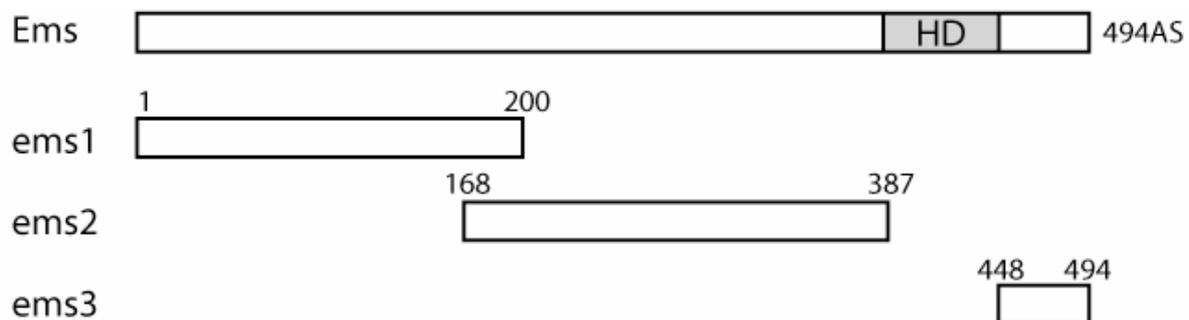


Abb.4.39. Schematische Darstellung der Konstrukte zur Untersuchung von Ems auf eine Phosphorylierung durch Hipk. Das Protein Ems hat eine Länge von 494 Aminosäuren und verfügt über eine C-terminal gelegene Homeodomäne (HD). Dargestellt sind die Konstrukte ems1, ems2 und ems3 mit ihrer Position in Relation zum Gesamtprotein inklusive der Positionszahl der jeweils terminalen Aminosäuren.

Auf eine Untersuchung der Homeodomäne wurde hier verzichtet, da diese bisher in keinem Hipk-Substrat als Ziel der Phosphorylierung nachgewiesen werden konnte und zudem die Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen über Affinitätschromatographie stark erschwert (unveröffentlichte Beobachtung). Die Proteinkonstrukte ems1, ems2 und ems3 wurden aufgereinigt und analysiert wie bereits beschrieben (4.1.2).

Tab.4.13. Verwendete Primer zur Klonierung der ersten Ems-Konstrukte. Als Template diente der *ems*-cDNA-Klon cW13/7.

Konstrukt	Primer1	Primer2
ems1	emsE1	emsE2
ems2	emsE3	emsE4
ems3	emsE5	emsE6

Abbildung 4.40 zeigt das Autoradiogramm des *in vitro* Kinaseassays für ems1, ems2 und ems3. Da insbesondere ems2 zu einer starken Degradation neigt, wurde hier ein größerer Bildausschnitt als üblich gewählt. Im Rahmen der durchgeführten Untersuchung konnte Ems als Hipk-Substrat identifiziert und eine Phosphorylierung in mindestens zwei Regionen des

Proteins nachgewiesen werden. Die stärkste Phosphorylierung zeigte sich dabei im N-terminalen Fragment *ems1*, während *ems2* und die zugehörigen Degradationsprodukte deutlich schwächer phosphoryliert wurden. Für *ems3* war keine Hipk-vermittelte Übertragung von radioaktivem Phosphat feststellbar.

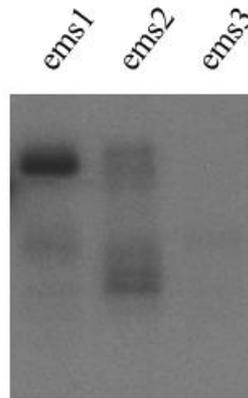


Abb.4.40. Nachweis der Phosphorylierung von Ems durch Hipk. Dargestellt ist ein Autoradiogramm eines *in vitro* Kinaseassays der Konstrukte *ems1*, *ems2* und *ems3*. Ein bereits als Substrat identifiziertes Msh-Konstrukt diente als Positivkontrolle (nicht gezeigt). Da die verwendete Kinase und ihre Degradationsprodukte eine starke Autophosphorylierung zeigen, wurde das Autoradiogramm zur besseren Übersicht auf den Bereich der Proteine von Interesse zugeschnitten.

4.3.3.2 Eingrenzung der phosphorylierten Regionen von Ems

Zur genaueren Kartierung der phosphorylierten Regionen von Ems wurden die Konstrukte *ems1* und *ems2* in verschiedene Subkonstrukte unterteilt und mit Hilfe der in Tabelle 4.14 aufgelisteten Primer kloniert wie zuvor beschrieben (4.1.2). Eine schematische Übersicht über die einzelnen Konstrukte ist in Abbildung 4.41 dargestellt. Der überlappende Bereich der beiden übergeordneten Konstrukte *ems1* und *ems2* (zu sehen in Abb.4.41A) wurde im Rahmen der Analyse der Subkonstrukte für *ems2* untersucht.

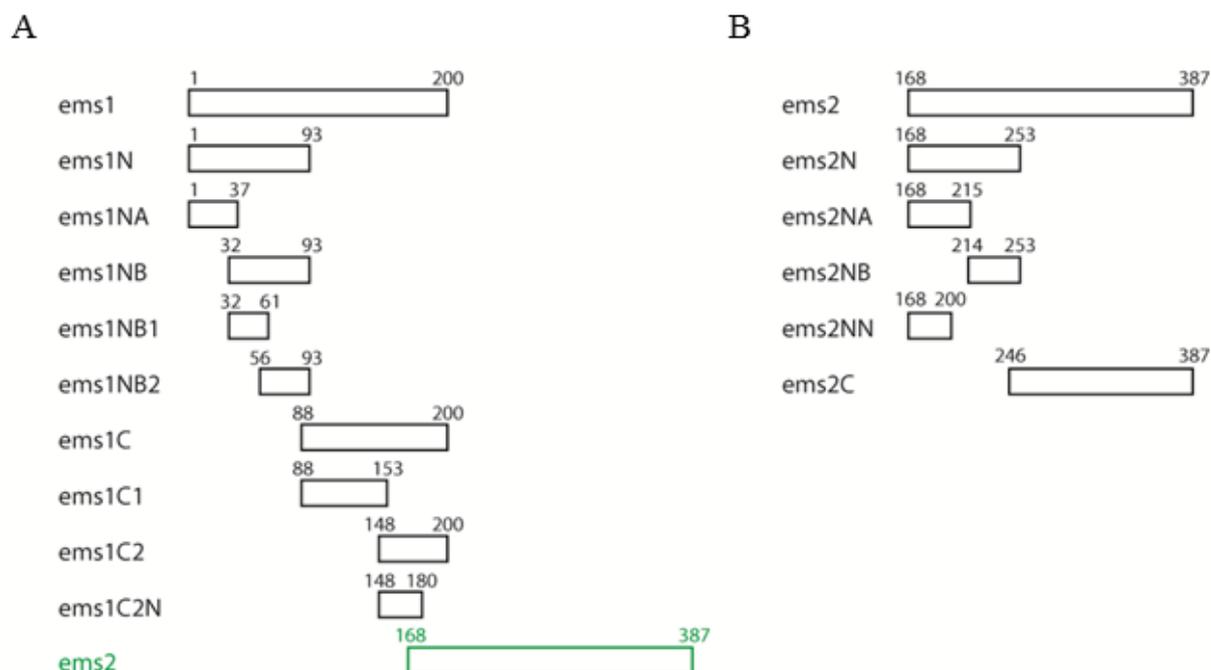


Abb.4.41. Schematische Darstellung der Konstrukte zur Eingrenzung der Phosphorylierung von Ems.

Gezeigt ist die Position der Subkonstrukte in Relation zum jeweils übergeordneten Konstrukt mit Angabe der Positionszahl der jeweils terminalen Aminosäuren. (A) Darstellung der Subkonstrukte zur Kartierung der Phosphorylierung innerhalb des Konstrukts ems1. Dieses überschneidet sich mit dem Konstrukt ems2 (grün). Der entsprechende, überlappende Bereich wurde im Rahmen der Analyse der Subkonstrukte von ems2 abgedeckt. (B) Darstellung der Subkonstrukte zur Kartierung der Phosphorylierung innerhalb des Konstrukts ems2.

Tab.4.14. Verwendete Primer zur Klonierung der Ems-Eingrenzungskonstrukte. Als Template diente der *ems*-cDNA-Klon cW13/7.

Konstrukt	Primer1	Primer2
ems1N	emsE1	ems8
ems1NA	ems1B	ems16
ems1NB	ems15	ems8B
ems1NB1	ems15	ems18
ems1NB2	ems17	ems8B
ems1C	ems7	emsE2
ems1C1	ems7	ems12
ems1C2	ems11	emsE2
ems1C2N	ems11B	ems19
ems2N	emsE3	ems9
ems2NA	ems3-EcoB	ems14
ems2NB	ems13	ems9
ems2NN	emsE3	emsE2
ems2C	ems10	emsE4

Abbildung 4.42 zeigt die Autoradiogramme der durchgeführten *in vitro* Kinaseassays für die Eingrenzungskonstrukte von *ems1* (Abb.4.42A) und *ems2* (Abb.4.42B) in einer Anordnung entsprechend der Hierarchie der Subkonstrukte. Eine erste Unterteilung ergab eine Phosphorylierung von *ems1* sowohl im N-terminalen (*ems1N*) als auch im C-terminalen Bereich (*ems1C*) des Konstrukts, wobei letzterer ein deutlich stärkeres Signal aufwies (Abb.4.42A). *ems2* wurde lediglich im N-terminalen Bereich des Konstrukts (*ems2N*) phosphoryliert (Abb.4.42B). Diese Daten entsprechen der bereits beobachteten stärkeren Phosphorylierung des übergeordneten Konstrukts *ems1* verglichen mit *ems2* (Abb.4.40). Die Analyse weiterer Subkonstrukte erlaubte schließlich die Identifikation von insgesamt drei phosphorylierten Regionen innerhalb von *Ems*. Innerhalb des N-terminalen Subkonstrukts *ems1N* konnte die Phosphorylierung auf die Konstrukte *ems1NB1* und *ems1NB2* eingegrenzt werden. Die Phosphorylierung von *ems1C* konnte dem Bereich der Überlappung von *ems1* mit *ems2* zugeordnet werden, da zwar *ems1C2* eine Phosphorylierung aufwies, das nachgeordnete Konstrukt *ems1C2N* jedoch nicht (vgl. Abb.4.41A). Eine genauere Kartierung dieser Phosphorylierungsregion erfolgte daher durch die Analyse der Subkonstrukte zu *ems2* (Abb.4.42B). Dabei wurde die Phosphorylierung auf den Sequenzbereich von *ems2NN* eingegrenzt.

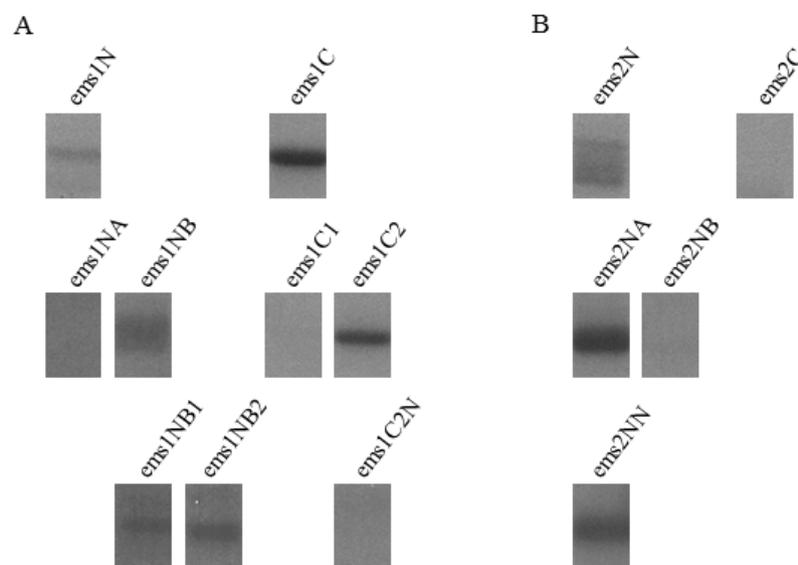


Abb.4.42. Untersuchung der Phosphorylierung der Ems-Eingrenzungskonstrukte. Dargestellt sind Autoradiogramme von *in vitro* Kinaseassays der Eingrenzungskonstrukte aus Abb.4.41. Als Positivkontrolle diente das zugehörige übergeordnete Konstrukt (nicht gezeigt). Da die verwendete Kinase und ihre Degradationsprodukte eine starke Autophosphorylierung zeigen, wurden die Autoradiogramme zur besseren Übersicht auf die Bereiche der Proteine von Interesse zugeschnitten. (A) Eingrenzungskonstrukte für *ems1*. (B) Eingrenzungskonstrukte für *ems2*.

4.3.3.3 Bestimmung der Phosphorylierungsstellen von Ems durch *in vitro* Mutagenese

Abschließend sollten auch die phosphorylierten Sequenzen von Ems durch die Analyse spezifischer Mutagenesekonstrukte genau kartiert werden. Eine Übersicht über die entsprechenden Konstrukte mit Position der mutierten Bereiche ist in Abbildung 4.23 dargestellt, die Klonierung erfolgte mit Hilfe der in Tabelle 4.15 aufgeführten Primer wie zuvor beschrieben (4.1.2).

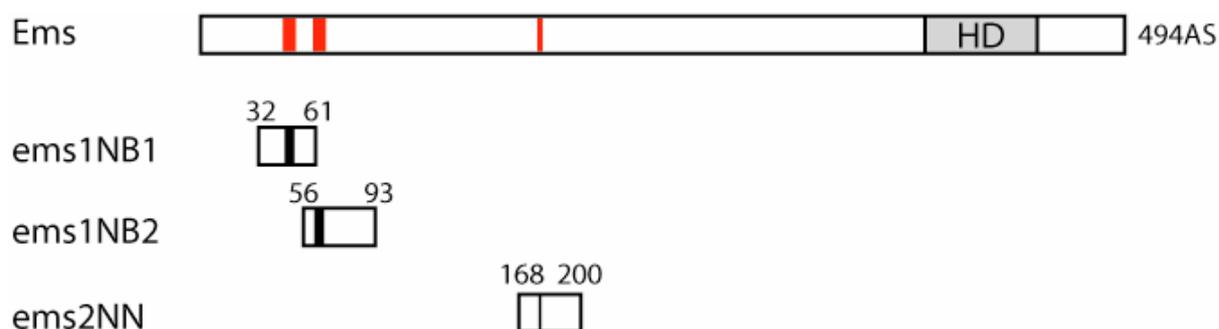


Abb.4.43. Schematische Darstellung der Mutagenesekonstrukte zur Bestimmung der phosphorylierten Motive von Ems. Gezeigt sind die mutierten Konstrukte mit ihrer Position in Relation zum Gesamtprotein inklusive der Positionsanzahl der jeweils terminalen Aminosäuren. Schwarze Balken markieren durch Mutagenese untersuchte Bereiche. Rote Balken kennzeichnen tatsächlich phosphorylierte Sequenzbereiche.

Tab.4.15. Verwendete Primer zur Klonierung der Ems-Mutagenesekonstrukte. Als Template diente der *ems*-cDNA-Klon cW13/7.

Konstrukt	Primer1	Primer2
ems1NB1mut1	ems15	ems1NB1mut1R
ems1NB2mut1	ems1NB2mut1F	ems8B
ems2NNmut1	ems2NNmut1F	emsE2

Abbildung 4.44 zeigt die jeweils durch Mutagenese veränderten Proteinsequenzen (Abb.4.44A) sowie die Autoradiogramme der durchgeführten *in vitro* Kinaseassays für die Mutagenesekonstrukte und ihre wildtypischen Entsprechungen (Abb.4.44B). In allen Fällen führte der Aminosäureaustausch zum Wegfall der Hipk-bedingten Phosphorylierung. Damit konnte die Phosphorylierung von Ems den Sequenzen PDL⁴⁸GPQS⁵²PP (ems1NB1), PGS⁶³PPQT⁶⁷PPA (ems1NB2) und KRERS¹⁸²PAPPK (ems2NN) zugeordnet werden.

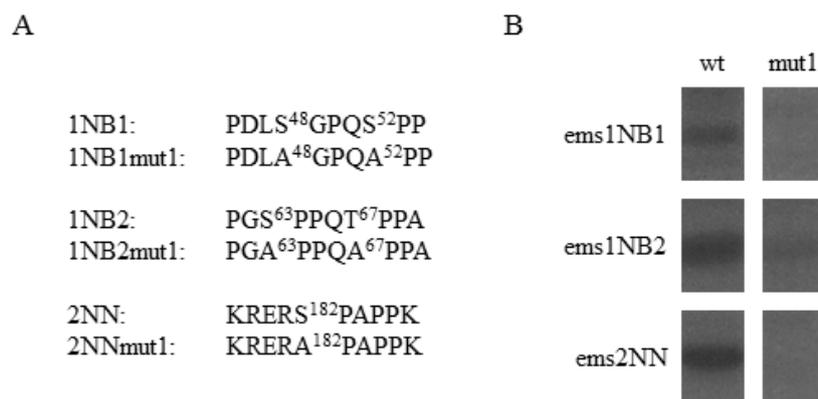


Abb.4.44. Analyse der Ems-Mutagenese-Konstrukte. (A) Gegenüberstellung der wildtypischen und mutierten Proteinsequenzen. (B) Autoradiogramme von *in vitro* Kinaseassays der mutierten Proteinkonstrukte im Vergleich mit ihren wildtypischen Entsprechungen. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Autoradiogramme auf den Bereich der Proteine von Interesse zugeschnitten.

5. Diskussion

5.1 Die Interaktion zwischen Hipk und Nito

5.1.1 *in vitro* Analyse der Interaktion zwischen Hipk und Nito

Ein primäres Ziel der vorliegenden Arbeit bestand im Nachweis und der weiterführenden Analyse einer Interaktion zwischen der Homeodomän-interagierenden Proteinkinase (Hipk) und dem kleinen SPOC-Protein Spenito (Nito). Nito stellte dabei aus verschiedenen Gründen einen wahrscheinlichen Interaktionspartner von Hipk dar. Zum einen konnte innerhalb der Arbeitsgruppe bereits das große SPOC-Protein Split ends (Spen) im Rahmen eines Hipk-spezifischen Enhancer-Suppressor-Screens als Wechselwirkungspartner von Hipk identifiziert und in nachfolgenden *in vitro* Analysen als Substrat der Kinase zugeordnet werden (Steinmetz, 2006; Dewald, 2008). Aufgrund des ähnlichen strukturellen Aufbaus der Proteine innerhalb der SPOC-Familie erschien eine Phosphorylierung weiterer Mitglieder dieser Gruppe naheliegend. Weiterhin konnte für Spen und Nito eine Interaktion als Antagonisten in der Augenentwicklung (Jemc und Rebay, 2006) sowie eine redundante Funktion im Wingless-Signalweg nachgewiesen werden (Chang et al., 2008). Eine Phosphorylierung zweier verwandter Proteine durch die gleiche Kinase könnte dabei einen Mechanismus zur Feinabstimmung der Signalübertragung in Entwicklungsprozessen darstellen. Mit Hilfe von Kreuzungsanalysen nach dem Prinzip des oben erwähnten Screens konnte in einer vorhergehenden Arbeit die genomische Region um *nito* als Träger eines oder mehrerer Interaktionspartner von Hipk zugeordnet und Nito damit als geeigneter Kandidat für eine Wechselwirkung mit der Kinase bestätigt werden (Dewald, 2008). Eine genauere Untersuchung sollte in der vorliegenden Arbeit erfolgen. Da zu diesem Zeitpunkt keine *nito*-Einzelgenmutante zur gezielten genetischen Analyse verfügbar war, wurde zunächst einer biochemischen Herangehensweise der Vorzug gewährt, die den direkten Nachweis einer möglichen Enzym-Substrat-Beziehung erlauben sollte.

Im Rahmen der in dieser Arbeit durchgeführten *in vitro* Phosphorylierungsstudie konnte Nito erfolgreich als Substrat von Hipk identifiziert werden. Durch die Analyse sukzessive trunkierter Konstrukte und den gerichteten Austausch einzelner Aminosäuren war es dabei möglich, die Phosphorylierung auf sechs Sequenzmotive einzugrenzen (4.1.2, Abb.5.1). Hierbei ist festzustellen, dass keine der phosphorylierten Sequenzen innerhalb der RNA-Erkennungsmotive (RRMs) oder der SPOC-Domäne zu finden ist (Abb.5.1). Da neben Nito auch Split ends ein Hipk-Substrat darstellt, deutet eine Phosphorylierung jenseits der in der

SPOC-Familie konservierten Proteindomänen auf eine differentielle Regulation der einzelnen SPOC-Proteine durch die Homeodomän-interagierende Proteinkinase hin. Eine Kartierung der Phosphorylierung von Split ends könnte in nachfolgenden Untersuchungen diese Vermutung untermauern. Beide SPOC-Proteine wurden in verschiedenen Untersuchungen dem Wingless-Signalweg zugeordnet (Lin et al., 2003; Chang et al., 2008). Hipk selbst wirkt durch Phosphorylierung und Stabilisierung des Wg-Effektors Armadillo sowie durch Interaktion mit TCF als positiver Regulator dieses Signalwegs (Lee et al., 2009b; Swarup und Verheyen, 2011; Verheyen et al., 2012). Damit erscheint die differentielle Phosphorylierung der SPOC-Proteine als wahrscheinliche weitere Ebene, auf der Hipk in die Steuerung der Übertragung des Wingless-Signals eingreift.

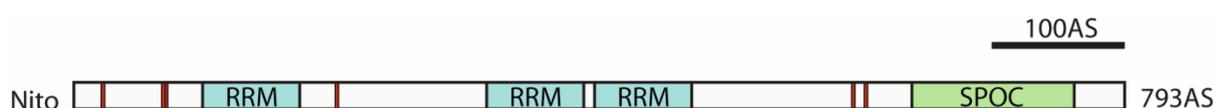


Abb.5.1. Die Phosphorylierung von Nito durch Hipk. Zu sehen ist eine schematische Darstellung der durch Mutagenese-Analysen identifizierten phosphorylierten Sequenzbereiche von Nito (rot) in Relation zu den konservierten Domänen im Gesamtprotein. blau: RNA-Erkennungsmotive (RRMs), grün: SPOC-Domäne.

Neuere, großangelegte Screens zeigen eine weitergehende Einordnung von Nito in verschiedene Signalwege (Schertel et al., 2013). Die Assoziation von Nito zum Wingless-Signalweg konnte in der beschriebenen Untersuchung nicht festgestellt werden; vielmehr wurde Nito als mögliche Komponente des Myc- und Hedgehog-Signalwegs eingruppiert. Eine tatsächliche Beteiligung von Nito an Prozessen des Wg-Signalwegs ist dennoch nicht auszuschließen, da es je nach Aufbau der jeweiligen Untersuchungen durchaus zu Abweichungen in den Resultaten kommen kann. Des Weiteren erscheint auch im Umfeld des Hedgehog-Signalwegs eine Regulation von Nito durch Hipk-vermittelte Phosphorylierung als nicht unwahrscheinlich, da Hipk hier ebenfalls durch Stabilisierung des entsprechenden Effektor (Cubitus interruptus, Ci) positiv auf die Signalübertragung einwirkt (Swarup und Verheyen, 2011, Verheyen et al., 2012).

Die in dieser Arbeit für Nito nachgewiesene Zahl von sechs phosphorylierten Zielsequenzen erscheint hoch im Vergleich mit anderen Hipk-Substraten wie z.B. Groucho oder Homeobrain (Choi et al., 2005; Steinmetz, 2006; Dewald, 2008) und erschwert insbesondere im Hinblick auf die Möglichkeiten der Kombinatorik die Zuordnung der jeweiligen funktionalen Bedeutung der einzelnen Phosphorylierungsstellen. Dabei ist jedoch zu beachten, dass die

Expression der Fusionsproteine im bakteriellen System einen artefiziellen Hintergrund darstellt, der nicht zwingend eine dem natürlichen Zustand entsprechende Faltung der Proteine erlaubt. Dadurch sowie durch die für die Kartierung notwendige Trunkierung der Proteine besteht die Möglichkeit, dass in der *in vitro* Analyse Zielsequenzen freigelegt werden, die im nativen System für die Kinase nicht zugänglich sind.

5.1.2 *in vivo* Analyse mittels BiFC

Zur Unterstützung der *in vitro* ermittelten Daten sollte die Interaktion zwischen Hipk und Nito auch *in vivo* untersucht werden. Die durchgeführten Yeast-Two-Hybrid-Analysen erwiesen sich dabei allerdings als unbrauchbar, da Nito selbst bereits starke Eigeneffekte aufwies: Sowohl im Colony-lift Filter-Assay als auch bei der Wachstumsselektion auf Mangelmedien führte die Expression der Fusion aus Nito und Gal4-Bindedomäne zusammen mit einer freien Gal4-Aktivierungsdomäne zu einer unspezifischen Reporter-genaktivierung (4.1.3.1, Abb.4.11). Ursache hierfür könnte einerseits eine Bindung an die freie Domäne des Gal4-Transkriptionsfaktors oder eine Funktion von Nito als eine Art Transkriptionsfaktor sein. Beides erscheint naheliegend, da in Vertebraten die SPOC-Proteine SHARP und MINT bereits mit Funktionen in der transkriptionellen Regulation in Verbindung gebracht werden konnten (Shi et al., 2001; Oswald et al., 2002; Kuroda et al., 2003; Yang et al., 2005). Dieses Problem zeigt eine prinzipielle Schwäche des Yeast-Two-Hybrid-Systems, das es unter den gegebenen Bedingungen nicht erlaubt, Proteine sicher zu untersuchen, wenn diese ihrerseits Einfluss auf die Genexpression ausüben können.

Die Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation in *Drosophila* (Gohl et al., 2010) erlaubte die Umgehung des beschriebenen Problems, da hier ein direkterer Nachweis der Interaktion durch Rekonstitution eines Fluoreszenzproteins im Herkunftsorganismus erfolgen konnte. Im Rahmen dieser Arbeit war es neben der Bestätigung der Interaktion zwischen Hipk und Nito möglich, mit Groucho eine systemimmanente Positivkontrolle zum Nachweis von Interaktionen der Homeodomän-interagierenden Proteinkinase zu etablieren. Für die zukünftige Analyse weiterer potentieller Wechselwirkungspartner ist es jedoch immer noch von großer Bedeutung, verschiedene Kombinationen der Orientierung der jeweiligen YFP-Fusionen zu analysieren um die jeweils bestmöglichen sterischen Bedingungen für eine erfolgreiche Fluoreszenzkomplementation zu erzielen (Kerppola, 2008). Dabei kann die Topologie der Fusionsproteine einen negativen Einfluss auf die Stärke des Fluoreszenzsignals, also auf die Rekonstitution des Fluoreszenzproteins, aber auch auf die Stärke der zu untersuchenden Interaktion selbst ausüben; eine effektive Vorhersage des

optimalen Aufbau von Fusionsproteinen für BiFC-Analysen ist bisher allerdings auch bei Kenntnis der Interaktionsdomänen nicht möglich (Hudry et al., 2011). Die Größe von Hipk bzw. ein möglicher Größenunterschied zu den jeweiligen Interaktionspartnern kann in diesem Zusammenhang eine zusätzliche Rolle spielen, da hier nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden kann, dass die YFP-Komponenten zumindest in einzelnen Kombinationen der verschieden aufgebauten Fusionsproteine trotz einer stattfindenden Interaktion weiterhin räumlich zu weit voneinander entfernt vorliegen, um eine ausreichend gut nachweisbare Fluoreszenzkomplementation zu gewährleisten.

Da für jedes auf eine Interaktion mit Hipk zu untersuchende Protein mindestens eine bzw. unter Berücksichtigung der möglichen YFP-Fusionen zwei neue transgene Fliegenlinien erzeugt und in verschiedenen Kreuzungsansätzen analysiert werden müssen, bringt die Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation im *Drosophila*-System einen beträchtlichen praktischen Aufwand mit sich. Somit ist diese Methode zwar für die Bestätigung einer bereits *in vitro* bestimmten Interaktion einsetzbar, eignet sich jedoch nur in sehr begrenztem Umfang als Ausgangspunkt für die Suche nach weiteren Hipk-Interaktionspartnern.

5.1.3 Die funktionale Bedeutung der Interaktion zwischen *hipk* und *nito*

Um Rückschlüsse auf die funktionale Bedeutung der Interaktion zwischen *hipk* und *nito* ziehen zu können, wurden die Auswirkungen einer Veränderung der Gendosis von *hipk* und *nito* allein und in den verschiedenen möglichen Kombinationen in adulten Fliegen untersucht. Die alleinige Veränderung der *hipk*-Dosis führte dabei zu eher schwachen Effekten (4.1.4.4), während die Modifikation der *nito*-Expression mit stark ausgeprägten Phänotypen und häufig auch mit einer hohen Letalitätsrate einherging (4.1.4.2, 4.1.4.3). Diese massiven Effekte konnten sowohl im augenspezifischen als auch im flügel-spezifischen Hintergrund beobachtet werden, was die bereits durch andere Arbeitsgruppen konstatierte Bedeutung von *nito* für die Entwicklung der jeweiligen Strukturen weiter unterstreicht (Jemc und Rebay, 2006; Chang et al., 2008). Insgesamt verursachte die Reduktion der *nito*-Gendosis phänotypische Effekte, die denen der Überexpression ähnlich, jedoch deutlich schwächer ausgeprägt waren. Auch Letalität trat seltener auf. Eine mögliche Ursache hierfür besteht in der kontextabhängigen Redundanz zu *spen* (Chang et al., 2008), die eine partielle Kompensation der reduzierten *nito*-Expression bewirken könnte. Weiterhin ist die Möglichkeit eines dominant-negativen Effekts der Fehlexpression von *nito* in Betracht zu ziehen, wie er in einem großangelegten Screen von Schertel et al. (2013) für etwa 40% der dort untersuchten Gene beobachtet wurde. Ist ein durch ein solches Gen codiertes Protein am Aufbau größerer Multimer-Komplexe beteiligt,

könnte die Überexpression ebenso wie eine Reduktion zu Störungen in der Stöchiometrie dieser Komplexe und damit zu einer generellen Beeinträchtigung der Funktionalität führen (Schertel et al., 2013). Ähnliche Auswirkungen wären auch in Falle kleinerer Proteinkomplexe, beispielsweise aus transkriptionellen Cofaktoren, denkbar. Die Zuordnung als Komponente des Spliceosoms, aber auch die Beteiligung an verschiedenen Signalwegen machen Nito damit zu einem geeigneten Kandidaten für die zuvor beschriebenen Effekte (Chang et al., 2008; Herold et al., 2009; Schertel et al., 2013)

Eine eindeutige funktionale Beziehung zwischen *hipk* und *nito* konnte im Rahmen der durchgeführten Untersuchung nicht hergestellt werden, da die zusätzliche Modifikation der *hipk*-Gendosis keine oder nur geringfügige Veränderungen der *nito*-abhängigen Phänotypen verursachte (4.1.4.4, Abb.4.17, Abb.4.18). Aufgrund des geringen Ausmaßes der Veränderung und der Streuung der Einzelphänotypen konnte daher nicht mit Sicherheit festgestellt werden, ob es sich bei den beobachteten kombinierten Phänotypen um Varianten eines (*nito*-spezifischen) Einzelphänotyps, additive Effekte oder tatsächlich um interaktionsbedingte Resultate handelt. Abbildung 5.2 zeigt eine schematische Darstellung dieser Problematik. Die häufig auftretende Letalität erlaubte zudem nur eine eingeschränkte Auswertung verschiedener Gendosis-Kombinationen, da Änderungen in der *hipk*-Dosis keine Rettung der Letalität bewirkten und eine Verstärkung des Phänotyps hier naturgemäß nicht mehr möglich war. Eine Umgehung eventueller Interferenzeffekte durch die Interaktion zwischen *nito* und *spen* wurde versucht, indem durch Einkreuzen einer entsprechenden RNAi-Linie in den verschiedenen Untersuchungsansätzen zusätzlich die Gendosis von *spen* reduziert wurde. Dies führte jedoch lediglich zur Reproduktion der bereits beschriebenen Beziehung der beiden SPOC-Proteine (Jemc und Rebay, 2006; Chang et al., 2008). Der funktionale Einfluss von *hipk* konnte allerdings auch hier nicht näher spezifiziert werden (nicht gezeigt). Sowohl Nito als auch Spen wurden durch *in vitro* Analysen als Substrate von Hipk identifiziert (Dewald, 2008), was in Kombination mit den vorliegenden genetischen Daten die Annahme komplexer Interaktionen zwischen diesen drei Proteinen, gegebenenfalls auch unter Beteiligung weiterer Faktoren, nahelegt. Auch Regulationsmechanismen auf der Basis von Feedback-Loops können angesichts der Beteiligung der SPOC-Protein-Familie an Prozessen der transkriptionellen (Kuang et al., 2000; Shi et al., 2001; Oswald et al., 2002; Chang et al., 2008) und translationalen (Rebay et al., 2000; Lindtner et al., 2006; Herold et al., 2009) Regulation nicht ausgeschlossen werden.

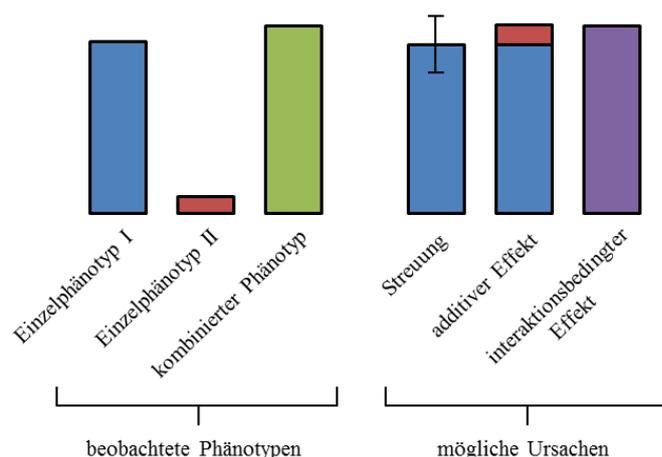


Abb.5.2. Schematische Darstellung der Problematik in der Auswirkung der phänotypischen Effekte bei gleichzeitiger Veränderung der Gendosis von *nito* und *hipk*. Die Dosisänderung eines Gens (*nito*) bewirkt einen starken Phänotyp (blau), die des anderen (*hipk*) einen schwachen (rot). Die gleichzeitige Veränderung beider Gendosen geht mit einem Phänotyp einher, der nur geringfügig von dem stärkeren der beiden Einzelphänotypen abweicht (grün). Mögliche Ursachen können in der Streuung des starken Einzelphänotyps, einer einfachen Addition der Phänotypen oder einer tatsächlichen, interaktionsbedingten Veränderung liegen.

5.1.4 *in vivo* Analyse der Nito-Phosphomutanten

Als weiterer Ansatz zur Aufklärung der funktionalen Bedeutung der Hipk-vermittelten Phosphorylierung von Nito wurden transgene Fliegen zur ektopischen Expression verschiedener Nito-Phosphomutanten erzeugt. Bei dieser Analyse zeigten sich jedoch ähnliche Probleme, wie sie bereits für die ektopische Expression von wildtypischem Nito bekannt waren, d.h. die Expression der Konstrukte führte in fast allen Fällen zur Letalität (4.1.5.2, Tab.4.8). Ein rettender Effekt des veränderten Phosphorylierungsstatus konnte hierbei lediglich bei Fehlexpression über GMR-Gal4 festgestellt werden, wobei sich folgende Hierarchie der Letalitätsraten ergab: Wildtyp (80-90%) > N-terminale Mutante (50-60%) > C-terminale Mutante (30%) > N- und C-terminale Mutante (10-20%). Offensichtlich ist in diesem Kontext vor allem die (Nicht-)Phosphorylierbarkeit der C-terminalen Zielsequenzen durch Hipk von größerer Bedeutung für die Lebensfähigkeit. Interessanterweise erschien jedoch der C-Terminus von Nito im *in vitro* Kinaseassay deutlich schwächer phosphoryliert als die N-terminalen Bereiche. Damit zeigt sich, dass die Stärke der Phosphorylierung *in vitro* nicht zwingend ein Maß für ihre funktionale Relevanz *in vivo* darstellt.

Obwohl die Untersuchung im GMR-Hintergrund Hinweise auf eine funktionale Relevanz der Hipk-abhängigen Phosphorylierung von Nito liefert, muss dennoch die Frage gestellt werden, warum ein Einfluss von Hipk nicht auch in den anderen untersuchten Expressionsmustern festzustellen ist. Als Erklärung hierfür kommen mehrere Ursachen in Frage. So ist es

beispielsweise möglich, dass nur ein Teil der *in vitro* identifizierten Phosphorylierungsstellen im nativen Protein überhaupt für die Kinase zugänglich und damit *in vivo* von funktionaler Bedeutung ist. Auch eine von weiteren Signalen oder Cofaktoren abhängige, eventuell auch differentielle Phosphorylierung der einzelnen Zielsequenzen durch Hipk kann nicht ausgeschlossen werden. Bei Fehlen des entsprechenden Signals/Cofaktors würde Nito nicht oder nur teilweise phosphoryliert, so dass sich verschiedene Phosphomutanten in der Konsequenz gleich verhalten. Weiterhin konnte bereits für das Hipk-Substrat Yorkie gezeigt werden, dass eine durch Hipk phosphorylierte Aminosäure (Ser¹⁶⁸) auch Ziel für die Phosphorylierung durch eine andere Kinase (Warts) sein kann (Oh und Irvine, 2008; Meier, 2013). Ein ähnlicher Mechanismus könnte auch im Fall von Nito vorliegen, so dass durch die Mutagenese der Hipk-spezifischen Zielsequenzen auch Phosphorylierungsstellen anderer Kinasen betroffen sind, wodurch die Regulation von Nito auf verschiedenen Ebenen in komplexerem Umfang gestört würde. Der vollständige Ausfall einer entsprechenden Phosphorylierung könnte hier unter anderem zu grundsätzlichen Veränderungen in der Affinität von Nito zu verschiedenen Wechselwirkungspartnern führen und dadurch die Stabilität funktionaler Komplexe, wie beispielsweise des Spliceosoms (Herold et al., 2009), auch Hipk-unabhängig beeinträchtigen. Dominant negative Effekte durch die reine Überexpression, wie bei Schertel et al. (2013) beschrieben, könnten phosphorylierungsunabhängig sein und kommen daher als Erklärung der durchgängigen Letalität ebenfalls in Frage.

Zur weiteren Analyse der Bedeutung der Hipk-vermittelten Phosphorylierung von Nito könnte es notwendig sein, alle Phosphorylierungsstellen einzeln im Hinblick auf ihren phänotypischen Einfluss zu untersuchen. Auch die Auswahl eines geeigneten Expressionszeitpunktes und –gewebes kann durch den Einsatz zusätzlicher Treiberlinien optimiert werden. Zudem dürfte die Erzeugung und Expression komplementärer phosphomimetischer Mutanten von Nito weiteren Einblick in die funktionalen Zusammenhänge der Interaktion mit Hipk erlauben.

5.1.5 Die mögliche Konservierung der Interaktion

In der vorliegenden Arbeit konnte eine Interaktion zwischen Hipk und dem SPOC-Protein Nito in *Drosophila* nachgewiesen werden. Da viele zelluläre Prozesse, insbesondere im Hinblick auf die Signalübertragung im Allgemeinen aber auch speziell auf die Beteiligung der Homeodomän-interagierenden Proteinkinasen, evolutionär konserviert sind, stellt sich für zukünftige Arbeiten die Frage, ob auch in Vertebraten eine Enzym-Substrat-Beziehung

zwischen HIPK2 und dem Nito-Homolog RBM15/OTT1 nachweisbar ist. Die bisher verfügbaren Informationen über die beiden Proteine und ihre Homologe zeichnen dabei einen Hintergrund, der eine entsprechende Interaktion durchaus plausibel erscheinen lässt.

So konnte beispielweise Hipk in *Drosophila* als positiver Regulator des Notch-Signalwegs nachgewiesen werden, während RBM15 in Vertebraten als Repressor des Notch-Signals diskutiert wird (Ma et al., 2007; Lee et al., 2009b). Bei ausreichender Konservierung des Signalwegs könnte hier also eine Möglichkeit zur Interaktion sowohl in *Drosophila* als auch in Vertebraten gegeben sein. Besonderes Augenmerk verdient im Hinblick auf eine mögliche funktionale Beziehung zwischen HIPK2 und RBM15 jedoch vor allem die Zuordnung beider Proteine zu verschiedenen Krebsformen. HIPK2 wirkt unter anderem als positiver Regulator des proapoptotischen Tumorsuppressors p53 (D'Orazi et al., 2012, Hofmann et al., 2013) und wurde in diesem Zusammenhang mit diversen Prozessen in der Entwicklung von Schilddrüsenkrebs und Colonkarzinomen in Verbindung gebracht (D'Orazi et al., 2010; Lavra et al., 2011). Weiterhin wurde die Kinase als Repressor in der β -catenin-abhängigen Entwicklung von Hautkrebs identifiziert (Wei et al., 2007). RBM15 ist bekannt als Teil eines Fusionsproteins, welches durch eine Translokation entsteht, die durch bisher ungeklärte Mechanismen zu akuter megakaryoblastischer Leukämie führt (Ma et al., 2001; Mercher et al., 2001). Neuere Studien zeigen zudem einen veränderten RBM15-Level in verschiedenen Brustkrebs-Zelllinien (Lanigan et al., 2010). In *Drosophila* konnten Homologe beider Proteine dem Wingless-Signalweg zugordnet werden (Jemc und Rebay, 2006; Lee et al., 2009b), dem seinerseits ebenfalls eine Rolle in der Krebsentstehung zugeschrieben wird (Clevers, 2006). Eine Beteiligung von HIPK2 an der Wnt-vermittelten Signalübertragung in Vertebraten konnte bereits auf verschiedenen Ebenen gezeigt werden (Puca et al., 2008; Hikasa et al., 2010; Kim et al., 2010; Hikasa und Sokol, 2011); eine Rolle von RBM15 wäre aufgrund der starken Konservierung des Signalwegs naheliegend. Der Nachweis einer Interaktion zwischen HIPK2 und RBM15 könnte daher neue Einsichten in die Abläufe kanzerogener Prozesse eröffnen und damit eventuell auch diagnostische und therapeutische Implikationen mit sich bringen.

5.2 Die weitere Analyse von Nito

5.2.1 Die Expression von Nito

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein polyklonaler Antikörper gegen einen C-terminalen Bereich von Nito erzeugt und damit das Expressionsmuster auf Proteinebene sichtbar gemacht. Dabei ergab sich sowohl embryonal als auch larval eine nukleäre, ubiquitär erscheinende Expression, die auf den ersten Blick mit der bei Herold et al. (2009) beschriebenen Identifikation von Nito als Komponente des Spliceosoms konform geht. Betrachtet man jedoch die Gegenfärbung des Gliazellmarkers Repo (4.2.1.3, Abb.4.26), so zeigt sich, dass Nito zwar in vielen, jedoch nicht in allen Zellen des *Drosophila*-Embryos angefärbt wird. Dies widerspricht einer konstitutiven Rolle von Nito im Splicing-Prozess, da dieser als Haushaltsfunktion in allen Zellen, also auch in Gliazellen, durchgängig stattfindet. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte in einer zelltypabhängigen Beteiligung von Nito an der Verarbeitung spezifischer Transkripte bestehen. Im Laufe der Embryonalentwicklung zeigt Nito eine Anreicherung entlang des Nervensystems und durch Cofärbung mit einem Antikörper gegen den neuronalen Marker Elav konnte zudem eine Expression in embryonalen und larvalen Neuronen bestätigt werden (4.2.1.3, Abb.4.25). Zusammengenommen deutet dies auf eine allgemeine Rolle von Nito in der Entwicklung des Nervensystems hin. Unterstützt wird diese Annahme durch Screens zur Suche nach Faktoren mit Beteiligung an der Selbsterneuerung neuronaler Stammzellen im larvalen *Drosophila*-Gehirn. In diesen Untersuchungen führte die Reduktion der *nito*-Gendosis zu einer Unterproliferation im larvalen Nervensystem (Neumüller et al., 2011). Weiterhin wurde für Nito eine verstärkte Expression in ausdifferenzierten Neuronen festgestellt (Berger et al., 2012).

Eine Untersuchung der Colokalisation von Nito mit Hipk konnte in dieser Arbeit nur in sehr begrenztem Umfang erfolgen, da es bisher nicht möglich war, einen anti-Hipk-Antikörper in ausreichender Qualität herzustellen. Somit konnten lediglich die Expressionsmuster beider Gene auf Transkriptebene sichtbar gemacht und indirekt verglichen werden. Dabei ergab sich eine weitreichende Übereinstimmung der Expressionsmuster sowohl bezüglich der ubiquitären Basisexpression als auch hinsichtlich der Anreicherung im Nervensystem. Eine Hipk-vermittelte Regulation der Funktion von Nito, insbesondere während der Nervensystementwicklung, erscheint damit naheliegend.

5.2.2 Herstellung und Analyse einer *nito*-Mutante

Da zu Beginn dieser Arbeit keine mutanten Allele für die Untersuchung von *nito* verfügbar waren, bestand ein Ziel in der eigenen Herstellung einer Nullmutante durch Ends-out Gene Targeting. Bei der Analyse der resultierenden balancierten Fliegenlinie *nito*^{GT} ergab sich eine Gesamtletalität von mehr als 64%. Diese setzt sich zusammen aus einer basalen Letalitätsrate von 25%, verursacht durch das homozygote Vorliegen des Balancers, und der eigentlichen Letalität bedingt durch das mutante Allel. Dabei lässt die Aufteilung auf embryonale und larvale Letalität auf ein Absterben im späten Embryonalstadium und frühen Larvalstadium bzw. im Übergang zwischen den Stadien schließen. Die Letalitätsrate bestätigt damit eine funktionelle Relevanz von *nito* im Verlauf der *Drosophila*-Entwicklung, wie sie aufgrund des beobachteten, relativ ubiquitären Expressionsmusters (4.2.1.2) und der Zuordnung zu Nervensystementwicklung und Splicing angenommen werden konnte (Herold et al., 2009; Neumüller et al., 2011, Berger et al., 2012).

Mit über 64% liegt die Letalität des Stamms *nito*^{GT} deutlich über der zu erwartenden Letalitätsrate von 50% für ein balanciertes, homozygot letales Allel. Eine mögliche Ursache hierfür könnte in einer partiellen Haploinsuffizienz von *nito* liegen, d.h. das verbleibende intakte Allel reicht unter Umständen nicht aus, um eine ungestörte Entwicklung zu gewährleisten. Da keine weiteren *nito*-Mutanten zur Verfügung stehen, war es jedoch nicht möglich, diese Vermutung durch die vergleichende Analyse zusätzlicher Allele weiter zu untersuchen bzw. zu verifizieren. Die Untersuchung von in vorhergehenden Arbeiten verwendeten Defizienzstämmen (BL6144; Dewald, 2008), in denen größere genomische Bereiche um den *nito*-Locus deletiert sind, zeigte zwar eine noch höhere Letalitätsrate von bis zu 80%. Diese scheint jedoch nicht an ein spezifisches Gen, sondern vielmehr an die prinzipielle Deletion eines größeren Sequenzbereichs gekoppelt zu sein, da vergleichbare Resultate innerhalb der Arbeitsgruppe auch für Defizienzen anderer genomischer Regionen festgestellt wurden (nicht gezeigt). Artefiziell eingeführte letale Mutationen in benachbarten Genen oder regulatorischen Elementen durch PCR-bedingte Mutationen im Targeting-Konstrukt können ausgeschlossen werden, da die Sequenz der zur Rekombination eingesetzten Homologiearme bereits im Rahmen ihrer Klonierung überprüft wurde. Es besteht allerdings die Möglichkeit, dass es sich bei der erhöhten Letalität von *nito*^{GT} nicht um einen genspezifischen, sondern um einen durch das Targeting-Ereignis selbst bedingten Effekt handelt. Eine ähnlich gesteigerte Letalitätsrate eines Targeting-Allels konnte auch in einer anderen Arbeit beobachtet werden (Bach, 2011). Dort konnte ein genspezifischer Effekt zwar relativ sicher ausgeschlossen werden, eine tatsächliche Ursache der hohen Letalitätsrate war

allerdings nicht feststellbar. In beiden Fällen waren durch die Targeting-vermittelte Deletion keine bekannten haploinsuffizienten Loci betroffen (Marygold et al., 2007; Bach, 2011). Dennoch besteht die Möglichkeit, dass bei einem Targeting-Ereignis durch die Deletion bisher unbekannte haploinsuffiziente Loci oder nicht codierende, regulatorische Elemente anderer Gene entfernt werden. Durch den Austausch des deletierten Bereichs gegen in der Größe abweichende Vektor-DNA in Form des *white*-Markergens könnte es weiterhin zu Verschiebungen in der relativen Entfernung einzelner regulatorischer Elemente kommen. Entsprechende Effekte könnten dann additiv zu der spezifischen, durch das Ausschalten des Zielgens bedingten Letalität wirken und zur überproportionalen Gesamtletalität beitragen.

Erste phänotypische Analysen von $nito^{GT}$ erlaubten keinen Rückschluss auf die Ursache der beobachteten Letalität. Offensichtliche morphologische Defekte konnten im Embryonalstadium nicht festgestellt werden. Heterozygote adulte Fliegen zeigten ebenfalls keine erkennbaren phänotypischen Veränderungen, was gegen eine Haploinsuffizienz von *nito* spricht. Würde ein solcher Effekt vorliegen, wären bei einer phänotypischen Verteilung von letal bis wildtypisch auch diverse Zwischenstufen mit mehr oder weniger ausgeprägter Schädigung zu erwarten. Es liegt nun an zukünftigen Studien, die Auswirkungen des *nito*-Nullallels genauer zu charakterisieren und dadurch die Ursache für die damit einhergehende Letalität aufzudecken.

Da die embryonale/larvale Letalität von $nito^{GT}$ lediglich eine Betrachtung mutanter Embryonen erlaubt, wurden zur Analyse späterer Effekte mit Hilfe des MARCM-Systems *nito*-defiziente Zellklone erzeugt und in larvalen sowie adulten Strukturen untersucht. Auch hier konnten jedoch im Rahmen der durchgeführten Analysen kaum signifikante Musterausfälle festgestellt werden. Lediglich im adulten Flügel war eine schwache Korrelation zwischen dem Vorkommen mutanter Klone und dem Auftreten veränderter Venenstrukturen zu beobachten. Dabei offenbarten sich Schwierigkeiten im Nachweis der klonspezifischen Fluoreszenzmarkierung aufgrund von Schwankungen in der Signalstärke im adulten Gewebe, so dass schwach markierte Klone eventuell nicht identifiziert oder Klongrenzen nur ungenau bestimmt werden konnten. Die Etablierung einer stärkeren Klonmarkierung oder einer effizienteren Nachweismethodik könnte daher eine effektivere Klon-Phänotyp-Korrelation erlauben.

Die weiteren Gründe für das insgesamt fast vollständige Fehlen nachweisbarer phänotypischer Auswirkungen können vielfältig sein. Technische Ursachen wie eine zu niedrige Frequenz in der Erzeugung der Klone, zu geringe Klongröße oder eine persistierende

Nito-Expression innerhalb der Klone konnten durch fluoreszenzmikroskopische Auswertung entsprechender larvaler Gewebe sowie durch Anfärbung mit dem in dieser Arbeit erzeugten anti-Nito-Antikörper ausgeschlossen werden. Eine mögliche Erklärung könnte darin bestehen, dass *nito* eventuell vor allem für den korrekten Ablauf früher Phasen der *Drosophila*-Entwicklung relevant ist und ein Ausfall in späteren Stadien damit nur noch geringfügige Auswirkungen hätte. Dem entgegen stehen die ubiquitäre Expression in larvalen Geweben sowie die Zuordnung als Komponente des Spliceosoms (Herold et al., 2009), die eine funktionale Relevanz auch in späteren Entwicklungsstadien nahelegen. Andererseits verursachte nur die Überexpression von *nito* mit larval aktiven Treibern (z.B. MS1096-Gal4, GMR-Gal4) massiv ausgeprägte Phänotypen, während die Reduktion der Gendosis im gleichen System weit weniger schwerwiegende Effekte zur Folge hatte. Wie im Fall der RNA-Interferenzstudie könnte auch hier eine partielle Kompensation des *nito*-Ausfalls durch *split ends* vorliegen (4.1.4.3, 5.1.3). Ein möglicher Effekt des *nito*-Ausfalls könnte sich zudem nicht in offensichtlichen Strukturveränderungen, sondern vielmehr in der veränderten Expression eines direkt oder indirekt von *nito* abhängigen Zielgens ausdrücken. Im Rahmen dieser Arbeit konnten jedoch nur die Expressionsmuster einzelner Gene als Repräsentanten ausgewählter Signalwege und Entwicklungsprozesse untersucht werden. Da bisher nur wenige konkret durch *nito* beeinflusste Gene bekannt sind, könnte eine hinreichende Charakterisierung des *nito*^{GT}-Allels gegebenenfalls erst nach der Identifizierung entsprechender Zielgene möglich sein.

5.3 Hipk phosphoryliert die Homeodomän-Transkriptionsfaktoren Msh und Ems

Neben Nito wurden in dieser Arbeit weitere potentielle Substrate der Homeodomän-interagierenden Proteinkinase untersucht. Damit sollten einerseits weitere Informationen über das Interaktionsspektrum der Kinase gewonnen werden, andererseits sollte die Identifikation zusätzlicher Zielsequenzen dazu beitragen, die im Rahmen der Analyse von Nito entworfenen Konsensusmotive für eine Hipk-abhängige Phosphorylierung (4.1.2.3, Abb. 4.9) zu untermauern oder, falls möglich, sogar zu verfeinern (für eine genauere Diskussion siehe 5.4). Für die Durchführung entsprechender Analysen wurden die Homeodomän-Transkriptionsfaktoren Msh und Ems ausgewählt. Da die Homeodomän-interagierenden Proteinkinasen initial über die Interaktion mit verschiedenen Homeodomän-Transkriptionsfaktoren identifiziert wurden (Kim et al., 1998), erschienen Mitglieder dieser Proteinfamilie als besonders geeignete Kandidaten. Weiterhin verfügen beide Faktoren über

eine konservierte Oktapeptidsequenz und erfüllen Funktionen in der Entwicklung des Nervensystems (Walldorf und Gehring, 1992; Lord et al., 1995; Hirth et al., 1995; D'Alessio und Frasch, 1996). Damit weisen sie zudem sowohl strukturelle als auch funktionale Parallelen zu dem bereits in vorangehenden Arbeiten identifizierten Hipk-Substrat Homeobrain auf (Walldorf et al., 2000; Dewald, 2008; Kaspar 2008). Die Untersuchung einer möglichen Colokalisation von Msh bzw. Ems und Hipk konnte auch hier, wie im Fall von Nito, aufgrund des Fehlens eines geeigneten anti-Hipk-Antikörpers nur durch den indirekten Vergleich der Expressionsmuster auf Transkriptebeine erfolgen. Dabei legen die Expression von *msh* und *ems* in Zellen des Nervensystems sowie die ubiquitäre Expression von *hipk* mit Anreicherung im ZNS eine ausreichende Überschneidung der zeitlichen und räumlichen Aktivitätsmuster der potentiellen Interaktionspartner nahe.

Sowohl Msh als auch Ems konnten im Rahmen der vorliegenden Arbeit als Substrate von Hipk nachgewiesen und bezüglich ihrer phosphorylierten Bereiche genauer kartiert werden. Für beide Faktoren wurden jeweils drei durch Hipk phosphorylierbare Sequenzmotive identifiziert (Abb.5.3). Mögliche Bedeutungen der hier aufgedeckten Enzym-Substrat-Beziehungen werden nachfolgend im Einzelnen diskutiert.



Abb.5.3. Die Phosphorylierung von Ems und Msh durch Hipk. Zu sehen ist eine schematische Darstellung der durch Mutagenese-Analysen identifizierten phosphorylierten Sequenzbereiche von Ems bzw. Msh (rot) in Relation zu den konservierten Domänen im Gesamtprotein. blau: Oktapeptid, grün: Homeodomäne (HD).

5.3.1 Hipk phosphoryliert Msh

Der Transkriptionsfaktor Msh erfüllt während der Entwicklung von *Drosophila* Funktionen in der Musterbildung verschiedener embryonaler Strukturen. So wird Msh mesodermal eine Schlüsselrolle in der regionalen Spezifikation ausgewählter Muskelvorläuferzellen zugeschrieben (Nose et al., 1998). Während der Entwicklung des Nervensystems ist Msh zunächst an der dorsoventralen Musterbildung des Neuroektoderms und später an der Neuroblastenspezifikation und Definition der Neuroblastenidentität beteiligt (D'Alessio und Frasch, 1996; Buescher und Chia, 1997; Isshiki et al., 1997; Von Ohlen und Doe, 2000). Die ektodermale Expression von *msh* wird unter anderem durch die beiden Segmentpolaritätsgene *wingless* (*wg*) und *hedgehog* (*hh*) aktiviert (D'Alessio und Frasch, 1996). Sowohl im

Wingless- als auch im Hedgehog-Signalweg wirkt die Homeodomän-interagierende Proteinkinase als positiver Regulator (Lee et al., 2009b; Swarup und Verheyen, 2011, Verheyen et al., 2012), so dass die Hipk die Funktion von Msh und die davon abhängigen neurogenen Prozesse einerseits auf direktem Wege durch Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors, andererseits auch indirekt durch Modulation der eingehenden Wg- und Hh-Signale steuern könnte. Dabei wäre auch eine differentielle Regulation denkbar, bei der Hipk zwar durch Promotion der Signalübertragung die Expression von *msh* fördert, die Aktivität des Proteins jedoch durch Phosphorylierung wieder reduziert. Funktionale Analysen auf Basis der Interaktion zwischen Msh und Hipk könnten in zukünftigen Arbeiten weiteren Aufschluss über die Rolle von Hipk in der mesodermalen und neuronalen Musterbildung geben. Mögliche Ansatzpunkte wären hier beispielsweise die *in vivo* Untersuchung von Msh-Phosphomutanten, die Bestimmung des Expressionslevels von *msh* in *hipk*-defizienten Zellpopulationen oder die Prüfung von *hipk*-Mutanten hinsichtlich *msh*-korrelierter Phänotypen.

Msh verfügt in Säugern über drei Homologe (MSX1-3), deren Expressionsmuster in einem gewissen Umfang Übereinstimmungen mit der Expression von *msh* in *Drosophila* aufweisen (Davidson, 1995; Wang et al., 1996; Alappat et al., 2003). Somit wäre auch in diesem Fall die Prüfung einer möglichen Konservierung der Hipk-vermittelten Phosphorylierung interessant. In Vertebraten wurde, ähnlich wie in *Drosophila*, eine Beteiligung von MSX-Genen an der dorsalen Musterbildung des Neuralrohrs beschrieben (Liu et al., 2004; Ramos und Robert, 2005). Eine Phosphorylierung von MSX durch HIPK2 würde damit auf eine starke prinzipielle Konservierung bestimmter neuronaler Musterbildungsprozesse hindeuten. Weiterhin konnte MSX2 eine Funktion als Regulator von BMP4-abhängigen Apoptoseprozessen zugeordnet werden (Marazzi et al., 1997; Israsena und Kessler, 2002). Im Falle einer konservierten Phosphorylierung könnte Hipk2 daher über die Aktivierung von MSX2 auch eine Rolle bei der p53-unabhängigen Apoptosekontrolle spielen.

Neuere Untersuchungen bringen MSX mit verschiedenen Krebsarten in Verbindung. So konnten zum Beispiel, passend zu ihrer Beteiligung an der Entwicklung craniofacialer Strukturen, Veränderungen im Expressionsmuster von MSX-Genen in odontogenen Tumoren festgestellt werden (Foerst-Potts und Sadler, 1997; Ruhin-Poncet et al., 2009). Studien an Brustkrebspatienten ergaben eine Korrelation der Expression von MSX2 mit einer verbesserten Allgemeinprognose, die vermutlich auf einer erhöhten Apoptoseaktivität in diesen Zellen beruht. In verschiedenen Brustkrebs-Zelllinien mit erhöhter MSX-Expression

wurde zudem eine veränderte Expression des Nito-Homologs RBM15 nachgewiesen (Lanigan et al., 2010). Eine gleichzeitige Veränderung des Levels gleich zweier potentieller Substrate wirft damit auch die Frage nach dem HIPK2-Status in derartigen Tumoren bzw. nach dem Einfluss von HIPK2 auf MSX-abhängige Tumore im Allgemeinen auf. Die Homeodomän-interagierende Proteinkinase könnte damit eine noch breitere Assoziation zu verschiedenen Krebsformen aufweisen als bisher angenommen.

5.3.2 Hipk phosphoryliert Ems

Ems spielt als Kopflückengen bereits in sehr frühen Stadien der Embryonalentwicklung eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung diverser Kopfstrukturen (Dalton et al., 1989; Walldorf und Gehring, 1992). Im weiteren Verlauf der Entwicklung erfüllt Ems Funktionen in der regionalisierten Neurogenese in den Anlagen des Deuto- und Tritocerebrums sowie in der axonalen Wegfindung spezifischer Interneurone des ventralen Nervensystems (Hirth et al., 1995; Hartmann et al., 2000). Die Phosphorylierung von Ems durch Hipk liefert damit einen weiteren Ansatzpunkt, an dem die Homeodomän-interagierend Proteinkinase in die vielfältigen Prozesse der Neurogenese modulierend eingreifen kann. Ein entsprechender Nachweis dieses Zusammenhangs könnte beispielsweise, wie bereits für Msh erwähnt, durch eine Analyse der Ems-Expression in *hipk*-defizienten Zellpopulationen, die *ems*-spezifische phänotypische Untersuchung von *hipk*-Mutanten oder durch Fehlexpressionsstudien mit Ems-Phosphomutanten erfolgen.

In der post-embryonalen Entwicklung zeigt Ems eine starke Beteiligung am Aufbau des olfaktorischen Systems. So ist der Transkriptionsfaktor sowohl in die Spezifikation und Wegfindung gehirnständiger olfaktorischer Interneurone und Projektionsneurone als auch in die Entwicklung larvaler und adulter Sinnesorgane involviert (Das et al., 2008; Lichtneckert et al., 2008; Sen et al., 2010). Eine Kontrolle von Ems durch die Hipk-vermittelte Phosphorylierung könnte damit auf eine Relevanz der Kinase für Prozesse der olfaktorischen Wahrnehmung hindeuten. Mit Experimenten zur olfaktorischen Wahrnehmung in *ems*- und *hipk*-Mutanten könnte diese Möglichkeit weiter untersucht werden.

Wie viele andere Homeodomänproteine verfügt auch Ems über Homologe in Vertebraten (EMX1 und EMX2), die wie Ems in Teilen des Gehirns und im olfaktorischen System exprimiert werden (Simeone et al., 1992 a und b) und auch funktional eine weitreichende Konservierung aufweisen. Insbesondere EMX2 zeigt unter anderem eine Beteiligung an der Migration kortikaler Neurone, an regionalen Musterbildungsprozessen innerhalb des

zerebralen Cortex sowie in Kombination mit EMX1 an der Entwicklung des Bulbus olfactorius (Cecchi et al., 2000; Cecchi und Boncinelli, 2000; Bishop et al., 2003). Eine HIPK2-vermittelte Regulation von EMX erscheint daher naheliegend und entsprechende Untersuchungen sollten weitere Einsichten in die Entwicklung des Vertebraten-Nervensystems liefern. Weiterhin wird EMX2 aufgrund seiner Assoziation mit humaner Schizenzephalie hinsichtlich einer Beteiligung an kognitiven Prozessen diskutiert (Granata et al., 1997; Cecchi und Boncinelli, 2000; Cecchi, 2002). Angesichts der starken evolutionären Konservierung wäre auch eine Rolle von Ems und damit eventuell auch von Hipk in kognitiven Abläufen bei *Drosophila* denkbar. Zur Prüfung dieses Sachverhalts könnten klassische Lernversuche mit *ems*- und *hipk*-Mutanten durchgeführt werden (Pitman et al., 2009). Da derartige Versuche häufig die Verarbeitung olfaktorischer Reize beinhalten, dürfte es jedoch schwierig werden, tatsächliche kognitive Auswirkungen von Effekten durch mögliche Ausfälle des olfaktorischen Systems zu trennen. Versuche zum visuellen Lernen hingegen könnten durch die Rolle von Hipk in der Entwicklung des optischen Systems beeinträchtigt sein (Pitman et al., 2009; Lee et al., 2009a). Bei der weiteren Aufklärung der funktionalen Beziehung zwischen *ems* und *hipk* sollte also der Analyse morphologischer Effekte Priorität eingeräumt werden.

5.4 Entwurf eines Konsensusmotivs für die Hipk-abhängige Phosphorylierung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Proteine hinsichtlich einer Enzym-Substrat-Beziehung mit Hipk untersucht und die jeweils phosphorylierten Sequenzbereiche genauer bestimmt. Bereits bei der Analyse von Nito ergaben sich dabei im Vergleich der Kandidatenregionen mit bekannten Phosphorylierungsstellen anderer Proteine erste Hinweise auf Übereinstimmungen potentieller Hipk-Zielsequenzen (4.1.2.3, Abb.4.9). Ausgehend diesen Übereinstimmungen konnten vorläufige Konsensusmotive für eine Hipk-abhängige Phosphorylierung entworfen werden (Tab.5.1). Die Untersuchung von Msh und Ems sowie weitere innerhalb der Arbeitsgruppe durchgeführte Studien lieferten zusätzliche Phosphorylierungsstellen, die in die weitere vergleichende Analyse mit einbezogen werden konnten (Meier, 2013; Steinmetz, persönliche Kommunikation). Tabelle 5.1 zeigt eine Zusammenstellung der ausgewerteten Substrat-Sequenzen sowie die daraus abgeleiteten vorläufigen Konsensusmotive.

Tab.5.1. Herleitung vorläufiger Konsensusmotive für eine Hipk-vermittelte Phosphorylierung. Dargestellt sind diverse phosphorylierte Sequenzmotive verschiedener Hipk-Substrate sowie die daraus abgeleiteten vorläufigen Konsensusmotive. Phosphorylierte Aminosäuren sind rot markiert.

Protein	Phosphoryliertes Sequenzmotiv
Nito	MKRS ²³ AS ²⁵ RS ²⁷ PGPA
	RLDRS ⁷³ PS ⁷⁵ RYG
	RYGS ⁷⁹ PHREPY
	RYHYS ²⁰¹ RS ²⁰³ PMG
	ERS ⁵⁹² RS ⁵⁹⁴ RS ⁵⁹⁶ PLK
	ARS ⁶⁰³ PGS ⁶⁰⁶ DS ⁶⁰⁸ DT
Msh	LADT ¹⁴³ RPRT ¹⁴⁷ PP
	SQAS ¹⁷² S ¹⁷³ T ¹⁷⁴ PPP
	Ser/Thr-Cluster um Pro ²⁴⁵
Ems	PDLs ⁴⁸ GPQS ⁵² PP
	PGS ⁶³ PPQT ⁶⁷ PPA
	KRERS ¹⁸² PAPPK
Hbn (Dewald, 2008)	VQES ²⁸ PVS ³¹ RPR
	KRMYT ⁵⁴ PS ⁵⁶ EVL
Toy (Steinmetz, pers. Kommunikation)	LGSMT ⁴⁵² PS ⁴⁵⁴ CLQ
Yorkie (Meier, 2013)	RARS ¹⁶⁸ S ¹⁶⁹ PAS ¹⁷² LQ
	YDVIS ²⁵⁵ PIQLN
Abgeleitete Kern-Konsensusmotive:	
P – S/T – X – (X) – S/T	
S/T – X – (X) – S/T – P	
S/T – (X) – P – (X) – S/T	

Neben der bereits bekannten Führung der Kinase durch Prolin (Kim et al., 2006) konnten weitere Gemeinsamkeiten vieler durch Hipk phosphorylierter Sequenzmotive festgestellt werden. So treten phosphorylierte Serine oder Threonine bevorzugt als Cluster aus zwei bis drei, meist nicht zusammenhängenden Aminosäuren auf, von denen sich mindestens eine in direkter Nachbarschaft zu einem Prolin befindet. Dabei scheint es nicht von Relevanz zu sein, ob der Prolinrest am Anfang oder am Ende des Clusters bzw. zwischen den Substratresten zu liegen kommt. Der Abstand der einzelnen Serine oder Threonine kann von direkter Nachbarschaft bis zu drei Aminosäuren reichen, wobei größere Abstände häufig mit einem dazwischen liegenden Prolin einhergehen. In vielen Substratregionen wurde zudem die räumliche Nähe zu einem oder mehreren Argininresten beobachtet, ein direkter Zusammenhang zwischen dem Vorkommen von Arginin und einer Phosphorylierung war

jedoch nicht feststellbar. Insgesamt scheint Serin gegenüber Threonin bevorzugt phosphoryliert zu werden.

Die beschriebenen Eigenschaften und die damit verbundenen Konsensusmotive reichen jedoch nicht aus, um alle möglichen Hipk-abhängigen Phosphorylierungsstellen sicher zu identifizieren. So wurden auch im Rahmen dieser Arbeit Substratsequenzen aufgedeckt, die dem entworfenen Konsensus nicht entsprechen, da beispielsweise einzeln auftretende Substratrete phosphoryliert wurden (Nito, Ems, Yorkie) oder Substratrete im Umfeld großer Serin-/Threonin-Cluster auftraten (Msh). Weiterhin finden sich in den untersuchten Proteinen Sequenzmotive, die zwar eine hohe Übereinstimmung mit dem Konsensus aufweisen, aber nicht durch Hipk phosphoryliert wurden. Somit liefern die hier entworfenen Konsensusmotive zwar gute Hinweise auf mögliche Kandidaten für eine Hipk-vermittelte Phosphorylierung. Für die sichere Verwendbarkeit zur Identifikation der meisten oder sogar aller Hipk-Substratsequenzen ist aber eine weitere Verfeinerung bzw. die Definition zusätzlicher Konsensusmotive unabdingbar. Eine geeignete Herangehensweise hierfür wäre eine Kombination aus klassischen biochemischen Methoden zur Identifikation weiterer Hipk-Substrate in Verbindung mit bioinformatischen Analysen zum intensiveren Vergleich der physiko-chemischen Spezifikationen der einzelnen Phosphorylierungsstellen innerhalb eines wachsenden Datensatzes von Sequenzmotiven. In einem anderen, technisch allerdings weit aufwändigeren, Ansatz könnte unter Verwendung einer Vielzahl definierter, artefizieller Peptide eine (oder mehrere) optimale Substratsequenz(en) für Hipk bestimmt werden (vgl. Songyang et al., 1994).

Neben der Definition eines *Drosophila*-spezifischen Konsensusmotivs ist auch die Frage nach einer prinzipiellen evolutionären Konservierung einer Hipk-vermittelten Substraterkennung und -phosphorylierung von Interesse. In Vertebraten konnte bisher eine Vielzahl von HIPK2-Substraten nachgewiesen werden (siehe z.B. Rinaldo et al., 2007a), ein konkretes Konsensusmotiv wurde bisher jedoch nicht publiziert. In dieser Arbeit durchgeführte Vergleiche der in *Drosophila* bestimmten Substrate mit Sequenzen verschiedener in Vertebraten durch HIPK2 phosphorylierter Proteine ergaben in Vertebraten zwar eine Tendenz zur Phosphorylierung einzelner Aminosäure, zeigten jedoch auch Übereinstimmungen im Sequenzaufbau (4.1.2.3, Abb.4.9). Daher besteht die Möglichkeit, dass zumindest Teile eines oder mehrerer Hipk-spezifischer Konsensusmotive evolutionär konserviert sind. Um dies zu prüfen, wurden repräsentative, durch Hipk phosphorylierte Konstrukte der in dieser Arbeit untersuchten Proteine ausgewählt und in einem *in vitro*

Kinaseassay mit humaner HIPK2 analysiert (Abb.5.4). Dabei zeigte sich in allen Fällen eine mehr (Nito, Msh) oder weniger (Ems) ausgeprägte Phosphorylierung der *Drosophila*-Proteine durch die Vertebraten-Kinase. Es ist daher anzunehmen, dass zumindest ein Teil der Zielsequenzen in beiden Organismen erkannt wird, d.h. dass die Substraterkennung in einem gewissen Maße konserviert ist. Bei ausreichender sequenzieller Konservierung der Substratproteine könnten die hier gezeigten Resultate auf eine Phosphorylierung ihrer Vertebraten-Homologe an korrespondierenden Sequenzmotiven hindeuten. Im Fall einer sequenziell eher geringen Konservierung ist eine Phosphorylierung dennoch nicht auszuschließen, da der funktionale Zusammenhang einer prinzipiellen Enzym-Substrat-Beziehung auch durch die Phosphorylierung neuer Zielsequenzen beibehalten werden könnte, die zwar erst im Zuge der evolutionären Divergenz entstanden sind, aber eine vergleichbare physiologische Rolle spielen.

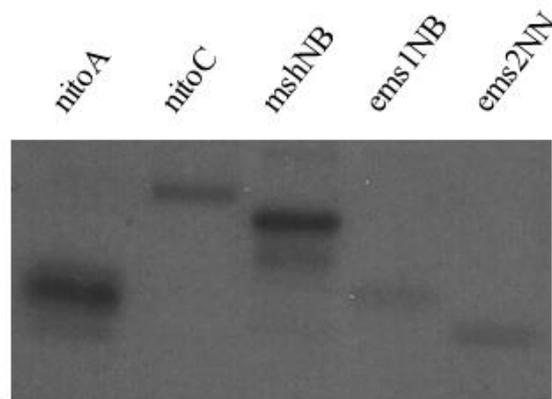


Abb.5.4. Evolutionäre Konservierung der Substraterkennung von Hipk bzw. HIPK2. Dargestellt ist das Autoradiogramm eines *in vitro* Kinaseassays, in dem ausgewählte, in dieser Arbeit identifizierte Hipk-Substrate auf eine Phosphorylierung durch HIPK2 untersucht wurden.

5.5 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde das SPOC-Protein Nito als Substrat der Homeodomän-interagierenden Proteinkinase identifiziert. In weiterführenden Arbeiten könnte durch die Erzeugung Einzelrest-spezifischer Phosphomutanten und phosphomimetischer Mutanten eine genauere Analyse der funktionalen Relevanz dieser Beziehung vorgenommen werden. Die Identifizierung weiterer durch Nito regulierter Zielgene würde dabei neue Nachweismöglichkeiten für den Einfluss einer Hipk-vermittelten Phosphorylierung eröffnen, da sie die gezielte Untersuchung potentieller Veränderungen im Expressionsmuster dieser Gene ermöglicht. Gleichzeitig könnten Untersuchungen der entsprechenden Gene in der *nito*-

Mutante *nito*^{GT} tiefere Einblicke in die allgemeine Rolle von *nito* während der *Drosophila*-Entwicklung erlauben.

Mit *Msh* und *Ems* wurden nach *Homeobrain* zwei weitere Homeodomän-Transkriptionsfaktoren als Hipk-Substrate zugeordnet (Dewald, 2008). Untersuchungen des Expressionsmusters der beiden Proteine sowie nachgeordneter Zielgene in *hipk*-Mutanten könnten hier Aufschluss über die funktionalen Auswirkungen der Enzym-Substrat-Beziehung liefern.

Zur allgemeinen Analyse der Hipk-Expression auf Proteinebene sowie für Colokalisationsstudien mit potentiellen Interaktionspartnern ist in Zukunft die Herstellung eines qualitativ hochwertigen anti-Hipk-Antikörpers von großer Bedeutung.

Alle in dieser Arbeit untersuchten Hipk-Substrate verfügen über Homologe in Vertebraten, so dass die Prüfung einer möglichen Phosphorylierung dieser Proteine durch HIPK2 Rückschlüsse auf die Konservierung der Regulation der einzelnen Substrate zulassen sollte. Vergleichende funktionale Analysen könnten dabei ein genaueres Bild einer konservierten Rolle der Hipk-Familie in Regulationsmechanismen sowohl auf zellulärer als auch auf gesamtorganismischer Ebene zeichnen.

Die im Rahmen dieser Arbeit entworfenen Konsensusmotive für eine Hipk-vermittelte Phosphorylierung sollten bereits jetzt das Auffinden potentiell phosphorylierter Sequenzen erleichtern und könnten durch die Identifizierung und Phospho-Kartierung neuer Substrate weiter verfeinert werden. Gleichzeitig würde die Zuordnung neuer Substrate das bekannte Wirkungsspektrum der Homeodomän-interagierenden Proteinkinase erweitern und könnte damit zur Aufklärung der Rolle von Hipk in verschiedenen entwicklungsbiologischen und pathologischen Prozessen, insbesondere im Hinblick auf die Beteiligung der Kinase an verschiedenen Signalwegen, beitragen.

6. Literaturverzeichnis

1. Adams MD et al. (2000) The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287:2185-2195
2. Affolter M, Schier A, Gehring WJ (1990) Homeodomain proteins and the regulation of gene expression. *Curr Opin Cell Biol* 2:485-495
3. Alappat S, Zhang ZY, Chen YP (2003) Msx homeobox gene family and craniofacial development. *Cell Res* 13:429-442
4. Ariyoshi M, Schwabe JW (2003) A conserved structural motif reveals the essential transcriptional repression function of Spen proteins and their role in developmental signalling. *Genes Dev* 17:1909-1920
5. Bach NM (2011) Funktionelle Analyse des Homeoboxgens *orthopedia* in der Enddarm- und Nervensystementwicklung von *Drosophila melanogaster*. Dissertation, Universität des Saarlandes
6. Bendixen C, Gangloff S, Rothstein R (1994) A yeast mating-selection scheme for detection of protein-protein interactions. *Nucleic Acids Res* 22:1778-1779
7. Berger C, Harzer H, Burkard TR, Steinmann J, van der Horst S, Laurenson AS, Novatchkova M, Reichert H, Knoblich JA (2012) FACS purification and transcriptome analysis of drosophila neural stem cells reveals a role for Klumpfuss in self-renewal. *Cell Rep* 2:407-418
8. Bernard P, Couturier M (1992) Cell Killing by the F Plasmid CcdB Protein Involves Poisoning of DNA-Topoisomerase II Complexes. *J Mol Biol* 226:735-745
9. Bernard P, Gabant P, Bahassi EM, Couturier M (1994) Positive Selection Vectors Using the F Plasmid *ccdB* Killer Gene. *Gene* 148:71-74
10. Bier E (2005) *Drosophila*, the golden bug, emerges as a tool for human genetics. *Nature Review Genetics* 6:9-23
11. Bischof J, Maeda RK, Hediger M, Karch F, Basler K (2007) An optimized transgenesis system for *Drosophila* using germ-line-specific phiC31 integrases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:3312-3317
12. Bishop KM, Garel S, Nakagawa Y, Rubenstein JL, O'Leary DD (2003) Emx1 and Emx2 cooperate to regulate cortical size, lamination, neuronal differentiation, development of cortical efferents, and thalamocortical pathfinding. *J Comp Neurol* 457:345-360

13. Brand A, Perrimon N (1993) Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118:401-415
14. Brofman Epelbaum RE (2011) Characterization of *Drosophila melanogaster* Homeodomain Protein Interaction Kinase 2 (dHIPK2) interaction proteins. Bachelor Thesis, Universität des Saarlandes
15. Burri M, Tromvoukis Y, Bopp D, Frigerio G, Noll M (1989) Conservation of the paired domain in metazoans and its structure in three isolated human genes. *EMBO J* 8:1183-1190
16. Buescher M, Chia W (1997) Mutations in *lottchen* cause cell fate transformations in both neuroblast and glioblast lineages in the *Drosophila* embryonic central nervous system. *Development* 124:673-681
17. Bushman W, Thompson JF, Vargas L, Landy A (1985) Control of Directionality in Lambda Site Specific Recombination. *Science* 230:906-911
18. Campos-Ortega JA, Hartenstein V (1997) *The Embryonic Development of Drosophila melanogaster*. 2nd Edition, Springer-Verlag, Berlin
19. Capdevila J, Guerrero I (1994) Targeted expression of the signaling molecule decapentaplegic induces pattern duplications and growth alterations in *Drosophila* wings. *EMBO J* 13:4459-4468
20. Cecchi C (2002) *Emx2*: a gene responsible for cortical development, regionalization and area specification. *Gene* 291:1-9
21. Cecchi C, Boncinelli E (2000) *Emx* homeogenes and mouse brain development. *Trends Neurosci* 23:347-352
22. Cecchi C, Mallamaci A, Boncinelli E (2000) *Otx* and *Emx* homeobox genes in brain development. *Int J Dev Biol* 44:663-668
23. Chang JL, Lin HV, Blauwkamp TA, Cadigan KM (2008) *Spenito* and *Split* ends act redundantly to promote *Wingless* signaling. *Dev Biol* 314:100-111
24. Chen J, Verheyen EM (2012) Homeodomain-interacting protein kinase regulates *Yorkie* activity to promote tissue growth. *Curr Biol* 22:1582-1586
25. Choi CY, Kim YH, Kwon HJ, Kim Y (1999) The homeodomain protein *NK-3* recruits *Groucho* and a histone deacetylase complex to repress transcription. *J Biol Chem* 274:33194-33197

26. Choi CY, Kim YH, Kim YO, Park SJ, Kim EA, Riemenschneider W, Gajewski K, Schulz RA, Kim Y (2005) Phosphorylation by the DHIPK2 Protein Kinase Modulates the Corepressor Activity of Groucho. *J Biol Chem* 280:21427-21436
27. Clevers H (2006) Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell* 127:469-480
28. Dalton D, Chadwick R, McGinnis W (1989) Expression and embryonic function of empty spiracles: a *Drosophila* homeo box gene with two patterning functions on the anterior-posterior axis of the embryo. *Genes Dev* 3:1940-1956
29. Dauth I, Krüger J, Hofmann TG (2007) Homeodomain-interacting protein kinase 2 is the ionizing radiation-activated p53 serine 46 kinase and is regulated by ATM. *Cancer Res* 67:2274-2279
30. D'Alessio M, Frasch M (1996) msh may play a conserved role in dorsoventral patterning of the neuroectoderm and mesoderm. *Mech Dev* 58:217-231
31. Das A, Sen S, Lichtneckert R, Okada R, Ito K, Rodrigues V, Reichert H (2008) *Drosophila* olfactory local interneurons and projection neurons derive from a common neuroblast lineage specified by the empty spiracles gene. *Neural Dev* 3:33
32. Davidson D (1995) The function and evolution of Msx genes: pointers and paradoxes. *Trends Genet* 11:405-411
33. Davis RJ, Tavsanlı BC, Dittrich C, Walldorf U, Mardon G (2003) *Drosophila* retinal homeobox (drx) is not required for establishment of the visual system, but is required for brain and clypeus development. *Dev Biol* 259:272-287
34. Dewald DN (2008) Charakterisierung von Wechselwirkungen der Homeodomänprotein-interagierenden Proteinkinase 2 (dHipk2) bei *Drosophila melanogaster*. Diplomarbeit, Universität des Saarlandes
35. Dietzl G, Chen D, Schnorrer F, Su KC, Barinova Y, Fellner M, Gasser B, Kinsey K, Oettel S, Scheiblauer S, Couto A, Marra V, Keleman K, Dickson BJ (2007) A genome-wide transgenic RNAi library for conditional gene inactivation in *Drosophila*. *Nature* 448:151-156
36. Doble BW, Woodgett JR (2003) GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase. *J Cell Sci* 116:1175-1186
37. D'Orazi G, Cecchinelli B, Bruno T, Manni I, Higashimoto Y, Saito S, Gostissa M, Coen S, Marchetti A, Del Sal G, Piaggio G, Fanciulli M, Appella E, Soddu S (2002) Homeodomain-interacting protein kinase-2 phosphorylates p53 at Ser 46 and mediates apoptosis. *Nat Cell Biol* 4:11-19

38. D'Orazi G, Sciulli MG, Di Stefano V, Riccioni S, Frattini M, Falcioni R, Bertario L, Sacchi A, Patrignani P (2010) Homeodomain-interacting protein kinase-2 restrains cytosolic phospholipase A2-dependent prostaglandin E2 generation in human colorectal cancer cells. *Clin Cancer Res* 12:735-741
39. D'Orazi G, Rinaldo C, Soddu S (2012) Updates on HIPK2: a resourceful oncosuppressor for clearing cancer. *J Exp Clin Cancer Res* 31:63
40. Doroquez DB, Orr-Weaver TL, Rebay I (2007) Split ends antagonizes the Notch and potentiates the EGFR signaling pathways during *Drosophila* eye development. *Mech Dev* 124:792-806
41. Duffy JB (2002) GAL4 system in *Drosophila*: a fly geneticist's Swiss army knife. *Genesis* 34:1-15
42. Eggert T, Hauck B, Hildebrandt N, Gehring WJ, Walldorf U (1998) Isolation of a *Drosophila* homolog of the vertebrate homeobox gene Rx and its possible role in brain and eye development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:2343-2348
43. Finley Jr., RL, Brent R (1994) Interaction mating reveals binary and ternary connections between *Drosophila* cell cycle regulators. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:12980–12984
44. Fiol CJ, Mahrenholz AM, Wang Y, Roeske RW, Roach PJ (1987) Formation of protein kinase recognition sites by covalent modification of the substrate. Molecular mechanism for the synergistic action of casein kinase II and glycogen synthase kinase 3. *J Biol Chem* 262:14042-14048
45. Foerst-Potts L, Sadler TW (1997) Disruption of Msx-1 and Msx-2 reveals roles for these genes in craniofacial, eye, and axial development. *Dev Dyn* 209:70-84
46. Freeman M (1996) Reiterative use of the EGF receptor triggers differentiation of all cell types in the *Drosophila* eye. *Cell* 87:651-660
47. Gehring WJ (1987) Homeo boxes in the study of development. *Science* 236:1245-1252
48. Ghosh I, Hamilton AD, Regan L (2000) Antiparallel Leucine Zipper-Directed Protein Reassembly: Application to the Green Fluorescent Protein. *J Am Chem Soc* 122:5658-5659
49. Gilbert SF (2006) *Developmental Biology*. 8th Edition, Sinauer Associates Inc., Sunderland (USA)
50. Gohl C, Banovic D, Grevelhörster A, Bogdan S (2010) WAVE forms hetero- and homo-oligomeric complexes at integrin junctions in *Drosophila* visualized by bimolecular fluorescence complementation. *J Biol Chem* 285:40171-40179

51. Golic MM, Golic KG (1996) A quantitative measure of the mitotic pairing of alleles in *Drosophila melanogaster* and the influence of structural heterozygosity. *Genetics* 143:385-400
52. Granata T, Farina L, Faiella A, Cardini R, D'Incerti L, Boncinelli E, Battaglia G (1997) Familial schizencephaly associated with EMX2 mutation. *Neurology* 48:1403-1406
53. Groth AC, Fish M, Nusse R, Calos MP (2004) Construction of transgenic *Drosophila* by using the site-specific Integrase from Phage Φ C31. *Genetics* 166:1775-1782
54. Hanahan D (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166:557-580
55. Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ (1993) The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 75:805-816
56. Hartley JL, Temple GF, Brasch MA (2000) DNA Cloning Using *in vitro* Site-Specific Recombination. *Genome Research* 10:1788-1795
57. Hartmann B, Hirth F, Walldorf U, Reichert H (2000) Expression, regulation and function of the homeobox gene empty spiracles in brain and ventral nerve cord development of *Drosophila*. *Mech Dev* 90:143-153
58. Hartmann B, Reichert H, Walldorf U (2001) Interacting of gap genes in the *Drosophila* head: tailless regulates expression of empty spiracles in early embryonic patterning and brain development. *Mech Dev* 109:161-172
59. Hazelett D, Bourouis M, Walldorf U, Treisman J (1998) *Decapentaplegic* and *wingless* are regulated by *eyes absent* and *eyegone* and interact to direct the pattern of retinal differentiation in the eye disc. *Development* 125:3741-375
60. Herold N, Will CL, Wolf E, Kastner B, Urlaub H, Lührmann R (2009) Conservation of the protein composition and electron microscopy structure of *Drosophila melanogaster* and human spliceosomal complexes. *Mol Cell Biol* 29:281-301
61. Herskowitz I (1988) Life cycle of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev* 52:536-553
62. Hikasa H, Ezan J, Itoh K, Li X, Klymkowsky MW, Sokol SY (2010) Regulation of TCF3 by Wnt-dependent phosphorylation during vertebrate axis specification. *Dev Cell* 19:521-532

63. Hikasa H, Sokol SY (2011) Phosphorylation of TCF proteins by homeodomain-interacting protein kinase 2. *J Biol Chem* 286:12093-12100
64. Hirth F, Therianos S, Loop T, Gehring WJ, Reichert H, Furukubo-Tokunaga K (1995) Developmental defects in brain segmentation caused by mutations of the homeobox genes *orthodenticle* and *empty spiracles* in *Drosophila*. *Neuron* 15:769-778
65. Hofmann TG, Möller A, Sirma H, Zentgraf H, Taya Y, Dröge W, Will H, Schmitz ML (2002) Regulation of p53 activity by its interaction with homeodomain-interacting protein kinase-2. *Nat Cell Biol* 4:1-10
66. Hofmann TG, Jaffray E, Stollberg N, Hay RT, Will H (2005) Regulation of homeodomain-interacting protein kinase 2 (HIPK2) effector function through dynamic small ubiquitin-related modifier-1 (SUMO-1) modification. *J Biol Chem* 280:29224-29232
67. Hofmann TG, Glas C, Bitomsky N (2013) HIPK2: A tumour suppressor that controls DNA damage-induced cell fate and cytokinesis. *Bioessays* 35:55-64
68. Hortsch M, Patel NH, Bieber AJ, Traquina ZR, Goodman CS (1990) *Drosophila* neurotactin, a surface glycoprotein with homology to serine esterases, is dynamically expressed during embryogenesis. *Development* 110:1327-1340
69. Hsiao FC, Williams A, Davies EL, Rebay I (2001) *Eyes absent* mediates cross-talk between determination genes and the receptor tyrosine kinase signalling pathway. *Dev Cell* 1:51-61
70. Huang J, Wu S, Barrera J, Matthews K, Pan D (2005) The Hippo signalling pathway coordinately regulates cell proliferation and apoptosis by inactivating Yorkie, the *Drosophila* Homolog of YAP. *Cell* 122:421-434
71. Hudry B, Viala S, Graba Y, Merabet S (2011) Visualization of protein interactions in living *Drosophila* embryos by the bimolecular fluorescence complementation assay. *BMC Biol* 9:5
72. Inoue T, Kagawa T, Inoue-Mochita M, Isono K, Ohtsu N, Nobuhisa I, Fukushima M, Tanihara H, Taga T (2010) Involvement of the Hipk family in regulation of eyeball size, lens formation and retinal morphogenesis. *FEBS Lett* 584:3233-3238
73. Isono K, Nemoto K, Li Y, Takada Y, Suzuki R, Katsuki M, Nakagawara A, Koseki H (2006) Overlapping roles for homeodomain-interacting protein kinases *hipk1* and *hipk2* in the mediation of cell growth in response to morphogenetic and genotoxic signals. *Mol Cell Biol* 26:2758:2771
74. Israsena N, Kessler JA (2002) *Msx2* and p21(CIP1/WAF1) mediate the proapoptotic effects of bone morphogenetic protein-4 on ventricular zone progenitor cells. *J Neurosci Res* 69:803-809

75. Isshiki T, Takeichi M, Nose A (1997) The role of the *msh* homeobox gene during *Drosophila* neurogenesis: implication for the dorsoventral specification of the neuroectoderm. *Development* 124:3099-3109
76. James P, Halladay J, Craig EA (1996) Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics* 144:1425-1436
77. Jemc J, Rebay I (2006) Characterization of the split ends-like gene *spenito* reveals functional antagonism between SPOC family members during *Drosophila* eye development. *Genetics* 173:279-286
78. Jin Y, Ratnam K, Chuang PY, Fan Y, Zhong Y, Dai Y, Mazloom AR, Chen EY, D'Agati V, Xiong H, Ross MJ, Chen N, Ma'ayan A, He JC (2012) A systems approach identifies HIPK2 as a key regulator of kidney fibrosis. *Nat Med* 18:580-588
79. Johnson RL, Grenier JK, Scott MP (1995) patched overexpression alters wing disc size and pattern: transcriptional and post-transcriptional effects on hedgehog targets. *Development* 121:4161-4170
80. Johnson SA, Hunter T (2005) Kinomics: methods for deciphering the kinome. *Nat Methods* 2:17-25
81. Kaspar P (2008) Die Bedeutung des Homeoboxgens *homeobrain* für die embryonale Gehirnentwicklung von *Drosophila melanogaster*. Dissertation, Universität des Saarlandes
82. Kerppola TK (2008) Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) analysis as a probe of protein interactions in living cells. *Annu Rev Biophys* 37:465-487
83. Kerppola TK (2009) Visualization of molecular interactions using bimolecular fluorescence complementation analysis: characteristics of protein fragment complementation. *Chem Soc Rev* 38:2876-2886
84. Kim EA, Noh YT, Ryu MJ, Kim HT, Lee SE, Kim CH, Lee C, Kim YH, Choi CY (2006) Phosphorylation and transactivation of Pax6 by homeodomain-interacting protein kinase 2. *J Biol Chem* 281:7489-7497
85. Kim EA, Kim JE, Sung KS, Choi DW, Lee BJ, Choi CY (2010) Homeodomain-interacting protein kinase 2 (HIPK2) targets beta-catenin for phosphorylation and proteasomal degradation. *Biochem Biophys Res Commun* 394:966-971
86. Kim YH, Choi CY, Lee SJ, Conti MA, Kim Y (1998) Homeodomain-interacting Protein Kinases, a Novel Family of Co-repressors for Homeodomain Transcription Factors. *J Biol Chem* 273:25875-25879

87. Kodama Y, Hu CD (2012) Bimolecular fluorescence complementation (BiFC): a 5-year update and future perspectives. *Biotechniques* 53:285-298
88. Kuang B, Wu SC, Shin Y, Luo L, Kolodziej P (2000) split ends encodes large nuclear proteins that regulate neuronal cell fate and axon extension in the *Drosophila* embryo. *Development* 127:1517-1529
89. Kumar JP (2009) The molecular circuitry governing retinal determination. *Biochim Biophys Acta* 1789:306-314
90. Kuroda K, Han H, Tani S, Tanigaki K, Tun T, Furukawa T, Taniguchi Y, Kurooka H, Hamada Y, Toyokuni S, Honjo T (2003) Regulation of marginal zone B cell development by MINT, a suppressor of Notch/RBP-J signaling pathway. *Immunity* 18:301-312
91. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685
92. Landy A (1989) Dynamic, Structural, and Regulatory Aspects of Lambda Site-specific Recombination. *Ann Rev Biochem* 58:913-949
93. Lanigan F, Gremel G, Hughes R, Brennan DJ, Martin F, Jirstrom K, Gallagher WM (2010) Homeobox transcription factor muscle segment homeobox 2 (Msx2) correlates with good prognosis in breast cancer patients and induces apoptosis in vitro. *Breast Cancer Res* 12:R59
94. Laupsien P (2007) Funktionelle Analyse der Phosphorylierung des *Drosophila melanogaster Pax6*-Gens *Twin-of-eyeless* durch die Homöodomänprotein-interagierende Proteinkinase dHIPK2. Diplomarbeit, Universität des Saarlandes
95. Laski FA, Rio DC, Rubin GM (1986) Tissue specificity of *Drosophila* P element transposition is regulated at the level of mRNA splicing. *Cell* 44:7-19
96. Lavra L, Rinaldo C, Olivieri A, Luciani E, Fidanza P, Giacomelli L, Bellotti C, Ricci A, Trovato M, Soddu S, Bartolazzi A, Sciacchitano S (2011) The loss of the p53 activator HIPK2 is responsible for galectin-3 overexpression in well differentiated thyroid carcinomas. *PLoS One* 6:e20665
97. Lee T, Luo L (1999) Mosaic analysis with a repressible cell marker for studies of gene function in neuronal morphogenesis. *Neuron* 22:451-461
98. Lee T, Luo L (2001) Mosaic analysis with a repressible cell marker (MARCM) for *Drosophila* neural development. *Trends Neurosci* 24:251-254

99. Lee W, Andrews BC, Faust M, Walldorf U, Verheyen EM (2009a) Hipk is an essential protein that promotes Notch signal transduction in the *Drosophila* eye by inhibition of the global co-repressor Groucho. *Dev Biol* 325:263-272
100. Lee W, Swarup S, Chen J, Ishitani T, Verheyen EM (2009b) Homeodomain-interacting protein kinases (Hipks) promote Wnt/Wg signaling through stabilization of beta-catenin/Arm and stimulation of target gene expression. *Development* 136:241-251
101. Legent K, Treisman JE (2008) Wingless signaling in *Drosophila* eye development. *Methods Mol Biol* 469:141-161
102. Lichtneckert R, Nobs L, Reichert H (2008) Empty spiracles is required for the development of olfactory projection neuron circuitry in *Drosophila*. *Development* 135:2415-2424
103. Lin HV, Doroquez DB, Cho S, Chen F, Rebay I, Cadigan KM (2003) Splits ends is a tissue/promoter specific regulator of Wingless signaling. *Development* 130:3125-3135
104. Lin WC, Desiderio S (1993) Regulation of V(D)J recombination activator protein RAG-2 by phosphorylation. *Science* 260:953-959
105. Lindberg RA, Quinn AM, Hunter T (1992) Dual-specificity protein kinases: will any hydroxyl do? *Trends Biochem Sci* 17:114-119
106. Lindtner S, Zolotukhin AS, Uranishi H, Bear J, Kulkarni V, Smulevitch S, Samiotaki M, Panayotou G, Felber BK, Pavlakis GN (2006) RNA-binding motif protein 15 binds to the RNA transport element RTE and provides a direct link to the NXF1 export pathway. *J Biol Chem* 281:36915-36928
107. Link N, Chen P, Lu WJ, Pogue K, Chuong A, Mata M, Checketts J, Abrams JM (2007). A collective form of cell death requires homeodomain interacting protein kinase. *J Cell Biol* 178:567-574
108. Liu Y, Helms AW, Johnson JE (2004) Distinct activities of Msx1 and Msx3 in dorsal neural tube development. *Development* 131:1017-1028
109. Lord PC, Lin MH, Hales KH, Storti RV (1995) Normal expression and the effects of ectopic expression of the *Drosophila* muscle segment homeobox (*msh*) gene suggest a role in differentiation and patterning of embryonic muscles. *Dev Biol* 171:627-640
110. Louie SH, Yang XY, Conrad WH, Muster J, Angers S, Moon RT, Cheyette BN (2009) Modulation of the beta-catenin signaling pathway by the dishevelled-associated protein Hipk1. *PLoS One* 4:e4310

111. Ma Z, Morris SW, Valentine V, Li M, Herbrick JA, Cui X, Bouman D, Li Y, Mehta PK, Nizetic D, Kaneko Y, Chan GC, Chan LC, Squire J, Scherer SW, Hitzler JK (2001) Fusion of two novel genes, RBM15 and MKL1, in the t(1;22)(p13;q13) of acute megakaryoblastic leukemia. *Nat Genet* 28:220-221
112. Ma X, Renda MJ, Wang L, Cheng EC, Niu C, Morris SW, Chi AS, Krause DS (2007) Rbm15 modulates Notch-induced transcriptional activation and affects myeloid differentiation. *Mol Cell Biol* 27:3056-3064
113. Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S (2002) The Protein Kinase Complement of the Human Genome. *Science* 298:1912-1934
114. Marazzi G, Wang Y, Sassoon D (1997) Msx2 is a transcriptional regulator in the BMP4-mediated programmed cell death pathway. *Dev Biol* 186:127-138
115. Marinaro C, Pannese M, Weinandy F, Sessa A, Bergamaschi A, Taketo MM, Broccoli V, Comi G, Götz M, Martino G, Muzio L (2012) Wnt signaling has opposing roles in the developing and the adult brain that are modulated by Hipk1. *Cereb Cortex* 22:2415-27
116. Marygold SJ, Roote J, Reuter G, Lambertsson A, Ashburner M, Millburn GH, Harrison PM, Yu Z, Kenmochi N, Kaufman TC, Leevers SJ, Cook KR (2007) The ribosomal protein gene and Minute loci of *Drosophila melanogaster*. *Genome Biol* 8:R216
117. Marygold SJ, Leyland PC, Seal RL, Goodman JL, Thurmond JR, Strelets VB, Wilson RJ and the FlyBase Consortium (2013) FlyBase: improvements to the bibliography. *Nucleic Acids Res* 41:D751-D757
118. McGinnis W, Garber RL, Wirz J, Kuroiwa A, Gehring WJ (1984) A homologous protein-coding sequence in *Drosophila* homeotic genes and its conservation in other metazoans. *Cell* 37:403-408
119. Meier A (2013) Identification and characterization of possible interaction partners of the Homeodomain-Interacting Protein Kinase. Bachelor Thesis, Universität des Saarlandes
120. Mercher T, Coniat MB, Monni R, Mauchauffe M, Nguyen Khac F, Gressin L, Mugneret F, Leblanc T, Dastugue N, Berger R, Bernard OA (2001) Involvement of a human gene related to the *Drosophila* spen gene in the recurrent t(1;22) translocation of acute megakaryocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:5776-5779
121. Monaghan AP, Davidson DR, Sime C, Graham E, Baldock R, Bhattacharya SS, Hill RE (1991) The Msh-like homeobox genes define domains in the developing vertebrate eye. *Development* 112:1053-1061

122. Morgan TH (1914) No crossing over in the Male of *Drosophila* of Genes in the Second and Third Pairs of Chromosomes. Biol Bull 26:195-204
123. Mozer BA (2001) Dominant Drop mutants are gain-of-function alleles of the muscle segment homeobox gene (*msh*) whose overexpression leads to the arrest of eye development. Dev Biol 233:380-393
124. Nagel AC, Krejci A, Tenin G, Bravo-Patino A, Bray S, Maier D, Preiss A, (2005) Hairless-mediated repression of notch target genes requires the combined activity of Groucho and CtBP corepressors. Mol Cell Biol 25:10433-10441
125. Neuberger G, Schneider G, Eisenhaber F (2007) pkaPS: prediction of protein kinase A phosphorylation sites with the simplified kinase-substrate binding model. Biol Direct 2:1
126. Neumann CJ, Cohen SM (1996) Distinct mitogenic and cell fate specification functions of wingless in different regions of the wing. Development 122:1781-1789
127. Neumüller RA, Richter C, Fischer A, Novatchkova M, Neumüller KG, Knoblich JA (2011) Genome-wide analysis of self-renewal in *Drosophila* neural stem cells by transgenic RNAi. Cell Stem Cell 8:580-593
128. Nose A, Isshiki T, Takeichi M (1998) Regional specification of muscle progenitors in *Drosophila*: the role of the *msh* homeobox gene. Development 125:215-223
129. Noyes MB, Christensen RG, Wakabayashi A, Stormo GD, Brodsky MH, Wolfe SA (2008) Analysis of homeodomain specificities allows the family-wide prediction of preferred recognition sites. Cell 133:1277-1289
130. Oh H, Irvine KD (2008) In vivo regulation of Yorkie phosphorylation and localization. Development 135:1081-1088
131. Oswald F, Kostezka U, Astrahantseff K, Bourteele S, Dillinger K, Zechner U, Ludwig L, Wilda M, Hameister H, Knöchel W, Liptay S, Schmid RM (2002) SHARP is a novel component of the Notch/RBP-Jkappa signalling pathway. EMBO J 21:5417-5426
132. Otting G, Qian YQ, Müller M, Affolter M, Gehring W, Wüthrich K (1988) Secondary structure determination for the Antennapedia homeodomain by nuclear magnetic resonance and evidence for a helix-turn-helix motif. EMBO J 7:4305-4309
133. Paddison PJ, Caudy AA, Bernstein E, Hannon GJ, Conklin DS (2002) Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. Genes Dev 16:948-958

134. Picton C, Woodgett J, Hemmings B, Cohen P (1982) Multisite phosphorylation of glycogen synthase from rabbit skeletal muscle. Phosphorylation of site 5 by glycogen synthase kinase-5 (casein kinase-II) is a prerequisite for phosphorylation of sites 3 by glycogen synthase kinase-3. *FEBS Lett* 150:191-196
135. Pierantoni GM, Fedele M, Pentimalli F, Benvenuto G, Pero R, Viglietto G, Santoro M, Chiariotti L, Fusco A (2001) High mobility group I (Y) proteins bind HIPK2, a serine-threonine kinase protein which inhibits cell growth. *Oncogene* 20:6132-6141
136. Pitman JL, DasGupta S, Krashes MJ, Leung B, Perrat PN, Waddell S (2009) There are many ways to train a fly. *Fly (Austin)* 3:3-9
137. Poon CL, Zhang X, Lin JI, Manning SA, Harvey KF (2012) Homeodomain-interacting protein kinase regulates Hippo pathway-dependent tissue growth. *Curr Biol* 22:1587-1594
138. Piovant M, Léna P (1988) Membrane glycoproteins immunologically related to the human insulin receptor are associated with presumptive neuronal territories and developing neurones in *Drosophila melanogaster*. *Development* 103:145-156
139. Puca R, Nardinocchi L, D'Orazi G (2008) Regulation of vascular endothelial growth factor expression by homeodomain-interacting protein kinase-2. *J Exp Clin Cancer Res* 27:22
140. Qian YQ, Billeter M, Otting G, Müller M, Gehring WJ, Wüthrich K (1989) The structure of the Antennapedia homeodomain determined by NMR spectroscopy in solution: comparison with prokaryotic repressors. *Cell* 59:573-580
141. Ramos C, Robert B (2005) msh/Msx gene family in neural development. *Trends Genet* 21:624-632
142. Rebay I, Chen F, Hsiao F, Kolodziej PA, Kuang BH, Laverly T, Suh C, Voas M, Williams A, Rubin GM (2000) A genetic screen for novel components of the Ras/Mitogen-activated protein kinase signaling pathway that interact with the yan gene of *Drosophila* identifies split ends, a new RNA recognition motif-containing protein. *Genetics* 154:695-712
143. Rechsteiner M, Rogers SW (1996) PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem Sci* 21:267-271
144. Reiter LT, Potocki L, Chien S, Gribskov M, Bier E (2001) A systematic analysis of human disease-associated gene sequences in *Drosophila melanogaster*. *Genome Res* 11:1114-1125
145. Ricci A, Cherubini E, Ulivieri A, Lavra L, Sciacchitano S, Scozzi D, Mancini R, Ciliberto G, Bartolazzi A, Bruno P, Graziano P, Mariotta S (2013) Homeodomain-interacting protein kinase2 in human idiopathic pulmonary fibrosis. *J Cell Physiol* 228:235-241

146. Rinaldo C, Prodosmo A, Siepi F, Soddu S (2007a) HIPK2: a multitasking partner for transcription factors in DNA damage response and development. *Biochem Cell Biol* 85:411-418
147. Rinaldo C, Prodosmo A, Mancini F, Iacovelli S, Sacchi A, Moretti F, Soddu S (2007b) MDM2-regulated degradation of HIPK2 prevents p53Ser46 phosphorylation and DNA damage-induced apoptosis. *Mol Cell* 25:739-750
148. Robert B, Sassoon D, Jacq B, Gehring W, Buckingham M (1989) Hox-7, a mouse homeobox gene with a novel pattern of expression during embryogenesis. *EMBO J* 8:91-100
149. Robinow S, White K (1988) The locus elav of *Drosophila melanogaster* is expressed in neurons at all developmental stages. *Dev Biol* 126:294-303
150. Robinow S, White K (1991) Characterization and spatial distribution of the ELAV protein during *Drosophila melanogaster* development. *J Neurobiol* 22:443-461
151. Rong YS, Golic KG (2000) Gene targeting by homologous recombination in *Drosophila*. *Science* 288:2013-2018
152. Rong YS, Titen SW, Xie HB, Golic MM, Bastiani M, Bandyopadhyay P, Olivera BM, Brodsky M, Rubin GM, Golic KG (2002) Targeted mutagenesis by homologous recombination in *D.melanogaster*. *Genes and Development* 16:1568-1581
153. Rubin GM, Spradling AC (1982) Genetic transformation of *Drosophila* of transposable element vectors. *Science* 218:348-353
154. Ruhin-Poncet B, Ghoul-Mazgar S, Hotton D, Capron F, Jaafoura MH, Goubin G, Berdal A (2009) Msx and dlx homeogene expression in epithelial odontogenic tumors. *J Histochem Cytochem* 57:69-78
155. Rui Y, Xu Z, Lin S, Li Q, Rui H, Luo W, Zhou HM, Cheung PY, Wu Z, Ye Z, Li P, Han J, Lin SC (2004) Axin stimulates p53 functions by activation of HIPK2 kinase through multimeric complex formation. *EMBO J* 23:4583-4594
156. Sambrook J, Russell D (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press
157. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74:5463-5467

158. Schertel C, Huang D, Björklund M, Bischof J, Yin D, Li R, Wu Y, Zeng R, Wu J, Taipale J, Song H, Basler K (2013) Systematic screening of a *Drosophila* ORF library in vivo uncovers Wnt/Wg pathway components. *Dev Cell* 25:207-219
159. Schneitz K, Spielmann P, Noll M (1993) Molecular genetics of *Aristaless*, a *prd*-type homeo box gene involved in the morphogenesis of proximal and distal pattern elements in a subset of appendages in *Drosophila*. *Genes Dev* 7:911
160. Sen S, Hartmann B, Reichert H, Rodrigues V (2010) Expression and function of the empty spiracles gene in olfactory sense organ development of *Drosophila melanogaster*. *Development* 137:3687-3695
161. Shi Y, Downes M, Xie W, Kao HY, Ordentlich P, Tsai CC, Hon M, Evans RM (2001) Sharp, an inducible cofactor that integrates nuclear receptor repression and activation. *Genes Dev* 15:1140-1151
162. Shuman S (1994) Novel Approach to Molecular Cloning and Polynucleotide Synthesis Using Vaccinia DNA Topoisomerase. *J Biol Chem* 269:32678-32684
163. Silver SJ, Rebay I (2005) Signaling circuitries in development: insights from the retinal determination gene network. *Development* 132:3-13
164. Simeone A, Gulisano M, Acampora D, Stornaiuolo A, Rambaldi M, Boncinelli E (1992a) Two vertebrate homeobox genes related to the *Drosophila* empty spiracles gene are expressed in the embryonic cerebral cortex. *EMBO J* 11:2541-2550
165. Simeone A, Acampora D, Gulisano M, Stornaiuolo A, Boncinelli E (1992b) Nested expression domains of four homeobox genes in developing rostral brain. *Nature* 358:687-690
166. Smith ST, Jaynes JB (1996) A conserved region of engrailed, shared among all *en*-, *gsc*-, *Nk1*-, *Nk2*- and *msh*-class homeoproteins, mediates active transcriptional repression in vivo. *Development* 122:3141-3150
167. Songyang Z, Blechner S, Hoagland N, Hoekstra MF, Piwica-Worms H, Cantley LC (1994) Use of an oriented peptide library to determine the optimal substrates of protein kinases. *Curr Biol* 4:973-982
168. Soubeyran I, Mahouche I, Grigoletto A, Leste-Lasserre T, Drutel G, Rey C, Pedeboscq S, Blanchard F, Brouste V, Sabourin JC, Bécouarn Y, Reiffers J, Ichas F, De Giorgi F (2011) Tissue microarray cytometry reveals positive impact of homeodomain interacting protein kinase 2 in colon cancer survival irrespective of p53 function. *Am J Pathol* 178:1986-1998

169. Steinmetz EL (2006) Analyse und Charakterisierung von Wechselwirkungen der Homeodomänprotein Interagierenden Proteinkinase dHIPK2 mit den Genen der Augenentwicklung bei *Drosophila melanogaster*. Diplomarbeit, Universität des Saarlandes
170. Sturtevant AH (1913) The linear arrangement of six sex-linked factors in *Drosophila*, as shown by their mode of association. *J Exp Zool* 14:43-59
171. Swarup S, Verheyen EM (2011) *Drosophila* homeodomain-interacting protein kinase inhibits the Skp1-Cul1-F-box E3 ligase complex to dually promote Wingless and Hedgehog signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:9887-9892
172. Thorpe HM, Smith MCM (1998) *In vitro* site-specific integration of bacteriophage DNA catalyzed by a recombinase of the resolvase/invertase family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:5505-5510
173. Ubersax JA, Ferrell JE Jr (2007) Mechanisms of specificity in protein phosphorylation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8:530-541
174. Venken KJT, Carlson JW, Schulze KL, Pan H, He Y, Spokony R, Wan KH, Koriabine M, de Jong PJ, White KP, Bellen HJ, Hoskins RA (2009) Versatile P[acman] BAC Libraries for transgenesis studies in *Drosophila melanogaster*. *Nat Methods* 6:431-434
175. Verheyen EM, Swarup S, Lee W (2012) Hipk proteins dually regulate Wnt/Wingless signal transduction. *Fly* 6:126-131
176. Von Ohlen T, Doe CQ (2000) Convergence of Dorsal, Dpp, and Egfr Signaling Pathways Subdivides the *Drosophila* Neuroectoderm into Three Dorsal-Ventral Columns. *Dev Biol* 224:362-372
177. Walldorf U, Gehring WJ (1992) Empty spiracles, a gap gene containing a homeobox involved in *Drosophila* head development. *EMBO J* 11:2247-2259
178. Walldorf U, Kiewe A, Wickert M, Ronshaugen M, McGinnis W (2000) Homeobrain, a novel paired-like homeobox gene is expressed in the *Drosophila* brain. *Mech Dev* 96:141-144
179. Wang W, Chen X, Xu H, Lufkin T (1996) Msx3: an novel murine homologue of the *Drosophila* msh homeobox gene restricted to the dorsal embryonic central nervous system. *Mech Dev* 58:203-215
180. Wei G, Ku S, Ma GK, Saito S, Tang AA, Zhang J, Mao JH, Appella E, Balmain A, Huang EJ (2007) HIPK2 represses beta-catenin-mediated transcription, epidermal stem cell expansion, and skin tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:13040-13045

181. Wiellette EL, Harding KW, Mace KA, Ronshaugen MR, Wang FY, McGinnis W (1999) *spen* encodes an RNP motif protein that interacts with Hox pathways to repress the development of head-like sclerites in the *Drosophila* trunk. *Development* 126:5373-5385
182. Wu JS, Luo L (2006) A protocol for mosaic analysis with a repressible cell marker (MARCM) in *Drosophila*. *Nat Protoc* 1:2583-2589
183. Xiong WC, Okano H, Patel NH, Blendy JA, Montell C (1994) *repo* encodes a glial-specific homeo domain protein required in the *Drosophila* nervous system. *Genes Dev.* 8:981-994.
184. Yaglom J, Linskens MH, Sadis S, Rubin DM, Futcher B, Finley D (1995) p34Cdc8-mediated control of Cln3 cyclin degradation. *Mol Cell Biol* 15:731-741
185. Yanagawa S, Matsuda Y, Lee JS, Matsubayashi H, Sese S, Kadowaki T, Ishimoto A (2002) Casein kinase I phosphorylates the Armadillo protein and induces its degradation in *Drosophila*. *EMBO J* 21:1733-1742
186. Yang X, Li J, Qin H, Yang H, Li J, Zhou P, Liang Y, Han H (2005) Mint represses transactivation of the type II collagen gene enhancer through interaction with alpha A-crystallin-binding protein 1. *J Biol Chem* 280:18710-18716
187. Zhang Q, Wang Y (2007) Homeodomain-interacting protein kinase-2 (HIPK2) phosphorylates HMGA1a at Ser-35, Thr-52, and Thr-77 and modulates its DNA binding affinity. *J Proteome Res* 6:4711-4719
188. Zolotukhin AS, Uranishi H, Lindtner S, Bear J, Pavlakis GN, Felber BK (2009) Nuclear export factor RBM15 facilitates the access of DBP5 to mRNA. *Nucleic Acids Res* 37:7151-7162

7. Anhang

Tab.7.1. Zusätzliche Primer für externe Sequenzierungen durch die Firma StarSeq.

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Schmelztemperatur (2°C+4°C-Regel)
groBiFCseq1	GACATCAAGCCGACGGGTC	62°C
groBiFCseq2	GACGCGTTGGTGGGTGTTG	62°C
nitoBiFCseq1	CATTGCATCATGACTATCCTC	60°C
nitoBiFCseq2	CTCCGTATCCACCTAGGGG	62°C
hipkBiFCseq1	CGACTACCAGCTGGTGCAG	62°C
hipkBiFCseq2	CCACAGAGCACATGCTGAAC	62°C
hipkBiFCseq3	CCATGCAGCCACCGTTGCAG	62°C
hipkBiFCseq4	CTGGAGGAGCTCAGGTACC	62°C

Tab.7.2. Verwendete Primer zum Nachweis der erfolgreichen Integration bei der Herstellung transgener Fliegen.

Bemerkung	Primer	Sequenz (5' → 3')	Schmelztemperatur (2°C+4°C-Regel)
Nachweis eines beliebigen Inserts in der Docking-Site	attP-F	AGGTCAGAAGCGGTTTTTCGGGAGTAGTG	86°C
	attP-R	GGTCGTAAGCACCCGCGTACGTGTCCAC	92°C
Nachweis eines beliebigen Inserts in pUAST	pUAST5	GCAACTACTGAAATCTGCCAAG	64°C
	pUAST3	GTAAGGTTCTTCACAAAGATCCTCTA	76°C
Nachweis der <i>nito</i> -Phospho-mutanten in der Docking-Site	nitoBiFCseq2	CTCCGTATCCACCTAGGGG	62°C
	attP-R	GGTCGTAAGCACCCGCGTACGTGTCCAC	92°C
Nachweis der BiFC-Konstrukte für Nito und Groucho in der Docking-Site	pUAST5	GCAACTACTGAAATCTGCCAAG	64°C
	attP-F	AGGTCAGAAGCGGTTTTTCGGGAGTAGTG	86°C
Nachweis der Hipk-BiFC-Konstrukte in der Docking-Site	HipkBiFCseq4	CTGGAGGAGCTCAGGTACC	62°C
	attP-R	GGTCGTAAGCACCCGCGTACGTGTCCAC	92°C

Tab.7.3. Verwendete Primer zum Konstruktachweis bei der Überprüfung rekombinierter Fliegenstämme.

Konstrukt	Primer	Sequenz (5' → 3')	Schmelztemperatur (2°C+4°C-Regel)
UAS-nito	pUAST5	GCAACTACTGAAATCTGCCAAG	64°C
	nitoA2r	GTCCAATCGACGTCGCATG	60°C
UAS-hipk	pUAST5	GCAACTACTGAAATCTGCCAAG	64°C
	Hipkseq6r	CTTGACCACCTGGCCAAAGG	64°C
nitoRNAi 20942	SV2	CACAGAAGTAAGGTTCTTCACAAAGATCC	86°C
	RNAi20942	AGAGCAAGAAGGACAAGTTCCCC	60°C
hipkRNAi 108254	SV2	CACAGAAGTAAGGTTCTTCACAAAGATCC	86°C
	RNAi108254	GTTGACCAGCCAGGTGCAGCG	70°C

8. Publikationen

Dewald DN, Steinmetz EL, Walldorf U:

Homeodomain Interacting Protein Kinase (Hipk) Phosphorylates the Small SPOC Family Protein Spenito.

Manuskript eingereicht zur Veröffentlichung

Teile der Arbeit wurden auf folgender wissenschaftlicher Fachtagung vorgestellt:

- 23rd European Drosophila Research Conference (EDRC), Barcelona 2013

9. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Uwe Walldorf für die Möglichkeit zur Promotion in einem interessanten und anspruchsvollen Arbeitsgebiet. Ich bedanke mich für die Überlassung des Arbeitsthemas, Unterstützung und Gesprächsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. Uli Müller von der Fachrichtung Zoologie/Physiologie von der Universität des Saarlandes danke ich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.

Ich danke allen ehemaligen und gegenwärtigen Mitarbeitern des Instituts für Entwicklungsbiologie für die gute Zusammenarbeit und ein angenehmes Arbeitsklima. Ein besonderer Dank gilt dabei Nicole Bach, die mir bereits während meiner Diplomarbeit stets mit Rat zur Seite stand und Jan Lindacher für seine ebenso tatkräftige wie zuverlässige Unterstützung. Eva Steinmetz danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und Kooperation, insbesondere bei der Arbeit an der gemeinsamen Publikation. Dieter Kolb danke ich für seine Unterstützung bei den Arbeiten in der Konfokalmikroskopie, vor allem aber für seine Freundschaft und Gesprächsbereitschaft in allen Labor- und Lebenslagen.

Der Arbeitsgruppe Montenarh im Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie danke ich für die Möglichkeit, in ihrem Isotopenlabor zu arbeiten. Ein großer Dank gilt an dieser Stelle Sabine Kartarius, die mich in das Arbeiten mit Radioaktivmaterial eingeführt hat und mir auch danach stets als Ansprechpartnerin zur Seite stand.

Danke auch an die Arbeitsgruppen von Prof. Dr. Peter Lipp und Prof. Dr. Dieter Bruns, an deren Mikroskopen die Konfokalaufnahmen entstanden sind.

Meinen Freunden und Verwandten danke ich für ihre Unterstützung, aber auch für Ablenkung, wann immer es nötig war.

Der größte Dank gilt jedoch meinen Eltern und Großeltern. Ohne sie wäre ich nicht dort, wo ich heute bin – in jeder erdenklichen Hinsicht.

10. Lebenslauf

Name: Denise Nicole Dewald

Geburtsdatum: 28.08.1984

Geburtsort: Saarbrücken-Dudweiler

Schulbildung: 1990 - 1994:
Grundschule Saarbrücken-Dudweiler – Turmschule
1994 - 2003:
Gymnasium am Schloss Saarbrücken
Juni 2003: Abitur

Studium: Oktober 2003 – Juli 2008:
Studium der Biologie mit Schwerpunkt Human- und Molekularbiologie
an der Universität des Saarlandes
Vordiplom: 13.10.2005
Diplom: 29.07.2008
Prüfungsfächer:
Entwicklungsbiologie, Humangenetik, Physiologie
Thema der Diplomarbeit:
„Charakterisierung von Wechselwirkungen der Homeodomänprotein-
interagierenden Proteinkinase 2 (dHIPK2) bei *Drosophila*
melanogaster“

Promotion: Januar 2009:
Beginn der Doktorarbeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Uwe
Walldorf am Institut für Entwicklungsbiologie, Universität des
Saarlandes