

**Analyse von Wechselwirkungen der Homeodomänen
Interagierender Proteinkinase (Hipk) mit Genen der
Augenentwicklung von *Drosophila melanogaster***

Dissertation zur Erlangung des Grades der Doktorin der Naturwissenschaften
der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
der Universität des Saarlandes

von

Eva Louise Steinmetz

(Dipl.Biol.)

Saarbrücken

2018

Tag des Kolloquiums:	26.10.2018
Dekan:	Prof. Manfred Schmitt
Berichterstatter:	Prof. U. Walldorf
	Prof. M. Montenarh
Vorsitz:	Prof. U. Müller
Akad. Mitarbeiter:	Dr. K. Lepikovh

Eidesstattliche Versicherung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form in einem Verfahren zur Erlangung eines akademischen Grades vorgelegt.

Ort, Datum

(Unterschrift)

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
ad	auffüllen auf
AK	Antikörper
Ala	Alanin (Aminosäure)
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäuren
Asp	Aspartat (Aminosäure)
ATP	Adenosintriphosphat
BiFC	<i>Bimolecular fluorescence complementation</i>
BL	<i>Bloomington Stock Center</i> (Stammbezeichnung: + Nummer)
bp	<i>base pairs</i> (Basenpaare)
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
C	Cytosin
CaCl ₂	Calciumchlorid
Ci	Curie
cDNA	komplementäre DNA (<i>copy DNA</i>)
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
C-terminal	carboxyterminal (Protein)
CYFP	C-terminales Fragment von YFP
CyO	<i>Curly of Oster</i> (Phänotypischer Marker, nach oben gebogene Flügel)
Da	Dalton
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
DGRC	<i>Drosophila Genomics Resource Center</i>
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
d.h.	das heißt
deion	deionisiertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DSHB	<i>Developmental Studies Hybridoma Bank</i>
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure
et al.	<i>et alii / et aliae</i> (lat. "und andere")
F1	1. Filialgeneration
F2	2. Filialgeneration
Flp	Flippase
FRT	<i>Flp Rekombinase Target</i>
g	(Normwert) Erdbeschleunigung ($g = 9.80665 \text{ m/s}^2$)
g	Gramm
γ	Gamma-

G	Guanin
G ₀	G ₀ -Generation, Ausgangsgeneration bei Kreuzungen
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
Glu	Glutamat (Aminosäure)
h	Stunde(n)
H ₂ O	Wasser
HCl	Salzsäure
Ig	Immunglobulin
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalaktopyranosid
IRD	<i>Infrared Dye</i>
kb	<i>kilo base pairs</i> (Kilobasenpaare)
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
l	Liter
<i>lacZ</i>	Beta-Galaktosidase-Gen
LB	Luria Bertani Medium
LiCl	Lithiumchlorid
M	Molarität
μ	Mikro-
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
max.	maximal
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
mM	Millimolarität
min	Minute(n)
ml	Milliliter
MnCl ₂	Manganchlorid
Myr	<i>Millions of years</i>
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ HPO ₄ (2H ₂ O)	di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat
NaH ₂ PO ₄ (H ₂ O)	Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat
NaOH	Natriumhydroxid
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
ng	Nanogramm
NHS	<i>Normal Horse Serum</i> (normales Pferdeserum)
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	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PBL	<i>Phosphate Buffered Lysin</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
pg	Pikogramm

pH	<i>Potentia hydrogenii</i> ; pH = -log c(H ₃ O ⁺) bzw. = -log c(H ⁺)
pmol	Pikomol
Pro	Prolin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RbCl	Rubidiumchlorid
RDGN	<i>Retinal Determination Gene Network</i>
RFP	<i>Red Fluorescent Protein</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
RNase	Ribonuklease
rpm	<i>revolutions per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
Sb	<i>Stubble</i> (Phänotypischer Marker, kurze Borsten)
Sco	<i>Scutoid</i> (Phänotypischer Marker, fehlende Borsten)
SDS	Natriumdodecylsulfat (Sodiumdodecylsulfat)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
sek	Sekunde(n)
Ser	Serin (Aminosäure)
Ser	<i>Serrate</i> (Phänotypischer Marker, gekerbte Flügel)
SOC	<i>Super Optimal Broth</i> (Optimales Nährmedium für Bakterien)
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Taq	<i>Thermus aquaticus</i> (hitzebeständiges Bakterium)
Tb	<i>Tubby</i> (Phänotypischer Marker, gedrungener Körper)
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tertramethylethylendiamin
Thr	Threonin (Aminosäure)
TM3	<i>Third multiple 3</i> (<i>Drosophila</i> -Balancer, 3.Chromosom)
TM6	<i>Third multiple 6</i> (<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	Polyoxyethylen Octylphenylether (Nichtionisches Tensid)
Tween®20	Polyoxyethylen Sorbitan Monolaurat (Nichtionisches Tensid)
Tyr	Tyrosin (Aminosäure)
UAS	<i>Upstream Activation Sequences</i>
U	<i>Unit(s)</i> (Enzymeinheit)
UV	Ultraviolettes Licht
V	Volt
vgl.	vergleiche
VDRC	Vienna <i>Drosophila</i> RNAi Center
W	Watt
wt/WT	Wildtyp
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-Galaktopyranosid
YFP	<i>Yellow Fluorescent Protein</i>
<i>yw</i>	<i>yellow-white</i> (Genotyp-Beschreibung)
z.B.	zum Beispiel

%	Prozent
% (w/v)	Gewichtsprozent (<i>weight per volume</i>)
% (v/v)	Volumenprozent (<i>volume per volume</i>)
~	ungefähr
∞	unendlich
♀	weiblich
♂	männlich
°C	Grad Celsius

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
1.1	Analyse von Wechselwirkungen der Homeodomänen Interagierenden Proteinkinase (Hipk) mit Genen der Augenentwicklung von <i>Drosophila melanogaster</i>	1
1.2	Analysis of interactions of the homeodomain interacting protein kinase (Hipk) in <i>Drosophila melanogaster</i> eye development.....	2
2	Einleitung	3
2.1	Der Modellorganismus <i>Drosophila melanogaster</i>	3
2.2	Die Augenentwicklung von <i>Drosophila melanogaster</i>	5
2.2.1	Das visuelle System von <i>Drosophila melanogaster</i>	8
2.2.2	Das Retinale Determination Gen Netzwerk (RDGN).....	11
2.3	Die PAX6-Proteine Twin of Eyeless (Toy) und Eyeless (Ey).....	13
2.4	Die Homeodomänen Interagierende Proteinkinase (Hipk).....	15
2.5	Zielsetzung der Arbeit.....	20
3	Material und Methoden	21
3.1	Material.....	21
3.1.1	Antikörper.....	21
3.1.2	Bakterienstämme.....	21
3.1.3	Fliegenstämme	22
3.1.4	DNA-Klone und cDNA-Konstrukte	23
3.1.5	Oligonukleotide (Primer).....	23
3.1.6	Vektoren.....	27
3.1.7	Bezugsquellen	29
3.1.8	Verwendete Kits.....	30
3.1.9	Geräte	30
3.1.10	Internetadressen und PC-Programme	31
3.1.11	Lösungen und Puffer.....	32
3.1.12	Medien.....	34
3.2	Methoden.....	36
3.2.1	Herstellung chemisch kompetenter Zellen.....	36
3.2.2	DNA-Restriktion.....	37
3.2.3	Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten.....	37
3.2.4	DNA-Isolierung aus Agarosegelen	37
3.2.5	Dephosphorylierung mit rAPid Alkaline Phosphatase.....	38
3.2.6	Ligation.....	38
3.2.7	Transformation chemisch kompetenter Bakterien mit Plasmid-DNA.....	38
3.2.8	Klonierung mit dem TOPO® TA Cloning® Kit.....	39
3.2.9	Klonierung mit dem pCR®8/GW/TOPO® TA Cloning® Kit.....	39

3.2.10	Klonierung mit dem Gateway® LR Clonase™ II Enzym Mix.....	40
3.2.11	Plasmid-Isolierung mittels alkalischer Lyse	41
3.2.12	Plasmid-Isolierung mittels peqGOLD Plasmid Miniprep Kit II (Peqlab).....	42
3.2.13	Ortsspezifische Mutagenese mit dem Q5 Kit (NEB).....	42
3.2.14	Isolierung genomischer DNA aus Fliegen.....	43
3.2.15	Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	43
3.2.16	Anfügen von 3'-A-Überhängen	45
3.2.17	Sequenzierung von DNA.....	45
3.2.18	Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen im Batchverfahren	47
3.2.19	Expression und Aufreinigung von GST-Hipk als Fusionsprotein	48
3.2.20	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	49
3.2.21	Proteinkonzentrationsbestimmung (Bradford-Methode).....	49
3.2.22	Phosphorylierungsassay (Kinaseassay)	50
3.2.23	Fliegenzucht	51
3.2.24	Absammeln von virginellen Weibchen (Jungfrauen) für Kreuzungen.....	51
3.2.25	Phänotypische Untersuchungen.....	51
3.2.26	PhiC31-Integrase-vermittelte Keimbahntransformation	52
3.2.27	Durchführung der Keimbahntransformation.....	53
3.2.28	Fehlexpression mit dem UAS/Gal4-System (Brand & Perrimon, 1993).....	55
3.2.29	Messungen der Augenfläche von Komplexaugen.....	56
3.2.30	Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (BiFC).....	56
3.2.31	Antikörperfärbungen an larvalen Geweben.....	58
3.2.32	Konventionelle Lichtmikroskopie.....	58
3.2.33	Fluoreszenzmikroskopie.....	59
3.2.34	Konfokalmikroskopie.....	60
4	Ergebnisse.....	61
4.1	Untersuchung der <i>in vivo</i> Interaktion zwischen Hipk und Toy.....	61
4.1.1	Erzeugung eines transgenen UAS _{toy} -BiFC-Stammes.....	62
4.1.2	BiFC-Nachweis der <i>in vivo</i> Interaktion von Hipk und Toy	64
4.2	Analyse phosphorylierungsmutanter UAS _{toy} -Stämme I.....	67
4.2.1	Erzeugung transgener UAS _{toy} -Stämme mittels PhiC31-Integration	68
4.2.2	Fehlexpressionsanalyse phosphorylierungsmutanter UAS _{toy} -Stämme I.....	70
4.3	Biochemische Analyse des Hipk-Substrates Twin of eyeless (Toy).....	75
4.3.1	Grobkartierung von Toy	75
4.3.2	Feinkartierung des N-Terminus.....	78
4.3.3	Feinkartierung des C-Terminus.....	82
4.3.4	Konservierung der gefundenen Hipk-Phosphorylierungsstellen.....	85
4.4	Analyse phosphorylierungsmutanter UAS _{toy} -Fliegenstämme II.....	87
4.4.1	Herstellung mutierter pUAS _{TattB-toy} -Transformationskonstrukte.....	87
4.4.2	Erzeugung transgener phosphorylierungsmutanter UAS _{toy} -Stämme	91

4.4.3	Zielgenaktivierung durch Fehlexpression der phosphorylierungsmutanten UAS toy -Konstrukte	92
4.4.4	Rescue-Analyse der letalen toy -Allelkombination $toy^{hd1}/toy^{G7.39}$	94
4.4.5	Fehlexpressionsanalyse phosphorylierungsmutanter UAS toy -Stämme II.....	96
4.5	Analyse genetischer Interaktionen der $hipk$ mit Faktoren des RDGN	104
4.5.1	Augenspezifische Fehlexpression von RDGN-Faktoren bei unterschiedlicher $hipk$ -Dosis	105
4.5.2	Einfluss von Hipk auf die Augenentwicklung bei unterschiedlicher toy -Dosis	110
4.5.3	Charakterisierung der Interaktion von $hipk$ und RDGN-Faktoren.....	112
4.6	$Hipk$ -Enhancer-Analyse	115
4.6.1	Expressionsanalyse potentieller augenspezifischer $hipk$ -Enhancer.....	116
4.6.1	Deletion eines augenspezifischen $hipk$ -Enhancers	118
4.6.2	Letalitätsanalyse des erzeugten $hipk^{EGT}$ -Stammes.....	122
5	Diskussion	124
5.1	Analyse der <i>in vivo</i> Interaktion von Hipk mit Toy und mit Ey.....	124
5.2	Biochemische Analyse der Hipk-Phosphorylierungsstellen von Toy	128
5.3	Auswirkungen der Hipk-Phosphorylierung von Toy <i>in vivo</i>	134
5.3.1	Zielgenaktivierung durch die Phosphorylierungsmutante ToyVM.....	134
5.3.2	Rescue-Analyse von $toy^{hd1}/toy^{G7.39}$ -Fliegen	136
5.3.3	Fehlexpressionsanalyse der Phosphorylierungsmutanten.....	137
5.4	Weiterführende Untersuchung des Hipk-Einflusses auf die Augenentwicklung von <i>Drosophila melanogaster</i>	140
5.4.1	Wechselwirkungen der Hipk mit weiteren Faktoren des RDGN.....	141
5.4.2	Analyse eines potentiellen augenspezifischen Enhancers von $hipk$	145
5.5	Modell des Hipk-Einflusses auf die Augenentwicklung	147
6	Literaturverzeichnis.....	150
7	Anhang.....	163
7.1	Ergänzende Daten zu Hipk-Substraten innerhalb des RDGN.....	163
7.2	Hipk-Substrate Überblick	164
7.3	Ergänzende Daten zur $hipk$ -Enhancer Analyse	165
8	Publikationen.....	169
9	Danksagung.....	170
10	Lebenslauf	171

1 Zusammenfassung

1.1 Analyse von Wechselwirkungen der Homeodomänen Interagierenden Proteinkinase (Hipk) mit Genen der Augenentwicklung von *Drosophila melanogaster*

Ziel der Arbeit war die Untersuchung des einzigen bei *Drosophila* vorkommenden Vertreters der HIPK-Familie im Kontext der Augenentwicklung. Die retinale Determination wird bei *Drosophila* von den Faktoren des Retinalen Determinations Gen Netzwerkes (RDGN) gesteuert.

Während einer Interaktionsstudie mit Hilfe der Bimolekularen Fluoreszenzkomplementation (BiFC) konnten die RDGN-Faktoren Twin of Eyeless (Toy) und Eyeless (Ey) als *in vivo* Interaktionspartner der Hipk bestätigt werden. Außerdem konnten beide Proteine durch *in vitro* Phosphorylierungsanalysen als Substrat der Hipk identifiziert werden und die vollständige Kartierung von Toy ergab vier Hipk-Phosphorylierungsstellen. Um die Auswirkungen der Hipk-Phosphorylierung von Toy *in vivo* zu untersuchen, wurden ausgehend von den kartierten Phosphorylierungsstellen transgene phosphorylierungsmutante Fliegenstämme erzeugt und diese zur ektopischen Expression im Rahmen von Fehlexpressionsanalysen eingesetzt.

Zur Auffindung weiterer Wechselwirkungen der Hipk mit Faktoren der Augenentwicklung wurden Kreuzungsanalysen bei variierender Hipk-Dosis durchgeführt. Außerdem konnten bei einer Untersuchung regulatorischer Regionen von *hipk* drei potentiell augenspezifische *hipk*-Enhancer identifiziert werden. Zur funktionellen Analyse wurde ein entsprechender transgener Fliegenstamm erzeugt (*hipk*^{EGT}).

1.2 Analysis of interactions of the homeodomain interacting protein kinase (Hipk) in *Drosophila melanogaster* eye development

HIPKs are well conserved in different signaling pathways and developmental processes throughout the animal kingdom. Purpose of this work was the investigation of the only representative of the Hipk family in *Drosophila* within the context of eye development. Retinal determination in *Drosophila* is molecularly controlled by the Retinal Determination Gene Network (RDGN).

Using a Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC), the two RDGN factors and Paired box protein 6 (PAX6) homologues Twin of eyeless (Toy) and Eyeless (Ey) were confirmed to be *in vivo* interaction partners of Hipk. In addition, Toy and Ey were set in an enzyme-substrate relationship with Hipk by *in vitro* phosphorylation assays. Full mapping of Toy revealed four Hipk phosphorylation sites. In order to investigate the effects of Hipk phosphorylation *in vivo* transgenic phosphorylation mutant fly strains were generated based on the mapped Hipk-phosphorylation sites and used for ectopic expression.

In order to detect further interactions of the Hipk with factors of eye development, genetic analyzes were performed at varying Hipk dose.

In addition, an analysis of *hipk* regulatory regions by larval reporter gene expression identified three specific *hipk* enhancers for expression in developing eye tissue. For the functional analysis a corresponding transgenic fly strain was generated (*hipk*^{EGT}).

2 Einleitung

2.1 Der Modellorganismus *Drosophila melanogaster*

Die Taufliege *Drosophila melanogaster* wurde bereits Anfang des 20. Jahrhunderts von Thomas Hunt Morgan als Modellorganismus in die genetische Forschung eingeführt und stellt mittlerweile seit rund 100 Jahren vor allem dank ihrer relativ kurzen Generationszeit (10-12 Tage bei 25 °C) und einfachen Zucht das klassische Objekt der eukaryotischen Genetik dar. Das relativ kleine Genom (165.000 kb) ist in vier Chromosomenpaare (Geschlechtschromosomen X/X bzw. X/Y und die Autosomen 2, 3 und 4) verpackt und konnte bereits komplett sequenziert werden (Adams et al., 2000). Es kodiert für ca. 14.000 Gene, von denen viele während der Evolution konserviert geblieben sind. Damit stellt *Drosophila* einen geeigneten Modellorganismus dar, um auch die humane Biologie und krankheitsbildende Prozesse zu analysieren. Von 2.309 gelisteten humanen Krankheitsgenen haben etwa 700 ein konserviertes Homolog im *Drosophila*-Genom (Bier et al. 2005).

Die Aufklärung einer Gen-/Protein-Funktion bei *Drosophila* erfolgt oft über die Charakterisierung entsprechender das Gen (und damit auch das Protein) betreffende Mutationen. Alternativ stellt die gezielte zeit- und gewebespezifische (Fehl-) Expression zu untersuchender Faktoren in anderen Geweben eine Möglichkeit der Analyse von Genfunktionen dar. Um die gezielte Expression eines zu untersuchenden Genes möglich zu machen, erzeugt man transgene Fliegenlinien, indem entsprechende DNA-Konstrukte per Mikroinjektion in frühe Embryonen injiziert werden. Dabei kann der Einbau der DNA ins Fliegen-genom entweder ungerichtet mittels P-Elementen oder gerichtet mit Hilfe des PhiC31-Systems erfolgen (Rubin & Spradling, 1982; Groth et al., 2004).

Das anzuwendende System für die zeit- und gewebespezifische Expression ist das UAS/Gal4 System (Brand & Perrimon, 1993), das sich aus zwei Komponenten eines ursprünglich aus der Hefe stammenden Transkriptionsfaktors zusammensetzt. Um das System in *Drosophila* zu nutzen, werden zwei verschiedene transgene Fliegenlinien miteinander verkreuzt und so die Komponenten miteinander kombiniert (siehe Abb. 2.1).

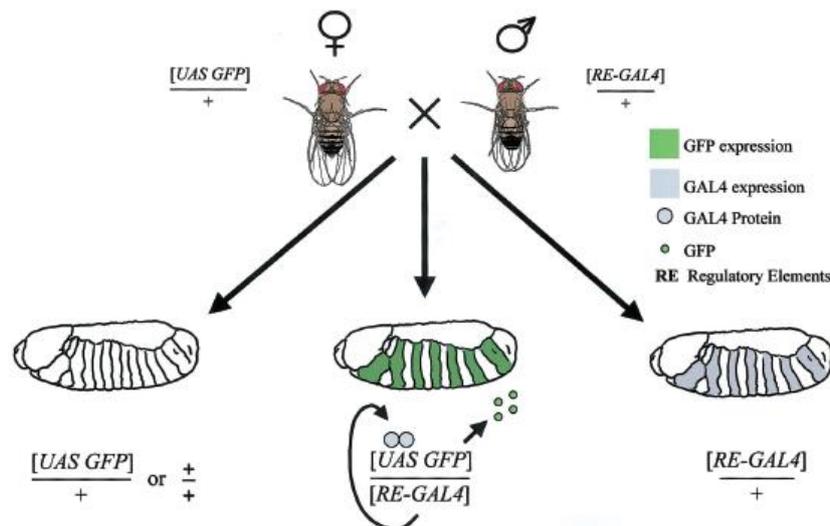


Abb. 2.1: Das binäre UAS/Gal4-System von *Drosophila*. Durch Kreuzung zweier transgener Fliegen mit je einer Komponente des UAS/Gal4-Systems erhält man Nachkommen, die beide Elemente des Systems in sich tragen und somit zeit- und gewebespezifisch Gal4 und als Konsequenz auch das Reportergen *Green Fluorescent Protein* (GFP) exprimieren (Duffy, 2002).

Die Treiberlinie enthält das *Gal4*-Gen unter der Kontrolle einer bestimmten regulatorischen Region und gibt damit Zeit und Gewebe der Expression von Gal4 vor. Die Effektor Linie enthält das zu analysierende Gen unter der Kontrolle einer sogenannten UAS-Sequenz (*Upstream Activation Sequences*, UAS). Diese reagiert auf die Bindung des Gal4-Proteins, bindet kein Gal4-Protein, wird das dahinter geschaltete Gen nicht exprimiert. Als Konsequenz einer Kreuzung von Treiber- und Effektorlinie kommt es zur Bindung von Gal4 an die UAS-Sequenz und damit zur Expression des zu analysierenden Gens im gewünschten zeit- und gewebespezifischen Muster.

Die Haltung beider Komponenten in getrennten Linien ermöglicht ein hohes Maß an Kombinatorik. Je nach Fragestellung können ausgewählte Treiberstämme das gewünschte Expressionsmuster des zu untersuchenden Gens induzieren. Auch humane Gene konnten auf diese Weise in *Drosophila* exprimiert und analysiert werden.

Außerdem ist es möglich, endogene zu untersuchende Gene herunterzuregulieren, indem statt des Gens die Expression einer entsprechenden *hairpin* RNA induziert wird und so der endogene RNAi-Silencing Mechanismus ausgelöst wird (Duffy, 2002).

2.2 Die Augenentwicklung von *Drosophila melanogaster*

Die Evolution des visuellen Systems vielzelliger Tiere hat morphologisch sehr unterschiedliche Augenstrukturen hervorgebracht. Von einer einfachen Ansammlung weniger lichtempfindlicher Lichtrezeptoren über das Komplexauge der Insekten bis hin zum kameraähnlichen Linsenauge der Wirbeltiere. Die unterschiedliche Architektur der Augenstrukturen verschiedener Spezies wurde lange Zeit durch eine polyphyletische, voneinander unabhängige Entwicklung erklärt.

Aus heutiger Sicht gilt im Tierreich die Theorie einer monophyletischen Entstehung eines Augenprototypes der im Laufe der Evolution durch Diversifizierung zu unterschiedlichen Augenstrukturen geführt hat. Dabei liegt der gemeinsame Ursprung in einem Gen das zur PAIRED (PRD)-Klasse der Homeoboxgene gehört (zusammengefasst in Gehring & Ikeo, 1999; Gehring, 2014; Bürglin & Affolter, 2016).

Das charakteristische Merkmal der Homeoboxgene ist ein 180 bp langes DNA-Sequenzelement das für eine 60 Aminosäure große DNA-bindende Proteindomäne, die Homeodomäne (HD), kodiert (McGinnis et al., 1984a). Der Name stammt von den homeotischen Genen von *Drosophila*, in denen sie zum ersten Mal entdeckt wurde. Die HD besteht aus drei α -Helices, wobei die sehr konservierte dritte α -Helix eine spezifische Bindung an ein Erkennungsmotiv der DNA vermittelt (Wilson et al., 1993, Gehring et al., 1994). Die Erkennung erfolgt über ein zentrales TAAT-Motiv, gefolgt von mehreren spezifizierenden Basenpaaren. Die HD konnte nicht nur in *Drosophila*, sondern auch in vielen anderen eukaryotischen Organismen von Pflanzen über Frösche bis hin zu Maus und Mensch, nachgewiesen werden (McGinnis et al., 1984b). Vielzellige Tiere besitzen zwischen 100 (Protostomia) und 250 (Vertebraten), *Drosophila* besitzt 103 Homeoboxgene (Bürglin & Affolter, 2016). Die Unterteilung dieser Gene erfolgt in 16 Klassen, je nachdem für welche weiteren Domänen sie kodieren. In vielzelligen Tieren sind etwa 15-30 % der transkriptionellen Regulatoren HD-Proteine (De Mendoza et al., 2013).

Die PAIRED (PRD) Klasse der Homeoboxgene kodiert zusätzlich für die PAIRED Domäne. Man fand die Mitglieder der Proteinfamilie über Sequenzhomologien zu einer 128 Aminosäuren langen Paired Domäne (PD), die initial im Protein Paired (Prd) von *Drosophila* beschrieben wurde (Bopp et al., 1986; Noll, 1993). Sie stellt eine bipartite DNA-Bindedomäne dar (Treisman et al., 1991; Czerny et al., 1993). Diese besteht aus zwei Helix-Turn-Helix-Motiven, der PAI (N-terminal) und der RED (C-terminal) Subdomäne, welche über eine Linker-Region aus acht Aminosäuren verbunden sind (Xu et al., 1995; Xu et al., 1999).

Die ursprünglichste Version eines PRD-Proteins besaß vermutlich neben jeweils einer vollständigen HD und PD zwei weitere Sequenz-Motive, ein EH1 (auch Oktapeptidsequenz genannt) und ein OAR-Motiv (Bürglin & Affolter, 2016). In manchen PRD-Genen, die in Säugetieren *Paired Box Gene* (*Pax Gene*) genannt werden, sind einzelne Sequenz-Motive jedoch ganz oder teilweise verloren gegangen. Durch die Beschaffenheit und die unterschiedliche Kombinatorik ihrer DNA-Bindedomänen (und Subdomänen) können diese als Transkriptionsfaktoren funktionierenden PRD/PAX-Proteine eine hohe Kombinatorik entwickeln und daher spezifisch an ein großes Repertoire von Zielsequenzen binden (Jun & Desplan, 1996; Bürglin & Affolter, 2016) (Abb. 2.2).

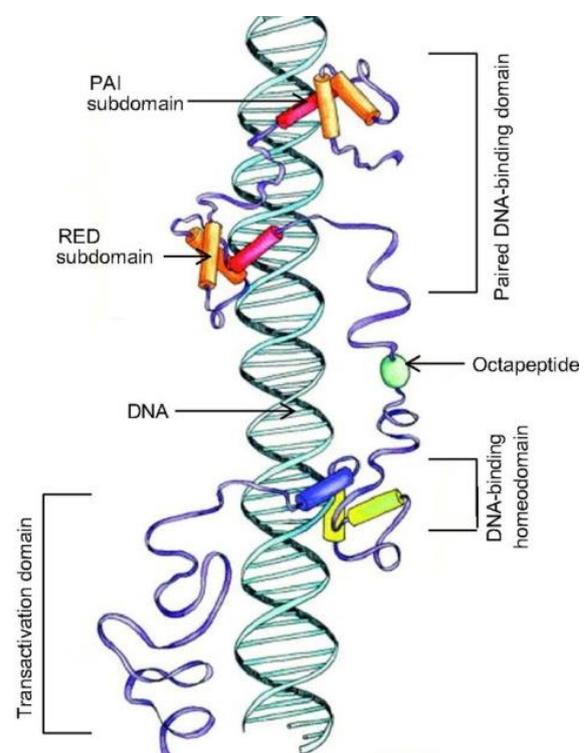


Abb. 2.2: Allgemeine Proteinstruktur von PRD/PAX Proteinen. Paired Domäne (PD; unterteilt in PAI und RED Subdomäne), Homeodomäne (HD) und Oktapeptid (Chi & Epstein, 2002).

Die Struktur bezüglich ihrer DNA-Bindedomänen bestimmt auch über die Einteilung der PRD-Gene in 6 Familien bzw. der *Pax Gene* (*Pax1-Pax9*, Säugetiere) in vier Subgruppen (Chi & Epstein, 2002, Bürglin & Affolter, 2016). *Pax6 Gene* sind die bisher am besten untersuchten, sie besitzen eine PD und eine HD, aber keine Oktapeptidsequenz/EH1-Motiv (Callaerts et al., 1997; Cvekl & Callaerts, 2016).

Sowohl beim Menschen als auch bei Mäusen konnten schon früh Vertreter der *Pax* Genklasse mit der Augenentwicklung in Verbindung gebracht werden. Mutationen der Gene *Aniridia* (*AN*) beim Menschen (Rush, 1926; Ton et al., 1991) und *Small eyes* (*Sey*) der Maus (Roberts, 1967; Hill et al., 1991) sind beschrieben als semi-dominant und rezessiv letal, wobei heterozygote Individuen

massive okulare Missbildungen aufweisen. Sequenzvergleiche deckten die Homologie der beiden Gene auf und in den Polypeptidsequenzen beider Proteine wurde je eine Paired Domäne und eine Homeodomäne gefunden, was zur Einteilung in die *Pax6* Genklasse führte.

Mildred Hoge entdeckte ihrerseits einen durch spontane Mutation entstandenen augenlosen *Drosophila*-Stamm, dessen Phänotyp sie gemäß dem Erscheinungsbild *eyeless* (augenlos) benannte und ihn durch Kartierung dem 4. Chromosom zuordnen konnte (Hoge, 1915). Als man 1994 ein *Drosophila* Homolog zum PAX6 Protein identifizierte und während der Analyse des dazugehörigen genomischen Lokus dieses Protein dem *eyeless* (*ey*) Lokus zugeordnet werden konnte, war die molekulare Ursache des von Hoge's beobachteten Phänotyp geklärt, die Insertion eines transposablen Elementes hatte die augenspezifische Expression des Genes *eyeless* (*ey*) ausgeschaltet (Quiring et al., 1994).

Die Entdeckung eines zum humanen *Pax6* Gen homologen Faktors in *Drosophila* war eine wichtige Erkenntnis, die zum modernen Verständnis der Augenentwicklung in allen Tieren beitragen konnte. *Pax6* ist damit nicht nur in Säugetieren, sondern auch in Insekten für die genetische Steuerung der Augenentwicklung verantwortlich. Dies führte dazu, dass die unabhängige Evolution des visuellen Systems aller Tiere neu durchdacht werden musste.

In *Drosophila* wurde gezeigt, dass die gezielte Fehlexpression von *ey* mit Hilfe des UAS/Gal4-Systems das Entwicklungsschicksal epithelialer Zellen hin zu einem retinalen Schicksal umprogrammieren und es folglich im Zielgewebe zur Ausbildung sogenannter ektopischer Augen kommen kann (Halder et al., 1995). Unter ektopischen Augen versteht man das Vorkommen von Augengewebe an einer für dieses Gewebe nicht typischen Stelle des Organismus (von griechisch: „ektos“ für außen, „topos“ für Ort). Darauf aufbauend wurde eine Theorie formuliert, in der *ey* als Masterregulator die Organogenese der Augen lenkt und an der Spitze einer linearen Hierarchie von Genen steht (Gehring, 1996; Callaerts et al., 1997). Tatsächlich fand man mehrere Gene, die *ey* transkriptionell untergeordnet sind, die ihrerseits bei gezielter Fehlexpression (alleine oder in Kombination) die Bildung ektopischer Augen induzieren: *eyes absent* (*eya*), *sine oculis* (*so*) und *dachshund* (*dac*) (Bonini et al., 1997; Chen et al., 1997; Pignoni et al., 1997; Shen & Mardon, 1997). Weil die Induktion ektopischer Augen trotz allem abhängig ist von der Aktivierung der *ey* Expression (über einen Feedback-Loop), sprach man ab diesem Zeitpunkt von einem Netzwerk der Augenentwicklung in *Drosophila* (Chen et al., 1997; Pignoni et al., 1997; Desplan, 1997).

Der Arbeitsgruppe um Walter Gehring gelang es sogar, die Austauschbarkeit der PAX6 Homologen von Insekten- und Säugetieren nachzuweisen, indem sie zeigte, dass durch die

Fehlexpression des Vertebraten *Pax6* Gens in *Drosophila* ebenfalls ektopische Augen induziert werden können (Halder et al., 1995; Gehring, 2005). Somit war neben der Homologie der Sequenzen auch die funktionelle Konservierung der *Pax6* Genfunktion bewiesen. Diese Erkenntnisse führten zur modernen Ansicht, dass es einen gemeinsamen, monophyletischen, evolutionären Ursprung der Augenentwicklung gibt, das *Pax6* Gen (Gehring, 2012 & 2014).

Drosophila besitzt neben *ey* einen zweiten Vertreter der *Pax6* Genfamilie, *twin of eyeless (toy)*, beide Gene sind durch ein Duplikationsereignis auseinander hervorgegangen (Czerny et al., 1999). Holometabole Insekten wie *Drosophila melanogaster* stellen damit eine Ausnahme im Tierreich dar, denn alle anderen Spezies besitzen lediglich einen Vertreter der *Pax6* Klasse. Anhand von *Toy* und *Ey* wurden in *Drosophila* erste genetische Interaktionen von PAX6 Proteinen zu untergeordneten Zielgenen identifiziert und das Konzept eines Netzwerkes der augenspezifischen Gene erstellt (Desplan, 1997).

Neben *toy* und *ey* konnten zahlreiche der identifizierten untergeordneten Zielgene wie z.B. *eyes absent (eya)*, *sine oculis (so)* und *dachshund (dac)* in homologer Form bei Säugetieren nachgewiesen werden und es wurde festgestellt, dass, zumindest zum Teil, auch die netzwerkartige Regulation konserviert ist (Donner & Maas, 2004; Rebay et al., 2005). Der Modellorganismus *Drosophila* bietet somit ideale Voraussetzungen, um die grundlegende Funktion/Regulation der Augenentwicklung aller Tiere zu untersuchen.

2.2.1 Das visuelle System von *Drosophila melanogaster*

Das visuelle System von *Drosophila* setzt sich zusammen aus drei grob unterscheidbaren Strukturen, dem Bolwig-Organ (das larvale „Auge“), den optischen Loben und den adulten Komplexaugen. Im Folgenden wird ausschließlich auf die Entwicklung der adulten Komplexaugen eingegangen. Die Komplexaugen, sowie fast alle anderen Kopfstrukturen der adulten Taufliege (Kopfkapsel, Antennen, Maxillaren und Ocelli), entstehen aus den beiden Augen-Antennen-Imaginalscheiben (*Eye Antennal Discs*, EADs) (Haynie & Bryant, 1986). Imaginalscheiben sind Zellgruppen ektodermalen Ursprungs, die sich zu Körperstrukturen des adulten Tieres entwickeln. Die entsprechenden Zellen einer Imaginalscheibe gruppieren sich während des Embryonalstadiums und wandern als Einstülpung des Ektoderms ins Innere. Während des Larvalstadiums verbleiben sie im Larvenkörper als epitheliale Säckchen (Abb. 2.3),

bevor sie sich während der puppalen Metamorphose nach außen stülpen und die Struktur des adulten Körperteils ausbilden.

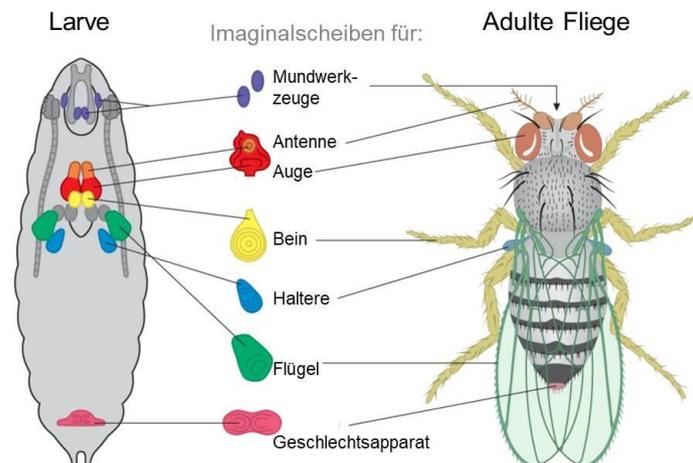


Abb. 2.3: Position und Form der Imaginalscheiben einer Larve des dritten Larvenstadiums (L3). Imaginalscheiben und die sich während der Metamorphose daraus entwickelnden adulten Körperstrukturen von *Drosophila* (Wolpert et al., 1999).

Im embryonalen Blastoderm Stadium formen zunächst 6-23 Zellen das Augen-Antennen-Primordium, den Vorläufer der EADs (Callaerts et al., 2006). Am Übergang zum ersten Larvenstadium (L1) bilden sich dann zwei Invaginationen des *dorsal pouch* Epitheliums (Zellen im dorso-lateralen Bereich des eingestülpten Kopfes) ins Innere des Larvenkörpers. Diese Strukturen stellen den Ursprung der beiden EADs dar (Struhl, 1981; Younossi-Hartenstein et al., 1993; Namba & Minden, 1999). Die Unterteilung der EAD in zwei diskrete Bereiche (Antennenscheibe und Augenscheibe) erfolgt im mittleren bis späten zweiten Larvalstadium (L2) (Abb. 2.4).

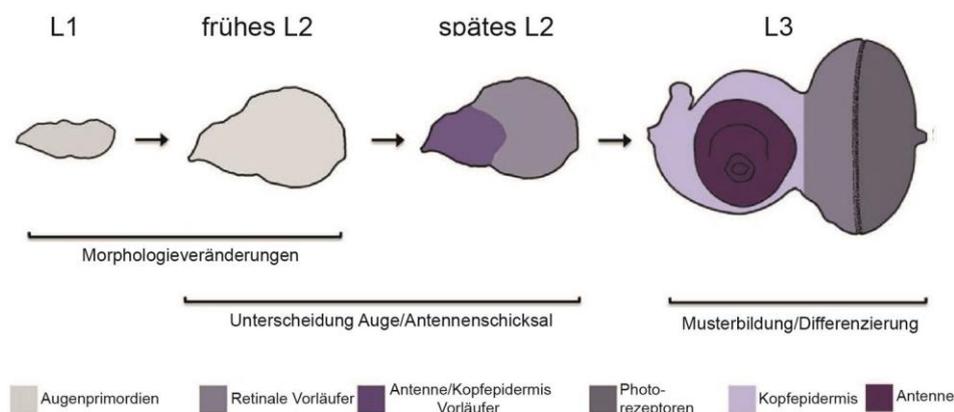


Abb. 2.4: Entwicklung einer Augen-Antennen-Imaginalscheibe. Während der Embryonalentwicklung haben sich aus einem einschichtigen Epithel Augenprimordien gebildet, die während der darauffolgenden Larvalstadien (L1-3) durch Proliferation deutlich an Größe zunehmen und in Kompartimente mit unterschiedlichem Entwicklungsschicksal unterteilt werden. Anterior ist links (Kumar, 2018; verändert).

Einfluss darauf haben die beiden gegenläufig angeordneten Konzentrationsgradienten der Morphogene Decapentaplegic (Dpp) und Wingless (Wg). Ein Dpp-Signal, am posterioren Rand der L2-EAD, ist essentiell für die Aktivierung von *eyes absent (eya)* (Hazelett et al, 1998; Dominguez & Casares, 2005). Dem wirkt das Wg-Signal vom dorsal-anterioren Rand der L2-EAD entgegen. Erst wenn die EAD durch Proliferation eine bestimmte Größe erreicht hat, kann das Dpp-Signal in den posterior gelegenen Zellen, die nicht mehr unter Einfluss des Wg-Signals stehen, effektiv zur Aktivierung der *eya*-Expression führen (Amore & Casares, 2010). Der Bereich der EAD, in dem Eya gebildet wird, entwickelt sich zum retinalen Vorläufer und es werden weitere Gene der frühen Augenentwicklung aktiviert (Abb. 2.4, spätes L2; Kumar & Moses, 2001; Kenyon et al., 2003). Im frühen dritten Larvenstadium (L3) aktiviert ein Proteinkomplex aus Eya und Sine oculis (So) die Transkription von *hedgehog (hh)* am posterioren Rand der Augen-Antennen-Imaginalscheibe, wodurch die morphogenetische Furche (MF) initiiert wird (Ready et al., 1976; Curtiss & Mlodzik, 2000; Kumar & Moses, 2001; Pauli et al., 2005). Diese steuert die Differenzierung der Photorezeptorzellen in Zellreihen, während sie von posterior nach anterior „wandert“. Der Fortschritt der Differenzierung ist dabei auch morphologisch erkennbar anhand einer „Kerbe“ (entspricht der MF) auf der EAD (Abb. 2.4, L3). Zellen anterior der Furche sind noch undifferenziert, Zellen posterior der Furche haben die Differenzierung bereits durchlaufen und sich dabei zu sechskantig angeordneten Zellclustern zusammengeschlossen (Abb. 2.5).

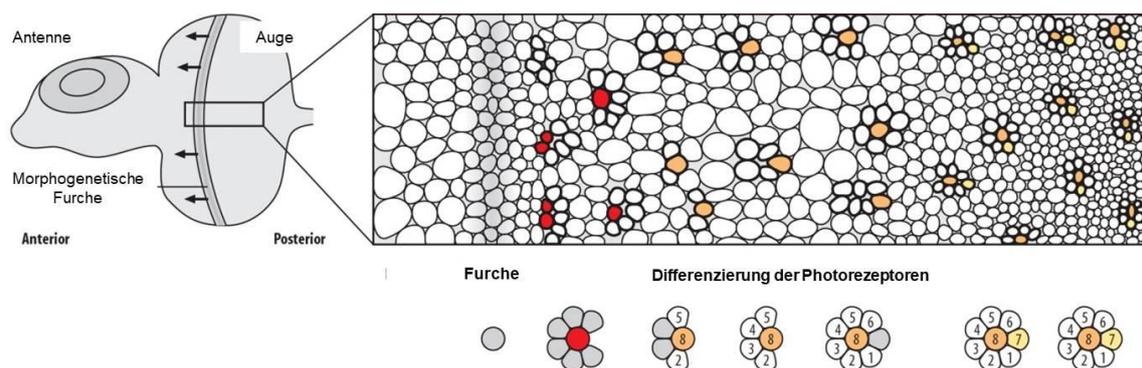


Abb. 2.5: Differenzierung der Photorezeptorzellen. Augen-Antennen-Imaginalscheibe (EAD) des dritten Larvalstadiums. Die Photorezeptoren beginnen mit der Differenzierung sobald sie die morphogenetische Furche (MF) passiert haben. Die MF bewegt sich von posterior nach anterior über den Augenbereich der EAD (Wolpert et al., 1999, verändert).

Die Differenzierung der insgesamt acht Photorezeptorzellen je Ommatidium erfolgt durch die sukzessive Abfolge induktiver Signale, sodass jedes der ~ 800 Ommatidien nach dem gleichen Schema gebildet wird. Zunächst differenziert sich die R8-Zelle, die sich im Zentrum des Clusters befindet, anschließend erfolgt um die R8-Photorezeptorzelle herum die paarweise

Differenzierung von R2/5, R3/4, R6/1 und zuletzt differenziert die R7-Photorezeptorzelle oberhalb der R8. Die hexagonale Anordnung spiegelt dabei bereits die Form des späteren Ommatidiums wieder (Ready et al., 1976; Wolff & Ready, 1991).

2.2.2 Das Retinale Determination Gen Netzwerk (RDGN)

Auf molekularer Ebene liegt der Augenentwicklung von *Drosophila* das Retinale Determination Gen Netzwerk (RDGN) zu Grunde (Abb. 2.6). Die Faktoren des RDGN wurden als solche identifiziert, weil homozygote Mutationen der entsprechenden Gene zu einem Verlust der adulten Augenstruktur führen bzw. eine gezielte Überexpression dieser Gene ektopische Augen in anderen Geweben induzieren kann (Halder et al., 1995; Pignoni et al., 1997; Bonini et al., 1997; Shen & Mardon, 1997). Das Kernnetzwerk setzt sich zusammen aus Mitgliedern der Genfamilien Pax6 (Paired box protein 6), EYA (Eyes absent), SIX (Sine oculis) und DAC (Dachshund) (Silver & Rebay, 2005). Die meisten der RDGN-Faktoren stellen Transkriptionsfaktoren (TF) dar, die entsprechende DNA-bindende Domänen besitzen, mit denen sie sequenzspezifisch in den regulatorischen Regionen der Zielgene binden und so deren Expression aktivieren können. Die Regulation des Netzwerkes erfolgt kontext-spezifisch und primär durch Interaktionen der Faktoren untereinander und Wechselwirkungen mit Effektoren bekannter Signalwege, wie dem Notch-, Dpp/TGFβ-, Wg/Wnt-, Hh- und EGFR-Signalweg (Silver & Rebay, 2005). Das gesamte regulatorische Repertoire des Netzwerkes geht jedoch weit darüber hinaus bis hin zu epigenetischen Einflüssen und steht im Mittelpunkt der aktuellen Forschung zu diesem Gebiet (Davis & Rebay, 2017).

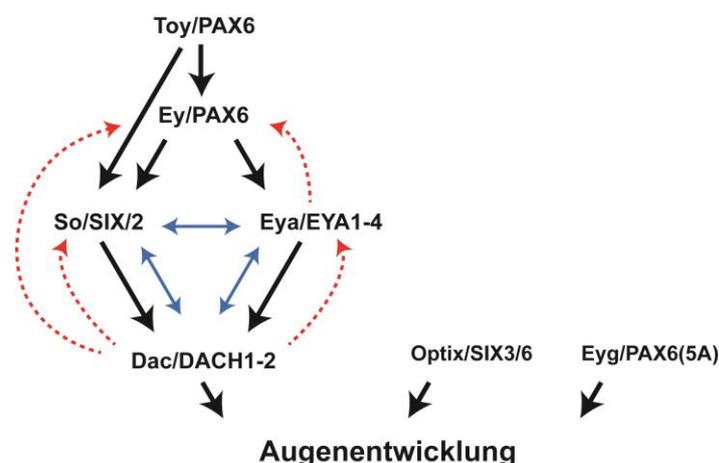


Abb. 2.6: Retinales Determination Gen Netzwerk (RDGN). Schwarze Pfeile: Hierarchie der transkriptionellen Aktivierung; Blaue Pfeile: Protein-Protein-Interaktionen; Rote Pfeile: Transkriptionelle Feedback-Loops (Silver & Rebay, 2005, verändert).

Über die Regulation des Netzwerkes, vor allem an seiner Spitze, ist noch wenig bekannt. Das erste bisher identifizierte Signal des Netzwerkes, welches schließlich den Impuls in Richtung Augenentwicklung setzt, kommt von Twin of eyeless (Toy), dem Faktor an der Spitze des Netzwerkes. Als Zielgene des Transkriptionsfaktors Toy werden daraufhin die Gene *eyeless* (*ey*) und *sine oculis* (*so*) aktiviert, welche entsprechende PAX6-PD Bindestellen für Toy aufweisen (Czerny et al., 1993; Czerny & Busslinger, 1995; Czerny et al., 1999; Hauck et al., 1999; Punzo et al., 2002). Das Protein Ey aktiviert seinerseits Gene, welche die Spezifizierung zu Augengewebe weiter fortsetzen, wie z.B. *so*, *eyes absent* (*eya*) und *optix* (*opt*) (Halder et al., 1998; Niimi et al., 1999; Punzo et al., 2002; Ostrin et al., 2006).

Der RDGN-Faktor Eya ist als transkriptioneller Ko-Aktivator bekannt, der zusammen mit anderen RDGN-Faktoren zur Ziel-DNA rekrutiert wird. Die Protein-Protein-Interaktion zu So oder Dac erfolgt über die C-terminale Eya-Domäne (ED) (Chen et al., 1997; Pignoni et al., 1997). In der ED wurde außerdem ein katalytisches Motiv der Halogensäure Dehalogenase (HAD) Superfamilie nachgewiesen. Eya kann sowohl Tyrosin- als auch Serin-/Threonin-Reste dephosphorylieren und agiert somit als dualspezifische Phosphatase (Li et al., 2003; Rayapureddi et al., 2003; Tootle et al., 2003). Der RDGN-Faktor So besitzt neben der DNA-bindenden HD eine zweite konservierte Domäne, eine Six-Domäne (SD) um Protein-Protein-Interaktionen, z.B. mit Eya und Dac, herzustellen (Seo et al., 1999; Kawakami et al., 2000). Opt gehört ebenfalls zur SIX-Genfamilie, zeigt aber keine Interaktion mit Eya (Seimiya & Gehring, 2000; Kawakami et al., 2000). Eya und So wirken zusammen um die Expression von *dachshund* (*dac*) (Pappu et al., 2005) zu aktivieren.

Der RDGN-Faktor Dac hat zwei konservierte Domänen, eine N-terminale (DachBox1) zur DNA-Bindung und eine C-terminale (DachBox2) für Protein-Protein-Interaktionen, z.B. mit Eya (Chen et al., 1997).

Jedes der untergeordneten Gene ist essentiell für die Augenentwicklung und mithilfe eines positiven Feedback-Mechanismus wird durch So, Eya und Dac wiederum die *ey* Expression stabilisiert (Pignoni et al., 1997; Bonini et al., 1997; Shen & Mardon, 1997). Zudem konnte in allen RDGN-Faktoren mindestens ein augenspezifisches Enhancer-Element nachgewiesen werden (Hauck et al., 1999; Niimi et al., 1999; Jacobsson et al., 2009; Blanco et al., 2010; Zimmerman et al., 2000; Bui et al., 2000; Pappu et al., 2005).

2.3 Die PAX6-Proteine Twin of Eyeless (Toy) und Eyeless (Ey)

Gemäß ihrer Zugehörigkeit zur PAX6-Familie zeichnen sich Toy und Ey durch den Besitz von zwei konservierten DNA-bindenden Domänen aus, der Paired Domäne (PD) und der Homeodomäne (HD) (Quiring et al., 1994; Czerny et al., 1999). Der C-terminale Bereich beider Proteine umfasst eine Prolin-Serin-Threonin (PST) -reiche Region, die auch als Transaktivierungsdomäne (TAD) bezeichnet wird (Czerny & Busslinger, 1995; Punzo et al., 2004; Weasner et al., 2009). Die Proteindomänenstrukturen von Toy und Ey sowie die Struktur von humanem PAX6 sind in Abb. 2.7 vergleichend dargestellt.

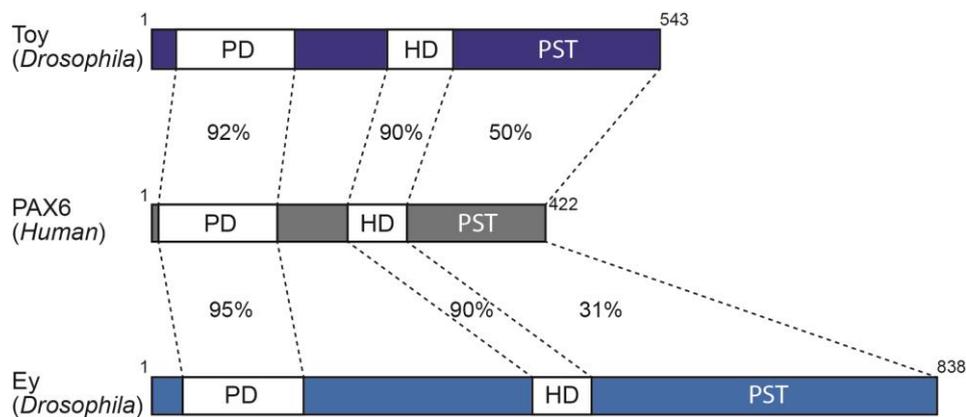


Abb. 2.7: Proteindomänenstruktur der Proteine Twin of Eyeless (Toy), Eyeless (Ey) (beide *Drosophila*) und PAX6 (Human). Prozentzahlen geben den Grad der Homologie ihrer Domänenstruktur/Aminosäuresequenz an. PD Paired Domäne, HD Homeodomäne, PST Prolin-Serin-Threonin-reiche Region (entspricht der Transaktivierenden Domäne TAD).

Toy und Ey werden beide in den embryonalen Augenvorläuferzellen und im embryonalen Nervensystem exprimiert und später larval in den EADs und im Gehirn. Die Initiation ihrer augenspezifischen Transkription wird bestimmt durch mehrere Enhancer-Sequenzbereiche in der 5' cis-regulatorischen Region von *toy* (Kronhamn et al., 2002; Blanco & Gehring, 2008; Kenyon et al., 2003; Jacobsson et al., 2009; Blanco et al., 2010) bzw. durch den augenspezifischen Enhancer-Sequenzbereich im zweiten Intron von *ey* (Hauck et al., 1999). Die endogene Expression von *toy* startet bereits während des Blastoderm Stadiums. Sie tritt somit früher auf als die Expression von *ey*. Daraus resultierendes Toy-Protein bindet anschließend mithilfe seiner PD an den augenspezifischen Enhancer von *ey* und aktiviert so die Expression von *ey* (Czerny et al., 1999). Die frühe Expression von *toy* (und *ey*) ist wichtig, um die Spezifizierung zu Augengewebe einzuleiten. Sie erfolgt unter dem epigenetischen Einfluss von Polycomb group (PcG) Proteinen. Fällt die Funktion von entsprechenden PcGs oder die von Toy und Ey aus, findet die Spezifikation nicht korrekt statt (Zhu et al., 2018).

Beide Proteine regulieren anschließend den augenspezifischen Enhancer von *sine oculis* (*so*), indem sie teilweise an die gleichen und teilweise an unterschiedliche Bindestellen im augenspezifischen Enhancer von *so* binden (Punzo et al., 2002). Aufgrund der beschriebenen Ähnlichkeiten wurde zunächst eine funktionelle Redundanz zwischen Toy und Ey vermutet. Dies konnte jedoch durch Unterschiede der beiden Proteine bezüglich ihrer PD-Bindung und ihrer C-terminalen Transaktivierungsdomäne relativiert werden. Trotz des hohen Grades an Homologie ihrer PD, kann Ey nicht selbst an den eigenen augenspezifischen Enhancer binden, um die *ey*-Expression autoregulatorisch zu steigern (Czerny et al., 1999; Punzo et al., 2001). Eine Asparagin zu Glycin Substitution an Position 14 der PD bildet den Unterschied: Toy besitzt ein Asparagin, Ey ein Glycin. Im Gegensatz dazu besteht bei Vertebraten, die jeweils nur ein PAX6-Protein aufweisen welches an entsprechender Stelle seiner PD ein Asparagin besitzt, ein autoregulatorischer Feedback-Mechanismus (Plaza et al., 1993; Epstein et al., 1994; Aota et al., 2003).

Die C-terminalen Bereiche von Toy und Ey zeigen unterschiedliche transaktivierende Fähigkeiten. Modular zusammengesetzte, chimäre PAX6-Proteine, die den Ey C-Terminus enthielten zeigten größeres Potential ektopische Augen an den Antennen zu induzieren, als solche mit Toy C-Terminus (Punzo et al., 2004). Auch bei der Induktion des gemeinsamen Zielgens *so* zeigte sich mit dem Ey C-Terminus eine stärkere Aktivierung (Punzo et al., 2004).

Homozygote Nullmutationen von *toy* (*l(4)8* bzw. *toy^{hd}*, *toy^{G7.39}*) führen zu puppaler Letalität mit *headless* oder *halfhead* Phänotyp, bei dem sich keine oder nur sehr rudimentäre Kopfstrukturen entwickeln (Hochman et al., 1964; Kronhamn et al., 2002; Flister et al., nicht veröffentlicht). Bei *ey* (*ey^D*, *ey^R*, *ey²*, *ey⁵⁷¹*) führen homozygote Nullmutationen zu teilweisem oder komplettem Verlust der Augenstrukturen, während sich die Kopfkapsel normal entwickelt (Quiring et al., 1994; Kronhamn et al., 2002; Punzo et al., 2004). Durch exogene Expression des jeweils fehlenden paralogen PAX6 Proteins in *toy* Mutanten bzw. *ey* Mutanten konnte der jeweilige Phänotyp teilweise gerettet werden, was aufzeigt, dass sich Toy und Ey zumindest partiell gegenseitig ersetzen können (Jacobsson et al., 2009).

Neben ihrer Funktion während der Entwicklung des visuellen Systems von *Drosophila* leisten beide Proteine außerdem einen wichtigen Beitrag zur Entwicklung des zentralen Nervensystems (ZNS) (Callaerts et al., 2001; Kammermeier et al., 2001; Clements et al., 2009; Furukubo-Tokunaga et al., 2009). Zur Funktion von Toy und Ey im ZNS wird in dieser Arbeit kein weiterer Bezug genommen.

Während die transkriptionelle Regulation von *toy* und *ey* schon eingehend untersucht ist (Hauck et al., 1999; Blanco & Gehring, 2008; Jacobsson et al., 2009; Blaquièere et al., 2014; Skottheim Honn et al., 2016), weiß man über die posttranslationale Regulation der beiden PAX6 Proteine bisher noch wenig. In S2-Zellkultur wurde anhand eines Bandenshiftes davon ausgegangen, dass das Protein Ey phosphoryliert werden kann (Choi, et al., 2005). In Vertebraten ist die Phosphorylierung von PAX6 als Regulationsmechanismus beschrieben (Mikkola et al., 1999; Kim et al., 2006).

2.4 Die Homeodomänen Interagierende Proteinkinase (Hipk)

Die Phosphorylierung eines Proteins durch Proteinkinasen stellt eine regulierende posttranslationale Modifikation dar, mithilfe derer eine Zelle auf externe Signale und auf dynamische Umgebungsbedingungen adäquat reagieren kann. Dabei katalysieren Proteinkinasen den Transfer von endständigen Phosphaten aus Nukleosidtriphosphaten (ATP oder GTP) auf die Hydroxylgruppen der proteinogenen Aminosäuren Serin, Threonin oder Tyrosin ihrer Substrate. Durch den reversiblen Prozess der Phosphorylierung kann die Aktivität eines Proteins auf verschiedene Arten moduliert werden: Änderung der Konformation, der Degradationsrate, der Interaktion mit anderen Proteinen oder Faktoren sowie der Lokalisation. Änderungen im Phosphorylierungsstatus von Transkriptionsfaktoren können deren Aktivität modulieren und so zu veränderter Genexpression und angepasstem Zellverhalten führen (Review Whitmarsh & Davis, 2000).

Proteinkinasen bilden eine der größten Genfamilien des eukaryotischen Genoms, so kodieren beim Mensch 518 Gene für Proteinkinasen (Manning et al., 2002), während bei *Drosophila melanogaster* bisher 251 Proteinkinasen gezählt wurden (Morrison et al., 2000). Sie stellen eine eigene Protein-Superfamilie dar, die eine gemeinsame katalytische Struktur besitzt und die anhand ihrer strukturellen und funktionellen Eigenschaften in verschiedene Gruppen unterteilt wurde (Hanks & Hunter, 1995). Die Gruppe der (CDK-, MAPK-, GSK- und CLK-) CMGC-Kinasen besteht dabei aus Prolin-geführten Serin/Threonin Kinasen, die ihre Funktion während der Zellzykluskontrolle und der intrazellulären Signalweiterleitung ausführen (Hanks & Hunter, 1995; Morrison et al., 2000). Zu dieser Gruppe gehört auch die Homeodomänen Interagierende Proteinkinase (HIPK) Familie, die man ursprünglich während eines Screens nach neuen Interaktionspartnern des Homeodomänen-Transkriptionsfaktors NKx-1.2 entdeckte (Kim et al., 1998). Insgesamt fand man in diesem Screen drei Mitglieder der daraufhin so benannten

neuen HIPK-Familie nukleärer Proteinkinasen: HIPK1-3. Ein viertes Mitglied der HIPK-Familie, HIPK4, wurde durch Sequenzvergleiche im humanen Genom gefunden (Manning et al., 2002). Diese Proteinkinasen waren die ersten Kofaktoren von Homeodomänenproteinen, die enzymatische Aktivität aufwiesen und Untersuchungen zeigten, dass die Homeodomäne essentiell und spezifizierend ist für die Interaktion zwischen Homeodomänenprotein und HIPK (Kim et al., 1998). Homeodomänenproteine übernehmen bei Vertebraten, aber auch in der Entwicklung von *Drosophila*, maßgebliche Funktionen. In der Regel als DNA-bindende Transkriptionsfaktoren vorkommend, initiieren und regulieren sie entwicklungsrelevante Prozesse, wie die Steuerung des Körperbauplans, aber z.B. auch die Gehirn- und Augenentwicklung von *Drosophila* (Bürglin & Affolter, 2016).

Bei *Drosophila* ist im Vergleich zu den vier Vertretern der Vertebraten lediglich ein Mitglied der HIPK-Familie als Ortholog bekannt. Bisher bezeichnet als DHIPK2 (Choi et al., 2005) bzw. HIPK (Link et al., 2007), wird dieses im Folgenden zur Vereinfachung Hipk genannt. Das Gen *hipk* ist bei *Drosophila* essentiell. Somit resultieren homozygote *loss of function* (LOF)-Mutationen, die zum Verlust der zygotischen *hipk* Expression führen, in larvaler bzw. puppaler Letalität. Fehlt zusätzlich die maternale Dosis *hipk*, führt dies zu embryonaler Letalität (Link et al., 2007; Lee et al., 2009a). Die Expression von *hipk* wird beeinflusst von *cis*-regulatorischen Elementen und auf posttranskriptioneller Ebene unter anderem durch miRNA-Einwirkung (Conte & Pierantoni, 2015). Die Protein-Domänenstruktur der bisher am besten untersuchten und somit prototypischen humanen HIPK2 sowie der Hipk von *Drosophila* sind in Abb. 2.8 vergleichend dargestellt.

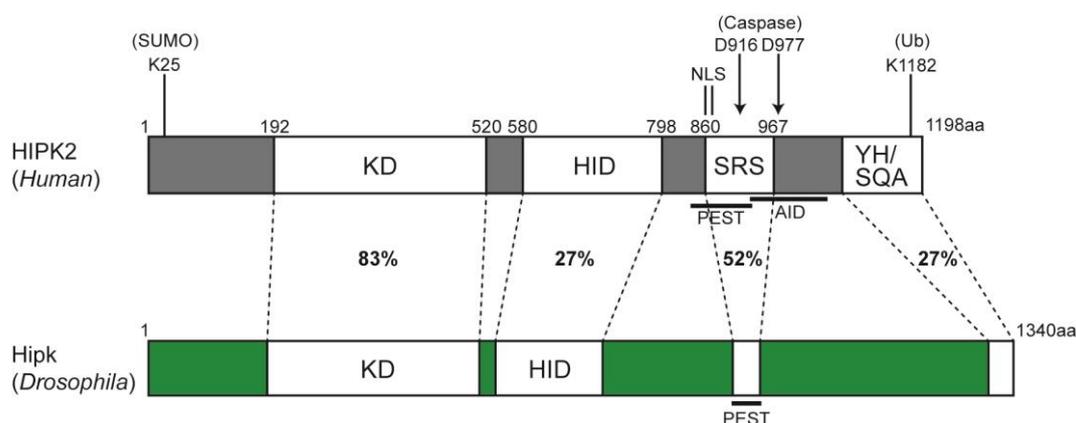


Abb. 2.8: Proteinstruktur von HIPK2 (Human) und Hipk (Drosophila) im Vergleich. Prozentzahlen geben den Grad der Homologie der Domänenstrukturen an. KD Kinase-Domäne; HID Homeodomänen-Interaktionsdomäne; NLS Nukleus-Lokalisationssignal; SRS Speckle Retention Signal; PEST-Domäne; AID Autoinhibitorische Domäne, YH/SQA Tyrosin/Histidin (YH) Serin/Glutamin/Alanin (SQA)-reiche Domäne. Außerdem sind verschiedene Stellen markiert, die zur Regulation durch Sumoylierung (K25), Caspase-vermittelter Spaltung (D916, D977) oder Ubiquitinylierung (K1198) dienen.

Neben einer Kinasedomäne (KD) besitzen beide Proteine eine Homeodomänen-Interaktionsdomäne (HID), mindestens zwei Lokalisationssignale: *Speckle Retention Signal* (SRS) und *Nuclear Localisation Signal* (NLS) sowie eine zum Abbau markierende Prolin/Glutamat/Serin/Threonin (PEST)-reiche Domäne und eine C-terminale Tyrosin/Histidin (YH)-reiche bzw. Serin/Glutamin/Alanin (SQA)-reiche Region (De la Vega et al., 2011). Die Aktivität der HIPK2 wird reguliert über Autophosphorylierung innerhalb der Aktivierungsschleife (Saul et al., 2013), den zellulären Kontext sowie über die Stabilität und Lokalisation. Letztere werden durch zahlreiche diverse posttranslationale Modifikationen, darunter z.B. Sumoylierung, Acetylierung, Ubiquitinylierung und Caspase-vermittelte Spaltung, beeinflusst (Saul & Schmitz, 2013; Kuwano et al., 2016, Blaquièrre & Verheyen, 2017).

Die Mehrzahl der Interaktionspartner und Substrate der HIPK2/Hipk sind wichtigen zellulären Funktionen, wie der transkriptionellen Regulation, der Proliferation und der schadensabhängigen Zellzykluskontrolle zuzuordnen (Rinaldo et al., 2007b; Rinaldo et al., 2008; Kuwano et al., 2016). Dabei ist der Einfluss den die HIPK2/Hipk auf grundlegende zelluläre bzw. entwicklungsbiologische Prozesse ausübt evolutionär von den Vertebraten bis zu *Drosophila* konserviert geblieben, z.B. die duale Regulation des Wnt/Wg- bzw. Hh-Signalweges durch die Inhibierung der E3 Ubiquitin-Ligase Skp1-Cul1-F-box (SCF)^{Slmb} (Swarup & Verheyen, 2011), oder die Regulation des transkriptionellen Koaktivators Yes-assoziiertes Protein/Yorkie (YAP/Yki) des Hippo-Salvador-Warts (HSW)-Signalweges (Chen & Verheyen, 2012; Poon et al., 2012). Die Hipk stellt in der Regel keine der Hauptkomponenten dar, sondern meist einen Modulator der Signalweiterleitung (Schmitz et al., 2014; Kuwano et al., 2016). Eine der bedeutendsten und ausführlich beschriebenen konservierten Funktionen der HIPK2/Hipk ist die eines Tumorsuppressors im Kontext der p53-abhängigen Apoptose. Irreparable Zellschädigungen leiten zelluläre Prozesse ein, die dazu führen, dass HIPK2 den Tumorsuppressor p53 an Serin46 (Ser⁴⁶) phosphoryliert und dieser aktiviert seinerseits verschiedene Zielgene/Signalwege, die letztlich die Apoptose einleiten (D'Orazi et al., 2002; Hofmann et al., 2002; Rui et al., 2004; Dauth et al., 2007; Rinaldo et al., 2007a). Fehlfunktionen dieser DNA-Schaden abhängigen Kontrolle können zu genomischer Instabilität und letztlich zu Tumorbildung führen (D'Orazi et al., 2012). Die Vernetzung der HIPK2/Hipk mit multiplen Signalwegen, die an der Regulation von Wachstums- und Proliferationsprozessen beteiligt sind, verleiht dieser Proteinkinase jedoch auch enormes onkogenes Potential. Aktuell konnte in *Drosophila* gezeigt werden, dass erhöhte Hipk-Level in epithelialen Zellen ausreichen, um hyperproliferatives und invasives Zellverhalten zu induzieren (Blaquièrre & Verheyen, 2017). Ob bzw. in welchem Kontext HIPKs/Hipk als

Onkogen oder als Tumorsuppressor betrachtet werden sollten bleibt noch offen. Eindeutig ist hingegen die stetig steigende Zahl an (Krebs-) Erkrankungen mit HIPK/Hipk-Beteiligung (Blaquière et al., 2018). Ein grundlegender Entwicklungsprozess, in dem die Funktion der HIPK2/Hipk ebenfalls konserviert ist, stellt die Augenentwicklung dar. In Vertebraten phosphoryliert die HIPK2 das PAX6-Protein (Kim et al., 2006). Außerdem werden die Augengröße, die Linsenbildung und die retinale Morphogenese von Hipk1 und Hipk2 reguliert (Inoue et al., 2010).

Bei *Drosophila* konnte gezeigt werden, dass Hipk *in vitro* sowohl Eyeless (Ey) als auch den allgemeinen Korepressoren Groucho (Gro) phosphoryliert und dadurch dessen Fähigkeit senkt, die *eyeless* Expression zu unterdrücken; *in vivo* unterstützt Hipk die Augenentwicklung, indem Gro durch Phosphorylierung (Ser^{194/196}, Ser^{285/287} und Ser²⁹⁷) inhibiert wird (Choi et al., 2005). Des Weiteren stimuliert Hipk die wachstumsregulierende Funktion von Notch während der frühen Augenentwicklung durch die Phosphorylierung von Gro (Lee et al., 2009a), die entsprechenden Hipk-Phosphorylierungsstellen von Gro Ser²⁹⁷/Ser³⁰⁰ wurden innerhalb unserer Arbeitsgruppe im Rahmen einer früheren Arbeit kartiert und die physiologische Relevanz *in vivo* der Augenentwicklung zugeordnet (Steinmetz, 2006). Außerdem konnten in einer früheren Arbeit Ey und Toy als *in vitro* Substrate der Hipk gezeigt werden (Abb. 2.9) und anhand von Fehlexpressionsanalysen konnte der Hipk auch im physiologischen Kontext eine Funktion in der Augenentwicklung zugesprochen werden (Steinmetz, 2006).

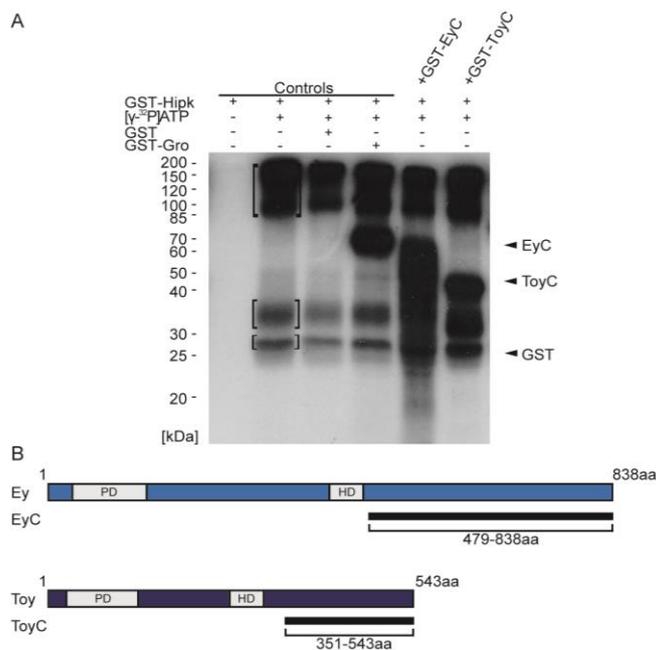


Abb. 2.9: Hipk phosphoryliert die *Drosophila* PAX6-Homologe Twin of Eyeless (Toy) und Eyeless (Ey). (A) Autoradiogramm nach *in vitro* Kinaseassay und Auftrennung der Phosphorylierungsprodukte mittels SDS-PAGE. In Klammern ist die Autophosphorylierung der Hipk markiert. (B) Schematische Darstellung PAX6-Homologen Eyeless (Ey) und Twin of eyeless (Toy). PD-Paired Domäne, HD- Homeodomäne. Schwarze Balken markieren den jeweils C-terminalen Bereich der Proteine, der im Kinase assay analysiert wurde (siehe A).

Im Rahmen einer weiteren Arbeit unserer Arbeitsgruppe wurden die Hipk-Phosphorylierungsstellen von Toy mithilfe einer *in vitro* Peptidfilteranalyse bestimmt (Laupsien, 2007). Die Analyse beschreibt die beiden Aminosäuren Ser⁴²⁴ und Thr⁴²⁸ als Ziel einer Hipk-Phosphorylierung (Abb. 2.9).

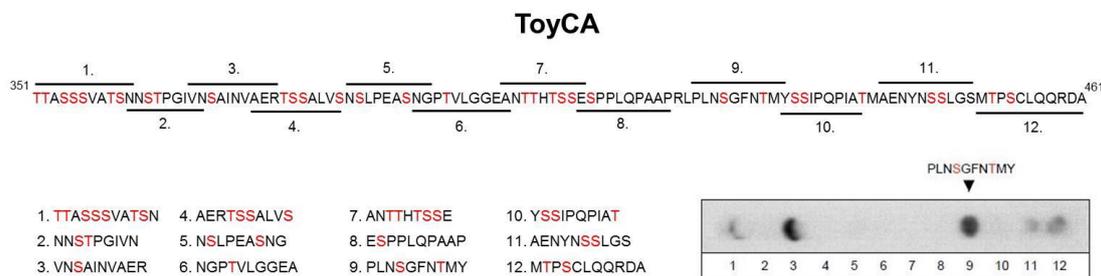


Abb. 2.10: Peptidfilteranalyse zur Bestimmung der Hipk-Phosphorylierungsstellen von Toy im C-terminalen Fragment ToyCA. In der Aminosäuresequenz des C-terminalen ToyCA (AS 351 - 461) sind potentiell phosphorylierbare Aminosäuren (Serin S bzw. Threonin T) rot dargestellt. Nummerierungen markieren einzelne Peptide, die während der Peptidfilteranalyse getestet wurden (Laupsien, 2007; verändert).

Daraufhin wurden phosphorylierungsmutante UAS_{toy}-Stämme generiert, um den Einfluss der Hipk-Phosphorylierung auf Toy *in vivo* zu untersuchen. Dabei wurden die mittels Peptidfilteranalyse bestimmten Phosphorylierungsstellen mutiert. Es konnte gezeigt werden, dass eine Zerstörung der Phosphorylierungsstellen Ser⁴²⁴ und Thr⁴²⁸ einen negativen Einfluss auf die resultierende Größe induzierter ektopischer Augen hat.

2.5 Zielsetzung der Arbeit

Nachdem sich konkrete Hinweise auf verschiedene Funktionen der Ser/Thr-Kinase Hipk im Kontext der Augenentwicklung von *Drosophila melanogaster* ergeben hatten, sollte der Einfluss der Proteinkinase auf die Augenentwicklung weiterführend charakterisiert werden. Als Ausgangspunkt waren die zuvor genannten phosphorylierungsmutanten UAS toy -Stämme neu zu generieren. Dabei sollte unter Zuhilfenahme von weiterentwickelten Methoden zur Herstellung transgener Fliegen nun die gezielte Integration der UAS toy -Konstrukte am gleichen Ort im Genom stattfinden, sodass damit solidere Vergleichsanalysen unter Ausschluss von Positionseffekten möglich werden.

Um die Enzym-Substrat-Beziehung zwischen Hipk und den beiden Masterregulatoren der Augenentwicklung, Toy und Ey, im physiologischen Hintergrund darzustellen, sollte anschließend die Interaktion von Hipk und Toy (bzw. Ey) *in vivo* überprüft werden. Weiterhin sollte eine vollständige biochemische Kartierung der Hipk-Phosphorylierungsstellen des Gesamtlängenproteins Toy mittels *in vitro* Kinaseassay erfolgen und dem folgend gegebenenfalls weitere phosphorylierungsmutante UAS toy -Stämme erzeugt werden. Durch die Fehlexpressionsanalyse dieser Fliegenstämme sollten nähere Informationen zur Relevanz der Hipk-Phosphorylierung von Toy *in vivo* erhalten werden.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss der Hipk-Dosis auf Faktoren des Retinalen Determination Gen Netzwerkes (RDGN) zu untersuchen, um den übergeordneten Einfluss der Hipk auf das Genregulationsnetzwerk der Augenentwicklung näher zu charakterisieren. Schließlich war auch die Untersuchung der augenspezifischen *hipk*-Expression ein Ziel dieser Arbeit. Durch die Analyse potentieller regulatorischer Regionen im Intronbereich von *hipk* mittels Reportergenanalyse sollten augenspezifische Enhancer identifiziert und anschließend funktionell analysiert werden.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Antikörper

3.1.1.1 Primäre Antikörper

Antigen	Spezies/Isotyp	Verdünnung	Bezugsquelle
Embryonic lethal abnormal vision (Elav)	Maus/IgG, monoklonal	1: 100	DSHB
Embryonic lethal abnormal vision (Elav)	Rabbit/IgG, monoklonal	1: 100	DSHB
Eyes absent (Eya)	Maus/IgG, monoklonal	1: 5	DSHB
Green Fluorescent Protein (GFP)	Kaninchen/IgG, polyklonal	1:2000	Molecular Probes
Twin of eyeless (Toy)	Meerschweinchen/IgG, polyklonal	1: 200	U. Walldorf
β - Galaktosidase	Maus/IgG, monoklonal	1:1000	Promega

3.1.1.2 Sekundäre Antikörper

Antigen	Konjugation	Spezies/Isotyp	Verdünnung	Bezugsquelle
Kaninchen IgG	AlexaFluor®488	Ziege/IgG	1:1000	Molecular Probes
Maus IgG	AlexaFluor®568	Ziege/IgG	1:1000	Molecular Probes
Meerschweinchen IgG	AlexaFluor®568	Ziege/IgG	1:1000	Molecular Probes
Maus IgG	AlexaFluor®647	Ziege/IgG	1:1000	Molecular Probes

3.1.2 Bakterienstämme

Bei allen benutzten Wirtsbakterien handelt es sich um Derivate von *E. coli K12*.

BL21 (DE3): (*hsdS gal (lclts857 ind1 Sam7 nin5 lac UV5-T7 gene 1)*) (Sambrook & Russell, 2001). Diese Bakterien wurden kompetent gemacht und zur Expression von GST-Fusionsproteinen verwendet.

DH5α: (*supE44 Δlac U169 (φ80lacZ) ΔM15 hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1*) (Hanahan, 1983). Diese Bakterien wurden kompetent gemacht und zur Transformation von Plasmidvektoren verwendet.

3.1.3 Fliegenstämme

Stamm	Beschreibung	Herkunft
<i>yw</i> ^{67c23}	Stamm für P-Element vermittelte Keimbahntransformation; generelle Wildtyp-Kontrolle	U. Walldorf
BL24871: <i>y</i> [1] M{vas-int.Dm}ZH-2A <i>w</i> [*] PBac{y[+]- <i>attP</i> -3B}VK00033	Stamm für PhiC31-vermittelte Keimbahntransformation	J. Bischof
<i>yw</i> ¹¹¹⁸ ; +/+; TM6B Tb/TM3, Sb	3. Chromosomaler Balancerstamm	U. Walldorf
<i>eyGal4</i>	Treiberstamm	Hazelett et al., 1998
<i>MS1096Gal4</i> (BL8860)	Treiberstamm	M. Ashburner
<i>dppGal4</i> (BL1553)	Treiberstamm	K. Staehling-Hampton
<i>enGal4</i> (BL6356)	Treiberstamm	J. Duffy
<i>GMRGal4</i> (BL9146)	Treiberstamm	L. Theodore
BL6935: <i>yw</i> ¹¹¹⁸ ; 70Flp 70I- <i>Scel</i> /TM3 Sb Ser	Stamm zur Mobilisierung des Targeting Konstrukts beim Genetargeting	K. Golic
<i>EEPGal4/EEPGal4;toy^{hdi}/Ci^D</i>	Treiber/Mutanten-Stamm	Blanco et al., 2010
<i>toy</i> ^{G7.39} /Ci ^D	Mutanten-Stamm	U. Walldorf
<i>UAShipkRNAi</i> (108254)	UAS-Effektor/RNAi-Stamm	VDRC
<i>UAStoyRNAi</i> (15919)	UAS-Effektor/RNAi-Stamm	VDRC
<i>UASNYFPhipk</i>	UAS-Effektor/BiFC-Stamm	Dewald, 2014
<i>UAShipkNYFP</i>	UAS-Effektor/BiFC-Stamm	Dewald, 2014
<i>UASgroCYFP</i>	UAS-Effektor/BiFC-Stamm	Dewald, 2014
<i>UASeyCYFP</i>	UAS-Effektor/BiFC-Stamm	Heyer, 2017
<i>UAS-eyeless</i>	UAS-Effektorstamm	Halder et al., 1995
<i>UAS-eyes absent</i>	UAS-Effektorstamm	Bonini et al., 1997
<i>UAS-sine oculis</i>	UAS-Effektorstamm	Pignoni et al., 1997
<i>UAS-dachshund</i>	UAS-Effektorstamm	Chen et al., 1997
<i>UAS-eyegone</i>	UAS-Effektorstamm	Jun et al., 1998
<i>UAS-optix</i>	UAS-Effektorstamm	Seimiya & Gehring, 2000
<i>UAS- HA hipk 1M</i>	Stamm zur Fehlexpression von <i>hipk</i> (2. Chromosom)	Lee et al., 2009a
<i>UAS- HA hipk 3M</i>	Stamm zur Fehlexpression von <i>hipk</i> (3. Chromosom)	Lee et al., 2009a
<i>UAS 2XEGFP</i> (BL6658)	UAS-Effektorstamm zur Expression von 2X <i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i> (EGFP)	A. Michelson
<i>UAS-H2B-RFP1, UAS-mCD8-GFP</i>	UAS-Effektorstamm zur Koexpression von <i>Red Fluorescent Protein</i> (RFP) und <i>Green Fluorescent Protein</i> (GFP)	Egger et al., 2010
<i>eyGal4, UAShipk2, CyO</i>	Rekombinierter Treiber/Effektorstamm	E. Verheyen
<i>eyGal4, UAShipk2RNAi, CyO</i>	Rekombinierter Treiber/Effektorstamm	E. Verheyen

<i>hipk</i> ^{EGT} -Donorstamm (X-Chr.)	Genetargeting-Donorstamm	Heyer, 2017
<i>Dcr-2</i> ; <i>eyGal4</i> , UAS <i>hipk2</i> RNAi	Rekombinierter Treiber/Effektorstamm	P. Kaspar
201396	Potentieller <i>hipk</i> -Enhancer-Stamm	VDRC
200141	Potentieller <i>hipk</i> -Enhancer-Stamm	VDRC
205820	Potentieller <i>hipk</i> -Enhancer-Stamm	VDRC
203394	Potentieller <i>hipk</i> -Enhancer-Stamm	VDRC
202023	Potentieller <i>hipk</i> -Enhancer-Stamm	VDRC
201436	Potentieller <i>hipk</i> -Enhancer-Stamm	VDRC
203203	Potentieller <i>hipk</i> -Enhancer-Stamm	VDRC
201549	Potentieller <i>hipk</i> -Enhancer-Stamm	VDRC
208145	Potentieller <i>hipk</i> -Enhancer-Stamm	VDRC
201526	Potentieller <i>hipk</i> -Enhancer-Stamm	VDRC
200880	Potentieller <i>hipk</i> -Enhancer-Stamm	VDRC
200741	Potentieller <i>hipk</i> -Enhancer-Stamm	VDRC

3.1.4 DNA-Klone und cDNA-Konstrukte

Klon	Gen	Größe	Herkunft
GH14454 (cDNA-Klon)	<i>toy</i>	2,3 kb	BDGP
Klon 44/2 (cDNA-Klon)	<i>toy</i>	1,7 kb	Czerny et al., 1999
pGEX4T-1 dHipk2FL4k (Expressionskonstrukt)	<i>hipk</i>	4,0 kb	U. Walldorf
Klon E10 (cDNA-Klon)	<i>ey</i>	2,8 kb	Quiring et al., 1994
GH05272 (cDNA-Klon)	<i>eya</i>	3,3 kb	BDGP
pGEX4T1- <i>gro</i> (Expressionskonstrukt)	<i>gro</i>	2,1 kb	Steinmetz, 2006
pCR2.1- <i>toy</i> (cDNA-Fragment von <i>toy</i> , PCR-amplifiziert mit den Primern <i>toy</i> 5' und <i>toy</i> 3' auf cDNA-Klon GH14454 und TA-kloniert; umfasst 1. ATG bis Stop-Codon)	<i>toy</i>	1,6 kb	Steinmetz, 2006
pBS- <i>toy</i> (cDNA-Fragment von <i>toy</i> ; umfasst 3. ATG bis Stop-Codon und 5'/3'-UTR-Regionen)	<i>toy</i>	1,7 kb	Laupsien, 2007

3.1.5 Oligonukleotide (Primer)

Primer wurden entsprechend der gewünschten Endprodukte ausgewählt und bei der Firma Sigma-Aldrich (Taufkirchen) synthetisiert. Die lyophilisierten Primer wurden in H₂O_{dion} zu einer Endkonzentration von 50 µM (Mutageneseprimer 100 µM) gelöst und anschließend bei -20 °C gelagert. Unterstrichene Nukleotide deuten auf Restriktionsschnittstellen hin. „TATA“- bzw. „ATAT“-Überhänge wurden ggf. angehängt zur Direkt-Klonierung. Mutagenese-Primer wurden

in PCR-Reaktionen bei einer pauschalen Schmelztemperatur von 55 °C eingesetzt, da diese in ausreichender Frequenz die gewünschten Basenfehlpaarungen erlaubt.

Tab. 3.1: Verwendete Primer. Die Primersequenzen sind in 5'→3'-Orientierung angegeben. Dem Primer angehängte Erkennungssequenzen von Restriktionsenzymen sind unterstrichen. ATAT bzw. TATA-Überhänge wurden angefügt, um eine Direktklonierung durchführen zu können. Die Schmelztemperaturen (T_m) errechnen sich nach der $2*(A/T) + 4*(G/C)$ [°C]-Regel, Mutageneseprimer wurden generell bei 55 °C T_m verwendet (siehe Klammer).

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')	T_m
Oligonukleotide zur Kartierung der Hipk-Phosphorylierungsstellen		
ToyCA2 3'	TATAGA <u>AATTCT</u> GAGGAGTTGTAATTCAGCC	60 °C
ToyCA5' B	ATAT <u>GGATCC</u> CACAACCTGCATCTTCCTCCG	58 °C
ToyCA3' B	TATAGA <u>AATTC</u> GGCCTCGCGTTGTTGTAAGC	62 °C
ToyCB5' B	ATAT <u>GGATCCT</u> ATCCTTACATGTTTCACGATC	60 °C
ToyCB3' B	TATAGA <u>AATTCT</u> CACTGAAGACGTGGCCAG	60 °C
ToyCA5 3'	TATAGA <u>AATTC</u> AGCCTCGGAAGGCTATTACTAAC	72 °C
ToyCA3 3'	TATAGA <u>AATTCT</u> GGTGTGTGTAGTATTAGCTTC	62 °C
ToyCA3 3'_mut	TATAGA <u>AATTCT</u> GGTGTGTGTAGTATTAGCTTCACCACC CAAACAGCTGGTCCATTTGCAGCCTCGGG	174 °C (55 °C)
ToyCA3 3'_mutA	TATAGA <u>AATTCT</u> GGTGTGTGTAGTATTAGCTTCACCACC CAAACAGTTGGTCCATTTGCAGCCTCGGG	174 °C (55 °C)
ToyCA3 3'_mutB	TATAGA <u>AATTCT</u> GGTGTGTGTAGTATTAGCTTCACCACC CAAACAGCTGGTCCATTTGAAGCCTCGGG	174 °C (55 °C)
ToyCB2 5'	ATAT <u>GGATCCT</u> TAGGATCAATGACCCCGTCA	62 °C
ToyCB2 5'_mut	ATAT <u>GGATCCT</u> TAGGAGCAATGGCCCCGGCATGCTTAC AAC	96 °C (55 °C)
ToyCB2 5'_mutB	ATAT <u>GGATCCT</u> TAGGAGCAATGACCCCGGCATGCTTAC AAC	94 °C (55 °C)
ToyCB2 5'_mutC	ATAT <u>GGATCCT</u> TAGGAGCAATGGCCCCGTCATGCTTAC AAC	94 °C (55 °C)
ToyCA4 5'	ATAT <u>GGATCC</u> GGAAGCTAATACTACACACACC	60 °C
ToyCA4 5'_mut	ATAT <u>GGATCC</u> GGAAGCTAATACTACACACACCCGCGCT GAAGCGCCACCCC	128 °C (55 °C)
ToyCA4 5'_mutA	ATAT <u>GGATCC</u> GGAAGCTAATACTACACACACCAGCGCT GAAGCGCCACCCC	126 °C (55 °C)
ToyCA4 5'_mutB	ATAT <u>GGATCC</u> GGAAGCTAATACTACACACACCCGCTCT GAAGCGCCACCCC	126 °C (55 °C)
ToyCA4 5'_mutC	ATAT <u>GGATCC</u> GGAAGCTAATACTACACACACCCGCGCT GAAACGCCACCCC	126 °C (55 °C)
ToyN.1_3'_2	TATAGA <u>AATTC</u> CATACCATGCCCATCCGCC	62 °C
ToyN.1_5'	ATAT <u>GGATCC</u> CATGATGCTAACAACCTGAACAC	58 °C
Eya1Eco	TTATGA <u>AATTC</u> ATGTTGTATAATGTGCCGTGCTATC	70 °C
Eya2Sal	TTATG <u>TGCT</u> ACTTACGGTGGCTTCAACGCCTCAC	74 °C
Eya3Eco	TTATGA <u>AATTC</u> GAGCGGGTGTTCGTCTGGGATC	72 °C
Eya4Sal	TTATG <u>TGCT</u> ACTCATAAGAAGCCCATGTCTGAGGG	70 °C

Oligonukleotide zur Herstellung der SOE-Ausgangsfragmente		
P1	CTGCTATCGGAACAAGTTTGCAATAGTGATAACATTCC AGCTGTTTCATCT	142 °C (55 °C)
P2	TACGTAAGACTCGATTAATAGATGAAACAGCTGGAAT GTTATCACTATTGCAAAC	148 °C (55 °C)
P3	GTAGCTACAGCCCCGGTTGTGCAAAAAATTGCAGATT ACAAACGGGAATGTCCCGCCATATTTGCG	196 °C (55 °C)
P3a	GTAGCTACAACCCCCGGTTGTGCAAAAAATTGCAGATT ACAAACGGGAATGTCCCGCCATATTTGCG	194 °C (55 °C)
P3b	GTAGCTACAGCCCCGGTTGTGCAAAAAATTGCAGATT ACAAACGGGAATGTCCCGCCATATTTGCG	194 °C (55 °C)
P4	CGCAAATATGGCGGGACATTCCCCTTTGTAATCTGCAA TTTTTGCACAACCGGGGCTGTAGCTACC	200 °C (55 °C)
P4a	CGCAAATATGGCGGGACATTCCCCTTTGTAATCTGCAA TTTTTGCACAACCGGGGTTGTAGCTAC	194 °C (55 °C)
P4b	CGCAAATATGCTGGGACATTCCCCTTTGTAATCTGCAA TTTTTGCACAACCGGGGCTGTAGCTAC	194 °C (55 °C)
Oligonukleotide für die Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation:		
Toy_BiFC5'	ATGATGCTAACAACACTGAACAC	58 °C
Toy_BiFC3'	CTGAAGACGTGGCCAG	52 °C
Oligonukleotide zur Erzeugung von Toy-Phosphomutanten:		
toy5'	<u>GGATTC</u> ATGATGCTAACAACACTGAACAC	58 °C
toy3'	<u>GGATCCT</u> CACTGAAGACGTGGCCAG	60 °C
ToyThr395_5'	CAAATGGACCAGCTGTTTTGGGTGGTGAA	86 °C (55 °C)
ToyThr395_3'	AAGCCTCGGGAAGGCTATTACTAAC	74 °C (55 °C)
ToySer410_5'	CCAGCTCTGAAGCGCCACCCCTTCAGCCAG	100 °C (55 °C)
ToySer410_3'	TGTGTGTAGTATTAGCTTCACCAC	68 °C (55 °C)
ToyThr452_5'	TTAGGATCAATGGCCCCGTATGCTTACAAC	92 °C (55 °C)
ToyThr452_3'	TGAGGAGTTGTAATTTTCAGCCATCGTTGC	86 °C (55 °C)
ToyPM5'	CGGGAATGTCCCGCCATATTTGCGTGGGAAAT	98 °C (55 °C)
ToyPM3'	TTTGTAACTGCAATTTTTGCACAAC	70 °C (55 °C)
ToyPM_E 5'	CGGGAATGTCCCGAAATATTTGCGTGGGAAAT	94 °C (55 °C)
Oligonukleotide zur Sequenzierung (Fluoreszenzmarkiert):		
ToyPhospho IRD700	CCGACGAGCTAAATGGC	54 °C
ToyPhospho DY782/IRD800	GAGATCCTAGTGATAACG	52 °C
pGEX5 IRD800	GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG	76 °C
pGEX3 IRD700	CCGGGAGCTGCATGTGTGTCAGAGG	76 °C
pUAST3' IRD	CCTTCACAAAGATCCTCTAG	58 °C
M13for	GTA AACGACGGCCAGT	52 °C
M13rev	GGAAACAGCTATGACCATG	56 °C
Oligonukleotide zum Nachweis von Konstrukten in genomischer DNA		
<i>attP</i> -F	AGGTCAGAAGCGGTTTTCGGGAGTAGTG	86 °C
<i>attP</i> -R	GGTCGTAAGCACCCGCGTACGTGTCCAC	92 °C
<i>attP</i>	CTCAAAGGTTACCCAGTTGGGG	72 °C
<i>attP</i> 1	CAACTGGGGTAACTTTGAGTTCTC	74 °C
ToyNt5'	<u>GGATCC</u> ATGATGCTAACAACACTGAACAC	58 °C
ToyNt3'	<u>GGATCCT</u> GTTGGTAGCGTCAAATGTG	60 °C

HipkEGT6	CACCCACTGTTTGCATCCTTGG	68 °C
HipkEGT7	ACATTAGGCAAGGGTATCCGTAGG	72 °C
HipkESeq6	TGGCTGGCCCCTAATCGAG	62 °C
HipkESeq7	AGCCAATATACAGGCCACGTATGAC	74 °C

Tab. 3.2: Primer-Kombinationen zur Erzeugung der GST-Expressionskonstrukte. Die entsprechenden PCR-Reaktionen zum Erhalt der gewünschten cDNA-Fragmente von *toy* wurden jeweils auf Plasmid-DNA des *toy*cDNA-Klons GH14454 durchgeführt. Analog wurden die *eyc*DNA (Klon E10) und *eyac*DNA GH05272 verwendet um die gewünschten cDNA-Fragmente zu erhalten. Die Fragmente konnten anschließend spezifisch restringiert und in den pGEX4T-1-Vektor inkloniert werden. Die zu erwartende Größe des resultierenden GST-Fusionsproteins in kDa ist angegeben.

Konstruktnamen	Verwendete Primer		[bp]	[kDa]
				(inkl. GST-Tag)
pGEX4T-1-ToyN	ToyN5'	ToyN3'	600	48,0
pGEX4T-1-ToyN.1	ToyN.1_5'	ToyN.1_3'_2	561	46,6
pGEX4T-1-ToyHD	ToyHD5'	ToyHD3'	583	43,5
pGEX4T-1-ToyC	ToyCA5' B	ToyCB3' B	579	47,2
pGEX4T-1-ToyCA	ToyCA5' B	ToyCA3' B	331	38,1
pGEX4T-1-ToyCA.1	ToyCA5' B	ToyCA3 3'	168	32,2
pGEX4T-1-ToyCA.1_mut	ToyCA5' B	ToyCA3 3'_mut	168	32,2
pGEX4T-1-ToyCA.1_mutA	ToyCA5' B	ToyCA3 3'_mutA	168	32,2
pGEX4T-1-ToyCA.1_mutB	ToyCA5' B	ToyCA3 3'_mutB	168	32,2
pGEX4T-1-ToyCA.3	ToyCA4 5'	ToyCA2 3'	144	31,3
pGEX4T-1-ToyCA.3_mut	ToyCA4 5'_mut	ToyCA2 3'	144	31,3
pGEX4T-1-ToyCA.3_mutA	ToyCA4 5'_mutA	ToyCA2 3'	144	31,3
pGEX4T-1-ToyCA.3_mutB	ToyCA4 5'_mutB	ToyCA2 3'	144	31,3
pGEX4T-1-ToyCA.3_mutC	ToyCA4 5'_mutC	ToyCA2 3'	144	31,3
pGEX4T-1-ToyCA.4	ToyCA5' B	ToyCA5 3'	119	30,4
pGEX4T-1-ToyCB	ToyCB5' B	ToyCB3' B	248	35,1
pGEX4T-1-ToyCB.1	ToyCB2 5'	ToyCB3' B	290	36,6
pGEX4T-1-ToyCB.1_mut	ToyCB2 5'_mut	ToyCB3' B	290	36,6
pGEX4T-1-ToyCB.1_mutA	ToyCB2 5'_mutA	ToyCB3' B	290	36,6
pGEX4T-1-ToyCB.1_mutB	ToyCB2 5'_mutB	ToyCB3' B	290	36,6
pGEX4T-1-ToyCB.1_mutC	ToyCB2 5'_mutC	ToyCB3' B	290	36,6
pGEX4T-1-Eya1/2	Eya1Eco	Eya2Sal	1458	81
pGEX4T-1-Eya3/4	Eya3Eco	Eya4Sal	826	56

3.1.6 Vektoren

Vektoren sind genetische Elemente, üblicherweise als Plasmid vorliegend, die ein Fragment Fremd DNA aufnehmen und es somit in eine Empfängerzelle übertragen können. Alle angegebenen Vektoren können mittels verschiedener Antibiotika-Resistenzgene selektiv in *E. coli* vermehrt werden.

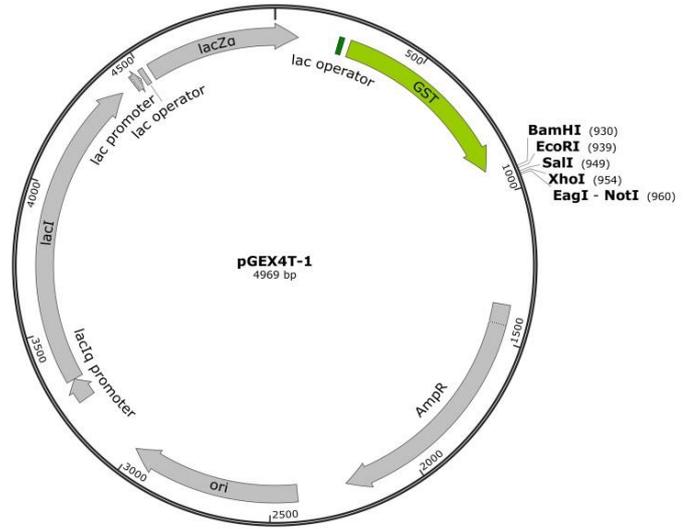
Tab. 3.3: Verwendete Vektoren. Das Vektorschema wurde jeweils mit SnapGene erstellt, besondere Eigenschaften eines Vektors sind farbig hervorgehoben.

Bezeichnung/ Verwendung	Vektorschema
<p>pBluescript II KS/SK+ (Fermentas GmbH)</p> <p>Klonierung von PCR-Produkten.</p>	
<p>TOPO-pCR® 2.1 (Thermo Scientific)</p> <p>Klonierung von PCR-Produkten mittels TA-Klonierung.</p>	

pGEX-4T-1

(Amersham Biosciences)

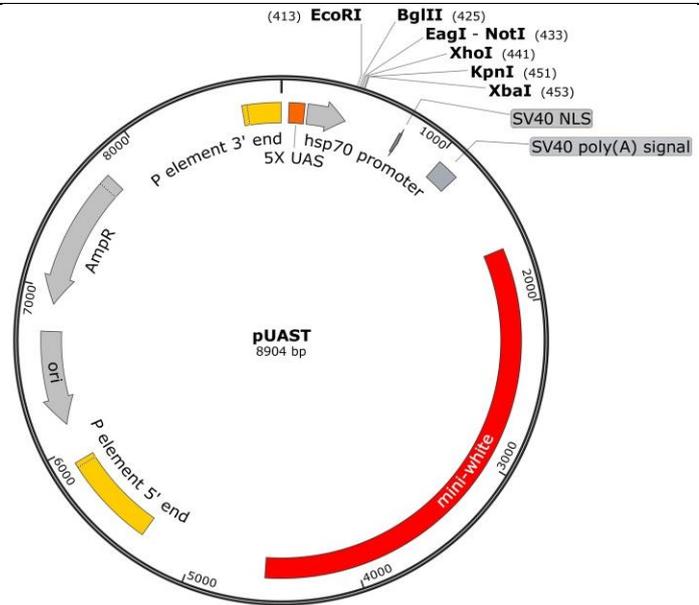
Heterologe Expression von GST-Fusionsproteinen.



pUAST

(Brand & Perrimon, 1993)

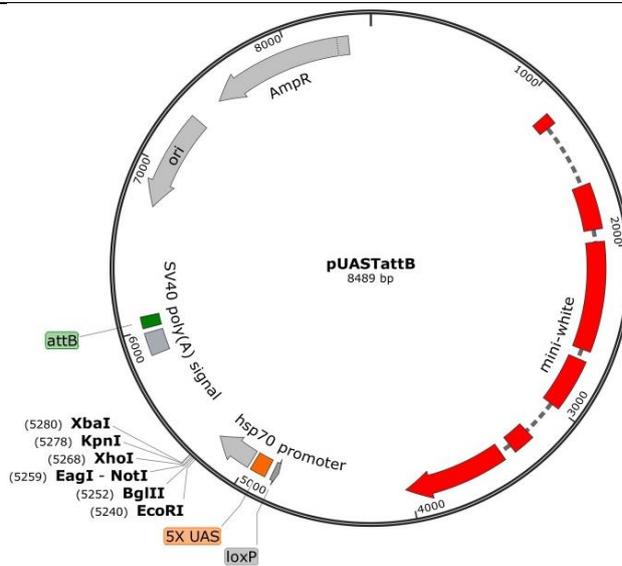
Transformationsvektor für die P-Element-vermittelte Keimbahntransformation in *Drosophila*.

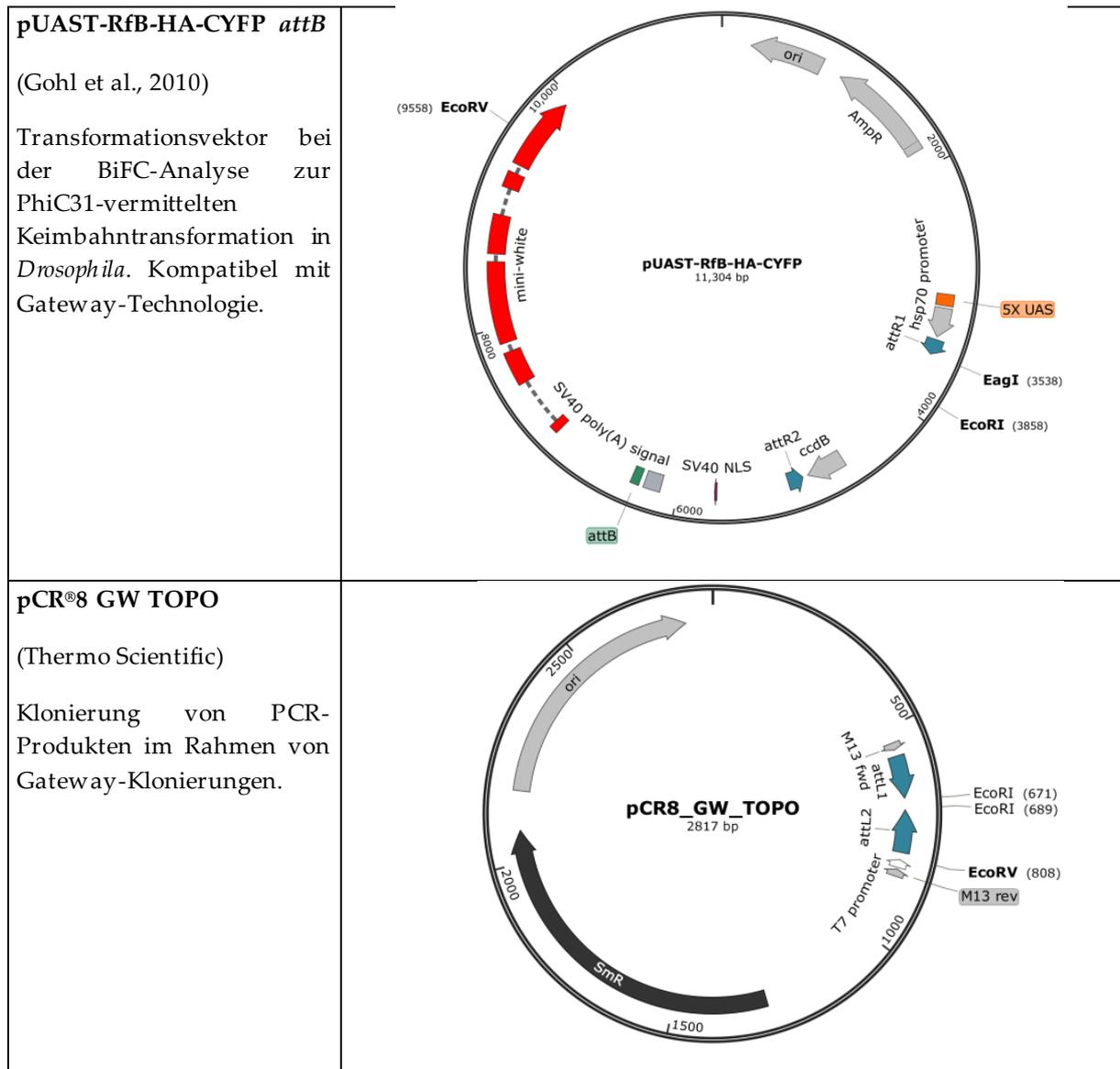


pUASTattB

(Bischof et al., 2007)

Transformationsvektor für die PhiC31-vermittelte Keimbahntransformation in *Drosophila*.





3.1.7 Bezugsquellen

Chemikalien:

Carl Roth GmbH (Karlsruhe), Sigma Aldrich Biochemie GmbH (Hamburg), Becton Dickinson & Co. (Heidelberg)

Enzyme und Feinchemikalien:

Axon Labortechnik GmbH (Kaiserlautern), Fermentas GmbH (St. Leon-Rot), Geneaid Biotech Ltd. (New Taipei, Taiwan), Genscript (Picataway, New Jersey), Hartmann Analytik GmbH (Braunschweig), Jena Bioscience (Jena), New England Biolabs (Ipswich, USA), Peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen), Roche Applied Science (Mannheim), Thermo Scientific (Waltham, MA, USA), VectorLabs Inc. (Burlingame, CA)

Fliegenstämme:

Bloomington *Drosophila* Stock Center (BDSC), Indiana University (USA); Vienna *Drosophila* Resource Centre (VDRC); Prof. E. Verheyen (Burnaby, Kanada)

3.1.8 Verwendete Kits:

Name des „Kits“	Bezugsquelle
DNA Cycle Sequencing Kit	Jena Bioscience GmbH (Jena)
Gateway®LR Clonase™ II Enzym Mix	Thermo Scientific (MA, USA)
Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit	Geneaid Biotech Ltd. (New Taipei, Taiwan)
GeneJET Gel Extraction Kit	Thermo Scientific (MA, USA)
GeneJET Plasmid Midiprep Kit	Thermo Scientific (MA, USA)
pCR®8/GW/TOPO®TA Cloning Kit	Thermo Scientific (MA, USA)
peqGOLD Plasmid Miniprep Kit II	PEQLAB Biotechnologie GmbH (Erlangen)
Q5 Site-Directed Mutagenesis Kit	New England Biolabs (Frankfurt a.M.)
TOPO®TA Cloning®Kit	Thermo Scientific (MA, USA)

3.1.9 Geräte:

Gerät	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 5415R Kühlzentrifuge	Eppendorf (Hamburg)
Eppendorf Concentrator 5301	Eppendorf (Hamburg)
Eppendorf miniSpin plus (Tischzentrifuge)	Eppendorf (Hamburg)
Eppendorf Thermomixer comfort	Eppendorf (Hamburg)
Eppendorf Zentrifuge 5702	Eppendorf (Hamburg)
Gelelektrophorese-System	Peqlab (Erlangen)
Geltrockner (Typ G2000)	Fröbel-Labor Technik (Lindau)
Gyro Mini Nutating Mixer	Labnet International Inc. (Oakham, UK)
Heidolph Rotamax 120	Heidolph (Kelheim)
Kamera U-CMAD3 (CC-12 soft imaging system)	Olympus (Hamburg)

Konfokalmikroskop SP5	Leica (Wetzlar)
LI-COR 4300 DNA-Analyzer	LI-COR (Bad Homburg)
Magnetheizgerät bzw. „Nadelzieher“	GETRA (München)
Mikromanipulator	Leitz (Wetzlar)
Mikroskop Axiovert 25	Carl Zeiss (Oberkochen)
Mikroskop BX 61	Olympus (Hamburg)
Mikroskop SZX 12	Olympus (Hamburg)
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-Gel-Dokumentationssystem Intas Gel Jet Imager	Intas (Göttingen)

3.1.10 Internetadressen und PC-Programme

http://flybase.bio.indiana.edu (und weitere Datenbanken innerhalb der Flybase)	Grundlagen der <i>Drosophila</i> -Forschung sowie Datenbank der Gene/ Fliegenstämme
http://flystocks.bio.indiana.edu Bloomington <i>Drosophila</i> Stock Center (BDSC)	Datenbank/Zentrum für Fliegenstämme (Berkeley)
http://stockcenter.vdrc.at Vienna <i>Drosophila</i> Resource Center (VDRC)	Datenbank/Zentrum für Fliegenstämme (Wien)
http://fruitfly.org Berkeley <i>Drosophila</i> Genome Projekt (BDGP)	Info zu Genexpressionsmustern
http://genome.inet.dkfz-heidelberg.de/husar	Bioinformatische Sequenzanalyse über das DKFZ Heidelberg
SnapGene	Software für die Molekularbiologie GSL Biotech LLC (Chicago)
nebCutter	Software für die Molekularbiologie (New England Biolabs GmbH, Frankfurt)

3.1.11 Lösungen und Puffer

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

APS-Lösung:

10 % (w/v) APS (-20 °C)

Aquatex®:

Wässriges Eindeckmittel für die Mikroskopie

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}

Elektrophoresepuffer (SDS-PAGE) (10x):

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

Elutionspuffer (Proteinaufreinigung):

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

Embryonenwaschlösung:

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

Entfärbepuffer (SDS-PAGE):

70 % (v/v) H₂O_{deion}, 10 % (v/v) Eisessig, 20 % (v/v) Methanol

Ethidiumbromid-Stammlösung:

10 mg/ml (4 °C, lichtgeschützt)

GTE-Lösung*(alkalische Lyse):

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

Hypochloritlösung (Dechorionieren von Embryonen):

1.4 % (w/v) Natriumhypochlorit in Leitungswasser

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

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

Kinasepuffer:

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

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

1 Teil 5 M Kaliumacetat-Lösung, 2.5 Teile 6 M Lithiumchlorid-Lösung

Lysepuffer (Proteinaufreinigung):

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

Lysispuffer (genomische DNA aus Fliegen):

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

NaOH/SDS-Lösung:

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

NHS:

5 % Normal Horse Serum in PBX_{0.5%}

PBL (sterilfiltriert):

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

PBS_{AK} (10x)*:

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

PBS_{Protein} (10x)*:

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

PBS(KM) (Aufreinigung Hipk):

1xPBS*, 1 mM MgCl₂, 3 mM KCl, pH 7.3

PBS(KM)T(Aufreinigung Hipk):

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

PBX_{0.5%}:

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

Puffer 1 für die Herstellung kompetenter Bakterien (sterilfiltriert):

100 mM RbCl, 30 mM Kaliumacetat, 10 mM CaCl₂, 50 mM 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):

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

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

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

Stopp-Lade-Puffer (6x):

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

TAE-Puffer (10X) (Agarosegelelektrophorese):

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

TBE-Puffer (10x)*(Sequenzier-Polyacrylamid-Gelelektrophorese):

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

TE-Puffer (1x)*:

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

3.1.12 Medien

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

Antibiotikastammlösungen:

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

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

Endkonzentration in LB-Flüssigmedium bzw. Agarplatten war standardmäßig 100 µg/ml.

Apfelsaftagarplatten:

8 g Agar-Agar in 250 ml H₂O_{deion} aufschwemmen und autoklavieren; 8 g Zucker durch Aufkochen in 80 ml Apfelsaft lösen und mit dem gelösten Agar vermischen. Gegossene Platten können einige Tage bei 4 °C gelagert werden.

Drosophila-Standardfuttermedium:

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

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 (wenn die Lösung auf unter 60 °C abgekühlt ist).

SOC-Medium:

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

3.2 Methoden

Molekularbiologische Methoden

Arbeiten mit DNA

3.2.1 Herstellung chemisch kompetenter Zellen (Rubidiumchlorid-Methode)

Kompetente Zellen sind Bakterienzellen, die derart behandelt wurden, dass sie in Lösung befindliche Plasmid-DNA aufnehmen können. 10 ml LB-Medium wurden mit einer Einzelkolonie von am Vortag ausgestrichenen *E. coli* DH5 α - bzw. *E. coli* BL21-Zellen inokuliert und über Nacht bei 37 °C und 200 rpm geschüttelt. Am folgenden Tag wurden 200 ml LB-Medium mit 2 ml der Übernachtskultur angeimpft und bei 37 °C im Schüttelinkubator inkubiert, bis eine optische Dichte OD₆₀₀ von 0.5 bis 0.7 erreicht war (etwa zu diesem Zeitpunkt befinden sich die Bakterien in ihrer logarithmischen Wachstumsphase). Die Zellen wurden in vorgekühlte Zentrifugenbecher überführt, 5 min auf Eis inkubiert und danach 5 min bei 6.000xg (Sorvall Evolution RC, SLA-1500-Rotor) und einer Temperatur von 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Bakterienpellet in 80 ml kaltem Puffer1 resuspendiert. Einer 5-minütigen Inkubation auf Eis folgte eine 5-minütige Zentrifugation bei 4 °C und 6.000xg. Der Überstand wurde verworfen und das Bakterienpellet in 8 ml kaltem Puffer2 resuspendiert. Je 200 μ l Zellsuspension wurden in vorgekühlte Reaktionsgefäße aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80 °C gelagert.

Kompetenzkontrolle der DH5 α -Bakterien gemessen in Kolonienzahl/ μ g DNA:

Für die Transformation von je 100 μ l Zellen wurden verschiedene Verdünnungsstufen Plasmid-DNA eingesetzt: 10 ng, 1 ng, 100 pg und 10 pg. Anschließend wurden die Transformationsansätze auf Agar-Platten mit geeignetem Antibiotikum ausplattiert und zusätzlich wurden 100 μ l Zellen ohne Plasmid als Negativkontrolle ausplattiert. Beim Auszählen der Kolonien am nächsten Tag liegt dann eine Transformationseffizienz von 1×10^7 Kolonien/ μ g DNA vor, wenn ~100 Klone bei der kleinsten DNA-Menge (10 pg) gewachsen sind.

3.2.2 DNA-Restriktion

Restriktionsenzyme sind bakterielle DNA-spaltende Endonukleasen, die im Inneren der Kettenmoleküle sequenzspezifisch spalten. Die Reaktionsbedingungen sind für jedes Enzym spezifisch, daher wurden Puffer- und Temperaturbedingungen dem jeweiligen Enzym angepasst, um ein optimales Ergebnis zu erhalten. Die Inkubationszeit betrug bei 37 °C je nach Vorhaben von ~1 h für einen Testverdau (~200 ng Plasmid-DNA) bis zu mehreren Stunden bei präparativen Verdaus (~1 µg Plasmid-DNA) für Klonierungsexperimente. Verwendet wurden überwiegend Enzyme der Firma Thermo Scientific.

3.2.3 Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA erfolgte ausschließlich in 1%igen Agarosegelen. Zur Gelherstellung wurde die Agarose in 1xTAE aufgekocht, 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™ 1 kb DNA ladder“ der Firma Thermo Scientific verwendet. Die Auftrennung erfolgte bei konstanter Spannung, die in Abhängigkeit von der Gelgröße zwischen 80 V und 150 V gewählt wurde. Anschließend wurde das Gel für 15 min 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 durchgeführt, wenn diese von anderen, im selben Gemisch befindlichen DNA-Fragmenten getrennt werden sollten (solche könnten sich nachteilig auf Folgereaktionen auswirken). Die Extraktion wurde mit Hilfe des „Gel/PCR Fragments Extraction Kit“ (Geneaid) gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Elution erfolgte mit H₂O_{deion.}

3.2.5 Dephosphorylierung mit rAPid Alkaline Phosphatase (Roche)

Um die Religation eines mit nur einem Restriktionsenzym geschnittenen Vektors während einer Ligationreaktion mit Fremd-DNA zu verhindern, wurde die restringierte Vektor-DNA zuvor mithilfe der rAPid Alkaline Phosphatase (Roche) dephosphoryliert. In einem Dephosphorylierungsansatz wurde linearisierte Vektor-DNA (bis zu 1 µg) mit Dephosphorylierungspuffer (1X) und rAPid Alkaline Phosphatase (AP) (1 U) versetzt und 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach einer AP-Inaktivierung für 2 min bei 75 °C konnte die DNA für eine Ligation verwendet werden.

3.2.6 Ligation

Die Ligation dient der enzymatischen Verknüpfung von DNA-Molekülen. Hierzu wurde linearisierte, dephosphorylierte Vektor-DNA mit ebenfalls linearisierter Fremd-DNA (in äquimolarem Verhältnis) sowie T4-DNA-Ligase-Puffer und T4-DNA-Ligase (1-5 U) vermischt. Das Reaktionsvolumen wurde dabei möglichst gering gewählt, in der Regel erfolgte die Ligation in einem Gesamtvolumen von 10 µl entweder bei 25 °C für 3 h oder bei 14 °C über Nacht. Anschließend wurde der komplette Reaktionsansatz zur Hitzeschock-Transformation in chemisch kompetente Zellen verwendet.

3.2.7 Transformation chemisch kompetenter Bakterien mit Plasmid-DNA

Bei der Transformation von Bakterienzellen wird isolierte DNA durch einen kurzen Hitzeschock in kompetente Wirtszellen eingeschleust. Je Transformationsansatz wurden 100 µl bei -80 °C gelagerte kompetente Zellen auf Eis aufgetaut, der komplette Ligationsansatz (10 µl) zugegeben und sanft mit den Bakterien vermischt. Das Gemisch wurde 20 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Bakterien 90 sek einem Hitzeschock von 42 °C ausgesetzt und sofort weitere 2 min auf Eis inkubiert. Zu dem Ansatz wurden 250 µl raumtemperiertes SOC-Medium ohne Antibiotikum gegeben und 60 min bei 37 °C und 200 rpm geschüttelt. Die Bakterien wurden je nach Antibiotikaresistenz des Plasmids auf entsprechenden antibiotikumhaltigen Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am folgenden Tag konnten gewachsene Einzelklone in Flüssigkultur für eine Alkalische Lyse angezogen werden.

3.2.8 Klonierung mit dem TOPO® TA Cloning® Kit (Thermo Scientific)

Mit Hilfe des TOPO®TA Cloning® Kit der Firma Thermo Scientific können PCR-Amplifikate direkt aus einer PCR-Reaktion heraus in den Vektor pCR®2.1 kloniert werden, ohne die Notwendigkeit einer Aufreinigung, einer Restriktion oder des Einsatzes sonstiger modifizierender Enzyme. Der pCR®2.1-Vektor liegt bereits linearisiert vor. Im Ansatz wurden 1 µl pCR®2.1-Vektor (25 ng/µl) und frisches PCR-Amplifikat (0,5 – 4 µl), mit 1 µl Ligationspuffer (10X) und mit sterilem H₂O_{deion} zu einem Endvolumen von 9 µl vermischt. Zuletzt erfolgte die Zugabe von 1 µl T4-DNA-Ligase (5 U). Der Ansatz wurde vorsichtig gemischt, bei 14 °C über Nacht inkubiert und am nächsten Tag in chemisch kompetente DH5α Zellen transformiert. Die Bakterien wurden anschließend auf Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum (Ampicillin, 100 µg/ml) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Die Selektion positiver Einzelklone kann bei Verwendung des pCR®2.1-Vektors durch Blau-Weiß-Selektion erfolgen. Dazu wurden die Bakterien auf Selektionsplatten mit IPTG (100 mM, 40 µl/Platte) und X-Gal (40 mg/ml in DMSO, 40 µl/Platte) ausplattiert. Dabei erscheinen Klone mit integrierter Fremd-DNA hellblau bis weiß, während Klone mit Leervektoren in einer Blaufärbung der Einzelklone resultieren. Für weiterführende Analysen wurden demnach ausschließlich hellblaue bis weiße Einzelklone verwendet.

3.2.9 Klonierung mit dem pCR®8/GW/TOPO® TA Cloning® Kit (Thermo Scientific)

Die Anwendung des pCR®8/GW/TOPO® TA Cloning® Kit der Firma Thermo Scientific kombiniert die Vorteile der TOPO-TA-Klonierung (3.2.8) mit den Möglichkeiten der Gateway®-Technologie (3.2.10). Der pCR®8/GW/TOPO®-Vektor liegt linearisiert und mit kovalent gebundener Topoisomerase I vor, sodass PCR-Produkte ohne weitere Zwischenschritte direkt in diesen Vektor kloniert werden können. Außerdem besitzt der Vektor sogenannte *attachment L1* (*attL1*) und *attL2* Sequenzen flankierend zu seiner Multiple Cloning Site, die einen auf Rekombination basierenden Transfer der in den Vektor eingebrachten Fremd-DNA in entsprechend aufgebaute Zielvektoren ermöglichen. Verifizierte Klone können so als Ausgangsvektor („Entry-Klon“) dienen in restriktionsunabhängigen Gateway-Klonierungen. Die Durchführung erfolgte analog dem Prozedere des TOPO® TA Cloning® Kit.

Der Ansatz wurde anschließend auf Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum (Spectinomycin, 100 µg/ml) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Einzelklone wurden als zur späteren Plasmid-Isolierung mittels alkalischer Lyse (3.2.11) in Flüssigmedium angezogen und nachfolgend analysiert.

3.2.10 Klonierung mit dem Gateway® LR Clonase™ II Enzym Mix (Thermo Scientific)

Mit Hilfe der Gateway® -Technologie sind restriktionsunabhängige Klonierungen möglich. Das System basiert stattdessen auf sequenzspezifischer *in vitro* Rekombination bestimmter *attachment* (*att*)-Sites (Rekombinationssequenzen). Der Austausch gewünschter DNA-Sequenzen erfolgt dabei durch Rekombination zwischen den *attL*-Sites eines Entry-Klons (z.B. pCR®8/GW/TOPO®-Vektor, 3.2.9) und *attR*-Sites eines Zielvektors unter Bildung eines Expressionsvektors mit *attB*-Sites (Abb. 3.1). Die benötigten Vektoren werden dabei als ringgeschlossene Plasmide eingesetzt. Der Gateway® LR Clonase™ II Enzym Mix enthält die benötigten Enzyme sowie den 5xLRClonase® Reaktionspuffer in einer Mischung und ermöglicht somit eine einfache Handhabung.

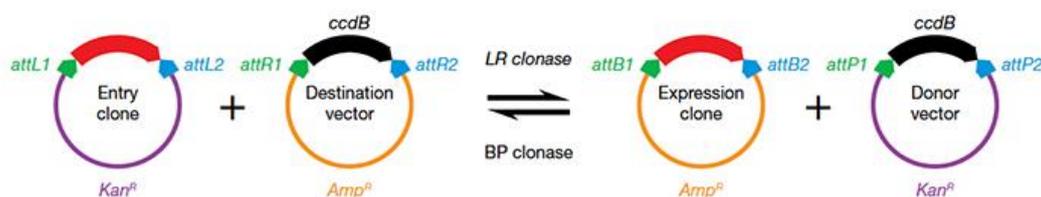


Abb. 3.1: Schema der LR-Klonierung mittels LR Clonase. Die sequenzspezifische *in vitro* Rekombination zwischen *attL1/2*-Sites und *attR1/2*-Sites erfolgt enzymatisch durch die LR Clonase. Es entsteht ein Expressionsklon mit der gewünschten DNA im Zielvektor, flankiert von *attB1/2*-Sites sowie ein Nebenprodukt aus Donorvektor mit *ccdB*-Gen (Bildquelle: thermofischer.com).

Im Ansatz wurden 1-7 µl des Entry-Vektors (50 - 150 ng/Reaktion) mit 1 µl des Zielvektors (150 ng/µl) versetzt und mit 1xTE-Puffer, pH 8.0 auf ein Gesamtvolumen von 8 µl gebracht. Anschließend wurden 2 µl des Gateway® LR Clonase™ II Enzym Mix zugegeben und sorgfältig vermischt. Die Inkubation erfolgte bei 25 °C für 1 h. Im Anschluss daran wurden 1 µl Proteinkinase K (2 µg/µl) zu dem Ansatz gegeben und 10 min bei 37 °C inkubiert, um Enzymaktivitäten zu stoppen. Anschließend wurden 2 µl dieses Ansatzes in kompetente DH5α Zellen transformiert (3.2.7) und die Bakterien auf Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum

(beim verwendeten Expressions-Vektor: Ampicillin, 100 µg/ml) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

Die Anwesenheit des *ccdB* Gens im Zielvektor ermöglicht negative Selektion von Donor- und Zielvektor in *E. coli* im Anschluss an die Rekombination. Das CcdB Protein wechselwirkt mit der bakteriellen DNA Gyrase und hemmt das Wachstum der Bakterien. Findet die Rekombination zwischen Entry-Vektor und Zielvektor wie gewünscht statt, wird das *ccdB* Gen durch das eingebrachte Gen ersetzt. Zellen, die einen Vektor aufnehmen, bei dem die Rekombination nicht stattgefunden hat oder bei dem ein Beiprodukt entstanden ist, welches das *ccdB* Gen noch trägt, können sich nicht vermehren.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Entry-Klon mit Hilfe des pCR[®]8/GW/TOPO[®] TA Cloning[®] Kit (Thermo Scientific) erzeugt (3.2.9) und als Zielvektor der pUAST-RfB-HA-CYFP-*attB* (Gohl et al., 2010) verwendet.

3.2.11 Plasmid-Isolierung mittels alkalischer Lyse

2 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum wurden mit einer Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 200 rpm im Schüttelinkubator inkubiert. 1,5 ml dieser Kultur wurden in ein Reaktionsgefäß überführt, 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Bakterienpellet wurde in 100 µl GTE-Puffer resuspendiert. Anschließend wurden durch die Zugabe von 200 µl SDS/NaOH und eine 5 minütige Inkubation bei RT die Zellwände der Bakterien aufgebrochen, um die Plasmid-DNA freizusetzen. Die Präzipitation der chromosomalen DNA und der Zelltrümmer erfolgte durch Zugeben von 150 µl 5 M Kaliumacetat, pH 4.8. Nach gründlichem Vermischen und einer weiteren 5 minütigen Inkubation auf Eis, wurde der Ansatz 10 min bei 13.000 rpm zentrifugiert und der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Zum Überstand wurden 800 µl eiskalter 100 % EtOH gegeben um die Plasmid-DNA zu präzipitieren und wiederum 10 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und 500 µl 70 % Ethanol zum Waschen des DNA-Pellets zugegeben. Nach weiteren 2 min Zentrifugation bei 13.000 rpm wurde der Überstand verworfen und das Pellet nach dem Trocknen im Rotationsverdampfer (Eppendorf Concentrator 5301) in 20 µl sterilem H₂O_{deion} aufgenommen.

3.2.12 Plasmid-Isolierung mittels peqGOLD Plasmid Miniprep Kit II (Peqlab)

Zur Gewinnung größerer Mengen reiner DNA wurde diese mit Hilfe des peqGOLD Plasmid Miniprep Kit II (Peqlab) nach Herstellerangaben aus 20 ml einer *E. coli*-Übernachtskultur mit entsprechendem Antibiotikum isoliert. Die Elution erfolgte mit sterilem $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion}}$.

3.2.13 Ortsspezifische Mutagenese mit dem Q5 Kit (NEB)

Durch ortsspezifische Mutagenese können gezielt Basenaustausche in eine DNA-Sequenz eingebracht werden. Dazu müssen entsprechende Mutageneseprimer kreiert werden, die über eine gezielte Fehlpaarung (Mismatch) die gewünschten Veränderungen der Basenabfolge während der PCR miteinbringen. Mutageneseprimer lagern sich trotz Mismatch ausreichend an eine Zielsequenz an, wenn mindestens 10 komplementäre und somit korrekt paarende Basen zu beiden Seiten des Mismatches vorhanden sind. Durch die Elongation des Mutageneseprimers entsteht der erste Strang mit gewünschtem Basenaustausch, der in den Folgezyklen der PCR-Reaktion weiter vervielfältigt wird. Der Gegenprimer (ohne Mismatch) ist invers und „auf Stoß“ angeordnet, so dass eine vollständige Amplifikation des Plasmides gewährleistet wird (Abb. 3.2).

Die ortsspezifische Mutagenese wurde mithilfe des Q5[®]Site-Directed Mutagenesis Kit der Firma NEB durchgeführt. Es wurden individuelle Mutagenese-Primer (3.1.5) kreiert, die zur gewünschten Substitution führen sollten. Die PCR wurde mithilfe eines Mastermixes angesetzt, welcher die mit niedriger Fehlerrate arbeitende Q5 High Fidelity DNA-Polymerase enthält. Anschließend wurden A'-Überhänge angefügt (3.2.16). Das entstandene PCR-Produkt stellte ein Gemisch aus dem ringgeschlossenen Ausgangs-Plasmid (welches die Substitution nicht trägt) und den amplifizierten, linearen DNA-Strängen mit Substitution dar. Die Selektion der gewünschten DNA-Stränge erfolgte durch Zugabe eines Kinase-Ligase-*DpnI*-(KLD) Enzym-Mix, in dem frisch amplifizierte DNA-Stränge zur Ringform ligiert und das Ausgangs-Plasmid durch einen enzymatischen Verdau eliminiert wurde. Unmittelbar nach der Ligation erfolgte die Transformation des mutierten Plasmids in chemisch kompetente DH5 α Zellen (3.2.7).

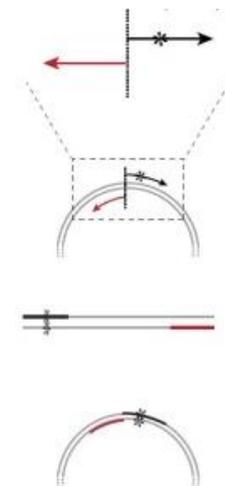


Abb. 3.2: Primerdesign für das Q5[®]-Mutagenese Kit.
(Bildquelle: NEB)

3.2.14 Isolierung genomischer DNA aus Fliegen

Um genomische DNA von Fliegen zu isolieren wurden fünfzehn mit CO₂ betäubte Fliegen in einem Reaktionsgefäß auf Eis gesammelt, in 200 µl Lysispuffer mit einem Mikropistill gründlich zerrieben und anschließend für 30 min bei 65 °C im Heizblock inkubiert. Nach der Zugabe von 400 µl frisch angesetzter LiCl/KAc-Lösung wurde der gründlich gemischte Ansatz mindestens 10 min auf Eis inkubiert. Danach folgte eine 15 minütige Zentrifugation bei 13.000 rpm, um grobe Bestandteile (Chitinhülle, Präzipitate) abzutrennen. Der Überstand mit der darin befindlichen genomischen DNA wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt, die DNA mit 300 µl 100 % Isopropanol vermischt und durch erneutes Zentrifugieren (15 min, 13.000 rpm) ausgefällt. Das DNA-Pellet wurde mit 70 % EtOH gewaschen, getrocknet und in 50 µl 1xTE-Puffer, pH 8,0, aufgenommen.

3.2.15 Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) wird zur Amplifikation definierter DNA-Abschnitte *in vitro* eingesetzt. Individuell kreierte Primer bestimmen dabei den DNA-Abschnitt des Templates, der in wiederholten Zyklen vervielfältigt wird und sich als PCR-Produkt anreichert.

3.2.15.1 Standard-PCR

Die Wahl der geeigneten DNA-Polymerase richtet sich nach der erforderlichen Amplifikationsgenauigkeit. Standardmäßig wurde als DNA-Polymerase die *Taq*-Polymerase der Firma GenScript verwendet, die am 3'-Ende des neu erzeugten Stranges Adenosin-Überhänge erzeugt, die z.B. Verwendung bei der Benutzung von TA-Cloning®-Kits finden. Für Anwendungen, die eine hohe Lesegenauigkeit erfordern, wurde die Q5 High Fidelity DNA Polymerase von NEB eingesetzt, die über eine Proofreading-Funktion (Korrektur von Synthesefehlern) verfügt und somit eine geringere Fehlerrate als die *Taq*-Polymerase aufweist.

Ansatz PCR-Reaktion:

- 100 ng-1 µg Template-DNA
- 5 µl 10x PCR-Puffer (GenScript) bzw. 5x Q5 Reaktionspuffer (NEB)
- 1 µl dNTP-Mix (10 mM)
- 1 µl Primer 1 (50 pmol/µl)
- 1 µl Primer 2 (50 pmol/µl)
- 1 µl *Taq* Polymerase (5 U/µl, GenScript) bzw. Q5 High Fidelity DNA Pol. (1 U/µl, NEB)
- Ad 50 µl steriles H₂O_{deion}

Reaktionsbedingungen eines Standard-PCR-Programms:

<i>Ereignis</i>	<i>Zeit</i>	<i>Temperatur</i>	<i>Zyklen</i>
Denaturierung	3 min	95 °C	1
Denaturierung	1 min	95 °C	30x
Annealing	1 min	T _{ANNEALING}	
Elongation	1 min/kb (<i>Taq</i> -Polymerase) 30 sek/kb (<i>Q5</i> -HF-Polymerase)	72 °C (<i>Taq</i> -Polymerase) 72 °C (<i>Q5</i> -HF-Polymerase)	
Finale Elongation	10 min	72 °C	1
Lagerung	∞	4 °C	1

3.2.15.2 Overlap-Extension-PCR (OE-PCR)

Manche Mutagenesekonstrukte konnten nicht während einer einzelnen PCR erzeugt werden, da die zu mutierende Position zu weit im Zentrum des Konstrukts lag, oder mehrere Austausche eingefügt werden sollten. Da dies nicht mit einem einzelnen Primer abgedeckt werden konnte, wurden zunächst entsprechende Teilfragmente mit Mutagenese-Primern bzw. endständigen Primern amplifiziert (Abb. 3.3). Die Amplifikate wurden aufgereinigt und möglichst äquimolar als Template für eine zweite PCR mit den beiden randständigen Primern eingesetzt. In deren Verlauf wurden zunächst alle PCR-Komponenten, bis auf die Primer, zugefügt, um die sich teilweise überlappenden Teilfragmente aufzufüllen. Nach etwa der Hälfte der Zyklen wurden die endständigen Primer dem Ansatz beigefügt, sodass nun das komplette, mutierte Konstrukt amplifiziert werden konnte. Sollten zwei Mutationen mit größerem Abstand zueinander in ein Konstrukt eingebracht werden, wurde nach der ersten OE-PCR eine weitere durchgeführt, bei der entsprechende Teilfragmente und endständige Primer beigefügt wurden. Die Reaktionsbedingungen entsprachen dabei denen einer einfachen Mutagenese-PCR (3.2.15.1).

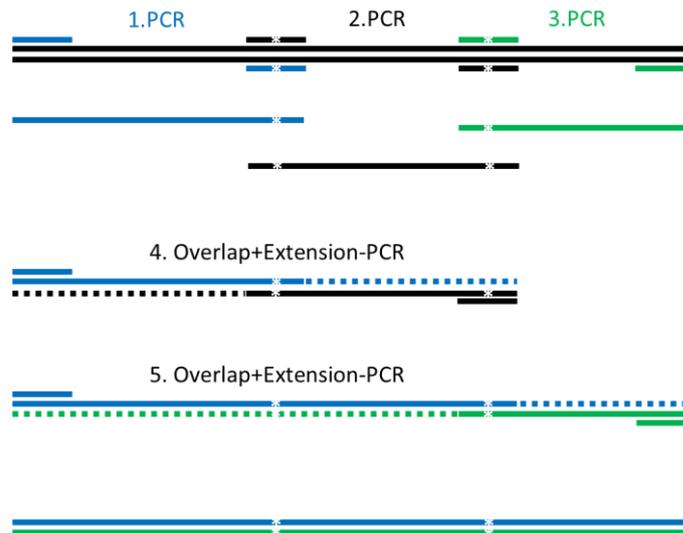


Abb. 3.3: Ablaufschema einer Overlap Extension (OE) PCR zur Mutagenese. Zunächst werden PCR-Reaktionen mit Mutageneseprimern durchgeführt, um Ausgangs-Fragmente mit gewünschtem Basenaustausch zu erzeugen, die sich teilweise überlappen. Diese Fragmente dienen anschließend als Template für die OE-PCR. Erst nach einigen PCR-Zyklen ohne Zugabe eines Primers, in denen die Fragmente Gelegenheit hatten sich im überlappenden Bereich aneinanderzulagern und „aufgefüllt“ zu werden, erfolgte die Zugabe von Primern um das gewünschte Amplifikat entsprechend zu vervielfältigen.

3.2.16 Anfügen von 3'-A-Überhängen

Proofreading-Polymerasen, wie die in dieser Arbeit verwendete Q5 High Fidelity DNA Polymerase von NEB, verfügen über eine Korrekturlese-Funktion, die es ihnen ermöglicht, fehlerhaft eingebaute Nukleotide zu erkennen und wieder 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 1 μ l 10 mM dATP und 1 μ l *Taq*-Polymerase (5 U/ μ l, GenScript) für 10 min bei 72 °C inkubiert.

3.2.17 Sequenzierung von DNA

Plasmid-DNA wurde zur Sequenzierung entweder an die Firma StarSEQ geschickt, oder vor Ort nach der Kettenabbruch-Methode (Sanger et al., 1977) sequenziert. Für die Sequenzierung wurde der DNA Cycle Sequencing Kit der Firma Jena Bioscience GmbH verwendet. Eingesetzt wurden fluoreszenz-markierte Sequenzierprimer (*infrared dyes* (IRD) 700 bzw. 800) (3.1.5), die vektorspezifisch oder innerhalb der Sequenz des zu analysierenden Konstruktes binden. Je

Sequenzierreaktion wurden vier Reaktionsgefäße vorbereitet, in denen je 4 µl Terminationsmix (ddGTP, ddATP, ddTTP und ddCTP) vorgelegt und bei 4 °C gelagert wurden. Anschließend wurde ein Mastermix aus 4 µl 10x Sequenzierpuffer, 1-2 µl (2 pmol/µl) Sequenzierprimer, x µl Template DNA (30-150 ng/kb), und 1 µl Sequenzier-Polymerase (4 U/µl) zusammen pipettiert und mit H₂O_{deion} auf 20 µl aufgefüllt. Jeweils 4 µl dieses Mastermixes wurden zu den vorgelegten Stopp-Nukleotiden gegeben.

Reaktionsbedingungen eines Standard-Sequenzier-PCR-Programms:

<i>Ereignis</i>	<i>Zeit</i>	<i>Temperatur</i>	<i>Zyklen</i>
Denaturierung	2 min	95 °C	1
Denaturierung	30 Sek	95 °C	25x
Annealing	30 Sek	T _{ANNEALING}	
Elongation	1 min	72 °C	
Lagerung	∞	4 °C	1

Nach Beendigung der PCR wurden zu jedem Ansatz 4 µl Stopp-Lösung gegeben, die Reaktionsansätze 2 min bei 95 °C denaturiert und je Probe 0,5 µl bis 1 µl auf ein Polyacrylamid-Sequenziergel aufgetragen.

Zur Herstellung des Sequenziergels wurden 25,2 g Harnstoff mit 6 ml Long Ranger™ Gel Lösung (Lonza, Biozym), 6 ml 10xTBE und etwas H₂O_{deion} gemischt, bis sich der Harnstoff vollständig aufgelöst hat. Kurz vor dem Gießen eines Gels wurde die frisch angesetzte Lösung filtriert und auf 60 ml Gesamtvolumen mit H₂O_{deion} aufgefüllt. Anschließend wurden 400 µl 10 %-iges APS und 40 µl TEMED zugegeben, die ein Auspolymerisieren der Gelmatrix induzieren.

Die Elektrophorese erfolgte bei etwa 1500 V/ 50 W in 1xTBE-Laufpuffer über 6 bis 10 Stunden in einem automatischen Sequenzierapparat (LI-COR 4300 DNA-Analyzer). Die Auswertung der Sequenzen erfolgte mit Hilfe der *Software* „e-Seq V3.0“ (LI-COR) oder manuell.

3.2.18 Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen im Batchverfahren

Für die Expression von GST-Fusionsproteinen wurde eine das Protein bzw. Proteinfragment kodierende Sequenz des zu untersuchenden Gens leserasterspezifisch in den Vektor pGEX4T-1 inkloniert. Dieser Vektor enthält auf DNA-Ebene kodierende Bereiche für die Gluthathion-S-Transferase (GST) aus *Schistosoma japonicum*. Aus einer heterologen Expression dieses Konstruktes in dem Wirtsbakterium *E. coli* BL21 ergibt sich ein Fusionsprotein des zu untersuchenden Proteins(-fragments) mit N-terminal angeknüpftem GST-Tag. Unter diesen Bedingungen stand die Expression der Fusionsproteine außerdem unter der Kontrolle des *lac*-Operons und konnte durch Zugabe des Lactose-Analogons Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid (IPTG) induziert werden. Die in dieser Arbeit verwendeten Proteine wurden nach Anzucht in einem unkomplizierten und schnellen Batchverfahren nach dem Prinzip der Affinitätschromatografie aufgereinigt.

Als Vorkultur wurden 10 ml LB-Medium mit einem Einzelklon (BL21 mit rekombinantem Konstrukt) inokuliert und über Nacht bei 37 °C und 200 rpm angezogen. Mit dieser Vorkultur wurden 250 ml LB-Medium auf eine OD₆₀₀ von ~0.1 gebracht und unter gleichen Bedingungen bis zu einer OD₆₀₀ von ~1 angezogen. Die Induktion der GST-Fusionsproteinexpression erfolgte durch Zugabe von 1 mM IPTG (Endkonzentration) und ~3 h nach Induktion wurde die Bakterienkultur durch 10 min Zentrifugation bei 4 °C und 5000 rpm (Sorvall Evolution RC, Rotor SLA-1500) abgeerntet. Das Pellet wurde in 20 ml Lysepuffer resuspendiert und die Zellen anschließend durch Ultraschallbehandlung (4x 30 sek) lysiert. Nach einer 30 minütigen Zentrifugation bei 4 °C und 20.000xg befand sich das Protein im klaren Überstand.

Zur Vorbereitung der Aufreinigung wurden 500 μ l Glutathion-Agarose-Matrix (GenScript) 5x in 10 Volumen 1xPBS_{Protein} gewaschen. Das aufzureinigende Proteingemisch aus dem Bakterienlysat wurde zum vorbereiteten Säulenmaterial zugegeben und über Nacht bei 4 °C auf einem Rollmischer inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde die Matrix 4x in PBS_{Protein} gewaschen. Die Elution erfolgte in 4 Fraktionen. Dazu wurde die Matrix jeweils 10 min bei RT mit 1 Volumen Elutionspuffer auf dem Taumler inkubiert und anschließend sedimentiert. Der Überstand entsprach einer Eluat-Fraktion und von jeder Fraktion wurde eine Probe genommen und über SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) analysiert. Fraktionen, welche das gewünschte GST-Fusionsprotein enthielten, wurden bei -80 °C gelagert.

3.2.19 Expression und Aufreinigung von GST-Hipk als Fusionsprotein

Die Aufreinigung der Proteinkinase Hipk als GST-Fusionsprotein, die während der *in vitro* Phosphorylierungsassays eingesetzt wurde, erfolgte ebenfalls nach dem Prinzip der Affinitätschromatografie, wie bereits unter (3.2.18) für beliebige Proteine beschrieben. Im Folgenden werden lediglich Abweichungen beschrieben, die sich daraus ergeben, dass die Proteinkinase in größeren Mengen und außerdem in enzymatisch aktiver Form aufgereinigt werden musste. Durch heterologe Expression des pGEX4T-1/dHipk2FL4k-Konstruktes im *E. coli*-Stamm BL21 resultierte ein GST-Hipk Fusionsprotein, das nach Anzucht und Aufschluss der Zellen über eine Glutathion-Sepharose-Säule aufgereinigt werden konnte.

Mit einem Einzelklon von *E. coli* (BL21) mit pGEX4T-1/dHipk2FL4k wurden 250 ml LB-Medium mit Ampicillin (100 µg/ml) angeimpft und als Vorkultur über Nacht bei 37 °C und 200 rpm herangezogen. Diese wurde am Folgetag dazu genutzt um 800 ml LB-Medium auf eine OD₆₀₀ von 0.3 einzustellen und bei 30 °C und 200 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 1 zu inkubieren. War diese optische Dichte erreicht, wurden 200 ml kaltes LB-Medium (4 °C) mit Ampicillin zugegeben und die Kultur weitere 30 min bei 18 °C und 200 rpm inkubiert. Die Induktion der Proteinexpression erfolgte durch Zugabe von 1 mM IPTG (Endkonzentration) und 21 ml EtOH (absolut, reinst). Die induzierte Kultur wuchs über Nacht bei 18 °C und 200 rpm. Am darauffolgenden Tag erfolgte die Zellernte durch Zentrifugation bei 4 °C und 5.000 rpm (Sorvall Evolution RC, Rotor SLA-1500). Die Bakterienpellets wurden in 20 ml Lysepuffer resuspendiert und durch Sonifikation auf Eis aufgeschlossen (10x 20 sek). Eine 30 minütige Zentrifugation bei 4 °C und 17.000 rpm (Sorvall Evolution RC, SA-600-Rotor) sedimentierte die Zelltrümmer. Der Überstand wurde mit 5 µl 1 M DTT versetzt und erneut bei gleichen Bedingungen zentrifugiert.

Die Säulenaufreinigung erfolgte bei 4 °C. Zur Vorbereitung der Säule wurden 2 ml Glutathion-Agarose-Matrix (GenScript) 5x in 10 Volumen 1x PBS_{Protein} gewaschen und das Säulenmaterial schließlich in 5 Volumen PBS(KM)T aufgenommen. Der Überstand mit dem GST-Hipk Fusionsprotein wurde zum vorbereiteten Säulenmaterial gegeben und dieses Gemisch über Nacht bei 4 °C auf dem Rollmischer inkubiert. Am Folgetag wurde das Gemisch auf eine Säule transferiert (Econo Column®; BioRad). Die Säule ist senkrecht in einem Stativ befestigt, der Durchfluss wird in einem Falcon aufgefangen. Hat sich das Säulenmaterial abgesetzt und ist der erste Durchlauf aufgefangen, wird das Säulenmaterial mit 40 ml PBS(KM)T und 20 ml PBS(KM) gewaschen. Die Elution erfolgte mit 10 ml Elutionspuffer und wurde in Fraktionen zu je 250 µl in Reaktionsgefäßen gesammelt. Die Fraktionen wurden über SDS-Polyacrylamid-

Gelelektrophorese analysiert und die stärksten Fraktionen in einem *in vitro* Phosphorylierungsassay (3.2.22) mit bekanntem Hipk Substrat (Groucho (Gro); Lee et al. 2009a) auf Kinaseaktivität geprüft. Die überprüften Kinase-Fraktionen wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

3.2.20 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Analyse von Proteinen wurde standardmäßig die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE; Laemmli, 1970) durchgeführt, die eine Auftrennung von Proteinen rein nach ihrem Molekulargewicht ermöglicht. Die zu untersuchenden Proben wurden hierzu mit denaturierendem SDS-Probenpuffer versetzt, 10 min bei 95 °C erhitzt und anschließend bei konstanter Spannung (120 V) aufgetrennt.

Sowohl zum Gießen der 12 %-igen Polyacrylamidgele als auch zur Auftrennung wurden Gelsysteme der Firma Bio-rad verwendet. Als Molekulargewichts-Marker wurde standardmäßig der *PageRuler Unstained Protein Ladder* von Thermo Scientific verwendet. Nach der Auftrennung wurden die Gele für 30 min in Coomassie-Lösung gefärbt, danach in Entfärbelösung bis zur deutlichen Sichtbarkeit der Proteinbanden entfärbt, mehrfach in H₂O gewaschen und getrocknet.

3.2.21 Proteinkonzentrationsbestimmung (Bradford-Methode)

Zur quantitativen Bestimmung in Lösung befindlicher Proteine wurde die kolorimetrische Methode nach Bradford verwendet (Bradford, 1976). Die Zugabe des Farbstoffes Coomassie Brilliantblau G-250 zu einer Proteinlösung führt im sauren Milieu zur Komplexbildung von Farbstoff und Protein, wodurch sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffes von 465 zu 595 nm verschiebt.

Lösungen aufgereinigter Proteine (3.2.18, 3.2.19) wurden mit der Roti®Quant-Lösung der Firma Roth gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch die anschließende photometrische Bestimmung der Absorption bei 595 nm und mit Hilfe einer entsprechenden BSA-Standardkurve konnte der Proteingehalt einer Lösung errechnet werden.

3.2.22 Phosphorylierungsassay (Kinaseassay)

In vitro Phosphorylierungsassays wurden durchgeführt um Proteine bzw. Proteinfragmente als potentielle Substrate der Proteinkinase Hipk zu testen. Die Aktivität einer Kinase besteht darin, einen Gamma- (γ -)Phosphatrest von einer Phosphatquelle (z.B. Adenosintriphosphat, ATP) auf ein ihr bereitgestelltes Substrat zu übertragen, sodass dieses mit einer energiereichen Phosphatgruppe versehen wird und aus der Kinasereaktion ein phosphoryliertes Substrat und ein Adenosindiphosphat (ADP) hervor gehen. Wird der Proteinkinase dazu radioaktiv markiertes [γ - ^{32}P]-ATP bereitgestellt, so kann mit einem solchen Ansatz getestet werden, ob ein Protein ein Substrat darstellt, da die Übertragung von radioaktiv markierten Phosphatresten verfolgt werden kann.

In einem Inkubationsmix wurden 5 μl ($\sim 0,5$ -1 μg) aufgereinigte GST-Hipk Proteinkinase (3.2.19) mit $\sim 0,5$ -2 μg aufgereinigtem GST-Fusionsprotein und Kinasepuffer auf ein Gesamtvolumen von 20 μl aufgefüllt. Nach der Zugabe von 5 μl radioaktiv markiertem [γ - ^{32}P]-ATP (insgesamt je Probe 3 μCi) erfolgte eine Inkubation der Ansätze für 3 h bei RT. Die Inkubation wurde durch Zugabe von SDS-Probenpuffer und eine 10 minütige Denaturierung bei 95 °C abgestoppt. Anschließend wurden die GST-Fusionsproteine in den Inkubationsansätzen über eine SDS-PAGE nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt, das Polyacrylamidgel auf eine Whatmanmembran übertragen und getrocknet. Im Folgenden konnte eine direkte Autoradiographie durchgeführt werden, bei der die Membran, auf welche die radioaktiv markierten GST-Fusionsproteine übertragen wurden, direkt mit dem Röntgenfilm (X-OMAT AR Film; XAR-5 (13x18); Kodak) in Kontakt gebracht wurde. Die Entwicklung des Röntgenfilms erfolgte mit der Curix-60 Fotomaschine von AGFA. Handelt es sich bei einem der untersuchten GST-Fusionsproteine um ein Substrat der Kinase, so werden ihm während der Inkubation radioaktiv markierte Phosphatreste angehängt, sodass es in der Autoradiographie eine Schwarzfärbung auf dem Röntgenfilm hinterlässt.

Arbeiten mit Drosophila

3.2.23 Fliegenzucht

Die verschiedenen *Drosophila*-Stämme wurden auf Standardfuttermedium gehalten. Die generelle Stammhaltung erfolgte bei 18 °C und ca. 65 % Luftfeuchtigkeit bei einer Generationszeit von ~21 Tagen. Um eine Verkürzung der Generationszeit auf ~12 Tage zu erreichen, wurden Fliegen, die für Versuche benötigt werden, bei 24 °C und ca. 65 % Luftfeuchtigkeit gehalten.

3.2.24 Absammeln von virginellen Weibchen (Jungfrauen) für Kreuzungen

Um Jungfrauen in ausreichender Zahl für Kreuzungen zur Verfügung zu haben, wurden die adulten Fliegen der entsprechenden Stämme durch Abschütteln entfernt und die Becher mit den darin verbleibenden Larven und Puppen bei 24 °C und ca. 65 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Frisch geschlüpfte Weibchen wurden spätestens 12 h danach abgesammelt, bevor die männlichen Tiere fertil wurden. Die männlichen 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. 65 % Luftfeuchtigkeit.

3.2.25 Phänotypische Untersuchungen

Zur Auswertung von Kreuzungsanalysen wurde die erste Filialgeneration (F1) einer Kreuzung zunächst nach optisch erkennbaren phänotypischen Markern selektiert, mit deren Hilfe nach dem gewünschten Genotyp selektiert werden kann. Bei einer Kreuzung mit balancierten Fliegenstämmen stammen diese Marker in der Regel von Balancerchromosomen (3.2.27.6). War die Kreuzung basierend auf dem UAS/Gal4-System (Brand & Perrimon, 1993) durchgeführt worden, beschränkte sich die Auswertung auf die Betrachtung der vom Treiberstamm betroffenen Körperstrukturen. Beispielsweise wurde nach einer augenspezifischen Fehlexpression die phänotypische Ausprägung an den Komplexaugen untersucht. Hierzu wurden einzelne Fliegen in 90 % EtOH unter dem Binokular betrachtet. Im Fall von flügel-spezifischen Fehlexpressionen wurde die phänotypische Ausprägung an adulten, einzeln präparierten Flügeln analysiert, die zunächst in 90 % EtOH gespült und anschließend in Aquatex® Eindeckmedium (VWR) eingedeckt wurden. Zur Dokumentation wurden bei gleichbleibender Vergrößerung (Foto)Aufnahmen gemacht und anschließend weitergehend analysiert (z.B. Augenflächenmessungen).

3.2.26 PhiC31-Integrase-vermittelte Keimbahntransformation bei *Drosophila*

Keimbahntransformation bei *Drosophila* wurde früher meist durch das Einbringen transposabler P-Elemente durchgeführt, die an einem zufälligen Ort im Fliegen-genom integrieren. In den letzten Jahren löste die PhiC31-Integrase-vermittelte Keimbahntransformation (Abb. 3.4) diese Technik vor allem dann ab, wenn es darum geht, die Transgene hinterher funktionell zu analysieren oder sogar miteinander zu vergleichen. Der Vorteil der PhiC31-Integration besteht darin, dass die Integration ortsspezifisch im Genom stattfindet und somit jedes Konstrukt in den gleichen genomischen Locus eingebracht wird und denselben Positionseffekten ausgesetzt ist. Ein weiterer Vorteil ist die Unidirektionalität der Integrase, die ein Konstrukt einbaut, aber nicht ausbauen kann.

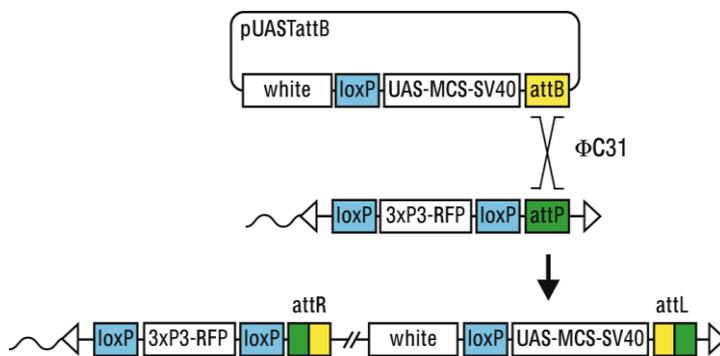


Abb. 3.4: Schema der PhiC31-Integration. Der Einbau eines Konstruktes erfolgt über homologe Rekombination zwischen den kompatiblen Rekombinationssequenzen *attachment B* (*attB*) und *attachment P* (*attP*). Die *attB*-Sequenz befindet sich im zu integrierenden Vektor, während die *attP*-Sequenz im Genom des Fliegenstammes zu finden ist (flyC31.frontiers-in-genetics.org).

Rund um die PhiC31-Integration wurde ein System entwickelt, das aus einer Serie von transgenen Fliegenstämmen besteht, die jeweils eine *attP* Rekombinationssequenz an einem bestimmten Ort integriert besitzen. Außerdem hat jeder dieser Stämme eine stabil ins Genom eingebrachte und keimbahn-spezifisch exprimierte Integrase (Bischof et al., 2007). Durch die Verwendung von Transformationsvektoren mit einer *attB* - Rekombinationssequenz und der Auswahl des entsprechenden Fliegenstammes (mit passender *attP*-Rekombinationssequenz) zur Injektion können Konstrukte gezielt am gewünschten Locus integriert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Konstrukte in entsprechend kompatible Transformationsvektoren mit *attB* - Rekombinationssequenz kloniert (pUAST_{toy} HA CYFP *attB* (4.1.1); pUAST_{attB}-*toy*-Konstrukte (4.2.1 und 4.4.2)) und diese anschließend in Fliegenembryonen des Stammes BL24871 injiziert. Die Integration erfolgt über die sowohl keimbahn- als auch sequenzspezifische homologe Rekombination der *attB* - Rekombinationssequenz des Transformationsvektors mit der *attP* - Rekombinationssequenz im Fliegen-genom der injizierten Fliegenembryonen. Im Falle des Stammes BL24871 erfolgt der Einbau auf dem linken Arm des 3. Chromosoms (*attP*-3B; 3L, 65B2). Das erfolgreich integrierte Konstrukt wird stabil an die

Folgegenerationen weitergegeben, was sich phänotypisch an der roten Augenfarbe erkennen lässt, welche durch die Expression des mittels Transformationsvektors eingebrachten *mini-white*-Gens hervorgerufen wird. Um diese Art der Selektion durchführen zu können, sind die Stämme mit *attP* - Rekombinationssequenz weißäugig (*white*) bzw. pinkfarben (*pink eyed*).

3.2.27 Durchführung der Keimbahntransformation

3.2.27.1 Injektionsmaterial

Hochreine DNA des Transformationskonstruktes (200-500 ng/ μ l) wurde in angegebener Konzentration in sterilem H₂O_{deion} aufgenommen. Anschließend wurde diese DNA-Lösung direkt zur Injektion eingesetzt.

3.2.27.2 Absammeln, Dechorionieren und Aufreihen von Embryonen

Zum Absammeln von Embryonen wurden die Fliegen in luftdurchlässigen Gelegebechern auf mit Hefe bestrichene Apfelsaftplatten gesetzt. Die Gewöhnungszeit betrug 1-2 Tage. Einige Stunden vor dem Injizieren wurden die Platten alle 20-30 min gewechselt, um die Fliegen an den Wechselrhythmus zu gewöhnen und eine gute Eiablage zu gewährleisten. Die Embryonen durften bis zum Abschluss der Injektion höchstens 1 h alt sein, da sich dann schon die Polzellen ausbilden. Alle 30 min wurden die Embryonen abgesammelt und dechorioniert. Dazu wurde die Platte von toten Fliegen gereinigt, für ca. 1,5 min mit 50 % Hypochlorit-Lösung überschichtet und einige Male sanft bewegt. Die dechorionierten Embryonen, die glänzend aufschwammen, wurden in einem Gazenetzt aufgefangan und mit Embryonenwaschlösung mehrmals gespült. Die Embryonen wurden dann unter einem Stereomikroskop auf den Rand einer Apfelsaftplatte mit Hilfe einer Präpariernadel so aufgereiht, dass der anteriore Teil der Embryonen zum Rand der Platte zeigte. Um die Embryonen auf ein Deckglas zu transferieren, wurde doppelseitiges Klebeband (Tesa Photo Film Tape, 12 mm breit) benutzt. Anschließend wurden die Embryonen für einige Minuten in einer Kammer mit Silikagel getrocknet und dann mit 10S Voltalef-Öl (Sigma) dünn überschichtet, damit sie im weiteren Verlauf nicht austrockneten.

3.2.27.3 Injektion

Die Injektion wurde an einem Inversmikroskop (Zeiss Axiovert 25), kombiniert mit einem Mikromanipulator (Leitz) durchgeführt. Als Injektionsnadeln wurden Glaskapillaren verwendet (\varnothing 1 mm, WPI), die mit Hilfe eines Magnetheizgerätes der Firma GETRA (Einstellungen: Magnet: 210, Heizung: 250 °C) gezogen wurden. Mit Hilfe einer Microloader-Spitze (Eppendorf) wurden 2-3 μ l Injektionsmaterial in die Spitze der Injektionsnadel gefüllt und diese in den Mikromanipulator eingesetzt. Das Deckglas mit den aufgereihten Embryonen wurde auf einem Objektträger in der Mitte des Objektisches positioniert und vorsichtig gegen die Injektionsnadel bewegt, um diese an der Spitze abzubrechen und somit zu schärfen. Nadel und Embryonen wurden auf eine Fokusebene gebracht und die Nadel am posterioren Pol des zu injizierenden Embryos positioniert. Anschließend wurde eine kleine DNA-Mengen in diesen Bereich des Embryos injiziert. Die injizierte DNA-Menge wurde mittels aufgebauten Drucks des Injektionsgeräts (Eppendorf FemtoJet) reguliert. Die Einstellungen konnten am Gerät vorgenommen werden, sodass die unterschiedlichen Parameter individuell, je nach Injektionsbedingungen, konstant gehalten werden konnten. Mittels eines Mausclicks wurde so eine genau definierte Menge an DNA in die Embryonen injiziert. Nachdem alle Embryonen eines Deckglases injiziert waren, wurde dieses in eine feuchte Kammer gelegt und bis zu 48 h bei 18 °C inkubiert.

3.2.27.4 Behandlung injizierter Embryonen

Im Anschluss an die Inkubation in der feuchten Kammer wurde das Deckglas mit den Embryonen auf eine Apfelsaftplatte gelegt, welche zuvor in der Mitte dünn mit Hefe bestrichen worden war. Nach Bedarf wurden die Embryonen noch einmal mit 10S Voltalef-Öl (Sigma) überschichtet und die Platten bei 24 °C und ca. 65 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Von den in den darauf folgenden Tagen geschlüpften Larven wurden jeweils zehn mit einer Präpariernadel vorsichtig in ein Futterröhrchen überführt und bei 24 °C und ca. 65 % Luftfeuchtigkeit weiter aufgezogen.

3.2.27.5 Selektion von Transformanten

Frisch geschlüpfte Fliegen (G_0 -Generation) wurden mit *yw*-Fliegen des anderen Geschlechts rückgekreuzt und bei 24 °C und ca. 65 % Luftfeuchtigkeit gehalten. Deren Nachkommen (F1-Generation) wurden auf die Augenfarbe hin untersucht. Erst in dieser Generation konnte das

Markergen *mini-white* (w^+) des Transformationsvektors, der in der G_0 in die Keimbahn integriert wurde, somatisch exprimiert werden. Die F1-Transformanten wurden zur Amplifikation zunächst weiter mit *yw*-Fliegen gekreuzt. Die nächste Generation (F2) wurde mit Fliegen des entsprechenden Balancerstammes gekreuzt. So konnte ein stabiler, balancierter Stamm erzeugt werden.

3.2.27.6 Balancierung transgener Fliegen

In der Stammhaltung von *Drosophila* versteht man unter Balancierung die heterozygote Stabilisierung von Mutationen über einem sogenannten Balancerchromosom. Diese zeichnen sich durch folgende Merkmale aus:

- mehrfache Inversionen (hierdurch wird Rekombination unterdrückt)
- ein oder mehrere dominante Markergene
- einen rezessiven Letalfaktor

Zur Balancierung eines mit Hilfe des PhiC31-Systems (3.2.25) neu erzeugten transgenen Fliegenstammes werden die transformanten F₂-Fliegen aus der Selektion von Transformanten (3.2.26.5) mit Fliegen gekreuzt, die ein Balancerchromosom für das entsprechende Chromosom besitzen, auf dem auch die Insertion stattgefunden hat. Anschließend werden die Nachkommen mit Hilfe der dominanten Markergene sortiert. Fliegen, die nach der Kreuzung sowohl das neu integrierte Konstrukt (selektierbar anhand des Markergens des Transformationsvektors) als auch das Balancerchromosom besitzen, werden zur Stammhaltung miteinander geselbstet (unter ihresgleichen verkreuzt), um einen stabilen, heterozygoten Stamm zu erhalten. Fliegen, in denen das Balancerchromosom homozygot vorkommt, können aufgrund der rezessiven Letalfaktoren nicht auftreten.

3.2.28 Fehlexpression mit dem UAS/Gal4-System (Brand & Perrimon, 1993)

Das UAS/Gal4-System erlaubt die gezielte zeit- und gewebespezifische Expression von Genprodukten in *Drosophila*. Dieses binär organisierte System beruht auf der Expression des Hefetranskriptionsfaktors Gal4 unter der Kontrolle der regulatorischen Region eines Gens, welches im gewünschten spatio-temporalen Muster aktiv ist. Das gebildete Gal4-Protein bindet seinerseits an sogenannte *Upstream Activation Sequences* (UAS) Promotorelemente und induziert

so die Transkription dahinter liegender Gene. Sowohl das Gal4- als auch das UAS-Konstrukt liegen zunächst in unterschiedlichen transgenen Fliegenstämmen vor. Erst durch die Kreuzung eines Gal4 (Treiber-) Stammes mit einem UAS (Effektor-) Stamm werden beide Faktoren in einem Embryo kombiniert und die Konsequenz der ektopischen Expression kann in den Nachkommen der Kreuzung beobachtet werden. Die Unterteilung des Systems in zwei Komponenten birgt ein großes Maß an Kombinatorik.

3.2.29 Messungen der Augenfläche von Komplexaugen

Die Auswertung eines bestimmten Phänotypes ist im Rahmen der *Drosophila*-Forschung weit verbreitet. Fliegen, die einen veränderten Genotyp aufweisen, bilden oft dafür charakteristische Phänotypen aus, welche die Auswertung einer Analyse in vielen Fällen vereinfachen oder gar erst ermöglichen. Da das Komplexauge von *Drosophila melanogaster* eine große Bandbreite von leicht unterscheidbaren phänotypischen Veränderungen aufweisen kann, ist es als „Modellorgan“ sehr geeignet. So wurde im Rahmen dieser Arbeit dieses Organ vor allem in Hinsicht auf dessen Größenzu- oder abnahme betrachtet. Um diesen Parameter sinnvoll auswerten zu können, wurden einige Rahmenbedingungen gesetzt. Je zu bestimmender mittleren Augengröße wurden jeweils mindestens 10 männliche Fliegen bei gleichbleibender Vergrößerung fotografiert (Kamera: U-CMAD3, Software: Cell P von Olympus). Anschließend wurde die Größe eines einzelnen Auges über die Fläche/Umfang-Messung des *analySIS*-Programms (Olympus) bestimmt. Hierbei wird manuell der Umfang eines Fliegenauges auf der Aufnahme umrandet, das Programm errechnet den zugehörigen Flächeninhalt in μm^2 , die gemessenen Werte wurden zusammengetragen und ein Mittelwert erstellt.

3.2.30 Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (BiFC) in *Drosophila*

Durch Komplementationsverfahren kann ein direkter Interaktionsnachweis zweier Proteine in ihrem endogenen Kontext erbracht werden. Dazu wird an die zu untersuchenden Proteine jeweils ein nicht-fluoreszierendes Fragment eines Fluoreszenzproteins (z.B. *Yellow Fluorescent Protein*, YFP) mit Hilfe molekularbiologischer Methoden angefügt. Gelangen die nicht-fluoreszierenden Fragmente durch physikalische Wechselwirkung der zu untersuchenden

Proteine in räumliche Nähe zueinander, wird das Fluoreszenzprotein rekonstituiert und kann nachgewiesen werden.

Zur Durchführung einer BiFC-Analyse werden die verschiedenen zu analysierenden Faktoren in Form ihrer cDNA in einen Transformationsvektor eingebracht und mit diesem Vektor werden anschließend entsprechende transgene BiFC-Stämme erzeugt. In der vorliegenden Arbeit wurde der Transformationsvektor pUAST-RfB-HA-CYFP-*attB* (Gohl et al., 2010) verwendet um einen BiFC-Stamm des zu untersuchenden Faktors herzustellen. Mit diesem wurde die PhiC31-vermittelte Keimbahntransformation durchgeführt, bei der das gewünschte Konstrukt mithilfe des PhiC31-Systems (3.2.26) in eine *attP*-Rekombinationssequenz auf dem dritten Chromosom in das Genom von *Drosophila* eingebracht wurde (3.2.27).

Mit Hilfe des UAS/Gal4-Systems (3.2.28) können die gewünschten zu untersuchenden Transgenkombinationen dann im Muster spezifischer Treiberstämmen exprimiert werden. Um dies zu erreichen, werden die einzelnen BiFC-Komponenten in zwei aufeinanderfolgenden Kreuzungen in einem Organismus zusammengebracht (Abb. 3.7). Zur Analyse werden die entsprechenden Gewebe nach rekonstituiertem YFP untersucht. Das Signal kann durch eine Anti-GFP-Antikörperfärbung (3.2.31) verstärkt visualisiert und konfokalmikroskopisch dokumentiert werden.

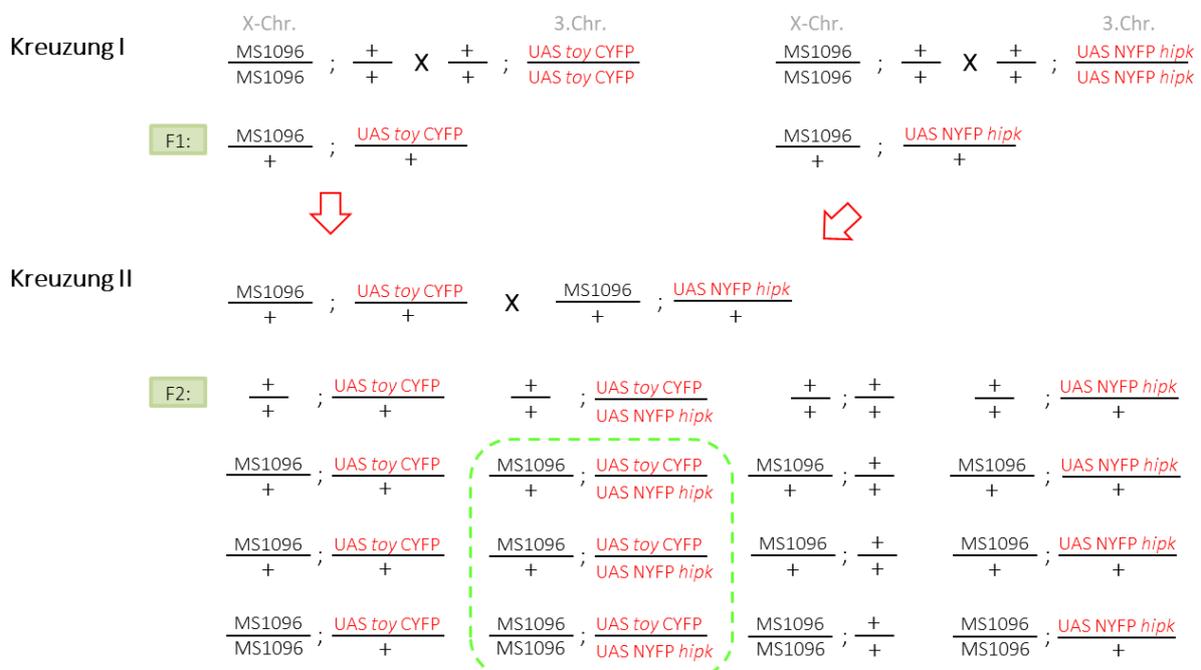


Abb. 3.7: Kreuzungsschema der BiFC-Analyse. In den beiden Kreuzungen I wird jeweils das Konstrukt eines zu testenden Faktors mit dem (gleichen) Gal4-Treiber zusammengekreuzt. Kreuzen der uniformen F1-Generation aus den beiden ersten Kreuzungen I miteinander bringt verschiedene Genotypen hervor, ein Teil davon trägt alle zur BiFC-Analyse nötigen Faktoren (grüne gestrichelter Rahmen). Der Nachweis der Interaktion von Hipk und Toy *in vivo* erfolgt durch den Nachweis des rekonstituierten YFP.

Histologische Methoden

3.2.31 Antikörperfärbungen an larvalen Geweben von *Drosophila melanogaster*

Imaginalscheiben (Augen-Antennen-, Flügel- und Beinscheiben) sowie Gehirne von Larven des dritten Larvalstadiums (L3) wurden in 1x PBS_{AK} präpariert und in Reaktionsgefäßen auf Eis gesammelt. Die Fixierung erfolgte in einem Gemisch aus 3 Volumen PBL und einem Volumen 8 %iger Paraformaldehyd-Lösung für 1 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C. Nach der Fixierung wurden die Präparate dreimal mit 1x PBS_{AK} gespült und 3x 5 min in Methanol (MeOH) dehydriert, bevor sie bei -20 °C gelagert wurden. Sollten die fixierten Gewebe direkt zur Antikörperfärbung eingesetzt werden, wurde trotzdem die Dehydrierung in MeOH durchgeführt.

Fixierte Gewebe wurden durch dreimaliges Spülen in PBX_{0.5%} rehydriert. Alle weiteren Schritte wurden auf dem Taumler unter sanfter Bewegung durchgeführt. Nach 5x 30 min Waschen in PBX_{0.5%} wurden die unspezifischen Bindungsstellen durch eine 30 minütige Inkubation mit 5 % NHS in PBX_{0.5%} abgeblockt. Die Inkubation mit dem primären Antikörper, verdünnt in 5 % NHS in PBX_{0.5%}, erfolgte bei 4 °C über Nacht. Am folgenden Tag wurden die Gewebe erneut 3x gespült und 5x 30 min mit PBX_{0.5%} gewaschen. Die Inkubation mit dem fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörper wurde analog durchgeführt. Nach 3x Spülen und 7x 30 min Waschen in PBX_{0.5%} wurden die Gewebe in Vectashield® Mounting Medium (VectorLabs) aufgenommen und eingedeckt. Die Auswertung und Dokumentation erfolgte wie unter 3.2.33 bzw. 3.2.34 beschrieben.

Fluoreszenztechniken

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Methoden der Mikroskopie angewendet, um Arbeiten an Präparaten durchzuführen bzw. um Phänotypen und Expressionsmuster zu dokumentieren.

3.2.32 Konventionelle Lichtmikroskopie

Bei *Durchlichtmikroskopen* wird das Licht durch das Präparat hindurch geleuchtet, bevor es vom Objektiv aufgefangen wird. Daher sind durchsichtige bzw. dünn geschnittene Präparate vorausgesetzt. Das erzeugte Bild wird durch das Okular weiter vergrößert, bevor es von einer

charge coupled device (CCD)-Kamera dokumentiert wird. Die Gesamtvergrößerung ergibt sich aus der Multiplikation der Vergrößerung des Objektivs (1.Vergrößerungsstufe) mit der Vergrößerung des Okulars (2.Vergrößerungsstufe), abhängig von der numerischen Apertur. Für Hellfeldaufnahmen (von z.B. Flügeln) wurde das Mikroskop BX61 (Hellfeld) mit der Kamera U-CMAD3 und der Software „CellP“ der Firma Olympus verwendet. Die weitere Bildbearbeitung erfolgte mit Adobe Photoshop und Illustrator CS6.

Bei einem *Auflichtmikroskop* wird das Licht vom Objektiv aus auf die Probe gestrahlt und das reflektierte Licht wird vom Objektiv aufgefangen und dargestellt. Die Aufnahmen von adulten Fliegen wurden mit zusätzlicher externer Beleuchtung an einem solchen Mikroskop SZX12 (Olympus) durchgeführt und mit der Kamera U-CMAD3 (Olympus) dokumentiert. Die weitere Bildbearbeitung erfolgte mit Adobe Photoshop und Illustrator CS6.

Bei einem *Inversen Mikroskop* ist das Objektiv von unten auf das Präparat gerichtet und es bleibt mehr Raum über dem Objektivtisch, was insbesondere dann von Vorteil ist, wenn während des Mikroskopierens mikromanipulative Eingriffe am Präparat vorgenommen werden, wie z.B. bei der Mikroinjektion von Fliegenembryonen zur Herstellung transgener Fliegen.

3.2.33 Fluoreszenzmikroskopie

Bei *Fluoreszenzmikroskopen* wird das Präparat zwar auch be-/durchleuchtet, jedoch ist das Anregungslicht stärker als bei normalen Lichtmikroskopen. Es kommt von Quecksilberdampf lampen, die das gesamte sichtbare Lichtspektrum sowie UV-Licht erzeugen können. Das Anregungslicht wird durch spezielle Filter sortiert, sodass nur Licht der gewünschten Wellenlänge zum Präparat durchgelassen wird. Werden im Präparat befindliche Fluoreszenzfarbstoffe (z.B. Fluoreszenz-gekoppelte Antikörper, die sich nach einer Antikörperfärbung im Präparat befinden, oder Reporterproteine nach Fehlexpression) mit Licht der entsprechenden Wellenlänge angeregt, strahlen sie anschließend Licht längerer Wellenlänge ab (Stokes-Verschiebung). Durch dieses vom Präparat emittierte Licht wird ein Bild erzeugt, welches über eine CCD-Kamera dokumentiert werden kann. Dabei verhindern spezielle optische Filter, dass zur Bilderzeugung anderes Licht, als das vom Fluoreszenzfarbstoff emittierte Licht detektiert wird. Die CCD-Kamera erzeugt dabei eine schwarz-weiß-Aufnahme, die im Nachhinein mithilfe eines Bildbearbeitungsprogrammes eingefärbt werden kann. Für Fluoreszenzaufnahmen wurde das Mikroskop BX61 mit der Kamera U-CMAD3 und der Software CellP von der Firma Olympus verwendet. Die weitere Bildbearbeitung erfolgte mit Adobe Photoshop und Illustrator CS6.

3.2.34 Konfokalmikroskopie

Die *Konfokalmikroskopie* ist eine Spezialform der Fluoreszenzmikroskopie. Für die konfokalen Aufnahmen in dieser Arbeit wurde ein sogenanntes konfokales Laser-Scanning-Mikroskop (*Confocal Laser Scanning Microscope*, CLSM; SP5 von Leica) verwendet, bei dem das Anregungslicht in Form eines energiereichen Laserstrahls auf einen Punkt des Präparates fokussiert wird. Die Fluoreszenz dieses Punktes gelangt anschließend zum Detektor (Abb. 3.8). Nachdem das gesamte Präparat mithilfe dieses Punktes abgerastert wurde, werden die Fluoreszenzintensitäten der einzelnen Punkte per Steuerungscomputer zu einem Bild zusammengesetzt. Das Signal der an fokussierten Schärfeebene ist kontrastreicher darstellbar als in der normalen Fluoreszenzmikroskopie, da Hintergrundfluoreszenz besser blockiert werden kann. Dies geschieht durch eine Lochblende, die Fluoreszenz, welche abseits der Schärfeebene entsteht, blockiert, bevor sie zum Detektor gelangt („optischer Schnitt“). Zur Verarbeitung und Auswertung der resultierenden Bilder wurde das Programm ImageJ (National Institutes of Health, NIH) verwendet. Die weitere Bildbearbeitung erfolgte mit Adobe Photoshop und Illustrator CS6.

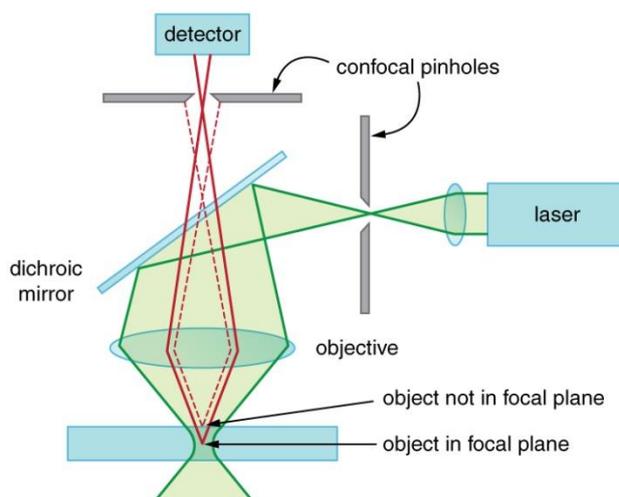


Abb. 3.8: Schematische Darstellung des Strahlenganges eines Konfokalmikroskopes. Energiereiches Licht des Lasers (grün) wird durch die Lochblende (*pinhole*) über den dichromatischen Spiegel (*dichroic mirror*) und das Objektiv punktförmig in die Fokusebene (*focal plane*) des Präparates gelenkt. Emittiertes Licht des Präparates (rot) wird durch das Objektiv und den dichromatischen Spiegel zum Detektor gelenkt. Streufluoreszenz des Präparates außerhalb der Fokusebene wird durch die Lochblende eingeschränkt (Bildquelle: philschatz.com).

Zur Erstellung der Abschnitte „Material und Methoden“ wurde die Methodensammlung der Arbeitsgruppe von Prof. U. Walldorf und die eigene Diplomarbeit zu Hilfe genommen.

4 Ergebnisse

Die Homeodomänen Interagierende Proteinkinase (Hipk) hat regulatorischen Einfluss auf eine Vielzahl von intra- und interzellulären Signalwegen. Ihre Substrate sind meist wichtigen zellulären Prozessen, wie z.B. der transkriptionellen Regulation oder der Proliferation, zuzuordnen. In vorhergehenden Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die beiden zum Vertebraten PAX6 homologen *Drosophila* Proteine Twin of Eyeless (Toy) und Eyeless (Ey) *in vitro* Substrate der Hipk darstellen (Steinmetz, 2006) und mit Hilfe einer Peptidfilteranalyse wurden zwei Hipk-Phosphorylierungstellen von Toy festgestellt, Ser⁴²⁴ und Thr⁴²⁸ (Laupsien, 2007). Um die Auswirkungen einer Phosphorylierung von Toy durch die Hipk näher zu charakterisieren, wurden entsprechende phosphorylierungsmutante UAS_{toy}-Stämme erzeugt und *in vivo* durch Fehlexpressionsstudien analysiert. Dabei ergaben sich erste Hinweise auf eine physiologische Relevanz des Phosphorylierungsstatus von Toy (Laupsien, 2007).

Die Basis der physiologischen Relevanz einer Beziehung zwischen Proteinkinase und ihrem Substrat ist, dass sie sich im endogenen Kontext tatsächlich begegnen. Die Expressionsmuster von Hipk und Toy zeigen überlappende Bereiche sowohl embryonal als auch larval im Nervensystem sowie in augenspezifischen Strukturen, den Augen-Antennen-Imaginalscheiben (*Eye Antennal Discs*, EADs) (Czerny et al., 1999; Lee et al., 2009a; Blaquière et al., 2014). Zur näheren Charakterisierung der Beziehung zwischen Hipk und Toy sollte analysiert werden, ob die beiden Proteine neben der *in vitro* festgestellten Enzym-Substrat-Beziehung auch tatsächlich *in vivo* interagieren können.

4.1 Untersuchung der *in vivo* Interaktion zwischen Hipk und Toy

Bereits seit 2002 wird die Methode der Bimolekularen Fluoreszenz Komplementation (*Bimolecular Fluorescence Complementation*, BiFC) dazu verwendet, um Protein-Protein-Interaktionen (PPI) *in vivo* nachzuweisen (Hu et al., 2002). Mittlerweile wurde das BiFC-System auch in *Drosophila* etabliert, indem man entsprechende Expressionsvektoren entwickelte, die es ermöglichen, die zu untersuchenden Faktoren gezielt *in vivo* zu exprimieren (Gohl et al., 2010). So können die zu untersuchenden Proteine mit Hilfe des UAS/Gal4-Systems direkt als Fusionsproteine mit je einem nicht fluoreszierenden Fluoreszenzprotein-Fragment zeit- und gewebespezifisch koexprimiert werden. Findet eine Interaktion der zu untersuchenden Proteine statt, werden die beiden nicht-fluoreszierenden Fluoreszenzprotein-Fragmente in unmittelbare räumliche Nähe

zueinander gebracht und rekonstituieren zu einem intakten, fluoreszierenden Protein. Das entstehende Fluoreszenzsignal kann mittels Fluoreszenzmikroskop dokumentiert werden.

4.1.1 Erzeugung eines transgenen UAS_{toy}-BiFC-Stammes

Die Untersuchung von Hipk und Toy mittels BiFC in *Drosophila* erforderte die Erzeugung des transgenen Fliegenstammes UAS_{toy}CYFP. Dazu wurde mit Hilfe der Primer Toy_BiFC5' und Toy_BiFC3' die kodierende Sequenz von *toy* (exklusive Stop-Codon) aus dem *toy*cDNA-Klon (GH14454) heraus amplifiziert (3.1.4, 3.1.5), in den Gateway-Entry-Vektor pCR[®]8/GW/TOPO[®] zwischenkloniert und mittels Sequenzierung überprüft (3.1.6, 3.2.9, 3.2.17). Anschließend wurde das Konstrukt durch Clonase-vermittelte Rekombination in den Transformationsvektor pUAST-RfB-HA-CYFP-*attB* (Gohl et al., 2010) übertragen (3.1.6, 3.2.10). Das resultierende Konstrukt ermöglicht es, Toy als Fusionsprotein mit C-terminal angehängtem CYFP (C-terminales Fragment des *Yellow Fluorescent Protein*, YFP) zu exprimieren. Eine schematische Darstellung des klonierten Transformationskonstruktes ist in Abb. 4.1, B gezeigt.

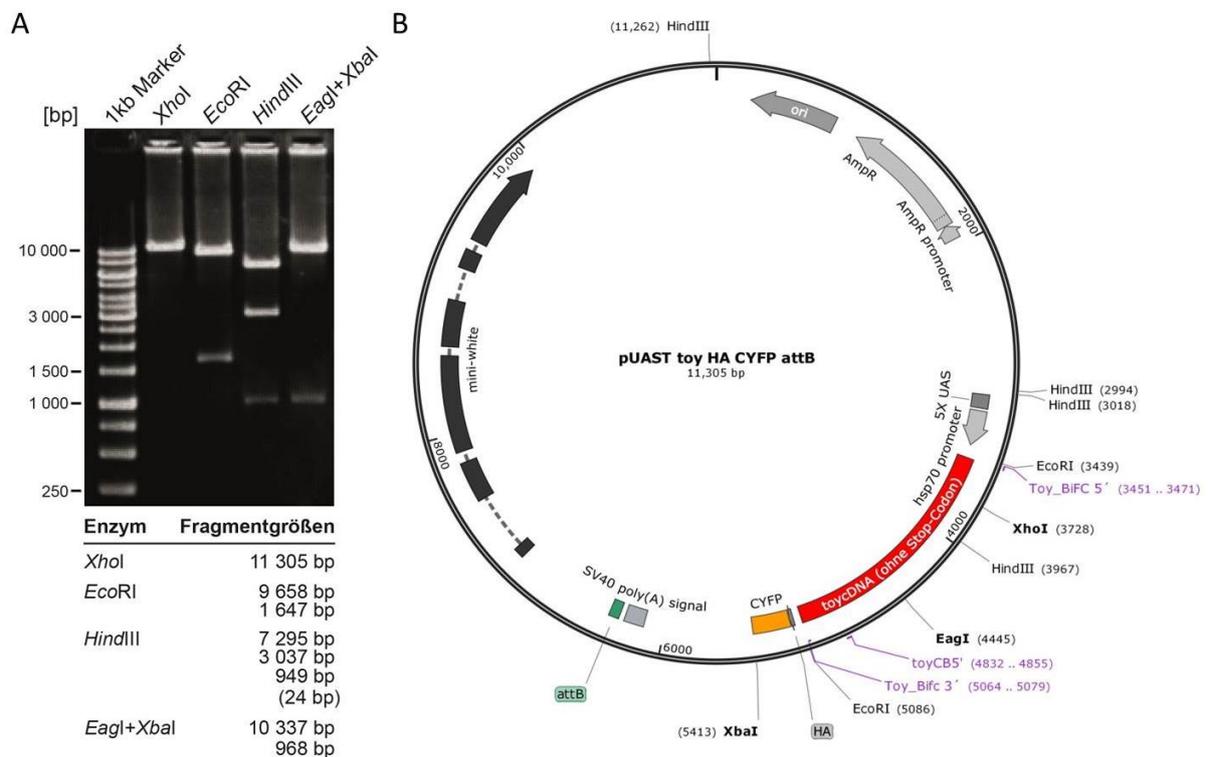
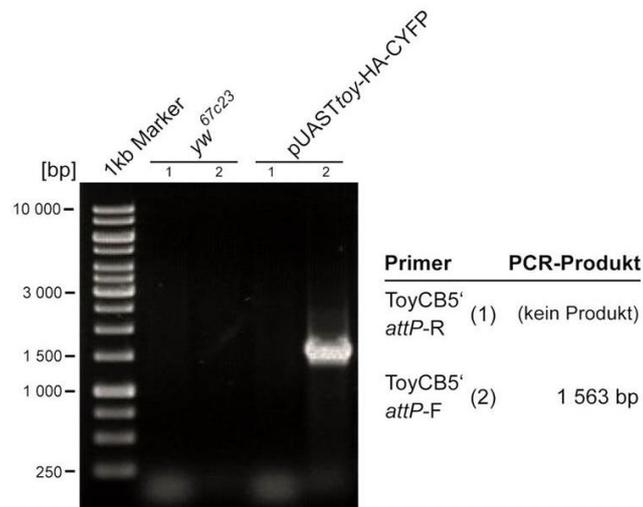


Abb. 4.1: Kontrollrestriktion und schematische Darstellung des pUAST_{toy}-HA-CYFP-*attB*-Konstruktes. (A) Gelelektrophoretische Auftrennung der Fragmente aus Restriktionsansätzen mit den Enzymen *XhoI*, *EcoRI*, *HindIII* und *EagI/XbaI* zur Kontrolle des Transformationskonstruktes. In der Tabelle darunter sind die zu erwartenden Fragmentgrößen aufgelistet. Fragmente in Klammern sind auf dem Gelbild nicht zu erkennen. **(B)** Schematische Darstellung des pUAST_{toy}-HA-CYFP-*attB*-Transformationskonstruktes. Das eingebrachte *toy*cDNA-Fragment ist rot, das C-terminale Fragment des *Yellow Fluorescent Protein* (CYFP) ist gelb und die *attB*-Sequenz ist grün dargestellt. Die Vektorkarte wurde mit Snapgene erstellt.

Im Anschluss an die erfolgreiche Überprüfung des Transformationskonstruktes durch Restriktion (Abb. 4.1, A) und Sequenzierung (3.2.2, 3.2.17) erfolgte die Injektion dieses Konstruktes in den Fliegenstamm BL24871, um einen entsprechenden transgenen UAS toy CYFP-Stamm zu generieren (3.2.27). Der Einbau ins Fliegen-genom fand gezielt mit Hilfe der PhiC31-Integration in der Zielsequenz *attP*-3B (Chr. 3L, 65B2) statt und wurde molekular mittels PCR auf genomische DNA des resultierenden Stammes überprüft (Abb. 4.2) (3.2.14, 3.2.15, 3.2.26).

A



B

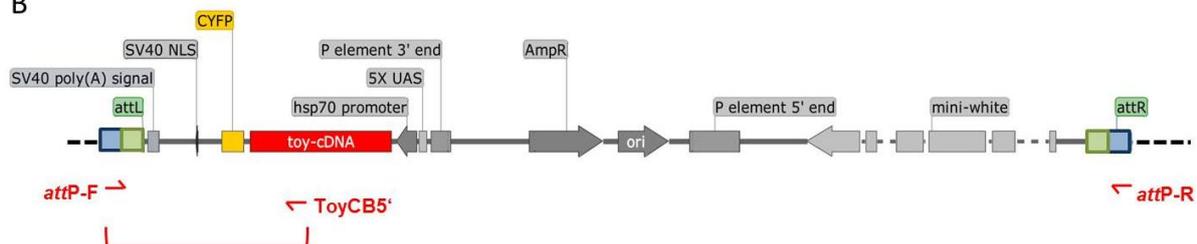


Abb. 4.2: Molekularer Nachweis des genomisch integrierten pUAST toy -HA-CYFP-Konstruktes. (A) Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte. Die PCR wurde auf genomische DNA des yw^{67c23} -Stammes (Kontrolle) bzw. des erzeugten UAS toy CYFP-Stammes mit den Primern *attP*-R und ToyCB5' (1) bzw. *attP*-F und ToyCB5' (2) durchgeführt. (B) Schematische Darstellung des PCR-Nachweises. Gezeigt ist die Lage der verwendeten Primer in Relation zum genomisch integrierten Konstrukt. In der gezeigten Orientierung entsteht mit dem Primerpaar *attP*-F/ToyCB5' ein PCR-Produkt von 1 563 bp, mit den Primern *attP*-R/ToyCB5' entsteht kein PCR-Produkt. Das Schema wurde mit Snapgene erstellt.

Durch die verwendeten Primerpaare *attP*-F/ToyCB5' bzw. *attP*-R/ToyCB5' (3.1.5) konnte nicht nur die generelle Anwesenheit des Konstruktes, sondern auch die Integration am gewünschten Ort im Genom nachgewiesen werden. Dazu war je Paar ein Primer konstrukt-spezifisch und der zweite Primer genomisch angeordnet. Es wurden verschiedene Kombinationen der Primer verwendet, um die Orientierung des integrierten Konstruktes im Genom zu testen. Aufgrund einer umgekehrten Orientierung der *attB*-Rekombinationssequenz im pUAST-R β -HA-CYFP-*attB*, wurde das Konstrukt anders herum in das Genom integriert, als es

ausgehend von der zur Verfügung gestellten Vektor-Sequenz (Gohl et al., 2010) zu erwarten war. Die Orientierung hat jedoch keinen negativen Einfluss auf die Expression des BiFC-Konstruktes, die Bildung eines funktionellen ToyCYFP wurde überprüft, indem das Konstrukt mit Hilfe des UAS/Gal4-Systems (3.2.28) und des *decapentaplegic*-Gal4 (*dppGal4*) Treibers in den Bein-Imaginalscheiben fehlexprimiert wurde. Die Entstehung ektopischer Augen an den Beinen der F1-Generation wies die Funktionalität des entstehenden ToyCYFP Fusionsproteins nach. Mit der Erzeugung des Fliegenstammes UAS_{toy}CYFP war die Voraussetzung geschaffen, um eine BiFC-Analyse durchführen zu können und die Interaktion zwischen Hipk und Toy *in vivo* zu testen. Die weiterhin benötigten Fliegenstämme UAS_{gro}CYFP, UAS_{hipk}NYFP und UASNYFP_{hipk} waren bereits innerhalb der Arbeitsgruppe vorhanden und wurden im Vorfeld bereits erfolgreich zum Nachweis einer *in vivo* Interaktion der Hipk mit ihrem Substrat Nito verwendet (Dewald et al., 2014).

4.1.2 BiFC-Nachweis der *in vivo* Interaktion von Hipk und Toy

Der eigentlichen BiFC-Analyse gehen zwei aufeinander folgende Kreuzungen nach dem Prinzip des UAS/Gal4-Systems voraus (3.2.28). Dabei müssen die Fliegen so verkreuzt werden, dass die drei Konstrukte (ein Gal4-Treiber-Konstrukt und zwei UAS-BiFC-Konstrukte mit den beiden zu testenden Faktoren) nach der zweiten Kreuzung in der F2-Generation zusammen kommen (detailliertes Kreuzungsschema siehe 3.2.30, Abb. 3.7). Die BiFC-Analyse wurde zunächst augengewebespezifisch durchgeführt, anhand der gezielten Expression der BiFC-Konstrukte unter Kontrolle des augenspezifischen Treiberstammes *eyeless*-Gal4 (*eyGal4*) (3.2.28). In diesem Gewebe konnte mit der Methode der BiFC keine *in vivo* Interaktion von Hipk und Toy nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Dies könnte daran liegen, dass im Augengewebe der endogene Kontext interferiert und so die Interaktion der gezielt fehlexprimierten UAS-BiFC-Konstrukte kompetitiv gehemmt wird, weil die einzelnen Faktoren mit endogenen Proteinen interagieren. Ein weiterer Ansatz unter Kontrolle des Treiberstammes *engrailed*-Gal4 (*enGal4*) führte zu einer Expression des ToyCYFP-Konstruktes jeweils im posterioren Kompartiment der Imaginalscheiben bzw. embryonal ubiquitär in jeder posterioren Segmenthälfte. Die Fehlexpression mit diesem Treiber führte zu Letalität im ersten Larvenstadium (L1), so dass eine Auswertung nicht möglich war (nicht gezeigt).

In einem dritten Ansatz erfolgte die gezielte Fehlexpression der UAS-BiFC-Konstrukte unter Kontrolle des *MS1096*Gal4-Treiberstammes im Flügelgewebe des dritten Larvalstadiums (L3).

Durch die Koexpression der UAS-BiFC-Konstrukte im selben Gewebe waren die beiden zu testenden Proteine in räumlicher Nähe zueinander und hatten die Möglichkeit, miteinander zu interagieren. Findet Interaktion statt, komplementieren die beiden an die zu untersuchenden Faktoren angehängten Fragmente des *Yellow Fluorescent Protein* (YFP) zu einem funktionellen Fluoreszenzprotein und können nachgewiesen werden (Abb. 4.3, A). Das Expressionsmuster des Treiberstammes wurde zur Veranschaulichung visualisiert durch die gezielte Expression des Reportergens *UAS-Enhanced Green Fluorescent Protein* (UAS-EGFP) (Abb. 4.3, B). Die L3-Flügelimaginalscheiben der F2-Generation wurden präpariert, anschließend fixiert und einer indirekten *Anti-Green Fluorescent Protein* (GFP)-Antikörperfärbung unterzogen, um das Signal von rekonstituiertem YFP zu verstärken (3.2.31). Die Flügelscheiben wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet und anschließend konfokalmikroskopisch dokumentiert (Abb. 4.3) (3.2.33, 3.2.34).

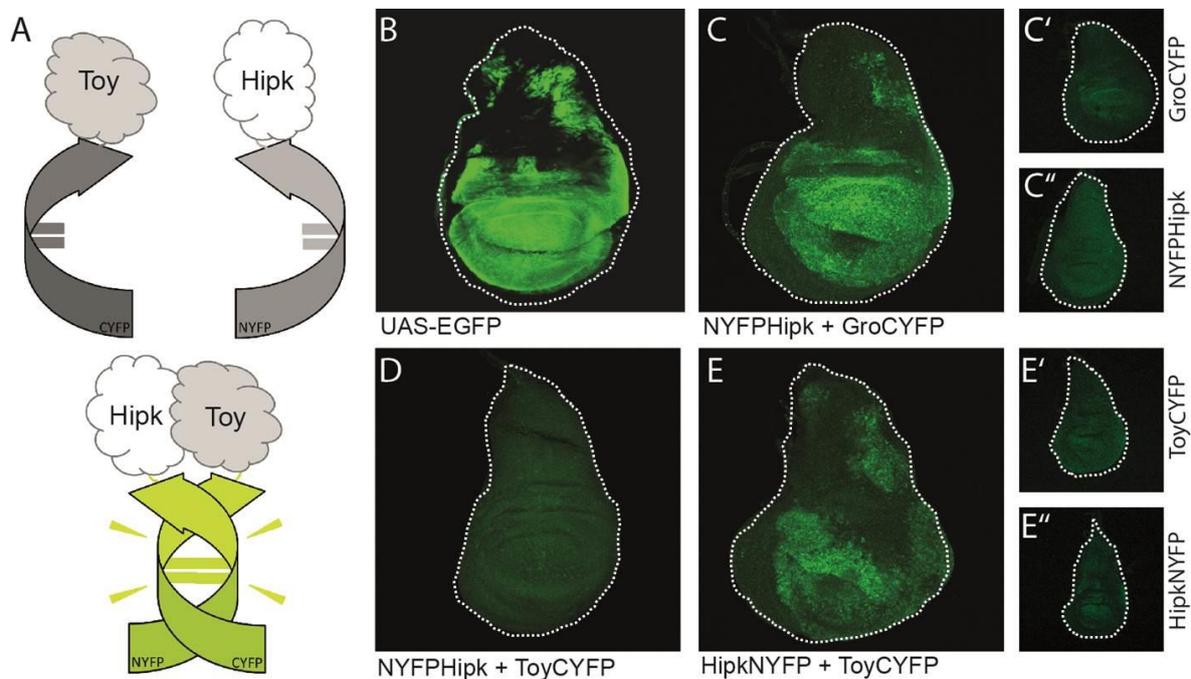


Abb. 4.3: *In vivo* Nachweis der Protein-Protein-Interaktion zwischen Hipk und Toy. Konfokalmikroskopische Aufnahmen von Flügelscheiben des dritten Larvalstadiums von *Drosophila*. Anterior ist links. Alle Flügelscheiben wurden mit Anti-GFP+AlexaFluor[®]488-Antikörper gefärbt. (A) Schematische Darstellung der Interaktion von Hipk und Toy, die zur Rekonstitution des *Yellow Fluorescent Protein* (YFP) führt. (B) *MS1096Gal4*>UASEGFP; Expression des Reportergens *Enhanced Green Fluorescent Protein* (EGFP) zur Visualisierung des vom Treiberstamm *MS1096Gal4* induzierten Expressionsmusters. (C, D, E) Flügelscheiben, in denen je zwei der zu testenden Fusionsproteine mittels *MS1096Gal4* koexprimiert werden. (C) Positivkontrolle mit dem bereits bekannten Hipk-Interaktionspartner Groucho (Gro). (C', C'', E', E'') Expression der einzelnen UAS-BiFC-Konstrukte (GroCYFP, NYFPHipk, HipkNYFP, ToyCYFP) mittels *MS1096Gal4*-Treiber als technische Kontrolle.

Als Positivkontrolle wurde der bereits etablierte UAS-BiFC-Stamm des bestätigten Hipk-Interaktionspartners/-Substrates Groucho (Gro) verwendet (Abb. 4.3, C; Choi et al., 2005; Lee et al., 2009a). Das resultierende Signal bei Koexpression der beiden Konstrukte

UAS $hipk$ NYFP und UAS toy CYFP weist eine Protein-Protein-Interaktion von Hipk und Toy *in vivo* nach (Abb. 4.3, E). Die Interaktion findet nur in der Orientierung des HipkNYFP (N-terminales YFP-Fragment hängt C-terminal an Hipk) statt. Möglicherweise führen im Fall der umgekehrten Orientierung von NYFPHipk (N-terminales YFP-Fragment hängt N-terminal an Hipk) sterische Gründe dazu, dass keine Interaktion stattfinden kann (Abb. 4.3, D). Um falsch positive Signale durch Detektion einzelner YFP-Fragmente auszuschließen, wurden als technische Kontrolle außerdem Flügelscheiben von L3-Larven nach den ersten BiFC-Kreuzungen präpariert und gleichermaßen der Antikörperfärbung mit Anti-GFP unterzogen. Da diese kein Signal zeigten (Abb. 4.3, C', C'', E', E''), konnte davon ausgegangen werden, dass das Fluoreszenzsignal, das die Interaktion von HipkNYFP und ToyCYFP (Abb. 4.3, E) nachweist, spezifisch für diese Interaktion ist.

Im Rahmen einer parallel zu der vorliegenden Arbeit betreuten Bachelorarbeit konnte analog das Transformationskonstrukt pUAST ey -HA-CYFP-*attB* sowie ein entsprechender transgener Fliegenstamm, UAS ey CYFP, erzeugt werden, um die Interaktion von Hipk und Ey mittels BiFC-Analyse zu untersuchen (Heyer, 2017). Weil die Anzahl der untersuchten Larven während der vorangegangenen Analyse noch nicht repräsentativ war, wurden die Kreuzungen und Präparationen mit einer größeren Anzahl an Larven wiederholt (Abb. 4.4).

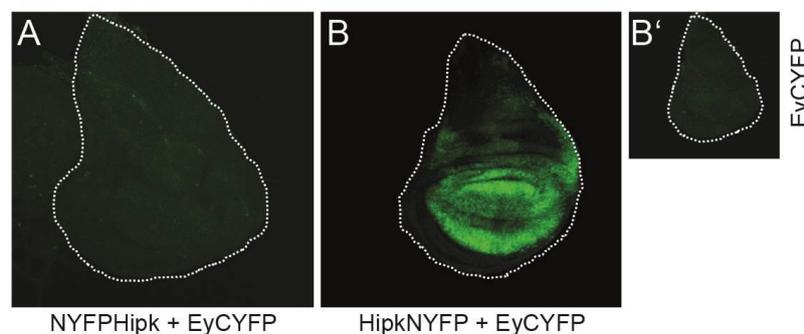


Abb. 4.4: *In vivo* Nachweis der Protein-Protein-Interaktion zwischen Hipk und Ey. Konfokalmikroskopische Aufnahmen von Flügelscheiben des dritten Larvalstadiums von *Drosophila*. Anterior ist links. Alle Flügelscheiben wurden mit Anti-GFP+AlexaFluor[®]488-Antikörper gefärbt. (A, B) Flügelscheiben, in denen je zwei der zu testenden Fusionsproteine mittels *MS1096*Gal4-Treiber koexprimiert werden. (B') Expression des einzelnen BiFC-Konstruktes EyCYFP mittels *MS1096*Gal4 als technische Kontrolle. Kontrollen entsprechen denen in Abb. 4.3.

Die Koexpression der BiFC-Konstrukte UASNYFP $hipk$ mit UAS ey CYFP bringt kein Signal hervor, während die gemeinsame Expression von UAS $hipk$ NYFP und UAS ey CYFP zur Rekonstitution des YFP führt und somit die Interaktion von Hipk und Ey *in vivo* nachweist (Abb. 4.4, B). Ähnlich wie bei der BiFC-Analyse von Hipk und Toy, führt auch hier nur eine Orientierung des Hipk-BiFC-Konstruktes zur Interaktion mit EyCYFP. Die Kontrollen wurden analog zu denen der BiFC-Analyse von Toy durchgeführt und um die Expression des einzelnen BiFC-Konstruktes EyCYFP erweitert (Abb. 4.4, B').

Mit Hilfe der Komplementationsanalyse konnte somit nachgewiesen werden, dass sowohl die Interaktion von Hipk und Toy als auch die Interaktion von Hipk und Ey *in vivo* prinzipiell stattfinden kann. In einem nächsten Schritt sollte nun geklärt werden, ob der Phosphorylierungsstatus an den beiden durch Peptidfilteranalyse identifizierten Hipk-Phosphorylierungsstellen (Ser⁴²⁴ und Thr⁴²⁸) *in vivo* eine funktionelle Relevanz zeigt.

4.2 Analyse phosphorylierungsmutanter UAS_{toy}-Stämme I

Zur näheren Charakterisierung der Auswirkungen eines veränderten Phosphorylierungsstatus von Toy, wurden bereits während einer früheren Arbeit entsprechende phosphorylierungsmutante UAS_{toy}-Stämme erzeugt und während erster *in vivo* Fehlexpressionsstudien analysiert. Die Konstrukte pUAS_{toy}SA, -TA und SATA sind als Mutanten mit zerstörter Phosphorylierungsstelle zu betrachten, bei denen respektive entweder das Serin (S)⁴²⁴, das Threonin (T)⁴²⁸ oder beide Aminosäuren gleichzeitig zu Alanin (A) mutiert sind. Entsprechend stellen die Konstrukte pUAS_{toy}SE, -TE und -SETE phosphomimetische Mutationen dar, bei denen die sonst phosphorylierbaren Aminosäuren zu Glutamat (E) mutiert sind. Ein Glutamat besitzt einen negativ geladenen, raumgreifenden Rest, der aufgrund seiner Ladung und seiner sterischen Eigenschaften einem durch Phosphorylierung angehängten Phosphatrest sehr ähnlich ist und somit eine konstitutive Phosphorylierung simuliert. Eine erste phänotypische Auswertung einer geringen Anzahl von Individuen, in denen die phosphorylierungsmutanten Formen von Toy exprimiert wurden, stellte eine funktionelle Relevanz der Phosphorylierungsstellen Ser⁴²⁴ und Thr⁴²⁸ fest (Laupsien, 2007).

Diese zuvor analysierten phosphorylierungsmutanten UAS_{toy}-Stämme sind jedoch aufgrund der ungerichteten P-Element Insertion, mit der sie erzeugt wurden, unter Umständen durch Positionseffekte beeinträchtigt. Da in *Drosophila* mittlerweile durch Anwendung der neueren Methode der PhiC31-Integration eine zielgerichtete Integration möglich ist, wurden in der vorliegenden Arbeit die phosphorylierungsmutanten UAS_{toy}-Konstrukte erneut, diesmal zielgerichtet, ins Genom integriert. Durch die Integration der Konstrukte an jeweils der gleichen Position des Fliegen-genoms wird die Problematik des Positionseffektes vernachlässigbar. Eine anschließende Fehlexpressionsstudie mit den auf diese Weise neu erzeugten phosphorylierungsmutanten UAS_{toy}-Stämmen sollte die vergleichende phänotypische Auswertung präziser darstellen.

4.2.1 Erzeugung transgener UAS_{toy}-Stämme mittels PhiC31-Integration

Die bereits in der Arbeitsgruppe als Plasmid-DNA vorliegenden pUAST-Konstrukte pUAST_{toySA}, -TA und -SATA sowie -SE -TE, -SETE (Laupsien, 2007) dienten als Ausgangsmaterial. Um neue Transformationskonstrukte zur Herstellung entsprechender UAS_{toy}-Effektorstämme zu erzeugen, wurde das jeweilige *EcoRI*/*toy*cDNA-Fragment aus dem ursprünglichen pUAST-Konstrukt in den neuen Transformationsvektor pUAST_{attB} (3.1.6) umkloniert. Damit außerdem ein entsprechend integriertes wildtypisches UAS_{toy}-Konstrukt zur Verfügung steht, wurde unter Verwendung der Primer *toy*5' und *toy*3' (3.1.5) die komplette kodierende Sequenz von *toy* (von Transkriptionsstart bis -stop) mittels *Polymerase Chain Reaction* (PCR) amplifiziert und in den TOPO-pCR2.1 Vektor zwischenkloniert (3.1.6, 3.2.8, 3.2.15). Template für die PCR war der *toy*cDNA-Klon GH14454 (3.1.4). Anschließend konnte das wildtypische Fragment gleichermaßen restringiert und in den Transformationsvektor pUAST_{attB} umkloniert werden.

Der Vektor pUAST_{attB} unterscheidet sich vom Vektor pUAST durch die Anwesenheit einer *attB*-Sequenz, die im Folgenden eine gerichtete genomische Integration nach dem Prinzip der PhiC31-Integration ermöglicht (3.2.26). Nach der (Um-)Klonierung wurde eine *XhoI*-Restriktion durchgeführt, um auf gewünschte Orientierung zu selektieren (3.2.2) und jedes Konstrukt wurde mittels Sequenzierung überprüft (3.2.17). Zur Herstellung der transgenen Fliegen wurde das jeweilige DNA-Konstrukt in frühe Embryonen des Fliegenstammes BL24871 (mit entsprechender *attP*-Zielsequenz auf dem 3. Chr.) injiziert (3.2.27, Tab. 4.1).

Tab. 4.1: Injektion der mutierten UAS_{toy}-Transformationskonstrukte in BL24871-Embryonen. Aufgelistet sind die Anzahl der injizierten Embryonen sowie der daraus hervorgegangenen Larven und Fliegen. Die Transformationseffizienz ergibt sich aus der Anzahl der erhaltenen Transformanten bezüglich der adulten Fliegen.

Konstrukt	pUAST _{attB} -						
	<i>toy</i> WT	<i>toy</i> SA	<i>toy</i> TA	<i>toy</i> SATA	<i>toy</i> SE	<i>toy</i> TE	<i>toy</i> SETE
Embryonen	711	744	515	549	187	736	518
Larven	55	61	75	93	23	91	85
% Larven	7,6 %	8,2 %	14,6 %	16,8 %	12,3 %	12,4 %	16,3 %
Fliegen	34	34	48	72	19	51	70
% Fliegen	7,6 %	4,6 %	9,2 %	13,0 %	10,2 %	6,8 %	13,4 %
Unabhängige Transformanten	9	3	7	10	6	2	2
Transformationseffizienz bzgl. Fliegen	26,5 %	8,7 %	14,6 %	13,9 %	31,6 %	3,8 %	2,9 %

Die Balancierung erfolgte durch Kreuzung der transformanten Fliegen mit solchen, die ein drittmorphosomales Balancerchromosom besitzen (3.2.27.6). Die Kontrolle der erzeugten transgenen Fliegenstämme erfolgte molekular mit Hilfe einer PCR-Reaktion und den Primern *toyCB5'* und *attP-R* (3.1.5) auf genomische DNA des entsprechenden Fliegenstammes (3.2.14, 3.2.15, Abb. 4.5). Durch diese PCR-Kontrolle wird sowohl die generelle Anwesenheit des Konstruktes im Genom überprüft als auch die Integration des Konstruktes am gewünschten Ort nachgewiesen, denn der *ToyCB5'*-Primer bindet konstruktintern und der *attP-R*-Primer bindet auf der genomischen DNA des zur Injektion verwendeten Stammes BL24871, genauer auf der *attP*-Zielsequenz.

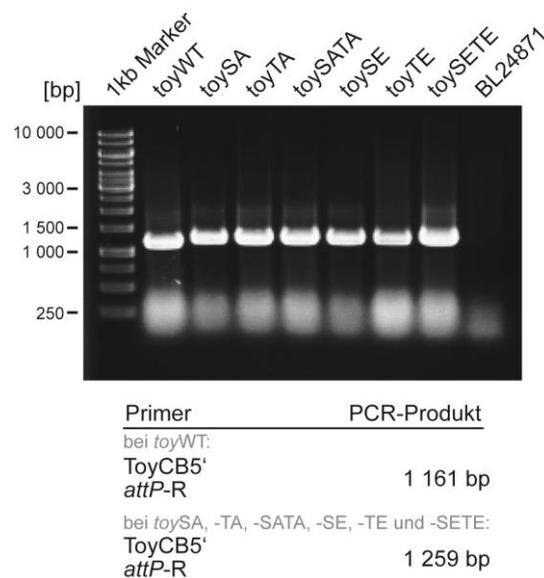


Abb. 4.5: PCR-Nachweis der zielgerichteten genomischen Integration der UAS*toy*-Transformationskonstrukte. Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte. Die PCR erfolgte mit genomischer DNA der erzeugten transgenen UAS*toy*-Stämme und den Primern *ToyCB5'* und *attP-R*. Das zu erwartende PCR-Produkt hat jeweils eine Länge von 1 161 bp (*toyWT*) bzw. 1 259 bp (*toySA*, *-TA*, *-SATA*, *-SE*, *-TE* und *-SETE*). Als (Negativ-) Kontrolle diente DNA des BL24871-Injektionsstammes mit (leerer) *attP*-Rekombinationssequenz, hier war kein PCR-Produkt zu erwarten.

Alle Konstrukte konnten erfolgreich an der gewünschten Stelle (3. Chr., 65B2) im Genom des Stammes BL24871 integriert werden. Das PCR-Produkt im molekularen Nachweis von *toyWT* ist um 98 bp kleiner aufgrund verschiedener Herkunft des klonierten *EcoRI*-Fragmentes. Dieses Fragment der *toycDNA* (GH14454) enthält keine Sequenzbereiche der 3'-Untranslatierten Region (3'-UTR). Die übrigen Konstrukte wurden aus der *toycDNA* (Klon44/2, Czerny et al., 1999) amplifiziert und enthalten einen Teil der 3'-UTR-Sequenzen (Laupsien, 2007).

4.2.2 Fehlexpressionsanalyse phosphorylierungsmutanter UAS toy -Stämme I

Um die Funktionalität der resultierenden phosphorylierungsmutanten Toy Protein-Varianten miteinander vergleichen zu können, sollte zur Fehlexpression ein dafür geeignetes Gewebe genutzt werden, sodass etwaige Unterschiede eindeutig ausgewertet und dokumentiert werden können. Zunächst wurden die verschiedenen Konstrukte anhand des UAS/Gal4-Systems augenspezifisch mit dem *eyeless*-Gal4 (*eyGal4*) Treiberstamm überexprimiert (3.2.28). Der Vergleich der resultierenden adulten Fliegen bzw. ihrer Komplexaugen ergab keinen signifikanten Unterschied bzgl. der Größe, der Form oder sonstiger phänotypischer Merkmale (nicht gezeigt). Eine leichte Reduktion der Augengröße war in allen Kreuzungen gleichermaßen zu beobachten. Eventuell können die überexprimierten mutierten Toy-Varianten im endogenen Kontext der Augenentwicklung keinen unterscheidbaren Effekt hervorrufen, weil dieser durch endogenes Toy bzw. durch andere Faktoren kompensiert wird.

Eine exogene Expression von wildtypischem *toy* führt in Bein- und Flügel-Imaginalscheiben (in denen *toy* nicht endogen exprimiert wird) zur Ausbildung sogenannter ektopischer Augen (Czerny et al., 1999; Salzer & Kumar, 2010). Basierend auf der Annahme, eine phosphorylierungsmutante Form von Toy zeigt eine veränderte Effizienz ektopische Augen zu erzeugen, wurden die phosphorylierungsmutanten UAS toy -Konstrukte nun mithilfe des *decapentaplegic*-Gal4 (*dppGal4*) Treiberstammes (Stahling-Hampton & Hoffmann, 1994) fehlexprimiert (3.2.28). Hieraus folgt die exogene Expression im Muster der regulatorischen Region von *dpp* und somit in allen Imaginalscheiben entlang ihrer antero-posterioren (A/P) - Achse. Die Größe der resultierenden ektopischen Augen an den Beinen wurde vermessen und miteinander verglichen (3.2.25, 3.2.29). Das Ergebnis der Messungen und repräsentative Fliegen mit ektopischen Augen an den Beinen sind in Abb. 4.6 gezeigt.

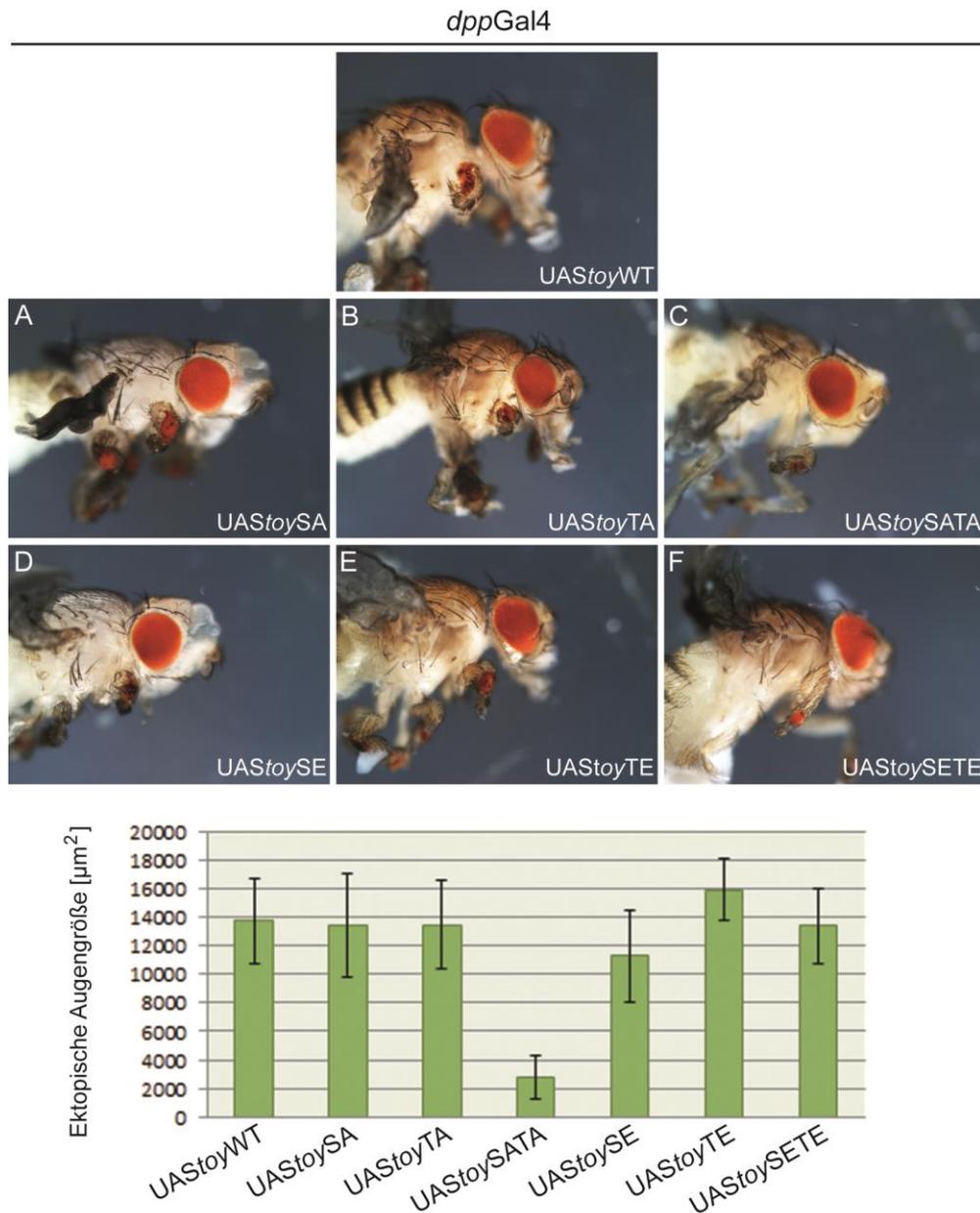


Abb. 4.6: Ektopische Augengrößen nach gezielter Fehlexpression der phosphorylierungsmutanten UAS*toy*-Konstrukte mittels UAS/Gal4-System. Oben: Fliegen der F1-Generation nach einer Kreuzung gemäß UAS/Gal4-System mit dem Treiberstamm *decapentaplegic-Gal4* (*dppGal4*) und den Effektor Stämmen UAS*toy*WT, *-toySA*, *-toyTA*, *-toySATA*, *-toySE*, *-toyTE* und *-toySETE*. **Unten:** Gemittelte Werte der ektopischen Augengröße nach Vermessung der Augenfläche am jeweils rechten Vordebein von Fliegen der F1-Generation; n=20.

Nach der gezielten ektopischen Fehlexpression mit Hilfe des *dppGal4*-Treibers wird deutlich, dass die phosphorylierungsmutanten Varianten von Toy eine unterschiedliche Tendenz aufweisen ektopische Augen zu erzeugen. Während sich bei den Einzelmутanten *toySA* (-1,5 %), *toyTA* (-1,6 %), *toySE* (-18 %) und *toyTE* (+17 %) (Abb. 4.6; A, B, D, und E) sowie bei der Doppelmutante mit phosphomimetischer Mutation *toySETE* (-2,2 %) (Abb. 4.6; F) nur geringe Veränderungen im Vergleich zur Fehlexpression der wildtypischen Form *toyWT* ergeben, wirkt sich die Zerstörung beider Phosphorylierungsstellen in der Doppelmutante (*toySATA*; Abb. 4.6,

C) deutlich auf die Fähigkeit aus, ektopische Augen hervorzubringen. Die Größe der durch die Fehlexpression von *UAS_{toy}SATA* hervorgerufenen ektopischen Augen im Vergleich zu denen von *UAS_{toy}WT* ist um 80 % reduziert (13.700 μm^2 / 2.800 μm^2). Außerdem ist hier eine (fast) normale Entwicklung der Beinstruktur zu beobachten, welche bei den anderen Phosphorylierungsmutanten massiv gestört ist. Ähnlich fällt bei der phosphomimetischen Doppelmutante (*toySETE*; Abb. 4.6, F) auf, dass zwar die Größe des ektopischen Auges nicht signifikant von der wildtypischen Variante abweicht, aber die Beinentwicklung weniger beeinträchtigt zu sein scheint.

Eine weitere Analyse fand im Gewebe der Flügel-Imaginalscheiben statt. Die Durchführung in einem weiteren Gewebe ermöglicht eine differenzierte Beurteilung der Konsequenzen, welche sich aus der Mutation der Phosphorylierungsstellen ergeben, da jedes Gewebe einen individuellen Kontext bietet. Mit Hilfe des UAS/Gal4-Systems und des flügel-spezifischen *MS1096Gal4*-Treiberstammes (Capdevila & Guerrero, 1994) wurden die phosphorylierungsmutanten *UAS_{toy}*-Konstrukte im dorsalen und ventralen *wing pouch* (spätere Flügelfläche), sowie im *hinge* (späterer dorsaler Flügelansatz) der Flügel-Imaginalscheibe fehlexprimiert (3.2.28). Die adulten Flügel der resultierenden Fliegen aus der F1-Generation wurden präpariert und lichtmikroskopisch ausgewertet, wie in Abb. 4.7 gezeigt.

MS1096Gal4

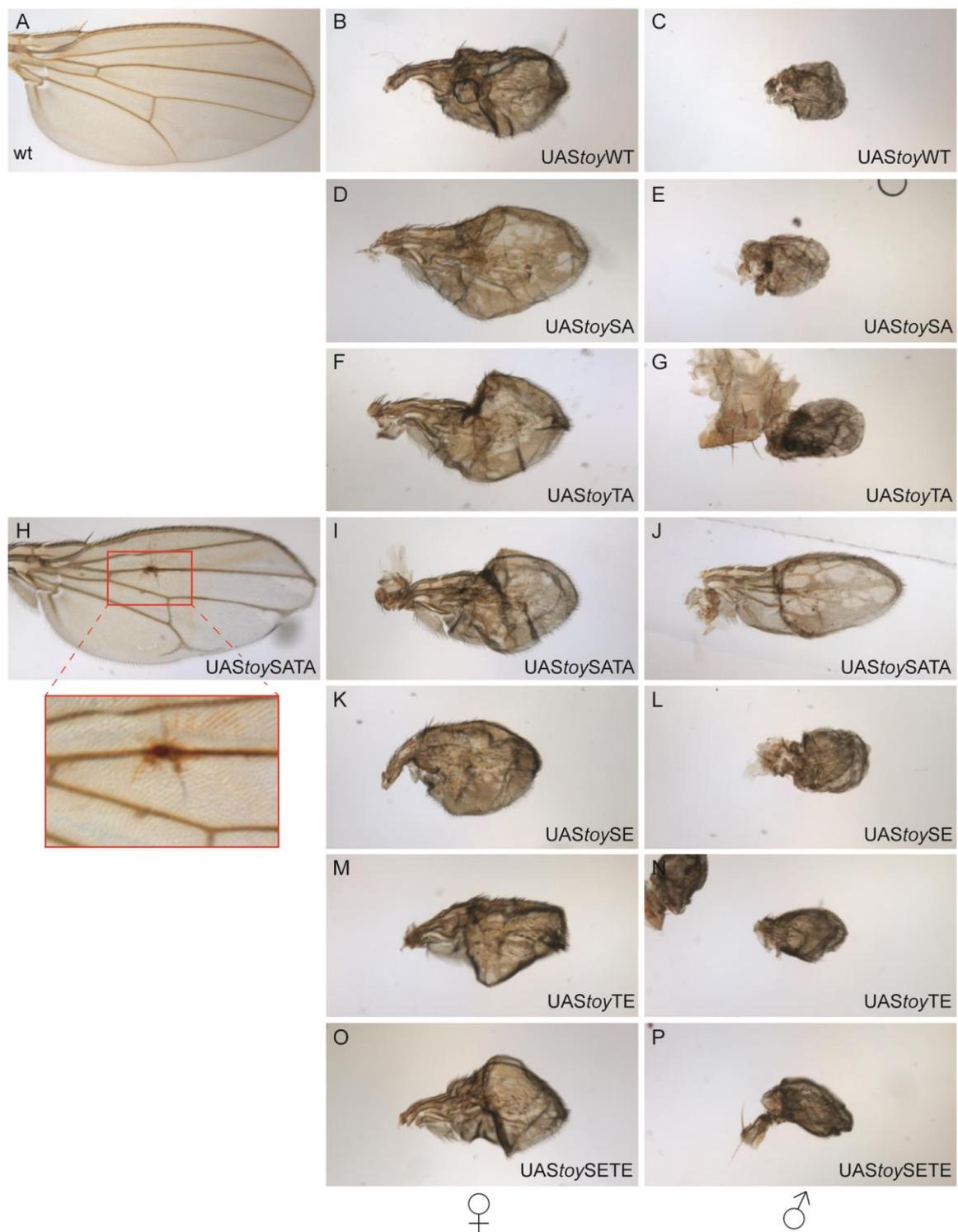


Abb. 4.7: Vergleich der resultierenden Flügelphänotypen nach gezielter Fehlexpression der phosphorylierungsmutanten UAS*toy*-Konstrukte. Flügel von adulten Fliegen der F1-Generation nach einer Kreuzung gemäß UAS/Gal4-System mit dem Treiberstamm MS1096Gal4 und den Effektorstämmen UAS*toy*WT, -*toy*SA, -*toy*TA, -*toy*SATA, -*toy*SE, -*toy*TE und -*toy*SETE (♀ weibliche Tiere, ♂ männliche Tiere). Aufgenommen bei konstanter Vergrößerung. Roter Kasten: Vergrößerte Darstellung des ektopischen retinalen Gewebes aus H. Proximal ist links.

Auch bei der gezielten Fehlexpression der verschiedenen *UAS_{toy}*-Konstrukte in den Flügel-Imaginalscheiben ergeben sich daraus phänotypische Unterschiede in der F1-Generation. Die Fehlexpression aller *UAS_{toy}*-Konstrukte führt zu einer Interferenz mit der Flügelentwicklung, phänotypisch erkennbar an nicht vollständig entwickelten/entfalteten Flügeln im Vergleich zum wildtypischen Flügel (Abb. 4.7, A). Weiterhin ist die Ausbildung der Flügelvenen gestört und generell prägt sich der resultierende Phänotyp in männlichen Nachkommen stärker aus als in weiblichen.

Nach Fehlexpression der Einzelmutanten (*UAS_{toySA}*, *-toyTA*, *-toySE* und *-toyTE*; Abb. 4.7, D-G und K-N) und der phosphomimetischen Doppelmutante (*UAS_{toySETE}*; Abb. 4.7, O, P) ist keine signifikante Veränderung der phänotypischen Ausprägung im Vergleich zur Expression der wildtypischen Form (*UAS_{toyWT}*; Abb. 4.7, B, C) zu erkennen. Die Fehlexpression der Doppelmutante (*UAS_{toySATA}*; Abb. 4.7, H-J) führt zu deutlich weniger Interferenz mit der Flügelentwicklung. Hier ist bei den weiblichen Tieren eine Streuung des Phänotypes zu beobachten von einer überwiegend normalen Entwicklung der Flügel (Abb. 4.7, H) bis hin zu vergleichbar massiv gestörter Flügelentwicklung wie bei den anderen Phosphorylierungsmutanten (Abb. 4.7, I). In Abb. 4.7, H ist außerdem zu erkennen, dass sich auf der zweiten Flügelvene ein Areal mit retinalem, rot pigmentiertem Gewebe gebildet hat (siehe auch vergrößerter Ausschnitt, rote Box). Betrachtet man die Flügel der männlichen Tiere, zeigt sich ein einheitlicher Phänotyp, der jedoch weniger stark ausgeprägt ist, als bei den anderen Phosphorylierungsmutanten (Abb. 4.7, J).

Anhand der analysierten Phänotypen kann auf eine funktionelle Relevanz der gefundenen Phosphorylierungsstellen in Toy geschlossen werden. Das phosphorylierungsmutante Protein *ToySATA* scheint in seiner Funktion, verglichen zu *ToyWT*, am stärksten verändert. Die Zerstörung der beiden Phosphorylierungsstellen von Toy verringert die Fähigkeit, ektopische Augen an den Beinen zu erzeugen. Im Gegensatz hierzu ist aber ektopisches Augengewebe an den Flügeln bei *ToySATA* zu beobachten. Da der störende Einfluss der exogenen Toy-Expression in den anderen Fällen ein stark deformiertes/unterentwickeltes Flügelgewebe hervorbringt, ist es denkbar, dass das retinale Gewebe ausschließlich hier zu beobachten ist, wo die Interferenz aufgrund der abgemilderten Toy Funktion die Flügelentwicklung geringfügiger stört und so überhaupt die Grundlage gegeben ist, dass sich ektopisches Augengewebe bildet.

Nachdem die funktionelle Relevanz der Hipk-Phosphorylierung im C-terminalen Bereich von Toy gezeigt werden konnte, war nun von Interesse eine umfassende Kartierung potentieller weiterer Hipk-Phosphorylierungsstellen im Gesamtlängenprotein Toy durchzuführen.

4.3 Biochemische Analyse des Hipk-Substrates Twin of eyeless (Toy)

In vorangegangenen Arbeiten konnte Toy prinzipiell als Substrat der Hipk *in vitro* nachgewiesen (Steinmetz, 2006) und mit Hilfe von Peptidfilteranalysen zwei *in vitro* Hipk-Phosphorylierungsstellen in Toy (Ser⁴²⁴ und Thr⁴²⁸) bestimmt werden (Laupsien, 2007).

Weiterhin konnten im Vorfeld dieser Arbeit mit Hilfe von *in vitro* Kinaseassays bereits solide Phosphorylierungs-Kartierungen von anderen Hipk-Substraten durchgeführt werden, bis hin zu den einzelnen Aminosäuren, die von Hipk phosphoryliert werden: Groucho (Gro) (Steinmetz, 2006; Lee et al., 2009a) und Spentito (Nito) (Dewald et al., 2014). Für einen solchen Assay werden rekombinante Proteine (oder Proteinfragmente) des zu testenden Substrates erzeugt und diese anschließend *in vitro* mit ebenfalls aufgereinigter rekombinanter Kinase inkubiert. Anschließend erfolgen durch Verkürzung der Proteinfragmente eine progressive Eingrenzung potentieller Aminosäuren, die als Phosphorylierungsstellen in Betracht kommen und schließlich eine Mutationsanalyse der eingegrenzten Aminosäuren, um sie als Phosphorylierungsstelle zu verifizieren.

Ziel war es, eine vollständige Analyse der Hipk-Phosphorylierungsstellen im Gesamtlängenprotein Toy durchzuführen und somit ggf. weitere Hipk-Phosphorylierungsstellen zu identifizieren. Zur Einschätzung potentieller Phosphorylierungsstellen wurde dabei berücksichtigt, dass die Hipk eine Prolin-geführte Ser/Thr-Kinase ist, deren Phosphorylierungsstellen meist innerhalb eines Clusters aus zwei bis drei Serin oder Threonin-Resten zu finden sind, die benachbart zu einem Prolin liegen: S/X-R-S-P-S/X-P/R (Dewald et al., 2014).

4.3.1 Grobkartierung von Toy

Innerhalb der Aminosäuresequenz von Toy befanden sich 14 potentielle Hipk-Phosphorylierungscluster, die mit Hilfe des Hipk-Konsensus definiert wurden. Welche davon tatsächlich von der Proteinkinase Hipk phosphoryliert werden, sollte im Folgenden durch *in vitro* Kinaseassays und ein progressives Eingrenzen getestet werden. Anhand der Lage konservierter Proteindomänen bzw. der Verteilung der potentiellen Phosphorylierungscluster bot sich eine erste Grobeinteilung des Gesamtlängenproteins Toy in drei Fragmente an: ToyN (N-Terminus; Aminosäuren (AS) 1-200), ToyHD (Homeodomäne; AS 196-357) und ToyC (C-Terminus; AS 351-543). Bei der Einteilung von Toy in drei etwa gleich große Fragmente wurde

außerdem darauf geachtet, dass weder potentielle Hipk-Phosphorylierungs-Cluster, noch allgemein konservierte Bereiche wie die Paired-Domäne (PD) oder die Homeodomäne (HD) unterbrochen werden. Die Fragmente wurden leicht überlappend gewählt, um wichtige Positionen/Aminosäuren nicht auszuschließen (Abb. 4.8).

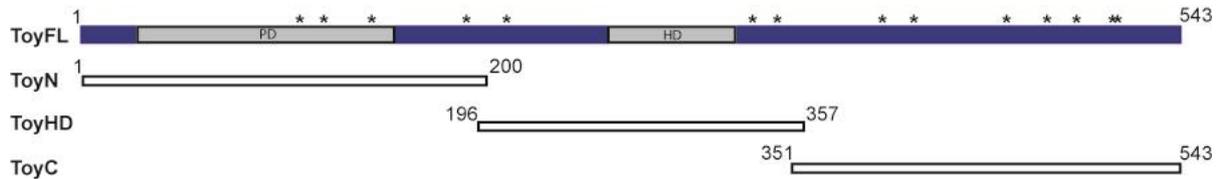


Abb. 4.8: Grobeinteilung von Toy in ToyN, -HD und -C. Einteilung des Gesamtlängenproteins in die drei Fragmente ToyN (Aminosäuren (AS) 1-200), -HD (AS 196-357) und -C (AS 351-543). Die Lage der potentiellen Hipk-Phosphorylierungs-Cluster in Toy ist durch * markiert. PD-Paired Domäne, HD-Homeodomäne, Nummern geben die Position randständiger Aminosäuren an.

Zur Durchführung des *in vitro* Kinaseassays mussten GST-Fusionsproteine der drei Fragmente erzeugt und aufgereinigt werden. Entsprechende pGEX4T-1-Expressionsplasmide für die Teilfragmente ToyN und ToyHD standen bereits in der Arbeitsgruppe zur Verfügung. Das cDNA-Fragment zur Herstellung von ToyC wurde mit Hilfe der Primer ToyCA5' B und ToyCB3' B mit Hilfe einer PCR aus dem *toyc*DNA-Klon GH14454 amplifiziert (3.1.4, 3.1.5). Die Primer wurden dabei mit 3'-ATAT- bzw. 5'-TATA-Überhang kreiert, gefolgt von je einer Erkennungssequenz für ein Restriktionsenzym. Durch den Überhang war es möglich, das Amplifikat unmittelbar zu restringieren und direkt gerichtet und im gewünschten Leseraster in den gleichermaßen geschnittenen Expressionsvektor pGEX4T-1 zu ligieren. Durch Kontrollrestriktion wurden positive Klone selektiert und zusätzlich mittels Sequenzierung überprüft (3.2.2, 3.2.17).

Überprüfte Konstrukte wurden in *E. coli* heterolog exprimiert und die rekombinanten GST-Fusionsproteine im Batchverfahren mittels Affinitätschromatografie aufgereinigt (3.2.18). Anschließend wurden die GST-Fusionsproteine als potentielle Substrate in einem radioaktiven *in vitro* Kinaseassay mit ebenfalls aufgereinigter GST-Hipk (3.2.19) und radioaktiv markiertem ATP als Phosphatquelle für die Phosphorylierungsreaktion eingesetzt (3.2.22).

Die Auswertung erfolgte durch die Auftrennung der nach der Inkubation potentiell radioaktiv markierten GST-Fusionsproteine in einer diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) (3.2.20) und das Auflegen eines Röntgenfilms (Autoradiogramm) zur Detektion der radioaktiv markierten Proteinbanden (Abb. 4.9).

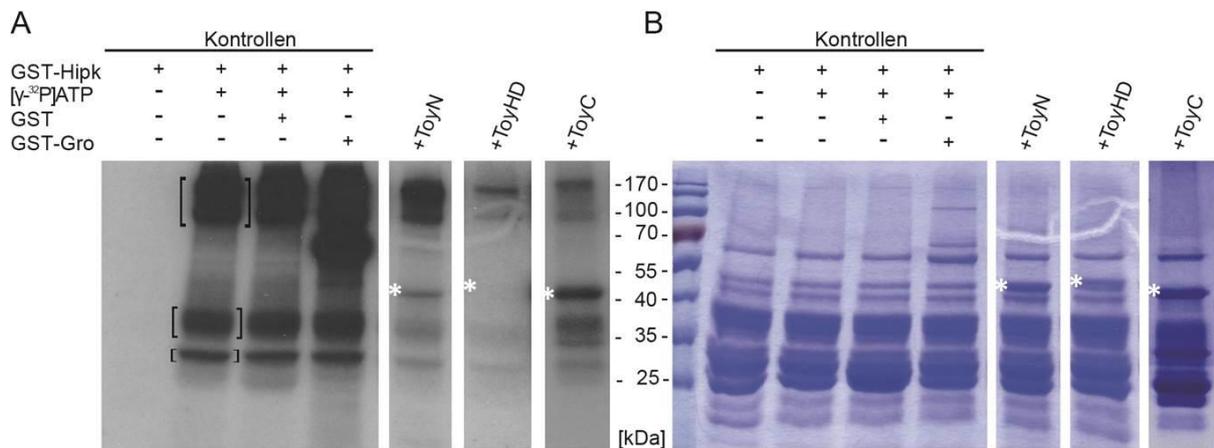


Abb. 4.9: Kinaseassay der Fragmente ToyN, ToyHD und ToyC. (A) Autoradiogramm zum *in vitro* Kinaseassay der potentiellen Hipk-Substrate ToyN [\sim 48 kDa], ToyHD [\sim 44 kDa, etwas höhere Laufhöhe] sowie ToyC [\sim 47 kDa]. Kontrollen: GST-Hipk ohne Phosphatquelle (Negativkontrolle); GST-Hipk und [γ - 32 P]ATP (Signal zeigt die Autophosphorylierung der Kinase) (Negativkontrolle) und GST-Hipk mit GST (Negativkontrolle); GST-Hipk, [γ - 32 P]ATP und GST-Groucho (Gro) (Positivkontrolle). (B) 12,5 %ige SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (PAGE) zum *in vitro* Kinaseassay (Originalgel zu A, Coomassie-gefärbt und Vakuum-getrocknet). Die Laufhöhen der zu testenden Substrate sind durch weiße Sterne markiert.

Anhand der SDS-PAGE können die verschiedenen Banden im Autoradiogramm den einzelnen Proteinen zugeordnet und gezielt ausgewertet werden. Im Autoradiogramm ist zu erkennen, dass sowohl der N-terminale Bereich von Toy (ToyN; \sim 48 kDa) als auch der C-terminale Bereich (ToyC; \sim 47 kDa) phosphoryliert werden und somit jeweils mindestens eine Hipk-Phosphorylierungsstelle besitzen (Abb. 4.9, A). Im Bereich der konservierten Homeodomäne (HD) inklusive der flankierenden Regionen (ToyHD; \sim 44 kDa) ist kein Phosphorylierungssignal zu erkennen. Das Laufverhalten von Proteinen mit DNA-bindender Domäne, wie der HD, kann leicht variieren, zu sehen an der Proteinbande von ToyHD, die etwas höher läuft als erwartet.

Damit zeigte sich, dass neben den bisher identifizierten Hipk-Phosphorylierungsstellen im C-terminalen Bereich von Toy auch eine oder mehrere Phosphorylierungsstellen im N-terminalen Bereich von Toy vorhanden sind. Im weiteren Verlauf der biochemischen Analyse sollte nun näher eingegrenzt werden, welche Bereiche innerhalb des N- bzw. des C-terminalen Fragmentes von der Hipk phosphoryliert werden. Um eine einheitliche und umfassende Analyse aller Hipk-Phosphorylierungsstellen in Toy zu erstellen, wurden beide Bereiche in ihrer kompletten Länge analysiert und somit auch der zuvor mittels Peptidfilteranalyse untersuchte Bereich (C-Terminus, AS 351-461) miteinbezogen.

4.3.2 Feinkartierung des N-Terminus

Zunächst wurde das Fusionsprotein ToyN.1 hergestellt, das eine verkürzte Form des bereits analysierten ToyN darstellt. Hierdurch war es möglich, einen einzelnen potentiellen Phosphorylierungscluster separat zu testen (Abb. 4.10). Das entsprechend benötigte *toy* DNA-Fragment wurde mit Hilfe der Primer ToyN.1_5' und ToyN.1_3'_2 amplifiziert (3.1.5). Die Herstellung des pGEX4T-1-Konstruktes sowie die Durchführung des *in vitro* Kinaseassays erfolgte wie bereits oben beschrieben (siehe Abschnitt 4.3.1).

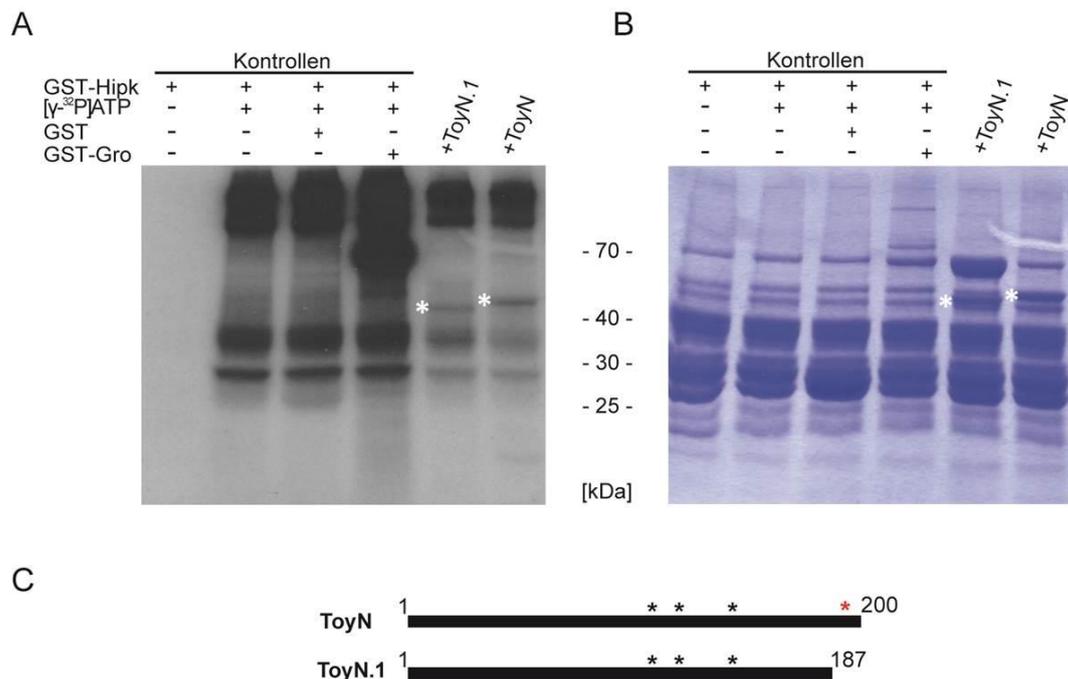


Abb. 4.10: Kinaseassay des N-terminalen Bereiches von Toy. (A) Autoradiogramm nach *in vitro* Kinaseassay des potentiellen Substrates ToyN.1 [\sim 47 kDa] mit GST-Hipk. Kontrollen wurden analog Abb. 4.9 durchgeführt. (B) 12,5 %ige SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (PAGE) des *in vitro* Kinaseassays (Originalgel zu A, Coomassiegefärbt und Vakuum-getrocknet). Die Laufhöhen der zu testenden Substrate sind durch weiße Sterne markiert. (C) Schematische Darstellung des verkürzten Fusionsproteins ToyN.1 im Vergleich zu ToyN. Der potentielle Hipk-Phosphorylierungscluster, der durch die Verkürzung wegfällt, ist mit einem roten Stern markiert. Weiterhin vorhandene potentielle Hipk-Phosphorylierungscluster sind mit schwarzen Sternen markiert.

Das verkürzte Fragment ToyN.1 wird mit gleichbleibender Phosphorylierungsrate im Vergleich zu Fragment ToyN phosphoryliert (siehe Abb. 4.10, A). Das lässt darauf schließen, dass in dem ausgelassenen potentiellen Hipk-Phosphorylierungscluster ($^{188}\text{PSNSTTTHLALP}^{199}$) keine Phosphorylierungsstelle vorliegt. Anhand von ToyN.1 wurde demnach einer der potentiellen Hipk-Phosphorylierungscluster ausgeschlossen.

Alternativ zur Kartierung durch die Erzeugung und Testung immer kleinerer Proteinfragmente können potentielle Phosphorylierungsstellen auch mittels einer Mutationsanalyse getestet werden. Der Vorteil liegt darin, dass eine weitere Verkürzung des Fragmentes ToyN.1 umgangen

werden kann und dass alle Derivate von ToyN.1, bis auf die mutierten Einzel-Aminosäuren, identisch sind und daher adäquat miteinander verglichen werden können. Ziel war es, die benötigten Veränderungen der Aminosäuresequenzen mittels Mutagenese auf cDNA-Ebene einzuführen.

Um die verbleibenden drei potentiellen Hipk-Phosphorylierungscluster innerhalb der Paired Domäne (PD) (vgl. Abb.4.10, C) zu analysieren, sollte von jedem Phosphorylierungscluster zunächst nur die dem Prolin direkt benachbarte Aminosäure (Serin oder Threonin) mutiert werden. Damit waren die Aminosäuren Threonin 106, Serin 121 und Serin 141 im Fokus der Analyse und wurden als die potentiellen Hipk-Phosphorylierungsstellen betrachtet. Dies entspricht der Erfahrung aus vorherigen Hipk-Phosphorylierungsassays und spiegelt den aktuellen Hipk-Konsensus wieder, da in den meisten Hipk-Substraten die dem Prolin direkt benachbarte Aminosäure phosphoryliert wird.

Im Verlauf der Mutationsanalyse sollten neben der Dreifachmutante (ToyPD3M) außerdem Doppelmutanten getestet werden, bei denen jeweils zwei der potentiellen Hipk-Phosphorylierungsstellen mutiert vorliegen (ToyPD2Ma, ToyPD2Mb und ToyPD2Mc). Auf diese Weise konnte jede der möglichen Phosphorylierungsstellen separat getestet werden.

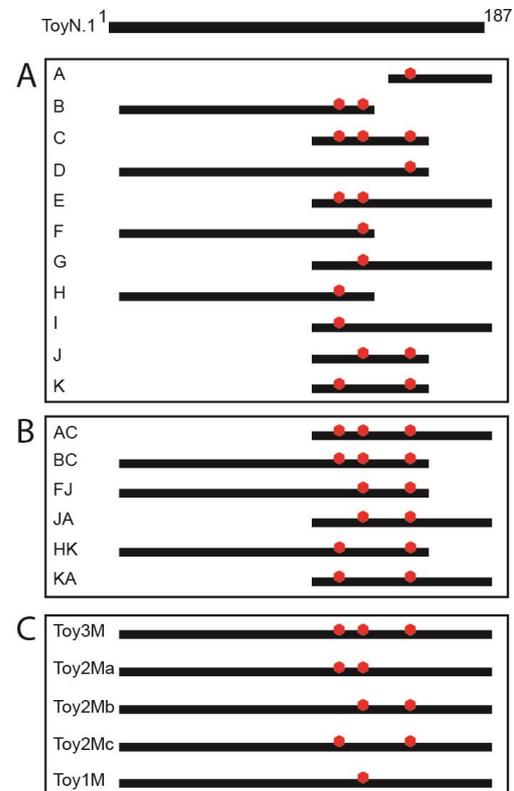
4.3.2.1 Mutationsanalyse des N-Terminus von Toy

Um in einem cDNA Fragment an mehreren Stellen gleichzeitig Mutationen einzuführen, bedarf es der etwas komplexeren *Overlap Extension* (OE) PCR (3.2.15.2). Dazu wurden zunächst mit Hilfe der spezifischen Mutagenese-Primer P1, P2, P3, P3a, P3b, P4, P4a und P4b (3.1.5), welche während der PCR-Reaktion gezielt Basenfehlpaarungen in die Fragmente einführen, die mutierten (Ausgangs-) cDNA-Fragmente A-K hergestellt (Abb. 4.11, A). Diese überlappen sich teilweise.

Anschließend wurden jeweils 2 der Ausgangsfragmente (A-K) zusammen (äquimolar) in einem ersten OE-PCR-Ansatz als Template eingesetzt (Schema siehe 3.2.15.2). Dieser Reaktion wurde erst zeitversetzt, nachdem die zugegebenen Fragmente einige PCR-Zyklen lang die Möglichkeit hatten, sich an den überlappenden Bereichen aneinander anzulagern und aufzufüllen, ein Primerpaar zugegeben, das schließlich zur Amplifikation der gewünschten (Zwischen-) cDNA-Fragmente (AC-KA) führte (Abb. 4.11, B).

Dabei entspricht die Bezeichnung der Zwischen-cDNA-Fragmente den beiden zur Herstellung verwendeten Ausgangs-cDNA-Fragmente (z.B. Zwischen-cDNA-Fragment „AC“ wurde hergestellt durch die Kombination von Ausgangs-cDNA-Fragment „A“ und -Fragment „C“).

Abb. 4.11: Schematischer Überblick aller cDNA-Fragmente der *Overlap Extension* (OE) PCR. (A) Mittels PCR hergestellte mutierte (Ausgangs-) cDNA-Fragmente A-K. Die gewünschten Mutationen (rote Punkte) wurden über spezifische Primer mit Basenfehlpaarungen eingebracht. **(B)** (Zwischen-) cDNA-Fragmente AC-KA nach der ersten OE-PCR-Runde (durchgeführt mit jeweils zwei der Fragmente aus A als Template). **(C)** Finale cDNA-Fragmente Toy3M, Toy2Ma, Toy2Mb, Toy2Mc und Toy1M nach der zweiten OE-PCR-Runde (mit jeweils zwei der Fragmente aus B als Template).



Die finalen cDNA-Fragmente wurden wiederum in einer weiteren OE-PCR-Runde hergestellt, in der jeweils zwei der Zwischenfragmente kombiniert wurden (Abb. 4.11, C).

Durch die Zugabe der Primer ToyN.1_5' und ToyN.1_3'_2 waren die resultierenden finalen cDNA-Fragmente Toy3M, Toy2Ma, Toy2Mb, Toy2Mc und Toy1M (ausgenommen der eingeführten Mutationen) identisch zu dem bereits beschriebenen ToyN.1 (vgl. 4.3.2) und konnten anschließend wie bereits beschrieben in den Expressionsvektor pGEX4T-1 inkloniert werden.

Die Einführung der gewünschten Basenaustausche wurde mittels Sequenzierung überprüft (3.2.17). Die entsprechenden Konstrukte wurden in *E. coli* heterolog exprimiert und als rekombinante GST-Fusionsproteine im Batchverfahren aufgereinigt (3.2.18). Die resultierenden Fusionsproteine GST-ToyPD3M, -ToyPD2Ma, -ToyPD2Mb, -ToyPD2Mc und -ToyPD1M, welche jeweils eine Variante des N-terminalen GST-ToyN.1 darstellen, konnten anschließend in einem *in vitro* Phosphorylierungsassay eingesetzt werden (3.2.22). Die resultierende SDS-PAGE (3.2.20) sowie das dazugehörige Autoradiogramm sind in Abb. 4.12 gezeigt.

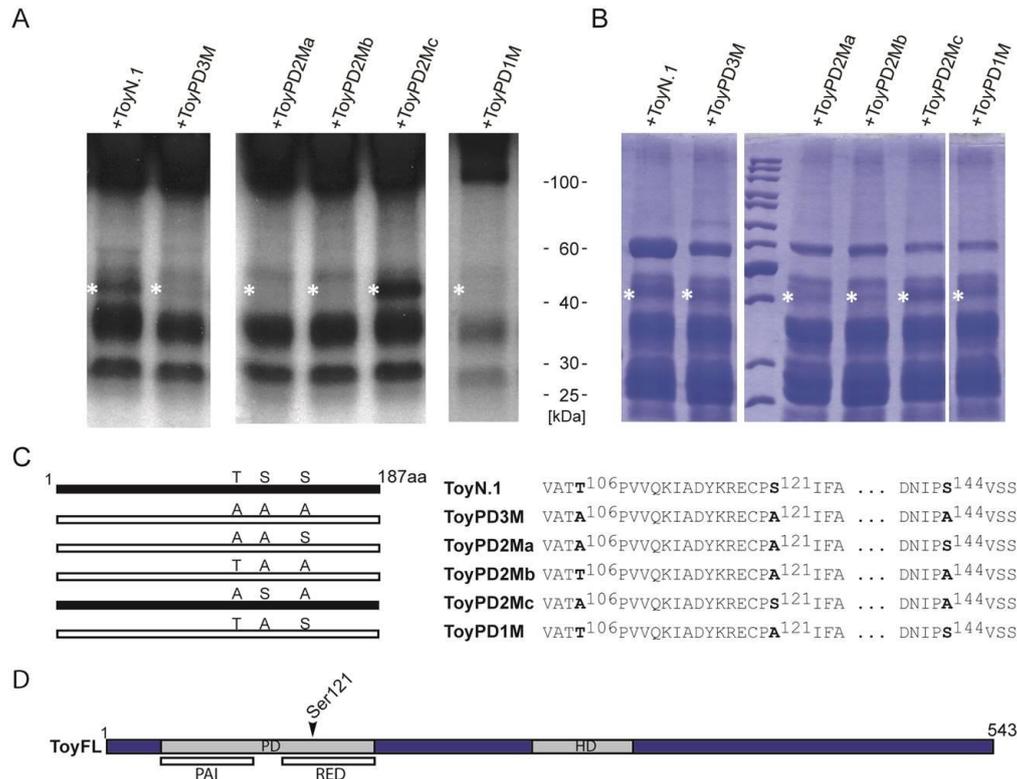


Abb. 4.12: Mutationsanalyse des N-terminalen Bereiches von Toy. (A) Autoradiogramm nach *in vitro* Kinaseassay der Mutationsvarianten des N-Terminus (Kontrollen durchgeführt wie in Abb. 4.9, nicht gezeigt). (B) SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (PAGE) des *in vitro* Kinaseassays (Originalgel zu A, Coomassie-gefärbt und Vakuum-getrocknet). (C) Schematische Darstellung der getesteten Fusionsproteine GST-ToyN.1, -ToyPD3M, -ToyPD2Ma, -ToyPD2Mb, -ToyPD2Mc und -ToyPD1M mit der Position der analysierten Aminosäuren (T-Threonin, S-Serin und A-Alanin). Phosphorylierte Fusionsproteine sind als schwarze Balken dargestellt. Rechts daneben ist jeweils ein Ausschnitt der entsprechenden Aminosäuresequenz, betroffene Aminosäuren sind fett gedruckt hervorgehoben. (D) Schematische Übersicht der Position von Ser¹²¹ innerhalb der Aminosäuresequenz von Toy. PD-Paired Domäne, HD-Homeodomäne, PAI bzw. RED-Subdomänen der PD.

Wie in Abb. 4.12 (A-C) zu erkennen ist, wird das mutierte Proteinfragment ToyPD3M, bei dem gleichzeitig an allen drei Positionen das dem Prolin direkt benachbarte Serin bzw. Threonin zerstört wurde, nicht phosphoryliert. Die sichtbaren Signale in dieser Spur stammen von der Autophosphorylierung der Hipk, auf der Höhe des aufgereinigten Proteins ToyPD3M (~ 47 kDa) ist kein Phosphorylierungssignal zu sehen. Diese Tatsache bestätigt die beobachtete Tendenz, dass die Hipk vorzugsweise die Position neben dem Prolin phosphoryliert, da offensichtlich alle Hipk-Phosphorylierungsstellen/phosphorylierbaren Aminosäuren in diesem Teilfragment von Toy „getroffen“ wurden. Die Auswertung der getesteten Substrate ToyPD2Ma, ToyPD2Mb und ToyPD2Mc, bei denen jeweils nur zwei der drei potentiellen Phosphorylierungsstellen mutiert sind und immer nur eine wildtypisch zur Phosphorylierung zur Verfügung steht, zeigt, dass lediglich das Serin¹²¹ von der Hipk phosphoryliert wird (Abb. 4.12, A-C). Dies ergibt sich aus der Beobachtung, dass lediglich ToyPD2Mc phosphoryliert wird, die beiden anderen Doppelmutanten nicht. Die Gegenkontrolle, das GST-Fusionsprotein ToyPD1M, bei dem

ausschließlich das Ser¹²¹ mutiert wurde, bestätigt dies ebenfalls. Bei einer Mutation von Serin 121 zu Alanin findet keine weitere Hipk-Phosphorylierung mehr statt. Somit befindet sich im N-terminalen Bereich von Toy innerhalb der Paired Domäne (PD), genauer in der RED-Subdomäne, lediglich eine Hipk-Phosphorylierungsstelle: Ser¹²¹ (Abb. 4.12, D).

4.3.3 Feinkartierung des C-Terminus

Die hohe Anzahl an potentiellen Hipk-Phosphorylierungsklustern im C-terminalen Bereich von Toy war zu hoch für eine direkte Mutationsanalyse, wie sie im N-terminalen Bereich von Toy angewandt worden war. Daher wurde dieser Bereich zunächst in zwei etwa gleich große Fragmente, ToyCA und ToyCB, unterteilt (Abb.4.13, C). Die Herstellung und Aufreinigung der entsprechenden rekombinanten Proteine erfolgte wie zuvor beschrieben (vgl. 4.3.1), die verwendeten Primer für alle Konstrukte sind in Tab. 3.2 (3.1.5) zusammengefasst.

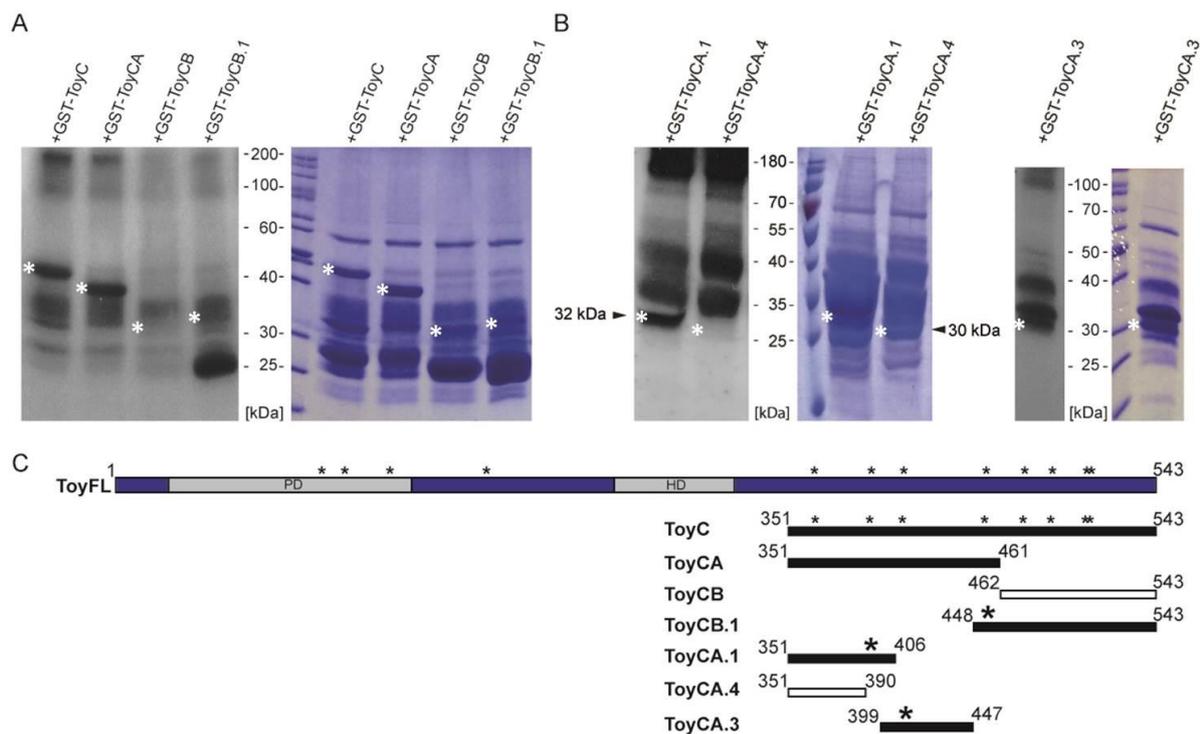


Abb. 4.13: Sukzessive Kartierung des C-terminalen Bereiches von Toy. (A+B) Autoradiogramme nach *in vitro* Kinase-Assay und dazugehörige SDS-PAGEs (Originalgele, Coomassie-gefärbt und Vakuum-getrocknet) (Kontrollen analog zu Abb. 4.9 durchgeführt, nicht gezeigt). Die Laufhöhen der zu testenden Substrate sind durch weiße Sterne markiert. (A) Unterteilung des C-Terminus in ToyCA und ToyCB sowie ToyCB.1. ToyC als interne Positivkontrolle. (B) Weiterführende Unterteilung des C-Terminales Bereiches ToyCA in ToyCA.1, ToyCA.4 und ToyCA.3. (C) Schematische Darstellung der Position und Größe aller getesteten Teilfragmente des Toy C-Terminus. Phosphorylierte Fragmente sind als schwarze Balken dargestellt. Schwarze kleine Sterne markieren potentielle Hipk-Phosphorylierungskuster, große Sterne markieren eingegrenzte und bestätigte Phosphorylierungskuster. PD-Paired Domäne, HD-Homeodomäne.

Wie in Abb. 4.13 A und C gezeigt, wurde ToyCA im *in vitro* Kinaseassay phosphoryliert und enthält daher mindestens einen Hipk-Phosphorylierungscluster. ToyCB wurde nicht phosphoryliert, sodass vier der potentiellen Hipk-Phosphorylierungscluster ausgeschlossen werden können.

Allerdings konnte durch das daraufhin analog hergestellte Proteinfragment ToyCB.1 der Positivnachweis eines Hipk-Phosphorylierungsclusters erbracht werden. Dieses Fragment unterscheidet sich nur wenige Aminosäuren von dem Fragment ToyCB (⁴⁴⁸LGSMTPSCLQQRDAY⁴⁶²), wird allerdings im Gegensatz zu diesem phosphoryliert (Abb. 4.13, A, C). Somit konnte ein weiterer einzelner Hipk-Phosphorylierungscluster identifiziert werden. Durch die sukzessive Unterteilung und Überprüfung von ToyCA in ToyCA.1, ToyCA.4 und ToyCA.3 konnten noch zwei weitere Hipk-Phosphorylierungscluster eingegrenzt werden (Abb. 4.13, B, C; große Sterne). ToyCA.1 und ToyCA.3 werden phosphoryliert, ToyCA.4 nicht.

Zusammengefasst konnten innerhalb des Toy C-Terminus insgesamt drei Hipk-Phosphorylierungscluster bestätigt werden, jeweils einer in der Nähe von Prolin (Pro)³⁹⁴, Pro⁴¹¹ und Pro⁴⁵³. Damit ist jeweils ein Cluster in Teilfragment ToyCA.1, ToyCA.3 und ToyCB.1 vorhanden.

Um herauszufinden, welche Aminosäure(n) je Cluster von der Hipk phosphoryliert werden, wurde eine Mutationsanalyse ähnlich der Analyse im N-terminalen Bereich von Toy durchgeführt. Dazu wurden die in Frage kommenden phosphorylierbaren Serin- oder Threonin-Reste eines Clusters einzeln bzw. alle zusammen mutiert und dann kontrolliert, ob die verbleibenden phosphorylierbaren Reste noch durch die Hipk phosphoryliert werden oder nicht. Die ortsspezifische Mutagenese erfolgte mit Hilfe spezifischer Primer (3.1.5, 3.2.13), die gezielte Basenfehlpaarungen während der PCR-Reaktion in die Fragmente einführen. Als Template diente wiederum der *toy*cDNA-Klon GH14454 (3.1.4). Anschließend wurde die mutierte cDNA zur Herstellung und Aufreinigung der entsprechenden rekombinanten Proteine eingesetzt und kontrolliert, wie bereits zuvor beschrieben (vgl. 4.3.1). Die mutierten Proteinfragmente GST-ToyCA.1_mut, -_mutA, und _mutB, welche jeweils eine Variante des N-terminalen ToyCA.1-Fragmentes darstellen, sowie die Proteinfragmente GST-ToyCA.3_mut, _mutA, _mutB und _mutC als Varianten des ToyCA.3-Fragmentes und die Proteinfragmente GST-ToyCB.1_mut, _mutA, _mutB und _mutC als Varianten des ToyCB.1-Fragmentes, konnten anschließend in einem *in vitro* Phosphorylierungsassay eingesetzt werden (3.2.22). Die Proteine wurden jeweils in gleicher Konzentration eingesetzt, um den optimalen Vergleich zu gewährleisten. Das Ergebnis ist in Abb. 4.14 gezeigt.

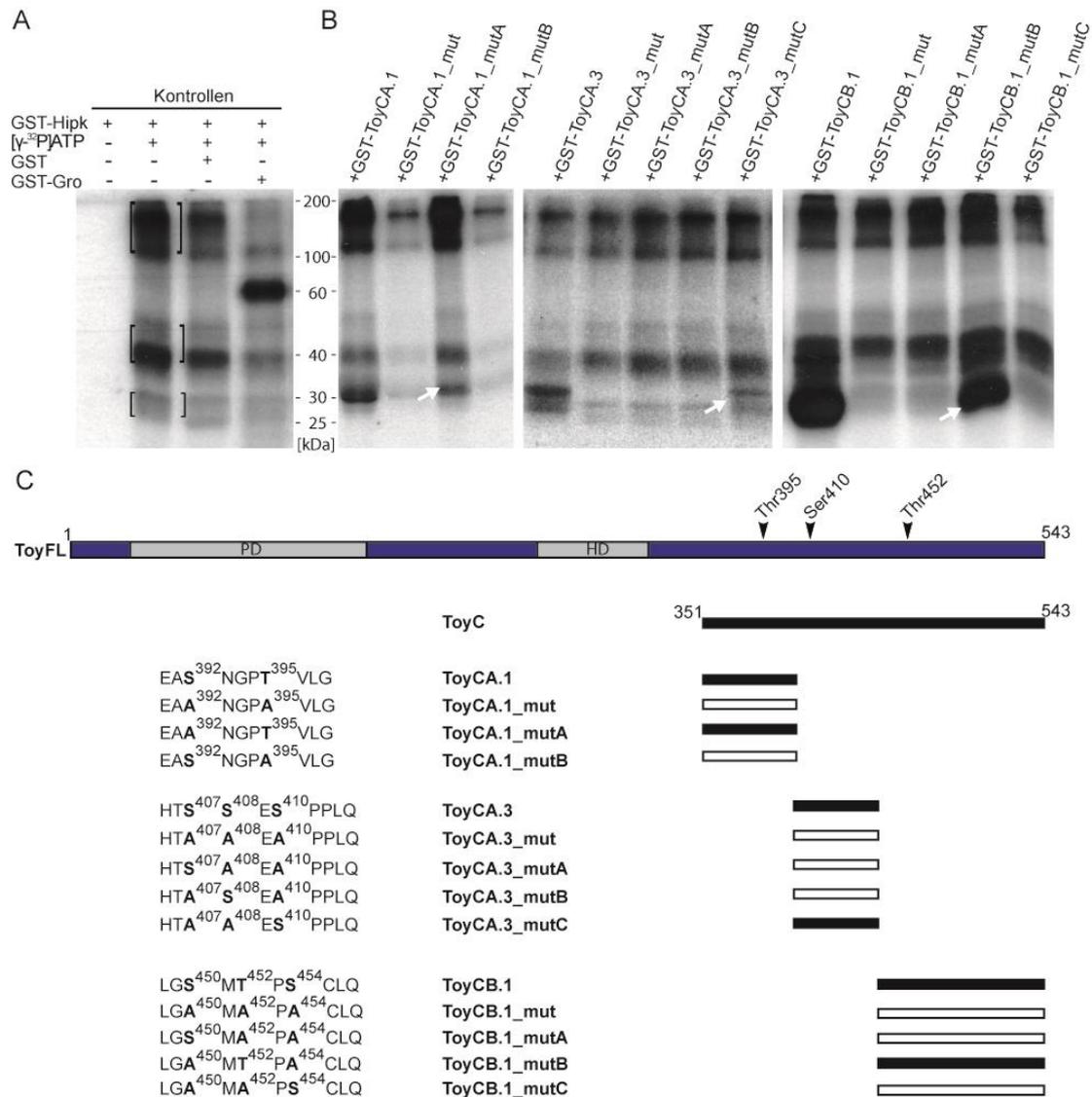


Abb. 4.14: Mutationsanalyse des C-terminalen Bereiches von Toy. (A) Autoradiogramm der Kontrollen, durchgeführt wie in Abb. 4.9 beschrieben. (B) Autoradiogramme nach *in vitro* Kinaseassay mit mutierten Varianten der Hipk-Substrate GST-ToyCA.1, -ToyCA.3 und -ToyCB.1. Weiße Pfeile deuten auf die Phosphorylierungssignale der positiv getesteten Teilfragmente. (C) Schematische Darstellung der Lage, Größe und Aminosäuresequenz der getesteten Proteinfragmente. Von der Mutationsanalyse betroffene Aminosäuren sind fett gedruckt. PD-Paired Domäne, HD-Homeodomäne.

Anhand der Mutationsanalyse des C-terminalen Bereiches von Toy wurde je Cluster eine Aminosäure gefunden, die Ziel einer Phosphorylierung durch Hipk ist. Im Teilfragment ToyCA.1 ist es das Thr³⁹⁵, im Teilfragment ToyCA.3 ist es das Ser⁴¹⁰ und bei ToyCB.1 ist es Thr⁴⁵². Auch hier findet die Hipk-Phosphorylierung demnach an einer dem Prolin direkt benachbarten Aminosäure statt.

Nach der umfassenden Kartierung der Hipk-Phosphorylierungsstellen von Toy durch *in vitro* Kinaseassays ergeben sich demnach insgesamt vier Hipk-Phosphorylierungsstellen:

Eine Hipk-Phosphorylierungsstelle befindet sich im N-terminalen Bereich von Toy, Ser¹²¹, innerhalb der DNA-bindenden Paired Domäne (PD). Die weiteren Phosphorylierungsstellen befinden sich im C-terminalen Bereich von Toy, Thr³⁹⁵, Ser⁴¹⁰ und Thr⁴⁵², innerhalb der Transaktivierungsdomäne (TAD). Alle phosphorylierten Aminosäuren befinden sich in direkter Nachbarschaft zu einem Prolin und je Hipk-Phosphorylierungscluster wird jeweils nur eine von mehreren möglichen Aminosäuren phosphoryliert.

Die in vorangegangenen Arbeiten gefundenen Hipk-Phosphorylierungsstellen Ser⁴²⁴ und Thr⁴²⁸ (Laupsien, 2007) traten im Rahmen der vorliegenden Phosphorylierungsanalyse nicht in Erscheinung. Diese Phosphorylierungsstellen sind von ihrer Position her dem Proteinfragment ToyCA.3 zuzuordnen. Dieses wird zwar in seiner nicht-mutierten Form phosphoryliert, jedoch kommt die vorliegende Mutationsanalyse zu dem eindeutigen Ergebnis, dass in den mutierten Varianten von ToyCA.3, ToyCA.3_mut, ToyCA.3_mutA und ToyCA.3_mutB, keine weitere Phosphorylierung stattfindet und somit keine weitere Hipk-Phosphorylierungsstelle vorliegt.

4.3.4 Konservierung der gefundenen Hipk-Phosphorylierungsstellen

Mit Hilfe der innerhalb unserer Arbeitsgruppe aufgestellten Hipk-Konsensus Sequenz (Dewald et al., 2014) konnten 14 potentielle Hipk-Phosphorylierungscluster in der Aminosäuresequenz von Toy bestimmt werden. Die Kartierung einzelner Phosphorylierungsstellen erfolgte durch sukzessiv eingrenzende *in vitro* Phosphorylierungsassays und anschließende Mutationsanalysen. Dabei wurden vier Hipk-Phosphorylierungsstellen von Toy identifiziert (Ser¹²¹, Thr³⁹⁵, Ser⁴¹⁰ und Thr⁴⁵²). Die Aminosäuresequenzen aller vier Phosphorylierungsstellen sind evolutionär konserviert in allen bisher vollständig analysierten Genomen der Familie der *Drosophilidae* (Clark et al. [*Drosophila 12 Genomes Consortium*], 2007). Zum Vergleich sind die entsprechenden Aminosäuresequenzen in Abb. 4.15 dargestellt.

Die Konservierung entspricht damit der Evolutionsdistanz innerhalb der gezeigten *Drosophilidae* (von *D.melanogster* bis *D.grimshawi*) und überspannt dabei 62,9 Myr (Millions of years) (Tamura et al., 2004; Singh et al., 2009). Das entspricht im Vergleich annähernd der evolutionären Distanz zwischen Maus und Mensch von ~65-75 Myr (Waterston et al. [*Mouse genome consortium*], 2002).

Dana	MMLTTEHIMHG-HPHSSV----QSALFGCSTAGHSGINQLGGVYVNGRPLDPSTROKIVELAHSGARPCDISRI LQVSNCGVSKILGRYYETGSIKPRAIIGGSKPRVATTPVVKIA
Dmel	MMLTTEHIMHG-HPHSSV----GQSTLFGCSTAGHSGINQLGGVYVNGRPLDPSTROKIVELAHSGARPCDISRI LQVSNCGVSKILGRYYETGSIKPRAIIGGSKPRVATTPVVKIA
Dsim	MMLTTEHIMHG-HPHSSV----GQSTLFGCSTAGHSGINQLGGVYVNGRPLDPSTROKIVELAHSGARPCDISRI LQVSNCGVSKILGRYYETGSIKPRAIIGGSKPRVATTPVVKIA
Dsec	MMLTTEHIMHG-HPHSSV----GQSTLFGCSTAGHSGINQLGGVYVNGRPLDPSTROKIVELAHSGARPCDISRI LQVSNCGVSKILGRYYETGSIKPRAIIGGSKPRVATTPVVKIA
Dyak	MMLTTEHIMHG-HPHSSV----GQSTLFGCSTAGHSGINQLGGVYVNGRPLDPSTROKIVELAHSGARPCDISRI LQVSNCGVSKILGRYYETGSIKPRAIIGGSKPRVATTPVVKIA
Dere	MMLTTEHIMHG-HPHSSV----GQSTLFGCSTAGHSGINQLGGVYVNGRPLDPSTROKIVELAHSGARPCDISRI LQVSNCGVSKILGRYYETGSIKPRAIIGGSKPRVATTPVVKIA
Dmoj	MMLTTEHIMHG-HPHSSV----GQSTLFGCSTAGHSGINQLGGVYVNGRPLDPSTROKIVELAHSGARPCDISRI LQVSNCGVSKILGRYYETGSIKPRAIIGGSKPRVATTPVVKIA
Dvir	MMLTTEHIMHG-HPHSSV----GQSTLFGCSTAGHSGINQLGGVYVNGRPLDPSTROKIVELAHSGARPCDISRI LQVSNCGVSKILGRYYETGSIKPRAIIGGSKPRVATTPVVKIA
Dgri	MMLTTEHIMHG-HPHSSV----GQSTLFGCSTAGHSGINQLGGVYVNGRPLDPSTROKIVELAHSGARPCDISRI LQVSNCGVSKILGRYYETGSIKPRAIIGGSKPRVATTPVVKIA
Dpse	MMLTTEHIMHG-HPHSSV----GQSTLFGCSTAGHSGINQLGGVYVNGRPLDPSTROKIVELAHSGARPCDISRI LQVSNCGVSKILGRYYETGSIKPRAIIGGSKPRVATTPVVKIA
Dper	MMLTTEHIMHG-HPHSSV----GQSTLFGCSTAGHSGINQLGGVYVNGRPLDPSTROKIVELAHSGARPCDISRI LQVSNCGVSKILGRYYETGSIKPRAIIGGSKPRVATTPVVKIA
Dwil	MMLTTEHIMHG-HPHSSV----MGQSALFGCSTAGHSGINQLGGVYVNGRPLDPSTROKIVELAHSGARPCDISRI LQVSNCGVSKILGRYYETGSIKPRAIIGGSKPRVATTPVVKIA

	Ser ¹²¹	
Dana	DYKRECPSTFAWEIRDRLLESEQVNSDNI PSVSSINRVLRLNLSAQEQQAQQQNESVYEKLRMFGQTGGWAWYPSNTTTHLALPPASATVATPNSLGGQINREDIQKRELQYSTDV	
Dmel	DYKRECPSTFAWEIRDRLLESEQVNSDNI PSVSSINRVLRLNLSAQEQQAQQQNESVYEKLRMFGQTGGWAWYPSNTTTHLALPPASAVVTPANLGGQADRDDVQKRELQFSIEV	
Dsim	DYKRECPSTFAWEIRDRLLESEQVNSDNI PSVSSINRVLRLNLSAQEQQAQQQNESVYEKLRMFGQTGGWAWYPSNTTTHLALPPASAVVTPANLGGQADRDDVQKRELQFSIEV	
Dsec	DYKRECPSTFAWEIRDRLLESEQVNSDNI PSVSSINRVLRLNLSAQEQQAQQQNESVYEKLRMFGQTGGWAWYPSNTTTHLALPPASAVVTPANLGGQADRDDVQKRELQFSIEV	
Dyak	DYKRECPSTFAWEIRDRLLESEQVNSDNI PSVSSINRVLRLNLSAQEQQAQQQNESVYEKLRMFGQTGGWAWYPSNTTTHLALPPASAVVTPANLGGQADRDDVQKRELQFSIEV	
Dere	DYKRECPSTFAWEIRDRLLESEQVNSDNI PSVSSINRVLRLNLSAQEQQAQQQNESVYEKLRMFGQTGGWAWYPSNTTTHLALPPASAVVTPANLGGQADRDDVQKRELQFSIEV	
Dmoj	DYKRECPSTFAWEIRDRLLESEQVNSDNI PSVSSINRVLRLNLSAQEQQAQQQNESVYEKLRMFGQTGGWAWYPSNTTTHLALPPASAVVTPANLGGQADRDDVQKRELQFSIEV	
Dvir	DYKRECPSTFAWEIRDRLLESEQVNSDNI PSVSSINRVLRLNLSAQEQQAQQQNESVYEKLRMFGQTGGWAWYPSNTTTHLALPPASAVVTPANLGGQADRDDVQKRELQFSIEV	
Dgri	DYKRECPSTFAWEIRDRLLESEQVNSDNI PSVSSINRVLRLNLSAQEQQAQQQNESVYEKLRMFGQTGGWAWYPSNTTTHLALPPASAVVTPANLGGQADRDDVQKRELQFSIEV	
Dpse	DYKRECPSTFAWEIRDRLLESEQVNSDNI PSVSSINRVLRLNLSAQEQQAQQQNESVYEKLRMFGQTGGWAWYPSNTTTHLALPPASAVVTPANLGGQADRDDVQKRELQFSIEV	
Dper	DYKRECPSTFAWEIRDRLLESEQVNSDNI PSVSSINRVLRLNLSAQEQQAQQQNESVYEKLRMFGQTGGWAWYPSNTTTHLALPPASAVVTPANLGGQADRDDVQKRELQFSIEV	
Dwil	DYKRECPSTFAWEIRDRLLESEQVNSDNI PSVSSINRVLRLNLSAQEQQAQQQNESVYEKLRMFGQTGGWAWYPSNTTTHLALPPASAVVTPANLGGQADRDDVQKRELQFSIEV	

Dana	SHTNSHDSTSDGNSDHNSSGDEDSQMRLLRKRKLRNRTSFTNEQIDSLKEFERFTHYPDVFARERLADKIGLPEARIQVWFSNRRAKWRREEKMRTRQRSADTVG---SSGRSTST
Dmel	SHTNSHDSTSDGNSDHNSSGDEDSQMRLLRKRKLRNRTSFTNEQIDSLKEFERFTHYPDVFARERLADKIGLPEARIQVWFSNRRAKWRREEKMRTRQRSADTVG---SSGRSTST
Dsim	SHTNSHDSTSDGNSDHNSSGDEDSQMRLLRKRKLRNRTSFTNEQIDSLKEFERFTHYPDVFARERLADKIGLPEARIQVWFSNRRAKWRREEKMRTRQRSADTVG---SSGRSTST
Dsec	SHTNSHDSTSDGNSDHNSSGDEDSQMRLLRKRKLRNRTSFTNEQIDSLKEFERFTHYPDVFARERLADKIGLPEARIQVWFSNRRAKWRREEKMRTRQRSADTVG---SSGRSTST
Dyak	SHTNSHDSTSDGNSDHNSSGDEDSQMRLLRKRKLRNRTSFTNEQIDSLKEFERFTHYPDVFARERLADKIGLPEARIQVWFSNRRAKWRREEKMRTRQRSADTVG---SSGRSTST
Dere	SHTNSHDSTSDGNSDHNSSGDEDSQMRLLRKRKLRNRTSFTNEQIDSLKEFERFTHYPDVFARERLADKIGLPEARIQVWFSNRRAKWRREEKMRTRQRSADTVG---SSGRSTST
Dmoj	SHTNSHDSTSDGNSDHNSSGDEDSQMRLLRKRKLRNRTSFTNEQIDSLKEFERFTHYPDVFARERLADKIGLPEARIQVWFSNRRAKWRREEKMRTRQRSADTVG---SSGRSTST
Dvir	SHTNSHDSTSDGNSDHNSSGDEDSQMRLLRKRKLRNRTSFTNEQIDSLKEFERFTHYPDVFARERLADKIGLPEARIQVWFSNRRAKWRREEKMRTRQRSADTVG---SSGRSTST
Dgri	SHTNSHDSTSDGNSDHNSSGDEDSQMRLLRKRKLRNRTSFTNEQIDSLKEFERFTHYPDVFARERLADKIGLPEARIQVWFSNRRAKWRREEKMRTRQRSADTVG---SSGRSTST
Dpse	SHTNSHDSTSDGNSDHNSSGDEDSQMRLLRKRKLRNRTSFTNEQIDSLKEFERFTHYPDVFARERLADKIGLPEARIQVWFSNRRAKWRREEKMRTRQRSADTVG---SSGRSTST
Dper	SHTNSHDSTSDGNSDHNSSGDEDSQMRLLRKRKLRNRTSFTNEQIDSLKEFERFTHYPDVFARERLADKIGLPEARIQVWFSNRRAKWRREEKMRTRQRSADTVG---SSGRSTST
Dwil	SHTNSHDSTSDGNSDHNSSGDEDSQMRLLRKRKLRNRTSFTNEQIDSLKEFERFTHYPDVFARERLADKIGLPEARIQVWFSNRRAKWRREEKMRTRQRSADTVG---SSGRSTST

	Thr ³⁹⁵	Ser ⁴¹⁰
Dana	A--NNTSGGASSVTTNNTSTPGIINSTAS--GSERPSSDVI-----TNNLSETPNGLGSDANS--AHTSSSPQLQVAVAPRIPLNTGFNTMYPISIPQPIAT	
Dmel	N--NPSSTASSSVATSNSTPGIIVNSAIN--VAERTSSALV-----SNSLPEASNGPTLGEANT--THTSSSPQLQPAAPRPLPNSGFNTMYPISIPQPIAT	
Dsim	N--NPSSTASSSVATSNSTPGIIVNSAIN--VAERASSALI-----SNSLPEASNGPTLGEANT--THTSSSPQLQPAAPRPLPNSGFNTMYPISIPQPIAT	
Dsec	N--NPSSTASSSVATSNSTPGIIVNSAIN--VAERASSALI-----SNSLPEASNGPTLGEANT--THTSSSPQLQPAAPRPLPNSGFNTMYPISIPQPIAT	
Dyak	N--NPSSTASSSVATSNSTPGIIVNSAIN--VAERASSALI-----SNSLPEASNGPTLGEANT--THTSSSPQLQPAAPRPLPNSGFNTMYPISIPQPIAT	
Dere	N--NPSSTASSSVATSNSTPGIIVNSAIN--VAERASSALI-----SNSLPEASNGPTLGEANT--THTSSSPQLQPAAPRPLPNSGFNTMYPISIPQPIAT	
Dmoj	N--NPSSTASSSVATSNSTPGIIVNSAIN--VAERASSALI-----SNSLPEASNGPTLGEANT--THTSSSPQLQPAAPRPLPNSGFNTMYPISIPQPIAT	
Dvir	N--NPSSTASSSVATSNSTPGIIVNSAIN--VAERASSALI-----SNSLPEASNGPTLGEANT--THTSSSPQLQPAAPRPLPNSGFNTMYPISIPQPIAT	
Dgri	N--NPSSTASSSVATSNSTPGIIVNSAIN--VAERASSALI-----SNSLPEASNGPTLGEANT--THTSSSPQLQPAAPRPLPNSGFNTMYPISIPQPIAT	
Dpse	N--NPSSTASSSVATSNSTPGIIVNSAIN--VAERASSALI-----SNSLPEASNGPTLGEANT--THTSSSPQLQPAAPRPLPNSGFNTMYPISIPQPIAT	
Dper	N--NPSSTASSSVATSNSTPGIIVNSAIN--VAERASSALI-----SNSLPEASNGPTLGEANT--THTSSSPQLQPAAPRPLPNSGFNTMYPISIPQPIAT	
Dwil	NNPNSVTSVSTTAAPTNGTPELSSAAVN--GSEESSAIV-----GGNNFLADSPNGPTLGEANT--AHGSSSPQLQHAVAPRIPLNTGFNTMYPISIPQPIAT	

	Thr ⁴⁵²
Dana	MAENYNS---PLGSETPFCLOQRDAYPYMFHDPLSLGSPYVAHHRNTACNPAHAHQPPQH--GVYTNSSMPSN--TGVISAGVSVVPQISTQNVSDLTGNSYWRPRLQ
Dmel	MAENYNS---PLGSETPFCLOQRDAYPYMFHDPLSLGSPYVAHHRNTACNPAHAHQPPQH--GVYTNSSMPSN--TGVISAGVSVVPQISTQNVSDLTGNSYWRPRLQ
Dsim	MAENYNS---PLGSETPFCLOQRDAYPYMFHDPLSLGSPYVAHHRNTACNPAHAHQPPQH--GVYTNSSMPSN--TGVISAGVSVVPQISTQNVSDLTGNSYWRPRLQ
Dsec	MAENYNS---PLGSETPFCLOQRDAYPYMFHDPLSLGSPYVAHHRNTACNPAHAHQPPQH--GVYTNSSMPSN--TGVISAGVSVVPQISTQNVSDLTGNSYWRPRLQ
Dyak	MAENYNS---PLGSETPFCLOQRDAYPYMFHDPLSLGSPYVAHHRNTACNPAHAHQPPQH--GVYTNSSMPSN--TGVISAGVSVVPQISTQNVSDLTGNSYWRPRLQ
Dere	MAENYNS---PLGSETPFCLOQRDAYPYMFHDPLSLGSPYVAHHRNTACNPAHAHQPPQH--GVYTNSSMPSN--TGVISAGVSVVPQISTQNVSDLTGNSYWRPRLQ
Dmoj	MAENYNSMTSSLGSETPFCLOQRDAYPYMFHDPLSLGSPYVAHHRNTACNPAHAHQPPQH--GVYTNSSMPSN--TGVISAGVSVVPQISTQNVSDLTGNSYWRPRLQ
Dvir	MAENYNSMTSSLGSETPFCLOQRDAYPYMFHDPLSLGSPYVAHHRNTACNPAHAHQPPQH--GVYTNSSMPSN--TGVISAGVSVVPQISTQNVSDLTGNSYWRPRLQ
Dgri	MAENYNSMTSSLGSETPFCLOQRDAYPYMFHDPLSLGSPYVAHHRNTACNPAHAHQPPQH--GVYTNSSMPSN--TGVISAGVSVVPQISTQNVSDLTGNSYWRPRLQ
Dpse	MAENYNSMTSSLGSETPFCLOQRDAYPYMFHDPLSLGSPYVAHHRNTACNPAHAHQPPQH--GVYTNSSMPSN--TGVISAGVSVVPQISTQNVSDLTGNSYWRPRLQ
Dper	MAENYNSMTSSLGSETPFCLOQRDAYPYMFHDPLSLGSPYVAHHRNTACNPAHAHQPPQH--GVYTNSSMPSN--TGVISAGVSVVPQISTQNVSDLTGNSYWRPRLQ
Dwil	MAENYNSMTSSLGSETPFCLOQRDAYPYMFHDPLSLGSPYVAHHRNTACNPAHAHQPPQH--GVYTNSSMPSN--TGVISAGVSVVPQISTQNVSDLTGNSYWRPRLQ

Abb. 4.15: Die Phosphorylierungsstellen Ser¹²¹, Thr³⁹⁵, Ser⁴¹⁰ und Thr⁴⁵² sind innerhalb der *Drosophiliden* konserviert. Vergleich der analysierten Phosphorylierungsstellen mit entsprechenden Aminosäuresequenzen von Toy in den *Drosophiliden*: *Drosophila ananassae* (Dana), *-melanogaster* (Dmel), *-simulans* (Dsim), *-sechellia* (Dsec), *-yakuba* (Dyak), *-erecta* (Dere), *-mojavensis* (Dmoj), *-virilis* (Dvir), *-grimshawi* (Dgri), *-pseudobscura* (Dpse), *-persimilis* (Dper) und *-wilistoni* (Dwil). Potentielle Phosphorylierungsstellen sind mit gestrichelter Linie umrahmt, bestätigte Phosphorylierungsstellen sind umrahmt und mit ihrer Aminosäureposition beschriftet. Die mehr N-terminal gelegene Paired Domäne (PD) und die Homeodomäne (HD) sind grau unterlegt. Der Sequenzabgleich erfolgte mit der Anwendung MUSCLE (EMBL).

4.4 Analyse phosphorylierungsmutanter UAS toy -Fliegenstämme II

Nach der umfassenden Aufklärung der Hipk-Phosphorylierungsstellen von Toy *in vitro* war es nun von Interesse, die funktionelle Relevanz auch dieser posttranslationalen Modifikation(en) von Toy zu untersuchen. Ziel war es, mit Bezug auf die ermittelten Phosphorylierungsstellen Ser¹²¹, Thr³⁹⁵, Ser⁴¹⁰ und Thr⁴⁵² phosphorylierungsmutante UAS toy -Fliegenstämme herzustellen. Diese sollten im Anschluss unter Einsatz des UAS/Gal4-Systems für weitere (vergleichende) Analysen zur Verfügung stehen. Die gewünschten Mutationen sollten durch ortsspezifische Mutagenese auf cDNA-Ebene eingebracht werden. Dabei kommt es in der cDNA-Sequenz zu Basenaustauschen, die in ihrer Konsequenz zu Aminosäureaustauschen auf Proteinebene führen. Der Austausch eines prinzipiell phosphorylierbaren Serins oder Threonins zu Alanin kommt hierbei einer Zerstörung der Phosphorylierungsstelle gleich, da diese Aminosäure nicht phosphoryliert werden kann.

Um die gefundenen N-terminal bzw. C-terminal gelegenen Phosphorylierungsstellen separat voneinander analysieren zu können, wurde neben einer Vollmutante, bei der alle vier Phosphorylierungsstellen zu Alanin mutiert sind (ToyVM), auch eine Mutante des N-Terminus (Paired Domänen Mutante; ToyPM) und eine Mutante des C-Terminus (Transaktivierungsdomänen Mutante; ToyTM) erzeugt. Bei ToyPM ist ausschließlich Ser¹²¹ zu Alanin mutiert, bei ToyTM sind gleichzeitig Thr³⁹⁵, Ser⁴¹⁰ und Thr⁴⁵² zu Alanin mutiert. Als Abstufungen sind die Doppelmutante ToyDM (Ser⁴¹⁰ und Thr⁴⁵² zu Alanin mutiert) und die Einzelmutante ToyEM (Thr⁴⁵² zu Alanin mutiert) generiert worden. Im Fall der N-terminalen Hipk-Phosphorylierungsstelle Ser¹²¹ wurde außerdem eine phosphomimetische Mutante erzeugt, indem die Aminosäure Ser¹²¹ zu einem Glutamat mutiert wurde.

4.4.1 Herstellung mutierter pUAS $attB$ - toy -Transformationskonstrukte

Die Mutagenese erfolgte ortsspezifisch mit Hilfe von individuellen Mutagenese-Primern während einer PCR-Reaktion (3.1.5, 3.2.13). Die Primer waren so konzipiert, dass sie während der Mutagenese-PCR-Reaktion gezielt einzelne Basen substituieren und außerdem invers und „auf Stoß“ angeordnet sind, um das gesamte *toy*cDNA-Plasmid während der PCR zu amplifizieren, das somit anschließend ligiert und direkt transformiert werden konnte (3.2.6, 3.2.7, 3.2.15). Die verwendeten Primer Kombinationen zur Herstellung der mutierten *toy*cDNA-Fragmente sind in Tab. 4.2 aufgelistet.

Tab. 4.2: Mutageneseprimer zur Herstellung mutierter *toycDNA*-Fragmente.

Konstrukt	Primer1	Primer2	Template
<i>toyPM</i>	ToyPM5'	ToyPM3'	<i>toycDNA</i> (GH14454, DGRC)
<i>toyPM_E</i>	ToyPM_E 5'	ToyPM3'	<i>toycDNA</i> (GH14454, DGRC)
<i>toyEM</i>	ToyThr452_5'	ToyThr452_3'	<i>toycDNA</i> (Klon 44/2)
<i>toyDM</i>	ToySer410_5'	ToySer410_3'	<i>toyEMcDNA</i> (Klon 44/2)
<i>toyTM</i>	ToyThr395_5'	ToyThr395_3'	<i>toyDMcDNA</i> (Klon 44/2)
<i>toyVM</i>	Durch Klonierung zusammengesetzt aus Fragmenten von <i>toyPM</i> und <i>toyTM</i> .		

Die Mutagenese-PCR erfolgte im Falle von *toyPM* und *toyPM_E* auf *toycDNA* (GH14454, DGRC) und im Fall von *toyEM* auf *toycDNA* (Klon 44/2; Czerny et al., 1999). Beide unterscheiden sich um 98 bp im 3'-UTR-Bereich, die in Klon 44/2 zusätzlich vorhanden sind. Die bereits mutierte *toyEMcDNA* wurde anschließend als Template eingesetzt in einer weiteren Mutagenese-PCR zur Erzeugung der *toyDMcDNA* und diese wiederum als Template verwendet zur Erzeugung der *toyTMcDNA*. Die mutierten *toycDNAs* wurden nach jeder Mutagenese mittels Sequenzierung überprüft, um den Erfolg der Mutagenese zu bestätigen und um auszuschließen, dass es während der PCR-Reaktion zu unerwünschten Nukleotidveränderungen gekommen ist, die im späteren Protein zu Rastershifts bzw. Nonsense-Mutationen führen könnten (3.2.17). Das Konstrukt *toyVM* wurde später über Klonierung zusammengesetzt. Als nächstes wurden die mutierten *toycDNA*-Fragmente in den Transformationsvektor pUASTattB umklont. Dieser verfügt neben einem Markergen und einer attB-Sequenz über eine Multiple Cloning Site (MCS) sowie über Upstream Activation Sequences (UAS) und einen Minimalpromotor, welche der MCS vorgelagert sind. Durch den Einbau der mutierten *toycDNA* in die MCS gelangt diese unter die Kontrolle der UAS-Sequenzen, was eine zeit- und gewebespezifische Expression der eingebauten phosphorylierungsmutanten *toycDNA* unter Zuhilfenahme des UAS/Gal4-Systems ermöglicht. Die nicht-mutierte sowie die mutierten *toyPM* und *toyPM_E* wurden direkt über einen EcoRI-Verdau in den gleichermaßen verdauten Zielvektor pUASTattB umklont (3.2.2, 3.2.3, 3.2.4, 3.2.5, 3.2.6). Im Falle der ausschließlich im 3'-Bereich mutierten Konstrukte *toyEM*, *toyDM* und *toyTM* wurde mit einer EagI/KpnI-Doppelrestriktion jeweils das ~0,7 kb große 3'-terminale Fragment der entsprechend mutierten *toycDNA* in den gleichermaßen restringierten pUASTattB-*toyWT* umklont. Der Austausch dieses kleineren Fragmentes der *toycDNA* diente der Klonierbarkeit. In Abb. 4.16 ist der schematische Aufbau der finalen Transformationskonstrukte gezeigt.

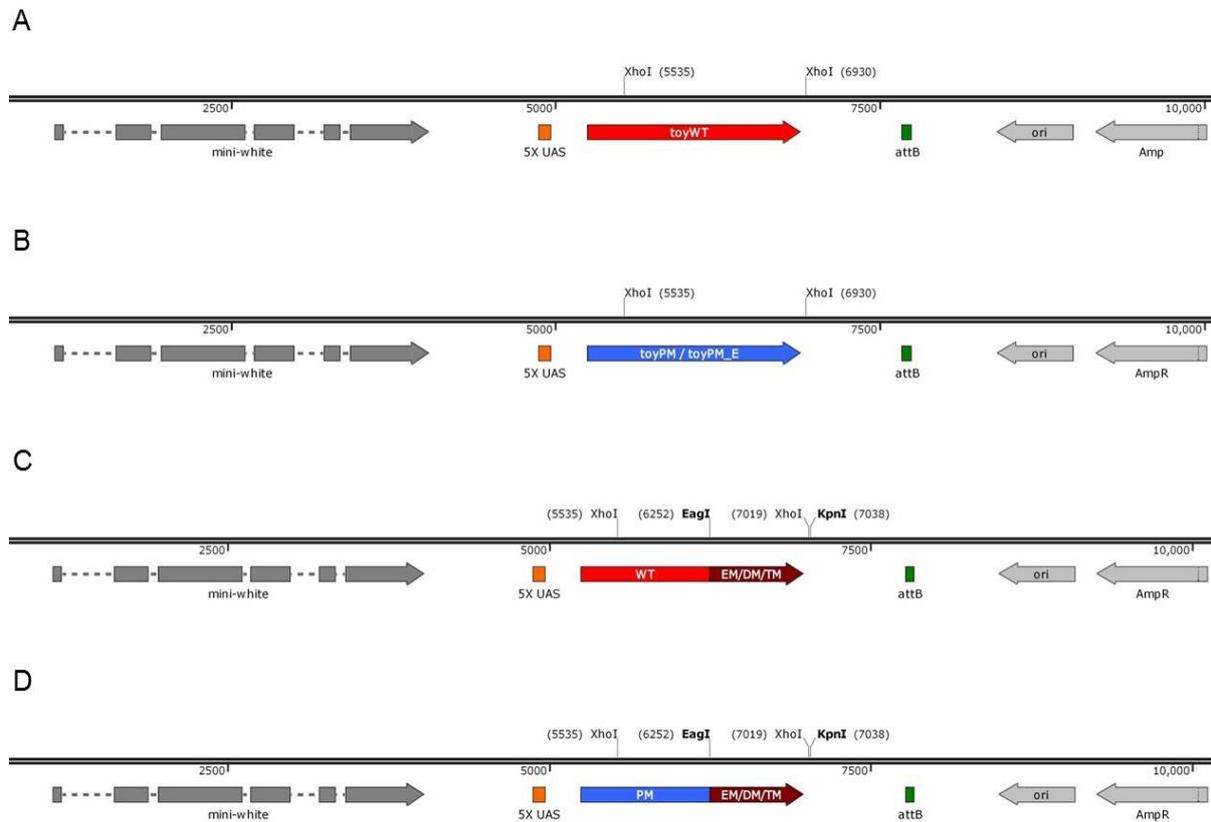


Abb. 4.16: Schematischer Aufbau der pUASTattB-toy-Transformationskonstrukte zur Herstellung der neuen Phosphorylierungsmutanten von Toy. Die klonierten Transformationskonstrukte sind zur besseren Übersicht in linearisierter Form dargestellt: **(A)** pUASTattB-ToyWT, **(B)** pUASTattB-ToyPM bzw. -ToyPM_E, **(C)** pUASTattB-ToyEM bzw. -DM und -TM (zusammengesetzt aus dem 5'-Bereich von ToyWT und dem 3'-Bereich von ToyEM/DM/TM). **(D)** pUASTattB-ToyVM (zusammengesetzt aus dem 5'-Bereich von ToyPM und dem 3'-Bereich von ToyTM).

Zur Herstellung des pUASTattB-toyVM wurde der 3'-Bereich (~0,7 kb) der toyTMcDNA in den analog restringierten pUASTattB-toyPM umklontiert. Da dieser bereits den mutierten 5'-Bereich der toyPMcDNA besaß ergab sich durch die Kombination des mutierten 5'- und des mutierten 3'-Bereiches das Transformationskonstrukt pUASTattB-toyVM (Abb. 4.16, D).

Mit Hilfe einer XhoI-Restriktion zur Selektion der gewünschten Orientierung (Abb. 4.16 und 4.17) der einklonierten Fragmente und mittels Sequenzierung konnte die Richtigkeit der Konstrukte überprüft werden (3.2.2, 3.2.17).

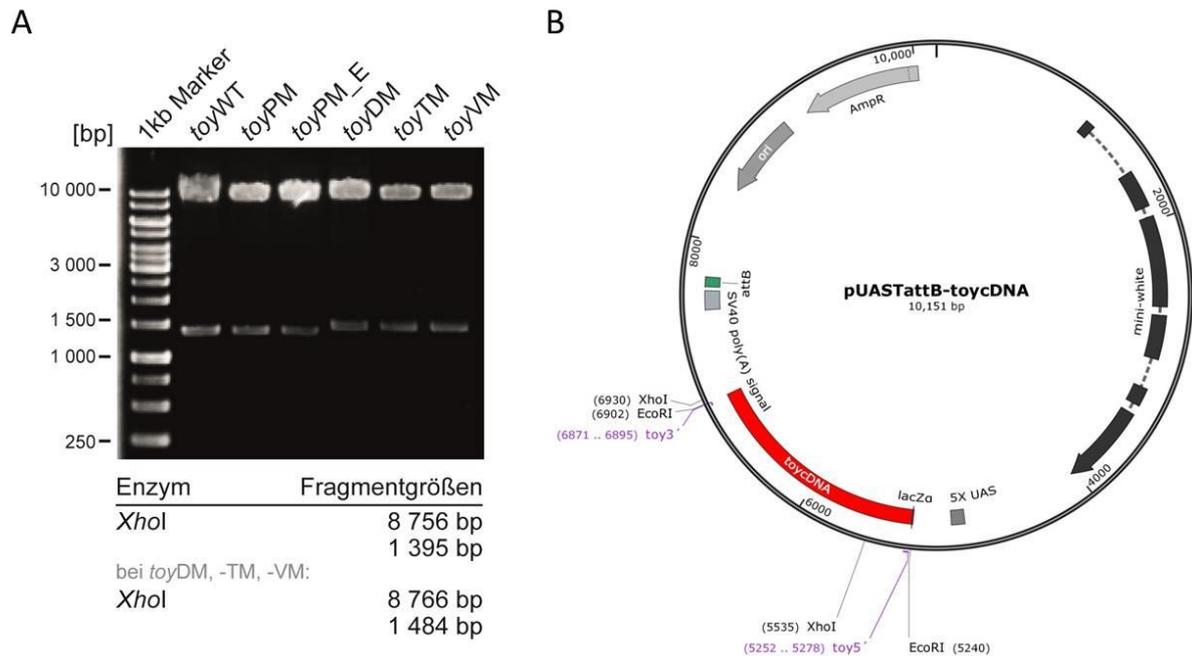


Abb. 4.17: Kontrollrestriktion und schematische Darstellung der erzeugten pUASTattB-toy-Transformationskonstrukte. (A) Gelelektrophoretische Auftrennung der Fragmente aus Restriktionsansätzen mit dem Enzym *XhoI* zur Kontrolle der Transformationskonstrukte pUASTattB-toyWT, -PM, -PM_E, -DM, -TM und -VM. In der Tabelle darunter sind die zu erwartenden Fragmentgrößen aufgelistet. Bei gewünschter Orientierung des Inserts entstehen zwei Fragmente: 8 756 bp (bzw. 8 766 bp) und 1 395 bp (bzw. 1 484 bp). Die Größendifferenz von ~100 bp ergibt sich aus der *EagI/KpnI*-Restriktion der *toyCDNA* (Klon 44/2) mit einem Stück 3'-Untranslatierter Region (3'-UTR) das folglich nur in die Konstrukte pUASTattB-toyDM, -TM, und -VM eingebracht wurde. (B) Beispielhafte schematische Darstellung eines pUASTattB-toy-Transformationskonstruktes entsprechend *toyWT*, -PM oder -PM_E. Die Vektorkarte wurde mit Snapgene erstellt.

Nach erfolgreicher Herstellung der Transformationskonstrukte standen diese bereit für die Erzeugung transgener Tiere.

4.4.2 Erzeugung transgener phosphorylierungsmutanter UAS toy -Stämme

Die fertigen Transformationskonstrukte wurden separat in frühe Embryonen des *Drosophila*-Stammes BL24871 injiziert, um entsprechende transgene Fliegenstämme zu erzeugen (Injektionsstatistik siehe Tab. 4.3) (3.2.27). Die Integration der Transformationskonstrukte erfolgte dabei über das PhiC31-System, sodass die verschiedenen Konstrukte jeweils am gleichen genomischen Ort (Chr. 3L, 65B2) integrierten. Durch die gezielte Integration können Positionseffekte bei zukünftigen vergleichenden Analysen vernachlässigt werden.

Tab. 4.3: Injektion der mutierten pUAS $attB$ - toy -Transformationskonstrukte in BL24871-Embryonen. Aufgelistet sind die Anzahl der injizierten Embryonen sowie der daraus hervorgegangenen Larven und Fliegen. Die Transformationseffizienz ergibt sich aus der Anzahl der erhaltenen Transformanten bezüglich der adulten Fliegen.

Konstrukt	pUAS $attB$ -				
	$toyPM$	$toyPM_E$	$toyDM$	$toyTM$	$toyVM$
Embryonen	857	2 297	634	496	1 619
Larven	123	204	38	29	97
% Larven	14,35 %	8,9 %	5,9 %	5,9 %	5,8 %
Fliegen	92	158	28	24	57
% Fliegen	10,6 %	6,9 %	4,3 %	4,7 %	3,4 %
Unabhängige Transformanten	1	1	1	2	2
Transformations-effizienz bzgl. Fliegen	1,1 %	0,5 %	3,6 %	8,2 %	3,4 %

Der Nachweis der Integration erfolgte molekular durch eine PCR auf genomische DNA der entsprechenden Stämme und mit den Primern ToyCB5' und $attP$ -R (analog zu 4.1.1) (3.2.14, 3.2.15). Bei den Konstrukten sind unterschiedliche PCR-Fragmente zu erwarten. Die Größendifferenz von 98 bp ergibt sich aus einem Stück 3'-UTR das bei der Restriktion mit ausgeschnitten wurde und folglich in die Konstrukte pUAS $attB$ - $toyDM$, - TM , und - VM mit eingebracht wurde. ToyWT, - PM und - PM_E werden durch ein PCR-Produkt von 1 161 bp bestätigt, während bei den zusammengesetzten Konstrukten ein PCR-Produkt von 1 259 bp zu erwarten war (Abb. 4.18).

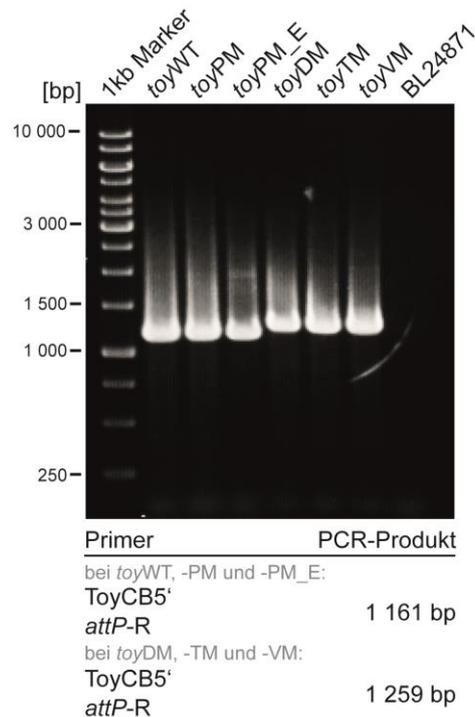


Abb. 4.18: PCR-Nachweis der zielgerichteten genomischen Integration der UAS_{toy}-Transformationskonstrukte. Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte. Die PCR erfolgte mit genomischer DNA des jeweiligen erzeugten transgenen UAS_{toy}-Stammes und den Primern ToyCB5' und *attP*-R. Das zu erwartende PCR-Produkt hat jeweils eine Länge von 1 161 bp bzw. 1 259 bp. Als (Negativ-) Kontrolle diente DNA des BL24871-Injektionsstammes mit leerer *attP*-Rekombinationssequenz, hier war kein PCR-Produkt zu erwarten.

Nachdem die gewünschten transgenen Fliegenstämme erzeugt waren, konnten diese im Folgenden zu Fehlexpressionsanalysen mit Hilfe des UAS/Gal4-Systems eingesetzt werden. Da alle UAS_{toy}-Konstrukte aufgrund des gleichen Integrationsortes auch den gleichen Positionseffekten unterliegen, ist es nun möglich, vergleichende Analysen durchzuführen. Änderungen in den resultierenden Phänotypen sind auf den durch die eingeführten Mutationen verursachten geänderten Phosphorylierungsstatus zurückzuführen.

4.4.3 Zielgenaktivierung durch Fehlexpression der phosphorylierungsmutanten UAS_{toy}-Konstrukte

Nun war konkret zu testen, ob die phosphorylierungsmutanten UAS_{toy}-Konstrukte in verändertem Maße ihr Zielgen *ey* aktivieren. Die Bindung des Transkriptionsfaktors Toy an den augenspezifischen Enhancer von *ey* erfolgt über die N-terminale Paired Domäne (PD) von Toy (Czerny et al., 1999; Hauck et al., 1999), wohingegen die C-terminale Transaktivierungsdomäne (TAD) von Toy Einfluss hat auf das Maß der Aktivierung der *ey*-Expression (Punzo et al., 2004).

Die gefundenen Hipk-Phosphorylierungsstellen in Toy betreffen sowohl die PD als auch die TAD und könnten somit die Transaktivierung von *ey* auf verschiedene Weise beeinträchtigen.

Um die Fähigkeit der phosphorylierungsmutanten Form von Toy zur direkten transkriptionellen Aktivierung von *ey* zu testen, wurde das nicht-mutierte Konstrukt *UAS_{toy}WT* bzw. das phosphorylierungsmutante Konstrukt *UAS_{toy}VM* in einem *eylacZ*-Stamm flügel-spezifisch fehlexprimiert. Gegenüber einer Anti-Ey-Antikörperfärbung bietet diese Vorgehensweise den Vorteil, dass speziell die Aktivierung des augenspezifischen Enhancers nachgewiesen wird und posttranskriptionelle Einflüsse außer Acht gelassen werden können.

Der *eylacZ*-Stamm besitzt die Sequenz des zweiten Introns von *eyeless* (*ey*), welche den augenspezifischen Enhancer E3.6 von *ey* beinhaltet (Hauck et al., 1999), kombiniert mit dem *lacZ*-Reportergen genomisch integriert in allen Zellen des Organismus. Bindet und aktiviert gezielt exprimiertes Toy den augenspezifischen Enhancer in diesen *eylacZ*-Konstrukten, wird das Reportergen *lacZ* exprimiert. Das Genprodukt β -Galactosidase (β -Gal) kann dann mittels indirekter Anti- β -Gal-Antikörperfärbung nachgewiesen werden. Das Treiberkonstrukt *MS1096Gal4* und je eines der *UAS_{toy}*-Konstrukte wurden sukzessive in den *eylacZ*-Stamm eingekreuzt (3.2.28). Die aus der zweiten Kreuzung resultierenden Larven wurden präpariert, fixiert und einer Antikörper-Doppelfärbung unterzogen (Anti-Toy/Anti- β -Gal) (3.2.31). Die Doppelfärbung mit Anti-Toy-Antikörper war notwendig, um zu selektieren, in welchen Flügelscheiben die Fehlexpression der *UAS_{toy}*-Konstrukte erfolgt ist. Anschließend wurden die Toy-positiven Flügelscheiben auf induzierte *lacZ*-Expression hin untersucht und diese konfokalmikroskopisch dokumentiert (Abb. 4.19) (3.2.33, 3.2.34).

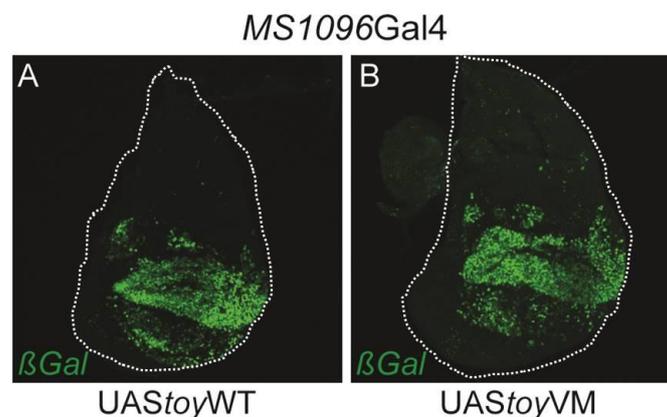


Abb. 4.19: Aktivierung der *eylacZ*-Expression durch Fehlexpression von *UAS_{toy}WT* bzw. *UAS_{toy}VM*. Flügel-Imaginalscheiben von Larven des dritten Larvalstadiums (L3) aus Larven eines *eylacZ*-Stammes (*ey*-Enhancer E3.6 als regulatorische Region vor dem Reportergen *lacZ*), in denen mit dem Treiber *MS1096Gal4* (A) wildtypisches *UAS_{toy}WT* bzw. (B) vollmutiertes *UAS_{toy}VM* exprimiert wurde. Die Expression von β -Galactosidase (β -Gal) wurde durch indirekte Antikörperfärbung nachgewiesen (Anti- β -Gal+AlexaFluor[®]488 (grün)).

Die resultierende β -Gal-Expression in den Flügelscheiben nach Fehlexpression des mutierten UAS toy VM-Konstrukts (Abb. 4.19, B) zeigt keinen signifikanten Unterschied zum wildtypischen UAS toy WT-Konstrukt (Abb. 4.19, A). Prinzipiell scheint auch die Phosphorylierungsmutante ToyVM in der Lage zu sein, an den augenspezifischen Enhancer zu binden und somit die Expression des Reportergens zu aktivieren. Die durch Toy vermittelte Bindung/Aktivierung von *ey* im Kontext der Induktion ektopischer Augen scheint unbeeinflusst von der Mutation der Hipk-Phosphorylierungsstellen in Toy. Somit kann davon ausgegangen werden, dass *ey* als direktes Zielgen von Toy auch durch die phosphorylierungsmutante Form aktiviert werden kann.

4.4.4 Rescue-Analyse der letalen *toy*-Allelkombination *toy^{hdl}/toy^{G7.39}*

Eine Nullmutante für das Gen *toy* wurde bisher noch nicht beschrieben. Das *toy*-Allel *toy^{hdl}* (*headless*, *hdl*) führt jedoch homozygot zu Letalität und kann funktionell einer Nullmutante gleich gestellt werden. Das Transkript von *toy^{hdl}* ist gegenüber der wildtypischen Variante im 3'-Bereich stark verkürzt, sodass ein entsprechend verkürztes Toy^{hdl} Protein gebildet wird, dem der C-terminale Bereich ab Aminosäure 46 der Homeodomäne (HD) fehlt (Kronhamn et al., 2002). Ein Drittel der homozygoten *toy^{hdl}*-Mutanten stirbt embryonal oder larval, zwei Drittel sterben aufgrund ihrer Unfähigkeit zu schlüpfen als adulte Pharate (mit fehlenden Kopfstrukturen) in ihrer Puppenhülle (Kronhamn et al., 2002). Das auf einer Punktmutation basierende hypomorphe Allel *toy^{G7.39}* ist funktionell mit *toy^{hdl}* vergleichbar, da es homozygot ebenfalls den letalen pharaten Phänotyp hervorbringt (Flister et al., nicht veröffentlicht). Kombiniert man die beiden Allele *toy^{hdl}* und *toy^{G7.39}* miteinander, kommt es ebenfalls zu dem letalen pharaten Phänotyp. Durch eine exogene Expression von wildtypischer *toy*cDNA mit Hilfe des UAS/Gal4-Systems kann die Überlebensrate bzw. der pharate Phänotyp von homozygot vorliegendem *toy^{hdl}* sowie *toy^{G7.39}* teilweise gerettet werden (Jacobsson et al., 2009; Blanco et al., 2010).

Diese Beobachtung diente im Folgenden als Grundlage, um zu testen, wie die Phosphorylierungsmutante ToyVM im Vergleich zu wildtypischem ToyWT in der Lage ist, die auftretende Letalität zu retten, wenn die beiden mutanten Allele *toy^{hdl}* und *toy^{G7.39}* kombiniert vorliegen. Anhand des UAS/Gal4-Systems sollten die Konstrukte UAS toy WT und UAS toy VM exogen in dem genetischen *toy^{hdl}/toy^{G7.39}*-Hintergrund exprimiert werden. Hierzu wurden zunächst durch sukzessive Kreuzungen entsprechende Effektorstämme erzeugt, die jeweils homozygot zwei Kopien eines der UAS toy -Konstrukte (3. Chr.) und außerdem heterozygot das *toy^{G7.39}*-Allel (4. Chr.) besitzen: UAS toy /UAS toy ; *toy^{G7.39}/Ci^D*. Das *toy^{G7.39}*-Allel ist dabei balanciert

über ein Balancerchromosom mit dem dominanten Marker Cubitus interruptus-Dominant (Ci^D ; 4. Chr.), der einen leicht erkennbaren Flügelphänotyp hervorbringt und somit zur Selektion der Folgegeneration verwendet werden kann.

Anschließend wurden diese Effektorstämme mit einem Treiberstamm verkreuzt (3.2.28), der neben dem Gal4-Treiber-Konstrukt außerdem das toy^{hd1} -Allel, ebenfalls balanciert über Ci^D , besitzt: $EEPGal4/EEPGal4; toy^{hd1}/Ci^D$ (*Embryonic Eye Primordium*, EEP). Der EEP-Enhancer entspricht einem 300 bp-DNA-Fragment im regulatorischen 5'-Bereich von toy . Die durch den EEPGal4-Treiber induzierte embryonale Expression von wildtypischer toy -cDNA in den Augen-Primordien reicht aus, um den homozygot letalen toy^{hd1} -Phänotyp zu retten (Blanco et al., 2010). Die resultierende F1-Generation besitzt uniform den Treiber EEPGal4 und das jeweilige UAS toy -Konstrukt und exprimiert somit je nach Kreuzung die phosphorylierungsmutante Form toy^{VM} bzw. die wildtypische Kontrolle toy^{WT} . Bei 25 % der Nachkommen liegen außerdem beide toy -Allele ($toy^{hd1}/toy^{G7.39}$, 4. Chr.) vor, d.h., diese Individuen bilden kein (funktionelles) endogenes Toy und können nur überleben, wenn sie durch exogene toy -Expression gerettet werden. Weitere 25 % der Nachkommen, die homozygot für Ci^D sind, sterben bereits embryonal. Die geschlüpften $toy^{hd1}/toy^{G7.39}$ -Nachkommen wurden anhand des (dann fehlenden) dominanten Ci^D Markers identifiziert und von heterozygoten Nachkommen mit Marker (toy^{hd1}/Ci^D bzw. $toy^{G7.39}/Ci^D$) unterschieden. Zur Auswertung (Tab. 4.4) wurde die Lebensfähigkeit der $toy^{hd1}/toy^{G7.39}$ -Nachkommen beurteilt.

Tab. 4.4: Rettung von $toy^{hd1}/toy^{G7.39}$ -Nachkommen durch gezielte Expression von UAS toy -Konstrukten. Aufgelistet ist jeweils die Anzahl der Nachkommen der F1-Generation nach Kreuzung der erzeugten Effektorstämme mit dem Treiberstamm $EEPGal4/EEPGal4; toy^{hd1}/Ci^D$. Alle Kreuzungen wurden parallel unter gleichen Bedingungen durchgeführt. Geschlüpfte $toy^{hd1}/toy^{G7.39}$ -Nachkommen wurden anhand des (fehlenden) dominanten Markers Ci^D bzw. nicht Geschlüpfte durch das Vorliegen eines pharaten Phänotyps identifiziert. Die Letalität [%] bezieht sich ausschließlich auf die Gesamtanzahl der $toy^{hd1}/toy^{G7.39}$ -Nachkommen.

Adulte Gesamt	Genotyp	Adulte toy^{hd1}/toy^{hd1} bzw. $toy^{G7.39}/toy^{G7.39}$ -Nachkommen			Letalität [%]
		Gesamt	Geschlüpfte	Nicht Geschlüpfte	
148	$\frac{+}{+}; toy^{G7.39}$	52	-	52	100
68	$\frac{EEPGal4; toy^{hd1}}{EEPGal4 toy^{hd1}}$	20	-	20	100
Adulte $toy^{hd1}/toy^{G7.39}$-Nachkommen					
72	$\frac{EEPGal4; toy^{hd1}}{+ toy^{G7.39}}$	25	-	25	100
212	$\frac{EEPGal4; toy^{hd1}}{UAStoy^{WT} toy^{G7.39}}$	115	65	50	44
116	$\frac{EEPGal4; toy^{hd1}}{UAStoy^{VM} toy^{G7.39}}$	55	17	38	69

Die Letalitätsrate der (für die mutanten *toy*-Allele homozygoten) Nachkommen der Ausgangsstämme *+/+*; *toy^{G7.39}/Ci^D* und *EEPGal4/EEPGal4*; *toy^{hd1}/Ci^D* sowie des zur Kontrolle (ohne *UAS_{toy}*-Konstrukt, aber mit Treiber-Konstrukt) gekreuzten *EEPGal4/+*; *toy^{G7.39}/toy^{hd1}* liegt jeweils bei 100 %. Das bedeutet, dass keine Rettung des letalen phänotypen stattfindet, so lange im *toy^{hd1}/toy^{G7.39}*-Hintergrund kein exogenes *toy* exprimiert wird. Durch die exogene Expression des wildtypischen *UAS_{toy}WT* kann die Letalitätsrate der *toy^{hd1}/toy^{G7.39}*-Individuen auf 44 % gesenkt werden. Im Vergleich dazu wird die Letalitätsrate durch exogene Expression des mutierten *UAS_{toy}VM* lediglich auf 69 % gesenkt. Somit ist Toy-Protein mit zerstörten Hipk-Phosphorylierungsstellen im Vergleich zu wildtypischem Toy-Protein in geringerem Maße in der Lage, eine *toy*-Nullmutation zu kompensieren. Die kartierten Hipk-Phosphorylierungsstellen (siehe 4.3) scheinen für die korrekte Funktion des Toy-Proteins relevant zu sein. Der gewählte *EEPGal4*-Treiber induziert eine Expression der *UAS_{toy}*-Konstrukte in den Primordien der Augen-Antennen-Imaginalscheiben (Blanco et al., 2010). Das spricht dafür, dass die Hipk-Phosphorylierung von Toy bereits sehr früh während der Augenentwicklung eine Rolle spielen könnte.

4.4.5 Fehlexpressionsanalyse phosphorylierungsmutanter *UAS_{toy}*-Stämme II

Eine gezielte Fehlexpression von *UAS_{toy}* kann in manchen Geweben zu der Ausbildung ektopischer Augen führen (Czerny et al., 1999; Punzo et al., 2004; Salzer & Kumar, 2010). Diese Tatsache wurde im Folgenden genutzt, um die Konsequenzen, welche die eingebrachten Mutationen der *UAS_{toy}*-Konstrukte nach Fehlexpression auf Proteinebene mit sich bringen, zu analysieren. Basierend auf der Annahme, eine phosphorylierungsmutante Form von Toy zeigt eine veränderte Effizienz ektopische Augen zu erzeugen, wurden die mutierten *UAS_{toy}* Konstrukte mit Hilfe des *UAS/Gal4*-Systems (3.2.28) gezielt fehlexprimiert und die Resultate der Fehlexpression mit denen des nicht-mutierten *UAS_{toy}*-Konstruktes verglichen. Durch eine zeit- und gewebespezifische Fehlexpression der *UAS_{toy}*-Konstrukte mit den *Gal4*-Treibern *decapentaplegic Gal4 (dppGal4)* (Staebling-Hampton, 1994) bzw. *MS1096Gal4* (Capdevila & Guerrero, 1994) findet die exogene Expression respektive in allen Imaginalscheiben entlang ihrer anterior-posterioren (A/P) Achse statt, bzw. im dorsalen und ventralen *wing pouch* (spätere Flügelfläche) sowie im dorsalen Flügelansatz. Die resultierenden Phänotypen waren in unterschiedlichen Geweben und Entwicklungsstadien zu erkennen; diese wurden dokumentiert

und phänotypisch bzw. histochemisch ausgewertet (3.2.25, 3.2.31) und sind in den folgenden Abbildungen gezeigt.

Durch die Fehlexpression von *UAS_{toy}* wird die Expression untergeordneter Faktoren des RDGNs aktiviert, deren Genprodukte wiederum dann durch entsprechende Antikörperfärbungen nachweisbar sind. Innerhalb des RDGNs stellen *ey* und *so* direkte Zielgene von *Toy* dar (Czerny et al., 1999; Hauck et al., 1999; Punzo et al., 2002, 2004) und deren Genprodukte aktivieren ihrerseits den im RDGN weiter untergeordneten Faktor *eyes absent (eya)*/Eya (Halder et al., 1998; Ostrin et al., 2006). Der Nachweis von Eya diente als Indikator für die Aktivierung des RDGNs. Des Weiteren wurde die Aktivierung des pan neuronalen Markers *Embryonic lethal abnormal vision (Elav)* zur Auswertung herangezogen. Ein Nachweis von Elav zeigt, dass Zellen neuronalen Charakter angenommen haben (Robinow & White, 1988 und 1991) und deutet bei der Entstehung ektopischer Augen darauf hin, dass sich Photorezeptoren entwickelt haben. Zur Einschätzung des Potentials, solche ektopischen Augen zu erzeugen, wurden nach den entsprechenden Kreuzungen zur Fehlexpression der verschiedenen *UAS_{toy}*-Konstrukte die Bein-, Flügel und Augen-Antennen-Imaginalscheiben (EADs) des dritten Larvalstadiums (L3) präpariert, fixiert und eine indirekte Dreifach-Antikörperfärbung durchgeführt (Anti-*Toy*, -Eya und -Elav) (3.2.31). Die Dokumentation erfolgte konfokal (3.2.34). In Abb. 4.20 sind die resultierenden Färbungen der Beinscheiben gezeigt.

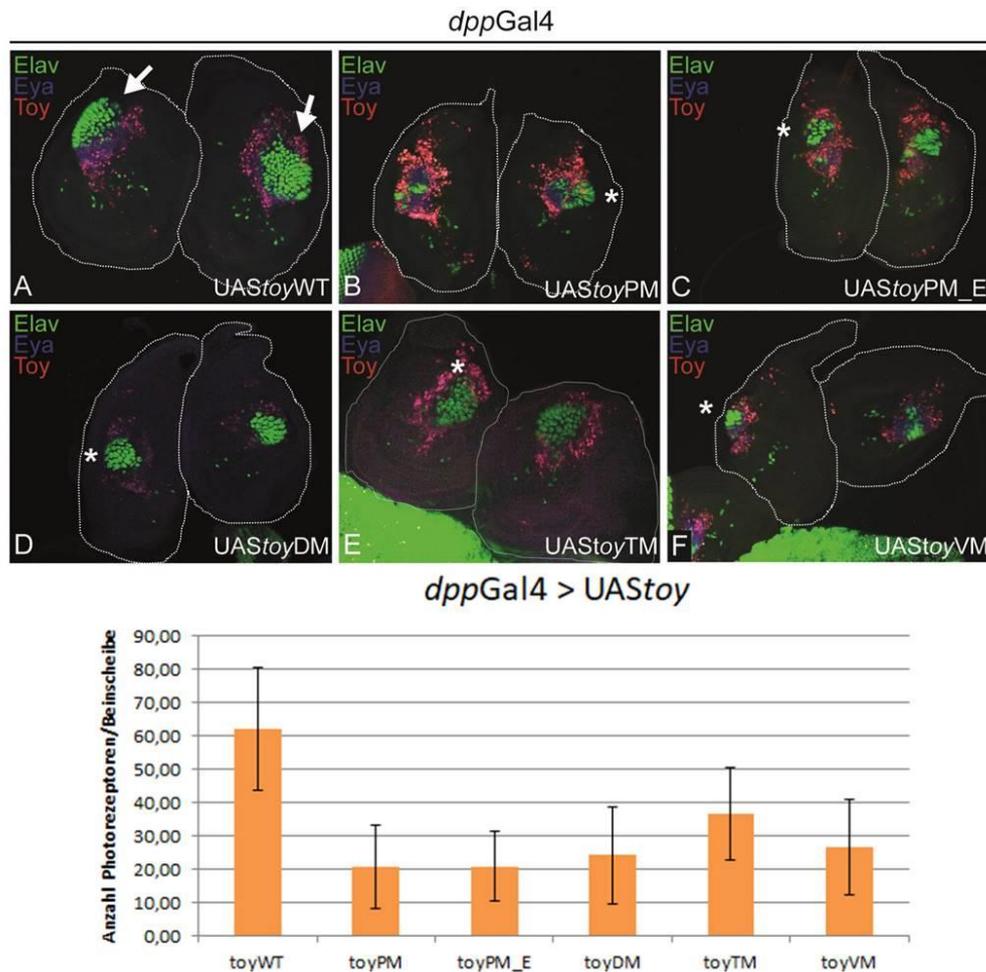


Abb. 4.20: Fehlexpression der UAStoy Phosphorylierungsmutanten in Bein-Imaginalscheiben. (A-F) Bein-Imaginalscheiben der F1 aus *dppGal4>UAStoy*WT, -PM, -PM_E, -DM, -TM und -VM. Die Expression von Toy, Eya und Elav wurde durch indirekte Antikörper-Färbung nachgewiesen (Anti-Toy+AlexaFluor®568 (rot); Anti-Eya+AlexaFluor®647 (blau) und Anti-Elav+AlexaFluor®488 (grün)). Pfeile: Elav-positives Areal („retinales Feld“) als Referenzwert. Sterne: Mit dem Referenzwert zu vergleichende retinale Felder der Phosphorylierungsmutanten. Anterior links, Dorsal oben. **Unten:** Mittlere Werte der Anzahl an Elav-positiven Photorezeptorzellen von ~20 Beinscheiben je Kreuzung. Die Elav-positiven Zellen jeder Bein-Imaginalscheibe wurden mit der *Cell Counter*-Anwendung von ImageJ in allen Schnittebenen gezählt.

Die Fehlexpression des nicht-mutierten UAStoy-Konstruktes führt im Gewebe der Bein-Imaginalscheiben zu Toy-Proteinexpression. Außerdem ist in allen Zellen, in denen die Toy-Expression angeschaltet ist, auch Eya nachweisbar (Abb. 4.20, A). Eya ist darüber hinaus in zahlreichen benachbarten Zellen ektopisch induziert worden. In einem Teil der Eya-positiven Zellen (diejenigen, die nicht Toy-positiv sind) wird Elav gebildet (Abb. 4.20, A). Seine Anwesenheit zeigt an, dass ausdifferenzierte Neuronen entstanden sind. Diese sind vergleichbar mit den entstehenden Photorezeptorzellen der EADs und deuten hier auf die Entstehung eines ektopischen Auges hin. Anhand dieses „retinalen Feldes“ wurde die Fähigkeit verglichen, mit der die verschiedenen Phosphorylierungsmutanten ektopische Augen induzieren können. Keine der Phosphorylierungsmutanten ist gleichermaßen befähigt, ektopische Augen zu induzieren wie nicht-mutiertes Toy (Abb. 4.20, B-F). In allen Phosphorylierungsmutanten ist zwar in

vergleichbaren Mengen Toy gebildet worden, allerdings wird weniger Eya gebildet und das resultierende retinale Feld fällt deutlich kleiner aus. Die Elav-positiven Zellen von ~20 Bein-Imaginalscheiben je Kreuzung wurden gezählt und die resultierende Anzahl als mittlerer Wert je Kreuzung aufgeführt (Abb. 4.20, unten). Dabei wurde der dreidimensionale Charakter der ektopischen Augen berücksichtigt, indem alle Schnittebenen der Konfokalaufnahmen bei der Zellzählung analysiert wurden. Die mittleren Zellzahlen bestätigen die Tendenz, dass durch die Expression von wildtypischem Toy mehr Elav-positive Zellen hervorgerufen werden, als durch die Expression der phosphorylierungsmutanten Toy Varianten. Da der Treiber *dppGal4* in verschiedenen Geweben die Expression der UAS-Konstrukte anschaltet, konnten aus den gleichen Larven, aus denen die o.g. Bein-Imaginalscheiben untersucht wurden, auch die Augen-Antennen-Imaginalscheiben (*eye-antennal discs*, EADs) analog untersucht werden (Abb. 4.21).

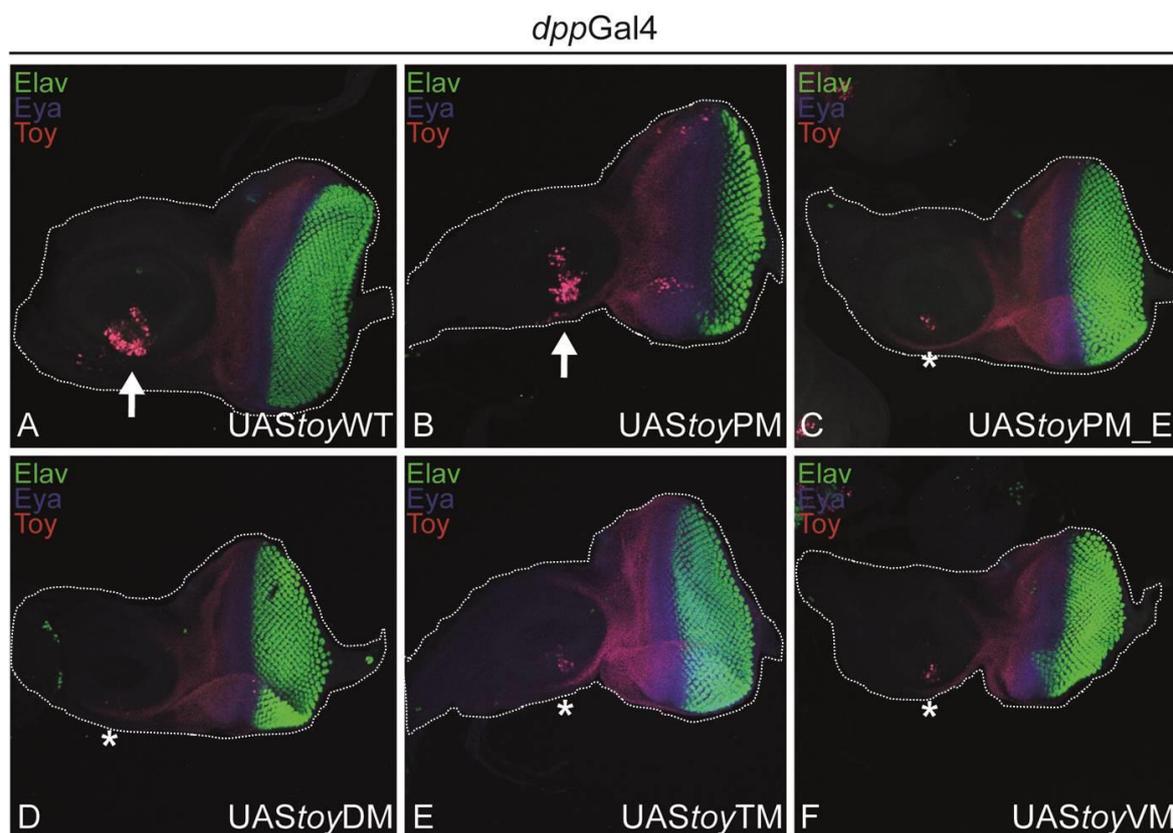


Abb. 4.21: *dppGal4*-Fehlexpression der phosphorylierungsmutanten UAS*toy* Varianten in Augen-Antennen-Imaginalscheiben. (A-F) Augen-Antennen-Imaginalscheiben (*eye-antennal discs*, EADs) von Larven des dritten Larvalstadiums (L3) der F1-Generation aus den Kreuzungen *dppGal4*>UAS*toy*WT, -PM, -PM_E, -DM, -TM und -VM. Die Expression von Toy, Eya und Elav wurde durch indirekte Antikörper Dreifach-Färbung nachgewiesen (Anti-Toy+Alexa Fluor®568 (rot); Anti-Eya+AlexaFluor®647 (blau) und Anti-Elav+AlexaFluor®488 (grün)). Pfeile deuten auf resultierende Areale der gezielten Toy-Expression im Antennen-Bereich, die der *dppGal4*-Expressionsdomäne entsprechen. Sterne markieren damit zu vergleichende reduzierte Toy-Expressionsareale. Anterior links, Dorsal oben.

Die *dppGal4*-induzierte Expression der verschiedenen *UAStoy*-Konstrukte war in den zusammengesetzten EADs jeweils im ventralen Bereich der Antennenscheibe, am posterioren Rand der Augenscheibe sowie unmittelbar anterior der wandernden Furche zu erwarten. Auffällig ist die unterschiedliche Größe der ektopischen Toy-Expressionsdomänen im Antennenbereich. Die durch gezielte Fehlexpression von *UAStoyWT* bzw. -PM (Abb. 4. 21; A, B) hervorgerufenen Toy-Expressionsdomänen sind signifikant größer, als die der anderen Konstrukte (*UAStoyPM_E*, -DM, -TM und -VM; Abb. 4.21, C-F). Außerdem ist zu erkennen, dass die Fehlexpression von *UAStoyWT* bzw. -PM zwar die Expression des untergeordneten RDGN-Faktors *eya* mit sich bringt, dass aber das gebildete Protein Eya zellautonom nur in den Zellen bleibt, in denen auch Toy nachgewiesen werden kann (Abb. 4.21 A, B). Elav wird in diesen Zellen in geringen Mengen auch gebildet, allerdings kommt es nicht zur Differenzierung zu Photorezeptoren. Im Vergleich dazu kann man im Bereich der Augenscheibe sehen, dass die endogene Verteilung des Proteins Eya normalerweise nicht-zellautonom den Bereich der Toy-positiven Zellen im Zuge der Augenentwicklung überschreitet und dass dann in den Zellen, in denen Eya nachweisbar ist, die aber kein Toy (mehr) bilden, Elav gebildet wird und es zur Differenzierung von Photorezeptoren kommt. Der deutlichste Unterschied zeigt sich, wenn man die induzierte Expression von *UAStoyPM* und *UAStoyPM_E* vergleicht (Abb. 4.21. B, C), dieser ist konkret auf den veränderten Phosphorylierungsstatus der Hipk-Phosphorylierungsstelle Ser¹²¹ zurückzuführen.

Im Bereich der Augenscheiben ist (bis auf einzelne Zellen in Abb. 4.21, B) keine ektopische Toy-Expression zu erkennen. Auch die Größe des sich entwickelnden retinalen Feldes ist, wenn überhaupt nur minimal reduziert (Anzahl der Ommatidienreihen bzw. Größe der Augenscheiben in Abb. 4.21, B, F). Die Anti-Toy-Antikörperfärbung weist hier lediglich die endogene Toy-Expression nach (Abb. 4.21, A-F). Die Anti-Eya-Färbung weist ihrerseits die endogene Eya-Expression nach. Eine leicht verstärkte Eya-Expression ist bei einer induzierten Expression von *UAStoyPM* und -*toyVM* zu erkennen (Abb. 4.21, B, F). Die Elav-Expression ist auf die endogene Expression beschränkt (Abb. 4.21, A-F).

Bei der gezielten *dppGal4*-Fehlexpression in Flügelscheiben zeigte sich kein Unterschied zwischen den verschiedenen *UAStoy*-Konstrukten. Die Flügelscheiben wurden aus denselben Larven der o.g. Kreuzungen präpariert und dreifach gefärbt (Anti-Toy, -Eya und -Elav) (3.2.31). In jeder Flügelscheibe wird im *dpp*-Expressionsmuster Toy exprimiert und im deckungsgleichen Muster Eya gebildet. Einige wenige Flügelscheiben zeigen einzelne Zellen mit Elav-Expression, diese stammen alle aus der Fehlexpression mit *UAStoyWT* (nicht gezeigt).

Durch die Auswertung der Antikörperfärbungen von larvalen Geweben nach induzierter Expression der phosphorylierungsmutanten *UAS_{toy}*-Konstrukte wird deutlich, dass jedes Gewebe separat ausgewertet werden sollte. Dies spiegelt den jeweils individuellen molekularen Kontext wider, der in den einzelnen Geweben vorliegt. Insgesamt scheint die transaktivierende Fähigkeit von Toy bei zerstörten Hipk-Phosphorylierungsstellen beeinträchtigt zu sein, was sich am deutlichsten bei der Induktion der in Bein-Imaginalscheiben induzierten ektopischen Augen widerspiegelt. Die gezielte Expression von *UAS_{toy}* im Gewebe der Antennenscheiben reicht nicht aus um ektopische Augen zu erzeugen. Die Induktion des RDGN bis zur *eya*-Expression findet statt, aber das gebildete Eya-Protein bleibt im Gegensatz zu den Prozessen in der normalen bzw. ektopischen Augenentwicklung zellautonom in den ebenfalls Toy-positiven Zellen.

Auch in adulten Strukturen sind Unterschiede darstellbar. Durch die Expression der mutierten *UAS_{toy}*-Konstrukte mit dem *dppGal4*-Treiber ist die Beinentwicklung gestört und im adulten Stadium sind ektopische Augen an den Beinen zu erkennen (Abb. 4.22). Die Größe der gebildeten ektopischen Augen wurde als phänotypisches Kriterium zur Auswertung verwendet (3.2.25).

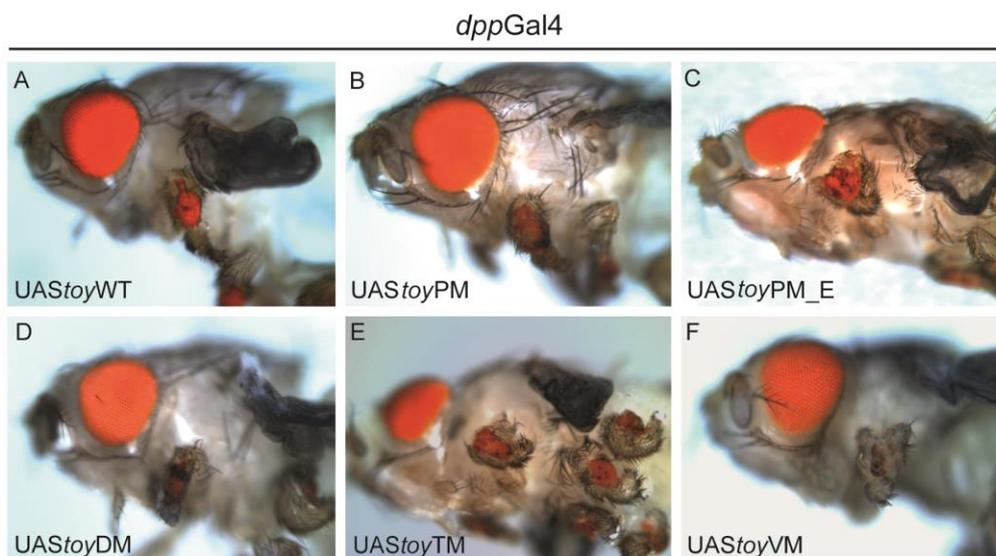


Abb. 4.22: Vergleich der nach gezielter Fehlexpression resultierenden ektopischen Augengrößen der mutierten *UAS_{toy}*-Stämme. (A-F) Fliegen der F1-Generation nach Kreuzung des Treiberstammes *decapentaplegic-Gal4* (*dppGal4*) mit den Effektor Stämmen *UAS_{toy}*WT, -PM, -PM_E, -DM, -TM und -VM gemäß UAS/Gal4-System.

Im Vergleich zu den ektopischen Augen, wie sie durch die Fehlexpression von nicht-mutiertem *UAS_{toy}*WT entstehen (Abb. 4.22, A), bringt die Fehlexpression der phosphorylierungsmutanten Formen von Toy (Abb. 4.22, B-F) im Mittel etwa gleich große ektopische Augen hervor. Die Größe der resultierenden ektopischen Augen ist allerdings deshalb nicht signifikant zu unterscheiden, weil die Spannweite und damit die Standardabweichung beim Vermessen der ektopischen Augengrößen zu groß sind. Die Auswertung der adulten Fliegen nach

Fehlexpression mit dem *dppGal4*-Treiber ist damit kritisch zu betrachten. Die große Spannweite der ektopischen Augengrößen könnte unter anderem dazu geführt haben, dass manche adulte Fliegen mit sehr großen ektopischen Augen nicht in der Lage waren, aus ihrer Puppenhülle zu schlüpfen und daher bei der Auswertung nicht berücksichtigt wurden. Andererseits fallen frisch geschlüpfte Fliegen mit ektopischen Augen leicht in den Futterbrei und bleiben auf diese Art bei der Auswertung außen vor. Um die genannten Schwierigkeiten zu umgehen, wurde folgend für die Fehlexpression der *UAS_{toy}*-Varianten ein anderer Treiberstamm verwendet, der zwar ebenfalls ektopisches Augengewebe hervorrufen kann, es aber in diesem Fall nicht zur Beeinträchtigung des Schlupfverhaltens kommt und die adulten Tiere auch nicht im Futterbrei versinken.

Durch die Fehlexpression der *UAS_{toy}*-Konstrukte mit *MS1096Gal4* im Flügelgewebe wird die Flügelentwicklung sichtbar gestört (Abb. 4.23). Außerdem wird in geringen Mengen retinales Gewebe in den Flügeln induziert. Die Tendenz, retinales Gewebe im Flügel zu induzieren, unterscheidet sich zwischen den *Toy*-Phosphorylierungsmutanten, stärkere Phänotypen zeigen rot pigmentierte Flecken aus ektopischem, retinalen Gewebe. Dies wurde jedoch nur bei wenigen Fliegen aus den Kreuzungen mit *UAS_{toy}WT*, *-PM* und *-PM_E* beobachtet (Abb. 4.23, A', B', siehe Pfeile), schwächere Phänotypen äußern sich in vereinzelten „knotenähnlichen“ Strukturen (Abb. 4.23, C', D', E', siehe Pfeile).

MS1096Gal4

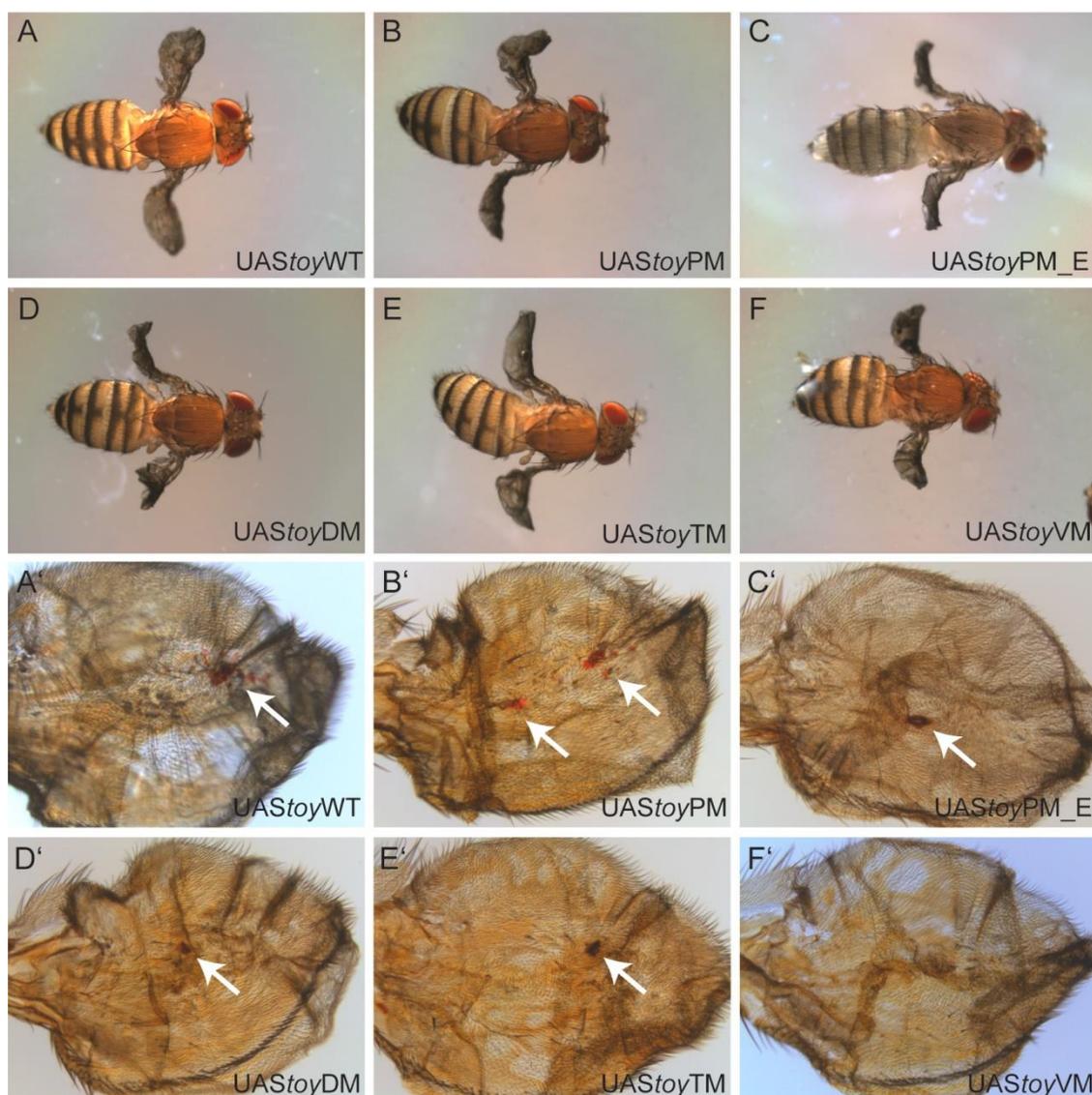


Abb. 4.23: Flügelphänotypen nach gezielter Fehlexpression der mutierten *UAStoy*-Konstrukte. (A-F) Fliegen der F1-Generation nach Kreuzung gemäß des UAS/Gal4-Systems mit dem Treiberstamm MS1096Gal4 und den Effektor Stämmen *UAStoy*WT, -PM, -PM_E, -DM, -TM und -VM. (A'-F') Einzelne Flügel aus A-F, lichtmikroskopisch aufgenommen. Pfeile deuten auf retinales Gewebe. Proximal ist links.

Vor allem der Unterschied zwischen *toy*PM und *toy*PM_E ist deutlich erkennbar. Beide Mutationen betreffen die Paired Domäne von Toy, in *toy*PM ist die Hipk-Phosphorylierungsstelle Ser¹²¹ zerstört (Ser→Ala) und bei *toy*PM_E ist sie so manipuliert, dass eine konstitutive Phosphorylierung vorgegeben ist (Ser→Glu).

Betrachtet man die Ergebnisse der Fehlexpressionen der *UAStoy*-Konstrukte, so wirkt sich eine Zerstörung der Hipk-Phosphorylierungsstellen von Toy zwar nicht auf dessen Fähigkeit aus, sein direktes Zielgen *ey* prinzipiell zu aktivieren (4.4.3), jedoch ist die Transaktivierungsfähigkeit von Toy in Bezug auf die frühe Augen- (und Kopf-) Entwicklung (4.4.4) sowie auf die Induktion ektopischen Augengewebes in Bein-, Flügel- und Augen-Antennen-Imaginalscheiben (4.4.5)

deutlich beeinträchtigt. Dabei scheint insbesondere die Phosphorylierung von Ser¹²¹ innerhalb der Paired Domäne (PD) die Transaktivierungsfähigkeit von Toy herabzusetzen, wie durch den direkten Vergleich der UAS_{toy}PM bzw. UAS_{toy}PM_E in den Abbildungen 4.23, B' und C' sowie 4.21, B und C gezeigt werden konnte.

Die Transaktivierungsaktivität von Toy wird nicht ausschließlich von seiner C-terminalen TAD, sondern unter anderem auch von seiner N-terminalen PD bestimmt, dies konnte bereits durch Deletionsanalysen gezeigt werden, bei denen die Expression von UAS_{toy}-Konstrukten bzw. Toy ohne PD nicht in der Lage waren, Reportergerkonstrukte zu aktivieren (Weasner et al., 2009).

4.5 Analyse genetischer Interaktionen der *hipk* mit Faktoren des RDGN

Die Analyse der Enzym-Substrat-Beziehung zwischen Hipk und Toy (bzw. Ey) *in vitro* und der Protein-Protein-Interaktion zwischen Hipk und Toy bzw. Ey *in vivo* lassen darauf schließen, dass die Hipk auf posttranslationaler Ebene Einfluss auf die Augenentwicklung von *Drosophila* nimmt. In ihrer Funktion als Transkriptionsfaktoren sind Toy und Ey Schlüsselfaktoren des molekularen Netzwerkes, welches die Augenentwicklung steuert. Da es denkbar ist, dass die Hipk neben Toy und Ey noch weitere RDGN-Faktoren beeinflussen kann, wurde dies anhand von Kreuzungsanalysen untersucht.

Mit dem UAS/Gal4-System kann man sowohl die Funktion eines einzelnen Genes, aber auch die Wechselwirkungen zweier Genprodukte miteinander analysieren. Hierzu werden die zu analysierenden Faktoren zunächst einzeln fehlexprimiert und phänotypisch ausgewertet. Anschließend koexprimiert man die zu analysierenden Faktoren so, dass die beiden zu analysierenden Genprodukte im gleichen zeit- und gewebespezifischen Hintergrund, wie zuvor die Einzelfaktoren, in räumliche Nähe zueinander gelangen. Im Fall einer Wechselwirkung auf molekularer Ebene würde man auf eine Veränderung der zuvor beobachteten Phänotypen schließen. In der vorliegenden Analyse wurde jeweils zusätzlich zur Fehlexpression eines RDGN-Faktors die Hipk-Menge entweder durch gleichzeitige Überexpression eines UAS_{hipk}-Konstruktes erhöht oder herunterreguliert mittels Expression eines UAS_{hipk}RNAi-Konstruktes. Durch ein zusätzliches Einkreuzen des Konstruktes UAS_{Dicer-2} (*Dcr-2*) wird die RNAi-vermittelte Herunterregulation noch verstärkt. Die daraus resultierenden Änderungen der Phänotypen wurden anschließend vergleichend ausgewertet.

4.5.1 Augenspezifische Fehlexpression von RDGN-Faktoren bei unterschiedlicher *hipk*-Dosis

Um mit Hilfe des UAS/Gal4-Systems verschiedene RDGN-Faktoren augenspezifisch und gleichzeitig bei entweder erhöhter oder reduzierter Hipk-Menge zu exprimieren, wurde der Treiberstamm *eyGal4* (2. Chr) sowie die rekombinierten Treiberstämme *eyGal4*, *UAShipk* (2. Chr.), *eyGal4*, *UAShipkRNAi* (2. Chr.) und *UASDcr-2*; *eyGal4*, *UAShipkRNAi* (2. Chr.) verwendet (3.2.28). Bei *Drosophila* können rekombinierte Stämme, bei denen bestimmte genetische Elemente dauerhaft miteinander gekoppelt vorliegen, relativ einfach erzeugt werden. Fliegen mit jeweils einem der Elemente werden gekreuzt und aufgrund der natürlicherweise stattfindenden Rekombinationsereignisse in der weiblichen Keimbahn von *Drosophila* kommt es in einem Teil der Nachkommen zur Kopplung der gewünschten Elemente. Wird mit solchen Nachkommen durch Balancierung ein Stamm etabliert, kann in Zukunft damit effizienter gekreuzt werden, weil beide genetischen Elemente gemeinsam auf einem Chromosom vererbt werden. Die verwendeten UAS-Konstrukte der RDGN-Faktoren sind jeweils drittchromosomal integriert und liegen homozygot vor: UAS-*twin of eyeless* (UAS t_{oy}), -*eyeless* (UAS e_{y}), -*eyes absent* (UAS e_{ya}), -*sine oculis* (UAS s_{o}), -*dachshund* (UAS d_{ac}), -*eyegone* (UAS e_{yg}) sowie -*optix* (UAS o_{pt}). Das allgemeine Kreuzungsschema der durchgeführten Fehlexpressionsanalyse ist in Abb. 4.24 gezeigt.

$$\begin{array}{c}
 \text{2.Chr.} \\
 \textit{eyGal4} \\
 \hline
 \text{CyO}
 \end{array}
 ;
 \begin{array}{c}
 \text{3.Chr.} \\
 + \\
 \hline
 +
 \end{array}
 \times
 \begin{array}{c}
 \text{2.Chr.} \\
 + \\
 \hline
 +
 \end{array}
 ;
 \begin{array}{c}
 \text{3.Chr.} \\
 \text{UASRDGN} \\
 \hline
 \text{UASRDGN}
 \end{array}$$

F1:

$$\begin{array}{c}
 \textit{eyGal4} \\
 \hline
 +
 \end{array}
 ;
 \begin{array}{c}
 \text{UASRDGN} \\
 \hline
 +
 \end{array}
 \text{ oder }
 \begin{array}{c}
 + \\
 \hline
 \text{CyO}
 \end{array}
 ;
 \begin{array}{c}
 \text{UASRDGN} \\
 \hline
 +
 \end{array}$$

Abb. 4.24: Kreuzungsschema zur augenspezifischen Fehlexpression von RDGN-Faktoren. *eyGal4* steht beispielhaft für einen der vier verwendeten augenspezifischen Treiberstämme. *Curly of Oyster* (CyO) ist ein dominanter Marker des zweitchromosomalen Balancerchromosoms. Da der Treiberstamm heterozygot/balanciert ist und die UASRDGN-Stämme homozygot sind, resultieren in der F1-Generation zwei phänotypisch unterscheidbare Genotypen. Zur Auswertung wurden männliche Fliegen der F1-Generation herangezogen, die nicht den dominanten Marker des Balancers (CyO, gebogene Flügel) aufwiesen (roter Kasten).

Die Kreuzungen wurden zeitgleich und unter gleichen Bedingungen angesetzt, um Schwankungen in der Ausprägung der Phänotypen aufgrund äußerer Einflüsse auszuschließen. Die adulten Fliegen der F1-Generation wurden anhand phänotypisch erkennbarer Marker auf den gewünschten Genotyp hin selektiert und entsprechende Tiere wurden unter gleichbleibenden Bedingungen dokumentiert (3.2.25). In Abb. 4.25 sind die Komplexaugen der männlichen F1-Generation gezeigt, die aus den Kreuzungen hervorgegangen sind.

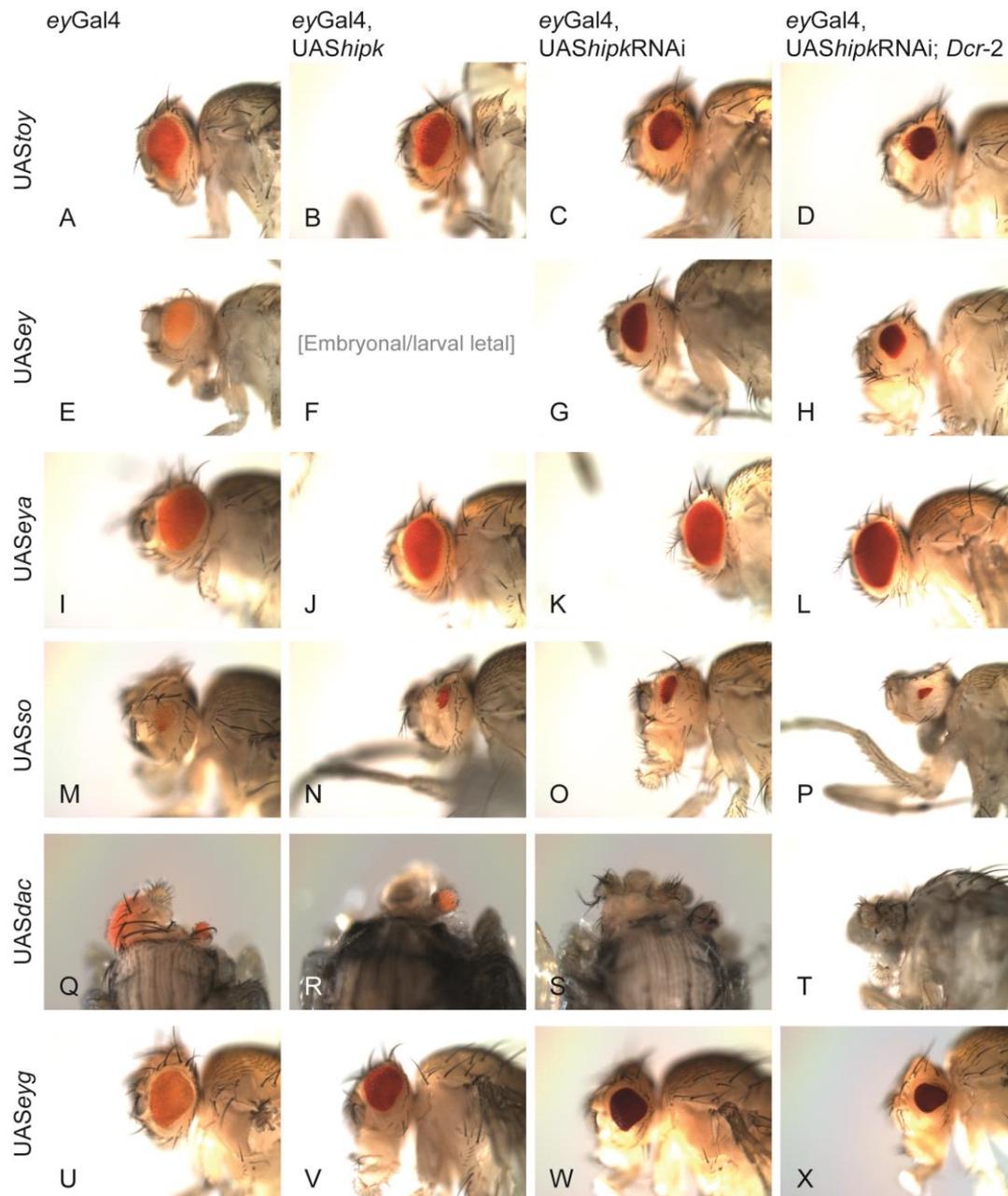


Abb. 4.25: Augenspezifische Fehlexpression von RDGN-Faktoren. (A-X) Mittels UAS/Gal4-System wurden die RDGN-Faktoren *UAStoy*, *-ey*, *-eya*, *-so*, *-dac* und *-eyg* mit den Treiberstämmen *eyGal4*; *eyGal4*, *UAShipk*; *eyGal4*, *UAShipkRNAi* und *UASDicer-2* (*Dcr-2*, X-Chr.); *eyGal4*, *UAShipkRNAi* gekreuzt. Zur Auswertung wurden männliche Fliegen der F1-Generation herangezogen. Jede Zeile entspricht einem UAS-Effektorstamm, der mit vier verschiedenen Treiberstämmen gekreuzt wurde. (F) Der gewünschte Genotyp wirkt sich embryonal/früh larvalletal aus. Q-S: Dorsal, sonst lateral.

Durch die augenspezifische Fehlexpression der RDGN-Faktoren *UAStoy*, *-ey*, *-so* und *-eyg* wird bei den Fliegen der F1-Generation die Augenentwicklung gehemmt und es resultiert eine reduzierte Augengröße, die kleiner ist, als ein wildtypisches Auge (Abb. 4.25, A, E, M und U). Bei der Fehlexpression von *UASdac* ist der repressive Effekt stärker, sodass auch die Kopfkapsel betroffen ist, bis hin zur Bildung von sogenannten *halfheads*, bei denen die halbe Kopfkapsel fehlt (Abb. 4.25, Q). Die Fehlexpression von *UASopt* führte in allen Kreuzungen gleichermaßen zu

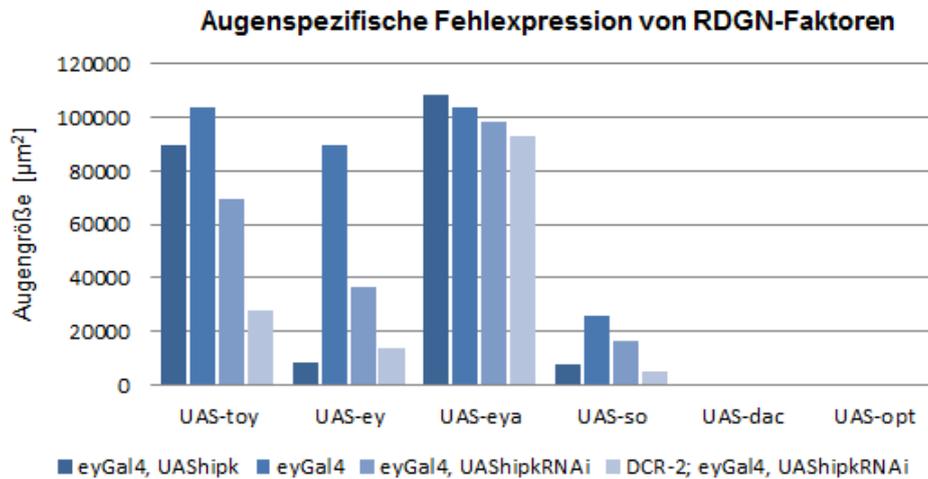
Fliegen ohne Kopfkapsel (*headless*), aber mit Clypeolabrum (nicht gezeigt). Wurde die Hipk-Dosis durch gleichzeitige UAS*hipk* Expression erhöht, wirkte sich der repressive Effekt stärker aus und die resultierenden Augen waren noch kleiner (Abb. 4.25, B, N, R und V). Auffällig ist der resultierende Phänotyp der augenspezifischen Koexpression von UAS*eya* und UAS*hipk*. Aus dieser Kreuzung gehen keine adulten Fliegen hervor (Abb. 4.25, F). Die Nachkommen sterben embryonal bzw. im frühen larvalen Stadium. Einige wenige „Escaper“ schaffen es bis zum adulten Stadium, zeigen aber extrem reduzierte Augen. Wenn die Hipk-Dosis durch die gleichzeitige Expression von UAS*hipk*RNAi herunterreguliert wurde, wirkte sich das ebenfalls stark reprimierend auf die Augengröße aus (Abb. 4.25, C, G, O, S und W). Dieser UAS*hipk*RNAi-Effekt wurde weiterhin verstärkt wenn additive Expression von UAS*Dcr-2* stattfand (Abb. 4.25, D, H, P, T und X). *Dcr-2* ist eine Komponente des RNA *induced silencing complex* (RISC).

Der überexprimierte RDGN-Faktor UAS*eya* führt zu deutlich anderen Beobachtungen. Wenn UAS*eya* einzeln im Auge fehlexprimiert wird, resultieren Fliegen mit wildtypischer Augengröße. Jedoch wirkt sich eine Änderung der Hipk-Menge nicht auf die resultierende Augengröße aus, wenn gleichzeitig *eya* überexprimiert wird. Damit unterscheidet sich dieser RDGN-Faktor von den anderen Faktoren, die bei Überexpression eine Reduktion der Augengröße hervorgerufen haben, die je nach Hipk-Menge variierte.

Eine exakte Hipk-Dosis scheint wichtig, damit die Augenentwicklung normal verläuft. Weicht die Hipk-Menge nach oben oder unten ab, resultiert eine Tendenz zu reduzierter Augengröße, die je nach zusätzlich überexprimiertem RDGN-Faktor zusätzlich beeinträchtigt wird. Die Überexpression von UAS*eya* scheint diesen „Hipk-Dosis-Effekt“ zu retten.

Zur besseren Vergleichbarkeit der resultierenden Phänotypen wurden von der F1-Generation jeder Kreuzung 20 männliche Tiere fotografiert und anschließend die Augengröße vermessen (3.2.29). Die gemittelten Werte sind in Tab. 4.4 grafisch dargestellt.

Tab. 4.4: Augengrößen nach augenspezifischer Fehlexpression der RDGN-Faktoren. Mittlere Augengrößen aus den Kreuzungen wie in Abb. 4.25 gezeigt. Die Augen männlicher Fliegen der F1-Generation (n=20) wurden bei gleichbleibender Vergrößerung fotografiert, anschließend die Augenfläche vermessen und die Mittelwerte miteinander verglichen. Die Intensität der blauen Farbe korreliert mit der effektiven Hipk-Menge.



Die Ergebnisse dieser Tabelle ergänzen die phänotypischen Beobachtungen aus Abb. 4.25 insofern, dass eine statistische Anzahl an Fliegen (n=20, je Kreuzung) berücksichtigt wurde, um eine genauere Aussage über die Tendenz der Augengröße treffen zu können. Es wurde außerdem darauf geachtet, nur Fliegen eines Geschlechtes zur Auswertung heranzuziehen, um geschlechtsbezogene Größenunterschiede auszuschließen. Ganz deutlich hebt sich auch hier die Augengröße der F1-Generation aus der augenspezifischen (Ko-)Überexpression von *UAShipk* und *UASey* von den anderen Kreuzungen ab, weil diese genetische Interaktion zu einer frühen Letalität führt. Dagegen lassen die in allen Kreuzungen mit *UASeya* resultierenden, nur minimal reduzierten Augen eine Unabhängigkeit von der Hipk-Menge vermuten. Vor allem Ey und Eya scheinen somit gute Kandidaten zu sein, mit denen der Hipk-Einfluss auf die Augenentwicklung weiterführend charakterisiert werden kann.

Zur weiteren Analyse wurden die entsprechenden Augen-Antennen-Imaginalscheiben von Larven der F1-Generation aus der gleichen Kreuzung analysiert (3.2.31). Durch eine dreifache indirekte Antikörperfärbung (Anti-Toy, -Eya und -Elav) können Rückschlüsse auf Konsequenzen der veränderten Hipk-Menge gezogen werden. Die konfokalen Aufnahmen (3.2.34) der EADs sind in Abb. 4.26 gezeigt.

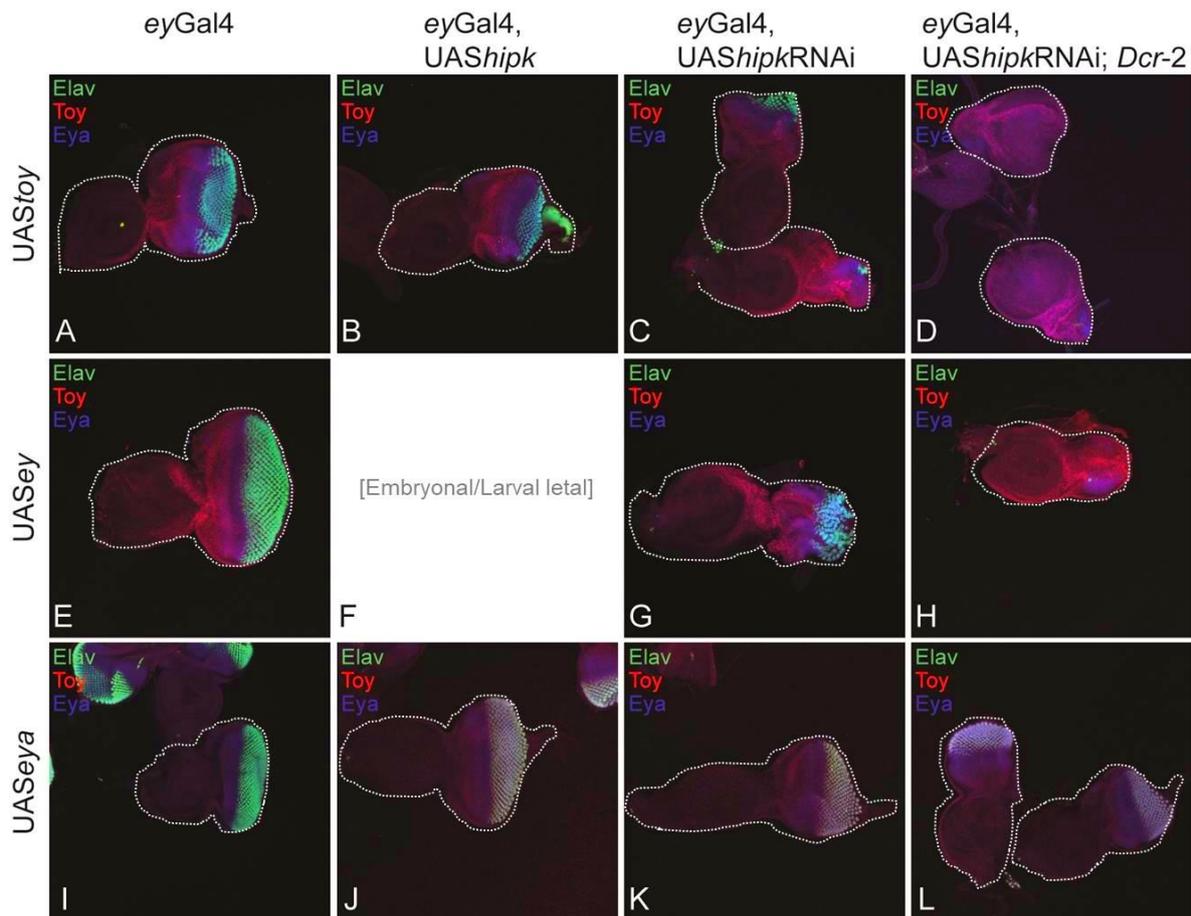


Abb. 4.26: Augenspezifische Fehlexpression der RDGN-Faktoren. (A-L) Die RDGN-Faktoren *UAS_{toy}*, *-ey* und *-eya* wurden mit *eyGal4*; *eyGal4,UAShipk*; *eyGal4,UAShipkRNAi* und *UASDcr-2*; *eyGal4,UAShipkRNAi* fehlexprimiert. Augen-Antennen-Imaginalscheiben des dritten Larvalstadiums (L3) wurden präpariert, fixiert und mittels indirekter Antikörper Dreifach-Färbung analysiert: Anti-Toy+AlexaFluor[®]568 (rot), Anti-Eya+AlexaFluor[®]647 (blau) und Anti-Elav+AlexaFluor[®]488 (grün). Jede Zeile entspricht einem UAS-Effektorstamm, der mit verschiedenen Treiberstämmen verkreuzt wurde. Anterior links, Dorsal oben.

Die Betrachtung der larvalen Phänotypen unterstützt die Beobachtungen bei den adulten Augenrößen. Durch die Überexpression von *UAS_{toy}* alleine ist die Entwicklung der EADs beeinträchtigt (Abb. 4.26, A), wird aber zusätzlich die Hipk-Menge erhöht bzw. reduziert (Abb. 4.26, B-D), ist die EAD im Bereich der Augenscheibe stark beeinträchtigt, wobei der Effekt stärker ist, wenn die Hipk-Menge reduziert wird. Bei der Überexpression von *UAS_{ey}* sind die Effekte ganz ähnlich (Abb. 4.26, E, G, H), mit der Ausnahme, dass es bei der gleichzeitigen Erhöhung der Hipk-Menge zu einer embryonalen oder frühen larvalen Letalität kommt, sodass an dieser Stelle keine EADs des dritten Larvenstadiums (L3) ausgewertet werden konnten (Abb. 4.26, F). Alleinige Überexpression von *UAS_{eya}* zeigt keinen Einfluss auf die Entwicklung der EADs im L3 (Abb. 4.26, I). Im Vergleich zu den anderen RDGN-Faktoren bildet *Eya* jedoch eine Ausnahme bei der gleichzeitigen Variation der Hipk-Menge: Die Entwicklung der EADs bei Überexpression von *UAS_{eya}* erfolgt offensichtlich unabhängig von der Hipk-Menge (Abb. 4.26, J, K, L), da sich die EADs trotz veränderter Hipk-Menge wildtypisch entwickeln.

Alles zusammengenommen führt eine augenspezifisch verringerte Hipk-Menge im larvalen Entwicklungsstadium zu einer reduzierten Größe des Augenbereiches der zusammengesetzten EAD. Die beobachteten larvalen Phänotypen spiegeln die adulten Phänotypen (Abb. 4.25 bzw. Tab. 4.4) wider und anhand der beobachteten Morphologie der larvalen Imaginalscheiben kann der resultierende adulte Phänotyp erklärt werden. Die augenspezifische Expression von UAS*eya* kann den durch eine verringerte Hipk-Menge hervorgerufenen Effekt bereits larval kompensieren. Dies lässt darauf schließen, dass die Hipk entweder auf Höhe von Eya oder der übergeordneten Faktoren des RDGN Einfluss nimmt.

4.5.2 Einfluss von Hipk auf die Augenentwicklung bei unterschiedlicher *toy*-Dosis

Um den Einfluss von Hipk auf die Augenentwicklung zusammen mit einer erhöhten bzw. verringerten Toy-Menge *in vivo* näher zu charakterisieren, wurde mit Hilfe des UAS/Gal4-Systems die Menge an augenspezifisch exprimierten UAS*toy* und UAS*toy*RNAi bzw. UAS*hipk* und UAS*hipk*RNAi variiert (3.2.28). Dabei regulieren die verwendeten (teils rekombinierten) Treiberstämme *eyGal4*, *eyGal4,UAShipk* und *eyGal4,UAShipkRNAi* die räumlich-/zeitliche Expression und die resultierende Menge an exprimierter Hipk und durch das jeweils eingekreuzte UAS*toy*- bzw. UAS*toy*RNAi-Konstrukt wird die resultierende Menge an exprimiertem Toy reguliert. Die Augen der männlichen F1-Generation wurden phänotypisch analysiert und vermessen (3.2.29) (Abb. 4.27).

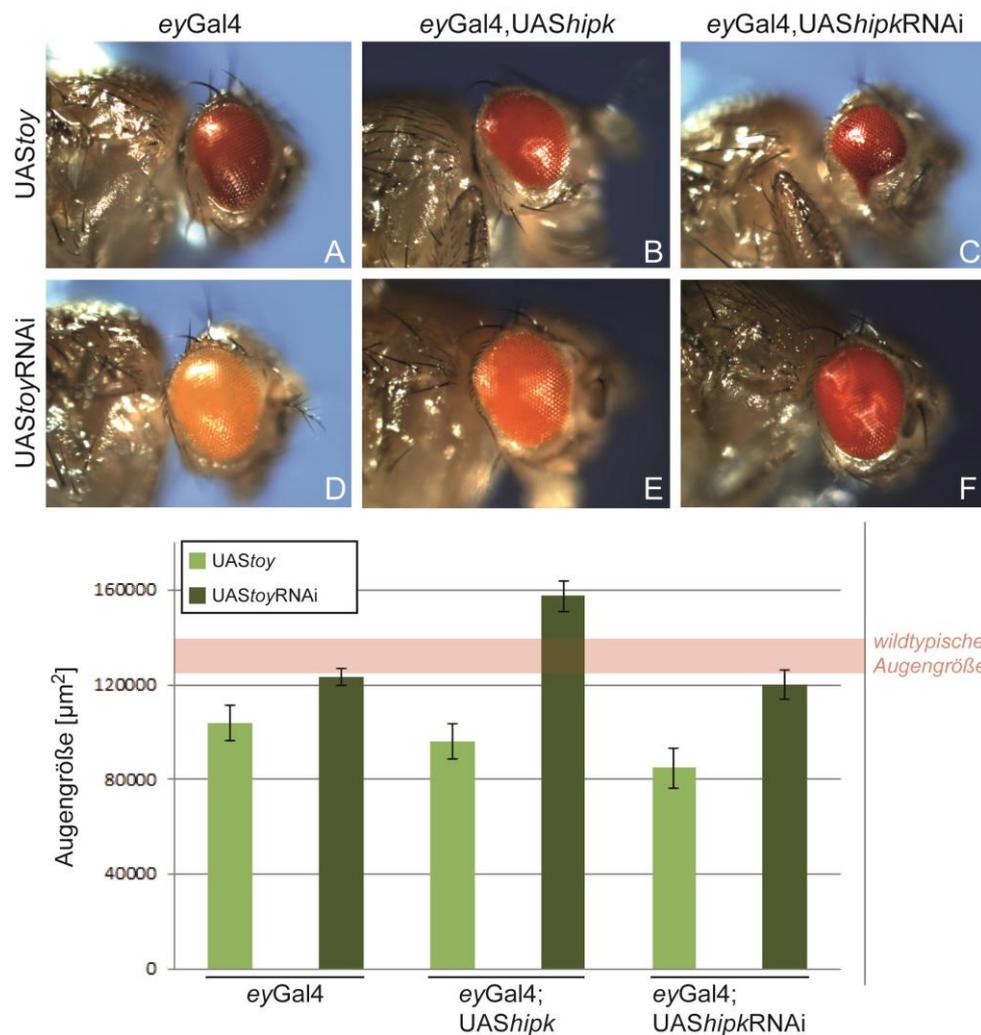


Abb. 4.27: Augenspezifische Fehlexpression von UAS_{toy} oder UAS_{toy}RNAi bei unterschiedlicher Hipk-Menge. (A-C) Komplexaugen von adulten Fliegen nach Überexpression von UAS_{toy} bzw. (D-F) UAS_{toy}RNAi. (B, E) Zusätzliche Expression von UAS_{hipk}. (C, F) Zusätzliche Expression von UAS_{hipk}RNAi. **Unten:** Werte der Augengrößenmessungen der entsprechenden männlichen F1-Fliegen (n≥30) grafisch dargestellt. Augengröße der Ausgangsstämme: eyGal4 (109.829 μm^2), eyGal4,UAS_{hipk} (105.491 μm^2), eyGal4,UAS_{hipk}RNAi (103.049 μm^2), UAS_{toy} (121.250 μm^2), UAS_{toy}RNAi (129.296 μm^2). Wildtypische Augengröße: 125.000-140.000 μm^2 (roter Balken).

Eine augenspezifische Überexpression von UAS_{toy} führt zu leicht reduzierten Augen im Vergleich zur wildtypischen Augengröße (~125.000-140.000 μm^2 , roter Balken) (Abb. 4.27, A). Bei gleichzeitiger Überexpression von UAS_{hipk} fällt die Reduktion minimal stärker aus (Abb. 4.27, B). Diese Tendenz könnte auf einen additiven Effekt zurückzuführen sein, da der zur Kreuzung verwendete rekombinierte Treiberstamm eyGal4,UAS_{hipk} bereits per se eine geringere durchschnittliche Augengröße besitzt (105.491 μm^2), als der Treiberstamm eyGal4 (109.829 μm^2). Deutlicher ist die Reduktion nach augenspezifischer Expression des UAS_{hipk}RNAi-Konstruktes, wodurch die effektive Hipk-Menge reduziert wurde (Abb. 4.27, C). Wird im Vergleich hierzu die effektive Toy-Menge durch augenspezifische Expression des UAS_{toy}RNAi-Konstruktes

reduziert, ist keine signifikante Reduktion der Augengröße zu beobachten, auch nicht bei gleichzeitiger Reduktion der effektiven Hipk-Menge durch Expression des UAS*hipk*RNAi-Konstruktes (Abb. 4.27, D und F). Die minimale Reduktion der Augengröße im Vergleich zur wildtypischen Größe ist in beiden Kreuzungen mit einem additiven Effekt der beiden Ausgangstämme zu begründen. Signifikant anders verhält sich die Augengröße jedoch bei gleichzeitiger Expression des UAS*hipk*-Konstruktes und dadurch erhöhter Hipk-Menge. Die resultierende durchschnittliche Augengröße ist mehr als wildtypisch groß (157.566 μm^2).

Die vergrößerten Augen in Abb.4.27, E sind mit der überexprimierten Hipk zu erklären, die wahrscheinlich durch ihren Einfluss auf den Notch-Signalweg (Lee et al., 2009a) zu einer vermehrten Proliferation führt oder das Fortschreiten der Morphogenetischen Furche (MF) antreibt (die wiederum die Differenzierung der Photorezeptoren lenkt, welche in diesem Fall nicht gebremst wird, weil Toy per RNAi herunterreguliert ist).

Der Einfluss, den eine veränderte Hipk-Menge auf die Augenentwicklung hat, ist somit auch abhängig von der vorliegenden PAX6/Toy/Ey-Menge.

4.5.3 Charakterisierung der Interaktion von *hipk* und RDGN-Faktoren

Komplexe Zusammenhänge können vereinfacht analysiert werden, indem das UAS/Gal4-System dazu verwendet wird, die zu untersuchenden Faktoren in einem anderen Gewebe zu exprimieren und so zunächst einen Teilaspekt des „großen Ganzen“ näher zu charakterisieren. Innerhalb eines solchen simplifizierten Umfeldes kann die genetische Interaktion von Hipk und Toy (bzw. Hipk und Ey) unter Minimierung der Komplexität aller Faktoren der Augenentwicklung erfolgen. Das RDGN reagiert kontextabhängig-dynamisch und daher muss berücksichtigt werden, dass die fehlexprimierten Faktoren in einem anderen Kontext nicht zwingend so interagieren/reagieren, wie in ihrem endogenen Umfeld. Da allerdings bereits bekannt ist, dass durch die Expression von RDGN-Faktoren in Bein- und Flügel-Imaginalscheiben durch den Treiberstamm *decapentaplegic*-Gal4 (*dpp*Gal4) ektopische Augen erzeugt werden können, scheint der Kontext prinzipiell ähnlich zu sein und eine Analyse der Hipk-Toy (bzw. Hipk-Ey) Beziehung denkbar. Somit wurde zunächst UAS*toy* in den Bein-Imaginalscheiben fehlexprimiert, um ektopische Augen zu erzeugen (Abb. 4.28, roter Kasten). In zwei weiteren Ansätzen wurde zusätzlich entweder UAS*hipk* koexprimiert, um die Hipk-Menge zu erhöhen oder durch die Koexpression eines UAS*hipk*RNAi-Konstruktes die Hipk-Menge reduziert.

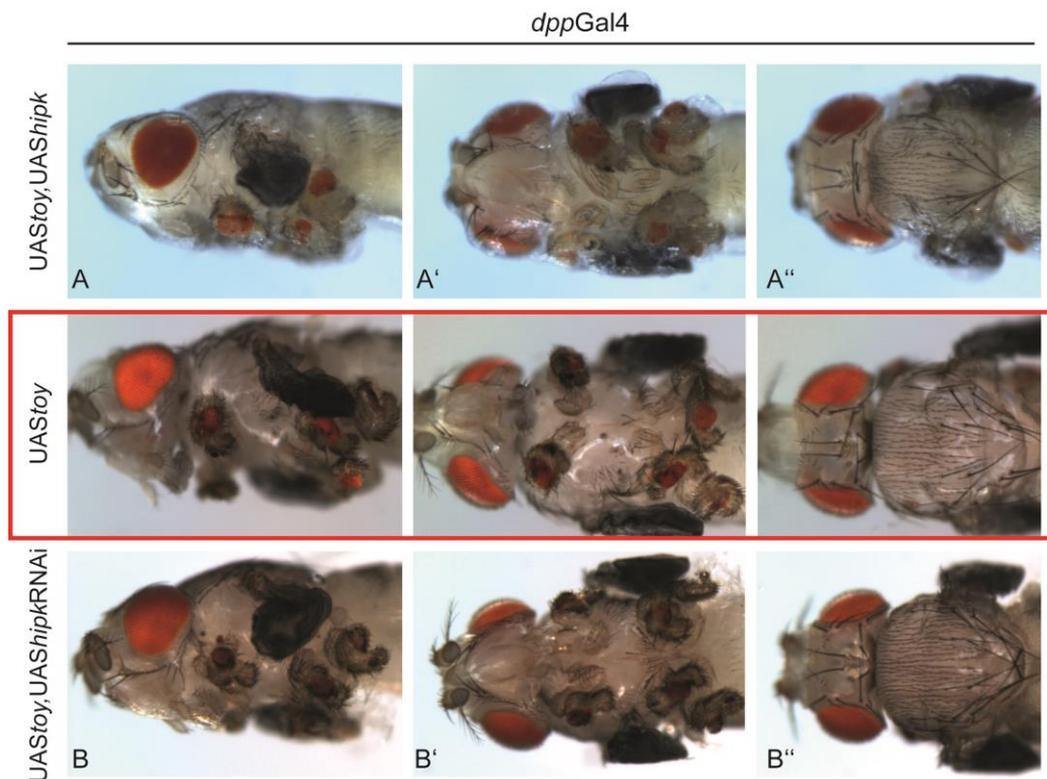


Abb. 4.28: Einfluss einer erhöhten/reduzierten *Hipk*-Menge bei der durch *UAStoy*-Expression induzierten Bildung ectopischer Augen. Roter Rahmen: Bildung ectopischer Augen nach *dppGal4*-abhängiger Expression von *UAStoy* mittels UAS/Gal4-System. (A-A'') Koexpression von *UAShipk* erhöht gleichzeitig die *Hipk*-Menge, (B-B'') Koexpression von *UAShipkRNAi* reduziert gleichzeitig die *Hipk*-Menge. (A, B) Lateralansicht. (A'-B') Ventralansicht. (A''-B'') Dorsalansicht. Anterior ist links.

Durch die gezielte Expression von *UAStoy* in den Bein-Imaginalscheiben im Muster des *dppGal4*-Treibers bilden sich ectopische Augen an den Beinen (Abb. 4.28, roter Rahmen). Wird gleichzeitig die *Hipk*-Menge erhöht durch Koexpression des rekombinierten *UAStoy*, *UAShipk*-Konstruktes, entstehen größere ectopische Augen im Vergleich zu *UAStoy* alleine (Abb. 4.28, A-A'). Bei einer Reduktion der endogenen *Hipk*-Menge durch Expression eines rekombinanten *UAStoy*, *UAShipkRNAi*-Konstruktes fallen die Augen kleiner aus (Abb. 4.28, B-B'). Da *dppGal4* in allen Imaginalscheiben Gal4-Protein bildet, wurden außerdem die Flügelansätze (Abb. 4.28, A'', B'') und die Antennen nach ectopischen Augen untersucht, hier aber bei Fehlexpression von *UAStoy* keine induzierten ectopischen Augen beobachtet.

Analog zu den Fehlexpressionen von *UAStoy* wurde die Fehlexpressionsanalyse mit *UASey* durchgeführt. Auch hier erfolgte die Koexpression mit *UAShipk*, um die *Hipk*-Menge zu erhöhen und außerdem eine Koexpression mit *UAShipkRNAi*, um die *Hipk*-Menge zu reduzieren. Durch eine exogene Expression von *UASey* entstehen an allen sechs Beinen ectopische Augen, jedoch im Vergleich zur *UAStoy*-Expression sind auch zusätzlich an den Antennen und an den Flügelansätzen ectopische Augen zu finden (Abb. 4.29, roter Rahmen).

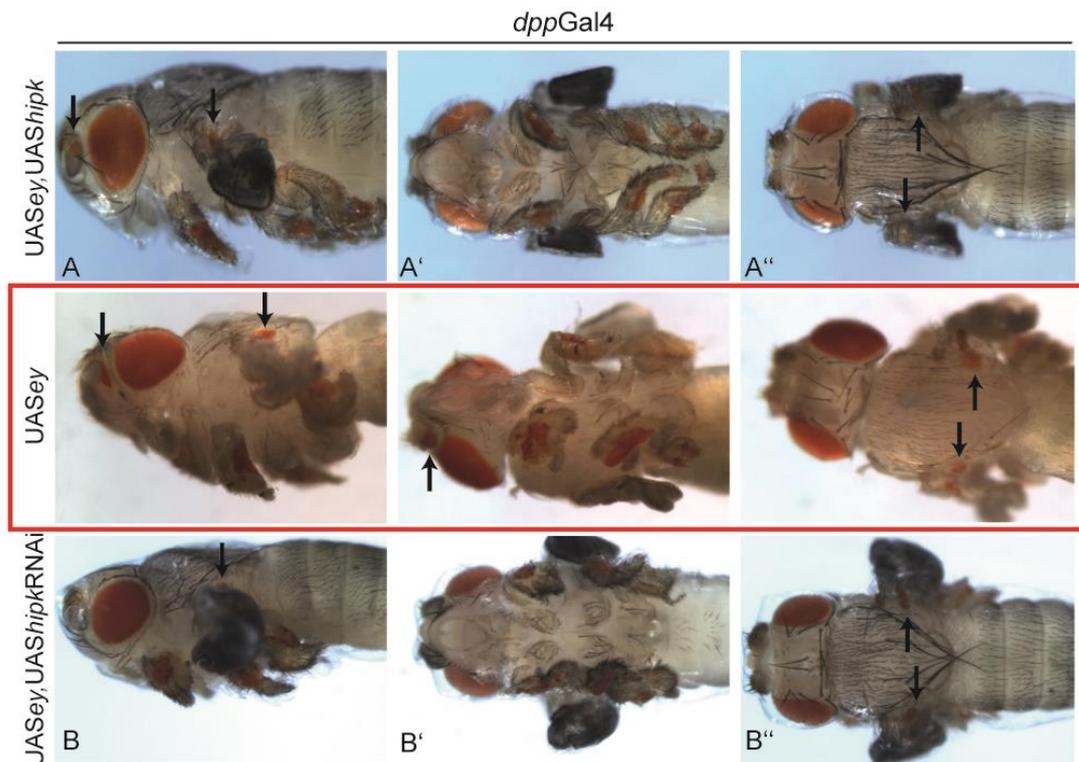


Abb. 4.29: Einfluss einer erhöhten/reduzierten Hipk-Menge bei der durch UASey-Expression induzierten Bildung ectopischer Augen. Roter Rahmen: Bildung ectopischer Augen nach *dppGal4*-abhängiger Expression von UASey mittels UAS/Gal4-System. (A-A'') Koeexpression von UAShipk erhöht gleichzeitig die Hipk-Menge, (B-B'') Koeexpression von UAShipkRNAi reduziert die Hipk-Menge. (A, B) Lateralansicht. (A', B') Ventralansicht. (A'', B'') Dorsalansicht. Pfeile deuten auf ectopische Augen an Antennen und Flügelansätzen. Anterior ist links.

Wird zusätzlich zu UASey auch UAShipk exogen exprimiert, sind die entstehenden ectopischen Augen kleiner (Abb. 4.29, A-A'). Bei einer Expression des UAShipkRNAi-Konstruktes, um die endogene Hipk-Menge herunter zu regulieren, fallen die ectopischen Augen (noch) kleiner aus (Abb. 4.29, B-B').

Prinzipiell rufen die Fehlexpressionen von UAStoy und von UASey einen ähnlichen Phänotyp hervor, es werden ectopische Augen an den Beinen gebildet. Die zusätzliche Expression von UAShipk wirkt sich allerdings unterschiedlich aus. Während die erhöhte Hipk-Menge die Größe der durch UAStoy-Expression hervorgerufenen ectopischen Augen positiv beeinflusst, fallen die durch UASey-Expression hervorgerufenen ectopischen Augen kleiner aus, je mehr Hipk vorhanden ist. Das offensichtlich verstärkte Potential, ectopische Augen zu erzeugen, führt jedoch nicht dazu, dass die Fehlexpression von UAStoy ectopische Augen an den Flügelansätzen hervorbringt. Die Herunterregulation der Hipk-Menge durch UAShipkRNAi hemmt allerdings bei beiden die Entstehung ectopischer Augen, sie fallen kleiner aus. Diese Beobachtung steht im Einklang mit den Beobachtungen bei der augenspezifischen Reduktion der Hipk-Menge, die zu reduzierten adulten Augenrößen und verkleinerten larvalen Augenbereichen der EADs führten.

4.6 *Hipk*-Enhancer-Analyse

Um die Funktion der *Hipk* während der Augenentwicklung von *Drosophila* genauer zu charakterisieren, sollten DNA-Bereiche, die als Enhancer die augenspezifische Expression von *hipk* regulieren, aufgefunden werden. Enhancer befinden sich meist in nicht-codierenden Regionen im 5'- oder 3'-Bereich bzw. in den Intronbereichen eines Gens.

Die genomische Region des Gens *hipk* (CG17090) liegt auf dem linken Arm des dritten Chromosoms (3L: 543060-581099, zytologische Lokalisation 61C3-61C5) und umfasst insgesamt ~38 kb. Es gibt drei Transkripte von *hipk* (*Hipk*-RA, -RB und -RC) mit jeweils unterschiedlich langen 5'UTR-Regionen. Die beiden längeren Transkripte RA (~11,3 kb) und RB (~6,3 kb) umfassen 11 Exons, bei *Hipk*-RC (~5,6 kb) fehlt ein Exon. Daraus resultieren zwei verschiedene Polypeptide: RA und RB bringen das gleiche Polypeptid hervor mit 1 340 AS, das RC-Transkript resultiert in einem kürzeren Polypeptid mit 1 256 AS (Quelle: Genome Browser/flybase.org).

DNA-Bereiche, die potentielle Enhancer von *hipk* darstellen könnten, wurden von Kvon et al. (2014) ausgewählt und zu jedem der Enhancer-Kandidaten wurde ein Gal4-Treiberstamm generiert, der folglich das Gal4-Protein in dem Muster exprimiert, das der Enhancer-Kandidat vorgibt. Dabei ist jedes Konstrukt (mit jeweils einem ~2,1 kb großen Enhancer-Kandidaten) an der gleichen genomischen Position integriert worden (*attP2*), um größtmögliche Vergleichbarkeit zu gewährleisten und Positionseffekte auszuschließen.

Eine Übersicht über die Position und die Größe der in der vorliegenden Arbeit bearbeiteten Enhancer-Kandidaten ist in Abb. 4.30 gezeigt. Die meisten der Enhancer-Kandidaten sind im Bereich des zweiten Introns von *hipk* zu finden, einige auch im 5'-Bereich vor dem Transkriptionsstart. Die Expressionsmuster der Enhancer-Kandidaten wurden von anderen Arbeitsgruppen embryonal (Kvon et al., 2014) und auch zum Teil in adulten *Drosophila*-Gehirnen (Tirian & Dickson, 2017) analysiert. Larvale, puppale oder adulte (mit Ausnahme des adulten Gehirns) Expressionsmuster der gezeigten Enhancer-Kandidaten waren bisher nicht bekannt.

Chr.3L, CG17090, 543060-581099

2 kb

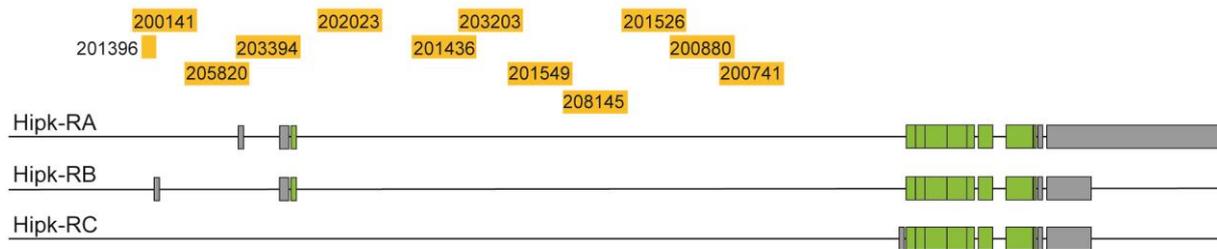


Abb. 4.30: Lage der *hipk*-Enhancer-Kandidaten. Sequenzbereiche der *hipk*-Enhancer-Kandidaten in Relation zum genomischen Sequenzbereich des Gens *hipk* (CG17090, Chr.3L: 543060-581099, ~38 kb). Jeder gelbe Balken entspricht einem ~2,1 kb großen Sequenzabschnitt (mit Ausnahme des Sequenzabschnittes 201396 von ~0,2 kb) des genomischen Bereiches von *hipk* und wird durch eine 6-stellige Nummer identifiziert. Gezeigt sind alle drei *hipk*-Transkripte (Hipk-RA, -RB und -RC) mit der entsprechenden Exon-Intron-Struktur (grün: codierende Bereiche/Exons; grau: untranslatierte Bereiche).

Ziel war es, die Expressionsmuster der einzelnen Enhancer-Kandidaten dahingehend zu untersuchen, ob sie ein Expressionsmuster in den Geweben erzeugen, aus denen die Komplexaugen hervorgehen.

4.6.1 Expressionsanalyse potentieller augenspezifischer *hipk*-Enhancer

Zur Visualisierung der Expressionsmuster der einzelnen Enhancer-Kandidaten wurde das UAS/Gal4-System angewandt (3.2.28). Als Reporter wurde der Effektorstamm UASmCD8-GFP, UASH2B-mRFP1 verwendet. Dieser exprimiert im Muster des jeweils eingekreuzten Enhancer-Kandidaten-Gal4-Stamms zwei Reportergene: UASmCD8-GFP (GFP membranständig) und UASH2B-mRFP (RFP kernständig). Das Kreuzungsschema ist in Abb.4.31 gezeigt. Die Auswertung erfolgte larval, puppal und adult jeweils mit dem Fluoreszenz-Binokular/-Mikroskop (3.2.33).

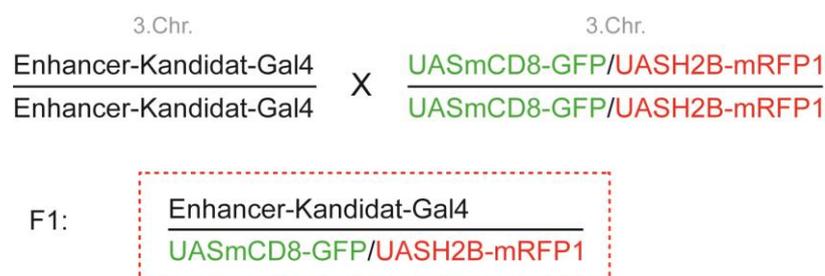


Abb. 4.31: Kreuzungsschema zur Visualisierung der Expressionsmuster der *hipk*-Enhancer-Kandidaten. Mittels UAS/Gal4-System wird die Expression der Reportergene *Green Fluorescent Protein* (GFP) und *Red Fluorescent Protein* (RFP) in dem durch den Enhancer-Kandidaten vorgegebenen räumlichen und zeitlichen Muster angeschaltet. GFP wird dabei membranständig exprimiert (mCD8), während RFP kernständig in den entsprechenden Zellen exprimiert wird (H2B).

Nach der Auswertung der resultierenden larvalen, puppalen und adulten Expressionsmuster konnten drei augenspezifische *hipk*-Enhancer Bereiche selektiert werden: 202023, 201396 und 208145. Die entsprechenden Expressionsmuster in den Augen-Antennen-Imaginalseiben des dritten Larvalstadiums sind in Abb. 4.32 gezeigt. Eine Auflistung aller getesteten Enhancer-Kandidaten sowie die Auswertung der Expressionsmuster anderer Entwicklungsstadien sind im Anhang (siehe Tab. 7.1 und Abb. 7.2 bis Abb. 7.4) dargestellt.

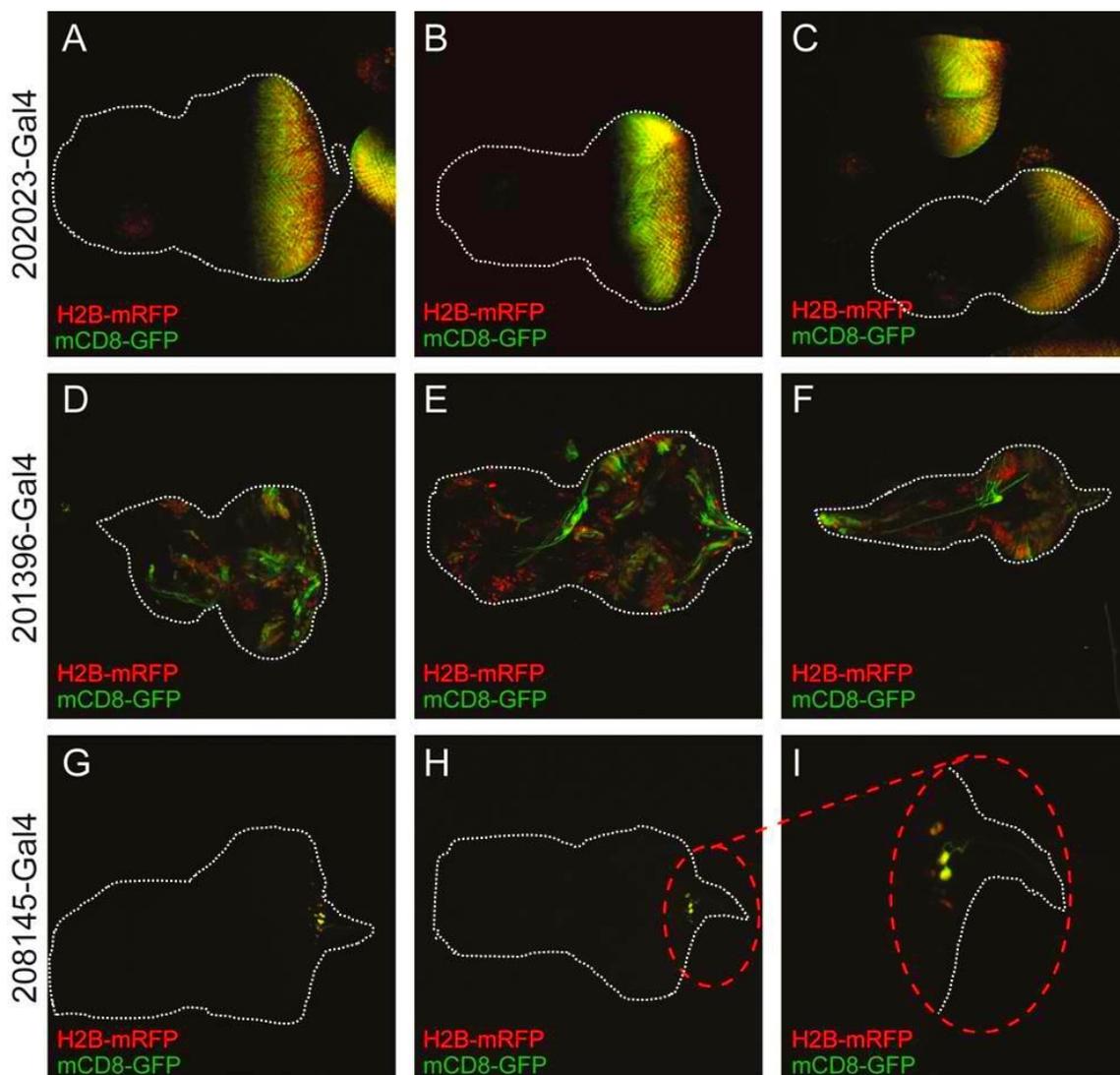


Abb. 4.32: Visualisierte Expressionsmuster der augenspezifischen *hipk*-Enhancer-Kandidaten. Augen-Antennen-Imaginalseiben des dritten Larvalstadiums aus der F1-Generation nach Kreuzung der Enhancer-Kandidaten-Gal4-Stämme 202023 (A-C), 201396 (D-F) und 208145 (G-I) mit dem Effektorstamm UASmCD8-GFP, UASH2B-mRFP1. Gezeigt ist jeweils eine Überlagerung der resultierenden Expressionsmuster der Reportergene (grün: membranständig (mCD8), rot: kernständig (H2B)). I zeigt einen vergrößerten Bereich aus H (siehe rot gestrichelte Linie). Anterior ist links, Dorsal oben.

Die Expressionsmuster der augenspezifischen *hipk*-Enhancer 202023, 201396 und 208145 unterscheiden sich deutlich voneinander. Während das Expressionsmuster des augenspezifischen *hipk*-Enhancers 202023 im posterioren Teil der Augenscheibe und im ventralen Kompartiment der Antennenscheibe zu sehen ist (Abb. 4.32, A-C), stellt sich das Expressionsmuster des *hipk*-Enhancers 201396 relativ unstrukturiert über die Peripodialmembran verteilt dar (Abb. 4.32, D-F). Diese Membran stellt neben der Säulen-Epithelschicht der Imaginalscheibe, aus der sich die adulten Komplexaugen entwickeln, eine zweite Zellschicht dar, aus der sich überwiegend Integument entwickelt (Fristrom & Fristrom, 1993). Das Expressionsmuster des augenspezifischen Enhancers 208145 betrifft nur wenige Zellen am posterioren Ende der Augenscheibe (Austrittsstelle des Sehnervs) (Abb. 4.32, G-I). Vergleicht man die Lage dieser drei Enhancer-Kandidaten, wird deutlich, dass sich diese nicht überlappen (vgl. Abb. 4.30) und somit drei unabhängige regulatorische Elemente darstellen. Im Folgenden wurde ausschließlich der Sequenzbereich des augenspezifischen *hipk*-Enhancers 202023 weiterführend analysiert, um den Einfluss der augenspezifischen *hipk*-Expression auf die Augenentwicklung zu untersuchen.

4.6.1 Deletion eines augenspezifischen *hipk*-Enhancers

Zur näheren Charakterisierung des augenspezifischen *hipk*-Enhancers 202023 sollte der entsprechende genomische Sequenzbereich (Chr. 3L: 549321-551551; zytologische Lokalisation 61C3) mit Hilfe einer speziellen Form des Gentergetings, der „Ends-out“ homologen Rekombination (Rong & Golic, 2000), deletiert werden. Dazu wurde in einer parallel zur vorliegenden Arbeit betreuten Bachelorarbeit (Heyer, 2017) ein Gentergeting-Donor-Konstrukt erzeugt, indem die beiden flankierenden Sequenzbereiche der zu deletierenden *hipk*-Enhancer-Sequenz als Homologiearme in den Transformationsvektor pTV[*cherry*] (Baena-Lopez et al., 2013) inkloniert wurden (Abb. 4.33). Dieses Konstrukt wurde anschließend über P-Element-Insertion ungerichtet ins Genom integriert, die resultierenden transgenen Fliegen wurden molekular überprüft und die Integration des Gentergeting-Donor-Konstruktes auf dem X-Chromosom festgestellt (Heyer, 2017). Diese Fliegen standen anschließend als Donor-Linie für das Gentergeting zur Deletion des augenspezifischen *hipk*-Enhancers zur Verfügung.

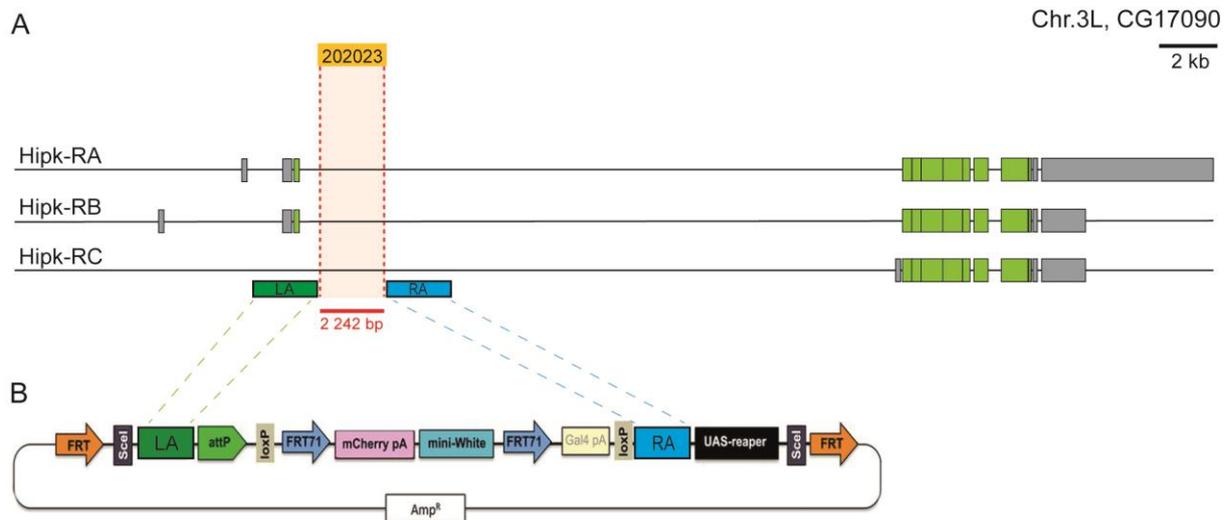


Abb. 4.33: Erzeugung eines Gentargeting-Donor-Konstruktes zur Deletion des augenspezifischen *hipk*-Enhancers 202023 mittels „Ends-out“-Gentargeting. (A) Schematische Übersicht der genomischen Region des Gens *hipk* mit allen drei Transkripten (RA, -B und -C). Die Position des zu deletierenden augenspezifischen *hipk*-Enhancers 202023 ist durch rote gestrichelte Linien eingezeichnet. Die beiden Homologiearme (LA, Linker Arm; RA, Rechter Arm) flankieren die Sequenz des *hipk*-Enhancers. Sie bilden die Basis für das folgende Homologe Rekombinationsereignis mit dem Gentargeting-Vektor pTV[*cherry*]. (B) Der Gentargeting-Vektor pTV[*cherry*] (Baena-Lopez et al., 2013; verändert) mit inklinierten Homologiearmen LA und RA.

Um die gewünschte Deletion des augenspezifischen *hipk*-Enhancers einzuleiten, muss das auf dem X-Chromosom integrierte Gentargeting-Donor-Konstrukt wieder mobilisiert werden. Die spezifische Zusammensetzung des pTV[*cherry*]-Transformationsvektors (Abb. 4.33, B) ermöglicht dies durch das Einkreuzen des Fliegenstammes BL6935 (mit einer Flippase (Flp)-Rekombinase und I-*SceI*-Endonuclease) (3.1.3). Das von *Flippase Recognition Target* (FRT)-Sequenzen flankierte Gentargeting-Konstrukt liegt dann in Form eines extrachromosomalen Ringes vor. Um ein Rekombinationsereignis des mobilisierten Gentargeting-Konstruktes mit der eigentlichen Zielsequenz zu ermöglichen, muss dieses jedoch in linearer Form vorliegen. Die Linearisierung erfolgt über zwei vektorspezifische I-*SceI*-Restriktionsschnittstellen (siehe Abb. 4.33, B), die im *Drosophila*-Genom ansonsten nicht vorkommen. Das entsprechende Enzym dazu wird zusammen mit der Flp-Rekombinase eingekreuzt. Das mobilisierte, lineare Konstrukt lagert sich über die homologen Sequenzbereiche (die Homologiearme LA und RA) flankierend zum chromosomalen Locus des *hipk*-Enhancers 202023 an und es erfolgt der präzise Austausch der *hipk*-Enhancer-Sequenz gegen die Sequenz des Gentargeting-Konstruktes (s. Abb. 4.34).

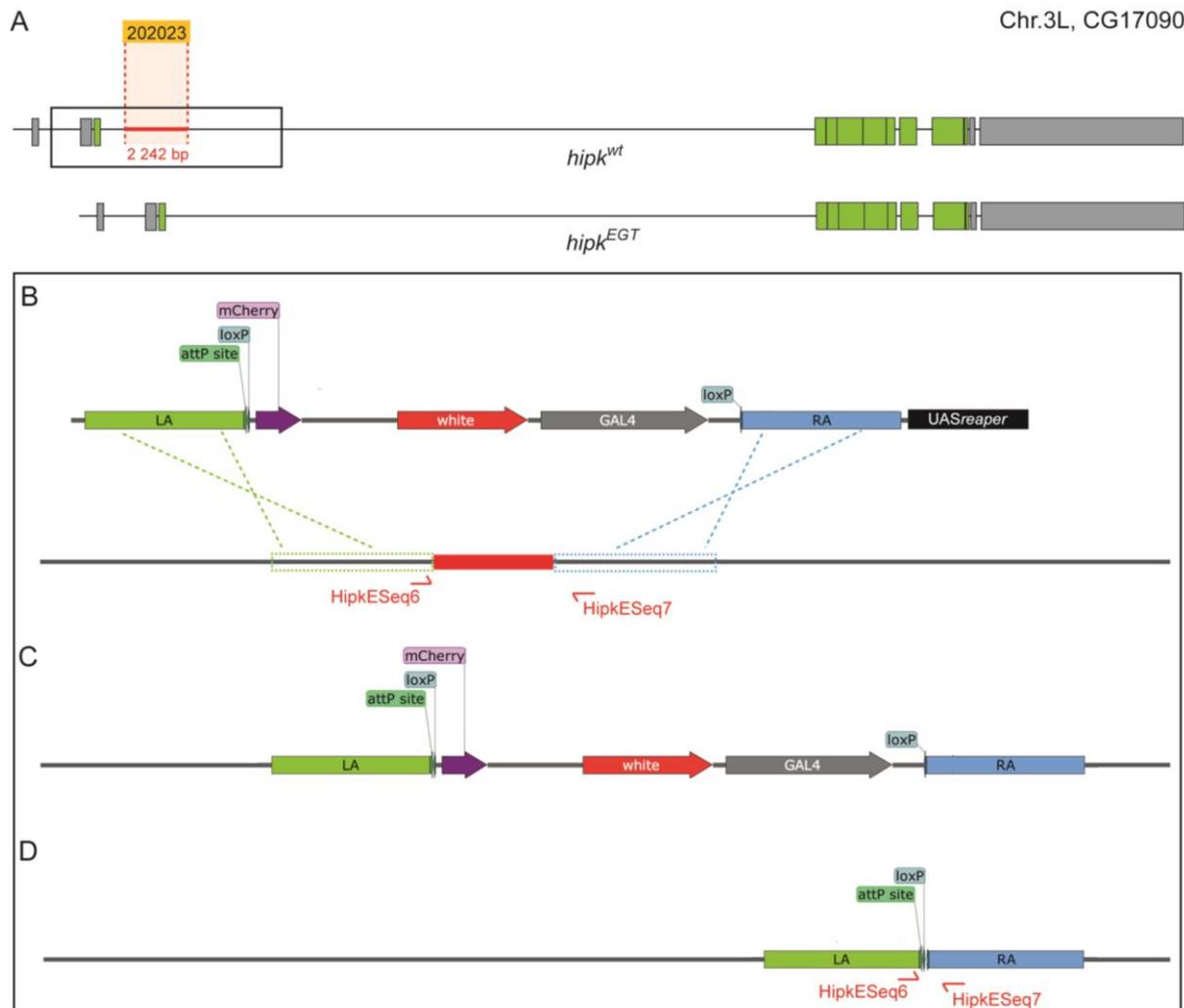


Abb. 4.34: Deletion des *hipk*-Enhancers 202023 mittels „Ends-out“-Gentargeting. (A) Vergleich der (wildtypischen) genomischen Region des Gens *hipk* (*hipk*^{wt}) mit dem durch Deletion des *hipk*-Enhancers 202023 (549 321 - 551 551; roter Balken) erzeugten *hipk*-Allel (*hipk*^{EGT}). (B) Anlagerung des mobilisierten und linearisierten Gentargeting-Konstruktes über die Homologiearme LA (grün) und RA (blau) an die Sequenzbereiche flankierend zum *hipk*-Enhancer 202023. (C) Aus der homologen Rekombination resultierender genomischer Bereich von *hipk*. Der Sequenzbereich des *hipk*-Enhancers 202023 wurde durch das Gentargeting-Konstrukt ersetzt. (D) Resultierender genomischer Bereich nach Cre/*loxP*-vermittelter Rekombination zur Deletion des Markergens *white* und *GAL4*.

Die Kreuzung mit einem *Ubiquitin* (*Ubi*) *GAL4*-Stamm ermöglicht die anschließende Selektion von Fliegen mit korrekt rekombiniertem Gentargeting-Konstrukt. Im Falle einer fehlenden Mobilisierung oder einer nicht korrekten homologen Rekombination würde das durch *GAL4* aktivierte *UASreaper* (proapoptotisches Protein) zur Eliminierung betroffener Individuen führen. Die folgende Generation (~10 200 Fliegen) wurde nach Fliegen mit roter Augenfarbe durchsucht, welche durch das Markergen *white* hervorgerufen wird, das nach erfolgreicher homologer Rekombination anstelle des *hipk*-Enhancers 202023 integriert ist (Abb. 4.34, C). Insgesamt wurden 8 rotäugige Fliegen gefunden, was einer Effizienz von ~0,08 % (1 Fliege je 1 270 Nachkommen) entspricht. Um unerwünschte Beeinträchtigungen der Funktion des *hipk*-Genes auszuschließen,

wurde das *white*-Gen anhand des Cre/loxP-Systems wieder aus dem Locus entfernt (Abb. 4.34, D). Dazu wurde entsprechend Cre-Rekombinase eingekreuzt. Die notwendigen loxP-Zielsequenzen waren flankierend zum *white*-Gen bereits im Gentargeting-Konstrukt mit eingebracht worden. Abschließend wurden die Fliegen molekular mittels PCR-Analyse überprüft (Abb. 4.35).

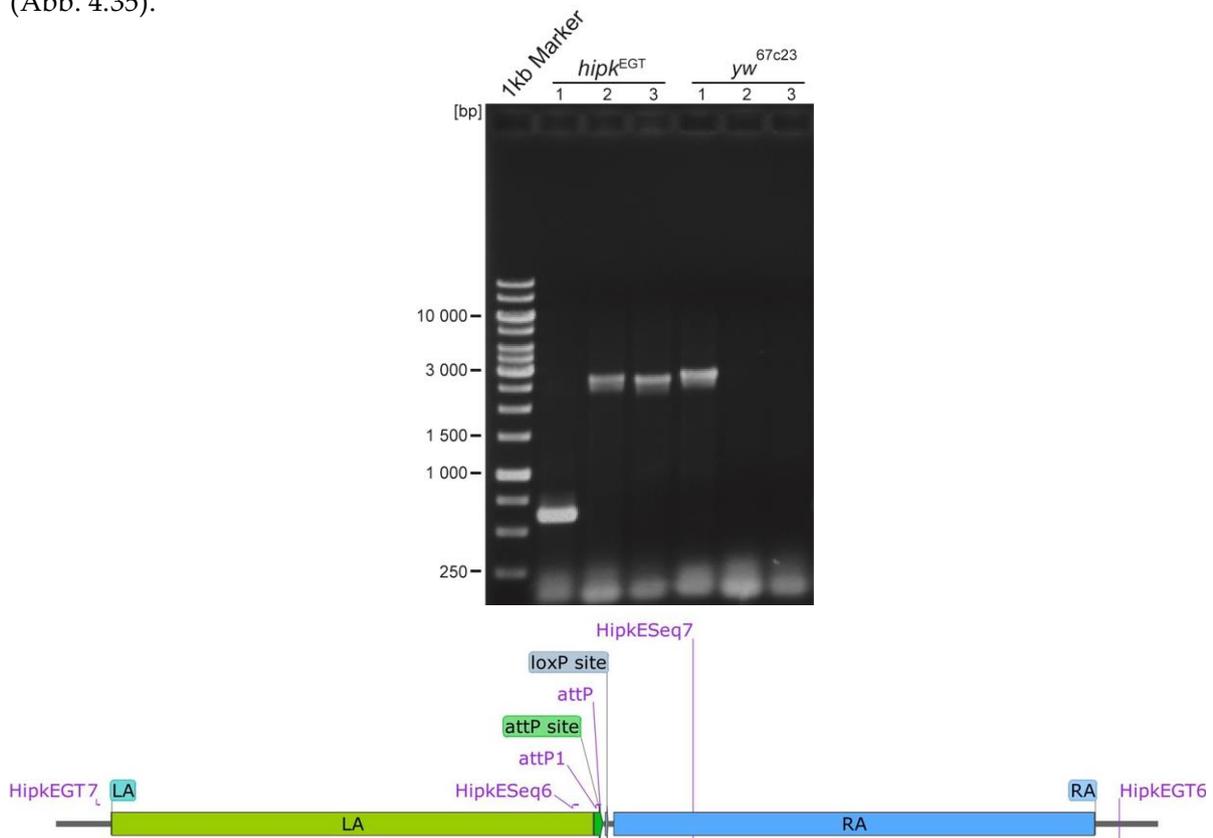


Abb. 4.35: Molekularer Nachweis der homologen Rekombination. PCR-Nachweis der erfolgreichen homologen Rekombination zur Deletion des augenspezifischen *hipk*-Enhancers 202023. Die PCR wurde mit genomischer DNA des erzeugten *hipk*^{EGT}-Stammes bzw. des *yw*^{67c23}-Stammes (Kontrolle) und mit den Primerpaaren (1) HipkESeq6/HipkESeq7, (2) attP1/HipkEGT6 und (3) attP/HipkEGT7 durchgeführt, anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt und nachgewiesen.

Der molekulare Nachweis erfolgte mit drei verschiedenen Kombinationen von Primern. Zunächst wurde der Sequenzbereich des *hipk*-Enhancers 202023 mithilfe des Primerpaares HipkESeq6/HipkESeq7 nachgewiesen (Abb. 4.35, jeweils Spur 1). Aus der PCR-Reaktion mit der genomischen DNA des *hipk*^{EGT}-Stammes ergibt sich ein 627 bp großes Fragment, so, wie es nach der oben beschriebenen Deletion des *hipk*-Enhancers 202023 zu erwarten war. Im Vergleich hierzu ergab sich bei der PCR-Reaktion mit dem gleichen Primerpaar auf genomische DNA des *yw*^{67c23}-Stammes (Kontrollstamm) ein 2 754 bp großes Fragment, weil der Sequenzbereich des *hipk*-Enhancers 202023 wildtypisch vorliegt. Die Primerkombination attP1/HipkEGT6 (Abb. 4.35, jeweils Spur 2) weist den rechten Homologiearm nach und die Primerkombination attP/HipkEGT7 (Abb. 4.35, jeweils Spur 3) weist den linken Homologiearm nach. Die beiden

Primer attP und attP1 sind dabei spezifisch für die Zielsequenz *attP*, welche nach dem Gentergeting anstelle des *hipk*-Enhancers 202023 (zusammen mit einer loxP-Sequenz) zurück bleibt. Somit entsteht lediglich im PCR-Ansatz mit genomischer DNA des *hipk*^{EGT}-Stammes ein PCR-Produkt. Diese weisen die intakten flankierenden Sequenzbereiche 5' und 3' der Deletion nach sowie die korrekte Entfernung des Markergens *white* und Gal4 durch Cre/loxP vermittelte Rekombination.

4.6.2 Letalitätsanalyse des erzeugten *hipk*^{EGT}-Stammes

Zur Charakterisierung des generierten *hipk*^{EGT}-Stammes wurde zunächst eine Analyse durchgeführt, um das *hipk*^{EGT}-Allel bezüglich einer möglicherweise auftretenden Letalität zu untersuchen. Bereits während der Balancierungskreuzungen fiel auf, dass keine adulten Nachkommen auftreten, die das *hipk*^{EGT}-Allel homozygot tragen. Um den Zeitpunkt zu bestimmen, an dem das homozygote Vorliegen dieses Allels zu Letalität führt, wurde eine Letalitätsanalyse durchgeführt. Hierzu wurden 200 Embryonen separiert und die sich daraus entwickelnden Larven, Puppen und adulten Fliegen ausgezählt. Anhand der so ermittelten Werte kann die Letalitätsrate errechnet und der Zeitpunkt ermittelt werden, zu dem die Letalität auftritt. Beim *hipk*^{EGT}-Stamm handelt es sich um einen balancierten Stamm, d.h. das zu analysierende Allel wird heterozygot über einem Balancerchromosom von beiden Elterntieren in die Kreuzung eingebracht. Das homozygote Auftreten des Balancerchromosoms wirkt sich embryonal letal aus. Das bedeutet, dass 25 % Letalität der F1-Nachkommen von vorneherein durch den Balancer gegeben sind. Weitere 50 % der F1-Nachkommen sind heterozygot für das *hipk*^{EGT}-Allel und damit lebensfähig. Die restlichen 25 % der F1-Generation bilden die für das *hipk*^{EGT}-Allel homozygoten Individuen. Ihre Lebensfähigkeit entscheidet somit über die endgültige Letalitätsrate. Liegt diese bei ~50 %, spricht man von einer homozygot letalen Mutation.

Tab. 4.5: Letalitätsanalyse des *hipk*^{EGT}-Stammes. Ausgehend von 200 Embryonen wurden die daraus resultierenden Larven, Puppen und Fliegen ausgezählt und die prozentuale Letalitätsrate zu den verschiedenen Entwicklungszeitpunkten bestimmt.

Stamm	<i>hipk</i> ^{EGT}
Embryonen	200
Larven	112
Embryonale Letalität	44 %
Puppen	98
Larvale Letalität	12,5 %
Adulte Fliegen	92
Puppale Letalität	6 %
Gesamtletalität	62,5 %

Wie in Tab. 4.5 zu erkennen, trat bereits während der Embryonalentwicklung eine erhöhte Letalität auf, die zu erwartende Letalität durch das homozygote Vorliegen des Balancerchromosoms von 25 % wird deutlich überschritten und liegt bei 44 %. Weitere 12,5 % Letalität kommen während der larvalen Entwicklung hinzu, sodass am Ende des Larvalstadiums bereits eine Letalitätsrate von 56,5 % aufgetreten ist. Puppal kommen erneut 6 % hinzu. Die Gesamtletalitätsrate beläuft sich somit auf 62,5 %. Das *hipk*^{EGT}-Allel kann demnach homozygot als embryonal letal bzw. früh larval letal eingestuft werden. Der Sequenzbereich bzw. die Aktivität des *hipk*-Enhancers 202023 scheinen essentiell für die Entwicklung von *Drosophila* zu sein.

5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der Homeodomänen Interagierenden Proteinkinase (Hipk) auf die Augenentwicklung der Taufliege *Drosophila melanogaster* weiterführend charakterisiert. Neben einer *in vivo* Interaktionsstudie der Proteinkinase Hipk mit den Masterregulatoren der Augenentwicklung, Twin of eyeless (Toy) und Eyeless (Ey), wurde eine umfassende *in vitro* Phosphorylierungs-Analyse zur Kartierung der Hipk-Phosphorylierungsstellen von Toy durchgeführt. Im Anschluss daran wurden entsprechende phosphorylierungsmutante Stämme erzeugt, um die physiologische Relevanz der gefundenen Phosphorylierungsstellen zu testen. Außerdem trugen Kreuzungsanalysen im Rahmen einer genetischen Interaktionsstudie sowie die Untersuchung augenspezifischer regulatorischer Elemente im *hipk*-Lokus zur Bearbeitung der Fragestellung bei.

5.1 Analyse der *in vivo* Interaktion von Hipk mit Toy und mit Ey

Die *Drosophila* Proteine Toy und Ey sind Homologe zum Vertebraten Paired box protein 6 (PAX6) (Quiring et al., 1994; Czerny et al., 1999). In vorangegangenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die C-Termini von Toy und Ey *in vitro* von der dualspezifischen Serin/Threonin-Kinase Hipk phosphoryliert werden (Steinmetz, 2006). Außerdem interagiert Hipk *in vitro* mit Ey und kann Ey in Zellkultur phosphorylieren (Choi et al., 2005). Damit gab es konkrete Hinweise darauf, dass die Hipk wichtigen Faktoren der Augenentwicklung von *Drosophila* zugeordnet werden kann und es galt als wahrscheinlich, dass Toy und/oder Ey auch *in vivo* Interaktionspartner der Hipk darstellen.

Während der vorliegenden Arbeit wurde getestet, ob die zuvor identifizierte Wechselwirkung zwischen Toy und Hipk sowie Ey und Hipk auch *in vivo* stattfindet. Im Vergleich zu Protein-Protein-Interaktionsanalysen, wie z.B. dem Pulldown-Assay (Kaelin et al., 1991), bei denen die zu testenden Proteine aufgereinigt und somit aus ihrem endogenen Kontext (und von eventuell wichtigen Kofaktoren) entfernt werden, bieten genetische Methoden den Vorteil, dass die Analyse im normalen zellulären Umfeld stattfinden kann und somit die Wahrscheinlichkeit höher ist, dass die Ergebnisse die Eigenschaften der nativen Proteine widerspiegeln. Hierzu bietet sich die klassische *Yeast Two Hybrid* (Y2H) - Analyse an, mit der auf effiziente Weise zahlreiche potentielle molekulare Interaktionspartner getestet werden können (Fields & Song,

1989). Durch Y2H-Analysen konnte z.B. auch die Interaktion der RDGN-Interaktionspartner Eyes absent (Eya)/Dachshund (Dac) sowie Eya/Sine oculis (So) (Chen et al., 1997; Pignoni et al. 1997) gezeigt werden. Während einer vorhergehenden Y2H-Analyse zwischen Hipk und dem SPOC-Protein Nito, bei der Nito selbst bereits starke Eigeneffekte aufwies und die Reporterexpression unspezifisch aktivierte, stellte sich jedoch dar, dass diese Methode prinzipielle Schwächen besitzt, wenn es um die Untersuchung von Proteinen geht, die ihrerseits Einfluss auf die Genexpression ausüben können (Dewald, 2014).

Um diese Schwierigkeiten bei der Analyse der beiden Transkriptionsfaktoren Toy und Ey zu umgehen, wurde auf die Methode der *Bimolecular Fluorescence Complementation* (BiFC) zurückgegriffen (Hu et al., 2002). Diese beruht auf dem Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen (PPI) durch Komplementation eines Fluoreszenzproteins. Da die Rekonstitution des Fluoreszenzproteins die PPI stabilisiert (Hu et al., 2002; Magliery et al., 2005), eignet sich diese Methode auch zum Nachweis relativ kurzlebiger Interaktionen, was sich insbesondere bei den oft transienten Interaktionen zwischen Kinasen und ihren Substraten positiv auswirkt.

Initial wurde die Fluoreszenzkomplementation mit Hilfe des *Green Fluorescent Protein* (GFP) in *E. coli* gezeigt (Ghosh et al., 2000), bevor eine entsprechende BiFC-Analyse in lebenden Säugetierzellen (Hu et al., 2002), in lebenden Bakterien, Würmern und Pflanzen (Kerppola, 2008) und schließlich auch in *Drosophila* Anwendung fand (Gohl et al., 2010). Durch die Verwendung der speziell für die BiFC-Analyse in *Drosophila* kreierten Transformationsvektoren ist eine effiziente Klonierung und Integration mit Hilfe des PhiC31-Integrase-Systems möglich (Bischof et al., 2007; Gohl et al., 2010). Hierdurch wird sowohl die Erzeugung der benötigten transgenen Fliegenstämme optimiert, als auch die gezielte Integration an immer demselben genomischen Locus gewährleistet, sodass die zu untersuchenden Faktoren in vergleichbaren Expressionsraten hergestellt werden (Voraussetzung für eine effiziente Rekonstitution des Fluoreszenzproteins). Unter Einsatz des UAS/Gal4-Systems (Brand & Perrimon, 1993) ist es möglich, die Interaktion der zu untersuchenden Proteine in verschiedenen Geweben und zu unterschiedlichen Zeitpunkten zu testen. So kann die Visualisierung der PPI unter minimaler Störung direkt in der endogenen Umgebung erfolgen.

Mit der BiFC-Analyse konnte bereits eine weitere Hipk-Substrat-Beziehung erfolgreich *in vivo* nachgewiesen werden (Dewald et al., 2014). Die dabei etablierten BiFC-Fliegenstämme UAS $hipk$ NYFP, UASNYFP $hipk$ und die systemimmanente Positivkontrolle UAS gro CYFP kamen auch in der vorliegenden Arbeit zum Einsatz. Darüber hinaus wurde für diese Arbeit ein

transgener Toy-BiFC-Stamm (bzw. ein transgener Ey-BiFC-Stamm (Heyer, 2017)) erzeugt. Die Funktionalität der integrierten Konstrukte wurde durch Fehlexpression des im BiFC-Stamm integrierten UAS_{toy}CYFP-Konstruktes (bzw. UAS_{ey}CYFP-Konstruktes) getestet. Die Ausbildung ektoptischer Augen an den Beinen adulter Tieren nach exogener Fehlexpression der UAS-Konstrukte mit Hilfe des UAS/Gal4-Systems zeigte, dass Toy und Ey trotz des C-terminal fusionierten Fluoreszenzproteinfragmentes funktionell sind und die Entwicklung ektoptischer Augen induzieren können. Für die eigentliche BiFC-Analyse schien das Gewebe der (larvalen) Flügelimaginalscheiben am besten geeignet. Zum einen, weil durch die Fehlexpression von *toy* bzw. *ey* in den Flügel-Imaginalscheiben ektoptische Augen an den Flügeln hervorgerufen werden können (Weasner et al., 2009) und somit Toy und Ey offensichtlich in dieser Umgebung funktionell arbeiten können. Zum anderen, weil auch die Hipk-BiFC-Konstrukte im Rahmen einer anderen BiFC-Analyse bereits erfolgreich in diesem Gewebe verwendet wurden (Dewald et al., 2014).

Während der Komplementationanalyse sind zwei verschiedene Konformationen des zu testenden Hipk-NYFP-Fusionsproteins verwendet worden, um möglichen sterischen Hinderungen entgegenzuwirken. Die Fusion des N-terminalen Fragmentes des *Yellow Fluorescent Protein* (NYFP, AS 1-173) lag zum einen am N-terminalen Ende der Hipk, zum anderen am C-terminalen Ende der Hipk vor. Das C-terminale Fragment von YFP (CYFP, AS 156-239) wurde an das C-terminale Ende von Toy (bzw. Ey) fusioniert. Um das relativ schwache Signal eines rekonstituierten YFP (die Intensität beträgt nur 10 % im Vergleich zu intaktem YFP (Kerppola 2008)) zu verstärken und damit eine solide Dokumentation zu gewährleisten, wurde eine Antikörperfärbung durchgeführt. Dabei wurde durch mitgeführte technische Kontrollen ein falsch positives BiFC-Signal der Teilfragmente des YFP ausgeschlossen.

Schließlich konnte die *in vivo* Interaktion zwischen Hipk und Toy (sowie Hipk und Ey (Heyer, 2017)) nachgewiesen werden. Die Interaktion fand jeweils nur mit C-terminal an Hipk fusioniertem NYFP-Fragment (HipkNYFP) statt. Andere in der Arbeitsgruppe untersuchten Hipk-Interaktionspartner (Groucho, Nito) interagierten ausschließlich mit N-terminal fusioniertem NYFP-Fragment (NYFPHipk) (Dewald, 2014). Dies verdeutlicht die Notwendigkeit während einer solchen Interaktionsstudie verschiedene Kombinationen und Orientierungen zu testen, um optimale sterische Bedingungen zu ermöglichen (Kerppola, 2008).

Die Negativkontrolle eines Interaktions-Tests verläuft vorzugsweise über einen weiteren Test auf Interaktion mit den entsprechenden Fusionsproteinen, diesmal mit mutierten Interaktionsdomänen (Review Kodama & Hu, 2012). Da diese in den hier getesteten Proteinen

noch nicht genau bekannt sind, wurde zumindest mit einer technischen Negativkontrolle bestätigt, dass die einzelnen YFP-Fragmente selbst zu keinem Signal führen. Des Weiteren wurde die BiFC-Analyse mit Toy auch in Augen-Antennen-Imaginalscheiben (*Eye Antennal Discs*, EADs) durchgeführt, dem Gewebe, in dem sowohl Toy als auch Ey und Hipk endogen vorhanden sind. Hier konnte jedoch kein rekonstituiertes YFP nachgewiesen werden. Das könnte unter anderem daran liegen, dass endogene Proteine um die Bindung an eines der Fusionsproteine konkurrieren und somit die Interaktion der zu testenden Faktoren inhibieren.

Die Methode der BiFC hat sich in *Drosophila* bewährt, um eine *in vitro* bereits festgestellte Interaktion zweier Proteine *in vivo* zu bestätigen. Um jedoch im Sinne eines Screens nach bisher unbekanntem Protein-Interaktionspartnern zu suchen, wäre der Arbeitsaufwand sehr groß (Erzeugung zahlreicher transgener BiFC-Stämme, Kreuzungen über mehrere Generationen) und ist daher als primäre Analyse nicht geeignet. Zur weiteren Charakterisierung von Transkriptionsfaktoren könnte die Visualisierung von Proteinkomplexbindungen an genomische Loci in Polytäncrosomen von *Drosophila* anhand von BiFC eingesetzt werden (Deng & Kerppola, 2017).

Ein Nachteil der BiFC-Analyse ist, dass die Reifung des rekonstituierten YFP Zeit braucht, sodass Nachweise in Echtzeit schwierig durchzuführen sind. Jüngere Publikationen beschreiben BiFC-Analysen in lebenden *Drosophila*-Embryonen (Duffraisse et al., 2014) und reversible BiFC-Analysen, die unabhängig von YFP und GFP mit dem infrarot fluoreszierenden Protein IFP1.4 eine spatio-temporale PPI-Analyse ermöglichen (Tchekanda et al., 2014). Diese Art der Analyse könnte in Zukunft helfen, die Interaktion zwischen Hipk und Toy (bzw. Ey) auch dynamisch-temporal zu beschreiben. Als Erweiterung der „Standard“-BiFC ist es möglich, Multiprotein-Interaktionen in Form einer Multicolor- oder Rainbow-BiFC durchzuführen (Hu & Kerppola, 2003; Wang et al., 2018), die bisher aber in *Drosophila* noch nicht zur Anwendung kamen. Gerade im Kontext der komplex organisierten molekularen Basis der Augenentwicklung von *Drosophila* könnte eine erweiterte BiFC-Analyse mit verschiedenen Faktoren des RDGN weitere Erkenntnisse für die Rolle der Hipk während dieses Entwicklungsprozesses liefern.

5.2 Biochemische Analyse der Hipk-Phosphorylierungsstellen von Toy

Die Hipk (*Drosophila*) bzw. HIPK2 (Vertebraten) ist eine Prolin-geführte dualspezifische Ser/Thr-Kinase, die mit wichtigen zellulären Prozessen, wie z.B. der Proliferation, der Stressantwort und der Differenzierung, in Verbindung gebracht wird (Rinaldo et al., 2008; Schmitz et al., 2014; Kuwano et al., 2016; Blaquière & Verheyen, 2017). Die meisten der bisher identifizierten Hipk/HIPK2-Substrate sind Transkriptionsfaktoren oder transkriptionelle Koregulatoren (Übersicht Tab. 7.1). Als Substrat der HIPK2 ist z.B. der Transkriptionsfaktor PAX6 bekannt (Kim et al., 2006). Dieser ist Regulator der Organogenese von Auge, Nase, Pankreas und des zentralen Nervensystems (ZNS) (Walther & Gruss, 1991; Cvekl & Callaerts, 2017).

Drosophila besitzt die beiden PAX6-Homologe Toy und Ey (Czerny et al., 1999). Funktionell sind diese als Transkriptionsfaktoren an der Entwicklung des visuellen Systems und des ZNS von *Drosophila* beteiligt (Silver & Rebay, 2005; Kumar, 2009; Callaerts et al., 2001; Kammermeier et al., 2001; Clements et al., 2009; Furukubo-Tokunaga et al., 2009). Ihre DNA-Bindung erfolgt über jeweils zwei DNA-Bindedomänen, die N-terminale Paired Domäne (PD) und die Homeodomäne (HD) (Quiring et al., 1994; Czerny et al., 1999). Außerdem besitzen beide Proteine eine C-terminale Transaktivierungsdomäne (TAD) (Czerny & Busslinger, 1995; Punzo et al., 2004; Weasner et al., 2009). Ey wurde in *Drosophila* S2-Zellkultur bereits als Substrat der Hipk identifiziert (Choi et al., 2005). Während der eigenen Diplomarbeit konnte das Enzym-Substrat Verhältnis zwischen Hipk und Ey anhand von *in vitro* Phosphorylierungsassays bestätigt werden. Darüber hinaus konnten hierbei die C-terminalen Transaktivierungsdomänen von sowohl Ey als auch Toy als Ziel einer Phosphorylierung durch die Hipk identifiziert werden. Dabei stellte sich die Phosphorylierung der TAD von Toy wesentlich stärker dar als die Phosphorylierung der TAD von Ey (Steinmetz, 2006). Eine weiterführende Arbeit innerhalb unserer Arbeitsgruppe identifizierte im C-terminalen Bereich von Toy zwei Hipk-Phosphorylierungsstellen, Ser⁴²⁴ und Thr⁴²⁸ (Laupsien, 2007). Die hierzu angewandte Peptidfilteranalyse basiert auf einem *in vitro* Kinaseassay mit synthetischen Peptiden, die auf einer Zellulose-Membran immobilisiert sind, hergestellt mit der SPOT-Methode (Frank et al., 2002; Hilpert et al., 2007).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine umfassende biochemische Analyse des gesamten Proteins Toy mit Hilfe von *in vitro* Phosphorylierungsassays durchzuführen. Da aufgereinigte GST-Fusionsproteine in löslicher Form einer nativen Form der zu untersuchenden Proteine mehr entsprechen als synthetische Peptide während einer Peptidfilteranalyse, diente die Methode

zugleich der Überprüfung der bisher identifizierten Hipk-Phosphorylierungsstellen von Toy. Die Vorgehensweise der *in vitro* Phosphorylierungsanalyse mit aufgereinigten GST-Fusionsproteinen wurde bereits bei den Hipk-Substraten Groucho (Gro) und Spenito (Nito) (Steinmetz, 2006; Lee et al., 2009a; Dewald et al., 2014) erfolgreich angewandt. Mit der gleichen Methode wurden auch HIPK2- sowie die CK2-Phosphorylierungsstellen von Pancreatic and duodenal homeobox-1 (PDX-1) eingegrenzt (Boucher et al., 2009; Meng et al., 2010) sowie eine Mutationsanalyse zur Bestimmung der Phosphorylierungsstellen von PAX6 durchgeführt (Kim et al., 2006).

Unter Berücksichtigung des in unserer Arbeitsgruppe entwickelten Hipk Konsensus P-S/T-X-(X)-S/T bzw. S/T-X-(X)-S/T-P (Dewald et al., 2014) wurden durch Betrachtung der Aminosäuresequenz von Toy zunächst 14 potentielle Hipk-Phosphorylierungscluster definiert. Daraufhin erfolgte eine sukzessive Eingrenzung der Cluster durch *in vitro* Phosphorylierungsassays mit fortschreitend trunkierten Proteinfragmenten, ergänzt durch eine Mutationsanalyse zur Bestimmung der einzelnen phosphorylierten Aminosäurepositionen. Als Resultat der Eingrenzung konnten vier der 14 zuvor definierten Hipk-Phosphorylierungscluster *in vitro* bestätigt werden.

In jedem der vier neu identifizierten Cluster wurde eine, dem Prolin direkt benachbarte, Aminosäure phosphoryliert, sodass insgesamt vier bisher unbekannte Hipk-Phosphorylierungsstellen in Toy identifiziert werden konnten. Eine davon innerhalb der N-terminal gelegenen PD (Ser¹²¹) und drei weitere im C-terminalen Bereich, der TAD (Thr³⁹⁵, Ser⁴¹⁰ und Thr⁴⁵²). Die Hipk-Phosphorylierung innerhalb der PD betrifft die RED-Subdomäne (Abb. 5.1). Das Vorkommen mehrerer Hipk-Phosphorylierungsstellen innerhalb der TAD entspricht den Beobachtungen bei HIPK2/PAX6; der N-terminale Bereich wurde in diesem Fall nicht analysiert (Kim et al., 2006).

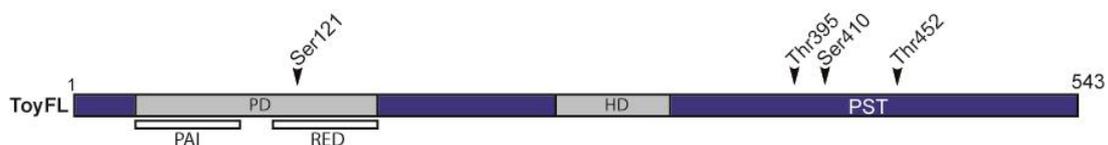


Abb. 5.1: Darstellung der identifizierten Hipk-Phosphorylierungsstellen in Toy. PD Paired Domäne, PAI N-terminale Subdomäne der PD, RED C-terminale Subdomäne der PD, HD Homeodomäne, PST Prolin-Serin-Threonin-reiche Region (auch: Transaktivierende Domäne, TAD). Zahlen geben die endständigen Aminosäuren an. Hipk-Phosphorylierungsstellen sind durch Pfeilspitzen markiert.

Die zuvor mittels Peptidfilteranalyse identifizierten Hipk-Phosphorylierungsstellen Ser⁴²⁴ und Thr⁴²⁸ (Laupsien, 2007) wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt. Die Aminosäureabfolgen flankierend zu diesen beiden Phosphorylierungsstellen entsprechen außerdem nicht dem aktuellen Hipk-Konsensus (Dewald et al., 2014). Möglicherweise wurden

beide Aminosäuren während der *in vitro* durchgeführten Peptidfilteranalyse von Hipk phosphoryliert, weil die recht kurzen Peptidfragmente in dieser Form einem „echten“ Hipk-Substrat sehr ähnlich waren. Da sich jedoch eine physiologische Konsequenz aus der Zerstörung der beiden Phosphorylierungsstellen ergeben hat, lässt sich daraus schließen, dass hier *in vivo* eventuell eine Phosphorylierung durch eine andere Kinase stattfinden könnte.

Zahlreiche Hipk/HIPK2-Substrate werden zusätzlich von anderen Kinasen phosphoryliert. Allen voran sind ebenfalls Prolin-geführte, Mitogen aktivierte Protein Kinasen (MAPKs) zu nennen. Zum Beispiel wird PAX6 auch durch die MAP Kinasen p38 und Extracellular-signal regulated Kinase (ERK) phosphoryliert (Mikkola et al., 1999) und p53 ist nicht nur Substrat von HIPK2, sondern auch von der MAP Kinase p38 (Bulavin et al., 1999). Auch der Transkriptionsfaktor PDX-1, transkriptioneller Regulator der Insulin Expression, wird unter anderem von HIPK2 und CK2 phosphoryliert (Boucher et al., 2009; Meng et al., 2010). Im Kontext der Augenentwicklung von *Drosophila* wurde Eya als Substrat verschiedener MAPKs beschrieben und bei Ey, So und Dac wurden zumindest MAPK Konsensus Sequenzen gefunden (Clark-Lewis et al., 1991), während Toy als einziger RDGN-Faktor keine (strikte) MAPK Konsensus Sequenz aufweist (Hsiao et al., 2001; Morillo et al., 2012). Somit bleibt zu untersuchen, ob Toy vielleicht auch das Substrat einer MAPK (mit weniger stringenter Konsensus) oder einer anderen Kinase darstellt.

Phosphorylierungen der RDGN-Faktoren durch verschiedene Kinasen könnten Teil der spatio-temporalen Regulation des RDGNs sein. Das Netzwerk agiert dynamisch, gesteuert durch Wechselwirkungen der RDGN-Faktoren untereinander, aber auch durch den Einfluss verschiedener Signalwege von außerhalb (Kumar, 2009; Atkins et al., 2013; Davis & Rebay, 2017) und nicht nur im Rahmen der Augenentwicklung, sondern z.B. auch während der Muskel-, der Ohr- und der Gonaden Entwicklung (Relaix & Buckingham, 1999; Silver & Rebay, 2005). Daher ist neben der präzisen Regulation der Genexpression vermutlich auch eine entsprechende Modulation der Aktivität der Transkriptionsfaktoren durch posttranslationale Modifikationen notwendig.

Die vier während dieser Arbeit identifizierten Phosphorylierungsstellen von Toy sind in allen *Drosophilidae* evolutionär konserviert (vgl. 4.3.4, Abb. 4.15), was dafür spricht, dass sie funktionell relevante Domänen darstellen. Das phosphorylierte Aminosäure-Motiv innerhalb der Toy-PD (¹²⁰PSIFA¹²⁴) sowie zwei der drei Aminosäure-Motive innerhalb der Toy-TAD (⁴⁰⁷SSESP⁴¹¹ und ⁴⁵¹MTPS⁴⁵⁴) sind auch in der Aminosäuresequenz von Ey zu finden. Während der vorliegenden Arbeit wurde überprüft, ob die beiden konservierten Motive in Ey von der Hipk (bei entsprechend klonierten, heterolog exprimierten und aufgereinigten Fusionsproteinen) *in*

in vitro phosphoryliert werden. Der potentielle Phosphorylierungscluster ⁵⁴⁷SSESP⁵⁵¹ wurde auch in Ey phosphoryliert, der Cluster ⁸⁰⁹MTPS⁸¹² nicht (nicht gezeigt). Dies spricht dafür, dass das SSESP-Motiv zwar positionell nicht konserviert geblieben ist (die Transaktivierungsdomänen von Toy und Ey zeigen große Unterschiede hinsichtlich ihrer Sequenz, vgl. Abb. 2.7), aber als Motiv erhalten geblieben ist und trotzdem von der Hipk erkannt wird.

Ein minimal verändertes Aminosäure-Motiv, PTIFA (mit einem Thr statt eines Ser, damit an dieser Position aber weiterhin eine phosphorylierbare Aminosäure), findet sich auch in der PD der beiden PAX6-ähnlichen *Drosophila* Proteine Eygone (Eyg) und Twin of Eygone (Toe) (Jun et al., 1998; Jang et al., 2003). Eyg und Toe sind Homologe der durch alternatives Spleißen entstehenden Vertebraten PAX6(5a)-Isoform. Sie werden allerdings von separaten Genen codiert und resultieren nicht aus alternativem Spleißen. Beiden Proteinen fehlt der N-terminale Teil der PD und somit die PAI-Subdomäne (Jang et al., 2003).

Betrachtet man alle neun Klassen der *Pax* Genfamilie, ist das PSIFA-Motiv lediglich in der Klasse der *Pax6* konserviert. Somit ist das PSIFA-Motiv bis zum PAX6 Homolog der Maus, Small eyes (Sey; Roberts, 1967), und zum PAX6 des Menschen, Aniridia (AN2; Ton et al., 1991), konserviert geblieben. Drei weitere PAX-Proteine zeigen ein ähnliches PTMFA-Motiv (aus den Klassen der PAX2, 5 und 8).

Die Hipk-Phosphorylierungsstellen innerhalb der Toy-TAD sind zum Teil konserviert in Vertebraten. In humanem PAX6 wurden Thr²⁸¹, Thr³⁰⁴ und Thr³⁷³ mittels Massenspektrometrie als HIPK2-Phosphorylierungsstellen identifiziert (Kim et al., 2006). Vergleicht man die Aminosäuresequenz von PAX6 mit der von Toy bzw. Ey, fällt ein konservierter Sequenzbereich auf. Thr²⁸¹ befindet sich innerhalb eines ²⁷⁹SNTP²⁸²-Motivs von PAX6, das bei einem Sequenzabgleich positionell mit dem ⁵⁴⁷SSESP⁵⁵¹-Motiv von Ey übereinstimmt bzw. dem ⁴⁰⁷SSESP⁴¹¹-Motiv von Toy zugeordnet werden kann. In PAX6 ist das dem Prolin benachbarte Threonin das Ziel der HIPK2-Phosphorylierung, während in Toy das entsprechende Serin von der Hipk phosphoryliert wird. Damit ist zumindest eine der drei Hipk-Phosphorylierungsstellen innerhalb der TAD konserviert bis zu Maus und Mensch.

Die gefundenen Hipk-Phosphorylierungsstellen in Toy stimmen weitestgehend mit dem zuvor entwickelten Konsensus überein. Ein Unterschied zeichnet sich ab, abhängig davon, ob ein Substrat zur PAX Familie gehört oder nicht. Der Konsensus für PAX Mitglieder stellt sich folgendermaßen dar, S/X-X-S/T-P-S/X, während andere *Drosophila* Substrate dem Konsensus S/X-R/X-S/T-P-S/X näher sind (es ist zusätzlich ein Arginin vorhanden) (Abb. 5.2). Durch den Abgleich aller Hipk/HIPK2-Substrate (mit bekannten Phosphorylierungsstellen) der

verschiedenen Spezies ergibt sich der Konsensus S/P-X-S/T-P-S/P (Tab. 7.1, siehe Anhang). Dieser Konsensus nähert sich stark dem strikten MAPK Konsensus P-X-S/T-P an (Clark-Lewis et al., 1991). Bestätigt wird diese Beobachtung durch gemeinsame Phosphorylierungsstellen der HIPK2 mit der MAP Kinase p38, beide Kinasen phosphorylieren die Transkriptionsfaktoren PDX-1 (Ser²⁶⁹; An et al., 2010; Zhou et al., 2013) und p53 (Ser⁴⁶; D’Orazi et al., 2002; Hofmann et al., 2002) an der gleichen Phosphorylierungsstelle.

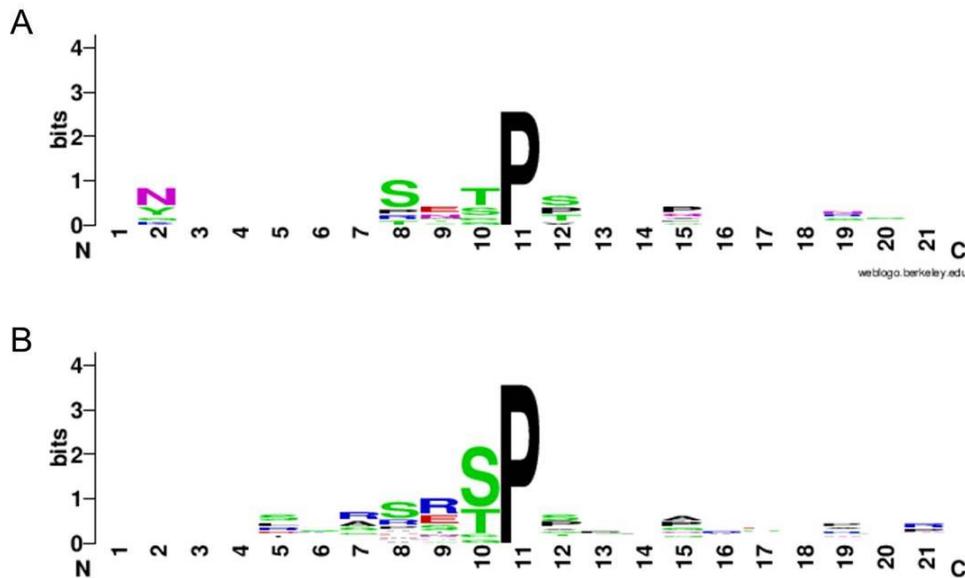


Abb. 5.2: Grafische Darstellung (Logo) des Sequenzvergleiches von Hipk-Substraten. Die Gesamthöhe gibt den Konservierungsgrad der Sequenz an der entsprechenden Position an, die Höhe einzelner Buchstaben zeigt die relative Frequenz einer Aminosäure an dieser Position an. **(A)** Hipk-Konsensus für PAX-Familienmitglieder (Toy, Ey, PAX6). **(B)** Hipk-Konsensus für bisher bekannte Hipk-Substrate bei *Drosophila melanogaster* (Toy, Ey, Gro, Nito, Hbn, Ems, Msh und Yki). Die Proteinsequenzen der Substrate wurden am Kinase-führenden Prolin ausgerichtet (soweit bekannt). Die Grafik wurde online erstellt auf weblogo.berkeley.edu (Crooks et al., 2004).

Der Phosphorylierungsstatus der PD von Toy könnte dessen DNA- bzw. Protein-Bindefähigkeit beeinträchtigen. Die Phosphorylierung an Ser¹²¹ findet in der „RED“-Subdomäne statt, dem C-terminalen Bereich der zweiteiligen PD (Czerny et al., 1993). Untersuchungen haben gezeigt, dass Mutationen der PD sich unterschiedlich auswirken können, je nachdem, ob der N-Terminale oder der C-terminale Bereich der PD betroffen ist, beruhend darauf, dass die beiden Bereiche unterschiedliche Aufgaben während der Entwicklung übernehmen (Azuma et al., 1996). Vor Kurzem konnte durch GST-Pulldownexperimente mit Ey gezeigt werden, dass die RED-Subdomäne der Ey-PD eine intramolekulare Interaktion mit der dritten Helix der Ey-HD eingeht und dass diese Interaktion die DNA-Bindeeigenschaften der Ey-PD beeinflusst (Tanaka-Matakatsu et al., 2015). Außerdem interagiert die RED-Subdomäne der PAX6-PD in Zebrafisch mit der DNA-Erkennungs-Helix der PAX6-HD und sogar mit der von weiteren

Homeodomänproteinen (Bruun et al., 2005). PAX6 unterscheidet sich hiermit von den anderen PAX-Proteinen, welche eher über die N-Terminale PAI-Subdomäne der PD mit HDs interagieren.

Die PAX6 PD-HD Interaktionsoberfläche setzt sich zusammen aus fünf Aminosäureresten der RED-Subdomäne (Glu¹⁰¹, Glu¹¹², Glu¹²⁰, Asp¹²³ und Glu¹²⁸) und es wurde bereits beschrieben, dass sie sowohl intra- als auch intermolekular die PAX6-vermittelte Genregulation beeinträchtigen kann (Bruun et al., 2005). Interessanterweise zeigt der Sequenzvergleich eine Konservierung des in der Toy-PD phosphorylierten PSIFA-Motivs mit der PAX6-PD von Zebrafisch, genauer, Toy-Ser¹²¹ korreliert mit PAX6-Ser¹¹⁵ (das innerhalb der beschriebenen Interaktions-Oberfläche liegt). Eine Phosphorylierung an dieser Stelle könnte somit das Interaktionsverhalten zwischen PD und HD verändern und so die DNA- bzw. Protein-Bindeeigenschaften von PAX6/Toy. Das wiederum könnte die Funktion von Toy als Transkriptionsfaktor beeinträchtigen, der über seine PD an Enhancer-Sequenzen der Gene *atonal*, *eyeless*, *sine oculis* und *string* bindet (Czerny et al., 1993; Punzo et al., 2002; Zhang et al., 2006; Lopes & Casares, 2015).

Posttranslationale Modifikationen in Form von Phosphorylierung(en) in der C-terminalen TAD von Toy (Thr³⁹⁵, Ser⁴¹⁰ und Thr⁴⁵²) ändern möglicherweise die transaktivierende Fähigkeit von Toy. Bei Vertebraten führt die Phosphorylierung von Zebrafisch-PAX6 durch die MAPK's p38 und ERK in Zellkultur zu einer gesteigerten Transaktivierung (Mikkola et al., 1999). Ähnlich wie bei Toy wurden auch hier zunächst mehrere Phosphorylierungsstellen innerhalb der TAD *in vitro* identifiziert. Eine dieser Phosphorylierungsstellen, Ser⁴¹³, ist konserviert von Seeigeln bis zum Menschen und wird auch *in vivo* phosphoryliert. Eine Mutation von Ser⁴¹³ zu Ala führt zu einem deutlichen Verlust (60-80 %) der Transaktivierung (Mikkola et al., 1999). Massenspektrometrische Analysen haben gezeigt, dass humanes PAX6 durch die HIPK2 an den Aminosäuren Thr²⁸¹, Thr³⁰⁴ und Thr³⁷³ phosphoryliert wird, dadurch verstärkt mit dem Kofaktor p300 interagiert und somit auch hier die transaktivierende Fähigkeit von PAX6 gesteigert wird (Kim et al., 2006). Im Gegensatz hierzu bewirkt die Dephosphorylierung von PAX6 durch die Protein Ser/Thr Phosphatase-1 (PP-1) eine verminderte Aktivität von PAX6 (Yan et al., 2007).

Allgemein scheint sich eine Hipk/HIPK2-Phosphorylierung meist positiv auf die Aktivität eines Transkriptionsfaktors auszuwirken. Da bereits gezeigt werden konnte, dass neben der transaktivierenden Eigenschaften der TAD auch die PD von Toy essentiell zur Transaktivierung beiträgt (Weasner et al. 2009), stellen sowohl die Hipk-Phosphorylierungsstelle Ser¹²¹ innerhalb der PD als auch die bis zu den Vertebraten konservierte Hipk-Phosphorylierungsstelle Ser⁴¹⁰ vielversprechende Kandidaten dar, um auch *in vivo* funktionelle Relevanz zu zeigen.

5.3 Auswirkungen der Hipk-Phosphorylierung von Toy *in vivo*

In einer früheren Arbeit wurden phosphorylierungsmutante UAS toy -Stämme generiert, um die zuvor mittels Peptidfilteranalyse identifizierten Hipk-Phosphorylierungsstellen Ser⁴²⁴ und Thr⁴²⁸ von Toy *in vivo* auf ihre funktionelle Relevanz hin zu untersuchen. Hierbei war zu beobachten, dass, wenn beide Hipk-Phosphorylierungsstellen ausgeschaltet sind, fehlexprimiertes Toy ektopische Augen an den Beinen weniger effektiv induziert (Laupsien, 2007).

Um Positionseffekte, die bei der damals angewandten Methode zur Herstellung transgener Fliegen aufgetreten sein können, auszuschließen, wurden in der vorliegenden Arbeit zunächst die betroffenen phosphorylierungsmutanten UAS toy -Stämme neu generiert. Durch die Verwendung eines zum PhiC31-Integrationssystem in *Drosophila* (Groth et al., 2004; Bateman et al., 2006; Bischof et al., 2007) kompatiblen Transformationsvektors konnten alle Konstrukte am gleichen Integrationsort in das Genom eingebaut werden. Hieraus konnte eine präziser vergleichende Fehlexpressionsanalyse mit den daraus resultierenden Stämmen gewährleistet werden. Auch hierbei zeigte sich eine funktionelle Relevanz der Doppelmutante ToySATA, (beide zuvor identifizierten Hipk-Phosphorylierungsstellen Ser⁴²⁴ und Thr⁴²⁸ liegen zu Alanin mutiert und damit zerstört vor).

Weiterhin konnten bei einer umfassenden Kartierung der Hipk-Phosphorylierungsstellen von Toy mit Hilfe von *in vitro* Phosphorylierungsanalysen vier Phosphorylierungsstellen identifiziert werden (Ser¹²¹, Thr³⁹⁵, Ser⁴¹⁰ und Thr⁴⁵²). Diese entsprechen nicht den zuvor mittels Peptidfilteranalyse gefundenen Phosphorylierungsstellen des C-terminalen Bereiches von Toy (Laupsien, 2007) (siehe auch Diskussionsteil 5.2).

Entsprechend der vier neu identifizierten Hipk-Phosphorylierungsstellen wurden weitere UAS toy -Stämme hergestellt, um Auswirkungen eines veränderten Phosphorylierungsstatus von Toy *in vivo* zu untersuchen. Die induzierte (Fehl-)Expression der phosphorylierungsmutanten UAS toy -Konstrukte wurde auf verschiedene Art und Weise zur Charakterisierung einer funktionellen Relevanz der Hipk-Phosphorylierungsstellen eingesetzt.

5.3.1 Zielgenaktivierung durch die Phosphorylierungsmutante ToyVM

Die beiden PAX6 Homologe, Toy und Ey, sind während der Insectenevolution durch Duplikation auseinander hervorgegangen und man geht davon aus, dass das ursprüngliche Gen autoregulatorisch kontrolliert war, so wie es in Organismen zu beobachten ist, die lediglich ein

Pax6-Gen besitzen (Czerny et al., 1999; Aota et al., 2003). Dafür spricht auch, dass Toy und Ey im gleichen entwicklungspezifischen Hintergrund eine ähnliche, aber nicht-redundante Funktion ausüben (Mansouri et al., 1996; Jacobsson et al., 2009). Vermutlich haben sich beide Proteine nach der Duplikation kreuzweise reguliert, ein Phänomen, das auch bei anderen Pax-Duplikationen beobachtet wurde (Pfeffer et al., 1998). Eine Mutation innerhalb von *ey* führte zu einem Aminosäureaustausch an Position 14 der DNA-bindenden Paired Domäne von Eyeless (Ey-PD) von Asparagin zu Glycin und folglich zur Divergenz der DNA-Bindung der Toy-PD und der Ey-PD (Czerny et al., 1999). Die Mutation führte dazu, dass die Ey-PD nicht mehr autoregulatorisch binden konnte, aber auch nicht mehr an *toy*. Anhand der Theorie der interkalaren Evolution lässt sich erklären, dass die Expression von *ey* damit abhängig von Toy wurde (Gehring & Ikeo, 1999). Die autoregulatorische Regulation ist hier zu einer heteroregulatorischen Kontrolle der *ey* Expression durch die Bindung von Toy geworden. Die Bindung von Toy an die PAX6 Bindestellen innerhalb des augenspezifischen Enhancers E3.6 im zweiten Intron von *ey* ist essentiell für die Aktivierung der augenspezifischen embryonalen und larvalen *ey* Expression (Czerny et al., 1999; Hauck et al., 1999).

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass durch die Fehlexpression von wildtypischem bzw. phosphorylierungsmutantem Toy (ToyVM, alle Hipk-Phosphorylierungsstellen, Ser¹²¹, Thr³⁹⁵, Ser⁴¹⁰ und Thr⁴⁵², zu Alanin mutiert) die Expression des *eylacZ*-Reportergens gleichermaßen induziert wird. Da dem Reporter gen die Sequenz des E3.6-Enhancers vorgeschaltet ist, bedeutet dies, dass auch die phosphorylierungsmutante Form der Toy-PD (ToyPM, Ser¹²¹ zu Alanin mutiert) den augenspezifischen Enhancer von Ey aktivieren kann. Die Zerstörung der Hipk-Phosphorylierungsstelle innerhalb der PD von Toy scheint somit *in vivo* keinen Einfluss auf die Bindung von Toy an den augenspezifischen *ey* Enhancer zu haben.

Das entspricht der Beobachtung, dass die HIPK2-Phosphorylierung von PAX6 nicht dessen DNA-Bindefähigkeit beeinträchtigt (Kim et al., 2006).

Aus derselben Analyse wird deutlich, dass Toy durch die Zerstörung der Hipk-Phosphorylierungsstellen innerhalb der Transaktivierungsdomäne (TAD) (Thr³⁹⁵, Ser⁴¹⁰ und Thr⁴⁵²) offenbar nicht die Fähigkeit verliert, sein Zielgen *ey* zu aktivieren.

In Vertebraten wird durch die HIPK2-Phosphorylierung der Aktivierungsdomäne von PAX6 dessen Transaktivierungsfähigkeit gesteigert, weil PAX6 verstärkt mit p300 interagiert (Kim et al., 2006). Die Phosphorylierung der PAX6 Aktivierungsdomäne durch die Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPKs), Extracellular-regulated Kinase (ERK) und p38 Kinase steigert ebenfalls die Transaktivierungsfähigkeit von PAX6 (Mikkola et al., 1999). Werden

die Phosphorylierungsstellen in den PAX6 Aktivierungsdomänen durch eine Mutation zu Alanin zerstört, wird das Transaktivierungspotential deutlich reduziert (Mikkola et al., 1999).

Da sich der molekulare Kontext im Gewebe der Flügelimaginalscheiben von dem Gewebe unterscheidet, in dem die untersuchten Faktoren normalerweise aufeinander treffen, könnte es sein, dass wichtige zur Steigerung (oder Hemmung) der Transaktivierung nötige Kofaktoren fehlen und sich daher keine signifikante Änderung der *ey*-Expression abzeichnet. Es könnte sein, dass der unphosphorylierte Zustand von Toy dem „normalen“ wildtypisch (aktiven) Zustand entspricht und möglicherweise eher eine Phosphorylierung zu einer veränderten Transaktivierungsfähigkeit führen würde. Prinzipiell kann Toy im unphosphorylierten Zustand den augenspezifischen *ey*-Enhancer aktivieren.

5.3.2 Rescue-Analyse von *toy^{hdl}/toy^{G7.39}*-Fliegen

Das Gen *twin of eyeless* (*toy*) ist essentiell für die Entwicklung fast aller Kopfstrukturen von *Drosophila*, die sich aus der Augen-Antennen-Imaginalscheibe entwickeln, daher führt eine homozygote Mutation von *toy* zum Verlust entsprechender Strukturen und zeigt sich in einem kopflosen (*headless*, *hdl*) Phänotyp (Hochman et al., 1964; Kronhamn et al., 2002). Die korrekte Regulation der *toy* Expression wird durch verschiedene Bereiche in der 5'-Region des Gens *toy* gewährleistet. Es konnten bisher zwei Enhancer-Regionen beschrieben werden, die in der Lage sind, durch exogene Expression eines UAS*toy*-Konstruktes den homozygoten Ausfall des endogenen *toy* zu retten (Jacobsson et al., 2009; Blanco et al., 2010). Der *Embryonic Eye Primordium* (EEP) Enhancer entspricht einem 300 bp DNA-Fragment ~8 kb stromaufwärts des Transkriptionsstartes von *toy* und induziert dessen Expression bereits im embryonalen Augenprimordium (Blanco et al., 2010). In Anlehnung an eine Rescue-Analyse, bei der durch die EEPGal4-induzierte Expression von wildtypischem UAS*toy* die Letalität der homozygoten *toy^{hdl}/toy^{hdl}*-Mutante gerettet werden konnte, wurden die in der vorliegenden Arbeit erzeugten UAS*toy*WT und UAS*toy*VM-Konstrukte in ihrer Fähigkeit getestet, die Letalität der Allelkombination *toy^{hdl}/toy^{G7.39}* zu retten. Das *toy*-Allel *toy^{G7.39}* (Flister et al., nicht veröffentlicht) ist aktuell nicht exakt molekular definiert, durch Komplementationskreuzungen wurde gezeigt, dass sie die Region der *toy^{hdl}*-Mutation nicht komplementiert. *toy^{hdl}/toy^{G7.39}* führt zu einem vergleichbaren letalen Phänotyp wie *toy^{hdl}/toy^{hdl}*.

Die Auswertung der Rescue-Kreuzungen ergab, dass eine exogene Expression von wildtypischem UAS*toy*WT die Letalitätsrate der Allelkombination *toy^{hdl}/toy^{G7.39}* deutlich senken

kann (von 100 % auf 44 %). Bei der exogenen Expression von phosphorylierungsmutantem UAS toy VM wird die Letalitätsrate zwar auch gesenkt, aber nur auf 69 %.

Die Mutation der im Rahmen dieser Arbeit identifizierten Hipk-Phosphorylierungsstellen führt somit zu einem Toy-Protein, das funktionelle Defizite gegenüber der wildtypischen Variante aufweist. Da die exogene Expression mit Hilfe des EEPGal4-Treibers in den Primordien der Augen-Antennen-Imaginalscheiben stattfindet, kann vermutet werden, dass die Hipk-Phosphorylierung von Toy während der frühen Augenentwicklung eine Rolle spielt.

5.3.3 Fehlexpressionsanalyse der Phosphorylierungsmutanten

Die erzeugten phosphorylierungsmutanten UAS toy -Konstrukte wurden sowohl im augenentwicklungsspezifischen Kontext als auch ektopisch exprimiert. Die ektopische Expression bietet den Vorteil, einen Faktor losgelöst von seinem endogenen Umfeld und den damit einhergehenden Bedingungen und Einflüssen in einem anderen Gewebe oder in einem anderen Entwicklungsstadium zu untersuchen. Die ektopische Expression des Masterregulators *toy* kann in manchen Geweben zur Induktion ektopischer Augen führen (Czerny et al., 1999). Diese können als simplifiziertes Modellgewebe der normalen Augenentwicklung im Rahmen eines „Ektopische-Augen-Assay“ genutzt werden (Halder et al., 1995; Pignoni et al., 1997; Anderson et al., 2012; Blaquièrre et al., 2014).

Methodisch wurde auf das UAS/Gal4-System (Brand & Perrimon, 1993) zurückgegriffen, ein etabliertes und vielseitig einsetzbares Zwei-Komponenten-Expressionssystem. Dennoch gibt es wichtige Punkte, die zu beachten sind im Umgang mit diesem System. Zum einen die Temperaturabhängigkeit bei der Bindung des Gal4-Proteins an die UAS-Zielsequenzen (Jarrett, 2000). Für die vorliegende Arbeit wurde darauf geachtet, insbesondere bei vergleichenden Analysen, dass alle Kreuzungen parallel und unter denselben Umgebungsbedingungen stattfanden. Des Weiteren ist zu berücksichtigen, dass eine Expression mit diesem System i.d.R. keine physiologischen Mengen des exprimierten Faktors hervorbringt. Bei der induzierten (Fehl/Über-)Expression in dem Gewebe, in dem der Faktor normalerweise aktiv ist, kann es daher zu einem Ungleichgewicht der vorliegenden Zusammenhänge kommen, was nicht selten eine klare Auswertung erschwert.

Im Verlauf der durchgeführten Experimente zeigte sich, dass die augenspezifische Expression der verschiedenen UAS toy -Konstrukte mit Hilfe des *dpp*Gal4-Treibers keine signifikanten Ergebnisse hervorbrachte. Vermutlich kam es zur Kompensation oder Hemmung potentieller

Effekte, da erhöhte Mengen an PAX6-Protein im Augengewebe die eigene Transkription hemmen können (Czerny & Busslinger, 1995; Schedl et al., 1996).

Auch in den Antennen-Scheiben führte keines der exprimierten *UAS_{toy}*-Konstrukte zur Entstehung ektopischer Augen oder Photorezeptoren. Dennoch war ToyPM, in gleichem Maße wie ToyWT, zu einer (schwachen) Aktivierung einer zellautonomen *eya*-Expression befähigt, während ToyPM_E diese *eya*-Expression nicht aktivieren konnte. Dies könnte neben dem veränderten Phosphorylierungsstatus von Ser¹²¹ auch an einer unmittelbaren Degradation des fehlexprimierten Proteins liegen, denn in den entsprechenden Antennenscheiben war deutlich weniger Toy nachgewiesen worden.

Die Transaktivierungsfähigkeit von Toy stammt nicht alleine von der TAD, sondern zum Teil auch von der PD (Punzo et al., 2004; Weasner et al., 2009). Daher könnte die Phosphorylierung an Ser¹²¹ die Transaktivierungsfähigkeit der Toy-PD verändert haben.

Im Vergleich zu Ey ist Toy als schwächerer transkriptioneller Aktivator beschrieben und kann in den Antennenscheiben normalerweise keine ektopischen Augen induzieren (Halder et al., 1995; Czerny et al., 1999; Punzo et al., 2004; Weasner et al., 2009). Das Potential von Toy und Ey ektopische Augen in Antennenscheiben zu induzieren hängt vor allem von deren C-terminaler TAD ab. Ey interagiert vermutlich mit einer anderen Gruppe von Kofaktoren als Toy (Punzo et al., 2004; Weasner et al., 2009) und besitzt zusätzlich repressive Fähigkeiten, die dazu beitragen, dass es sich als Aktivator ektopischer Augen im Antennengewebe durchsetzen kann (Weasner et al., 2009). Der molekulare Kontext im Gewebe der Antennenscheiben eignet sich aber generell zur Induktion ektopischer Augen, da bei einer Fehlexpression der RDGN-Faktoren Ey, So, Dac und Opt ektopische Augen an den Antennen beobachtet werden konnten (Halder et al., 1995; Bonini et al., 1997; Shen & Mardon, 1997; Salzer & Kumar, 2010; Anderson et al., 2012).

Der nicht-phosphorylierte Zustand der PD bei weiterhin phosphorylierbarer TAD scheint dem (schwach) aktivierenden Zustand von ToyWT in diesem Assay am ähnlichsten zu sein. Die Manipulation der Phosphorylierungsstellen innerhalb der TAD minderte die Transaktivierungsfähigkeit oder führte zum Abbau des fehlexprimierten Toy.

Die Expression der *UAS_{toy}*-Konstrukte in Bein-Imaginalscheiben hat in jedem Fall zur Induktion einer nicht-zellautonomen *eya*-Expression und schließlich zur Bildung von Elav-positiven Photorezeptoren geführt. Allerdings waren die Phosphorylierungsmutanten weniger effizient in der Induktion ektopischer Augen, als ToyWT. Die Proteinmenge, die initial durch die gezielte Expression der verschiedenen *UAS_{toy}*-Konstrukte in den Beinscheiben synthetisiert wurde, sollte vergleichbar sein, denn alle Konstrukte unterliegen denselben Positionseffekten und wurden

unter identischen Bedingungen exprimiert. Somit wird durch die Manipulation der Phosphorylierungsstellen die Transaktivierungsfähigkeit direkt oder indirekt beeinträchtigt. Bei Vertebraten wirkt sich die Phosphorylierung der PAX6-TAD durch HIPK2 positiv auf dessen Transaktivierungsfähigkeit aus (Kim et al., 2006). Auch die Phosphorylierung der PAX6-TAD durch die MAP Kinasen p38 und ERK steigert die transkriptionelle Aktivierung der Zielgene von PAX6 (Mikkola et al., 1999). Die Beobachtung, dass ToyVM in geringerem Maße als ToyWT dazu in der Lage ist, die Letalitätsrate einer homozygoten *toy*-Mutation zu retten (siehe 4.4.4), deutet ebenfalls darauf hin, dass die Zerstörung der Hipk-Phosphorylierungsstellen die transaktivierende Fähigkeit von Toy herabsetzt.

Es konnte außerdem eine Rolle der Hipk auf der Ebene der transkriptionellen Regulation von *toy* und *ey* festgestellt werden. Während des Voranschreitens der morphogenetischen Furche (MF), sowohl während der normalen Augenentwicklung als auch in ektopischen Augen, ist die transkriptionelle Repression von *toy* und *ey* notwendig, um die Differenzierung von Photorezeptoren zu ermöglichen. Diese Repression erfolgt vermutlich indirekt über den Hedgehog (Hh)- bzw. Decapentaplegic (Dpp)-Signalweg (Blaquière et al., 2014).

Zieht man beide Möglichkeiten der Hipk Regulation in Betracht, also transkriptionelle und posttranslationale Regulation, könnte bereits synthetisiertes Toy (und Ey) durch posttranslationale Hipk-Phosphorylierung in seiner transaktivierenden Rolle reguliert werden, während die indirekte transkriptionelle Repression der *toy*- bzw. *ey*-Expression durch Hipk dafür sorgt, dass zum Beginn der Differenzierung kein „Nachschub“ an Toy und Ey mehr vorhanden ist, damit sich Photorezeptoren entwickeln können. Bei den phosphorylierungsmutanten Toy-Varianten würden die resultierenden ektopischen Augen kleiner ausfallen als bei ToyWT, weil die Transaktivierung beeinträchtigt wird.

Die Beobachtungen nach der Fehlexpression der verschiedenen UAS*toy*-Konstrukte mit dem flügel-spezifischen Treiber *MS1096Gal4* entsprechen in ihrer Grundaussage denen in der Antennenscheibe. ToyWT und ToyPM haben etwa das gleiche (schwache) Potential, ektopisches retinales Gewebe zu induzieren. Die übrigen phosphorylierungsmutanten Konstrukte können kein ektopisches retinales Gewebe hervorbringen.

Es zeichnet sich ab, dass eine Phosphorylierung der ToyPD die Transaktivierungsfähigkeit von Toy vermindert. Im Gegensatz dazu scheint innerhalb der TAD eher die Mutation der Phosphorylierungsstellen die transaktivierende Fähigkeit von Toy zu reduzieren.

Prinzipiell ist möglich, dass nur ein Teil der *in vitro* identifizierten Phosphorylierungsstellen im endogenen Kontext überhaupt für die Kinase zugänglich und damit *in vivo* von funktionaler Bedeutung ist. Am Beispiel der MAPK Phosphorylierung von Eya wird deutlich, dass eine Phosphorylierung, die im Kontext der ektopischen Augenentwicklung die Transaktivierungsfähigkeit von Eya (zusammen mit So) deutlich gesteigert hat (Morillo et al., 2012), in der normalen Augenentwicklung von *Drosophila* als nicht essentiell (Jusiak et al., 2012) gilt.

Weiterhin bleibt zu untersuchen, in welchem exakten Zeitfenster der Entwicklung der Einfluß der Hipk-Phosphorylierung auf Toy bzw. auf das RDGN am größten ist. Die Plastizität des RDGN erschwert die Analyse der Regulationsmechanismen, gerade weil sich je nach spatial-temporalem Kontext die Kombination von Signalen und den daraus resultierenden Konsequenzen verändert. Eine räumlich und zeitlich abgestimmte Fehlexpression der erzeugten phosphorylierungsmutanten UAS toy -Konstrukte im richtigen sensitiven Hintergrund wird die funktionelle Relevanz des Phosphorylierungsstatus gegebenenfalls deutlicher darstellen.

5.4 Weiterführende Untersuchung des Hipk-Einflusses auf die Augenentwicklung von *Drosophila melanogaster*

Die Augenentwicklung von *Drosophila melanogaster* wird auf molekularer Ebene kollektiv von zahlreichen Transkriptionsfaktoren und weiteren nukleären Kofaktoren gesteuert, die man als das Retinale Determination Gennetzwerk (RDGN) bezeichnet (Desplan 1997; Weasner et al., 2005; Silver & Rebay, 2005; Kumar 2009, Davis & Rebay 2017). RDGN-Faktoren sind reguliert anhand von Interaktionen untereinander und durch Effektoren bekannter Signalwege, wie dem Notch-, Decapentaplegic (Dpp)/TGF β -, Wingless (Wg)/Wnt-, Hedgehog (Hh)- und EGFR-Signalweg (Kumar, 2001; Firth & Baker, 2009; Baker & Firth, 2011).

Die Rolle der Hipk während der Augenentwicklung von *Drosophila* ist komplex, sie wurde bisher zusammen mit dem Notch-, dem Wg/Wnt- und dem Hh- bzw. Dpp/TGF β -Signalweg beschrieben (Choi et al., 2005; Steinmetz, 2006; Lee et al., 2009a; Lee et al., 2009b; Swarup & Verheyen, 2011; Dewald et al., 2014; Blaquièrre et al., 2014). Auch bei Vertebraten konnte ein HIPK2 Einfluss auf die Augenentwicklung nachgewiesen werden (Okuda et al., 2006; Isono et al., 2006; Inoue et al., 2010).

5.4.1 Wechselwirkungen der Hipk mit weiteren Faktoren des RDGN

Anhand von Kreuzungsanalysen wurde untersucht, ob die Proteinkinase Hipk neben Toy und Ey noch weitere Wechselwirkungspartner innerhalb des RDGN besitzt. Kernfaktoren des RDGN sind Toy, Ey, Eyes absent (*Eya*), Sine oculis (*So*) und Dachshund (*Dac*) sowie Optix (*Opt*) und Eyegone (*Eyg*) (Desplan, 1997; Silver & Rebay, 2005). Zunächst wurden die RDGN-Faktoren einzeln augenspezifisch überexprimiert, um einen Ausgangsphänotyp zu erhalten, mit dem anschließend verglichen werden kann. Eine Koexpression von *UAShipk* erhöhte die Hipk-Menge, respektive wurde die Hipk-Menge im Augengewebe durch die Koexpression verschiedener *UAShipkRNAi*-Konstrukte reduziert. Eine Veränderung des Ausgangsphänotyps durch die Modulation der Hipk-Menge deutete auf eine Wechselwirkung mit der Proteinkinase hin.

Prinzipiell führte die exogene augenspezifische Expression jedes RDGN-Faktors zu einer negativen Beeinträchtigung der Augenentwicklung, mit Ausnahme des RDGN-Faktors *Eya*. Insbesondere bei den RDGN-Faktoren der *Pax6*-Genfamilie (*Toy*, *Ey* und *Eyg*) zeigt sich eine Sensitivität des Augengewebes gegenüber der erhöhten Expression dieser Faktoren. Erhöhte Mengen an PAX6-Protein führen zu einer transkriptionellen Hemmung der eigenen Expression (Czerny & Busslinger, 1995; Schedl et al., 1996). Außerdem könnte die erhöhte Menge auch dazu führen, dass die zur Differenzierung der Photorezeptoren notwendige Repression der *ey*-Expression nicht ausreichend stattfindet (Atkins et al., 2013; Blaquièrre et al., 2014). Beides könnte die reduzierte Augengröße erklären.

Sowohl die erhöhte Hipk-Menge als auch die reduzierte Hipk-Menge verstärkte den reprimierenden Effekt der überexprimierten RDGN-Faktoren zusätzlich. Dies geschieht vermutlich zum Teil additiv, da die verwendeten Fliegenstämme *eyGal4*, *UAShipkRNAi* und *eyGal4*, *UAShipkRNAi*; *Dcr-2* per se bereits eine leicht reduzierte Augengröße aufweisen. Die Überexpression von *UASeya* hingegen hat diesen reprimierenden „Hipk-RNAi-Effekt“ kompensiert. Keiner der anderen RDGN-Faktoren war in der Lage, den beobachteten Hipk-RNAi-Effekt zu kompensieren.

Die spatio-temporale Herunterregulation der Hipk-Menge war in der durchgeführten Kreuzungsanalyse durch den *eyGal4*-Treiber vorgegeben und erfolgte somit im Muster des augenspezifischen *ey*-Enhancers E3.6 vom embryonalen Primordium bis in die EAD des späten dritten Larvenstadiums (L3) (Hauck et al., 1999). Zu Beginn dieses Zeitraums ist *ey* im gesamten Primordium exprimiert und ein zusätzlich aufkommendes Signal des Dpp-Signalweges bestimmt

durch die Induktion der *eya*-Expression den späteren Augenbereich der kombinierten EAD (Kumar & Moses, 2001; Kenyon et al., 2003).

Durch die Herunterregulation der Hipk-Menge wurde vermutlich dieses entscheidende Dpp-Signal stark reduziert. Fehlt der stabilisierende Hipk-Einfluss auf den Hh-Effektor Cubitus interruptus (Ci) wird anstelle der aktivierenden Form Ci^{act} die verkürzte reprimierende Form Ci^{rep} gebildet und die Transkription der Zielgene (z.B. *dpp*) wird unterdrückt (Swarup & Verheyen, 2011). In der Konsequenz würde dies zur beobachteten reduzierten Spezifizierung des Augenbereiches der EAD führen. Ein reduziertes Hh-Signal (und damit einhergehend eine reduzierte *dpp*-Expression) unterbricht das Wachstum der frühen EAD (Cho et al., 2000). Auch in Analysen von *hipk*-mutanten Klonen innerhalb der L3-EAD wurde ein vermindertes Dpp-Signal nachgewiesen (Swarup & Verheyen, 2011).

Die Beobachtung, dass diese Reduktion durch die gezielte Expression von *UAS_{eya}* kompensiert werden kann, deckt sich mit der erfolgreichen Rettung einer *dpp*-Mutation durch exogene Expression von *UAS_{eya}* in L3-EADs (Curtiss & Mlodzik, 2000).

Somit scheint die Hipk eine wichtige Funktion während der Regulation des Dpp-Signals in den Primordien der EADs zu haben, welches eine entscheidende Rolle spielt bei der Induktion der *eya*-Expression. Ohne ausreichende Aktivierung der *eya*-Expression ist die Spezifizierung des Augenbereiches der EAD stark beeinträchtigt und es kommt zu stark reduzierten Augen-Imaginalscheiben bzw. adulten Komplexaugen. Die Funktion der Hipk scheint unterhalb von *ey*, aber epistatisch über oder gleichgestellt mit *eya* zu sein. Ist die Expression von *eya* gerettet, findet die normale Augenentwicklung statt.

Die zusätzliche Expression von *UAS_{ey}*, *UAS_{toy}*, *UAS_{sso}* oder *UAS_{dac}* kompensierte in der vorliegenden Kreuzungsanalyse den Hipk-RNAi-Effekt nicht, da sie den wichtigen Faktor zur Spezifizierung, *eya*, ohne Dpp-Signal nicht aktivieren können. Diese Faktoren stehen epistatisch über *dpp* (Toy und Ey), können die *dpp*-Expression aber nicht anschalten bzw. bilden keinen Feedback-Loop zu *dpp* (Curtiss & Mlodzik, 2000). Im Gegenteil, die zusätzliche Expression von *UAS_{sso}* oder *UAS_{dac}* verstärkt Effekte, die durch einen Verlust des Dpp-Signals entstehen (Curtiss & Mlodzik, 2000). Auch dies wurde durch die vorliegenden Kreuzungsanalysen bestärkt, denn der Hipk-RNAi-Effekt wird ebenfalls durch die zusätzliche Expression dieser beiden RDGN-Faktoren verstärkt.

Blaquière et al. (2014) beschreiben mit Hilfe eines Ektopische-Augen-Assays mit transheterozygoten Hipk-Mutanten und anhand klonaler Analysen in L3-EADs eine reprimierende Funktion der Hipk während der transkriptionellen Regulation von *toy* und *ey*. Sie

vermuten, dass die beschriebene Repression von *toy* und *ey* dabei über den Einfluss der Hipk auf Ci und Dpp erfolgt. An anderer Stelle wurde gezeigt, dass Dpp in den L3-EADs keinen reprimierenden Effekt auf die *ey*-Expression hat, aber das Dpp-Signal (zusammen mit Eya) die Funktion von Homothorax (Hth) herunterreguliert (Curtiss & Mlodzik, 2000; Bessa et al., 2002). Dadurch wird der Komplex aus Hth/Ey/Teashirt (Tsh) gehemmt, der normalerweise die Differenzierung von Photorezeptoren bremst, bis sich die MF nähert (Bessa et al., 2002). Eventuell könnte ein reduziertes Dpp-Signal in L3-EADs dazu führen, dass der Hth/Ey/Tsh-Komplex nicht gehemmt wird und deswegen die Differenzierung gestört ist.

In der vorliegenden Analyse wurde nach der Herunterregulation der Hipk-Menge mittels RNAi keine gesteigerte *toy*- oder *ey*-Expression in L3-EADs beobachtet. Im Vergleich zu Blaquièrre et al. wurde die Hipk-Menge mit dem *eyGal4*-Treiber allerdings auch deutlich früher herunterreguliert. Würde die Hipk in diesem frühen Entwicklungsstadium normalerweise einen reprimierenden Effekt auf die *ey*- und *toy*-Expression ausüben, wären vermutlich größere Beeinträchtigungen zu beobachten.

Neueste Untersuchungen zeigen eine bisher unbekannte Funktion von Ey. In den Zellen des Peripodialepitheliums (PE) der EAD reguliert Ey die *dpp*-Expression und nimmt somit Einfluss auf die Initiation der morphogenetischen Furche (MF) am posterioren Rand der EAD (Baker et al., 2018). Das PE ist eine dünne Zellschicht die über der eigentlichen EAD liegt, durch ein schmales Lumen von dieser getrennt ist, aber an den Rändern in diese übergeht. Signale von dort beeinflussen die Entwicklung der EAD (z.B. über den Dpp-Signalweg) (Atkins & Mardon, 2009). Die gezielte PE-spezifische Herunterregulation von Ey (*c311Gal4>UASeyRNAi*) führt zu einem Verlust des Hh- und Dpp-Signals am posterioren Ende der EAD und damit einer fehlerhaften Initiation der MF sowie der Entwicklung der EAD. Durch gezielte *dpp*-Expression (*c311Gal4>UASdpp*) kann dieser Phänotyp gerettet werden (Baker et al., 2018).

Die Ähnlichkeit des beobachteten Phänotyps nach Herunterregulation von Hipk (*eyGal4>UAShipkRNAi*) mit den Auswirkungen einer PE-spezifischen Herunterregulation von Ey (*c311Gal4>UASeyRNAi*) lässt vermuten, dass die Hipk aktiv an der Weiterleitung des Signals zwischen Ey und der *dpp*-Expression beteiligt ist und somit direkten Einfluss auf die Regulation der Augenentwicklung von *Drosophila* hat.

Die Ergebnisse der BiFC-Analyse (Kapitel 4.1 dieser Arbeit) zeigten, dass eine Protein-Protein-Interaktion von Hipk und Ey *in vivo* stattfinden kann. Das Enzym-Substrat-Verhältnis zwischen Hipk und Ey (Kapitel 4.2 dieser Arbeit; Choi et al., 2005) konnte ebenfalls

gezeigt werden. Zusammen mit dem peripodialen Expressionsmuster des augenspezifischen *hipk*-Enhancer-Kandidaten 201396 (Kapitel 4.6 dieser Arbeit, Abb. 4.32; Kvon et al., 2014), welches auf eine mögliche Expression von *hipk* innerhalb des PE hindeutet, ist ein direkter Hipk-Einfluss auf Ey innerhalb des PE denkbar.

Eine nähere Eingrenzung der kritischen Zeitspanne, während der die Hipk Funktion entweder bestimmte RDGN-Faktoren oder das Ci/Dpp-Signal beeinflusst, könnte über *Timeshift*-Experimente geklärt werden. Mit Hilfe ähnlicher Experimente wurde auch die kritische Periode der PE-spezifischen Ey-Funktion auf mittleres L1-Stadium bis mittleres L2-Stadium eingegrenzt (Baker et al., 2018).

Die Fehlexpression von *UAS_{toy}* bzw. *UAS_{ey}* mit dem Treiberstamm *dppGal4* (Stahling-Hampton & Hoffmann, 1994) brachte ektoische Augen an den Beinen adulter Fliegen hervor. Die zusätzliche Überexpression von *UAS_{hipk}* wirkte sich unterschiedlich auf die Größe der entstehenden ektoischen Augen aus. Die durch *UAS_{toy}* induzierten Augen fielen größer aus, die durch *UAS_{ey}* kleiner. Eine Herunterregulation der Hipk-Menge führte in beiden Fällen zur Reduktion der ektoischen Augengröße.

Die Beobachtungen während der Herunterregulation der endogenen Hipk-Menge lassen sich durch ein reduziertes Dpp-Signal erklären, wie bereits für die EAD beschrieben. Ohne Dpp-Signal findet die Repression von Hth nur vermindert statt und die Aktivierung von *eya*, *so* und *dac* kann nicht optimal stattfinden (Bessa et al., 2002). Beides resultiert in kleineren ektoischen Augen. Im Fall eines Knockouts der endogenen Hipk-Funktion bleibt die Bildung ektoischer Augen an den Beinen sogar aus (Blaquière et al., 2014).

Eine Überexpression mit *UAS_{hipk}* kann das Hh/Dpp-Signal verstärken (Swarup & Verheyen, 2011; Blaquière et al., 2014) und so auch die Induktion bzw. die resultierende Größe der ektoischen Augen fördern. Größere ektoische Augen durch die Koexpression von *UAS_{hipk}* und *UAS_{toy}* sind auch an anderer Stelle beschrieben und es wurde gezeigt, dass die dabei induzierte Eya-Domäne und das induzierte retinale Feld in den L3-Bein-Imaginalscheiben deutlich vergrößert sind (Blaquière et al., 2014).

Die Koexpression von *UAS_{ey}* und *UAS_{hipk}* führt im Gegensatz dazu zu kleineren ektoischen Augen. Möglicherweise stabilisiert die zusätzliche *ey*-Expression den Hth/Ey/Tsh-Komplex und schwächt damit die zur Differenzierung notwendige Hth-Repression (Bessa et al., 2002). In der Folge führt das zu einer kleineren ektoischen Augengröße als im Vergleich zur Fehlexpression von *UAS_{toy}*.

5.4.2 Analyse eines potentiellen augenspezifischen Enhancers von *hipk*

Um die Funktion der Homeodomänen interagierenden Proteinkinase (Hipk) im Kontext der Augenentwicklung von *Drosophila melanogaster in vivo* weiter zu charakterisieren, wurde nach augenspezifischen regulatorischen Regionen im chromosomalen *hipk*-Lokus (3L:543060-581099 (+); zytologische Lokalisation: 61C3-61C5) gesucht. Anhand von Reporteranalysen mit *hipk*-Enhancer-Gal4-Stämmen (*Vienna Tiles* Enhancer-Gal4-Stämme (VT-Gal4), VDRC) (Pfeiffer et al., 2008; Kvon et al., 2014; Tirian & Dickson, 2017) konnten drei genomische Sequenzbereiche als potentielle augenspezifische *hipk*-Enhancer identifiziert werden, die während der larvalen Entwicklung in der EAD aktiv sind: 202023, 2081450 und 201396 (vgl. Abb. 4.30). Der potentielle augenspezifische *hipk*-Enhancer 202023 (Chr. 3L: 549321-551551(+)) zeigte das prominenteste Expressionsmuster im sich differenzierenden posterioren Bereich der EAD in dritten Larvalstadium (L3). Um mehr über die Funktion dieses Sequenzbereiches mit regulatorischer Aktivität zu erfahren, wurde dieser mittels „Ends-out“ Gentargeting (Rong & Golic, 2000; Gong & Golic, 2004) deletiert.

Obwohl Gentargeting durch Homologe Rekombination in *Drosophila* im Vergleich zu anderen Modellorganismen, wie z.B. Mäusen (Capecchi, 2005), erst relativ spät möglich wurde, bietet es mittlerweile die Möglichkeit mit hoher Effizienz genomische Sequenzen präzise zu deletieren und gleichzeitig durch exogene Sequenzen zu ersetzen. Durch die Generierung des multifunktionalen Targeting-Vektors pTV[*cherry*] (Baena-Lopez et al., 2013) konnte die Anwendung außerdem zeiteffektiv optimiert werden.

Bei der Analyse des resultierenden Fliegenstammes *hipk*^{EGT} ergab sich eine embryonale Letalität von 44 %. Davon sind 25 % auf das homozygote Vorliegen des Balancerchromosoms zurückzuführen, während die weitere Letalität im Prinzip durch das mutante Allel *hipk*^{EGT} verursacht wurde. Die erwartete Letalität eines balancierten, homozygot letalen Allels liegt bei ~50 %. Damit spiegelt die ermittelte Rate eine homozygot embryonale Letalität wider, die nicht zu erwarten war.

Ein anderes *hipk*-Allel, *hipk*²², mit einer deutlich größeren chromosomalen Deletion im *hipk*-Locus (~16,5 kb, Exon 1-6 deletiert), die unter anderem auch den chromosomalen Bereich des *hipk*-Enhancer-Kandidaten 202023 betrifft, erzeugt durch unpräzises Ausschneiden des zuvor an diesem Locus integrierten P-Elementes *P{GT1}CG17090^{B^{G00855}}*, resultiert in homozygot puppaler Letalität (Lee et al., 2009a).

Der frühere Letalitätszeitpunkt von *hipk*^{EGT} könnte durch eingebrachte genetische Letal-Faktoren hervorgerufen werden. Während der verschiedenen Targeting-Kreuzungen könnte es demnach zur Anhäufung von solchen Faktoren in *cis*-Position zur erzeugten Deletion gekommen sein. Mit der aufgetretenen frühen Letalität, nicht genau definierter Ursache, konnten die potentiellen Auswirkungen des deletierten *hipk*-Enhancers 202023 auf die EAD-/Augenentwicklung vorerst nicht untersucht werden. Die Identifikation der potentiellen letalitätsfördernden Faktoren kann durch eine molekulare Analyse des genetischen Hintergrundes erfolgen. Anschließend ist zu prüfen, ob diese Faktoren beispielsweise durch Auskreuzen bzw. Rekombinationsereignisse entfernt werden können.

Der genomische Sequenzbereich, welcher zur *hipk*-Enhancer-Analyse deletiert wurde, enthält zudem die Information für die *long noncoding* RNA (lncRNA) CR46249 (3L: 550297-551010(-); zytologische Lokalisation 61C3). LncRNAs sind *noncoding* RNAs (ncRNAs) von mehr als 200 Nukleotiden Länge (zusammengefasst in Kung et al., 2013; Fang & Fullwood, 2016). Sie sind Bestandteil des Transkriptom einer Zelle und wurden bisher zahlreichen zellulären Funktionen wie, z.B. der transkriptionellen Regulation, zugeordnet. Die genaue Funktion der lncRNA CR46249 mit einem 630 bp langen Transkript (zwei Exons) und einer detektierbaren Expressionsrate vom ersten bis zum dritten Larvalstadium (Graveley et al., 2010) ist bisher jedoch nicht bekannt. Aufgrund ihrer Lage im Intronbereich von *hipk* und ihrer Orientierung sollte sie der Gruppe der *intronic*, *antisense* lncRNAs zugeordnet werden.

Denkbar wäre auch eine Funktion als *enhancer* RNA (eRNA), die nach Aktivierung eines in räumlicher Nähe befindlichen Enhancers (in diesem Fall des *hipk*-Enhancer 202023) transkribiert wird und z.B. eine Rolle in der Chromatin-Interaktion übernimmt. Prinzipiell sind lncRNAs häufig im Gehirn bzw. dem ZNS anzutreffen (Fang & Fullwood, 2016). Der Wegfall dieses potentiell regulatorischen Elementes könnte ebenfalls die Augenentwicklung beeinflussen und ist bei zukünftigen Analysen des deletierten Bereiches zu berücksichtigen.

Differenzierung der Photorezeptoren zu ermöglichen, nachdem die regulatorische Neuordnung des RDGN erfolgt ist (Atkins et al., 2013).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten somit auf eine Funktion der Hipk in der frühen Determination der EAD hin. Hipk interagiert *in vivo* mit den beiden sehr früh während der Augenentwicklung essentiellen RDGN-Faktoren Toy und Ey. Durch die exogene Expression von phosphorylierungsmutantem ToyVM in den Augenprimordien wurde die puppale Letalität eines *toy*-mutanten genetischen Hintergrundes weniger effektiv gerettet als durch die exogene Expression von wildtypischem ToyWT (vgl. 4.4.4). Die reduzierte Transaktivierungsfähigkeit von ToyVM während dieses Rettungsexperimentes deutet auf eine funktionelle Relevanz der identifizierten Hipk-Phosphorylierungsstellen (Ser¹²¹, Thr³⁹⁵, Ser⁴¹⁰ und Thr⁴⁵²) während des Übergangs vom Embryonal- zu Larvalstadium hin.

Bei der Herunterregulation der endogenen Hipk-Menge mit Hilfe von UAS*hipk*RNAi bzw. UAS*hipk*RNAi; UAS*Dcr-2* war eine starke Reduktion der Größe von L3-EADs sowie der daraus resultierenden adulten Komplexaugen zu beobachten (vgl. 4.5.1). Die geringe Größe der L3-EADs lässt ebenfalls darauf schließen, dass bereits zuvor, im L1/L2-Stadium, eine bestimmte Hipk-Menge notwendig ist, damit die frühe Entwicklung der EAD normal abläuft. Die Hipk könnte hier neben ihrer Wirkung auf das Dpp-Signal (Swarup & Verheyen, 2011) auch über die Phosphorylierung von Toy sowohl auf die Spezifizierung der frühen EAD (durch Beeinträchtigung der Transaktivierungsfähigkeit) als auch auf die Proliferation Einfluss nehmen. Neuere Analysen ergaben nämlich, dass in frühen L1-EADs Toy und Ey für das Wachstum der gesamten EAD essentiell sind. Über die Aktivierung der Faktoren *teashirt* (*tsh*), *eyegone* (*eyg*) und *Notch* (*N*) steuern sie die Zellproliferation und den Erhalt der Augenvorläuferzellen (Zhu et al., 2017).

Die Konsequenzen einer augenspezifisch stark herunterregulierten endogenen Hipk-Menge können durch die Überexpression von UAS*Eya* kompensiert werden (vgl. 4.5.1). Eya scheint damit ein kritischer Faktor im Übergang von der allgemeinen Spezifizierung des Augengewebes zum Start der Differenzierung zu sein. Dies könnte auch daran liegen, dass Eya der erste RDGN-Faktor während der RDGN-Hierarchie ist, der unterhalb des reprimierenden Gro-Einflusses arbeitet (Gro reprimiert Ey und So) (Choi et al., 2005, Silver et al., 2003). Die kritische Zeitspanne in dem eine ausreichende Hipk-Menge vorhanden sein muss, scheint somit durch die Expression von Eya begrenzt. Eya konnte als neues *in vitro* Hipk-Substrat identifiziert werden, obgleich die physiologische Bedeutung noch unklar ist.

Aktuell wird für PAX6/Ey eine bisher nicht bekannte Funktion innerhalb des Peripodialepitheliums der EAD bei der Initiation der *dpp*-Expression beschrieben (Baker et al., 2018). Auch hier ist ein Hipk-Einfluss vorstellbar. Dieser könnte darin bestehen, die Transaktivierung von Ey zu unterstützen, entweder anhand der direkten Phosphorylierung von Toy und/oder Ey sowie durch die Phosphorylierung von Gro (und dadurch Aufhebung des reprimierenden Einflusses auf Ey) oder die Stabilisierung des induzierten Hh/Dpp-Signals (Choi et al., 2005; Lee et al., 2009a; Swarup & Verheyen, 2011). Hier wäre es interessant, den aktuellen Erkenntnissen folgend, die Funktion der Hipk speziell im peripodialen Epithelium zu untersuchen. Dazu böte sich auch an, den in dieser Arbeit ebenfalls identifizierten augenspezifischen *hipk*-Enhancer 201396 (Abschnitt 4.6) näher zu analysieren, da dieser eine Aktivität innerhalb der Peripodialmembran aufwies.

In Maus und Mensch konnten im sich entwickelnden Auge neben PAX6 auch Vertreter der Genfamilien SIX, EYA und DACH nachgewiesen werden. Sie stehen in ähnlicher regulatorischer Beziehung zueinander wie die ihnen homologen Proteine bei *Drosophila* (zusammengefasst in Wawersik & Maas, 2000; Cvekl & Callaerts, 2016). PAX6 wird bis zur Induktion der Linsenbildung in einem breiten Muster des Kopfektoderms und im optischen Vesikel exprimiert. Es spezifiziert im Neuroektoderm das zukünftige Augengewebe, bevor induktive Signale aus dem optischen Vesikel die Expression progressiv auf die Plakoden von Linse, Linsenvesikel und das optische Vesikel eingrenzen. Während PAX6 zu Beginn der Differenzierung noch notwendig ist, muss es für die letzten Stadien der Differenzierung herunterreguliert werden (zusammengefasst in Wawersik & Maas, 2000, Shaham et al., 2012).

HIPK1 und HIPK2 werden augenspezifisch exprimiert und haben Einfluß auf die Augengröße, Linsenbildung und retinale Morphogenese (Isono et al., 2006; Inoue et al., 2010). HIPK2 phosphoryliert PAX6 und erhöht, durch die Rekrutierung von Kofaktoren, dessen Transaktivierungsfähigkeit (Kim et al., 2006).

Die aufgeführten Übereinstimmungen der molekularen Zusammenhänge die der Augenentwicklung von Fliege, Maus und Mensch zu Grunde liegen unterstützen, vor allem in Bezug auf die Regulation von PAX6/Toy/Ey durch die Proteinkinase HIPK2/Hipk, die Beobachtungen in dieser Arbeit. Diese und zukünftige Analysen können somit dazu beitragen die Entstehung von Augenbildungsdefekten beim Menschen aufzuklären und gegebenenfalls die Forschung zu molekularen Therapien voranzutreiben.

6 Literaturverzeichnis

1. Adams MD et al. (2000) The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287:2185-2195
2. Aikawa Y, Nguyen LA, Isono K, Takakura N, Tagata Y, Schmitz ML, Koseki H, Kitabayashi I (2006) Roles of HIPK1 and HIPK2 in AML1- and p300-dependent transcription, hematopoiesis and blood vessel formation. *EMBO J* 25:3955-3965
3. Amore G and Casares F (2010) Size matters: the contribution of cell proliferation to the progression of the specification *Drosophila* eye gene regulatory network. *Dev Biol* 344:569-577
4. An R, Da Silva Xavier G, Semplici F, Vakhshouri S, Hao HX, Rutter J, Pagano MA, Meggio F, Pinna LA, Rutter GA (2010) Pancreatic and duodenal homeobox 1 (PDX1) phosphorylation at serine -269 is HIPK2-dependent and affects PDX1 subnuclear localization. *Biochem Biophys Res Commun* 399:155-161
5. Anderson AM, Weasner BM, Weasner BP, Kumar JP (2012) Dual transcriptional activities of SIX proteins define their roles in normal and ectopic eye development. *Development* 139:991-1000
6. Ann EJ, Kim MY, Yoon JH, Ahn JS, Jo EH, Lee HJ, Lee HW, Kang HG, Choi DW, Chun KH, Lee JS, Choi CY, Ferrando AA, Lee K, Park HS (2016) Tumor suppressor HIPK2 regulates malignant growth via phosphorylation of NOTCH. *Cancer Res* 76:4728-4740
7. Aota S, Nakajima N, Sakamoto R, Watanabe S, Ibaraki N, Okazaki K (2003) Pax6 autoregulation mediated by direct interaction of Pax6 protein with the head surface ectoderm-specific enhancer of the mouse Pax6 gene. *Dev Biol* 257:1-13
8. Atkins M, Jiang Y, Sansores-Garcia L, Jusiak B, Halder G, Mardon G (2013) Dynamic rewiring of the *Drosophila* retinal determination network switches its function from selector to differentiation. *PLoS Genet* 9:e1003731.
9. Atkins M and Mardon G (2009) Signaling in the third dimension: the peripodial epithelium in eye disc development. *Dev Dyn* 238:2139-2148
10. Azuma N, Nishina S, Yanagisawa H, Okuyama T, Yamada M (1996) PAX6 missense mutation in isolated foveal hypoplasia. *Nat Genet* 13:141-142
11. Baena-Lopez LA, Alexandre C, Mitchell A, Pasakarnis L, Vincent JP (2013) Accelerated homologous recombination and subsequent genome modification in *Drosophila*. *Development* 140:4818-4825
12. Baker LR, Weasner BM, Nagel A, Neuman SD, Bashirullah A, Kumar JP (2018) Eyeless/Pax6 initiates eye formation non-autonomously from the peripodial epithelium. *Development* [doi: 10.1242/dev.163329]
13. Baker NE and Firth LC (2011) Retinal determination genes function along with cell-cell signals to regulate *Drosophila* eye development: examples of multi-layered regulation by master regulators. *Bioessays* 33:538-546
14. Bateman JR, Lee AM, Wu CT (2006) Site-specific transformation of *Drosophila* via phiC31 integrase-mediated cassette exchange. *Genetics* 173:769-777
15. Bessa J, Gebelein B, Pichaud F, Casares F, Mann RS (2002) Combinatorial control of *Drosophila* eye development by *eyeless*, *homothorax*, and *teashirt*. *Genes Dev* 16:2415-2427
16. Bier E (2005) *Drosophila*, the golden bug, emerges as a tool for human genetics. *Nat Rev Genet* 6:9-23
17. 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

18. Blake JA and Ziman MR (2014) Pax genes: regulators of lineage specification and progenitor cell maintenance. *Development* 141:737-751
19. Blanco J, Pauli T, Seimiya M, Udolph G, Gehring WJ (2010) Genetic interactions of *eyes absent*, *twin of eyeless* and *orthodenticle* regulate *sine oculis* expression during ocellar development in *Drosophila*. *Dev Biol* 344:1088-1099
20. Blanco J and Gehring WJ (2008) Analysis of *twin of eyeless* regulation during early embryogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Gene Expr Patterns* 8:523-527
21. Blaquièrre JA, Wong KKL, Kinsey SD, Wu J, Verheyen EM (2018) Homeodomain interacting protein kinase promotes tumorigenesis and metastatic cell behavior. *Dis Model Mech* 11:1-13
22. Blaquièrre JA, Lee W, Verheyen EM (2014) Hipk promotes photoreceptor differentiation through the repression of *Twin of eyeless* and *Eyeless* expression. *Dev Biol* 390:14-25
23. Blaquièrre JA and Verheyen EM (2017) Chapter Three: Homeodomain-Interacting Protein Kinases: Diverse and Complex Roles in Development and Disease. *Curr Top Dev Biol* 123:73-103
24. Bonini NM, Leiserson WM, Benzer S (1993) The *eyes absent* gene: genetic control of cell survival and differentiation in the developing *Drosophila* eye. *Cell* 72:379-395
25. Bonini NM, Bui QT, Gray-Board GL, Warrick JM (1997) The *Drosophila eyes absent* gene directs ectopic eye formation in a pathway conserved between flies and vertebrates. *Development* 124:4819-4826
26. Bonini NM, Leiserson WM, Benzer S (1998) Multiple roles of the *eyes absent* gene in *Drosophila*. *Dev Biol* 196:42-57
27. Bopp D, Burri M, Baumgartner S, Frigerio G, Noll M (1986) Conservation of a large protein domain in the segmentation gene *paired* and in functionally related genes of *Drosophila*. *Cell* 47:1033-1040
28. Boucher MJ, Simoneau M, Edlund H (2009) The homeodomain-interacting protein kinase 2 regulates insulin promoter factor-1/pancreatic duodenal homeobox-1 transcriptional activity. *Endocrinology* 150:87-97
29. Bracaglia G, Conca B, Bergo A, Rusconi L, Zhou Z, Greenberg ME, Landsberger N, Soddu S, Kilstrup-Nielsen C (2009) Methyl-CpG-binding protein 2 is phosphorylated by homeodomain-interacting protein kinase 2 and contributes to apoptosis. *EMBO Rep* 10:1327-1333
30. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Anal Biochem* 72:248-254
31. Brand AH and Perrimon N (1993) Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118:401-415
32. Bruun JA, Thomassen EI, Kristiansen K, Tylden G, Holm T, Mikkola I, Bjørkøy G, Johansen T (2005) The third helix of the homeodomain of paired class homeodomain proteins acts as a recognition helix both for DNA and protein interactions. *Nucleic Acids Res* 33:2661-2675
33. Bui QT, Zimmerman JE, Liu H, Bonini NM (2000) Molecular analysis of *Drosophila eyes absent* mutants reveals features of the conserved Eya Domain. *Genetics* 155:709-720
34. Bulavin DV, Saito S, Hollander MC, Sakaguchi K, Anderson CW, Appella E, Fornace AJ Jr (1999) Phosphorylation of human p53 by p38 kinase coordinates N-terminal phosphorylation and apoptosis in response to UV radiation. *EMBO J* 18:6845-6854
35. Bürglin TR and Affolter M (2016) Homeodomain proteins: an update. *Chromosoma* 125:497-521

36. Callaerts P, Leng S, Clements J, Benassayag C, Cribbs D, Kang YY, Walldorf U, Fischbach KF, Strauss R (2001) *Drosophila Pax-6/eyeless* is essential for normal adult brain structure and function. *J Neurobiol* 46:73-88
37. Callaerts P, Clements J, Francis C, Hens K (2006) Pax6 and eye development in Arthropoda. *Arthropod Struct Dev* 35:379-391
38. Callaerts P, Halder G, Gehring WJ (1997) PAX-6 in development and evolution. *Annu Rev Neurosci* 20:483-532
39. Capdevila J and Guerrero I (1994) Targeted expression of the signaling molecule *decapentaplegic* induces pattern duplications and growth alterations in *Drosophila* wings. *EMBO J* 13:4459-4468
40. Capecchi MR (2005) Gene targeting in mice: Functional analysis of the mammalian genome for the twenty-first century. *Nat Rev Genet* 6:507-512
41. Chen J and Verheyen EM (2012) Homeodomain-interacting protein kinase regulates yorkie activity to promote tissue growth. *Curr Biol* 22:1582-1586
42. Chen R, Amoui M, Zhang Z, Mardon G (1997) Dachshund and Eyes absent proteins form a complex and function synergistically to induce ectopic eye development in *Drosophila*. *Cell* 91:893-903
43. Chi N and Epstein JA (2002) Getting your Pax straight: Pax proteins in development and disease. *Trends Genet* 18:41-47
44. Cho KO, Chern J, Izaddoost S, Choi KW (2000) Novel signaling from the peripodial membrane is essential for eye disc patterning in *Drosophila*. *Cell* 103:331-342
45. 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
46. Clark AG et al. [*Drosophila* 12 genomes consortium] (2007) Evolution of genes and genomes on the *Drosophila* phylogeny. *Nature* 450:203-218
47. Clark-Lewis I, Sanghera JS, Pelech SL (1991) Definition of a consensus sequence for peptide substrate recognition by p44mpk, the meiosis-activated myelin basic protein kinase. *J Biol Chem* 266:15180-15184
48. Clements J, Hens K, Merugu S, Dichtl B, De Couet HG, Callaerts P (2009) Mutational analysis of the *eyeless* gene and phenotypic rescue reveal that an intact Eyeless protein is necessary for normal eye and brain development in *Drosophila*. *Dev Biol* 334:503-512
49. Conte A and Pierantoni GM (2015) Regulation of HIPK Proteins by MicroRNAs. *Microma* 4:148-157
50. Crooks GE, Hon G, Chandonia JM, Brenner SE (2004) WebLogo: a sequence logo generator. *Genome Res* 14:1188-1190
51. Curtiss J and Mlodzik M (2000) Morphogenetic furrow initiation and progression during eye development in *Drosophila*: the roles of *decapentaplegic*, *hedgehog* and *eyes absent*. *Development* 127:1325-1336
52. Cvekl A and Callaerts P (2017) PAX6: 25th anniversary and more to learn. *Exp Eye Res* 156:10-21
53. Czerny T, Halder G, Kloter U, Souabni A, Gehring WJ, Busslinger M (1999) Twin of eyeless, a second Pax-6 gene of *Drosophila*, acts upstream of *eyeless* in the control of eye development. *Mol Cell* 3:297-307
54. Czerny T and Busslinger M (1995) DNA-binding and transactivation properties of Pax-6: three amino acids in the paired domain are responsible for the different sequence recognition of Pax-6 and BSAP (Pax-5). *Mol Cell Biol* 15:2858-2871

55. Czerny T, Schaffner G, Busslinger M (1993) DNA sequence recognition by Pax proteins: Bipartite structure of the paired domain and its binding site. *Genes Dev* 7:2048-2061
56. 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* 67:2275-2279
57. Davis TL and Rebay I (2017) Master regulators in development: Views from the *Drosophila* retinal determination and mammalian pluripotency gene networks. *Dev Biol* 421:93-107
58. De la Vega L, Fröblius K, Moreno R, Calzado MA, Geng H, Schmitz ML (2011) Control of nuclear HIPK2 localization and function by a SUMO interaction motif. *Biochim Biophys Acta* 1813:283-297
59. De Mendoza A, Sebé-Pedrós A, Šestak MS, Matejčić M, Torruella G, Domazet-Lošo T, Ruiz-Trillo I (2013) Transcription factor evolution in eukaryotes and the assembly of the regulatory toolkit in multicellular lineages. *Proc Natl Acad Sci US A* 110:4858-4866
60. De Nicola F, Catena V, Rinaldo C, Bruno T, Jezzi S, Sorino C, Desantis A, Camerini S, Crescenzi M, Floridi A, Passananti C, Soddu S, Fanciulli M (2014) HIPK2 sustains apoptotic response by phosphorylating Che-1/AATF and promoting its degradation. *Cell Death Dis* 5:e1414
61. Deng H and Kerppola TK (2017) Visualization of the Genomic Loci That Are Bound by Specific Multiprotein Complexes by Bimolecular Fluorescence Complementation Analysis on *Drosophila* Polytene Chromosomes. *Methods Enzymol* 589:429-455
62. Desplan C (1997) Eye development: Governed by a dictator or a junta? *Cell* 91:861-864
63. Dewald D (2014) Analyse von Wechselwirkungen der Homeodomäninteragierenden Proteinkinase (Hipk) in *Drosophila melanogaster* unter besonderer Berücksichtigung des Interaktionspartners Spenito (Nito). Doktorarbeit, Universität des Saarlandes
64. Dewald DN, Steinmetz EL, Walldorf U (2014) Homeodomain-interacting protein kinase (Hipk) phosphorylates the small SPOC family protein Spenito. *Insect Mol Biol* 23:706-719
65. Dominguez M and Casares F (2005) Organ specification-growth control connection: new insights from the *Drosophila* eye-antennal disc. *Dev Dyn* 232:673-684
66. Donner AL, Maas RL (2004) Conservation and non-conservation of genetic pathways in eye specification. *Int J Dev Biol* 48:743-53
67. 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 Ser46 and mediates apoptosis. *Nat Cell Biol* 4:11-19
68. D'Orazi G, Rinaldo C, Soddu S (2012) Updates on HIPK2: A resourceful oncosuppressor for clearing cancer. *J Exp Clin Cancer Res* 31:63
69. Duffraisse M, Hudry B, Merabet S (2014) Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) in live *Drosophila* embryos. *Methods Mol Biol* 1196:307-318
70. Duffy JB (2002) GAL4 system in *Drosophila*: A fly geneticist's swiss army knife. *Genesis* 34:1-15
71. Egger B, Gold KS, Brand AH (2010) Notch regulates the switch from symmetric to asymmetric neural stem cell division in the *Drosophila* optic lobe. *Development* 137:2981-2987

72. Epstein J, Cai J, Glaser T, Jepeal L, Maas R (1994) Identification of a Pax paired domain recognition sequence and evidence for DNA-dependent conformational changes. *J Biol Chem* 269:8355-8361
73. Fang Y and Fullwood MJ (2016) Roles, Functions, and Mechanisms of Long Non-coding RNAs in Cancer. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 14:42-54
74. Fields S and Song O (1989) A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340:245-246
75. Firth LC and Baker NE (2009) Retinal determination genes as targets and possible effectors of extracellular signals. *Dev Biol* 327:366-375
76. Frank R (2002) The SPOT-synthesis technique. Synthetic peptide arrays on membrane supports--principles and applications. *J Immunol Methods* 267:13-26
77. Fristrom DK and Fristrom JW (1993) The metamorphic development of the adult epidermis. In: "The development of *Drosophila melanogaster*" (Bate M and Martinez Arias A). Cold Spring Harbor Laboratory Press 843-897
78. Furukubo-Tokunaga K, Adachi Y, Kurusu M, Walldorf U (2009) Brain patterning defects caused by mutations of the *twinn of eyeless* gene in *Drosophila melanogaster*. *Fly* 3:263-269
79. Gehring WJ, Qian YQ, Billeter M, Furukubo-Tokunaga K, Schier AF, Resendez-Perez D, Affolter M, Otting G, Wüthrich K (1994) Homeodomain-DNA recognition. *Cell* 78:211-223
80. Gehring WJ (1996) The master control gene for morphogenesis and evolution of the eye. *Genes Cells* 1:11-15
81. Gehring WJ and Ikeo K (1999) Pax6: mastering eye morphogenesis and eye evolution. *Trends Genet* 15:371-377
82. Gehring WJ (2005) New perspectives on eye development and the evolution of eyes and photoreceptors. *J Hered* 96:171-184
83. Gehring WJ (2012) The animal body plan, the prototypic body segment, and eye evolution. *Evol Dev* 14:34-46
84. Gehring WJ (2014) The evolution of vision. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* 3:1-40
85. 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
86. Gong WJ and Golic KG (2004) Genomic deletions of the *Drosophila melanogaster* Hsp70 genes. *Genetics* 168:1467-1476
87. Graveley BR, Brooks AN, Carlson JW, Duff MO, Landolin JM, Yang L, Artieri CG, van Baren MJ, Boley N, Booth BW, Brown JB, Cherbas L, Davis CA, Dobin A, Li R, Lin W, Malone JH, Mattiuzzo NR, Miller D, Sturgill D, Tuch BB, Zaleski C, Zhang D, Blanchette M, Dudoit S, Eads B, Green RE, Hammonds A, Jiang L, Kapranov P, Langton L, Perrimon N, Sandler JE, Wan KH, Willingham A, Zhang Y, Zou Y, Andrews J, Bickel PJ, Brenner SE, Brent MR, Cherbas P, Gingeras TR, Hoskins RA, Kaufman TC, Oliver B, Celniker SE (2011) The developmental transcriptome of *Drosophila melanogaster*. *Nature* 471:473-479
88. Gresko E, Ritterhoff S, Sevilla-Perez J, Roscic A, Fröbuis K, Kotevic I, Vichalkovski A, Hess D, Hemmings BA, Schmitz ML (2009) PML tumor suppressor is regulated by HIPK2-mediated phosphorylation in response to DNA damage. *Oncogene* 28:698-708
89. Groth A, 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

90. Hailemariam K, Iwasaki K, Huang BW, Sakamoto K, Tsuji Y (2010) Transcriptional regulation of ferritin and antioxidant genes by HIPK2 under genotoxic stress. *J Cell Sci* 123:3863-3871
91. Halder G, Callaerts P, Flister S, Walldorf U, Kloter U, Gehring WJ (1998) Eyeless initiates the expression of both *sine oculis* and *eyes absent* during *Drosophila* compound eye development. *Development* 195:2181-2191
92. Halder G, Callaerts P, Gehring W (1995) Induction of ectopic eyes by targeted expression of the *eyeless* gene in *Drosophila*. *Science* 267:1788-1792
93. Hanahan D (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166:557-580
94. Hanks SK and Hunter T (1995) The eukaryotic protein kinase superfamily : kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J* 9:576-596
95. Hauck B, Gehring WJ, Walldorf U (1999) Functional analysis of an eye specific enhancer of the *eyeless* gene in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:564-569
96. Hsiao FC, Williams A, Davies EL, Rebay I (2001) Eyes absent mediates cross-talk between retinal determination genes and the receptor tyrosine kinase signaling pathway. *Dev Cell* 1:51-61
97. Haynie JL and Bryant PJ (1986) Development of the eye-antenna imaginal disc and morphogenesis of the adult head in *Drosophila melanogaster*. *J Exp Zool* 237:293-308
98. Hazelett DJ, Bourouis M, Walldorf U, Treisman JE (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* 125:3741-3751
99. Heyer A (2017) Analysis of homeodomain-interacting protein kinase (Hipk) regulation and interaction during *Drosophila melanogaster* eye development. Bachelorarbeit, Universität des Saarlandes
100. Hill RE, Favor J, Hogan BL, Ton CC, Saunders GF, Hanson IM, Prosser J, Jordan T, Hastie ND, van Heyningen V (1991) Mouse small eye results from mutations in a paired-like homeobox-containing gene. *Nature* 354:522-525
101. Hilpert K, Winkler DF, Hancock RE (2007) Cellulose-bound Peptide Arrays: Preparation and Applications. *Biotechnol Genet Eng Rev* 24:31-106
102. Hochman B, Gloor H, Green MM (1964) Analysis of chromosome 4 in *Drosophila melanogaster*. I. Spontaneous and X-ray-induced lethals. *Genetica* 35:109-126
103. 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
104. Hoge MA (1915) Another gene in the fourth chromosome of *Drosophila*. *Am Naturalist* 49:47-49
105. Hu CD, Chinenov Y, Kerppola TK (2002) Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation. *Mol Cell* 9:789-798
106. Hu CD and Kerppola TK (2003) Simultaneous visualization of multiple protein interactions in living cells using multicolor fluorescence complementation analysis. *Nat Biotechnol* 21:539-545
107. 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
108. 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

109. Jacobsson L, Kronhamn J, Rasmuson-Lestander A (2009) The *Drosophila* Pax6 paralogs have different functions in head development but can partially substitute for each other. *Mol Genet Genomics* 282:217-231
110. Jang CC, Chao JL, Jones N, Yao LC, Bessarab DA, Kuo YM, Jun S, Desplan C, Beckendorf SK, Sun YH (2003) Two Pax genes, *eye gone* and *eyeless*, act cooperatively in promoting *Drosophila* eye development. *Development* 130:2939-2951
111. Jarrett HW (2000) Temperature dependence of DNA affinity chromatography of transcription factors. *Anal Biochem* 279:209-217
112. Jun S, Wallen RV, Goriely A, Kalionis B, Desplan C (1998) *Lune/eye gone*, a Pax-like protein, uses a partial paired domain and a homeodomain for DNA recognition. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:13720-13725
113. Jun S and Desplan C (1996) Cooperative interactions between paired domain and homeodomain. *Development* 122:2639-2650
114. Jusiak B, Abulimiti A, Haelterman N, Chen R, Mardon G (2012) MAPK target sites of *Eyes absent* are not required for eye development or survival in *Drosophila*. *PLoS One* 7: e50776
115. Kaelin WG, Pallas DC, DeCaprio JA, Kaye FJ, Livingston DM (1991) Identification of cellular proteins that can interact specifically with the T/E1A-binding region of the retinoblastoma gene product. *Cell* 64:521-532
116. Kammermeier L, Leemans R, Hirth F, Flister S, Wenger U, Walldorf U, Gehring WJ, Reichert H (2001) Differential expression and function of the *Drosophila* Pax6 genes *eyeless* and *twin of eyeless* in embryonic central nervous system development. *MechDev* 103:71-78
117. Kawakami K, Sato S, Ozaki H, Ikeda K (2000) Six family genes - Structure and function as transcription factors and their roles in development. *Bioessays* 22:616-626
118. Kenyon KL, Ranade SS, Curtiss J, Mlodzik M, Pignoni F (2003) Coordinating proliferation and tissue specification to promote regional identity in the *Drosophila* head. *Dev Cell* 5:403-414
119. Kerppola TK (2008) Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) analysis as a probe of protein interactions in living cells. *Annu Rev Biophys* 37:465-87
120. Kim EA, Kim JE, Sung KS, Choi DW, Lee BJ, Choi CY (2010) Homeodomain-interacting protein kinase 2 (HIPK2) targets β -catenin for phosphorylation and proteasomal degradation. *Biochem Biophys Res Comm* 394:966-971
121. 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
122. Kim Y, Choi CY, Lee SJ, Conti MA, Kim Y (1998) Homeodomain-interacting protein kinases, a novel family of corepressors for homeodomain transcription factors. *J Biol Chem* 273:25875-25879
123. Kodama Y and Hu CD (2012) Bimolecular fluorescence complementation (BiFC): A 5-year update and future perspectives. *Biotechniques* 53:285-298
124. Kronhamn J, Frei E, Daube M, Jiao R, Shi Y, Noll M, Rasmuson-Lestander A (2002) Headless flies produced by mutations in the paralogous Pax6 genes *eyeless* and *twin of eyeless*. *Development* 129:1015-1026
125. Kumar JP (2001) Signalling pathways in *Drosophila* and vertebrate retinal development. *Nat Rev Genet* 2:846-857
126. Kumar JP (2009) The molecular circuitry governing retinal determination. *Biochim Biophys Acta* 1789:306-314
127. Kumar JP (2018) The fly eye: Through the looking glass. *Dev Dyn* 247:111-123

128. Kumar JP and Moses K (2001) EGF Receptor and Notch Signaling Act Upstream of Eyeless / Pax6 to Control Eye Specification. *Cell* 104:687-697
129. Kung JT, Colognori D, Lee JT (2013) Long noncoding RNAs: past, present, and future. *Genetics* 193:651-669
130. Kuwano Y, Nishida K, Akaike Y, Kurokawa K, Nishikawa T, Masuda K, Rokutan K (2016) Homeodomain-interacting protein kinase-2: A critical regulator of the DNA damage response and the epigenome. *Int J Mol Sci* 17:E1638
131. Kvon EZ, Kazmar T, Stampfel G, Yáñez-Cuna JO, Pagani M, Schemhuber K, Dickson BJ, Stark A (2014) Genome-scale functional characterization of *Drosophila* developmental enhancers *in vivo*. *Nature* 512:91-95
132. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685
133. Laupsien P (2007) Funktionelle Analyse der Phosphorylierung des *Drosophila melanogaster* Pax6-Gens Twin-of-eyeless durch die Homöodomänenprotein-interagierende Proteinkinase dHIPK2. Diplomarbeit, Universität des Saarlandes
134. 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
135. Lee W, Swarup S, Chen J, Ishitani T, Verheyen EM (2009b) Homeodomain-interacting protein kinases (Hipks) promote Wnt/Wg signaling through stabilization of β -catenin/Arm and stimulation of target gene expression. *Development* 136: 241-251
136. Li X, Oghi KA, Zhang J, Kronen A, Bush KT, Glass CK, Nigam SK, Aggarwal AK, Maas R, Rose DW, Rosenfeld MG (2003) Eya protein phosphatase activity regulates Six1-Dach-Eya transcriptional effects in mammalian organogenesis. *Nature* 426:247-254
137. 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
138. Lopes CS and Casares F (2015) Eye selector logic for a coordinated cell cycle exit. *PLoS Genet* 11: e1004981
139. Magliery TJ, Wilson CG, Pan W, Mishler D, Ghosh I, Hamilton AD, Regan L (2005) Detecting protein-protein interactions with a green fluorescent protein fragment reassembly trap: scope and mechanism. *J Am Chem Soc* 127:146-57
140. Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S (2002) The Protein Kinase Complement of the Human Genome. *Science* 298:1912-1934
141. Mansouri A, Hallonet M, Gruss P (1996) Pax genes and their roles in cell differentiation and development. *Curr Opin Cell Biol* 8:851-857
142. McGinnis W, Levine MS, Hafen E, Kuroiwa A, Gehring WJ (1984a) A conserved DNA sequence in homoeotic genes of the *Drosophila* Antennapedia and bithorax complexes. *Nature* 308:428-433
143. McGinnis W, Garber RL, Wirz J, Kuroiwa A, Gehring WJ (1984b) A homologous protein-coding sequence in *Drosophila* homeotic genes and its conservation in other metazoans. *Cell* 37:403-408
144. Meier A (2013) Identification and characterization of possible interaction partners of the Homeodomain-Interacting Protein Kinase. Bachelorarbeit, Universität des Saarlandes
145. Meng R, Götz C, Montenarh M (2010) The role of protein kinase CK2 in the regulation of the insulin production of pancreatic islets. *Biochem Biophys Res Commun* 401:203-206

146. Mikkola I, Bruun JA, Bjorkoy G, Holm T, Johansen T (1999) Phosphorylation of the Transactivation Domain of Pax6 by Extracellular Phosphorylation of the Transactivation Domain of Pax6 by Extracellular Signal-regulated Kinase and p38 Mitogen-activated Protein Kinase. *J Biol Chem* 274:15115-15126
147. Morillo SA, Braid LR, Verheyen EM, Rebay I (2012) Nemo phosphorylates Eyes absent and enhances output from the Eya-Sine oculis transcriptional complex during *Drosophila* retinal determination. *Dev Biol* 365:267-276
148. Morrison DK, Murakami MS, Cleghon V (2000) Protein kinases and phosphatases in the *Drosophila* genome. *J Cell Biol* 150:57-62
149. Namba R and Minden JS (1999) Fate mapping of *Drosophila* embryonic mitotic domain 20 reveals that the larval visual system is derived from a subdomain of a few cells. *Dev Biol* 212:465-476
150. Niimi T, Seimiya M, Kloter U, Flister S, Gehring WJ (1999) Direct regulatory interaction of the Eyeless protein with an eye-specific enhancer in the *sine oculis* gene during eye induction in *Drosophila*. *Development* 126:2253-2260
151. Noll M (1993) Evolution and role of Pax genes. *Curr Opin in Genet Dev* 3:595-605
152. Okuda H, Manabe T, Yanagita T, Matsuzaki S, Bando Y, Katayama T, Wanaka A, Tohyama M (2006) Novel interaction between HMGA1a and StIP1 in murine terminally differentiated retina. *Mol Cell Neurosci* 33:81-87
153. Ostrin EJ, Li Y, Hoffman K, Liu J, Wang K, Zhang L, Mardon G, Chen R (2006) Genome-wide identification of direct targets of the *Drosophila* retinal determination protein Eyeless. *Genome Res* 16:466-476
154. Pappu KS, Ostrin EJ, Middlebrooks BW, Sili BT, Chen R, Atkins MR, Gibbs R, Mardon G (2005) Dual regulation and redundant function of two eye-specific enhancers of the *Drosophila* retinal determination gene *dachshund*. *Development* 132:2895-2905
155. Pauli T, Seimiya M, Blanco J, Gehring WJ (2005) Identification of functional *sine oculis* motifs in the autoregulatory element of its own gene, in the *eyeless* enhancer and in the signalling gene *hedgehog*. *Development* 132:2771-2782
156. Pfeiffer PL, Gerster T, Lun K, Brand M, Busslinger M (1998) Characterization of three novel members of the zebrafish Pax2/5/8 family: dependency of Pax5 and Pax8 expression on the Pax2.1 (*noi*) function. *Development* 125:3063-3074
157. Pfeiffer BD, Jenett A, Hammonds AS, Ngo TT, Misra S, Murphy C, Scully A, Carlson JW, Wan KH, Lavery TR, Mungall C, Svirskas R, Kadonaga JT, Doe CQ, Eisen MB, Celniker SE, Rubin GM (2008) Tools for neuroanatomy and neurogenetics in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:9715-9720
158. Pignoni F, Hu B, Zavitz KH, Xiao J, Garrity PA, Zipursky SL (1997) The Eye-Specification Proteins So and Eya Form a Complex and Regulate Multiple Steps in *Drosophila* Eye Development. *Cell* 91:881-891
159. Plaza S, Dozier C, Saule S (1993) Quail Pax-6 (Pax-QNR) encodes a transcription factor able to bind and trans-activate its own promoter. *Cell Growth Differ* 4:1041-1050
160. Plowman GD, Sudarsanam S, Bingham J, Whyte D, Hunter T (1999) The protein kinases of *Caenorhabditis elegans*: A model for signal transduction in multicellular organisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:13603-13610
161. Poon CL, Zhang X, Lin JJ, Manning SA, Harvey KF (2012) Homeodomain-interacting protein kinase regulates Hippo pathway-dependent tissue growth. *Curr Biol* 22:1587-1594
162. Punzo C, Seimiya M, Flister S, Gehring WJ, Plaza S (2002) Differential interactions of *eyeless* and *twinn of eyeless* with the *sine oculis* enhancer. *Development* 129:625-634
163. Punzo C, Plaza S, Seimiya M, Schnupf P, Kurata S, Jaeger J, Gehring WJ (2004) Functional divergence between *eyeless* and *twinn of eyeless* in *Drosophila melanogaster*. *Development* 131:3943-3953

164. Punzo C, Kurata S, Gehring WJ (2001) The *eyeless* homeodomain is dispensable for eye development in *Drosophila*. *Genes Dev* 15:1716-1723
165. Quiring R, Walldorf U, Kloter U, Gehring WJ (1994) Homology of the *eyeless* gene of *Drosophila* to the *Small eye* gene in mice and Aniridia in humans. *Science* 265:785-789
166. Rayapureddi JP, Kattamuri C, Steinmetz BD, Frankfort BJ, Ostrin EJ, Mardon G, Hegde RS (2003) Eyes absent represents a class of protein tyrosine phosphatases *Nature* 426:295-298
167. Ready DF, Hanson TE, Benzer S (1976) Development of the *Drosophila* retina, a neurocrystalline lattice. *Dev Biol* 53:217-240
168. Rebay I, Silver SJ, Tootle TL (2005) New vision from Eyes absent: transcription factors as enzymes. *Trends Genet* 21:163-171
169. Relaix F and Buckingham M (1999) From insect eye to vertebrate muscle: redeployment of a regulatory network. *Genes Dev* 13:3171-3178
170. Rinaldo C, Prodosmo A, Mancini F, Iacovelli S, Sacchi A, Moretti F, Soddu S (2007a) MDM2-Regulated Degradation of HIPK2 Prevents p53Ser46 Phosphorylation and DNA Damage-Induced Apoptosis. *Mol Cell* 25:739-750
171. Rinaldo C, Prodosmo A, Siepi F, Soddu S (2007b) HIPK2: a multitale nted partner for transcription factors in DNA damage response and development. *Biochem Cell Biol* 85:411-418
172. Rinaldo C, Siepi F, Prodosmo A, Soddu S (2008) HIPKs: Jack of all trades in basic nuclear activities. *Biochim Biophys Acta* 1783:2124-2129
173. Rinaldo C, Moncada A, Gradi A, Ciuffini L, D'Eliseo D, Siepi F, Prodosmo A, Giorgi A, Pierantoni GM, Trapasso F, Guarguaglini G, Bartolazzi A, Cundari E, Schinina ME, Fusco A, Soddu S (2012) HIPK2 Controls Cytokinesis and Prevents Tetraploidization by Phosphorylating Histone H2B at the Midbody. *Mol Cell* 47:87-98
174. Roberts RC (1967) Small eyes - a new dominant eye mutant in the mouse. *Genetical Res Camb* 9:121-122
175. Robinow S and White K (1988) The locus *elav* of *Drosophila melanogaster* is expressed in neurons at all developmental stages. *Dev Biol* 126:294-303
176. Robinow S and White K (1991) Characterization and spatial distribution of the ELAV protein during *Drosophila melanogaster* development. *J Neurobiol* 22:443-461
177. Rong YS and Golic KG (2000) Gene Targeting by Homologous Recombination in. *Science* 288:2013-2018
178. Rosci A, Möller A, Calzado MA, Renner F, Wimmer VC, Gresko E, Lüdi KS, Schmitz ML (2006) Phosphorylation-Dependent Control of Pc2 SUMO E3 Ligase Activity by Its Substrate Protein HIPK2. *Mol Cell* 24:77-89
179. Rubin G and Spradling A (1982) Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors. *Science* 218:348-353
180. 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
181. Rush C (1926) Congenital Aniridia. *Trans Am Ophthalmol Soc* 24:332-341

182. Sakamoto K, Huang BW, Iwasaki K, Hailemariam K, Ninomiya-Tsuji J, Tsuji Y (2010) Regulation of Genotoxic Stress Response by Homeodomain-interacting Protein Kinase 2 through Phosphorylation of Cyclic AMP Response Element-binding Protein at Serine 271. *Mol Biol Cell* 21:2966-2974
183. Salzer CL and Kumar JP (2010) Identification of retinal transformation hot spots in developing *Drosophila* epithelia. *PLoS ONE* 5:e8510
184. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Biotechnology* 24:104-108
185. Sambrook J and Russell DW (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press
186. Saul VV, de la Vega L, Milanovic M, Krüger M, Braun T, Fritz-Wolf K, Becker K, Schmitz ML (2013) Article HIPK 2 kinase activity depends on cis-autophosphorylation of its activation loop. *J Mol Cell Biol* 5:27-38
187. Saul VV and Schmitz ML (2013) Posttranslational modifications regulate HIPK2, a driver of proliferative diseases. *J Mol Med* 91:1051-1058
188. Schedl A, Ross A, Lee M, Engelkamp D, Rashbass P, van Heyningen V, Hastie ND (1996) Influence of PAX6 gene dosage on development: Overexpression causes severe eye abnormalities. *Cell* 86:71-82
189. Schmitz ML, Rodriguez-Gil A, Homung J (2014) Integration of stress signals by homeodomain interacting protein kinases. *Biol Chem* 395:375-386
190. Seimiya M and Gehring WJ (2000) The *Drosophila* homeobox gene *optix* is capable of inducing ectopic eyes by an *eyeless*-independent mechanism. *Development* 127:1879-1886
191. Seo HC, Curtiss J, Mlodzik M, Fjose A (1999) Six class homeobox genes in *Drosophila* belong to three distinct families and are involved in head development. *Mech Dev* 83:127-139
192. Shaham O, Menuchin Y, Farhy C, Ashery-Padan R (2012) Pax6: a multi-level regulator of ocular development. *Prog Retin Eye Res* 31:351-376
193. Shen W and Mardon G (1997) Ectopic eye development in *Drosophila* induced by directed *dachshund* expression. *Development* 124:45-52
194. Silver SJ, Davies EL, Doyon L, Rebay I (2003) Functional dissection of *eyes absent* reveals new modes of regulation within the retinal determination gene network. *Mol Cell Biol* 23:5989-5999
195. Silver SJ and Rebay I (2005) Signaling circuitries in development: insights from the retinal determination gene network. *Development* 132:3-13
196. Singh ND, Larracuente AM, Sackton TB, Clark AG (2009) Comparative Genomics on the *Drosophila* Phylogenetic Tree. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 40:459-480
197. Skottheim Honn J, Johansson L, Rasmuson Lestander A (2016) Regulation of *twin of eyeless* during *Drosophila* development. *Gene Expr Patterns* 20:120-129
198. Staehling-Hampton K and Hoffmann FM (1994) Ectopic *decapentaplegic* in the *Drosophila* Midgut Alters the Expression of Five Homeotic Genes, *dpp* and *wingless*, Causing Specific Morphological Defects. *Dev Biol* 164:502-512
199. Steinmetz EL (2006) Analyse und Charakterisierung von Wechselwirkungen der Homeodomanprotein Interagierenden Proteinkinase dHIPK2 mit den Genen der Augenentwicklung bei *Drosophila melanogaster*. Diplomarbeit, Universität des Saarlandes

200. Steinmetz E, Dewald D, Walldorf U (2018) Homeodomain-interacting protein kinase phosphorylates the *Drosophila* Paired box protein 6 (Pax6) homologues Twin of eyeless and Eyeless. *Insect Mol Biol* 27:198-211
201. Struhl G (1981) A blastoderm fate map of compartments and segments of the *Drosophila* head. *Dev Biol* 84:386-396
202. Swarup S and 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 USA* 108:9887-9892
203. Tamura K, Subramanian S, Kumar S (2004) Temporal Patterns of Fruit Fly (*Drosophila*) Evolution Revealed by Mutation Clocks. *Mol Biol Evol* 21:36-44
204. Tanaka-Matakatsu M, Miller J, Du W (2015) The homeodomain of Eyeless regulates cell growth and antagonizes the paired domain-dependent retinal differentiation function. *Protein Cell* 6:68-78
205. Tchekanda E, Sivanesan D, Michnick SW (2014) An infrared reporter to detect spatiotemporal dynamics of protein-protein interactions. *Nat Methods* 11:641-644
206. Tirian L and Dickson B (2017) The VT GAL4, LexA, and split-GAL4 driver line collections for targeted expression in the *Drosophila* nervous system. *BioRxiv* doi.org/10.1101/198648
207. Ton CC, Hirvonen H, Miwa H, Weil MM, Monaghan P, Jordan T, van Heyningen V, Hastie ND, Meijers-Heijboer H, Drechsler M, et al. (1991) Positional Cloning and Characterization of a Paired Box- and Homeobox-Containing from the Aniridia Region. *Cell* 67:1059-1074
208. Tootle TL, Silver SJ, Davies EL, Newman V, Latek RR, Mills IA, Selengut JD, Parlikar BE, Rebay I (2003) The transcription factor Eyes absent is a protein tyrosine phosphatase. *Nature* 426:299-302
209. Treisman J, Harris E, Desplan C (1991) The paired box encodes a second DNA-binding domain in the Paired homeo domain protein. *Genes Dev* 5:594-604
210. Walther C, Gruss P (1991) Pax-6, a murine paired box gene, is expressed in the developing CNS. *Development* 113:1435-1449
211. Waterston et al. [*Mouse genome consortium*] (2002) Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* 420:520-562
212. Wang S, Ding M, Xue B, Hou Y, Sun Y (2018) Live Cell Visualization of Multiple Protein-Protein Interactions with BiFC Rainbow. *ACS Chem Biol* 13:1180-1188
213. Wawersik S and Maas RL (2000) Vertebrate eye development as modeled in *Drosophila*. *Hum Mol Genet* 9:917-925
214. Weasner B, Salzer C, Kumar JP (2007) Sine oculis, a member of the SIX family of transcription factors, directs eye formation. *Dev Biol* 303:756-771
215. Weasner BM, Weasner B, Deyoung SM, Michaels SD, Kumar JP (2009) Transcriptional activities of the Pax6 gene *eyeless* regulate tissue specificity of ectopic eye formation in *Drosophila*. *Dev Biol* 334:492-502
216. Wee HJ, Voon DC, Bae SC, Ito Y. (2008) PEBP2-2/CBF-2 dependent phosphorylation of RUNX1 and p300 by HIPK2: Implications for leukemogenesis. *Blood* 112:3777-3787
217. Whitmarsh AJ and Davis RJ (2000) Regulation of transcription factor function by phosphorylation. *Cell Mol Life Sci* 57:1172-1183
218. Wilson D, Sheng G, Lecuit T, Dostatni N, Desplan C (1993) Cooperative dimerization of paired class homeo domains on DNA. *Genes Dev* 7:2120-2134

219. Wolff T and Ready DF (1991) The beginning of pattern formation in the *Drosophila* compound eye: the morphogenetic furrow and the second mitotic wave. *Development* 113:841-850
220. Wolpert L, Beddington R, Brockes J, Jessell T, Lawrence P, Meyerowitz E (1999) *Spektrum Lehrbuch Entwicklungsbiologie*, Spektrum Verlag
221. Xu HE, Rould MA, Xu W, Epstein JA, Maas RL, Pabo CO (1999) Crystal structure of the human Pax6 paired domain-DNA complex reveals specific roles for the linker region and carboxy-terminal subdomain in DNA binding. *Genes Dev* 13:1263-1275
222. Xu PX, Woo I, Her H, Beier DR, Maas RL (1997) Mouse Eya homologues of the *Drosophila eyes absent* gene require Pax6 for expression in lens and nasal placode. *Development* 124:219-231
223. Xu W, Rould MA, Jun S, Desplan C, Pabo CO (1995) Crystal structure of a paired domain-DNA complex at 2.5 Å resolution reveals structural basis for pax developmental mutations. *Cell* 80:639-650
224. Yamada D, Pérez-Torrado R, Filion G, Caly M, Jammart B, Devignot V, Sasai N, Ravassard P, Mallet J, Sastre-Garau X, Schmitz ML, Defossez PA (2009) The human protein kinase HIPK2 phosphorylates and downregulates the methyl-binding transcription factor ZBTB4. *Oncogene* 28:2535-2544
225. Yan Q, Liu WB, Qin J, Liu J, Chen HG, Huang X, Chen L, Sun S, Deng M, Gong L, Li Y, Zhang L, Liu Y, Feng H, Xiao Y, Liu Y, Li DW (2007) Protein phosphatase-1 modulates the function of Pax-6, a transcription factor controlling brain and eye development. *J Biol Chem* 282:13954-13965
226. Younossi-Hartenstein A, Tepass U, Hartenstein V (1993) Embryonic origin of the imaginal discs of the head of *Drosophila melanogaster*. *Roux Arch Dev Biol* 203:60-73
227. Zhang Q, Nottke A, Goodman RH (2005) Homeodomain-interacting protein kinase-2 mediates CtBP phosphorylation and degradation in UV-triggered apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:2802-2807
228. Zhang Q and 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
229. Zhang T, Ranade S, Cai CQ, Clouser C, Pignoni F (2006) Direct control of neurogenesis by selector factors in the fly eye: regulation of *atonal* by Ey and So. *Development* 133:4881-4889
230. Zhou G, Wang H, Liu SH, Shahi KM, Lin X, Wu J, Feng XH, Qin J, Tan TH, Brunnicardi FC (2013) p38 MAP kinase interacts with and stabilizes pancreatic and duodenal homeobox-1. *Curr Mol* 13:377-386
231. Zhu J, Palliyil S, Ran C, Kumar JP (2017) *Drosophila* Pax6 promotes development of the entire eye-antennal disc, thereby ensuring proper adult head formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114: 5846-5853
232. Zhu J, Ordway AJ, Weber L, Buddika K, Kumar JP (2018) Polycomb group (PcG) proteins and Pax6 cooperate to inhibit in vivo reprogramming of the developing *Drosophila* eye. *Development* [doi: 10.1242/dev.160754]
233. Zimmerman JE, Bui QT, Steingrímsson E, Nagle DL, Fu W, Genin A, Spinner NB, Copeland NG, Jenkins NA, Bucan M, Bonini NM (1997) Cloning and characterization of two vertebrate homologs of the *Drosophila eyes absent* gene. *Genome Res* 7:128-141
234. Zimmerman JE, Bui QT, Liu H, Bonini NM (2000) Molecular Genetic analysis of *Drosophila eyes absent* mutants reveals an Eye Enhancer Element. *Genetics* 154:237-246

7 Anhang

7.1 Ergänzende Daten zu Hipk-Substraten innerhalb des RDGN

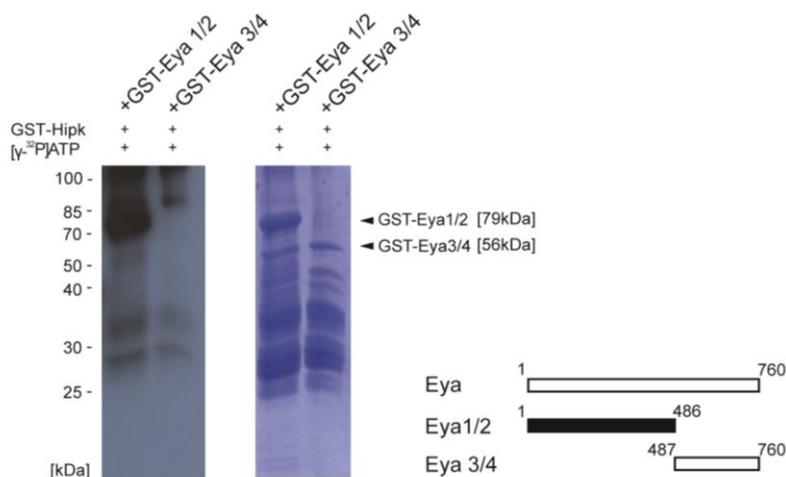


Abb. 7.1: Hipk phosphoryliert Eyes absent (Eya). Autoradiogramm und zugehörige SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach *in vitro* Kinaseassay mit den potentiellen Hipk-Substraten GST-Eya1/2 (AS 1-486) und -Eya3/4 (AS 478-760). Kontrollen wurden analog zu den vorangegangenen Kinaseassays durchgeführt (nicht mit abgebildet).

Eyes absent (Eya) stellt ein *in vitro* Substrat der Proteinkinase Hipk dar. Die Hipk-Phosphorylierungsstellen liegen im N-Terminalen Bereich (GST-Eya1/2; siehe Abb. 7.1). Eya gehört zur EYA Proteinfamilie, zu der neben dem *Drosophila* Protein Eya (Bonini et al., 1993 und 1998) auch die Vertebraten-Homologe Eya1-4 gehören (zusammengefasst in Rebay et al., 2005).

7.2 Hipk-Substrate Überblick

Tab. 7.1: Auflistung bisher bekannter Hipk-Substrate verschiedener Spezies. Die phosphorylierten Sequenzmotive der bekannten Hipk-Substrate wurden so dargestellt, dass das Kinase-führende Prolin (sofern bekannt) sowie zu jeder Seite zehn flankierende Aminosäuren gezeigt sind. Phosphorylierte Aminosäuren sind rot dargestellt, das die Kinase führende Prolin ist grün dargestellt. Ist der phosphorylierte Bereich eines Substrates noch nicht genauer bekannt, wurde keine Zielsequenz gelistet.

Hipk-Substrat	Phosphoryliertes Sequenzmotiv	Organismus	Quelle
Toy	QKIADYKRECPS ⁴²¹ IFAWEIRDR SNSLPEASNGPT ³⁹⁵ VLGGEANTT ANTTHTSSES ⁴¹⁰ PPLQPAAPRLP NYNSSLGSM ⁴⁵² PSC ⁴⁵² LQQRDAYP	<i>Drosophila</i>	(Steinmetz et al., 2018)
Ey	LGAGIDS ⁵⁴⁷ S ⁵⁴⁸ ES ⁵⁵⁰ PTPIPHIRPSC	<i>Drosophila</i>	(Steinmetz et al., 2018)
Gro	RSGSSSRSTPS ²⁹⁷ LKT ³⁰⁰ KDMEKP	<i>Drosophila</i>	(Steinmetz, 2006; Lee et al., 2009a)
Nito/Spen	HNMKRS ²³ AS ²⁴ RS ²⁷ PGPASRSSLSR ERMRRRLDRS ⁷³ PS ⁷⁵ RYGSPHREP DYERYHYS ²⁰¹ RS ²⁰³ PMGQGVPLDHR PGVERS ⁵⁹² RS ⁵⁹⁴ RS ⁵⁹⁶ PLKRARSPGSD SRSP ⁶⁰³ LKRARS ⁶⁰³ PGS ⁶⁰⁶ DS ⁶⁰⁸ DTSTR	<i>Drosophila</i>	(Dewald et al., 2014)
Hbn	AMRPAPVQES ⁴⁶ PVS ⁴¹ RPRAVYSI NQHQIKRMYT ⁵⁴ PS ⁵⁶ EVLITMPHH	<i>Drosophila</i>	(Dewald, 2014)
Ems	STPDL ¹⁰ GPQS ²² PPGERNVPGS MAVSLKRE ¹⁸² PAPAMEQAEN	<i>Drosophila</i>	(Dewald, 2014)
Msh	SLLADTRPRT ¹⁴⁷ PNQAADGPQN TSPISQASST ¹⁷⁴ PPPPASAAAQ	<i>Drosophila</i>	(Dewald, 2014; Heyer, 2017)
Yki	AIHHSRAR ¹⁰⁶ S ¹⁰⁷ PAS ¹¹⁷ LQQNYNVR KKQRSYDVIS ²⁵⁵ PIQLNRQLGAL	<i>Drosophila</i>	(Meier, 2013)
PAX6	RNQRQASNT ²⁶¹ PSH ²⁶¹ IPISSSSF VYQPIQPPT ³⁰⁴ PVSFTSGSML VNGRSYDTYT ³⁷³ P ³⁷³ PHMQTHMSQ	<i>Homo sapiens</i>	(Kim et al., 2006)
p53/TP53	SQAMDDLMLS ⁴⁶ PDDIEQWFTED	<i>Homo sapiens</i>	(D'Orazi et al., 2002; Hofmann et al., 2002)
PDX1	GLLPSGLSVS ²⁶⁹ PQPSSIAPLRP	<i>Mus musculus</i>	(Anetal., 2010)
CREB1/CBP	IAPGVVMAS ²⁷¹ PALPTQPAEEA	<i>Homo sapiens</i>	(Sakamoto et al., 2010)
RUNX1/AML1	MQDTRQIQPS ²⁴⁹ P ²⁴⁹ PWSYDQSYQ PSVHPAT ²⁷³ PIS ²⁷⁶ PGRASGMTLS	<i>Homo sapiens</i>	(Aikawa et al., 2006; Wee et al., 2008)
ATF1	SLPQTVM ¹⁹⁸ TS ¹⁹⁸ PVTLTSQTTKT	<i>Homo sapiens</i>	(Hailemariam et al., 2010)
PML	. .MEPAPARS ³⁶ PRPQQDPARPQ PSEGRQPS ³⁶ PS ³⁸ PSPTERAPASE	<i>Homo sapiens</i>	(Gresko et al., 2009)
Histon H2B	AKSAPAPKKGS ¹⁴ KKAVTKAQKK (nicht Prolin-geführt)	<i>Homo sapiens</i>	(Rinaldo et al., 2012)
β-Catenin/ CTNNB1	LDS ³³ GIHS ³⁷ GATTTAPSLSGKGN (nicht Prolin-geführt)	<i>Homo sapiens</i>	(Kim et al., 2010)
HMGA1	GRPRKQPPVS ³² PGTALVGSQKE SQKEPSEVPT ⁵² PKRPRGRPKGS AAKTRKTTT ⁷⁷ PGRKPRGRPKK	<i>Homo sapiens</i>	(Zhang & Wang, 2007)
CtBP1	PVAHPPHAPS ⁴²² PGQTVKPEADR	<i>Homo sapiens</i>	(Zhang et al., 2005)
CBX4 (Pc2)	PSSLQVKPET ⁴⁹⁵ PASA ⁴⁹⁵ AVAVAAA	<i>Mus musculus</i>	(Rosic et al., 2006)
ZBTB4	PQAAPPAPT ³⁹⁵ PPPTLPPPIP RHAAERPGGT ⁷⁹⁵ PT ⁷⁹⁷ PVIAYSKGS	<i>Homo sapiens</i>	(Yamada et al., 2009)
MeCP2	SAPAVPEASAS ⁸⁰ PKQRRSI IRDR	<i>Homo sapiens</i>	(Bracaglia et al., 2009)
Che1/AATF	KKRSRSHSAKT ¹⁴⁴ PGFSVQSI SDF	<i>Homo sapiens</i>	(De Nicola et al., 2014)
Notch1	LQVPEHPFLT ²⁵¹² PSPESPDQWSS	<i>Homo sapiens</i>	(Ann et al., 2016)

7.3 Ergänzende Daten zur *hipk*-Enhancer Analyse

Während der Suche nach potentiellen augenspezifischen *hipk*-Enhancern (Abschnitt 4.6) wurden die durch die potentiellen *hipk*-Enhancer aktivierten Expressionsmuster während verschiedener Stadien der *Drosophila*-Entwicklung dokumentiert. In Tab. 7.1 ist als Ergänzung eine Zusammenstellung aller Expressionsmuster aller untersuchten potentiellen *hipk*-Enhancer aufgeführt. In den darauffolgenden Abbildungen (Abb. 7.2 bis 7.4) sind die resultierenden Expressionsmuster der potentiellen *hipk*-Enhancer während verschiedener Entwicklungsstadien gezeigt.

Tab. 7.1: Liste der untersuchten potentiellen *hipk*-Enhancer-Elemente mit Angabe der Gewebe in denen sie während der angegebenen Entwicklungsstadien Reporterexpression induzieren. (Larvale Reporterexpression in den Augen-Antennen-Imaginalscheiben ist in Abb. 4.32 gezeigt)

VDRC-ID	Construct-ID	Koordinaten (alle Chr. 3L)	Larval	Puppal	Adult
200141	223552	542461-544728	Hirnstamm	-	Augen
200741	223565	562700-564874	Hirnstamm, Mundwerkzeuge	Augen, Mundwerkzeuge, Beine	Augen, Thorax
200880	223564	561070-563286	Hirnstamm, Mundwerkzeuge, Speicheldrüsen, Cuticula (segmentär)	Augen, Mundwerkzeuge	Augen, Thorax, Abdomen, (Bein-)muskulatur
201396	223553	542876-543113	Speicheldrüsen, Cuticula (ubiquitär)	Mundwerkzeuge, Abdomen	Abdomen (anterior),
201436	223559	552656-554858	Speicheldrüsen, Mundwerkzeuge	Mundwerkzeuge, Thorax	Augen, Thorax
201526	223563	559282-561596	Cuticula (ubiquitär), Vorder-/Mitteldarm	Augen, Abdomen, Vorder-/Mitteldarm	Augen, Abdomen
201549	223561	556045-558157	Mundwerkzeuge	Augen, Mundwerkzeuge	Augen, Mundwerkzeuge
202023	223557	549321-551551	Mundwerkzeuge, Speicheldrüsen, Cuticula	Mundwerkzeuge	Augen, Mundwerkzeuge
203203	223560	554369-556574	Mundwerkzeuge, Speicheldrüsen, Cuticula	Mundwerkzeuge	Thorax
203394	223555	545992-548133	Speicheldrüsen, Cuticula, Analplatten	Mundwerkzeuge, Abdomen (posterior)	Kopfkapsel, Ocelli
205820	223554	544317-546422	Hirnstamm	Augen (wenig)	Augen
208145	223562	?	Hirnstamm	Mundwerkzeug (wenig), Vorder-/Mitteldarm	Antennen, Mundwerkzeuge, Abdomen

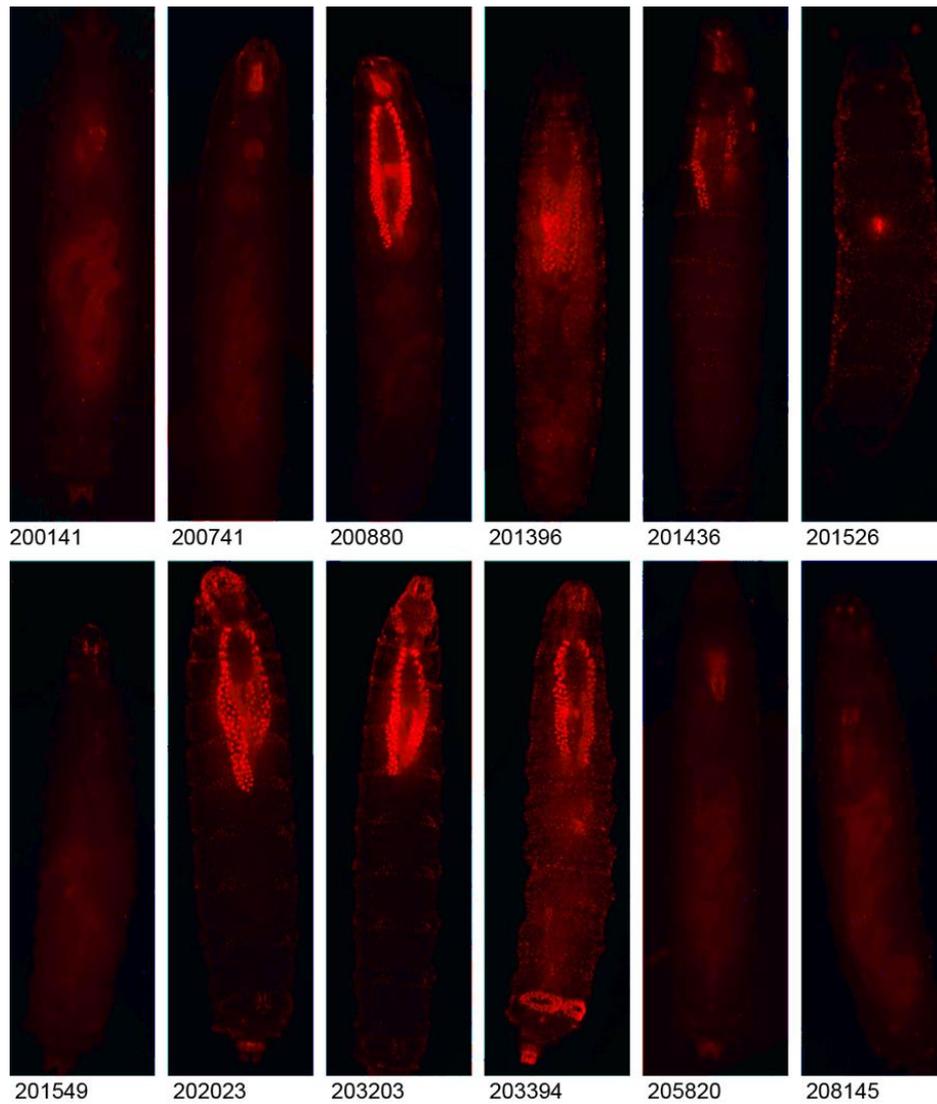


Abb. 7.2: Larvale Expressionsmuster einzelner potentieller *hipk*-Enhancer. Die Visualisierung der Muster erfolgte durch Kreuzung der entsprechenden Gal4-Stämme mit dem UAS-Reporter-Stamm UAS-mCD8-GFP, UAS-H2B-mRFP1. Gezeigt ist nur die Expression des RFP, da dieses intensiver leuchtete und somit die Auswertung erleichterte. Anterior ist oben, ventrale Aufsicht.

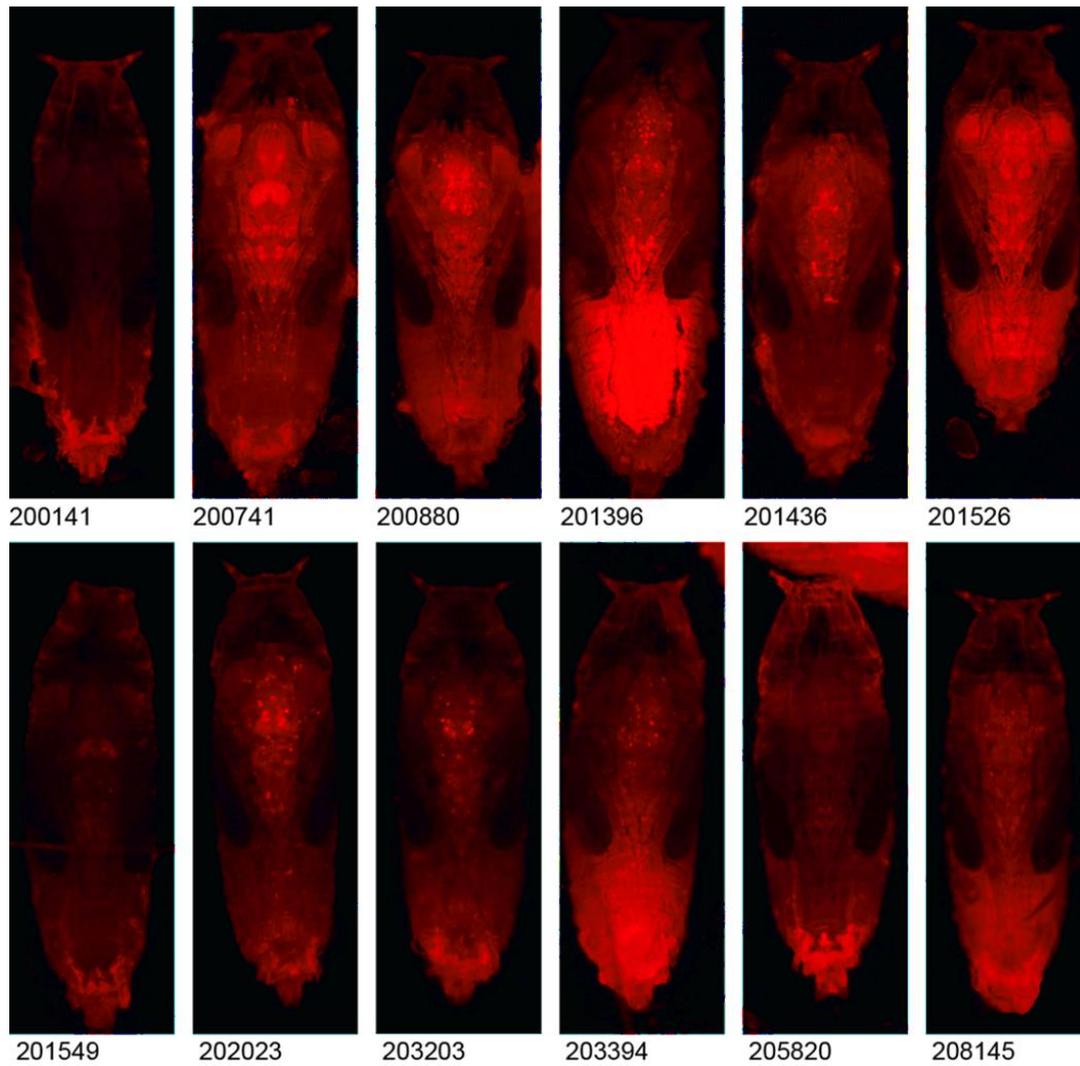


Abb. 7.3: Puppale Expressionsmuster einzelner potentieller *hipk*-Enhancer. Nach Kreuzung der entsprechenden Gal4-Stämme mit dem UAS-Reporter-Stamm UAS-mCD8-GFP, UAS-H2B-mRFP1 Gezeigt ist nur die Expression des RFP, da diese intensiver leuchtete und somit die Auswertung erleichterte. Anterior ist oben, ventrale Aufsicht.

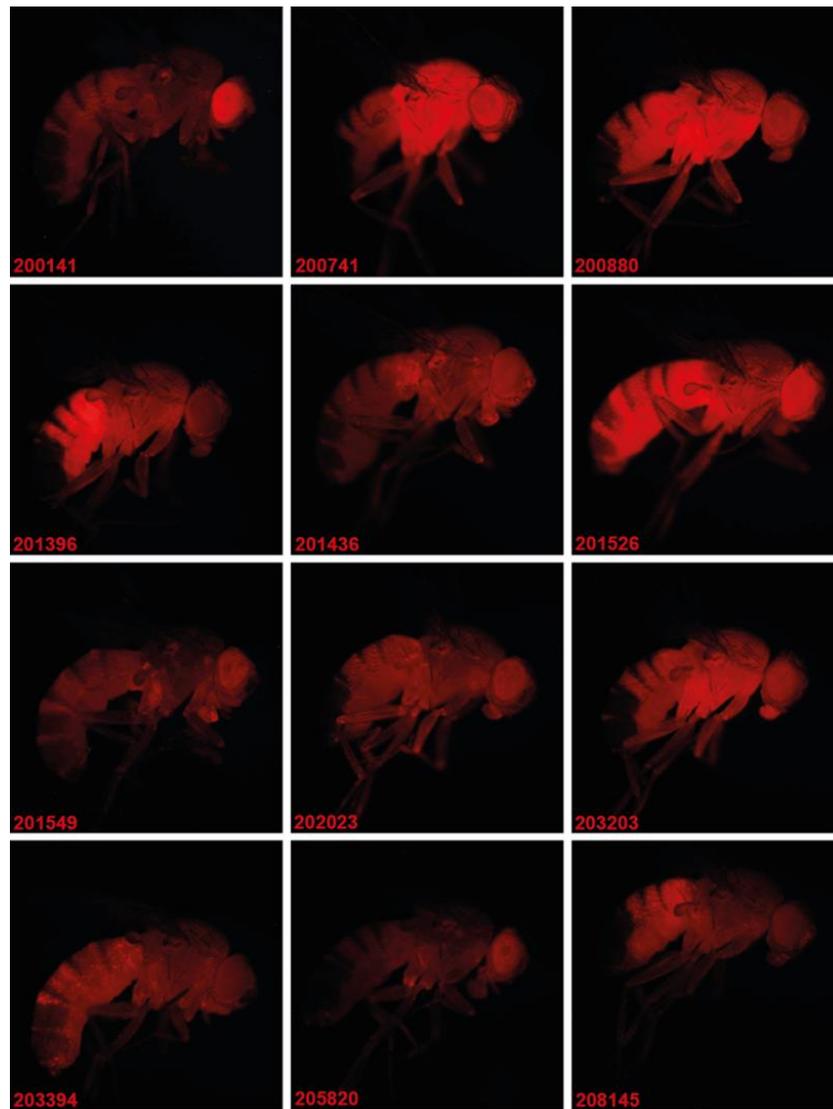


Abb. 7.4: Adulte Expressionsmuster potentieller *hipk*-Enhancer. Nach Kreuzung der entsprechenden Gal4-Stämme mit dem UAS-Reporter-Stamm UAS-mCD8-GFP, UAS-H2B-mRFP1. Gezeigt ist nur die Expression des RFP, da diese intensiver leuchtete und somit die Auswertung erleichterte. Anterior ist rechts, laterale Aufsicht.

8 Publikationen

Steinmetz EL, Dewald DN, Walldorf U. (2018) Homeodomain-interacting Protein Kinase (Hipk) phosphorylates the *Drosophila* Paired box protein 6 (Pax6) homologues Twin of eyeless and Eyeless. *Insect Mol Biol* 27:198-211. doi: 10.1111/imb.12363.

Dewald DN, **Steinmetz EL**, Walldorf U. (2014) Homeodomain-interacting protein kinase (Hipk) phosphorylates the small SPOC family protein Spenito. *Insect Mol Biol* 23:706-19. doi: 10.1111/imb.12117

Dewald DN, **Steinmetz EL**, Walldorf U. (2013) Homeodomain-interacting protein kinase (Hipk) phosphorylates the small SPOC family protein Spenito. [Posterpräsentation; 23rd European *Drosophila* Research Conference (EDRC) 2013, Barcelona]

Steinmetz EL, Walldorf U. Analyse von Interaktionen der Homeodomänprotein interagierenden Proteinkinase (dHIPK2) mit Faktoren des Retinalen Determination Gen Netzwerkes (RDGN) bei *Drosophila melanogaster* [Abstract; online: urn:nbn:de:bsz:291-scidok-56245; 2013]

Steinmetz EL, Walldorf U. [Posterpräsentation; Doktorandentag der Universität des Saarlandes 2017, Saarbrücken]

9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mich während meiner Promotion in vielfältiger Art und Weise unterstützt haben.

Inbesondere danke ich Herrn Prof. Uwe Walldorf für die Möglichkeit meine Promotion in seiner Arbeitsgruppe durchzuführen. Die ständige Gesprächsbereitschaft, konstruktive Diskussionen und nicht zuletzt die Bereitstellung hervorragender und familienfreundlicher Arbeitsbedingungen haben es mir ermöglicht diesen meinen Weg zu gehen.

Herrn Prof. Dr. Mathias Montenarh von der Fachrichtung Medizinische Biochemie und Molekularbiologie danke ich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens und den Zugang zum Isotopenlabor.

Ich danke der Graduiertenförderung GradUS der Universität des Saarlandes für die Bereitstellung des Stipendiums über drei Jahre und für die finanzielle Unterstützung bei Konferenzbesuchen.

Mein besonderer Dank geht an Dr. Denise Dewald für die stetige Gesprächsbereitschaft und Unterstützung bei der Arbeit im Labor sowie während der Zusammenarbeit an unseren gemeinsamen Veröffentlichungen.

Ich danke ich allen Doktoranden, Diplomanden, Masteranden und Bacheloranden sowie Doris Jann und Jennifer Flammann für die freundliche und stets inspirierende Arbeitsatmosphäre. Hervorheben möchte ich den Dank an Dr. Christine Klöppel, unsere Zusammenarbeit in der Lehre hat mir immer viel Freude bereitet und ich werde unsere Praktika sehr vermissen.

Außerdem möchte ich Mona Raffael danken, mit der ich im Studium und in diesem Labor die ersten beruflichen Schritte gemeinsam gemacht habe und dabei eine Freundin fürs Leben gefunden habe.

Mein herzlichster Dank geht an meine Familie. Meiner Mutter vor allem dafür, dass sie immer an mich geglaubt hat. Meinem Vater dafür, dass er jetzt so stolz wäre. Claudia für die stetige Hilfsbereitschaft. Insbesondere meinem Mann und unseren beiden Söhnen Fynn und Max danke ich, für die unendliche Geduld mich auf diesem Weg zu unterstützen, die Kraft die sie mir dazu gegeben haben und die Zeit die wir entbehren mussten.

Ohne Spekulation gibt es keine neue Beobachtung.

Charles Darwin, 1857

10 Lebenslauf

Name: Eva Louise Steinmetz

Geburtsdatum: 08. August 1980

Geburtsort: Homburg/Saar

Familienstand: Verheiratet, 2 Kinder

Schulbildung: 1986 - 1990:
Grundschule am Ordensgut, Saarbrücken
1990 - 2000:
Marienschule, Saarbrücken (Gymnasium)
Juni 2000: Abitur

Studium: 2000 - 2006:
Studium der Biologie mit Schwerpunkt Human- und Molekularbiologie, Universität des Saarlandes
Vordiplom: 12. Mai 2003
Diplom: 31. Mai 2006
Prüfungsfächer:
Entwicklungsbiologie, Molekularbiologie, Virologie
Thema der Diplomarbeit:
Analyse und Charakterisierung von Wechselwirkungen der Homeodomänprotein Interagierenden Proteinkinase dHIPK2 mit den Genen der Augenentwicklung bei *Drosophila melanogaster*.
Diplomarbeit, Universität des Saarlandes

Beruflicher Werdegang: Juni 2006 - Juli 2007
Wissenschaftliche Angestellte der CardioBioTech-AG (CBT), Prof. Dr. Malte Kelm, Universitätsklinikum RWTH Aachen

Promotion: Oktober 2011:
Beginn der Doktorarbeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Uwe Walldorf am Institut für Entwicklungsbiologie, Universität des Saarlandes