
6 Material und Methoden

Molekularbiologische Standardmethoden, Chemikalien, Kits und Geräte

Die im Folgenden nicht näher beschriebenen molekularbiologischen Standardmethoden wurden aus den Laborhandbüchern von Sambrook et al. (1989) und Ausubel et al. (1987) übernommen (Ausubel et al., 1987; Sambrook et al., 1989). Diese Methoden waren: Plasmid-DNA-Präparation im analytischen Maßstab, Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen, Dephosphorylierung linearisierter DNA, Auffüllen- bzw. Abdauen überstehender DNA-Enden, Ligationsreaktionen, Transformation von Bakterien, Auftrennung von Nukleinsäuren in Agarosegelen, Screening von Phagenbibliotheken sowie Northern- und Southern-Hybridisierungen. Nach Angaben der Hersteller wurden durchgeführt: Die Plasmid-DNA-Präparationen in quantitativem Maßstab (Qiagen), die Elution von DNA aus Agarosegelen (Jetsorb, Genomed), die radioaktive Markierung von DNA (Megaprime DNA labelling system, Amersham), Chemolumineszenzreaktion (ECL-Detection-Kit, Amersham) und die DNA-Sequenzierung (Thermo sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit, Amersham).

Soweit nicht anders angegeben wurden Chemikalien von Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Pharmacia (Freiburg), Serva (Heidelberg) und Sigma (Deisenhofen), radioaktive Nukleotide von Amersham-Buchler (Braunschweig), Enzyme von Boehringer Mannheim (Mannheim) und New England Biolabs (Schwalbach/Taunus) und Oligonukleotide von BioTeZ (Berlin) bezogen. Die verwendeten Geräte waren: Luminometer (Lumat LB9507, Berthold), ELISA-Reader Ultramark (Biorad), DNA-Sequencer 4000L (MWG-Biotech), Minifuge RF (Heraeus Sepatech), Centrifuge 5402 (Eppendorf), Centrifuge J2-21 (Beckman) mit Rotoren JA 10 und JA 12 und Ultracentrifuge TL-100 (Beckman) mit Rotoren TLA 100.3 und TLV 100.

Bakterienstämme

Es wurden ausschließlich konjugationsdefiziente K12-Sicherheitsstämme von E.coli verwendet:

-XL1 Blue [*F'*, *Tn10* (*tet^r*), *proAB*⁺, *lacI^q*, Δ (*lacZ*)*M15*, *supE44*, *hsdR17*, *recA1*, *endA1*, *relA1*, *gyrA96*] und

-HB 101 [*F*, *D*(*gpt-proA*)62, *leuB6*, *ara-14*, *galK2*, *lacY1*, *rpsL20* (*Str^r*), *xyl5*, *mtl-1*, *supE44*, *hsdR17*, *recA13*]

Verwendete Plasmide

pBTM116 (Bartel & Fields, 1995) wurde als „bait“-Vektor im Hefe-2-Hybrid-System eingesetzt; dieser Vektor enthält 5' der Klonierungsstelle eine LexA-DNA-Bindungsdomäne zur Expression entsprechender Fusionsproteine in Hefen; die Selektion erfolgt über Tryptophan-Auxotrophie.

pVP16 enthält 5' der Klonierungsstelle die VP16-Aktivierungsdomäne zur Expression entsprechender Fusionsproteine; zusätzlich wird ein Kern-Lokalisierungssignal kodiert; die Selektion erfolgt über Leucin-Auxotrophie. pVP16 wurde als cDNA-Bibliotheksvektor für Hefe-2-Hybrid-Screens eingesetzt.

pcDNA-FLAG/pcDNA-HA sind modifizierte pcDNA3.1-Vektoren (Invitrogen), bei denen ein FLAG bzw. HA-Epitop 5' der Klonierungsstelle inseriert wurde. Beide wurden zur Expression der angegebenen cDNAs in Zellkultur verwendet.

pSP64-FLAG ist ein durch Insertion eines FLAG-Epitopes modifizierter pSP64 (Krieg et al.; 1984) und wurde zur *In vitro*-mRNA-Synthese genutzt.

Alle bis hierher beschriebenen Konstrukte besitzen eine identische NotI-Restriktionsstelle. Diese ermöglicht die Umsetzung der zu analysierenden cDNAs im Leseraster des jeweiligen N-terminalen Fusionspartners (DNA-Bindungs- bzw. Aktivierungsdomäne in den Hefekonstrukten, FLAG-/HA-Epitop in den Expressionsvektoren).

pCS2+ (Weintraub et al., 1991) ist ein weiterer Expressionsvektor, der zu Expression in Zellkultur bzw. zur *in vitro*-Transkription verwendet wurde.

pBluescript II SK⁺ (Stratagene) wurde für DNA-Klonierungsschritte eingesetzt.

pQE-30, 31 und 32 (Stratagene) wurden zur Expression der N-terminalen Region von Diversin in Bakterien verwendet. Diese Vektoren enthalten ein His-Epitop 5' der Klonierungsstelle und einen IPTG-induzierbaren Promoter.

Dankbar bin ich für die Bereitstellung folgender cDNAs:

- Maus-Dishevelled 2 (D.J. Sussman, Baltimore)
- Maus-Axin (H Clevers, Utrecht)
- *Xenopus*-Wnt11 (R.T. Moon, Seattle)
- humane-CKI ϵ und bovine-CKI α und deren katalytisch-inaktive Versionen (D. Virshup, Salt Lake City)
- Diego und Drosophila-Axin wurden von Christian Asbrand aus embryonaler Gesamt-RNA von Drosophila durch RT-PCR kloniert (Asbrand, 2002).
- Conductin-Konstrukte (J. Behrens, Erlangen)

Klonierung der Diversin-Expressionskonstrukte

Die Sequenzierung der aus Phagen isolierten Diversin-cDNA-Fragmente erlaubte die Charakterisierung der vollständigen cDNA. Ein 2,2 kB Diversin-cDNA-Fragment, dem C-terminal ca. 90 Bp kodierender Bereich fehlte, wurde als EcoRI-Fragment in die EcoRI-Stelle des pBluescript II SK⁺ kloniert. Die NotI-Stelle in der multiplen Klonierungsregion des Bluescript und eine NotI-Stelle im klonierten Diversin Fragment gestatteten eine direkte Klonierung in die NotI-Stelle des pcDNA-HA. Die Anpassung des Leserahmens an die NotI-Stelle des N-terminalen HA-Epitopes erfolgte über PCR-Amplifizierung und Austausch eines NotI/PmlI-Fragmentes (5'Primer: TTC TCT CGC GGC CGC TGA GCC AGC A; 3'Primer: TGA GGA GGA TCT GAC GAC GGA C). Dabei wurde das ATG der Diversin cDNA zu CTG mutiert und an das HA-Epitop fusioniert. Die C-terminal fehlenden Nukleotide wurden ebenfalls über PCR amplifiziert und durch Austausch eines SacII/NotI-Fragmentes fusioniert (5'Primer: GGC CAG ATG GAG AGC AA; 3'Primer: CTG AAA TTG CGG CCG CTT GGG CGT GAC). Die so erstellte 5'- und 3' von Not-I-Restriktionsstellen flankierte Diversin cDNA war zu den oben beschriebenen Plasmiden kompatibel.

Ausgehend von diesem Konstrukt wurden die ApaI- und die PstI-Restriktionsstelle der Maus-Diversin-cDNA zur Klonierung der dargestellten Diversin-Deletionskonstrukte genutzt. Das im 2-Hybrid-System aus der cDNA-Bank isolierte Diversin-Fragment konnte über die NotI-Stellen des pVP16 direkt in den pcDNA-FLAG/pcDNA-HA kloniert werden. Die so generierten Konstrukte kodieren für folgende Aminosäuren: (a) 1-712; (b) 1-544; (c) 1-287; (d) 287-712; (e) 287-544; (f) 583-712.

Die cDNA von Zebrafisch-Diversin wurde ausgehend von dem durch das Ressourcenzentrum-Berlin zur Verfügung gestellten ESTs amplifiziert und konnte über die in den verwendeten

Primern enthaltenen Not-I-Stellen in die beschriebenen Vektoren kloniert werden (5'Primer: AGT CTC CCC GCG GCC GCT GAG CCA G; 3'Primer: AGT CTT TCG CGG CCG CTT TGT CTA T).

Die CKIe/Diversin-Fusionskonstrukte bestehen aus den Aminosäuren 1 bis 301 humaner CKIe und den C-terminalen Aminosäuren 583-712 des murinen bzw. 595-729 des Zebrafisch-Diversins.

Hefe-2-Hybrid-Screen

Die Transformation von *Saccharomyces cerevisiae* L40 [MATa, his3, trp-901, leu2-3,112, ade2, LYS2::(lexAop)⁴-HIS3, URA3::(lexAop)⁸, lacZ, gal4, gal80] erfolgte nach der Lithiumacetat-Methode (Ito et al., 1983). L40-Hefen wurden über Nacht in 25 ml YPD Medium [20 g/l Pepton; 10 g/l Hefeextrakt (Difco); 2 % Glucose] kultiviert. Am nächsten Morgen wurde die Kultur in einem 1 l Erlenmeyer-Kolben in 150 ml YPD auf eine OD₆₀₀ von 0,2 verdünnt. Nach Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase (OD₆₀₀=0,5-0,6) wurden die Hefen bei 1000xg pelletiert, einmal mit TE (0,1M Tris-HCl; 10mM EDTA, pH 7.5) gewaschen und in 1,5 ml 0,1M LiAc/1xTE resuspendiert. Je 50 µl der Zellsuspension wurden mit 200 ng der jeweiligen Hefeexpressionsvektoren („Bait“ und „Prey“), 50 µg Lachsspermien-Träger-DNA und 300µl 0,1M LiAc/40% PEG₃₈₅₀/1xTE vermischt und 30 min bei 30°C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden 35µl DMSO zugegeben, die Transformationsansätze 15 min bei 42°C inkubiert, kurz auf Eis abgekühlt und die Hefen pelletiert. Das Pellet wurde in TE resuspendiert und die Hefen jeweils auf Selektionsmedium [-TL (ohne Tryptophan und Leucin) und -THULL (ohne Tryptophan, Histidin, Uracil, Leucin und Lysin)] plattiert.

Im Hefe-2-Hybrid-Screen wurden die mit dem pBTM-Conductin „bait“-Vektor transformierten L40-Hefen in 5ml synthetischem Hefe-Selektionsmedium ohne Tryptophan (-T) kultiviert. Das Selektionsmedium enthielt 6,7g/l Yeast Nitrogen Base (Difco), 2% Glucose sowie folgende Aminosäuremischung (pH 5,8): 20mg/l Adenin-Hemisulfat, Arginin, Histidin, Methionin, Tryptophan, Uracil; 30mg/l Isoleucin, Lysin, Tyrosin; 50mg/l Phenylalanin; 100mg/l Leucin; 150mg/l Valin; 200mg/l Threonin. Die Kultur wurde in 200ml -T Medium verdünnt und bei 30°C bis zum Erreichen einer OD₆₀₀>1 inkubiert. Je 500 ml YPD wurden in zwei 2 l Erlenmeyer Kolben mit der Hefekultur auf eine OD₆₀₀ zwischen 0,2 und 0,4 eingestellt und für ca. 4 h bis zum Erreichen einer OD von 0,5-0,6 inkubiert. Die Hefen wurden dann pelletiert, in 50 ml 0,1M LiAc/0,5xTE gewaschen, erneut pelletiert und in 20 ml 0,1M LiAc/0,5xTE resuspendiert. Nach 5 min Inkubation bei RT wurden 10mg Träger-DNA

und 200-400µg der cDNA-Bank zugegeben, gemischt und mit 140ml 0,1M LiAc/40% PEG₃₈₅₀/1xTE versetzt. Nach 30 min Inkubation (Drehrad, RT) wurden die Hefen in einen 2 l Erlenmeyer-Kolben transferiert, mit 17,6 ml DMSO versetzt, im Wasserbad 15 min bei 42°C hitzegeschockt und in Eiswasser abgekühlt. Die Hefen wurden dann in 500 ml TE gewaschen, in 1 l YPD resuspendiert und für eine Stunde bei 30°C geschüttelt. Nach erneutem Waschen in 500 ml TE wurden die Zellen in 1 l -TL-Medium (Selektionsmedium ohne Tryptophan und Leucin) resuspendiert und 8 h bei 30°C geschüttelt. Die Hefen wurden dann pelletiert, zweimal in 50 ml TE gewaschen, in 10 ml TE resuspendiert und auf -THULL-Selektionsmedium plattiert (ca. 250µl pro 150 cm²-Kulturschale) und bei 30°C für 3-5 Tage inkubiert.

Zur Isolierung der Plasmid-DNA aus so erhaltenen Hefekolonien wurden einzelne Hefeklone in 2 ml YPD-Medium resuspendiert und 24 h bei 30°C geschüttelt. Die Flüssigkulturen wurden in Eppendorf-Reaktionsgefäßen pelletiert und nach Zugabe von 200 µl Hefelysepuffer (2% Triton X-100; 1% SDS; 100mM NaCl; 10mM Tris-HCl, pH 8; 1mM EDTA), 200µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) und 0,3g Säure-behandelter Glasperlen durch zwei-minütiges kräftiges Schütteln lysiert. Nach Zentrifugation (10.000xg, 5 min) wurde die DNA aus dem Überstand durch Präzipitation mit 1/10 Vol. 3M NaAc und 2,5 Vol. Ethanol isoliert. Das Pellet wurde dann mit 70% Ethanol gewaschen und in Wasser aufgenommen. Zur Isolierung der Bibliothek-Plasmide wurde die isolierte Hefe-DNA in elektrokompetente, Leucin-auxotrophe HB101-Bakterien transformiert. Die Bakterien wurden für zwei Tage auf M9-Agarplatten ohne Leucin selektiert [6 g/l Na₂HPO₄; 3 g/l KH₂PO₄; 1 g/l NH₄Cl; 0,5 g/l NaCl; 1x Aminosäuremischung ohne Leucin (-L); 2% Glucose; 50mg/ml Ampicilin; 40µg/ml Prolin; 1mM Thiamin; 1,5% Agar] und die Plasmid-DNA aus LB-Flüssigkulturen dieser Bakterien nach Standardmethoden isoliert.

Zellkultur und Transfektion

HEK293- (eine humane, embryonale Nierenepithelzelllinie, transformiert mit Adenovirus 5; ATCC-Nr. CRL 1573) und Neuro2A-Zellen (eine murine Neuroblastomzelllinie; ATCC-Nr. CCL 131) wurden in Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM) mit 10% fötalem Kälberserum (Sigma) bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchte kultiviert und transfiziert. Im Abstand von zwei Tagen wurden die Zellen durch fünf-minütige Trypsinbehandlung (0,5mM EDTA; 2% Trypsin, Merck, in PBS) abgelöst und 1:5 verdünnt. Zum Einfrieren wurden die Zellen für 5 min bei 300x g sedimentiert, in fötalem Kälberserum mit 10% DMSO resuspendiert, bei -80°C langsam eingefroren und am nächsten Tag in flüssigen Stickstoff

überführt. Die Transfektion von HEK293- und Neuro2A-Zellen wurde nach der Calciumphosphat-Kopräzipitationsmethode durchgeführt. Eine Mischung aus 10-20µg Plasmid-DNA in 450µl Wasser und 50µl 2,5M CaCl₂ wurde tropfenweise zu 500µl 2× HBS Puffer (280mM NaCl; 10mM KCl; 1,5mM Na₂HPO₄·2H₂O; 50mM HEPES; pH 7,05) gegeben und durch gleichzeitiges Schütteln vermischt. Die Zellen wurden 6-18 h mit dem Präzipitat in Zellkulturmedium inkubiert, einmal mit saurem Medium gewaschen und anschließend für weitere 24 h kultiviert.

Immunpräzipitation und Immunoblot

Zur Präparation der Zelllysate wurden die Zellen zweimal mit kaltem PBS gewaschen und in Protein-Lysepuffer (1 ml/10 cm Schale) mit Protease- und Phosphataseinhibitoren (150mM NaCl; 1mM EDTA; 50mM TRIS-HCl, pH 7,5; 1% NP-40; 1mM PMSF) aufgenommen. Die Suspension wurde für 5 min auf Eis inkubiert und 10 min bei 10.000× g und 4°C zentrifugiert. 50 µl des Zelllysats wurden mit gleichem Volumen reduzierendem Dissoziationspuffer (0,3M Tris-HCl, pH 6,8; 6% SDS; 12mM EDTA; 6% β-Mercaptoethanol; 30% Glycerin; 0,03% Bromphenolblau) versetzt und für 5 Minuten bei 95°C denaturiert.

Zur Immunpräzipitation wurden die Zelllysate mit 1-2µg des entsprechenden Antikörpers versetzt und mindestens 2 h bei 4°C rotiert. Nach Zugabe von 30µl 50%iger Protein A-Sepharose (PAS CL-4B, Pharmacia) in PBS wurden die Lösungen erneut für 1 h rotiert, 6× in Protein-Lysepuffer gewaschen, die Immunkomplexe bei 10.000× g sedimentiert und in 50µl reduzierendem Dissoziationspuffer für 5 Minuten bei 95°C erhitzt.

Die Trennung der Proteingemische erfolgte nach Laemmli (Laemmli, 1970) in denaturierenden Polyacrylamidgelen mit 5%igem Sammelgel (4% Acrylamid/Bisacrylamid 29:1; 125mM Tris-HCl, pH 6,8; 0,1% SDS; 0,1% Ammoniumpersulfat; 0,1% TEMED) und 8-12 %igem Trenngel (8-12% Acrylamid/Bisacrylamid 29:1; 300mM Tris-HCl pH 8,8; 0,1% SDS; 0,1% APS; 0,1% TEMED). Die Elektrophorese wurde bei 30 mA pro Gel in Laemmli-Elektrophoresepuffer (2,5mM Tris-HCl pH 8,3; 19,2mM Glycin; 0,2% SDS) durchgeführt. Transfer der Proteine auf PVDF-Membran (Millipore) erfolgte in Elektrotransfer-Apparaturen (Biorad) für 1,5 h bei 0,5 A und 4°C. Dazu wurden die Membranen kurz in Methanol gewaschen, Gele und Membranen in Transferpuffer equilibriert, luftblasenfrei übereinander gelegt und zwischen die Elektroden gebracht. Die Membranen wurden dann in PBT (PBS/0,1% Tween) gewaschen, 2 h in 5% Trockenmilch in PBT blockiert und für 3 h mit dem entsprechenden primären Antikörper inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in PBT wurde die Membran für 1 h mit dem Peroxidase-gekoppelten sekundären Antikörper in PBT/5%

Trockenmilch inkubiert, 5× in PBT gewaschen und die Immunkomplexe mittels Chemolumineszenzreaktion (ECL-Detection-Kit, Amersham) detektiert.

Folgende Antikörper wurden zur Immundetektion oder -präzipitation eingesetzt: anti-FLAG (Kodak), anti-HA (12CA5 Boehringer Mannheim), anti-β-Catenin, anti-GSK3β anti-CKIε (Transduction-Laboratories), anti-Diversin (von Eurogentec für uns hergestellt; siehe unten), Peroxidase-gekoppelter anti-His-Antikörper (Sigma), Peroxidase-gekoppelter anti-Maus-Antikörper und Peroxidase-gekoppelter anti-Kaninchen-Antikörper (Jackson ImmunoResearch).

Herstellung und Aufreinigung eines Diversin Antiserums

Die Herstellung eines Diversin-spezifischen Antiserums erfolgte durch Immunisierung mit bakteriell hergestelltem, rekombinantem Protein (Aminosäuren 1-300) in Kaninchen (Eurogentec, Seraing Belgien). Zwei Kaninchen wurden nach dem folgenden Zeitplan immunisiert: Tag 0, Abnahme des Präimmuserums und erste Immunisierung; Tag 14, zweite Immunisierung; Tag 21, dritte Immunisierung; Tag 38, Abnahme der ersten Blutprobe (2ml); Tag 56, vierte Immunisierung; Tag 66, zweite Blutprobe (20ml); Tag 80, Ausbluten der Kaninchen.

Herstellung von rekombinantem Diversin-Protein

Zur Herstellung von rekombinantem Diversin wurde ein NotI-ApaI-Fragment der Diversin-cDNA, das die Aminosäuren 1-300 kodiert, in den bakteriellen Expressionsvektor pQE32 (Qiagen) inseriert. Das Konstrukt wurde in XL1-Bakterien transformiert und die Bakterien in 20 ml LB Medium (10 g/l Baktotrypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl) über Nacht bei 30°C geschüttelt. Anschließend wurden die Bakterien in 1 l LB, 100 µg/ml Ampicillin überführt und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4-0,6 kultiviert. Nach vierstündiger Induktion mit 1 mM IPTG wurden die Bakterien durch Zentrifugation (20 min, 4.000× g, 4°C) geerntet und bei -70°C eingefroren. Vor und nach der IPTG-Induktion entnommene Aliquots wurden durch Comassie-Färbung nach SDS-PAGE auf Induktion des gewünschten Proteins getestet. Die Bakterienpellets wurden auf Eis aufgetaut, in 3 ml Lysepuffer pro g Naßgewicht (50 mM NaH₂PO₄, pH 8; 300 mM NaCl; 10 mM Imidazol) resuspendiert und nach Zugabe von Lysozym (20µg/ml) 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Bakterien 6× 10 Sekunden bei 200-300 W Ultraschall behandelt und die Zelltrümmer durch Zentrifugation (10.000× g, 60 min, 4°C) pelletiert. Das Diversin-Protein war im löslichen Überstand enthalten. Je 4 ml des mikrofiltrierten Überstandes wurden mit 1 ml 50%iger Nickel-Agarose

für 1-2 h bei 4 °C unter Rühren inkubiert. Die Agarose wurde dann auf eine Säule geladen und mit 2x4 ml Waschpuffer (50mM NaH₂PO₄, pH 8; 300mM NaCl; 20mM Imidazol) gewaschen. Das rekombinante Protein wurde mit 5x 1 ml Elutionspuffer (50mM NaH₂PO₄, pH 8; 300mM NaCl; 250mM Imidazol) eluiert und die Proteinmenge der einzelnen Fraktionen im SDS-PAGE bestimmt.

Affinitätsreinigung des Diversin Antiserums

Die Affinitätsreinigung des Diversin Antiserums erfolgte über Cyanobromid-Sepharose (CN-Br-Sepharose 4B, Pharmacia). 140 mg CN-Br-Sepharose wurden in 14 ml 1mM HCl bei RT auf dem Drehrad inkubiert, anschließend sedimentiert und erneut für 7 min in 1mM HCl drehend inkubiert. Anschließend wurde die Sepharose in PBS gewaschen und 2h bei RT rotierend mit 3mg rekombinantem Diversin-Protein inkubiert. Die so mit Protein gekoppelte Sepharose wurde dann abzentrifugiert und in fünffachem Volumen Kopplungspuffer (0,1M NaHCO₃; 0,5M NaCl) gewaschen. Freie Bindungsstellen wurden durch zweistündige Inkubation mit 10ml 0,1M Tris-HCl, pH 8 blockiert. Anschließend wurde dreimal alternierend in 5ml Lösung 1 (0,1M NaAc; 0,5M NaCl, pH 4,6) und 5ml Lösung 2 (0,1M Tris-HCl; 0,5M NaCl, pH 8,2) inkubiert, und schließlich mit 200 ml PBS gewaschen. 2 ml des Kaninchenserum wurden 1:10 in PBS verdünnt, mikrofiltriert, und anschließend über Nacht bei 4°C mit der Sepharose inkubiert. Diese wurden dann auf eine Säule geladen und mit 20 ml PBS gewaschen. Spezifisch gebundene Antikörper wurden durch Zugabe von 6x 0,9 ml 0,1 M Glycin, pH 2,5 eluiert, wobei die aufgefangenen Antikörperfraktionen sofort in 100µl 2M Tris-HCl neutralisiert wurden. Die Protein-gekoppelte Sepharose konnte mittels der oben beschriebenen Waschschriffe regeneriert, und so mehrfach wiederverwendet werden.

Lef-1/Tcf- und JNK- Reporter-Assays

Zur Bestimmung der Lef-1/Tcf-abhängigen transkriptionellen Aktivität wurden 293-Zellen über Nacht in 6-Loch-Zellkulturschalen transfiziert und nach Entfernen der DNA-Präzipitate mindestens weitere 6 h inkubiert. Die Zellen wurden in 1 ml PBS geerntet, 10 sec bei 10.000xg pelletiert und in 100µl Triton-Lyse-Puffer (25mM Glycylglycin, 15mM MgSO₄, 4mM EGTA, 1% Triton, 1mM DTT) resuspendiert. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 10.000xg und 4°C wurden Aliquots der gewonnenen Zelllysate im Luziferase-bzw. β-Galaktosidase-Assay eingesetzt. Zur Bestimmung der Luziferase-Aktivität wurden 10 µl des Zelllysats mit 200µl Luziferase-Puffer (25mM Glycylglycin; 2mM ATP, pH 7,5; 0,01M

MgSO₄) versetzt und im Luminometer nach Injektion von 80µl 0,2mM Luciferin/20 mM Glycylglycin-Lösung für 10 Sekunden gemessen. Für die β-Galaktosidase-Aktivitätsmessung wurden 25µl Zellysat mit 75 µl Reaktionspuffer [34 µl ONPG-Lösung (4mg/ml) und 41 µl Z-Puffer (60mM Na₂HPO₄; 40mM NaH₂PO₄; 1mM MgSO₄; 0,3% β-Mercaptoethanol)] versetzt und bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde nach Bildung eines gelben Farbumschlags durch Zugabe von 100µl 0,5M Na₂CO₃-Lösung abgestoppt und die optische Dichte bei 420nm im ELISA-Reader (Biorad) gemessen. Zur Ermittlung der relativen Luziferase-Aktivität wurden die erhaltenen Messwerte zu den entsprechenden β-Galaktosidase-Aktivitäten ins Verhältnis gesetzt.

Die Aktivierung von JNK wurde im Reporter-Assay mit dem Path-Detect-System (Statagene) nachgewiesen. 293 Zellen wurden über Nacht in serumfreiem Medium mit insgesamt 5µg der jeweils angegebenen Expressionskonstrukte (Dishevelled, Diversin, MEKK) und 0,2µg CMV-JNK, 0,04 µg pFA-JNK, 0,4µg pFRLuc und 0,4µg pSV40lacZ transfiziert. Zellyse und Bestimmung der Luziferase-bzw. β-Galaktosidase erfolgte wie in den Lef-1/Tcf-abhängigen Reporterassays.

***Xenopus* Injektionen**

Die Herstellung synthetischer RNA zur Injektion erfolgte mit den mMessageMachine-Kits (SP6, T7 oder T3) der Firma Ambion nach Herstellerangaben. *Xenopus laevis*-Weibchen wurden durch Injektion von 150U Gonadotropin superovuliert und das Gelege etwa 8 Stunden später geerntet. Die Oozyten wurden manuell befruchtet. Dazu wurde einem Männchen der gesamte Hoden entfernt, homogenisiert und zu den Oozyten gegeben. Erfolgreiche Befruchtung wurde anhand der Ausrichtung der Oozyten verifiziert. Durch Behandlung mit einer 3%igen Cystein-Lösung (3% in H₂O) wurde die Gallerthülle der befruchteten Oozyten entfernt. Die befruchteten Oozyten wurden in Oozyten-Medium (5mM HEPES pH7,6, 96mM NaCl, 2mM KCl, 1mM MgCl₂, 1,8mM CaCl₂, 2,5mM Na-Pyruvat, je 10% Penicillin & Strptomycin) bei 18°C bis zu Vierzellern entwickelt. Die RNA wurde mit DEPC-behandeltem Wasser auf die gewünschte Konzentration verdünnt. Mit einer ausgezogenen Glaskapillare wurden etwa 30 Nanoliter in die ventralen Blastomeren injiziert (microINJECTOR™, Tritech Research, Inc.). Die injizierten Embryonen wurden bei 18°C in Oozyten-Medium über Nacht kultiviert und die Phänotypen visuell bestimmt und ausgezählt.

Zebrafisch Injektionen

Zebrafisch-Embryonen wurden im 1-4-Zellstadium mit einer ausgezogenen Glaskapillare injiziert. Die RNA (zur Herstellung siehe im Kapitel Xenopus-Embryonen) wurde mit DEPC-behandeltem Wasser und die Morpholinos in 1x Danieau (5,8mM NaCl, 0,7mM KCl, 0,4mM MgSO₄, 0,6mM Ca(NO₃)₂, 5mM HEPES pH 7,6) auf die gewünschte Konzentration verdünnt. 0,1-0,4 ng mRNA wurden in den Dotter von „Top-Longfin“-Embryonen bzw. 1-6ng der Antisense Morpholinos in AB-Embryonen injiziert (Hammerschmidt et al., 1996; Nasevicius & Ekker, 2000). Die injizierten Embryonen wurden bei 28°C in 0,3x Danieau-Medium über Nacht inkubiert und die Phänotypen nach 24 h ausgezählt. Die Antisense-Morpholinos wurden von Gene Tools, LLC anhand der von uns entdeckten Nukleotid-Sequenzen definiert und synthetisiert:

- Diversin-5'UTR, 5'-CAGCCCTCATGTCCTGAAGAGAATC-3';
- Diversin- ATG, 5'-CATCGTGCTGGCTTATGAATCAGGG-3';
- Diversin-5'UTR-Kontrolle, 5'-CAGCGCTCAAGTCCTCAAGACAATC-3'.

In situ-Hybridisierung

Der Nachweis der Expression von mRNA in Zebrafisch-Embryonen erfolgte nach einer von C. und B. Thisse beschriebenen Methode, die teilweise modifiziert wurde (Thisse et al., 1993). Alle Lösungen wurden mit DEPC-behandeltem Wasser angesetzt. Die verwendeten Instrumente wurden mit Methanol gesäubert bzw. 1 h autoklaviert.

Vorbereitung der Embryonen: Embryonen verschiedener Entwicklungsstadien wurden über Nacht in PBS/4 % fixiert, und danach in PBT (PBS/0,1% Tween) manuell dechorioniert. Die Embryonen wurden 2x 5 min in PBT gewaschen und in 100% Methanol dehydriert. Die dehydrierten Embryonen konnten bei -20°C über mehrere Monate gelagert werden.

Alle zur *In situ*-Hybridisierung verwendeten cDNAs wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe um M. Hammerschmidt (Freiburg) zur Verfügung gestellt. Digoxigenin (DIG)-markierte RNA-Sonden wurden mit dem DIG-RNA-Markierungskit (Boehringer) hergestellt. Zur Synthese wurde 1µg linearisierte Matrizen-DNA eingesetzt. Die RNA-Synthese in „antisense“-Richtung erfolgte mit SP6-, T7- oder T3-RNA-Polymerase für eine Stunde bei 37°C. Zur Kontrolle wurden Transkripte in „sense“-Richtung verwendet. Nicht eingebaute Nukleotide wurden mittels Säulenchromatographie (RNeasy, Qiagen) abgetrennt.

Die Embryonen wurden über eine absteigende Methanolreihe rehydriert, 3x 10 min in PBT auf Eis gewaschen und je nach Alter für 10-30 min in 10µg/ml Proteinase K bei Raumtemperatur verdaut. Anschließend wurden sie für 20 min in PBS/4% PFA fixiert, 5x

5min in PBT und 1x in Prähybridisierungslösung (50% deionisiertes Formamid; 5xSSC, pH 4,5; 1mM Zitronensäure pH 6,0; 50µg/ml Heparin, 50µg/ml Hefe-tRNA; 0,1% Tween-20) gewaschen und bei 70°C im Schüttelwasserbad inkubiert. Nach 2-5 Stunden wurden 100-200ng der entsprechenden Sonde zugegeben und über Nacht bei 70°C hybridisiert. Die Embryonen wurden dann jeweils 15 min mit 100% Prähybridisierungslösung (Prähyb.), 75% Prähyb./25% 2xSSC, 50% Prähyb./50% 2xSSC, 25% Prähyb./75% 2xSSC und schliesslich in 2xSSC bei 70°C gewaschen. Danach wurde 2 x 30 min in 0,2 x SSC bei RT gewaschen, die Embryonen über eine absteigende SSC-Reihe in PBT überführt (jeweils 10 min bei RT in 75% 0,2 SSC/25% PBT; 50% 0,2 SSC/50% PBT; 25% 0,2 SSC/75% PBT) und anschließend für mehrere Stunden in PBT/2% und BSA (2mg/ml) blockiert. Der Anti-DIG Antikörper (Fab-Fragment aus dem Schaf, Boehringer) wurde in einer 1:1000 Verdünnung in PBT/2 % Schafserum und BSA mit vorher fixierten Embryonen (etwa 500 Embryonen für 10 ml Antikörper) für mehrere Stunden bei RT prä-adsorbiert und in einer 1:5000 Verdünnung mit den Embryonen über Nacht bei 4°C unter leichter Bewegung inkubiert. Am nächsten Tag wurde ungebundener Antikörper durch Waschen in PBT entfernt (6x 15 min) und die Embryonen in NBT/BCIP (Boehringer) in alkalischem-Phosphatase-Puffer (100mM NaCl; 100mM Tris, pH 9,5; 50mM MgCl₂; 0,1% Tween-20) im Dunkeln für 1-6 h gefärbt. Die Färbung wurde durch dreimaliges Waschen in PBT gestoppt und die Embryonen für 30 min in PBS/4 % PFA nachfixiert. Zur Lagerung wurden die Embryonen mit Methanol entwässert und Benzylalkohol/Benzylbenzoat (1:2) überführt. Die Analyse der Hybridisierungen erfolgte unter einem Dissektionsmikroskop (Leica), zur Dokumentation wurden die Embryonen in Methylzellulose auf Objektträgern fotografiert.

Abkürzungen

×g	×Gravitationskonstante
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaar
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme linked immuno sorbent assay
EST	Expressed sequence tag
FCS	Fetal calf serum
HBS	HEPES-buffered saline
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2- Ethansulfonsäure
IP	Immunpräzipitation
JNK	c-jun N-terminale Kinase
LB	Luria Bertani
LiAc	Lithiumacetat
luc	Luziferase
OD	Optische Dichte
ONPG	o-Nitrophenyl-β-D-Galactopyranosid
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PEG	Polyethylenglykol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkription
SV40	Simian virus 40
Tris	Tri-(hydroxymethyl)-aminoethan
Vol	Volumen
w/v	Masse pro Volumen