
5 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. und Ausubel et al. 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 cDNA-Bibliotheken sowie Northern-Hybridisierungen. Nach Angaben der Hersteller wurden durchgeführt: Die Plasmid-DNA-Präparationen in quantitativem Maßstab (Qiagen), die Elution von DNA aus Agarosegelen (Jetsorb, Genomed oder QIAquick®, Qiagen), 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) oder MWG (Ebersberg) bezogen. Die verwendeten Geräte waren: Luminometer (Lumat LB9507, Berthold), Microplate Reader Genios (Tecan), Bio-Imaging-Analyzer (Fujix BAS 2000, Fuji), DNA-Sequencer 4000L (MWG-Biotech), Minifuge RF (Heraeus Sepatech), Centrifuge 5402 (Eppendorf), Zentrifuge Variofuge 3.0R (Heraeus), Zentrifuge J2-21 (Beckman) mit Rotoren JA 10 und JA 12.

Bakterien- und Hefestämme, Zelllinien und Plasmide

In dieser Arbeit verwendete ich zur Amplifikation von Plasmid-DNA in Bakterien den konjugationsdefizienten K12-Sicherheitsstamm XL1-Blue von E.coli, der über folgende Spezifikationen verfügte: *F'*, *Tn10 (tetr)*, *proAB+*, *lacIq*, *(lacZ)M15*, *supE44*, *hsdR17*, *recA1*, *endA1*, *relA1*, *gyrA96*.

Im Hefe-2-Hybrid-Screen wurde der Hefestamm *Saccharomyces cerevisiae* AH106 verwendet, der nachstehende Modifikationen besaß: MATa, *trp1-901*, *leu2-3, 112*, *ura3-52*, *his3-200*, *gal4Δ*, *gal80Δ*, *LYS2::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3*, *MEL1 GAL2_{UAS}-GAL2_{TATA}-ADE2*, *URA3::MEL1_{UAS}-MEL1_{TATA}-lacZ* (James et al., 1996).

Die Zelllinie HEK-293 (Human Embryonic Kidney) habe ich für Zellkulturexperimente verwendet. HEK-293 ist eine humane Nierenepithelzelllinie, die mit dem Adenovirus 5 transformiert ist. Außerdem verwendete ich humane SW480-Zellen. Dabei handelt es sich um eine Kolonkarzinomzelllinie, die charakteristischerweise endothel-ähnliche, adherente Zellen bildet.

Im Hefe-2-Hybrid-Screen wurden pGAD, pGADT7-T, pGBKT7-53 und pGBKT7-Lam als Kontrollvektoren verwendet. Der Vektor pGBKT7 wurde zur Expression des Baits, während der Vektor pACTII zur Expression der cDNA-Bibliotheksklone in Hefen verwendet wurde. Die beschriebenen Hefe-Screen-Vektoren wurden von Clontech bezogen und sind im Handbuch zum MATCHMAKER-GAL4-Two-Hybrid-System-3-Kit (Clontech) im Detail beschrieben.

Zur Expression von Proteinen in Säugetierzellen oder zur Herstellung von In-Vitro-transkribierter mRNA für Zebrafisch-Injektionen verwendete ich spezielle Vektoren wie pcDNA-FLAG, pcDNA-HA, pCS2+ und den Vektor pSP64-FLAG. Bei dem pcDNA-FLAG bzw. pcDNA-HA-Vektor handelt es sich um 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 kultivierten Zellen verwendet. pSP64-FLAG ist ein durch Insertion eines FLAG-Epitopes modifizierter pSP64-Vektor (Krieg and Melton, 1984) und wurde zur In-Vitro-mRNA-Synthese genutzt. Der Vektor pCS2+ (Turner and Weintraub, 1994) ist ein Expressionsvektor, der zur Expression von Proteinen in Zellkultur und zur In-Vitro-mRNA-Synthese verwendet wurde.

Hefe-2-Hybrid-Screen

Die Hefe-2-Hybrid Technik wurde 1989 als ein System vorgestellt, das die Identifikation von Protein-Protein-Interaktionen in *Saccharomyces cerevisiae* erlaubt (Fields and Song, 1989). Das Prinzip dieses Systems beruht auf der Interaktion der DNA-Bindedomäne und der Aktivierungsdomäne des Hefeproteins GAL4, das als Transkriptionsaktivator für die Expression von Genen des enzymatischen

Galactoseabbaus fungiert. Werden die Domänen getrennt, so verliert das Protein seine Aktivität. Fusioniert man die getrennten Domänen mit Proteinen, die miteinander interagieren, so kommt es dadurch zur Assoziation der GAL4-DNA-Binde- und der Aktivierungsdomäne. Dies ist ausreichend für die Wiedererlangung der Funktionalität des GAL4s als transkriptioneller Aktivator. Diese Eigenschaft wird benutzt, um neue Interaktionspartner schon bekannter Proteine unter Verwendung bestimmter Reporterplasmide zu identifizieren.

Zur Klonierung der Bait-Vektoren für den Hefe-2-Hybrid-Screen wurden die Ankyrin-Repeat-Domäne und die Mittel-Domäne von Diversin durch Restriktionsverdau mit 1. NcoI und 2. PmeI aus pcDNA-FLAG geschnitten. Die Diversinfragmente wurden dann mit dem zuvor mit 1. NcoI und 2. SmaI linearisierten Vektor pGBKT7 ligiert. Beide Konstrukte wurden vor dem Screen auf intrinsische Aktivität überprüft. Dazu wurden die einzelnen Bait-Vektoren, die ein Fusionsprotein bestehend aus dem jeweiligen Diversinfragment und der GAL4-DNA-Bindedomäne bilden, zusammen mit den Vektoren pGAD oder pGADT7-T, die für die GAL4-Aktivierungsdomäne codieren, in Hefe (Stamm AH109) auf –TLAH Selektionsplatten exprimiert. Als Positiv-Kontrolle wurden pGBKT7-p53 und pGADT7-T in Hefe exprimiert. Weder die Ankyrin-Repeats, (pGBKT7-Div-ANK) noch die Mittel-Domäne (pGBKT7-Div-MD) von Diversin zeigten intrinsische Aktivität bei Ko-Transformation von AH109-Hefen mit den Kontroll-Vektoren.

In dieser Arbeit erfolgte die Transformation von *Saccharomyces cerevisiae* AH106 nach der Lithiumacetat-Methode (Ito et al., 1983). Es wurde eine Kolonie des Hefestammes AH109 verwendet, der zuvor mit pGBKT7-Div-ANK transformiert wurde. Die Inkubation dieser Kolonie in 50ml -T-Medium erfolgte über Nacht bei 30°C im Schüttler bei 250 rpm bis eine stationäre Phase mit einer OD600 zwischen 1 und 2 erreicht wurde. Die Über-Nacht-Kultur wurde für zehn Minuten bei 20°C und 4000 rpm zentrifugiert. Im Anschluss an die Resuspension des Pellets mit 20ml YPDA-Medium (10g/l Hefeextrakt, 20g/l Hefepepton, 40mg/l Adeninhemisulfat, 2% (w/v) Glukose) wurde ein Liter YPDA-Medium mit der Hefenresuspension bis zur OD600 von 0,1 bis 0,2 angeimpft. Nach einer dreistündigen Inkubation bei 30°C im Schüttler bei 250 rpm erreichten die Hefen eine OD600 von ca. 0,5. Im Anschluss an eine 10-minütige Zentrifugation bei 20°C und 4000 rpm wurde das Pellet in 500ml sterilem Wasser resuspendiert und erneut bei 20°C und 1000 rpm für fünf Minuten zentrifugiert. In ca. 8ml frisch vorbereiteter 1xTE/1xLiAc-Lösung erfolgte die Resuspension des Pellets. Die Transformation der nun kompetenten Hefen mit der pACTII-humanen

Gehirnbibliothek (Clontech, HY4004AH) erfolgte mit 400µg cDNA und 20mg Lachsspermien-Träger-DNA. Die Träger-DNA wurde vor dem Mischen mit der cDNA für fünf Minuten bei 95°C denaturiert und im Verhältnis 1 zu 1 mit eiskalter 2x TE/2x LiAc-Lösung vermischt. Das DNA-Gemisch wurde gevortext und in 60ml 40%-iger PEG/LiAc/TE-Lösung gegeben. Es folgte eine 10-minütige Inkubation bei 30°C im Schüttler bei 250 rpm. Nach Zugabe und Mischen mit DMSO (DMSO Zugabe ca. 1/10 des Gesamtvolumens), folgte ein Hitzeschock für 15 Minuten bei 42°C mit anschließendem Kälteschock für ein bis zwei Minuten bei 4°C. Danach wurden die transformierten Hefen fünf Minuten bei 20°C und 1000 rpm zentrifugiert und das Pellet in 10ml 1x TE-Lösung resuspendiert. Zur Kontrolle der Transformationseffizienz wurden auf -TL-Selektionsplatten 2µl (1:5000) und 0,2µl (1:50000) des Transformations-Gemisches ausplattiert. Die transformierten Hefen wurden dann auf -TLAH-Selektionsplatten ausgestrichen. Auf diesen Selektionsplatten können nur transformierte Hefe-Klone wachsen, in denen Interaktion zwischen dem Bait (Ankyrin Repeats) und dem unbekanntem Bibliotheks-Gen stattfindet.

Von dieser Platte habe ich Klone selektioniert und deren DNA-Plasmide isoliert. Zur Isolierung der Plasmide habe ich ca. 5ml SD-TL-Medium mit einem Hefeklon angeimpft und für 24 Stunden bei 30°C und 230 rpm kultiviert. Der Ansatz wird danach 1 Minute bei 13000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wird nach Zugabe von 200µl Hefe-Lysepuffer, 200µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) und 0,3g Säure-behandelter Glasperlen durch 2-minütiges Vortexen lysiert. Nach Zentrifugation für 5Min. bei 13000 rpm 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 Bakterien mittels Elektroporation transformiert. Nur Bakterien, die Plasmide der Bibliotheks-Klone aufgenommen hatten, konnten auf LB-Amp-Selektionsplatten wachsen, da der cDNA-Bibliothek-Vektor (pACTII) ein Ampicillin-Resistenzgen trägt, während der Bait-Vektor (pGBKT7) ein Kanamycin-Resistenzgen trägt. Die Klone wurden durch Sequenzierung isolierter Bibliotheks-Plasmide identifiziert und zur Kontrolle echter Interaktion in Hefen mit dem Bait-Vektor oder Kontroll-Vektoren in Hefe retransformiert und auf -TLAH-Selektionsplatten ausgestrichen. Zur Retransformation der Hefen wurden ca. 100ng Bibliotheks-Plasmid und 1µg Bait-Vektor oder Kontroll-Vektor mit 5µl denaturierter Lachsspermien-DNA (10mg/ml) in einem Reaktionsgefäß vorsichtig gemischt. Der DNA-Ansatz wurde nach Zugabe von 150µl kompetenter Hefezellen und 300µl 40-%igem PEG/LiAc/TE 30 Minuten bei 30°C

im Schüttler inkubiert. Nach Zugabe und Mischen mit 35µl DMSO erfolgte die Transformation der Hefen per Hitzeschock (siehe oben).

Die Zusammensetzung der oben nicht näher beschriebenen Medien und Lösungen war für 10xSD-Medium, 6,7g/l Difco Yeast Nitrogen Base w/o amino acids, 2% (w/v) Glucose. -TL-Medium bestand aus 1x SD-Medium, 300mg/l L-Isoleucin, 1500mg/l L-Valin, 200mg/l L-Adeninhemisulfat, 200mg/l L-Arginin, 200mg/l L-Histidin, 300mg/l L-Lysin, 200mg/l L-Methionin, 500mg/l L-Phenylalanin, 2000mg/l L-Threonin, 300mg/l L-Tyrosin, 200mg/l L-Uracil. -TLAH-Medium entsprach -TL-Medium, jedoch ohne Histidin und Adeninhemisulfat. Die zur Transformation von Hefe verwendete 1xTE/1xLiAc-Lösung bestand aus 10mM Tris-HCL, 1 mM EDTA, 100 mM LiAc, pH 7,5. Der TE-Puffer setzte sich aus 10mM Tris-HCl (pH 7,5) und 1mM EDTA zusammen. Für PEG/LiAc-Lösung wurden 40% PEG4000 in TE-Puffer und 100mM LiAc verwendet. Der Hefe-Lysepuffer, den ich zur Extraktion von Plasmid-DNA aus Hefen verwendete bestand aus 2% Triton X-100, 1% SDS, 100mM NaCl, 10mM Tris-HCl (pH 8) und 1mM EDTA.

Bis zur Transformation der AH106-Hefen mit der cDNA-Bibliothek führte Hans-Jörg Schäffer aus unserer Arbeitsgruppe diesen Screen durch. Ich habe die positiven Kolonien selektioniert, sequenziert, retransformiert und den Screen zu Ende geführt.

Zellkultur und Transfektion

HEK293- und SW480-Zellen 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 bis drei Tagen wurden die Zellen durch 5-minütige Trypsinbehandlung (0,5mM EDTA, 2% Trypsin, Merck, in PBS) abgelöst und 1 zu 5 verdünnt. Zum Einfrieren wurden die Zellen für 5 Min. bei 1000 rpm pelletiert, in fötalem Kälberserum mit 10% DMSO resuspendiert, bei -80 °C langsam eingefroren und am nächsten Tag in flüssigen Stickstoff überführt. Die Transfektion von HEK293-Zellen wurde nach der Kalziumphosphat-Kopräzipitationsmethode durchgeführt. Eine Mischung aus 10-20µg Plasmid-DNA in 450µl Wasser und 50µl 2,5M CaCl₂ wurde tropfenweise zu 500µl 2xHBS Puffer (280mM NaCl, 10mM KCl, 1,5mM Na₂HPO₄·2H₂O, 50mM HEPES, pH 7,05) gegeben und durch gleichzeitiges Schütteln vermischt. Die Zellen wurden über Nacht mit dem Präzipitat in Zellkulturmedium inkubiert, einmal mit saurem Medium (pH 5-6) gewaschen und anschließend für

weitere 24 Stunden kultiviert. Für Reporter-Assay-Experimente wurden SW480- oder HEK-293-Zellen mit Lipofectamin PLUS oder Lipofectamin 2000 (Invitrogen Life Tech) nach Protokoll des Herstellers transfiziert.

Bindungsstudien und Reporter-Assays

Der molekulare Mechanismus, durch den Diversin mit Dishevelled den nicht-kanonischen Wnt-Signal-Weg kontrolliert, wurde in Immunpräzipitations-Experimenten und funktionalen Assays charakterisiert. Diverse Deletions-Konstrukte und Punktmutationen von Diversin und Dishevelled wurden dafür verwendet. Alle Diversin-Konstrukte in pcDNA-HA und pcDNA-FLAG wurden mir von Thomas Schwarz-Romond zur Verfügung gestellt (Schwarz-Romond et al., 2002). Die Maus-Dishevelled-Konstrukte Dvl-2-DIX, Dvl-2-PDZ, Dvl-2-DEP und Dvl-2- Δ DEP (alle im Expressionsvektor pCS2+) wurden mir von Xi He (Boston) zur Verfügung gestellt (Habas et al., 2001). Dishevelled-2- Δ DIX wurde generiert, indem ein NotI-Fragment, das die N-terminale DIX-Domäne beinhaltet, aus Vollängen-Dishevelled-2 (in pcDNA-HA) herausgeschnitten wurde. Flankiert war das Fragment von der NotI-Schnittstelle des Vektors und der internen Dishevelled-2-NotI-Schnittstelle, die stromabwärts der DIX-Domäne liegt. Das so trunkierte Dishevelled-2 konnte mittels T4-DNA-Ligase (NEB), unter Beibehaltung des Leserahmens, mit der Vektor-NotI-Schnittstelle religiert werden. Um Dishevelled-2- Δ PDZ zu erhalten, wurde aus Vollängen-Dishevelled-2 die PDZ-Domäne durch Verdau mit den Restriktionsenzymen NotI und ApaLI entfernt. Es wurde aber zunächst Dishevelled-2- Δ DIX (in pcDNA-HA) mit ApaLI gespalten. Der ApaLI-5'-Überhang wurde mittels T4-DNA-Polymerase aufgefüllt und das verbleibende Konstrukt mit NotI verdaut. Hierbei fällt das N-terminale NotI-ApaLI-Fragment heraus. Der NotI-ApaLI-verdaute Vektor wurde dann mit dem NotI-NotI Fragment aus Vollängen-Dishevelled-2 (pcDNA-HA) ligiert. Der 5'-Überhang der NotI-Schnittstelle wurde durch Behandlung mit Mungobohnen-Nuklease (NEB) zur Anpassung des Leserahmens entfernt und danach mit der stumpfen ApaLI Stelle ligiert. Dishevelled-2- Δ DIX und - Δ PDZ wurden mir von Christian Asbrand aus unserem Labor zur Verfügung gestellt. Die Punktmutation K446M habe ich in Vollängen-Dishevelled-2-HA und in Dishevelled-2-DEP durch zielgerichtete Mutagenese (QuickChange, Stratagene) nach Herstellerangaben eingeführt. Folgende Primer wurden dafür verwendet: vorwärts: 5'-GCATGTGGCTCATGATCACCATCCCAAACGC-

3'; revers: 5'-GCGTTTGGGATGGTGATCATGAGCCACATGC-3. Beide Konstrukte habe ich zur Überprüfung sequenziert und dazu folgenden Primer (MWG) verwendet: 5'-TCACATCTGGCTCCTCTCTG-3'. Zur Stimulation von JNK in SW480-Zellen habe ich Wnt5a und Wnt11 aus *Xenopus Leavis* verwendet, die unserem Labor von Christof Niehrs, Heidelberg (XWnt11) und Doris Wedlich, Ulm (XWnt5a) zur Verfügung gestellt wurden. Für sämtliche Immunpräzipitations-Experimente habe ich HEK293-Zellen verwendet. Ich habe ca. $1,5 \times 10^6$ HEK293-Zellen in 10cm-Petrischalen mit den entsprechenden Plasmiden (10-20 μ g) nach der oben beschriebenen Kalziumphosphat-Kopräzipitationsmethode transfiziert. Nach Über-Nacht-Inkubation wurden die Zellen einmal mit saurem DMEM und einmal mit PBS (beides 37°C) gewaschen. Die Zellen wurden dann in der Petrischale in 1mL FLAG-Lysepuffer bei 4°C lysiert. Das Zelllysats wurde dann in 1,5ml Eppendorfgefäße überführt und für 10Min. bei 13000 rpm zentrifugiert. Vom Überstand, der die gelösten Proteine enthielt, wurden 50 μ l als Expressionskontrolle abgenommen, mit 15 μ l 4xLaemmli-Probenpuffer versetzt und 5 Min. auf 95°C erhitzt. Der restliche Überstand wurde für die Immunpräzipitation verwendet. Für die Immunpräzipitation von Proteinen, die mit einem HA-Tag fusioniert waren, wurde ca. 700 μ l des Lysats mit 3 μ g anti-HA-Antikörper (12CA5 Maus, Roche) und 20-30 μ l eines 1:1 Gemisches aus Protein-A und -G Sepharose (Pharmacia) für 2 Stunden bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert. Proteine, die mit einem FLAG-Tag fusioniert waren, wurden mittels 10 μ l anti-FLAG-Beads, versetzt mit 30 μ l Sepharose CL-6B (beides von Sigma, St. Louis), bei 4°C aus dem Lysat immunpräzipitiert. Die Ansätze wurden anschließend für 30 sec. bei 4°C und 1500 rpm zentrifugiert und 3-4 Mal mit 1ml Lysepuffer (4°C) gewaschen, wobei nach jeder Zentrifugation die Überstände scharf abgesaugt wurden. Abschließend wurden die Proben in 40 μ l 2xLaemmli-Probenpuffer aufgenommen und 10 Min. auf 95°C erhitzt. Die Trennung der präzipitierten Proteine erfolgte nach Laemmli in 8-10%-igen denaturierenden Polyacrylamidgelen (Laemmli, 1970). Anschließend wurden die aufgetrennten Proteine auf PVDF-Membranen (Millipore) mittels Tankblotverfahren transferiert. Die Membranen wurden danach 10 Min. in PBS gewaschen und in 5% Magermilch/PBS für eine 1 Stunde bei Raumtemperatur zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen inkubiert. Die verwendeten Antikörper wurden entweder über Nacht bei 4°C oder bei Raumtemperatur für eine Stunde in 5% Magermilch/PBS appliziert. Danach wurden die Membranen 4 Mal für 10-20 Minuten in PBS bei Raumtemperatur gewaschen. War der Primär-Antikörper nicht an Peroxidase gekoppelt, so folgte nach den letzten Waschschritten die erneute Inkubation in 5% Magermilch/PBS mit Peroxidase-

konjugiertem Sekundär-Antikörpern und anschließendem Waschen. Die Benetzung der Membranen mit ECL-Reagenz (Amersham) für 1 Min. mit anschließendem Belichten von Röntgenfilmen (Kodak) erlaubt eine Detektion der Immunkomplexe. Für Immunpräzipitations-Experimente und Immunoblots wurden folgende Antikörper in den angegebenen Verdünnungen eingesetzt: Peroxidase-konjugierte Antikörper waren Maus- α -HA (3F10, Roche; 1 : 5000), Maus- α -FLAG (A-8592, Sigma; 1 : 1000) und Esel- α -Ziege (Jackson Immunoresearch; 1 : 2500). Außerdem wurde Ziege- α -c-Myc-Antikörper (A14G; Santa Cruz Biotechnology; 1 : 2000) eingesetzt. Der Laemmli-Probenpuffer bestand aus 60mM Tris-HCl, 2% SDS, 10% Glycerol, 100mM DTT mit 0,001% Bromphenolblau und der FLAG-Lysepuffer aus 50mM Tris-HCl (pH 7,4), 150mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100 + Proteaseninhibitor-Cocktail (Roche). Die Zusammensetzung von weiteren, nicht im Detail beschriebenen Standardpuffern, Lösungen und Gelen war nach Ausubel et al. (1987).

Die Aktivierung von JNK habe ich im Reporter-Assay mit dem Path-Detect-System (Statogene) nachgewiesen. Eine Gesamtmenge von $0,75 \times 10^5$ HEK293- oder $1,0-1,5 \times 10^5$ SW480-Zellen (Anzahl der Zellen pro Vertiefung einer 12er-Zellkulturplatte) wurde mit den angegebenen Expressionskonstrukten und 50ng CMV-JNK, 10ng pFA-c-Jun, 0,2 μ g pFRLuc und 0,3 μ g pSV40lacZ transfiziert. Um den Effekt von Diversin und Dishevelled in SW480-Zellen auf Wnt5a- und Wnt11-induzierte Aktivierung von JNK zu studieren, wurde durch Ko-Transfektion spezifischer siRNAs gegen humanes Diversin und Dishevelled-3 deren Expression blockiert. Bezogen wurden die siRNAs von Dharmacon (Lafayette, hDiversin, Kat.# M-020396-00-0020, hDvl-3, Kat. # M-004070-00-0020, Kontroll-siRNA, Kat.# D-001206-13-20). Für die Transfektion von SW480-Zellen mit siRNAs (100nM) wurde Lipofectamin 2000 (Invitrogen) nach Herstellerangaben verwendet. Die transfizierten Zellen wurden 24 bis 30 Stunden in serumarmen Medium (1% FCS) bei 37°C kultiviert und danach 2 Mal mit PBS (37°C) gewaschen. Zur Lyse wurden die Zellen in 100 μ l Triton-Lyse-Puffer (25mM Glycylglycin, 15mM MgSO₄, 4mM EGTA, 1% Triton, 1mM DTT) für 20 bis 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Zur Bestimmung der Luziferase-Aktivität wurden 10-20 μ l des Zelllysats mit 200 μ l Luziferase-Puffer (25mM Glycylglycin, 2mM ATP (pH 7, 5), 10mM MgSO₄) versetzt und im Luminometer nach Injektion von 80 μ l 0,2mM Luciferin/20mM Glycylglycin-Lösung für 10 Sekunden gemessen. Für die β -Galaktosidase-Aktivitätsmessung wurden 50 μ l Zelllysats mit 75 μ l Reaktionspuffer (34 μ l ONPG-Lösung (4mg/ml) und 41 μ l Z-Puffer (60mM Na₂HPO₄, 40mM NaH₂PO₄, 1mM MgSO₄, 0,3% β -Mercaptoethanol) versetzt und bei 37°C inkubiert. Sobald deutlich ein gelber

Farbumschlag zu erkennen war, wurde die Absorption bei 420 Nanometer im 96er-Plattenleser (Tecan, Genios) gemessen. Zur Ermittlung der relativen Luziferase-Aktivität wurden die erhaltenen Messwerte zu den entsprechenden β -Galaktosidase-Aktivitäten ins Verhältnis gesetzt. Alle Experimente wurden in Duplikaten oder Triplikaten bereitet und mindestens drei Mal wiederholt.

Northern-Blot-Analyse

Um die Funktion von Diversin und Dishevelled auf die Aktivierung von JNK im Reporter-Assay näher zu untersuchen, versuchte ich, deren Expression in kultivierten Zellen mittels siRNA zu blockieren. Die Überprüfung humaner Zelllinien durch Northern-Blot-Analyse ergab, dass die Kolonkarzinomzelllinie SW480 Diversin und neben Dishevelled-1 und -2, im Besonderen Dishevelled-3 exprimiert (Daten nicht gezeigt). Für die Northern-Blot-Analysen habe ich entweder untransfizierte SW480-Zellen ($\sim 5 \times 10^5$ Zellen aus drei Vertiefungen einer 12er Zellkulturplatte) oder SW480-Zellen 24, 48 und 72 Stunden nach Transfektion mit siRNAs gegen Diversin oder Dishevelled-3 in 200 μ l Trizol (Gibco) lysiert. Die Gesamt-RNA habe ich nach Angaben des Herstellers (Gibco) isoliert, in RNase-freiem, bidestilliertem Wasser gelöst und die Konzentration photometrisch bestimmt. Von jeder Probe wurden je 10 μ g RNA mit 10 μ l 2xRNA-Ladepuffer (NEB) versetzt und auf ein denaturierendes RNA-Gel aufgetragen (für 200ml: 160ml ddH₂O, 1,6g Agarose, 20ml 10xMOPS, 20ml Paraformaldehyd (37%) und 0,001% Ethidiumbromid). Die Proben wurden bei 4°C über Nacht in 1xMOPS-Puffer (0,2M MOPS, pH 7,0, 50mM Natriumacetat, 5mM EDTA, pH 8,0) bei einer Spannung von 40mV elektrophoretisch aufgetrennt. Nach dem Lauf wurde das Gel 4x 30 Min. mit ddH₂O gewaschen, 30 Min. in Denaturierungspuffer (50mM NaOH, 10mM NaCl), 30 Min. in Neutralisierungspuffer (100mM Tris, pH 7,5), sowie 30 Min. in 20x SSC (3M NaCl, 0,3M NaAc) geschwenkt. Die RNA wurde dann durch Kapillarblotten über Nacht auf eine Membran (Hybond N, Amersham) transferiert, wobei 20x SSC-Puffer als Transferlösung verwendet wurde. Mittels UV-Licht wurde die transferierte RNA kovalent an die Membran gebunden (UV Stratalinker 1800, Stratagene) und anschließend bei 68°C für 2 bis 3 Stunden inkubiert in 50ml Prähybridisierungslösung (ExpressHyb, BD Biosciences) mit 1ml denaturierter Lachsspermien-DNA (10mg/ml, Roche) zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen. Als Sonde für die Detektion von Diversin- oder Dishevelled-3-mRNA wurden cDNAs von humanem Diversin (EST-

Klon AI222135, NotI/EcoRI 2,0 kB-Fragment) bzw. murinem Dishevelled-3 (aus pSVK-Dvl-3, BglII/XhoI 2,1 kB-Fragment) verwendet. Murines Dishevelled-3 wurde uns von Daniel Sussman (Baltimore) zur Verfügung gestellt. Mit dem Megaprime-DNA-Labeling-System (Amersham Biosciences) wurden die Sonden nach Herstellerangaben mit α -³²P-dCTP (NEN) radioaktiv markiert und die Membranen über Nacht bei 68°C mit den, in Hybridisierungslösung gelösten Sonden, inkubiert. Danach wurden die Membranen 2x 15 Min. in Waschlösung 1 (2x SSC, 0,1% SDS) und 2x 15 Min. in Waschlösung 2 (0,2x SSC, 0,1% SDS) bei 68°C gewaschen. Durch Exposition von Phosphoimager-Platten (Fuji) für 24 Stunden bis zu einer Woche mit den Membranen und anschließendem Auslesen der Imager-Platten, ließen sich die spezifischen mRNA-Banden detektieren.

Zebrafisch-Injektionen und In-Situ-Hybridisierung

Alle Zebrafisch-Experimente habe ich im Labor von Matthias Hammerschmidt (Freiburg) durchgeführt. Zebrafisch-Embryonen habe ich im 1-2-Zellstadium mit einer ausgezogenen Borosilicatglaskapillare (Hilgenberg GmbH) injiziert. Dabei wurde die Spitze der Kapillare durch das Chorion in die Dottersackzelle unterhalb der Animalpolzelle des Embryos gestochen und so die Lösung injiziert. Die für Injektionen verwendeten mRNAs wurden mit dem mMessage-mMachine-Kit (Ambion) nach Herstellerangaben synthetisiert. Die RNA wurde mit RNase-freiem (DEPC-behandeltem) Wasser und die Morpholinos in 1x Danieau-Puffer (5,8mM NaCl, 0,7mM KCl, 0,4mM MgSO₄, 0,6mM Ca(NO₃)₂, 5mM HEPES, pH 7,6) und Phenolrot (0,1%) auf die gewünschte Konzentration verdünnt. Die injizierten Embryonen wurden bei Raumtemperatur oder bei 28°C in 0,3x Danieau-Medium bis zum Erreichen des zu untersuchenden Entwicklungsstadiums inkubiert. Die Auswertung der Phänotypen erfolgte nach Fixierung der Embryonen in 4% PFA/PBS bei 4°C über Nacht mit anschließender In-Situ-Hybridisierung von mRNAs spezifischer Markergene. Für die Evaluierung des Cardia-Bifida-Phänotyps wurden 48 Stunden alte, lebende Fische ausgewertet und auch die Fusion von Herzvorläuferzellen in 20 Stunden alten Embryonen, detektierbar durch Nkx2.5-Färbung, untersucht. Beide Methoden lieferten nahezu identische Ergebnisse. Zur Aufnahme des Videos, das die schlagenden Herzen in einem mit Diversin- Δ ANK-mRNA injizierten 48 Stunden alten Zebrafisch zeigt, wurde der Fisch zuvor betäubt mit Mesab (Tricain, 400mg 3-amino benzoic

acidethylester (Sigma) in 97,9ml H₂O, mit 2,1ml Tris/HCl, pH 9,0 auf pH 7,0 einstellen)
Zur Betäubung wurden 4,2ml mit 100ml Aquarienwasser gemischt.

Um die Funktion von Diversin während der Zebrafischembryogenese zu analysieren, habe ich diverse mRNAs in Zebrafischembryonen im Ein- bis Zweizellstadium injiziert. Für die In-Vitro-mRNA-Synthese wurden die Vektoren pSP64-FLAG und pCS2+ verwendet. Maus-Diversin-cDNA in pSP64-FLAG wurde von Thomas Schwarz-Romond aus unserer Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt. Die Ankyrin-Repeat-Domäne und Diversin- Δ ANK habe ich aus den, diese Diversin-Fragmente enthaltenden pCDNA-FLAG-Vektoren (Schwarz-Romond et al., 2002), in pSP64-FLAG umkloniert. Dabei konnte das Diversin- Δ ANK-Konstrukt direkt über Restriktion mit NotI in die NotI-Schnittstelle des pSP64-FLAG-Vektors kloniert werden. Die Ankyrin-Repeat-Domäne wurde mittels NotI und PmeI aus dem pCDNA-FLAG-Vektor geschnitten und über die Schnittstellen NotI und BglII in den pSP64-FLAG-Vektor kloniert, wobei der 5'-Überhang der BglII Schnittstelle zuvor mittels T4-DNA-Polymerase (NEB) aufgefüllt wurde. Beide Konstrukte wurden mittels Restriktionsverdau und Sequenzierung (SP6-Primer, MWG) auf Richtigkeit überprüft. Maus-Dishevelled-2- Δ DEP in pCS2+ wurde mir von Xi He (Boston) zu Verfügung gestellt (Habas et al., 2001). Murines Dishevelled-2- Δ DIX habe ich aus pCDNA-HA-Dvl-2- Δ DIX mit den Restriktionsenzymen PmeI und BamHI geschnitten und über StuI und BamHI in pCS2+ kloniert. Alle anderen in dieser Arbeit verwendeten Konstrukte, wie RhoA-N19, RhoA-V14 und Rac1-V12, sowie Antisense-Morpholinos (GeneTools, LLC) gegen Zebrafisch-Diversin - Diversin-5'UTR, 5'-CAGCCCTCATGTCCTGAAGAGAATC-3'; Diversin-ATG, 5'-CATCGTGCTGGCTTATGAATCAGGG-3', im Verhältnis 1:10 eingesetzt, und gegen Zebrafisch-Wnt5a und -Wnt11, im Verhältnis 2:1 eingesetzt, die für Injektionen in Zebrafischembryonen verwendet wurden, stellte mir Matthias Hammerschmidt (Freiburg) zur Verfügung (Lele et al., 2001; Schwarz-Romond et al., 2002).

Die Expression von Genen in Zebrafischembryonen habe ich mittels In-Situ-Hybridisierungen analysiert. Dazu wurden Embryonen verschiedener Entwicklungsstadien über Nacht in 4% PFA/PBS fixiert, und danach die Chorione mit der Feinpinzette in PBT (PBS/0,1% Tween) entfernt. 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. Die zur In-Situ-Hybridisierung verwendeten cDNAs, wie eve1, gsc, tbx6, Nkx2.5, krox20, myoD und Diversin wurden von Matthias Hammerschmidt (Freiburg) zur Verfügung gestellt. Digoxigenin (DIG)-markierte RNA-Sonden wurden mit dem DIG-RNA-Markierungskit

(Boehringer) hergestellt. Zur Synthese wurde 1 µg linearisierte Matrizen-DNA eingesetzt. Die RNA-Synthese in Nicht-Sinn-Richtung erfolgte mit SP6-, T7- oder T3-RNA-Polymerase für eine Stunde bei 37°C. Zur Kontrolle wurden Transkripte in Sinn-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 10 µg/ml Proteinase K bei Raumtemperatur verdaut. Anschließend wurden sie für 20 Min. in 4% PFA/PBS fixiert, 5x 5 Min. in PBT und 1x in Prähybridisierungslösung (50% deionisiertes Formamid, 5x SSC (pH 4,5), 1mM Zitronensäure (pH 6,0), 50 µg/ml Heparin, 50 µg/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% 2x SSC, 50% Prähyb./50% 2x SSC, 25% Prähyb./75% 2x SSC und schließlich in 2x SSC bei 70°C gewaschen. Danach wurde 2x 30 Min. in 0,2x SSC bei Raumtemperatur (RT) gewaschen, die Embryonen über eine absteigende SSC-Reihe in PBT überführt (jeweils 10 Min. bei RT in 75% 0,2x SSC/25% PBT, 50% 0,2x SSC/50% PBT, 25% 0,2x 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 Raumtemperatur präadsorbiert und in einer 1 : 5000 Verdünnung mit den Embryonen über Nacht bei 4°C unter leichter Bewegung inkubiert. Am darauf folgenden Tag wurden unspezifisch gebundene 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 Stunden gefärbt. Die Färbung wurde durch dreimaliges Waschen in PBT gestoppt und die Embryonen für 30 Min. in 4% PFA/PBS nachfixiert. Zur Lagerung wurden die Embryonen mit Methanol entwässert und in Benzylalkohol/Benzylbenzoat (1:2) überführt. Die Analyse der Hybridisierungen erfolgte unter einem Dissektionsmikroskop (Leica), zur Dokumentation wurden die Embryonen auf Objektträgern fotografiert.

Drosophila Genetik

Die Analyse zur Funktion von Diversin und Diego in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* wurde im Labor von Marek Mlodzik von Andreas Jenny (Mount Sinai School of Medicine, New York) durchgeführt. Für die Experimente in *Drosophila* wurden pCaspTubPA-Diversin und pUAST-Diversin mittels Insertion eines KpnI/XbaI-Fragment aus pcDNA-FLAG-Diversin (Schwarz-Romond et al., 2002) in pCaspTubPA and pUAST (Brand and Perrimon, 1993) generiert. Ein DraI-Fragment von EP Dgo(2619) (Feiguin et al., 2001) wurde in pCaspTubPA kloniert um pCaspTubPA-Dgo zu erhalten. UAS-Dgo ist bereits beschrieben (Das et al., 2004). Die transgenen Fliegenlinien wurden durch Standard-P-Element-Transformation generiert. Die Überexpressionsstudien in *Drosophila* wurden unter Verwendung des *sevenless* (*sev*)-Gal4 oder des Tubulin (*tub*)-Gal4-Treibers (Basler et al., 1991) für das Gal4/UAS-System (Brand and Perrimon, 1993) in Fliegen, die bei 29°C gehalten wurden, durchgeführt. w^{1118} (w^-) ist eine *white*-Mutante, die einen Pigmentationsdefekt aufweist und als Kontrolle verwendet wurde. Für Kompensations-Experimente wurden die Fliegen bei 25°C gehalten. Es wurden jeweils drei unabhängige transgene Fliegenlinien analysiert. Die Ankyrin-Repeat-Domäne von Diego wurde als NotI/Sall-Fragment aus pCRIITopo-DgoANK (Das et al., 2004) über NotI/XbaI in pUASMyc (Jenny et al., 2003) kloniert, um pUASMyc-Dgo-ANK zu erhalten, wobei die Sall- und XbaI-5'-Überhänge mit T4-DNA-Polymerase aufgefüllt wurden, um stumpfe Ende zu erhalten. pUASMyc-Dgo-ΔANK wurde erzeugt, indem das BamHI/EcoRI (linker)-Fragment aus pCRIITopo-Dgo-ΔANK (Jenny et al., 2005) in die entsprechenden Restriktionsschnittstellen von pUASMyc kloniert wurde. Für die Rescue-Experimente in *dgo*³⁸⁰-Mutanten wurden 5 unabhängige transgene Fliegenlinien mit UAS-Dgo-Ank und sechs mit UAS-Dgo-ΔAnk getestet, die jeweils die gleichen Resultate lieferten.

Abkürzungen

ATP	Adenosintriphosphat
Amp	Ampicilin
cDNA	complementary DNA
CMV	Cytomegalie-Virus
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfan
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamin-tetraacetat
EGTA	Ethylenglykol-bis-(2-aminoethylethyl)-tetraacetat
EST	Expressed sequence tag
FCS	Fetal calf serum
HA	Hemagglutinin
HBS	HEPES-buffered saline
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2- Ethansulfonsäure
IP	Immunpräzipitation
JNK	c-jun N-terminale Kinase
kB	Kilobasen
K446M	Lysin an der Stelle 446 ausgetauscht mit Methionin
LB	Luria Bertani
LiAc	Lithiumacetat
luc	Luziferase
ml	Milliliter
(m)g	(Milli)gramm
(m)M	(milli)molar
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
mRNA	messenger RNA (Boten-RNA)
NaAc	Natriumacetat
ng	Nanogramm
nM	nanomolar
OD	Optische Dichte
ONPG	o-Nitrophenyl- β -D-Galactopyranosid

PBS	Phosphate-buffered saline
PBT	Phosphate-buffered saline Tween-20
PEG	Polyethylenglykol
PFA	Paraformaldehyd
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
SDS	Sodiumdodecylsulfat
siRNA	small interference RNA
SV40	Simian virus 40
SSC	Standard Saline Citrate
TE	Tris-EDTA
Tris	Tri-(hydroxymethyl)-aminoethan
UAS	Upstream Activating Sequence
Vol	Volumen
w/v	Masse pro Volumen