

Funktionale Analyse nicht-konservierter Domänen der Lef/Tcf
Transkriptionsfaktoren aus *Xenopus laevis*

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

von der KIT-Fakultät für Chemie und Biowissenschaften

des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)

genehmigte

DISSERTATION

von

Dipl. Biol. Jessica Schunk

aus

Ludwigsburg

KIT-Dekan: Professor Dr. Willem Klopper

Referent: PD Dr. Dietmar Gradl

Korreferent: Professor Dr. Martin Bastmeyer

Tag der mündlichen Prüfung: 18. Dezember 2015

Erklärung

Der experimentelle Teil der vorliegenden Arbeit wurde im Zoologischen Institut, Abteilung für Zell- und Entwicklungsbiologie am Karlsruher Institut für Technologie (KIT) in der Zeit von April 2012 bis November 2015 durchgeführt.

Ich versichere, dass ich meine Doktorarbeit selbstständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt sowie die wörtlichen oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche kenntlich gemacht und die Satzung des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT) zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis in der jeweils gültigen Fassung beachtet habe.

Jessica Schunk, November 2015

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|------------|
| Erklärung | II |
| Inhaltsverzeichnis | III |
| Zusammenfassung..... | VI |
| 1. Einleitung..... | 1 |
| 1.1 Der Wnt/ β -Catenin-Signalweg in Vertebraten | 1 |
| 1.2 β -Catenin-unabhängige Wnt-Signalwege | 3 |
| 1.3 Die Transkriptionsfaktoren des kanonischen Wnt-Signalwegs | 4 |
| 1.3.1 Aufbau der Vertebraten Lef/Tcfs | 6 |
| 1.3.2 Evolutionäre Betrachtung der Lef/Tcf Transkriptionsfaktoren..... | 10 |
| 1.3.3 Posttranslationale Modifikationen beeinflussen die Funktion der Vertebraten Lef/Tcfs | 12 |
| 1.3.4 Alternative Methoden zur Regulation der Lef/Tcf Transkriptionsfaktoren | 14 |
| 1.3.5 Redundante und subtypspezifische Funktionen der Lef/Tcfs..... | 16 |
| 1.4 Pangolin - Aktivator und Repressor | 19 |
| 2. Zielsetzung..... | 22 |
| 3. Material..... | 23 |
| 4. Methoden | 37 |
| 4.1 Arbeiten mit <i>Drosophila melanogaster</i> | 37 |
| 4.1.1 Haltung von <i>Drosophila melanogaster</i> | 37 |
| 4.1.2 Generierung homozygoter Fliegenstämmen mit Hilfe von Balancer-Chromosomen..... | 37 |
| 4.1.3 Regulierte Genexpression durch das UAS-Gal4-System | 38 |
| 4.1.4 Präparation adulter <i>Drosophila</i> Flügel | 39 |
| 4.1.5 Immunfärbung auf <i>Drosophila</i> Flügelimaginalscheiben | 39 |
| 4.1.6 DNA-Extraktion und Genamplifikation aus <i>Drosophila melanogaster</i> | 40 |
| 4.2 Arbeiten mit <i>Xenopus laevis</i> | 41 |
| 4.2.1 Haltung von <i>Xenopus laevis</i> | 41 |
| 4.2.2 Testisextraktion und Eiablage..... | 41 |
| 4.2.3 <i>In vitro</i> Fertilisation | 42 |
| 4.2.4 Entfernen der Gallerthülle und Mikroinjektion | 42 |
| 4.2.5 Embryonenpflege bei <i>Xenopus laevis</i> | 43 |
| 4.2.6 Induktion mesodermalen Gewebes in animalen Kappen | 43 |
| 4.2.7 <i>In situ</i> Hybridisierung zur Darstellung der mRNA-Expression | 44 |
| 4.3 Molekularbiologische und mikrobiologische Methoden | 45 |
| 4.3.1 RNA-Isolation, Aufkonzentrierung und Bestimmung der RNA-Qualität | 45 |
| 4.3.2 Reverse Transkription | 45 |
| 4.3.3 Quantitative Realtime Polymerasekettenreaktion | 46 |
| 4.3.4 <i>In vitro</i> Transkription von Cap mRNA..... | 47 |
| 4.3.5 Sonden-Synthese für die <i>in situ</i> Hybridisierung..... | 47 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 4.3.6 | Polymerasekettenreaktion | 48 |
| 4.3.7 | Ortsspezifische Mutagenese | 49 |
| 4.3.8 | Gateway-Klonierung | 49 |
| 4.3.9 | Ligation | 50 |
| 4.3.10 | Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i> | 51 |
| 4.3.11 | Transformation elektrokompetenter <i>E. coli</i> | 51 |
| 4.3.12 | Synthese und Transformation chemisch kompetenter MaV203 Hefen | 52 |
| 4.3.13 | Blau/Weiß Selektion | 52 |
| 4.3.14 | Plasmidpräparation aus <i>E. coli</i> Bakterien mit anschließender Isopropanolfällung | 53 |
| 4.3.15 | DNA-Isolation aus MaV203-Hefekolonien | 53 |
| 4.3.16 | Restriktionsanalyse von DNA | 54 |
| 4.3.17 | Ethanol-fällung von Nukleinsäuren | 54 |
| 4.3.18 | Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration und deren Reinheit | 54 |
| 4.3.19 | Sequenzanalyse der DNA | 55 |
| 4.3.20 | Analytische Flachbett-Gelelektrophorese | 55 |
| 4.3.21 | DNA-Extraktion aus dem Agarosegel mit anschließendem Anfügen des 3'-Adenosinüberhangs | 56 |
| 4.3.22 | Synthese der cDNA Bibliothek | 56 |
| 4.4 | Proteinbiochemische Methoden | 60 |
| 4.4.1 | Hefe-2-Hybridsystem | 60 |
| 4.4.2 | Überführung und Reinigung von Hefekolonien durch Stempeln | 62 |
| 4.4.3 | Bestimmung der Eigenaktivität der Bait-Konstrukte | 62 |
| 4.4.4 | X-Gal Färbung der Hefekolonien | 63 |
| 4.4.5 | Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) | 63 |
| 4.4.6 | Western Blot | 64 |
| 4.4.7 | Proximity Ligation Assay | 64 |
| 4.4.8 | Proteinextraktion aus <i>X. laevis</i> Embryonen durch nichtionisches Detergens | 67 |
| 4.5 | Zellbiologische Methoden | 67 |
| 4.5.1 | Kultivieren und Passagieren von humanen Zellen | 67 |
| 4.5.2 | Kultivieren und Passagieren von <i>Drosophila</i> S2R+ Schneiderzellen | 67 |
| 4.5.3 | Konservierung von Zellen in Kryostocks | 68 |
| 4.5.4 | Transfektion mittels kationischer Polymere | 68 |
| 4.5.5 | Transfektion mit der Calcium-Phosphat-Methode | 68 |
| 4.5.6 | Reportergenassay in Hek293- und <i>Drosophila</i> Schneiderzellen | 69 |
| 4.5.7 | Renilla-Reportergenassay | 70 |
| 4.5.8 | Immunfärbung auf HeLa-Zellen | 71 |
| 5. | Ergebnisse | 72 |
| 5.1 | Die <i>Xenopus</i> Lef/Tcfs in der Reportergenaktivierung in <i>Drosophila</i> Schneiderzellen ____ | 72 |
| 5.2 | Einfluss der Lef/Tcfs und Pangolin auf die Distalless-Expression in Flügelimaginalscheiben | 73 |
| 5.2.1 | Die Überexpression der Wnt-Transkriptionsfaktoren in der Zielgenanalyse | 74 |
| 5.2.2 | Zielgenanalyse der <i>Xenopus</i> Lef/Tcfs in Pangolin defizientem Hintergrund | 76 |
| 5.3 | Funktionsanalyse der Lef/Tcfs in der Flügelmorphogenese | 79 |
| 5.3.1 | Veränderung der Flügelmorphologie durch die Überexpression der Wnt-Transkriptionsfaktoren von <i>Drosophila</i> und <i>Xenopus</i> | 79 |

| | | |
|-----------|--|------------|
| 5.3.2 | Rekonstitutionsexperimente am Gesamtflügel | 82 |
| 5.3.3 | Untersuchung des Flügelbildes in Abhängigkeit zweier <i>Xenopus</i> Tcfs..... | 84 |
| 5.4 | Das C-terminale Bindeprotein ist der dominante Bindepartner des <i>Xenopus</i> Tcf4 E-Tails | 87 |
| 5.5 | Funktionsanalyse des Tcf4 E-Tails | 88 |
| 5.5.1 | Analyse unterschiedlicher Domänen des Tcf4 E-Tails auf die Aktivierung des <i>siamois</i> - Promotors und die Induktion sekundärer Körperachsen | 89 |
| 5.6 | Neue Interaktionspartner der <i>Xenopus</i> Lef/Tcf kontext-abhängigen Domänen | 92 |
| 5.7 | Die Dynein leichte Kette 2 | 93 |
| 5.7.1 | Die Expression der Dynein leichten Kette 2 | 93 |
| 5.7.2 | Die Dynein leichte Kette 2 interagiert mit Tcf1..... | 98 |
| 5.7.3 | Die Dynein leichte Kette 2 moduliert die Aktivität des SuperTOPFlash-Reporters | 98 |
| 5.8 | Die Phospholipid Scramblase 1 | 99 |
| 5.8.1 | Die Expression der Phospholipid Scramblase 1 | 99 |
| 5.8.2 | Die Phospholipid Scramblase 1 moduliert die Aktivität des SuperTOPFlash-Reporters | 101 |
| 6. | <i>Diskussion</i> | 102 |
| 6.1 | Der Einfluss der <i>Xenopus</i> Lef/Tcfs in <i>Drosophila</i> | 102 |
| 6.1.1 | Lef/Tcf-abhängige Induktion der Reporterogenaktivität in <i>Drosophila</i> Schneiderzellen..... | 102 |
| 6.1.2 | Die Auswirkungen der Lef/Tcfs in der Flügelentwicklung | 104 |
| 6.2 | Die Analyse des Tcf4 C-Terminus auf seine aktivierenden und reprimierenden Eigenschaften | 113 |
| 6.2.1 | Analyse der Cystein-Klammer des Tcf4 E-Tails | 113 |
| 6.2.2 | Tcf4E und das C-terminale Bindeprotein | 115 |
| 6.3 | Identifizierung neuer Lef/Tcf Interaktionspartner | 118 |
| 6.3.1 | Die Dynein leichte Kette 2 als Interaktionspartner von Tcf1 und Modulator des kanonischen Wnt-Signalweges | 119 |
| 6.3.2 | Die Phospholipid Scramblase 1 als Modulator des kanonischen Wnt-Signalweges | 122 |
| 7. | <i>Literaturverzeichnis</i> | 124 |
| 8. | <i>Anhang</i> | 138 |
| 8.1 | Liste der verwendeten Abkürzungen | 138 |
| 8.2 | Aminosäuresequenz der für das Hefe-2-Hybridsystem verwendeten Baits | 139 |
| | <i>Danksagung</i> | 140 |
| | <i>Publikationen</i> | 141 |
| | <i>Lebenslauf</i>..... | 142 |

Zusammenfassung

In Komplementationsexperimenten in *Drosophila* konnte keines der untersuchten *Xenopus* Lef/Tcfs Pangolin ersetzen. Damit hat in der Vertebraten Entwicklung entweder jedes Lef/Tcf ursprüngliche Eigenschaften verloren oder Pangolin hat seit dem Abspalten vom gemeinsamen Vorläufer neue Eigenschaften angenommen.

Die Analysen in *Drosophila* wurden dadurch erschwert, dass Depletion und Überexpression von Pangolin sehr ähnliche Phänotypen verursachten. Trotzdem konnten funktionale Unterschiede der Lef/Tcfs ermittelt werden. Lef scheint ein sehr starker Aktivator zu sein, wohingegen Tcf3 die Aktivator-Eigenschaften von Pangolin, vermutlich durch das Abfangen des Ko-Repressors CtBP, zu verstärken scheint. Insgesamt liegen offensichtlich wesentliche evolutionär konservierte regulatorische Elemente im C-Terminus. Dies wurde zwischenzeitlich durch Komplementationsexperimente mit Chimären Lef/Tcfs unterstrichen (Bhambhani et al., 2014).

Die Bedeutung bekannter regulatorischer Bereiche im C-Terminus, die Cystein-Klammer und das CtBP Bindemotiv, wurden in *Xenopus* durch Analysen von Punktmutationen untersucht. Diese Mutationen hatten überraschend schwache Effekte auf die Funktion von Tcf4E, was darauf hindeutet, dass zumindest in *Xenopus* die Cystein-Klammer und das CtBP Bindemotiv modulierend wirken. Im Hefe-2-Hybridsystem konnte kein neuer Interaktionspartner des C-Terminus identifiziert werden. Stattdessen scheint hier tatsächlich CtBP das dominierende Bindeprotein zu sein.

Für die kontext-abhängige regulatorische Domäne (CRD) wurden sowohl bei Tcf1 als auch bei Tcf4 mögliche neue Interaktionspartner gefunden. Während die Interaktion von Tcf4 mit der Phospholipid Scramblase 1 noch nicht weiter bestätigt werden konnte, wurde die physische Interaktion von Tcf1 mit der Dynein leichten Kette 2 durch ein weiteres unabhängiges Analysesystem, den Proximity Ligation Assay, verifiziert. Sowohl die Dynein leichte Kette 2 als auch die Phospholipid Scramblase 1 beeinflussen die Aktivität des für den kanonischen Wnt-Signalweg spezifischen SuperTOPFlash-Reporters.

1. Einleitung

1.1 Der Wnt/ β -Catenin-Signalweg in Vertebraten

Die Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs beginnt mit der Bindung eines Wnt-Liganden (Wingless/Int-1) an den Rezeptor Frizzled und den Ko-Rezeptor LRP5/6 (low density lipoprotein receptor related protein) (MacDonald und He, 2012).

Dieser Signalweg ist unter anderem entscheidend bei der Entstehung der anterioren/posterioren Achse des sich entwickelnden Keims, der Musterbildung des zentralen Nervensystems, bei der Regulation der Stammzellerneuerung und kann bei fehlerhafter Regulation zur Entstehung von Krebs führen (Logan und Nusse, 2004, Reya und Clevers, 2005, Minde et al., 2011, Clevers und Nusse, 2012).

In Abwesenheit eines Wnt-Liganden sorgt ein sogenannter Degradationskomplex dafür, dass die cytoplasmatische Konzentration an β -Catenin konstant niedrig gehalten wird. Dieser Degradationskomplex enthält die Glykogen Synthase Kinase 3 β (GSK3 β), die Casein Kinase 1 α (CK1 α) sowie Axin und APC (Adenomatous Polyposis Coli) (Kimelman und Xu, 2006). Die beiden Kinasen phosphorylieren β -Catenin an charakteristischen Serin-Resten am N-Terminus (Liu et al., 2002). Phosphoryliertes β -Catenin wird von der SKP1-cullin 1-F-box E3 Ligase erkannt und ubiquitiniert. Die Ubiquitinierung und nachfolgende Poly-Ubiquitinierung führt zum Abbau des β -Catenin am 26S Proteasom.

Durch die Bindung eines Wnt-Liganden an Frizzled und den Ko-Rezeptoren LRP5 oder LRP6 wird der kanonische Wnt-Signalweg aktiviert und der Degradationskomplex zerstört. Der Rezeptorkomplex rekrutiert das Adaptorprotein Dishevelled (Kafka et al., 2014). Daraufhin phosphorylieren GSK3 β und CK1 α den Ko-Rezeptor LRP5/6 und ermöglichen so die Bindung von Axin (Zeng et al., 2008a). Die Verschiebung des limitierenden Faktors Axin aus dem Degradationskomplex hin zum Rezeptorkomplex führt zu einer reduzierten Anzahl an Degradationskomplexen (Salic et al., 2000). So wird verhindert, dass β -Catenin weiterhin phosphoryliert und degradiert wird. Die Akkumulation von β -Catenin induziert letztendlich dessen Translokation in den Nukleus, wo es mit den Transkriptionsfaktoren der Lef/Tcf (T-cell factor/Lymphoid enhancer factor) Familie interagiert. Im Komplex mit den nukleären Wnt-Mediatoren reguliert β -Catenin als Ko-Aktivator an Lef/Tcf

Konsensussequenzen der DNA die Zielgenexpression (Brannon et al., 1997, Hoppler und Kavanagh, 2007).

Ergänzend bzw. alternativ zu diesem Mechanismus zeigten Taelmann und Kollegen (2012), dass nach Bildung eines Wnt-Signalosoms, also der Akkumulation von Wnt/Rezeptor/Ko-Rezeptorkomplexen (Bilić et al., 2007), GSK3 β zusammen mit den Komponenten des Signalosoms endocytiziert wird und in multivesikulären Körperchen erscheint. Damit wird das Enzym GSK3 β physikalisch von seinem Substrat β -Catenin getrennt. Hypophosphoryliertes β -Catenin wird nicht degradiert, akkumuliert so im Zellkern und reguliert dort die Zielgenexpression (Maher et al., 2010).

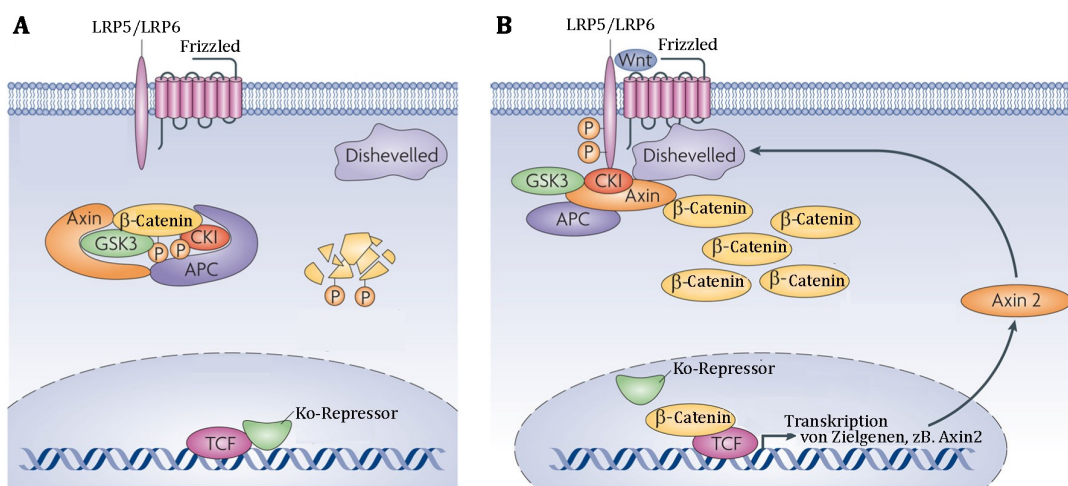


Abbildung 1.1: Vereinfachte Darstellung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs

(A) In Abwesenheit des Wnt-Liganden ist β -Catenin Teil des Degradationskomplexes bestehend aus APC, Axin, GSK3 β und CK1 α . Dieser führt zur Phosphorylierung von β -Catenin mit anschließender Ubiquitinierung und Poly-Ubiquitinierung und letztendlich zum Abbau von β -Catenin. Im Nucleus bindet der Transkriptionsfaktor Tcf im Komplex mit Ko-Repressoren wie Groucho/TLE oder CtBP an spezifische DNA-Sequenzen. (B) Die Bindung des Wnt-Liganden an Frizzled führt zur Rekrutierung von LRP5/6, Dishevelled und Axin, wodurch der Degradationskomplex aufgelöst wird. Die Phosphorylierung von β -Catenin wird inhibiert, was zu dessen Akkumulation im Cytoplasma und der dadurch induzierten Translokation in den Nucleus führt. Dort verdrängt β -Catenin den Ko-Repressor und aktiviert mit Tcf die spezifische Zielgenexpression von zum Beispiel Axin2. Verändert nach McNeil und Woodgett, 2010.

Bei *Drosophila* ist der Wnt/ β -Catenin-Signalweg unter anderem in der Flügelentwicklung entscheidend. Dies geht bereits aus dem Namen des Wnt-1 Homologs der Fliege, Wingless, hervor. In frühen Embryonalstadien führt der Wingless Verlust zu einer Transformation des Flügels in das Notum. Ein Flügel als solcher ist dann nicht zu finden (Sharma und Chopra, 1976, Morata und Lawrence,

1977). Wingless Defizienz während der frühen Larvalstadien führt zu Zellverlusten in und um die Flügelmargin herum (Couso et al., 1994, Zecca et al., 1996). Die Wingless-Überexpression dagegen induziert ektopische Borsten, reduziert aber ebenfalls die Zellzahl an der Flügelmargin und führt somit zu charakteristischen Einkerbungen der Flügelränder (Blair, 1992, Lawrence et al., 2000). Der prinzipielle Ablauf der Signalkaskade ist hoch konserviert, erfolgt also wie bei Vertebraten, wobei das Homolog zu LRP5/6 Arrow heißt, das für die GSK3 β heißt Zest white 3 (Zw3)/Shaggy und β -Catenin entspricht Armadillo (Yost et al., 1996, Aberle et al., 1997). Die Lef/Tcf Transkriptionsfaktoren werden in *Drosophila*, wie bei allen Invertebraten, von einem Vertreter, dTcf oder Pangolin, repräsentiert (Brunner et al., 1997, Cavallo et al., 1997, van de Wetering et al., 1997).

1.2 β -Catenin-unabhängige Wnt-Signalwege

Neben dem Wnt/ β -Catenin-Signalweg können einige Wnt-Liganden, bzw. Ligand/Rezeptor/Ko-Rezeptor-Kombinationen auch alternative, β -Catenin-unabhängige, sogenannte nicht kanonische Wnt-Signalwege aktivieren. Diese nicht kanonischen Signalwege, deren Hauptvertreter der Wnt5a/Ca²⁺ und der Wnt/PCP-Signalweg sind, nehmen vor allem über die Aktivierung des nuclear factor of activated t-cells (NFAT) (Shou et al., 2015), der Aktivierung der c-Jun N-terminalen Kinase (cJUNK) (Oishi et al., 2003) und damit die Konstituierung des Transkriptionsfaktors activator protein-1 (AP-1) (Katoh und Katoh, 2007, Nishita et al., 2010) Einfluss auf die Transkription. Ihre hauptsächliche Aktivierung in der Wnt-empfangenden Zelle ist aber in Veränderungen des Cytoskeletts zu sehen. So wird zum einen durch Wnt11 die Polarisierung des Mikrotubulicytoskeletts induziert (Rigo-Watermeier et al., 2012), während über die GTPasen Rac und RhoA das Aktincytoskelett reorganisiert wird, um zum Beispiel Filopodien auszubilden und letztendlich die Zellmigration einzuleiten (Tahinci und Symes, 2003).

In *Drosophila melanogaster* ist der PCP (Planar Cell Polarity)-Signalweg für die Polarisierung der Zelle im zweidimensionalen Bereich verantwortlich und führt unter anderem zur Ausrichtung der Borsten zum distalen Ende des Flügels hin. Die asymmetrische Verteilung über die Membran der für den PCP-Signalweg

verantwortlichen Proteine wird während der kompletten Flügelentwicklung aufrecht erhalten. Frizzled ist gemeinsam mit den cytoplasmatischen Proteinen Dishevelled und Diego im distalen Zellbereich lokalisiert (Axelrod, 2001, Strutt, 2001). Gegenüber befinden sich im proximalen Bereich das Transmembranprotein Strabismus und das cytoplasmatische Protein Prickle (Bastock et al., 2003). Flamingo, das sieben Transmembran Cadherin, ist sowohl distal als auch proximal lokalisiert (Matthews et al., 2008). Funktionsverluste von einem der genannten Proteine führten im *Drosophila* Flügel zu fehlgerichteten Borsten oder zu Borsten, die mittig anstatt distal aus der Zelle auswachsen (Vinson und Adler, 1987, Chae et al., 1999). Für die Änderungen im Cytoskelett zur Induktion der Borstenformation sind im Flügel die GTPasen Rac und RhoA essentiell. Beide binden an unterschiedliche Domänen von Dishevelled. Über die Bindung an die PDZ-Domäne wird RhoA aktiviert und infolgedessen die RhoA assoziierte Kinase Drok (Strutt et al., 1997, Winter et al., 2001). Rac führt nach dessen Aktivierung über die DEP-Domäne zur Aktivierung der c-Jun N-terminalen Kinase. Weitere relevante Effektorgene für die richtige Lokalisation der Flügelborsten sind: *Inturned*, *fuzzy*, *fritz* und *multiple wing hairs (mwh)* (Collier und Gubb, 1997, Adler, 2002). *mwh*-Mutanten führen zur Expression mehrerer Borsten, statt wildtypisch einer, aus ein und derselben Zelle (Lu et al., 2015). Wie letztendlich die Polarität über den gesamten Flügel etabliert wird konnte nicht geklärt werden, da ein globaler Signalgeber noch nicht identifiziert wurde. Wingless scheint es nicht zu sein, da in Wg-Mutanten die Polarität erhalten bleibt (Chen et al., 2008). Tatsächlich konnte bisher noch kein Wnt-Ligand identifiziert werden, der für die planare Zellpolarität in *Drosophila* verantwortlich ist.

1.3 Die Transkriptionsfaktoren des kanonischen Wnt-Signalwegs

Mit der Identifizierung der Lef/Tcf Transkriptionsfaktoren als Bindepartner von β -Catenin war der entscheidende Schritt der Transduktion eines Signals in eine transkriptionelle Regulation aufgeklärt (Behrens et al., 1996, Huber et al., 1996, Molenaar et al., 1996). Damit sind die Lef/Tcfs als transkriptionelle Regulatoren die Effektoren des kanonischen Wnt-Signalwegs (Brantjes et al., 2005). Die Anzahl an nukleären Wnt-Mediatoren unterscheidet sich dabei zwischen Invertebraten und Vertebraten. Invertebraten wie *Hydra magnipapillata*, *D. melanogaster* und *C. elegans*

exprimieren nur einen dieser Transkriptionsfaktoren, der in *Drosophila* Pangolin und in *C. elegans* Pop-1 genannt wird (Brunner et al., 1997, Lin et al., 1998). Vertebraten wie *Mus musculus*, der Mensch oder *Xenopus laevis* exprimieren vier verschiedene Transkriptionsfaktoren: Lef (Lymphoid enhancer binding factor)(Travis et al., 1991), Tcf1 (T-cell factor) (van de Wetering et al., 1991), Tcf3 und Tcf4 (Korinek et al., 1998b). Nach der HUGO (Human Genome Organisation) lauten die Bezeichnungen: Lef-1 (Lef), Tcf-7 (Tcf1), Tcf-7/1 (Tcf3) und Tcf-7/2 (Tcf4). Zur besseren Unterscheidung werden in der vorliegenden Arbeit weiterhin die traditionellen Namen verwendet. Für *Danio rerio* sind durch eine Duplikation von Tcf3 zu Tcf3a und Tcf3b sogar fünf verschiedene Transkriptionsfaktoren bekannt (Dorsky et al., 2003, Veien et al., 2005).

Ihre Struktur ermöglicht es mit ihrer hochkonservierten HMG-Box (high mobility group box) an die kleine Furche der DNA zu binden. Sie erkennen CCTTTGWW, W:A/T Motive, sogenannte WREs (Wnt-Responsive Elements), die stromaufwärts der Wnt-Zielgene liegen (van de Wetering et al., 1992). Gemeinsam mit β -Catenin und weiteren Ko-Aktivatoren führen sie zur Bildung eines Aktivator-Komplexes. Zu diesen Ko-Aktivatoren gehören unter anderem CBP/p300 (cAMP responsive element binding (CREB) binding protein/E1A-Binding protein, 300 kDa) (Hecht et al., 2000, Takamaru und Moon, 2000), Pygopus und Bcl9/Lgl (B-Zell Lymphoma 9/Legless) (Städeli und Basler, 2005, Takada et al., 2012) und viele mehr (Cadigan und Waterman, 2012). In diesen multimeren Komplexen gelten die Lef/Tcf Transkriptionsfaktoren generell als Aktivatoren ihrer Zielgene. Ist kein β -Catenin vorhanden, so bilden die Lef/Tcfs Repressorkomplexe. Hierfür binden sie unter anderem Groucho/TLE (Groucho related genes/Transducin like Enhancer of split) (Daniels und Weis, 2005, Kaul et al., 2015) oder das C-terminale Bindeprotein (CtBP) (Valenta et al., 2003). Als genereller regulatorischer Schalter zwischen Aktivator- und Repressorfunktion wird dabei die Konkurrenz von β -Catenin und Groucho/TLE um die Bindung der Transkriptionsfaktoren angesehen (Daniels und Weis, 2005). Weitere Regulatoren wie Hic-5 (hydrogen peroxide-induced clone 5) (Ghogomu et al., 2006), Kaiso (Park et al., 2005) oder auch SMADs (Labbé et al., 2000) wurden in verschiedenen Systemen identifiziert (Cadigan und Waterman, 2012), sind aber verglichen mit der Regulation über β -Catenin/Groucho, Bcl9/Lgl oder CtBP weniger

konserviert, stärker kontext-abhängig und/oder eher als Modulatoren denn als Schalter anzusehen.

1.3.1 Aufbau der Vertebraten Lef/Tcfs

Allen Lef/Tcfs gemeinsam ist die strukturelle Einteilung in vier Domänen. Von N-terminal nach C-terminal sind das die β -Catenin Bindedomäne (β CBD), die kontext-abhängige regulatorische Domäne (Context dependent Regulatory Domain, CRD), die DNA-Bindedomäne (High Mobility Group, HMG-Box) mit der nukleären Lokalisationssequenz (NLS) und der C-Terminus. Am stärksten konserviert ist dabei die HMG-Box inklusive NLS, gefolgt von der β -Catenin Bindedomäne.

Diese β CBD enthält circa 60 Aminosäuren und weist eine 60 %ige Aminosäureidentität unter den Tcf-Orthologen auf (Behrens et al., 1996). Die Armadillo Motive 3-10 von β -Catenin binden diese Domäne (Graham et al., 2000). β -Catenin/Tcf Interaktionen werden durch drei Bindemodule bewerkstelligt, die negativ geladen sind und antiparallel zu den positiv geladenen Armadillo Motiven verlaufen. Für *Xenopus* Tcf3 wurde in Kristallanalysen gezeigt, dass die N-terminale Haarnadelstruktur direkt in die Einkerbung der Armadillo Wiederholungen 9-10 passt. Die Domäne zwei, eine ausgedehnte Domäne, interagiert mit den Wiederholungen 5-8, während die letzte Domäne der β CBD von Tcf3, eine α -Helix, mit den Armadillo Wiederholungen 3-4 wechselwirkt (Graham et al., 2000). Für Tcf4 konnten zwei Aminosäuren ausgemacht werden, Asp-16 und Leu-48, die essentiell für die Bindung an β -Catenin sind (Omer et al., 1999). Die Nutzung alternativer Promotoren führt bei Lef, Tcf1 und Tcf4 zu N-terminal trunkierten Isoformen ohne β CBD (van de Wetering et al., 1992, Van de Wetering et al., 1996, Hovanes et al., 2000, Hoepfner et al., 2009, Vacik et al., 2011). Bei Tcf1 und Lef wurde gezeigt, dass diese trunkierten Varianten als dominant-negative Isoformen agieren (dnLef, dnTcf1), sie bilden also Repressorkomplexe (Roose et al., 1999), obwohl für Lef zusätzliche Bindestellen für β -Catenin in der CRD beschrieben sind (Daniels und Weis, 2005).

Die CRD ist mit 15-20 % Sequenzhomologie die am wenigsten konservierte Domäne. Allerdings ist allen CRD gemein, dass dort der Ko-Repressor Groucho/TLE bindet (Jennings und Ish-Horowicz, 2008, Agarwal et al., 2015). Der Repressorkomplex wird

erst nach Aktivierung des Wnt-Signalwegs durch das Verdrängen von Groucho/TLE durch β -Catenin aufgelöst.

Durch die alternative Verwendung von Spleißdonor- und Akzeptorstellen kommt es in der CRD zu einer Vielzahl diverser Isoformen. Dem alternativ gespleißten Exon IV in Tcf1 und entsprechend Exon VIII in Tcf4, bzw. Exon VI in Lef, werden sowohl aktivierende als auch reprimierende Eigenschaften zugeschrieben (Gradl et al., 2002, Tomimaru et al., 2013). Die Zielgenaktivierung durch dieses Exon wird durch die Bindung des LIM-Proteins Hic-5 (Hydrogen peroxide-induced clone-5) unterdrückt (Ghogomu et al., 2006). Tcf3 und Tcf4 weisen zusätzlich zum Exon VIII mit LVPQ und SxxSS flankierende Sequenzen auf, denen reprimierende Eigenschaften zugesprochen werden. Bei Tcf4 wurde nachgewiesen, dass die Varianten tatsächlich alternativ exprimiert werden (Duval et al., 2000, Pukrop et al., 2001). Generell führen die Aminosäuresequenzen LVPQ und SxxSS auf noch unbekanntem Wege zu einer Repression der Transkription (Pukrop et al., 2001, Gradl et al., 2002).

Lef weist innerhalb der CRD eine weitere Besonderheit auf. Als einziges Lef/Tcf enthält es eine Transaktivator-domäne und kann so anstatt durch β -Catenin durch ALY (Ally of AML-1 and Lef-1) zu einer transkriptionellen Aktivierung führen. ALY bindet dabei an die kontext-abhängige Transaktivierungsdomäne (context dependent transactivation domain, CAD) (Bruhn et al., 1997), also dem Bereich, der inzwischen CRD genannt wird. Bisher wurde von keinem anderen Lef/Tcf nachgewiesen, dass es ALY bindet. So ist 18 Jahre nach der Erstbeschreibung der Lef-ALY Interaktion davon auszugehen, dass diese Art der transkriptionellen Regulation Lef-spezifisch ist.

Tcf4 Isoformen, denen C-terminal der CRD die HMG-Box und der C-Terminus fehlen, (Tcf4N), agieren als dominant-negative Transkriptionsfaktoren. Sie fangen β -Catenin ab, bilden einen Komplex und können dann, auf Grund des Verlustes der HMG-Box, nicht an Zielgen-Promotoren binden. Explizit wurde dies für den *lef1*-Promotor gezeigt (Kennell et al., 2003).

Die HMG-Box als DNA-Bindedomäne besteht aus circa 80 Aminosäuren und weist gemeinsam mit der anschließenden NLS eine über 90 %ige Aminosäureidentität unter den einzelnen Lef/Tcfs unterschiedlicher Organismen auf. Für Tcf1 konnte gezeigt werden, dass die Faltung der HMG-Box in ungebundener Form zu 60 % aus α -Helices besteht und zu 40 % willkürlich gewunden ist. Eine

Konformationsänderung der HMG-Box nach der DNA-Bindung konnte ebenfalls ermittelt werden (van Houte et al., 1993). Durch die Bindung an der Konsensussequenz WWCTTTG (W=A/T) wird die DNA durch die HMG-Box um 130 ° gebogen (Giese et al., 1991, Oosterwegel et al., 1991, van Beest et al., 2000). Die Beugung der DNA weg vom Transkriptionsfaktor induziert das Binden basischer Aminosäuren der NLS an das Phosphatrückgrat der DNA und unterstützt die Bindung DNA/Transkriptionsfaktor (Love et al., 1995). Die Konformationsänderungen der DNA und der HMG-Box verändern die Bindemodalitäten weiterer Ko-Faktoren. Dies konnte unter anderem für den TCR α -Enhancer (T-Cell Receptor α) gezeigt werden (Carlsson et al., 1993, Giese und Grosschedl, 1993). Einer dieser Ko-Faktoren ist die Thymin DNA Glykosylase (TDG). Diese bindet an Tcf1, Lef und Tcf4, was in einer erhöhten Genexpression resultiert (Jia et al., 2014).

Verglichen zur hohen Konservierung der DNA-Bindedomäne sind die Unterschiede im C-Terminus der Lef/Tcfs immens. Durch alternatives Spleißen von Tcf1 und Tcf4 entstehen diverse Isoformen, die sich hauptsächlich im Vorhandensein einer Cystein-Klammer und Bindestellen für das C-terminale Bindeprotein (CtBP) unterscheiden (Weise et al., 2010). Die längsten dieser Varianten werden E-Tail (E = elongation) Varianten genannt. Die Cystein-Klammer (C-Klammer) erstreckt sich über die Exons 14-17 und besteht aus einer CRARF-Domäne und drei weiteren Cysteinen, wobei das letzte in ein RKKKCIRY-Motiv integriert ist. Abwandlungen des CRARF-Motivs treten häufig auf, so findet sich in Vertebraten zum Beispiel auch CRALF statt CRARF (Weise et al., 2010). Die Cystein-Klammer dient als zusätzliches DNA-Bindemotiv, welches an GC-reiche DNA-Elemente/Helferstellen (RCCGCC) stromabwärts der WREs bindet (Hoverter et al., 2014). Die Aktivierung des *lef1*-Promotors konnte einzig durch die Bindung der E-Tail Varianten an eine dieser zusätzlichen DNA-Bindestellen induziert werden (Hovanes et al., 2001). Für die Bindung der C-Klammer an den Helferstellen ist ein Zink-Ion essentiell (Ravindranath und Cadigan, 2014). Die Aktivierung durch den E-Tail scheint dabei auf einige Zielgene beschränkt zu sein. Lef (also ohne E-Tail) aktiviert den *cdx1*-Promotor nicht. Erst eine Chimäre aus Lef und dem E-Tail von Tcf4 führt zur *cdx1*-Expression (Hecht und Stemmler, 2003). Inzwischen wird allgemein angenommen, dass die Cystein-Klammer die Bindung der HMG-Box an die WRE unterstützt und eine starke Zielgenaktivierung fördert (Atcha et al., 2007, Chang et al.,

2008, Wallmen et al., 2012). Neben der akzessorischen Bindung an die WREs und zusätzlichen Helferstellen ist die Cystein-Klammer auch an der Rekrutierung transkriptioneller Aktivatoren beteiligt. So ist das RKKKCIRY-Motiv das Bindeelement für den Ko-Aktivator CBP/p300. Diese Histonacetyltransferase verändert nicht nur den „Histon-Code“ in näherer Umgebung, sondern unterstützt auch die Bindung an β -Catenin und führt somit zur Zielgenexpression (Atcha et al., 2003, Li et al., 2007). Damit wird über den E-Tail die Expression der Zielgene über zwei Mechanismen gefördert, die verstärkte Bindung an die DNA und die Rekrutierung einer Histonacetyltransferase. Für Tcf1 sind bisher keine weiteren regulatorischen Mechanismen des E-Tails bekannt. Für Tcf4 erscheint die Regulation über den C-Terminus deutlich komplexer, denn er enthält neben der Cystein-Klammer auch Bindemotive (PLSL) für den Ko-Repressor CtBP. Die inhibitorischen Eigenschaften des Ko-Repressors CtBP konnten unter anderem durch die unterbundene *siamois*-Promotoraktivierung im Komplex mit Tcf3 gezeigt werden (Brannon et al., 1999, Valenta et al., 2003). Dabei ist noch immer umstritten wie CtBP tatsächlich als Repressor agiert (Hamada und Bienz, 2004, Sierra et al., 2006). Zwei unterschiedliche Modelle werden favorisiert. Nach einem Modell interagiert CtBP direkt mit Tcf4 und unterstützt die Zielgenunterdrückung gemeinsam mit Groucho, im anderen Modell bindet CtBP an APC und induziert die Loslösung von Armadillo/ β -Catenin vom Tcf (Brannon et al., 1999, Hamada und Bienz, 2004, Fang et al., 2006, Sierra et al., 2006).

Die kürzeste der C-terminalen Varianten wird als S-Form bezeichnet. Durch alternatives Spleißen kommt es zum Verlust von Exon 17, einer Verschiebung des Leserahmens in nachfolgenden Exons und damit zum Translationsstop (Weise et al., 2010). Von den vier Cysteinen der C-Klammer sind die ersten drei enthalten. Das RKKKCIRY-Motiv fehlt. Alle Tcf1-Varianten, die im Modellorganismus *Xenopus* bisher beschrieben wurden, entsprechen dieser Variante (Roël et al., 2003). Dabei ist auch hier der E-Tail wichtig für die Zielgenaktivierung. Rekonstitutionsexperimente in Tcf1/Tcf4 depletierten E14 ESC-Zellen mit Tcf1B und Tcf1E zeigten auf, dass für die wildtypische Expression von Axin2 und CDK1 beide Tcf1 Isoformen eine wildtypische Expression einleiten können. Für T/Bra konnte allerdings einzig Tcf1E die wildtypische Zielgenexpression wiederherstellen (Wallmen et al., 2012).

Die M-Isoformen zeichnen sich durch den kompletten Verlust der Cystein-Klammer und der CtBP Bindemotive aus. In *Xenopus* sind dies die ursprünglich beschriebenen Varianten, auf denen zum Beispiel die Untersuchungen der Exon VIII flankierenden Sequenzen LVPQ und SxxSS beruhen. Basierend auf diesen Ergebnissen lassen sich die M-Formen weiterhin in Tcf4A, Tcf4B und Tcf4C unterteilen (Pukrop et al., 2001, Gradl et al., 2002). Die A-Isoform enthält beide flankierenden Sequenzen, die C-Isoform keine und bei der B-Variante ist einzig das LVPQ-Motiv enthalten.

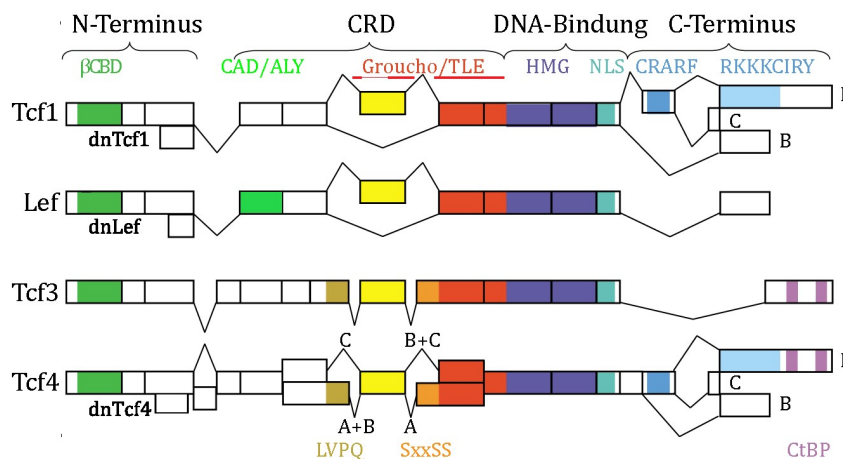


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der Vertebraten Lef/Tcf Transkriptionsfaktoren

Die Struktur der Lef/Tcfs enthält vier Domänen: Der N-Terminus mit der β -Catenin Bindestelle (grün), der CRD, die DNA-Bindedomäne aus HMG-Box und NLS (blau, türkis) sowie der C-Terminus. Durch die Verwendung alternativer Promotoren entstehen für Lef, Tcf1 und Tcf4 dominant-negative Isoformen. Die Bindestelle für den Transaktivator ALY befindet sich in der CRD von Lef (grün). Das in Gelb dargestellte Exon innerhalb der CRD weist durch alternatives Spleißen unterschiedliche flankierende Sequenzen, LVPQ (braun) und SxxSS (orange), auf. Das Bindemotiv für den Ko-Repressor Groucho/TLE ist in Rot markiert. Der C-Terminus von Tcf1E und Tcf4E trägt die Cystein-Klammer, bestehend aus dem CRARF- und dem RKKKCIRY-Motiv (mittelblau, hellblau). Einzig Tcf4E und Tcf3 enthalten Bindemotive für den Ko-Repressor CtBP (lila). Verändert nach Hoppler und Kavanagh, 2007.

1.3.2 Evolutionäre Betrachtung der Lef/Tcf Transkriptionsfaktoren

Vor der Entdeckung ihrer Interaktion mit β -Catenin waren Lef/Tcfs nur als Lymphoid-spezifische Proteine bekannt (Travis et al., 1991). Vertreter der nukleären Wnt-Effektoren sind in Metazoen weit verbreitet. Bereits im Stamm der Prolifera wurden Vertreter der Tcf identifiziert (King et al., 2008, Adamska et al., 2010). Mit Ausnahme von *Schistosoma mansoni* (Pärchenegel) enthalten alle Invertebraten ein einziges Tcf (Berriman et al., 2009).

Genduplikationen gelten als Ursache dafür, dass Vertebraten generell vier verschiedene Lef/Tcfs exprimieren. Im Laufe der Vertebraten Entwicklung erhielten

die einzelnen Lef/Tcfs ihre spezifischen nicht-redundanten Funktionen durch Subfunktionalisierung und Neofunktionalisierung (Klingel et al., 2012). Dabei entstehen vor allem bei den Säugern durch alternatives Spleißen zahlreiche unterschiedliche Varianten, die sich funktional weiter unterscheiden.

Basierend auf Vergleichen über die gesamte Proteinsequenz gruppieren sich die Lef/Tcfs im phylogenetischen Stammbaum zu zwei Geschwistergruppen, Lef/Tcf1 und Tcf3/Tcf4 (Korinek et al., 1998b, Lin et al., 2006, Klingel et al., 2012). Diese Einteilung blieb unverändert, wenn die C-Termini, also die Bereiche C-terminal der konservierten HMG-Box für den Vergleich entfernt wurden. Dabei gelten Tcf1 und Lef gemeinhin als Aktivatoren, während Tcf3 repressorisch agiert und Tcf4, je nach Spleißvariante, sowohl inhibitorisch als auch aktivierend wirken kann (Gradl et al., 2002, Lien und Fuchs, 2014). Für die Invertebraten Tcf sind dagegen meist bifunktionale Eigenschaften beschrieben (Bhambhani et al., 2014). Dies bedeutet, ein Tcf kann kontext-abhängig als Aktivator oder Repressor wirken. Besonders interessant ist dabei, dass beispielsweise Pangolin auch nach der Bindung an Armadillo die Expression einiger Zielgene reprimiert (Zhang et al., 2014). Möglicherweise wurden während der Vertebraten Evolution also aktivierende und reprimierende Funktionen des ursprünglichen Tcf auf die Geschwistergruppen Lef/Tcf1 und Tcf3/Tcf4 aufgeteilt.

Überraschend bei der Zuordnung in Geschwistergruppen bleibt aber, dass vor allem im C-terminalen Bereich von Tcf1 und Tcf4 ähnliche alternative Spleißvarianten existieren, ja sogar Intron/Exon Grenzen hoch konserviert sind (Wallmen et al., 2012). Dabei ist vor allem das CRARF-Motiv und die sogenannte Cystein-Klammer (Weise et al., 2010, Hoverter et al., 2014) ein ursprüngliches Motiv, das auch bei Hydra Tcf, Pangolin und Pop-1 zu finden ist (Bhambhani et al., 2014). Bei Hydra liegt anstelle des CRARF ein CRARY-Motiv vor (Archbold et al., 2012). Das CRARF-Motiv findet sich in der Geschwistergruppe Lef/Tcf1 ausschließlich bei einigen Varianten von Tcf1, in der Geschwistergruppe Tcf3/Tcf4 ausschließlich in einigen Isoformen von Tcf4. Das einzig in den Vertebraten auftretende Bindemotiv PLSL für das C-terminale Bindeprotein scheint dabei eine Neuerung in der evolutionären Entwicklung der Lef/Tcfs darzustellen (Robertson et al., 2011, Wallmen et al., 2012).

Diese Bindestelle für CtBP ist bei den Vertebraten auf die Geschwistergruppe Tcf3/Tcf4 aufgeteilt, Lef/Tcf1 exprimieren dieses Motiv nicht.

1.3.3 Posttranslationale Modifikationen beeinflussen die Funktion der Vertebraten Lef/Tcfs

Die funktionale Regulation der Lef/Tcfs kann neben der Rekrutierung von Ko-Faktoren auch durch posttranslationale Modifikationen beeinflusst werden. Eine Methode wie unterschiedliche Mediatorproteine die Funktion in ein und demselben Protein, oder übergreifend auf andere Proteine beeinflussen können, zeigt die Phosphorylierung von Tcf3. Die durch die Casein Kinase 1 ϵ (CK1 ϵ) induzierte Phosphorylierung von Tcf3 verstärkt die Bindung zu β -Catenin, wogegen die durch die GSK3 β induzierte Phosphorylierung die Interaktion zwischen Tcf3 und β -Catenin unterbindet (Lee et al., 2001). Die Phosphorylierung durch zwei verschiedene Kinasen an unterschiedlichen Stellen auf ein und demselben Protein moduliert folglich dessen Bindeaffinität. Die Casein Kinase 1 δ beeinflusst durch die Phosphorylierung von Lef den β -Catenin/Lef Komplex negativ (Hämmerlein et al., 2005). An einer anderen Stelle wurde gezeigt, dass die Phosphorylierung von Lef an Serin-42 und Serin-61, also im Bereich der β CBD, durch CK2 die Affinität zu β -Catenin erhöht und parallel die zum Ko-Repressor Groucho/TLE reduziert (Wang und Jones, 2006). Die durch die Phosphorylierung veränderte Affinität zu β -Catenin wurde Jahre später widerlegt. Durch isotherme Titrationskalorimetrie konnte keine Phosphorylierungsabhängigkeit der Bindeaffinität von Lef festgestellt werden (Sun und Weis, 2011). Dieselbe Casein Kinase führte allerdings bei Tcf4 zu einer schwächeren Interaktion mit Plakoglobin (Miravet et al., 2002). Die Phosphorylierung am Serin-154 von Tcf4 durch TNIK (TRAF2-und-NCK interacting protein Kinase) induziert auf noch ungeklärtem Weg die Zielgenaktivierung (Mahmoudi et al., 2009, Shitashige et al., 2010). Weiterhin ist die Interaktion des Wnt-Signalwegs mit dem TNIK-Signalweg in *Xenopus* konserviert, da die Expression vieler Gene, die für die Achseninduktion und die Aktivierung des Speemann Organisators essentiell sind, durch TNIK reguliert werden. Dabei fördert die Phosphorylierung von Tcf4 durch TNIK die Zielgenexpression (Satow et al., 2010, Shitashige et al., 2010).

Wnt1 induziert über die Nemo-like Kinase (NLK) die Phosphorylierung an den Threoninen-178 und -189, also in der CRD, was zur Separation von Tcf4 und der DNA

führt (Ishitani et al., 2003, Smit et al., 2004). Die Phosphorylierung kann auch als Markierung für weitere Proteininteraktionen dienen. So induziert die Phosphorylierung von Tcf4 und Lef deren Ubiquitinierung, Poly-Ubiquitinierung und letztendlich den Abbau am Proteasom (Yamada et al., 2006). Im Zebrafisch führt die Phosphorylierung von Tcf3a und Tcf3b durch die NLK zur Zielgenrepression (Thorpe und Moon, 2004), wobei der Mechanismus noch unklar ist. Möglicherweise ist der Mechanismus ähnlich wie bei der Phosphorylierung durch HIPK2 (homeodomain-interacting protein kinase 2). Diese Kinase phosphoryliert in Anwesenheit von β -Catenin Tcf3 und führt zur Dissoziation von Tcf3 von den Zielgen-Promotoren (Hikasa et al., 2010, Hikasa und Sokol, 2011).

Die beiden Kinasen HIPK2 und TNIK beeinflussen somit gemeinsam mit β -Catenin, inwiefern Tcfs in einer zielgenaktivierenden oder -reprimierenden Form vorliegen. Durch den Austausch von Tcf3 durch Tcf4 wird aus einer Genrepression eine Genexpression (Satow et al., 2010).

Ein direkter Austausch von Tcf3 und Tcf1 konnte am Zielgen-Promotor *vent2* nachgewiesen werden. Hier beeinflusst β -Catenin die Aktivität des Promotors, in dem es den Repressor Tcf3 gegen den Aktivator Tcf1 ohne weitere Unterstützung ersetzen kann (Hikasa und Sokol, 2011). Die Funktionen von β -Catenin sind offensichtlich vielseitiger als einfaches Binden an den Transkriptionsfaktor und nachfolgende Transaktivierung. Eine interessante These besagt, dass β -Catenin als Gerüstprotein für die Phosphorylierung von Tcf3 durch HIPK2 benötigt wird. Hikasa und Kollegen (2010) zeigten, dass eine Depletion von β -Catenin die Phosphorylierung von Tcf3 unterdrückt. Eine Punktmutation in Tcf3, die die Bindung zu β -Catenin unterbindet, resultiert darin, dass eine Phosphorylierung von Tcf3 unmöglich ist (Hikasa et al., 2010). Die Phosphorylierung der Lef/Tcfs durch zum Beispiel HIPK2 reguliert die Zielgenexpression auf unterschiedlichen Wegen. Zum einen induziert die Phosphorylierung das Lösen der Transkriptionsfaktoren von den Promotoren, zum anderen kann es aber auch die Bindung an β -Catenin erhöhen oder die Interaktion mit anderen Proteinen fördern. Auch in embryonalen Stammzellen ist der HIPK-Signalweg für den Austausch von Tcf1 und Tcf3 verantwortlich (Yi et al., 2011). Merkwürdigerweise scheint Tcf1 von Regulationsmechanismen durch die

Phosphorylierung ausgenommen, denn es wird von keiner der drei hier besprochenen Kinasen phosphoryliert.

Neben der Phosphorylierung spielt auch die Acetylierung eine wichtige Rolle in der Regulation der Lef/Tcfs. Die Acetylierung von Tcf4 am Lysin-150, also innerhalb der CRD, durch das CREB Bindeprotein (CBP) führt zu einer Konformationsänderung des Transkriptionsfaktors und erschwert somit die Bindung des Repressors HMG-Box Protein 1, einem DNA-Bindeprotein mit tumorsuppressorischen Eigenschaften, da es unter anderem Zellzyklus Regulatoren inhibieren kann (Sampson et al., 2001, Berasi et al., 2004, Elfert et al., 2013).

Proteinmodifikationen durch den SUMO (small ubiquitin-related modifier) Mechanismus führen in der β CBD von Lef zur Inhibition der Zielgenexpression, wohingegen die SUMOylierung an der Groucho/TLE Bindestelle, also innerhalb der CRD, von Tcf4 dessen transkriptionelle Aktivität erhöht. Lef wird durch die SUMO E3 Ligase PIASy (Protein inhibitor of activated STATy) sumoyliert (Sachdev et al., 2001, Yamamoto et al., 2003). Die Rolle der SUMO E3 Ligase PIASy im kanonischen Wnt-Weg ist allerdings noch nicht geklärt. PIASy Depletion in Mäusen führte zu keinen erkennbaren morphologischen Defekten (Roth et al., 2004).

1.3.4 Alternative Methoden zur Regulation der Lef/Tcf Transkriptionsfaktoren

In karzinogenen Kolonzellen werden Tcf1 und Tcf4 ko-exprimiert. Tcf4 gilt hierbei als Aktivator (Korinek et al., 1998a) während Tcf1 defiziente Mäuse Tcf1 als Tumorsuppressor ausweisen (Roose et al., 1999). In wildtypischen Kolonzellen wird zusätzlich zu Tcf1 auch N-terminal trunkiertes dnTcf1 exprimiert. Dabei unterscheidet sich die subzelluläre Lokalisation der Tcf1 Isoformen. In karzinogenen Zellen ist Tcf1 hauptsächlich im Cytosol lokalisiert, in wildtypischen Zellen wird dnTcf1 im Cytosol und im Nukleus vorgefunden. Das Verhältnis zwischen Tcf4 und Tcf1 in wildtypischen Zellen wird insofern reguliert, als dnTcf1 die Expression von Tcf4 unterdrückt. In karzinogenen Zellen ist das Verhältnis zwischen Tcf4 und dnTcf1 gestört, Tcf4 liegt vermehrt im Zellkern vor, Tcf1 hauptsächlich im Cytoplasma. Hierfür werden zwei Ursachen diskutiert. In Krebszellen ist der CaMKII (Calcium-

abhängige Calmodulin Kinase II) -Signalweg stark aktiviert. Dieser führt auf noch ungeklärtem Wege zum Export von dnTcf1 in das Cytosol. Die Repression von Tcf4 durch dnTcf1 ist damit aufgehoben. Zusätzlich wird mehr Tcf1B exprimiert, welches aktivierend auf die Tcf4-Expression wirkt (Najdi et al., 2009).

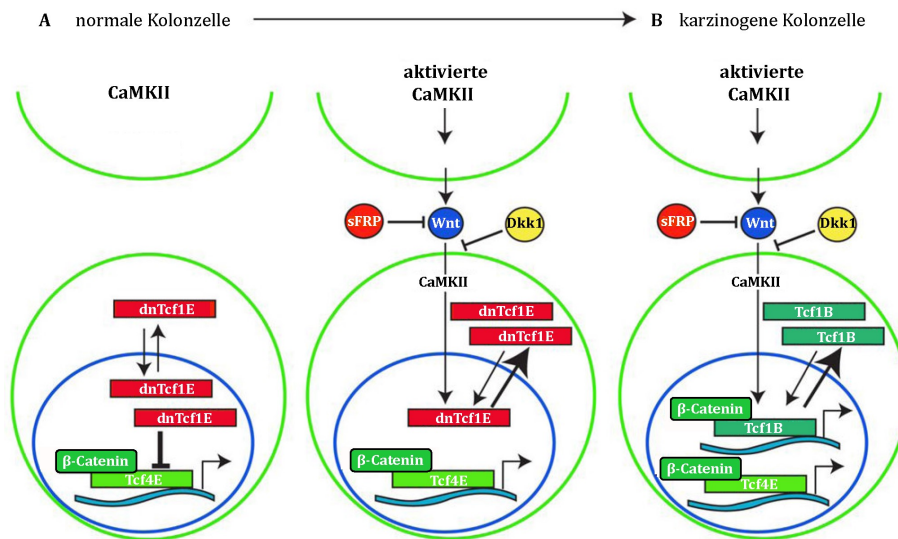


Abbildung 1.3: Modell der alternativen Regulation von Tcf4E in Kolonzenellen

(A) In wildtypischen Kolonzenellen ist dominant-negatives Tcf1E (dnTcf1E) im Nucleus lokalisiert, wo es die Expression von Tcf4E inhibiert und dadurch das Gleichgewicht zwischen Zellproliferation und Zelldifferenzierung aufrecht erhält. Die Aktivierung der CaMKII (Calcium-abhängige Calmodulin Kinase) induziert die Aktivierung des Wnt-Signalwegs, sowohl den CaMKII-abhängigen, als auch den kanonischen, da sowohl Dickkopf-1 (Dkk), sFRP (secreted frizzled related protein) und der CaMKII Inhibitor KN-93 die Aktivierung inhibieren können. Als Folge der Aktivierung wird dnTcf1E aus dem Nucleus exportiert. (B) Die Expression von dnTcf1 ist reduziert, dafür steigt die Expression von Tcf1B und Tcf4E, was in erhöhter Proliferation der karzinogenen Kolonzenellen resultiert. Verändert nach Najdi, 2009.

Die Regulation Tcf-abhängiger Gene durch die subzelluläre Lokalisation der Transkriptionsfaktoren wurde auch bei Pop-1 in *C. elegans* beschrieben. Um endodermale Gene zu aktivieren wird weniger Pop-1 im Nucleus benötigt (Lin et al., 1995, Huang et al., 2007). Der Export erfolgt nach Phosphorylierung durch den β -Catenin/MAPK (mitogen activated protein Kinase)-Komplex zusammen mit dem 14-3-3 Protein (Rocheleau et al., 1999, Lo et al., 2004). In speziesübergreifenden Experimenten konnte weder humanes Tcf4, noch murines Lef oder *Xenopus* Tcf3 in *C. elegans* aus dem Nucleus exportiert werden (Robertson et al., 2011).

Auch der Export von Pangolin aus dem Nucleus in *Drosophila melanogaster* ist bereits dargestellt (Chan und Struhl, 2002). Hier wird die interessante Theorie vertreten, dass repressorisches Pangolin, im Komplex mit Ko-Repressoren, aus dem Zellkern

exportiert wird und durch aktiviertes Pangolin, im Komplex mit Ko-Aktivatoren, aus dem Cytoplasma ersetzt wird. Das Schlüsselement dafür ist der C-Terminus von Armadillo (Chan und Struhl, 2002).

1.3.5 Redundante und subtypspezifische Funktionen der Lef/Tcfs

Kombinatorische Depletionsstudien und Epistasisexperimente zeigten, dass die einzelnen Lef/Tcfs der Vertebraten spezieübergreifend sowohl redundante als auch nicht redundante Funktionen aufweisen (Hoppler und Kavanagh, 2007). Tcf4 scheint in intestinalen Stammzellen eine aktivierende Rolle zu spielen, da Tcf4^{-/-} Mäuse eine reduzierte Anzahl an Epithelzellen im Intervillus-Bereich, in den enteroendokrinen Drüsen und in den Dünndarmzotten aufweisen. Die Tcf4 Depletion führt zum Tod der Mäuse bereits 24 Stunden nach der Geburt (Korinek et al., 1998a). Redundante Eigenschaften zwischen Tcf1 und Tcf4 konnten in der Analyse von Tcf1^{-/-}Tcf4^{-/-} Mäusen ermittelt werden, da die Doppeldepletion schwerwiegendere Defekte hervorrief, als die Addition der einzelnen Tcf impliziert hätte (Gregorieff et al., 2004).

Weiterhin werden Tcf1 und Lef während der Thymozyten Entwicklung benötigt. In diesem System wurden sowohl redundante als auch nicht redundante Funktionen beschrieben. Die Doppeldepletion von Tcf1/Lef induzierte stärkere Effekte, als die Addition der Einzelverlustmutanten implizieren würde, was für redundante Eigenschaften spricht (Galceran et al., 1999). Im Gegensatz dazu führt der Verlust von Lef zu einem schwerwiegenderen Phänotyp als der Verlust von Tcf1. Lef scheint partiell Funktionen von Tcf1 übernehmen zu können, umgekehrt gilt dies nicht (Verbeek et al., 1995, Staal und Clevers, 2001). Kolonzellen exprimieren Lef erst, wenn sie zu Krebszellen transformiert sind. Zwei Lef Isoformen wurden dabei in Kolonkarzinomzellen beschrieben, N-terminal trunkiertes Lef (entsprechend dnTcf1) und vollständiges Lef (Hovanes et al., 2001). Die Expression des vollständigen Lef ist abhängig von Tcf1 und Tcf4 vermittelter Transkription. Dabei dienen ausschließlich die E-Formen der Induktion des vollständigen Lef Transkriptionsfaktors (Li et al., 2006). Es handelt sich hier also um eine Isoform-spezifische Redundanz.

Tcf3 und Tcf4 weisen dasselbe Expressionsmuster in der Haut von Mäuseembryonen auf. Redundante Auswirkungen auf die Zielgenexpression wurden in einem MicroArray aus Keratinozyten mit Tcf3/Tcf4 Doppeldepletionen detektiert. In diesem kam es zu großen Überschneidungen in der Zielgenrepression (Nguyen et al., 2009).

Auch im Afrikanischen Krallenfrosch werden redundante und nicht redundante Funktionen unterschieden. In der Mesoderminduktion von *Xenopus* Embryonen ist zum einen die Aktivierung der Zielgene durch Tcf1 essentiell und zum anderen wird der hemmende Einfluss von Tcf3 benötigt (Liu et al., 2005). Dies wurde bei der Analyse der Expression des mesodermalen Markergens *xbrachyury* (*xbra*) deutlich. Tcf1 Morphanten und Tcf3 Morphanten zeigten eine reduzierte XBra-Expression. In Epistasisexperimenten konnte die wildtypische XBra-Expression in Tcf3 Morphanten durch Tcf3, nicht aber durch Tcf1 wiederhergestellt werden, in Tcf1 Morphanten durch Tcf1, nicht aber durch Tcf3. Somit ist eine gegenseitige Substitution von Tcf1 und Tcf3 ausgeschlossen. Stattdessen üben die beiden Tcf antagonistische Funktionen in der Mesoderminduktion aus (Liu et al., 2005). Bei der Analyse der ventrolateralen mesodermalen Markergene *xmyoD* (*Xenopus myogenic differentiation 1*) und *xpo* (*exportin-1*) konnten sich Lef und Tcf1 in ähnlichen Experimenten vollständig ersetzen. Tcf3 dagegen verstärkte die durch Lef/Tcf1 Morpholino induzierten Effekte.

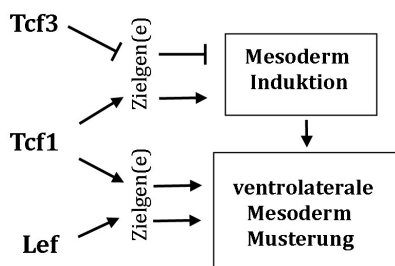


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung der durch die Lef/Tcfs regulierten frühen Mesoderm Entwicklung

Zur Induktion des Mesoderms werden die repressorischen Eigenschaften von Tcf3 in Verbindung mit den aktivierenden Eigenschaften von Tcf1 benötigt. In der ventrolateralen Musterung des Mesoderms wirken Lef und Tcf1 synergistisch. Verändert nach Liu, 2005.

In diesem Kontext wurde auch untersucht, inwiefern Tcf4 Isoformen für einzelne Lef/Tcfs substituieren können. So konnte die reprimierend wirkende Tcf4 Isoform A die reduzierte XBra-Expression in Tcf3 Morphanten wiederherstellen. Im Gegensatz dazu substituierte Tcf4C im selben Experiment für Tcf1 und Lef. Dies zeigt, dass die Tcf4 Isoformen unterschiedliche funktionale Eigenschaften aufweisen. Dabei unterscheiden sich diese Tcf4 Isoformen nur in den ein konserviertes Exon der CRD flankierenden DNA-Motiven LVPQ- und SxxSS.

In *Xenopus* ist Tcf4 spezifisch im Mittelhirnbereich exprimiert und induziert dort die Differenzierung von Mittelhirn und Isthmus. Zielgenuntersuchungen auf Tcf4 depletierten *Xenopus* Embryonen ergaben, dass Tcf4A für die Ausbildung des Mittelhirns und Tcf4C für die Entwicklung des Isthmus notwendig ist (Kunz et al., 2004). Dabei wird die Expression von Tcf4 über Tcf1 reguliert (Koenig et al., 2010). *xCirp* (*Xenopus cold inducible RNA binding protein*) ist ein spezifisches Tcf3 Zielgen. Durch Morpholino induzierten Tcf3 Verlust kam es zu einer Verbreiterung des anterioren Neuralgewebes sowie der Reduktion der XCirp-Expression. XCirp und Tcf3 spielen also beide eine Rolle in der Entwicklung des anterioren Gehirns. Da XCirp spezifisch für Tcf3 ist, sollte auch einzig Tcf3 die wildtypische Expression wiederherstellen. Eine partielle Wiederherstellung konnte durch Tcf3, aber auch durch Lef erzeugt werden. Keine Rekonstitution wurde mit Tcf4 erzielt. In der Entwicklung des anterioren Gehirns weisen somit Tcf3 und Lef eine redundante Funktion auf (van Venrooy et al., 2008).

Soweit wurden ausschließlich redundante und nicht redundante Funktionen zwischen den Lef/Tcfs im selben Organismus beschrieben. Wenn im Zuge der Vertebraten Entwicklung ausschließlich bestehende Eigenschaften des ursprünglichen Tcfs auf die vier Wirbeltier Transkriptionsfaktoren verteilt wurden, dann müssten die ursprünglichen Tcfs niederer Spezies alle Funktionen vereinen. Tatsächlich wurden speziesübergreifende redundante Funktionen detektiert. Dabei konnte in *C. elegans* Pop-1 einzig durch Tcf4 und nicht durch Lef oder Tcf3 substituiert werden (Robertson et al., 2011). Umgekehrt konnte in *Xenopus* Pop-1 die Depletion von Tcf3 kompensieren, nicht aber die Depletion von Tcf4 und Tcf1 (Klingel et al., 2012). Das ursprünglichste der in diesem Kontext untersuchten Tcf, der Transkriptionsfaktor aus *Hydra*, konnte dagegen den Verlust von Tcf4 kompensieren, nicht aber den Verlust von Tcf3 und Tcf1. Einzig Pangolin, also das Tcf aus *Drosophila*, konnte in diesen Epistasisexperimenten sowohl für Tcf1 als auch für Tcf3 und Tcf4 substituieren (Klingel et al., 2012).

1.4 Pangolin - Aktivator und Repressor

Die prinzipielle Struktur von Pangolin gleicht der der Vertebraten Lef/Tcfs. N-terminal befindet sich die Armadillo Bindestelle (van de Wetering et al., 1997). Innerhalb der darauf folgenden kontext-abhängigen regulatorischen Domäne (CRD) bindet der Ko-Repressor Groucho (Cavallo et al., 1998). Der C-Terminus von Pangolin enthält eine vollständige Cystein-Klammer mit der CRARF-Domäne und dem Bindemotiv für CBP/p300. Pangolin wurde erstmals 1997 als Lef Homolog beschrieben. Hier führte der Pangolin Verlust zu Segmentpolaritätsdefekten, die phänotypisch den Defekten der Wg-Mutanten ähnelten (Brunner et al., 1997). In der Flügelentwicklung ist Pangolin wichtig für die Zellproliferation, die Spezifizierung der Flügelmargin und die Regulation von Wingless-Zielgenen (Schweizer et al., 2003).

Die Funktionen von Pangolin sind reguliert durch die Bindung des Ko-Repressors Groucho oder der Komplexbildung mit Armadillo, Pygopus (Pygo) und Legless (Lgl)/Bcl9. Die Bindung von Pangolin an Armadillo wird von Legless/Bcl9 nicht beeinflusst, dieses dient einzig als Adaptorprotein zur zusätzlichen Rekrutierung von Pygopus (Thompson et al., 2002), was in einer stärkeren SuperTOPFlash-Reporteraktivität resultiert (Kramps et al., 2002, Städeli und Basler, 2005). dCBP ist eine Histonacetyltransferase, welche über Armadillo an die WREs rekrutiert wird und eine Zielgenaktivierung induziert. dCBP acetyliert Pangolin an einem konservierten Lysin-25 in der Armadillo Bindedomäne (Mosimann et al., 2009). Für dasselbe Lysin konnte allerdings auch gezeigt werden, dass die Acetylierung die Affinität zu Armadillo reduziert und somit eine Zielgenrepression einleitet (Waltzer und Bienz, 1998). Zusätzlich zu Groucho wurde mit Coop (co-repressor of Pangolin) ein weiterer Ko-Repressor identifiziert. Dabei konkurriert Coop mit Armadillo um die Bindung von Pangolin. Die Überexpression von Coop in Flügelimaginalscheiben führte zu einer reduzierten Distalless-Expression, Coop-Verlustmutanten induzierten eine erhöhte Distalless-Expression (Song et al., 2010). Eine spezifische Rolle in der Reprimierung in *Drosophila* kommt auch CtBP zu. Die Funktion von CtBP ist dabei bifunktional. Überexpressionsstudien in Flügelimaginalscheiben führten zu einer verringerten Expression des Wg-Zielgens *senseless*, aber auch zu einer verstärkten *distalless*-Expression. Reporteranalysen in

Drosophila Kc-Zellen bestätigten die Bifunktionalität von CtBP. Chromatin-Immunopräzipitationsstudien zeigten auf, dass die Bindung an die WREs unabhängig von Pangolin erfolgt. In Wg inaktiven Zellen führte CtBP zu einer basalen Repression von *nkd* (*naked cuticle*). Durch die Signalweg-Aktivierung wird die Repression aufgehoben (Fang et al., 2006).

In Pangolin Verlust-Studien war die Expression der Zielgene *distalless* und *vestigial* verringert und die Flügel wiesen charakteristische Einkerbungen an den Flügelrändern auf. Dies lässt auf Pangolin als Aktivator schließen (Schweizer et al., 2003). Überraschenderweise führte auch die Überexpression von Pangolin im Flügel zu einem Phänotyp der dem der Wingless-Mutanten entspricht (Blair, 1992, Phillips und Whittle, 1993). Dies wiederum impliziert, dass Pangolin einen inhibitorischen Effekt auf die Entwicklung der Flügelmargin ausübt. Dieser inhibitorische Effekt beruht auf der Interaktion mit Groucho (Lawrence et al., 2000). Insgesamt führt sowohl die Aktivierung als auch die Reprimierung des Wg-Signalwegs zu ein und demselben Phänotyp an der Flügelmargin.

Ein großes Arbeitsfeld beschäftigt sich derzeit damit, inwieweit die Modulation von Pangolin in aktiv oder repressiv durch die Bindung der Cystein-Klammer an unterschiedliche DNA-Elemente beeinflusst wird. Im derzeitigen Modell wird die Interaktion von Pangolin und Armadillo sowohl für die Zielgenaktivierung als auch für die -reprimierung benötigt. Die Bindung von Pangolin/Armadillo an unterschiedliche Ziel-Sequenzen beeinflusst die Aktivierung/Reprimierung diverser Zielgene. Im klassischen Fall, wie bei *nkd* und *CG6234*, führt die Bindung von Pangolin/Armadillo an CCTTTGWW zur Rekrutierung von Ko-Aktivatoren und infolgedessen zur Zielgenaktivierung (Fang et al., 2006). Durch die Bindung von Pangolin/Armadillo an eine neue, allosterische Zielsequenz AGAWAW, wird eine Repression der Zielgentranskription von *Ugt36Bc*, *Peroxidasin (Pxn)* und *Tiggrin (Tig)* induziert. Die Spezifität der beiden unterschiedlichen Ziel-Sequenzen wurde durch den Austausch der beiden Sequenzen im Analysesystem bestätigt (Blauwkamp et al., 2008). Die Bifunktionalität von Pangolin wird also durch die Bindung an unterschiedliche WREs beeinflusst. Zusätzlich zu den verschiedenen HMG-Sequenzen wurden weitere modulierende DNA-Sequenzen, die Helfersstellen, gefunden. Eine

basale Repression konnte im Mitteldarmepithel bei *pxb* detektiert werden. Durch die Mutation zweier HMG-Stellen im WRE von *pxb* wurde die basale Repression unterbunden, die Mutation von zwei in der Nähe liegenden Helferstellen führte zu milden Veränderungen. Der aktivierende Einfluss der Cystein-Klammer konnte in Rekonstitutionsexperimenten gezeigt werden (Bhambhani et al., 2014). Die Cystein-Klammer ermöglicht die Bindung von Pangolin und den Vertebraten Tcf1E und Tcf4E Varianten an eine größere Anzahl an DNA-Bindemotiven und verstärkt dadurch die transkriptionelle Aktivierung. Die Cystein-Klammer kann dabei sowohl an DNA-Helfermotive, als auch an WREs binden (Hoverter et al., 2014).

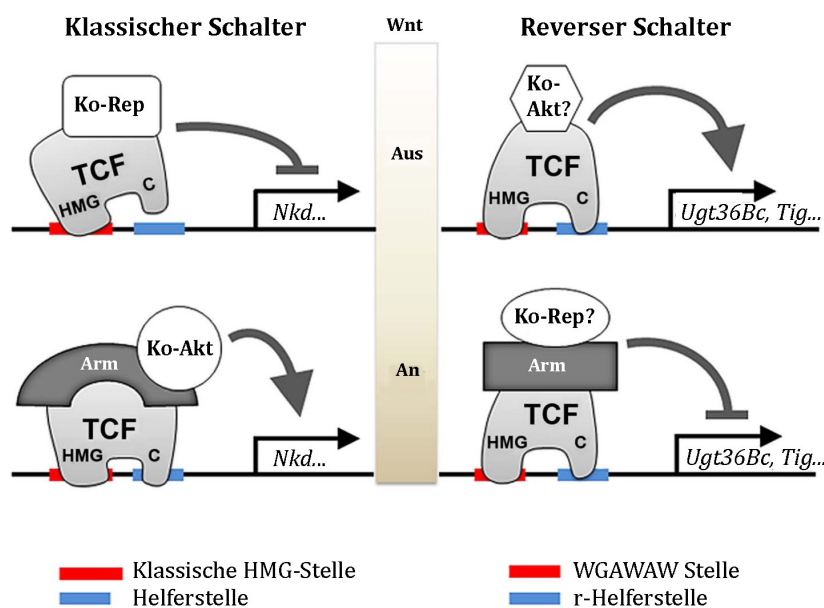


Abbildung 1.5: Modell über die Auswirkung der dTcf-Funktion in Abhängigkeit diverser DNA-Bindemotive sowie der Bindung durch die HMG-Box und der Cystein-Klammer

Das Schema zeigt auf der linken Seite die klassische Umschaltung, bei der Pangolin in inaktivierten Zellen in einem Komplex mit einem Ko-Repressor an die WRE bindet. Nach der Aktivierung durch Wg verdrängt Armadillo den Ko-Repressor und rekrutiert einen Ko-Aktivator. Dies führt zur zusätzlichen Bindung der Cystein-Klammer an ein Helferelement und somit zur Induktion der Zielgenexpression. Auf der rechten Seite ist die reverse transkriptionelle Umschaltung dargestellt. Pangolin bindet mit der HMG-Domäne an die alternative HMG-Bindestelle und mit der Cystein-Klammer an die alternative Helfersequenz. Die Bindung an beide DNA-Domänen ist essentiell für die Aktivierung der Zielgenexpression in inaktiviertem Zustand. Die Bindung von Armadillo an Pangolin induziert die Inhibition der Zielgenexpression. Mögliche Ko-Aktivatoren und -Repressoren können das Modell vervollständigen. Verändert nach Zhang, 2014.

2. Zielsetzung

Die evolutionäre Entwicklung des ursprünglich singulären Transkriptionsfaktors des Wnt-Signalwegs führte in der Vertebratenlinie zu einer Vervielfachung der Lef/Tcfs. Invertebraten, einschließlich *D. melanogaster*, exprimieren nur ein einziges Tcf, das in der Fliege Pangolin genannt wird. In Vertebraten konnten dagegen mit Lef, Tcf1, Tcf3 und Tcf4 vier verschiedene nukleäre Wnt-Mediatoren identifiziert werden, die auf Grund funktionaler Studien und Stammbaumanalysen in die Geschwistergruppen Lef/Tcf1 und Tcf3/Tcf4 eingeteilt wurden. Den einzelnen Transkriptionsfaktoren wurden dabei unterschiedliche Funktionen übertragen. Sie agieren stark kontextabhängig, konnten aber in Rekonstitutionsexperimenten in *X. laevis* durch Pangolin ersetzt werden (Klingel et al., 2012). Dies bedeutet, dass der gemeinsame Vorfahre der Vertebraten Tcf die Eigenschaften aller *Xenopus laevis* Tcfs vereint hat und Pangolin diesem ursprünglichen Tcf ähnlich ist. Im Modelorganismus *D. melanogaster* soll in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, welches der vier *Xenopus* Lef/Tcfs dem ursprünglichen Tcf am ähnlichsten ist, also Pangolin in der Fliege ersetzen kann. Neben morphologischen Veränderungen der Gesamtflügel dienen dabei auch Expressionsanalysen des Wg-Zielgens *distalless* in Flügelimaginalscheiben und Reportergerstudien in transfizierten *Drosophila*-Zellen als Analysesystem.

Die Übertragung distinkter Funktionen auf die einzelnen Lef/Tcfs beruht vermutlich auf subtypspezifischen Ko-Faktoren. In einem Hefe-2-Hybridsystem sollen demnach neue Bindungspartner der schwach konservierten Bereiche der *Xenopus* Lef/Tcfs identifiziert werden. Da eine hohe kontext-abhängige funktionale Divergenz der Lef/Tcfs in mesodermalem Gewebe beschrieben ist, sollte für das Hefe-2-Hybridsystem eine cDNA Bibliothek aus mesodermal-induzierten animalen Kappen synthetisiert werden.

Punktmutationen in regulatorischen Domänen des C-Terminus von XTcf4E sollen die Einflüsse einer akzessorischen DNA-Bindedomäne (Cystein-Klammer) und der Rekrutierung eines Ko-Repressors (CtBP) auf die subtypspezifische Zielgenregulation aufzeigen.

3. Material

3.1 Antikörper

Tabelle 3.1: Primärantikörper

In der vorliegenden Arbeit verwendete Primärantikörper mit Angaben zur Verdünnung, dem Wirt und der Herkunft. WB= Western Blot, IF=Immunfärbung, PLA=Proximity Ligation Assay

| Antikörper | Wirt | Verdünnung | Quelle/Referenz |
|----------------------|-----------|----------------------------|------------------------------------|
| α -distalless | Ziege | IF 1:50 | Santa Cruz Biotechnology Inc., USA |
| Tcf-1 | Ratte | WB unverdünnt | Ralph Rupp, München |
| Tcf-3/4 | Ratte | WB unverdünnt | Ralph Rupp, München |
| α -Flag | Maus | WB/ IF /PLA 1:2000 | Sigma-Aldrich, St- Louis, USA |
| α -6x His | Kaninchen | WB 1:2000 IF/PLA: 1:400 | abcam, Cambridge, UK |
| β -Catenin | Maus | WB 1:2000 | BD Bioscience, USA |
| PLA Probe Minus | Maus | PLA 1:5 | Sigma-Aldrich, St- Louis, USA |
| PLA Probe Plus | Kaninchen | PLA 1:5 | Sigma-Aldrich, St- Louis, USA |

Tabelle 3.2: Sekundärantikörper

In der vorliegenden Arbeit verwendete Sekundärantikörper mit Angaben zur Verdünnung, dem Wirt, der Herkunft und dem Konjugat. WB= Western Blot, PLA=Proximity Ligation Assay, ISH: *In situ* Hybridisierung

| Antikörper | Wirt | gerichtet gegen/ Konjugat | Verdünnung | Quelle/ Referenz |
|--------------------------|-------|---|-------------|--|
| G α M-AP | Ziege | Maus IgG/alkalische Phosphatase | WB 1:2000 | Dianova GmbH, Hamburg |
| G α R-AP | Ziege | Ratte IgG/alkalische Phosphatase | WB 1:2000 | Dianova GmbH, Hamburg |
| G α Rab-AP | Ziege | Kaninchen IgG/AP | WB 1:2000 | Jackson ImmunoResearch Europe Ltd, Suffolk, UK |
| D α G-Cy3 | Esel | Ziege IgG/Cy TM -3 | IF 1:100 | Dianova GmbH, Hamburg |
| G α R-Cy3 | Ziege | Ratte IgG/Cy TM -3 | IF 1:400 | Dianova GmbH, Hamburg |
| G α Rab-Cy2 | Ziege | Kaninchen IgG/ Cy TM -2 | IF 1:400 | Jackson ImmunoResearch Europe Ltd, Suffolk, UK |
| PLA Probe Minus | Esel | Maus | PLA 1:5 | Sigma-Aldrich, St- Louis, USA |
| PLA Probe Plus | Esel | Kaninchen | PLA 1:5 | Sigma-Aldrich, St- Louis, USA |
| α -Digoxigenin-AP | Schaf | Fab-Fragment/ alkalische Phosphatase | ISH 1:30000 | Roche Diagnostics, Mannheim |

3.2 Enzyme

Tabelle 3.3: Enzyme

| Enzym | Bezugsquelle |
|---------------------------------------|--|
| BsrGI Restriktionsendonuklease | New England Biolabs, Frankfurt am Main |
| GoTaq® DNA Polymerase | Promega, Mannheim |
| Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase | New England Biolabs, Frankfurt am Main |
| Turbo <i>Pfu</i> Polymerase | Stratagene, La Jolla, CA, USA |
| Proteinase K | Merk, Darmstadt |
| M-MLV Reverse Transkriptase | Promega, Mannheim |
| PureLink™ DNase | Invitrogen™, Life Technologies GmbH, Darmstadt |
| Restriktionsendonukleasen | Promega, Mannheim |
| RNase A | AppliChem GmbH, Darmstadt |
| T4 DNA Ligase | Promega, Mannheim |
| T4 DNA Ligase | TAKARA BIO INC., Shiga, Japan |
| T4 DNA Polymerase | Promega, Mannheim |

3.3 Bakterienstämme

Tabelle 3.4: Bakterienstämme

| Bakterienstamm | Genotyp | Hersteller |
|---------------------------------------|---|--|
| DH5α™ | <i>F-φ80lacZΔM15Δ(lacZYA-argF)U169 recA1 endA1 hsdR17(rk-, mk-) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ-</i> | Invitrogen™, Life Technologies GmbH, Darmstadt |
| ElectroMAX™ DH10B™ | <i>F-mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC)Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 endA1 araD139Δ(ara, leu)7697 galU galK-rpsL nupG</i> | Invitrogen™, Life Technologies GmbH, Darmstadt |
| JM109 | <i>endA1 recA1 gyrA96 thi hsdR17 (r_km_k⁺) relA1 supE44 Δ(lac-proAB) F' (traD36proAB+, lacI^qlacZΔM15)</i> | Promega, Mannheim |
| One Shot® TOP10 Chemically Competent™ | <i>F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 Δ lacX74 recA1 araD139 Δ(ara,leu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG</i> | Invitrogen™, Life Technologies GmbH, Darmstadt |
| One Shot® TOP10 Electrocomp™ | <i>F-mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC)φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 endA1 araD139Δ(ara, leu)7697 galU galK - rpsL nupG</i> | Invitrogen™, Life Technologies GmbH, Darmstadt |

3.4 Hefestamm

Tabelle 3.5: Hefestamm

| Hefestamm | Genotyp | Hersteller |
|-----------|---|--|
| MaV203 | <i>MATα; leu2-3,112; trp1-901; his3Δ200;ade2-101; cyh2^R; can1^R; gal4Δ; gal80Δ; GAL1::lacZ; HIS3UASGAL1::HIS3@LYS2; SPAL10::URA3</i> | Invitrogen™, Life Technologies GmbH, Darmstadt |

3.5 Zelllinien

Tabelle 3.6: Zelllinien

| Zelllinie | Herkunft |
|-----------|--|
| Hek293 | humane embryonale Nierenzellen |
| HeLa | humane Zervixkarzinomzellen |
| S2R+ | <i>Drosophila melanogaster</i> Flügelimaginalscheiben Zellen Rezeptor Plus |

3.6 Fliegenstämme

Tabelle 3.7: UAS-Fliegenstämme

In der vorliegenden Arbeit verwendete UAS-Fliegenstämme mit Information über den chromosomalen Insertionsort, Herkunft und Stocknummer

| UAS-Stämme | Name/ Stocknummer | Insertionsort | Herkunft |
|----------------|-----------------------|----------------|---|
| UAS-LacZ | BDSC Stock-Nr.:8530 | II. Chromosom | Bloomington Drosophila Stock Center, Indiana, USA |
| UAS-eGFP | - | II. Chromosom | Chaudhary, DKFZ Heidelberg |
| UAS-PanRNAi KK | VDRC Stock Nr.:108697 | II. Chromosom | Vienna Drosophila Resource Center |
| UAS-PanRNAi GD | VDRC Stock Nr.:25940 | III. Chromosom | Vienna Drosophila Resource Center |
| UAS-Xlef | 8033-1-4M-Ch2 | II. Chromosom | BestGene Inc., Chino Hills, USA |
| UAS-Xlef | 8033-1-5M-Ch3 | III. Chromosom | BestGene Inc., Chino Hills, USA |
| UAS-XTcf1 | 8590-1-4M-Ch2 | II. Chromosom | BestGene Inc., Chino Hills, USA |
| UAS-XTcf1 | 8590-1-5M-Ch3 | III. Chromosom | BestGene Inc., Chino Hills, USA |
| UAS-XTcf3 | 8033-2-M3-Ch2 | II. Chromosom | BestGene Inc., Chino Hills, USA |
| UAS-XTcf3 | 8033-2-M7-Ch3 | III. Chromosom | BestGene Inc., Chino Hills, USA |
| UAS-XTcf4 | 8033-3-M9-Ch2 | II. Chromosom | BestGene Inc., Chino Hills, USA |
| UAS-XTcf4 | 8033-3-M1-Ch3 | III. Chromosom | BestGene Inc., Chino Hills, USA |
| UAS-Pangolin | BDSC Stock-Nr.: 4838 | II. Chromosom | Bloomington Drosophila Stock Center, Indiana, USA |
| UAS-Pangolin | BDSC Stock-Nr.: 4837 | III. Chromosom | Bloomington Drosophila Stock Center, Indiana, USA |

Tabelle 3.8: Gal-4 Fliegenstämme

In der vorliegenden Arbeit verwendete Gal4-Treiberstämme mit Information über den chromosomalen Insertionsort und Herkunft.

| Gal4-Stämme | Information | Insertionsort | Herkunft |
|--------------|-------------|---------------|----------------------------|
| Patched-Gal4 | - | II. Chromosom | Büchling, DKFZ, Heidelberg |
| MS1096-Gal4 | homozygot | X Chromosom | Basler, Zürich, Schweiz |

Tabelle 3.9: Andere Fliegenstämme

| Fliegenstamm | Genotyp |
|---------------|---------------------------------|
| Balancerstamm | <i>If/CyOGFP;MKRbS/Tm3, Ser</i> |
| YellowWhite | <i>yw; ;</i> |

3.7 Kits

Tabelle 3.10: Kits

| Kit | Bezugsquelle |
|--|--|
| Ambion mMessage mMachine High Yield Capped RNA Transcription Kit | Invitrogen™, Life Technologies GmbH, Darmstadt |
| CloneMiner™ II cDNA Library Construction Kit | Invitrogen™, Life Technologies GmbH, Carlsbad, USA |
| DIG RNA Labeling Kit (Sp6/T7/T3) | Roche Applied Science, Mannheim |
| Duolink® In Situ Orange Starter Kit Mouse/Rabbit | Sigma-Aldrich, St- Louis, USA |
| High Pure PCR Produkt Purification Kit | Roche Applied Science, Mannheim |
| High Pure RNA Isolation Kit | Roche Applied Science, Mannheim |
| illustra ProbeQuant G-50 Columns | GE Healthcare, Solingen |
| NucleoBond Xtra Midi Kits | Macherey Nagel GmbH, Düren |
| ProQuest™ Two-Hybrid System | Invitrogen™, Life Technologies GmbH, Carlsbad, USA |
| Renilla Luciferase Assay System | Promega, Mannheim |
| RNA 6000 Nano Kit | Agilent Technologies, Waldbronn |
| RNeasy® MinElut® Cleanup | Quiagen, Hilden |
| TRIzol® Plus RNA Purification Kit | Invitrogen™, Life Technologies GmbH, Darmstadt |
| Zymoprep™ Yeast Plasmid Miniprep II | The Epigenetics Company™, Freiburg |

3.8 Primer/ Oligonukleotide

Alle Primer wurden von biomers.net GmbH (Ulm) bezogen.

Tabelle 3.11: Klonierungsprimer

| Name | Sequenz | Annealing Temperatur |
|----------------|------------------------------------|----------------------|
| Xlef-TOPO.fwd | 5'-CACCCCCAGCAGCAACAGTC-3' | 62 °C |
| Xlef-TOPO.rev | 5'-CTACTGTTTCGTGGTGTGGTTTCATGTGC3' | 63 °C |
| XTcf1-TOPO.fwd | 5'-CACCTCACATCCCCGAGTC3' | 58 °C |
| XTcf1-TOPO.rev | 5'-CTATGGCTCTGAATGTTGCTTCATTC-3' | 58 °C |

| | | |
|-----------------------------|---|-------|
| XTcf3-TOPO.fwd | 5'-CACCCACAGCAGCGATTTCG-3' | 60 °C |
| XTcf3-TOPO.rev | 5'-CTAAACTACCACATTGGACTTCGTGC-3' | 60 °C |
| XTcfCRD-TOPO.fwd | 5'-CACCCCCACAGCTCGTCG-3' | 63 °C |
| XTcf4CRD-TOPO.rev | 5'-CTAGAATCCTGATGTTTCGAGCTGTGGG-3' | 62 °C |
| XTcf4E-TOPO.fwd | 5'-CACCCAGCAAGGAGAGGCC-3' | 61 °C |
| XTcf4E-TOPO.rev | 5'-CTACTCTAAGGGTTTGGTGACCAGGG-3' | 62 °C |
| DYNLL2_EcoRI.fwd | 5'-GAATTCATGTCTGACAGAAAGGCTGTTATC-3' | 56 °C |
| C-His_DYNLL2.rev | 5'-CTAGTGGTGGTGGTGGTGGTGGCCAGACTTAAAGAGGAGAATTGC-3' | 56 °C |
| His-tag_XhoI.rev | 5'-CTCGAGCTAGTGGTGGTGGTGGTG-3' | 64 °C |
| PLSCR1 N-term MEM,EcoRI.fwd | 5'-GAATTCATGGAAATGAAAAATGGCAATGAACCGAACC-3' | 59 °C |
| PLSCR1_C-HA,XhoI.rev | 5'-CTCGAGCTACTGGAACATCGTATGGGTAGTTATTGTTACTATGTTCAAAAAATG-3' | 52 °C |
| PLSCR1_C-His,XhoI.rev | 5'-CTCGAGCTAGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTTATTGTTACTATGTTCAAAAAACATG-3' | 52 °C |

Tabelle 3.12: Mutageneseprimer

| Name | Sequenz | Annealing Temperatur |
|-------------------|--|----------------------|
| XTcf4E 1.C.fwd | 5'-CCTGAGCGCTCCTAAGAAAGCTCGAGCGCGCTTTGGCATTG-3' | 75 °C |
| XTcf4E 1.C.rev | 5'-CAATGCCAAAGCGCGCTCGAGCTTTCTTAGGAGCGCTCAGG-3' | 75 °C |
| XTcf4E 3.C.fwd | 5'-GCAGAATAACTGGTGCGGTCCCCTAGAAAGGAAAAAGAAGTGCATTTCGC-3' | 73 °C |
| XTcf4E 3.C.rev | 5'-GCCAATGCACTTCTTTTCTTCTAGCGGGACCGCACAGTTATTCTGC-3' | 73 °C |
| XTcf4E 1.PLSL.fwd | 5'-CAAACCACAACTGAACAACTCAAGCTTTTCTGCTACCTTGAAACCCGACCCCTGAC-3' | 75 °C |
| XTcf4E 1.PLSL.rev | 5'-GTCAGGGGGTCCGGTTTCAAGGTAGCAGAAAGAGCTTGAGTTTGTTCAGTTTGTGGTTTG-3' | 75 °C |

Tabelle 3.13: Analyse-Primer

| Name | Sequenz | Annealing Temperatur |
|---------------|-------------------------------|----------------------|
| prey.fwd | 5'-TATAACGCGTTTGGAACTCACT-3' | 58 °C |
| bait.fwd | 5'-AACCGAAGTGCGCCAAGTGTCTG-3' | 58 °C |
| bait,prey.rev | 5'-AGCCGACAACCTTGATTGGAGAC-3' | 58 °C |

Tabelle 3.14: Primer für die qRT-PCR

| Name | Sequenz | Annealing Temperatur |
|-------------------|----------------------------------|----------------------|
| ODC_realtime.fwd | 5'-CATTGCAGAGCCTGGGAGATA-3' | 63 °C |
| ODC_realtime.rev | 5'-TCCACTTTGCTCATTCCACATAAC-3' | 63 °C |
| XBra_realtime.fwd | 5'-TTC AGC CTG TCT GTC AAT GC-3' | 57 °C |
| XBra_realtime.rev | 5'-TGA GAC ACT GGT GTG ATG GC-3' | 57 °C |

3.9 Vektoren

Tabelle 3.15: Klonierungs- und Expressionsvektoren

| Vektor | Referenz |
|-----------------------------|------------------------------|
| pCS2+ | R. Rupp, München |
| pDest22 | Life Technologies, Darmstadt |
| pDest32 | Life Technologies, Darmstadt |
| pDONR221 | Life Technologies, Darmstadt |
| pENTR/D-TOPO | Life Technologies, Darmstadt |
| pEXP32Krev1 | Life Technologies, Darmstadt |
| pEXP22Ral/GDS wt | Life Technologies, Darmstadt |
| pEXP22Ral/GDSm1 | Life Technologies, Darmstadt |
| pEXP22Ral/GDSm2 | Life Technologies, Darmstadt |
| pGEM®-T Easy Vector Systems | Promega, Mannheim |
| pGEM®-T Vector Systems | Promega, Mannheim |
| pBluescript SK+ | addgene, Cambridge, MA |

3.10 Plasmid-Konstrukte

Tabelle 3.16: Plasmid-Konstrukte

IF: Immunfärbung, PLA: Proximity Ligation Assay

| Konstrukt | Vektor | Verwendung | Referenz |
|---------------|---------|---------------------------|---------------------|
| Xlef CRD | pDest32 | Hefe-2-Hybridsystem | vorliegende Arbeit |
| XTcf1 CRD | pDest32 | Hefe-2-Hybridsystem | vorliegende Arbeit |
| XTcf3 CRD | pDest32 | Hefe-2-Hybridsystem | vorliegende Arbeit |
| XTcf4 CRD | pDest32 | Hefe-2-Hybridsystem | vorliegende Arbeit |
| XTcf4 E-Tail | pDest32 | Hefe-2-Hybridsystem | vorliegende Arbeit |
| DYNLL2 | pDest22 | Hefe-2-Hybridsystem | vorliegende Arbeit |
| PLSCR1-His | pDest22 | Hefe-2-Hybridsystem | vorliegende Arbeit |
| XTcf1UTR-flag | pCS2+ | Reportergenassay, PLA, IF | Mansperger, München |

| | | | |
|-------------------------|----------------|-------------------------------|-------------------------------|
| XLefmyc | pCS2+ | Reportergenassay | D. Gradl, Karlsruhe |
| XTcf4Cmyc | pCS2+ | Reportergenassay | D. Gradl, Karlsruhe |
| XTcf4Amyc | pCS2+ | Reportergenassay | D. Gradl, Karlsruhe |
| XTcf4CE | pCS2+ | Reportergenassay | Ghogomu, Masterarbeit |
| DYNLL2-His | pCS2+ | Reportergenassay, PLA, IF | vorliegende Arbeit |
| PLSCR1-His | pCS2+ | Reportergenassay | vorliegende Arbeit |
| β -Galactosidase | pCS2+ | Reportergenassay | Klingel et al., 2012 |
| dTcf Luc | pGL3 | Reportergenassay | Büchling et al., 2011 |
| Rpl128-RL | pGL3 | Reportergenassay | Bartscherer et al., 2006 |
| SuperTOPFlash | pGL3 | Reportergenassay | Klingel et al., 2012 |
| Siamois | pGL3 B | Reportergenassay | Brannon et al., 1997 |
| β -Catenin (S33A) | pCS2+ | Reportergenassay | O. Huber, Jena |
| pAct-Wg | pAct5.1 | Reportergenassay | V. Chaudhary, DKFZ Heidelberg |
| PLSCR1-His | pGEMT | <i>In situ</i> Hybridisierung | vorliegende Arbeit |
| DYNLL2-His | pBluescriptSK+ | <i>In situ</i> Hybridisierung | vorliegende Arbeit |
| PLSCR1-His | pBluescriptSK+ | <i>In situ</i> Hybridisierung | vorliegende Arbeit |

3.11 Lösungen und Puffer

Alle verwendeten Lösungen wurden entweder autoklaviert oder aus sterilen Stammlösungen mit A. bidest. oder DEPC (Diethyl-Pyrocbonat) H₂O verdünnt. Nicht autoklavierbare Chemikalien, wie zum Beispiel Aminosäuren, Methanol und Tween20, wurden bei Bedarf durch Sterilfiltration (Porendurchmesser 0.2 μ m) entkeimt.

Tabelle 3.17: Lösungen und Puffer

| Name der Lösung | Zusammensetzung |
|---|---|
| 4 % Paraformaldehyd/APBS | 4 g Paraformaldehyd bei 55 °C in 60 ml A. bidest. und 200 μ l 1 M NaOH lösen, filtrieren, Zugabe von 10 ml 10x APBS und mit A. bidest. auf 100 ml auffüllen; pH 7.4, Lagerung bei -20 °C |
| Alkalischer Phosphatase Puffer (Western Blot) | 100 mM NaCl, 100 mM Tris/HCl pH 9.5 |
| Aminosäuremix | Je 2 g Adeninsulfat, Alanin, Arginin, Asparaginsäure, Asparagin, Cystein, Glutaminsäure, Glutamin, Glycin, Isoleucin, Lysin, Methionin, Phenylalanin, Prolin, Serin, Threonin, Tyrosin, Valin |
| Ampicillin Stammlösung 1000x | 100 mg/ml; Lagerung bei -20 °C |

| | |
|---|--|
| APBS 10x | 27 mM KCl, 1.5 mM KH ₂ PO ₄ , 1.03 M NaCl, 7 mM Na ₂ HPO ₄ ; pH 7.5 mit NaOH |
| BBT (Blockierungspuffer IF) | 1x PBS 0.1 % (w/v) BSA, 0.1 % (v/v) TritonX-100 |
| Betäubungslösung (<i>Xenopus</i>) | 2.5 g/l Aminobenzoessäure-Ethylester in A. bidest.; pH 7.4 mit NaOH; Lagerung bei 4 °C |
| Blockierungspuffer (Western Blot) | 10 % Magermilchpulver in TBS-T |
| Blockierlösung IF HeLa-Zellen | 1x PBT mit 20 % Pferdeserum |
| Blotpuffer | 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0.1 % (w/v) SDS, 20 % (v/v) Ethanol |
| Cysteinhydrochloridlösung | 2 % (w/v) Cysteinhydrochlorid in 0.1x MBSH, pH 8.0 mit NaOH |
| DAPI-Lösung (4',6-Diamidin-2-phenylindol) | Stammlösung: 1 mg/ml DAPI in DMF, Lagerung bei -20 °C im Dunkeln. Gebrauchslösung: Stammlösung 1:1000 in 1x PBT |
| DMEM Einfriermedium | 40 % (v/v) DMEM-Komplettmedium, 40 % (v/v) DMSO, 20 % (v/v) inaktiviertes FCS; Lagerung -20 °C |
| DMEM Komplettmedium | 89 % (v/v) DMEM High Glucose (4.5 g/l), 10 % (v/v) hitzeinaktiviertes FCS, 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin (100x) |
| Histidin Stocklösung | 100 mM Histidin-HCl in A. bidest. |
| HeBS 10x | 1.36 M NaCl, 0.05 M KCl, 7 mM Na ₂ HPO ₄ , 0.2 M HEPES, 1 % (w/v) Glukose; pH 7.1 mit NaOH |
| K-Puffer | 1x P-Puffer, 25 % Tween20, 5 µg/µl Proteinase K, immer frisch ansetzen |
| LB-Agarplatten | 1.5 % (w/v) Agar in 1x LB-Medium, selektive Agarplatten werden mit entsprechenden Antibiotika versetzt |
| LB-Medium | 5 % (w/v) Trypton, 2.5 % (w/v) Hefeextrakt, 5 % (w/v) NaCl mit A. bidest. auffüllen; pH 7.5 mit NaOH, Lagerung bei 4°C |
| Leucin Stocklösung | 100 mM Leucin in A. bidest. |
| LiAc 10x | 1 M Lithiumacetat, steril filtriert |
| 1x LiAc/40 % PEG- 3350/ 1x TE | 1x LiAc, 1x TE, 40 % (w/v) PEG 3350 |
| Lysispuffer Minipräparation | 0.2 M NaOH, 1 % SDS |
| Lysepuffer Minipräparation (Hefe) | 1 % (w/v) SDS, 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 50 mM Na ₂ -EDTA, pH 8.0 |
| Luziferaseassaypuffer | 33.3 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 1.07 mM MgCO ₃ *Mg(OH) ₂ , 2.67 mM MgSO ₄ , 20 mM Tricin |
| Luziferase Reagenz | 2.12 mg CoenzymA-Trilitiumsalz-Dihydrat, 1.32 mg Beetle-Luziferin, 2.92 mg ATP in 10 ml Luziferase Assay Puffer |

| | |
|--|--|
| Luziferase Lysispuffer | 25 mM Tris/H ₃ PO ₄ (pH 7.8), 2 mM EDTA, 2 mM DTT, 10 % (v/v) Glycerin, 1 % (v/v) TritonX-100 |
| Magnesium Lösung 100x | 0.1 M MgCl ₂ , 4.5 M β-Mercaptoethanol |
| MBSH 10x | 100 mM HEPES, 880 mM NaCl, 10 mM KCl, 8.2 mM MgSO ₄ , 24 mM NaHCO ₃ , 4.1 mM CaCl ₂ , 3.3 mM Ca(NO ₃) ₂ ; pH 7.4 mit NaOH |
| Mowiol/DABCO | 6 g Glycerin und 2.4 g Mowiol in 6 ml sterilem H ₂ O und 12 ml Tris/HCl (pH 7.8) laut Herstellerangaben lösen; 25 mg/ml DABCO hinzugeben, zentrifugieren 15 min bei 13000 rpm; Lagerung bei -20°C |
| Nährmedium (<i>Drosophila</i>) | 5 % (w/v) Maismehl, 3.2 % (w/v) handelsüblichen Zucker, 1.25 % (w/v) Agar, 2.4 % (w/v) Frischhefe, 1.5 % Propionsäure, 0.64 ‰ (w/v) 4-Hydroxybenzoesäuremethyl-ester in Ethanol gelöst, 2 Messerspitzen Ascorbinsäure, in 1000 ml H ₂ O |
| NBT/BCIP Färbelösung | 2 % NBT/BCIP Reagenz (v/v) in 1x AP-Puffer |
| Neutralisationspuffer Miniplasmidpräparation (Hefe) | 8 M Kaliumacetat |
| Neutralisationspuffer Miniplasmidpräparation | 2.8 M K-Acetate; pH 5.1 |
| ONPG Substrat | 4 mg/ml ONPG in 0.1 M NaPhosphat Puffer (pH 7.5) |
| Orange G DNA Ladepuffer 6x | 0.25 % (w/v) Orange G, 40 % (w/v) Saccharose in A. bidest., Lagerung bei 4 °C |
| PBS 10x | 27 mM KCl, 15 mM KH ₂ PO ₄ , 65 mM Na ₂ HPO ₄ , 1.37 M NaCl; pH 7.5 |
| PBT | 1x PBS, 0.1 % (v/v) TritonX-100 |
| P-Puffer 10x | 100 mM Tris-HCl, pH 9.0, 50 mM KCl, 15 mM MgCl ₂ |
| Resuspensionspuffer Miniplasmidpräparation | 100 µg/ml RNase A, 50 mM Tris/HCl (pH 8.0), 10 mM EDTA (pH 8.0) |
| RIPA-Puffer | 50 mM Tris/HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 % (v/v) TritonX-100, 0.1 % (w/v) SDS |
| Schneider S2 Kompletmedium | 89 % (v/v) RPMI Schneider S2 Medium (4.5 g/l), 10 % (v/v) hitzeinaktiviertes FCS, 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin (100x) |
| RPMI Medium | 89 % (v/v) RPMI High Glucose (4.5 g/l), 10 % (v/v) hitzeinaktiviertes FCS, 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin (100x) |

| | |
|---------------------------------|--|
| SC-Minimalmedium Platten (Hefe) | Lösung I: 13.4 g Hefe Nitrogenbase, 2.7 g Aminosäuremix-Pulver in 1 l A. bidest. aufnehmen, pH 5.9 mit NaOH einstellen Lösung II: 40 % Agar (w/v) 900 ml A. bidest., Lösung I und II autoklavieren. Beide Lösungen mischen und bei 50 °C 1 h schütteln. Zugabe von 10 % 40 %ige Glucose |
| SD-Medium Platten (Hefe) | SC-Minimalmedium + 1.6 % Aminosäurestocklösung (Leucin, Tryptophan, Histidin-HCl, Uracil) |
| SDS-Elektrophorespuffer 10x | 1 % (w/v) SDS, 250 mM Tris, 1.92 M Glycin |
| SDS-Ladepuffer 5x | 0.5 M Tris-HCl (pH 6.8), 12 % (w/v) SDS, 30 % (v/v) Glycerin, 5 % (v/v) β -Mercaptopropandiol, 0.2 % (w/v) Bromphenolblau |
| SOB-Medium | 2 % (w/v) Trypton, 0.5 % (w/v) Hefeextrakt, 0.05 % (w/v) NaCl, 0.25 % (w/v) MgCl ₂ , pH 7.0 mit NaOH; Lagerung bei -20 °C |
| SOC-Medium | SOB-Medium mit 20 mM MgCl ₂ , 20 mM MgSO ₄ , 20 mM Glucose; Lagerung -20°C |
| TAE-Puffer 50x | 0.1 M EDTA, 1 M Essigsäure, 2 M Tris-Base |
| TBS 10x | 1.5 M NaCl, 500 mM Tris/HCl (pH 7,4) |
| TBS-T | 1x TBS mit 0.1 % (v/v) Tween20 |
| TE-Puffer | 0.1 mM EDTA, 10 mM Tris/HCl (pH 8.0) |
| TE-Puffer 10x (Hefe) | 100 mM Tris HCl, 10 mM EDTA pH 7.5 |
| Tryptophan Stocklösung | 40 mM Tryptophan in A. bidest. |
| Uracil Stocklösung | 20 mM in A. bidest. |
| Waschpuffer A 10x (PLA) | 0.01 M Tris, 0.15 m NaCl, 0.05 % Tween20, pH 7.4 |
| Waschpuffer B 1x (PLA) | 0.2 M Tris, 0.1 M NaCl, pH 7.5 |
| X-Gal Lösung | 5 % (w/v) X-Gal in N,N-Dimethylformamid |
| X-Gal Färbelösung | 0.01 % X-Gal Lösung, 0.006 % 2-Mercaptoethanol in Z-Puffer |
| YPAD-Medium (Hefe) | 10 g Bacto-Hefeextrakt; 20 g Bacto Pepton; 20 g Dextrose; 100 mg Adeninsulfat mit A. bidest. auffüllen auf 1000 ml |
| Z-Puffer | 8.52 g Na ₂ HPO ₄ ; 4.8 g H ₂ PO ₄ ; 0.75 g KCl; 0.012 g MgSO ₄ , mit A. bidest. auf 1000 ml auffüllen, steril filtrieren |

3.12 Chemikalien

Die nicht aufgeführten Reagenzien wurden über AppliChem GmbH (Darmstadt), Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe) oder Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München) bezogen.

Tabelle 3.18: Chemikalien

| Reagenz | Hersteller |
|--|---|
| 2-log DNA Marker | New England Biolabs, Frankfurt am Main |
| 5'-Fluorooticsäure | Thermo Fisher, Karlsruhe |
| Aktivin A | PeptoTech GmbH, Manufacture of Quality Cytokine Products, Hamburg |
| Agarose | Biozym, Rockland, USA |
| complete Protease Inhibitor, EDTA-frei | Roche Applied Science, Mannheim |
| Desoxyribonukleotide | Promega GmbH, Mannheim |
| Dextran, Oregon Green® 488 | Invitrogen GmbH, Karlsruhe |
| Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) High Glucose (4.5 g/l) | GE Healthcare Life Sciences, Pasching |
| FCS (Fetal Calf Serum) | Invitrogen™, Life Technologies GmbH, Darmstadt |
| iQ™ SYBR® Green Supermix | BioRad, Hercules, USA |
| Magermilchpulver | Sucofin, TSI GmbH & Co. KG; Zeven |
| Midori Green Advance | NIPPON Genetics EUROPE GmbH, Düren |
| Natriumdodecylsulfat (SDS) | Serva, Heidelberg |
| NBT/BCIP Stocksolution | Roche Applied Science, Mannheim |
| PageRuler™ Prestained Protein Marker | Fermentas GmbH, St. Leon-Rot |
| Penicillin/Streptomycin (100x) | PAA Laboratories GmbH, Pasching |
| Pferdeserum | Invitrogen™, Life Technologies GmbH, Darmstadt |
| PhosSTOP Phosphatase Inhibitor Cocktail Tabletten | Roche Applied Science, Mannheim |
| RNAlater® RNA Stabilization Solution | ambion®, Life Technologies GmbH, Darmstadt |
| RNAaseZap® RNase Decontamination Solution | ambion®, Life Technologies GmbH, Darmstadt |
| Trypsin EDTA (1x) | PAA Laboratories GmbH, Pasching |
| Turbofect™ <i>in vitro</i> transfection reagent | Thermo Fisher, Karlsruhe |
| RPMI-Medium | GE Healthcare Life Sciences, Pasching |
| Schneider's Medium | Biowest SAS, Nuaille, F |
| YPAD-Pulver für Platten | Dualsystems Biotech AG, Schlieren, CH |

3.13 Geräte

Tabelle 3.19: Geräte in der Zellkultur

| Gerät | Hersteller |
|--|---|
| Begasungsbrutschrank für Zellkultur Series II Water Jacketed CO ₂ Inkubator | Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA |
| Kühltischzentrifuge Hettich Universal 32 R | Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen |
| Medingen Wasserbad WB 12 | PD-Industriegesellschaft GmbH, Dresden |
| Sterilbank Microflow 2 Advanced Bio Safety Cabinet Class II | Bioquell Ltd, Hampshire, UK |
| Stickstofftank Thermo Cytotechnics Biorack 5400 | Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA |
| Vakuumpumpe Laboport N811KT.18 | KNF Neuberger GmbH, Freiburg |

Tabelle 3.20: Geräte in der Embryologie

| Gerät | Hersteller |
|--|---|
| Brutschrank APT.line™ Serie BD/ED/FD | Binder GmbH, Tuttlingen |
| Fliegenanlage | |
| 1. Zeiss Stemi DV4 Stereomikroskop | Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena |
| 2. Fliegenbett | Dominique Dutscher SA, Brumath, F |
| 3. Inject+Matic Sleeper | INJECT+MATIC, Genf, Schweiz |
| Kühlinkubator Model MIR-254 | SANYO Electric Co., Ltd., München |
| Mikro-Druckinjektor Model PV 820 | H. Saur Laborbedarf, Reutlingen |
| Mikromanipulator, Model M1 | H. Saur Laborbedarf, Reutlingen |
| Mikropipettenpuller Model P-97 | Sutter Instrument Company, Novato, USA |
| Stereomikroskop MIC 1639 ZS, ausgestattet mit EUROMEX Kaltlichtquelle EK-1 | EUROMEX Mikroskope BV, Arnheim, Niederlande |

Tabelle 3.21: Geräte für die Mikroskopie

| Gerät | Hersteller |
|---|------------------------------------|
| Spinning Disk Mikroskop Cell Observer SD, ausgestattet mit inversen Mikroskop Axio Observer.Z1, konfokale Bildaufnahme Yokogawa CSU-X1, drei Laserlinien (405,288,532/561 nm), Digitalkamera AxioCam MRm, Definite Focus, Uniblitz, Model VCM-D1 und externer Fluoreszenz Lichtquelle HXP 120 | Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena |

| | |
|---|------------------------------------|
| digitales Fluoreszenz-Stereomikroskop Leica MZ10F, ausgestattet mit externer Leica Kaltlichtquelle KL 1500 LCD, externer Fluoreszenz Lichtquelle Leica EL 6000 und Digitalkamera Retiga Exi Fast 1394 Color 12 bit | Leica Mikrosystems GmbH, Wetzlar |
| Axiovert 200 M inverses Mikroskop mit Camera Adaptor CMA-D2 | Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena |

Tabelle 3.22: Sonstige Geräte

| Gerät | Hersteller |
|--|--|
| Agilent 2100 Bioanalytiker | Agilent Technologies, Waldbronn |
| Blot-Apparatur Trans-Blot® SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell | Bio-Rad Laboratories, München |
| Colibri Microvolume Spectrometer | Titertek-Berthold, Pforzheim |
| Eppendorf® Thermomixer compact | Eppendorf AG, Hamburg |
| Eppendorf® Tischzentrifuge 5415D | Eppendorf AG, Hamburg |
| Flachbettelektrophoresekammer Perfect Blue™ Minigelsysteme | PEQLAB Biotechnologies GmbH, Erlangen |
| Folienschweißgerät SEVERIN Folie | SEVERIN Elektrogeräte GmbH, Sundern |
| Geldokumentationsanlage Gel Max mit monochromem Videoprinter Mitsubishi P91D und Fisher Bioblock Scientific UV- Tisch | INTAS Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen |
| Luminometer Lumat LB 9507 | Berthold Technologies, Bad Wildbad |
| Mini-Protean® 3 Cell/PowerPac 200/300 Stromversorgung | Bio-Rad Laboratories, München |
| Mini-Protean® 3 Electrophoresis System | Bio-Rad Laboratories, München |
| PCR Cycler, iCycler™ Thermal Cycler | Bio-Rad Laboratories, München |
| Plattformschüttler Unimax 2010 | Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach |
| Präzisions-pH-Meter pH521 | WTW GmbH, Weilheim |
| Sartorius Analysewaage BP 221S | Sartorius AG, Göttingen |
| Sartorius Präzisionswaage PT 310 | Sartorius AG, Göttingen |
| Tischkühlzentrifuge Eppendorf™ 5415 R | Eppendorf AG, Hamburg |
| Tischschüttelinkubator, Forma Optical Shaker Model 420 | Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA |
| Überkopffrotator INTELLI-MIXER RM-2 | ELMI Ltd., Riga, Litauen |
| UV/Visible Spectrophotometer, Ultospec™ 2100 pro | Amersham Bioscience, Freiburg |
| Wasserbad Modell WNB 7 | Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach |

3.14 Software

Tabelle 3.23:Software

| Software | Hersteller |
|---|---|
| 2100 Expert Version 2.8.0.520 | Agilent Technologies, Waldbronn |
| Adobe Illustrator CS5 Version 15.1.0 | Adobe Systems GmbH, München |
| Adobe Photoshop CS5 Extendet Version 12.0 | Adobe Systems GmbH, München |
| ApE-A Plasmid Editor V1.12 | M. Wayne Davis |
| Axio Vision Release 4.8.2 | Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena |
| ImageJ 1.45s | W. Rasband, USA |
| Microsoft Excel 2007 | Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim |
| Microsoft Word 2007 | Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim |

4. Methoden

4.1 Arbeiten mit *Drosophila melanogaster*

4.1.1 Haltung von *Drosophila melanogaster*

Die *Drosophila*-Stämme werden in Plastikröhrchen gehalten, welche mit Nährmedium befüllt und durch einen luftdurchlässigen Ceaprenstopfen verschlossen sind. Die Entwicklungsdauer vom Ei bis zur Imago ist abhängig von der Individuenzahl im Fliegenbehältnis, dem Genotyp, der Feuchtigkeit sowie der Temperatur. Die Entwicklung der Weibchen geht dabei schneller vonstatten als die der Männchen. Bei einer Temperatur von 18 °C dauert der durchschnittliche Generationszyklus 18 Tage, bei 25 °C verkürzt er sich auf 10 Tage. Das Umsetzen der Stammhaltung auf frisches Nährmedium sollte bei einer Temperatur von 18 °C spätestens nach drei Wochen geschehen, bei einer Haltung bei 25 °C bereits nach 14 Tagen.

4.1.2 Generierung homozygoter Fliegenstämme mit Hilfe von Balancer-Chromosomen

Zur Kreuzung neuer Fliegenlinien werden ausschließlich virginelle Weibchen verwendet. Diese lassen sich phänotypisch leicht identifizieren. Zum einen ist das Abdomen leicht aufgedunsen und sehr schwach pigmentiert, zum anderen tragen die Jungfrauen einen schwarzen Fleck auf der ventralen Seite des Abdomens. Zur Unterscheidung männlicher und weiblicher Jungfrauen hilft es nach dem Anusring zu schauen. Dieser ist bei männlichen Fliegen stärker pigmentiert als bei weiblichen. Zur Identifizierung werden die Imagos mit CO₂ betäubt und dann auf ein Fliegenbett gelegt. Dieses lässt kontinuierlich CO₂ ausströmen und hält somit die Betäubung aufrecht. Zur Kreuzung werden je drei Jungfrauen mit einem Männchen auf ein Futtergefäß gesetzt. Die parentale Generation sollte vor dem Schlüpfen der F1-Generation auf frisches Nährmedium gesetzt werden. So können genügend Nachkommen mit demselben Genotyp gewonnen werden ohne dass die parentale Generation sich mit der F1-Generation verkreuzt.

Zur Generierung homozygoter Fliegenstämme werden jeweils virginelle Weibchen der F1-Generation mit Männchen desselben Genotyps derselben F1-Generation verkreuzt. Die Verifizierung des Genotyps ist durch die Benutzung von Balancer-

Chromosomen gewährleistet. Balancer-Chromosomen sind genetisch veränderte Chromosomen, die ein Gen tragen, das phänotypisch leicht nachweisbar ist und gleichzeitig so verändert wurde, dass eine homologe Rekombination ausgeschlossen werden kann. Dies ist unter anderem von Vorteil, da so rezessiv letale Mutationen als stabile Stämme gehalten werden können. Fliegen, die das Balancer-Chromosom homozygot tragen sind nicht lebensfähig. Beispiele für Balancer-Chromosomen sind *curleyO* und *serrate*. CurleyO führt zu gekrümmten Flügeln, Serrate zu einem Teilverlust des Flügels am distalen Ende.

Tabelle 4.1: Verwendete Balancer-Chromosomen mit Namen, Insertionsort, Mutation und Merkmal

In dieser Tabelle sind einzig die phänotypischen Merkmale angegeben nach denen in vorliegender Arbeit selektiert wurde.

| Balancer | Chromosom | Name | Mutation | Merkmal |
|----------|-----------|---------------------------|--|--|
| CyO | 2 | Curley of Oster | In(2LR)O, <i>Cy1 dp^{lv1} pr1 cn2</i> | nach oben gewundene Flügel |
| IF | 2 | irregular facette | In(2R) <i>vg^U, wg^{Sp-1} vg^U mam^U Kr^{if-1}/ Sm5</i> | kleine Augen mit fusionierten Ommatidien |
| Tm3, Ser | 3 | Third multiple 3, Serrate | In(3LR)TM3, <i>knirⁱ⁻¹ p^p vvl^{sep} l(3)89Aa¹ Ubx^{bx-34e e1}</i> zusätzlich mit Ser markiert | Flügel tragen Kerbe am distalen Ende |
| MKRSb | 3 | Stubble | Tp(3;3)MRS, M(3)76A ¹ <i>kar¹ry² Sb¹</i> | dicke, kurze Borsten |

4.1.3 Regulierte Genexpression durch das UAS-Gal4-System

Das aus der Hefe stammende UAS-Gal4-System ist auch in *Drosophila melanogaster* anwendbar. Hierfür gibt es verschiedene Treiber-Linien (Gal4-Linien), die eine orts- und zeitspezifische Genexpression ermöglichen. Der Gal4-Promotor liegt dabei stromabwärts des genspezifischen Promotors. Nach dessen Aktivierung wird der Transkriptionsfaktor Gal4 exprimiert. Werden diese Fliegen mit Fliegen verkreuzt, deren Zielgen hinter einer UAS (engl.: upstream activating sequence) Einheit liegt, so bindet Gal4 an die UAS-Sequenz und induziert die Expression des Zielgens.

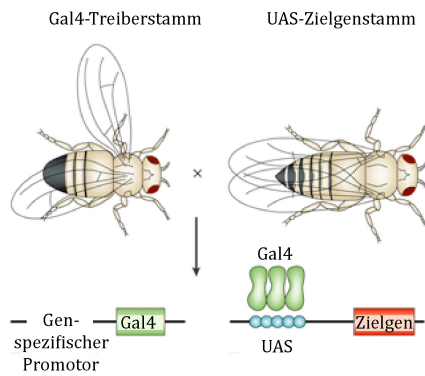


Abbildung 4.1: Das UAS-Gal4-System

Nach der Verkreuzung des Gal4-Treiberstammes mit dem UAS-Zielgenstamm induziert der gewebe- und zeitspezifische Promotor die Expression des Transkriptionsfaktors Gal4. Dieser bindet an die „upstream activating“-Sequenz (UAS) und induziert so die Zielgenexpression. Verändert nach St. Johnson, 2002.

4.1.4 Präparation adulter *Drosophila* Flügel

Nach dem Kreuzen der Jungfrauen des zu untersuchenden UAS-Stammes mit den entsprechenden Gal4-Treiber Männchen werden die F1-Fliegen mit CO₂ betäubt und in 80 % Ethanol überführt. So können die Imagos beliebig lange bei Raumtemperatur gelagert werden. Für die Flügelpräparation wird Ethanol durch Wasser ersetzt. Mit Hilfe zweier Pinzetten wird der Gesamtflügel zwischen Thorax und Flügelgelenk abgetrennt und auf einen mit Mowiol bedeckten Objektträger überführt. Es werden ausschließlich Flügel weiblicher Fliegen verwendet, die konstant bei 25 °C gehalten wurden.

4.1.5 Immunfärbung auf *Drosophila* Flügelimaginalscheiben

Imaginalscheiben sind Vorläuferstrukturen adulter Fliegenextremitäten. Diese sind mit Ausnahme der Genitalimaginalscheibe paarig angelegt. Bereits im Entwicklungsstadium 11 nach Campos-Ortega und Hartenstein, (1985), werden circa 20 Zellen aus der Epidermis ausgegliedert. Es entstehen sackartige Einstülpungen, deren Zellen während der weiteren Entwicklung proliferieren und sich unter anderem zu Flügeln, Augen, Halteren und Beinen differenzieren.

Die Larven des dritten Instarstadiums, deren Flügelimaginalscheiben sich bereits zu einem zweilagigen Gewebeverbund entwickelt haben, werden aus den Fliegengefäßen abgesammelt und in 1x PBS überführt. In kleinen Petrischalen werden die Larven mit der ersten Pinzette knapp distal des Pharynx gegriffen. Die zweite Pinzette fasst die Larven am Schwanzende. Durch eine ruckartige Bewegung wird die Larve zweigeteilt. Im proximalen Larventeil befinden sich nun die Imaginalscheiben, welche jetzt frei zugänglich für weitere Behandlungen sind. Die

Fixierung der Larvenkopfteile erfolgt für 23 Minuten mit 4 % PFA auf einem vertikalen Schüttler bei Raumtemperatur. Anschließend wird durch mehrmaliges Waschen mit PBT das PFA entfernt. Als Blockierlösung dient 0.1 % Albumin in PBT (BBT). Die Larvenproben sollten für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur in BBT inkubieren. Die primären Antikörper werden in BBT verdünnt und binden über Nacht bei 4 °C. Während den nächsten zwei Stunden werden die Proben mehrmals mit PBT gewaschen und so überschüssige ungebundene Antikörper entfernt. Der fluoreszierende Sekundärantikörper wird in PBT verdünnt. Die Larvenproben werden in dieser Lösung eine Stunde im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Erneut werden ungebundene Antikörper mit PBT ausgewaschen. Vor der endgültigen Präparation der Imaginalscheiben erfolgt eine Umpufferung in 1x PBS. Mittels zweier Pinzetten erfolgt die Freilegung der einzelnen Imaginalscheiben. Die freipräparierten Imaginalscheiben werden auf einen mit Mowiol bedeckten Objektträger überführt. Nach dem Trocknen des Mowioms sind die Präparate bei -20 °C lagerbar.

4.1.6 DNA-Extraktion und Genamplifikation aus *Drosophila melanogaster*

Zur Extraktion der DNA aus einer weiblichen Fliege wird diese mit CO₂ betäubt und auf Eis in ein 1.5 ml Reaktionsgefäß überführt. Mittels eines Pistills wird die Fliegenimago in 50 µl K-Puffer pro Fliege mechanisch homogenisiert. Der Proteinase K Verdau findet im Anschluss für eine Stunde bei 68 °C statt. Um die DNA von den verdauten Proteinen zu trennen, wird die Probe für fünf Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert. 15 µl des Überstandes dienen als Matrize für die anschließende PCR. Der restliche Überstand kann bei -20 °C gelagert werden.

Ein Ansatz zur Genamplifikation enthält:

| | |
|---------|---------------------------|
| 15.0 µl | Überstand |
| 6.0 µl | 10x Taq-Puffer Flexi |
| 4.5 µl | MgCl ₂ -Lösung |
| 2.5 µl | dNTP-Mix (10 mM) |
| 3.0 µl | Primermix (10 mM) |
| 29.0 µl | A. bidest. |

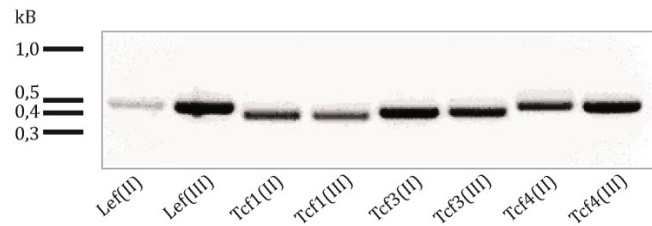


Abbildung 4.2: Verifizierung des Genotyps von *D. melanogaster*

Nach der DNA-Extraktion und darauffolgender PCR mit spezifischen Lef/Tcf-Primern wird das PCR-Produkt auf ein 1 %iges Agarosegel aufgetragen und durch Midori Green im UV-Licht visualisiert. Die Integration der Lef/Tcf-Gene im Fliegen genom konnte dadurch immer wieder bestätigt werden.

4.2 Arbeiten mit *Xenopus laevis*

4.2.1 Haltung von *Xenopus laevis*

In 50 l fassenden Aquarien werden die adulten *Xenopus laevis* nach Geschlecht getrennt gehalten. Das mit Hilfe von Bakterienfiltern und UV-Licht entkeimte Wasser zirkuliert dabei mit einer Temperatur zwischen 18 und 20 °C. Der durch eine Zeitschaltuhr regulierte Tag-Nacht Rhythmus wechselt die Belichtung im 12-Stunden-Takt. Zweimal wöchentlich werden die Frösche mit zerkleinerten Rinderherzen und Fertigfutter in Form von Pellets gefüttert. Alle drei Monate sind die Weibchen für die Eiablage bereit. Nach der Eiablage werden sie zur Vorbeugung von Infektionen und Hautreizungen für eine Nacht in separaten Wannen mit 3 g/l Meersalz gehalten.

4.2.2 Testisextraktion und Eiablage

Die Gewinnung der *Xenopus* Testis beginnt mit der Narkotisierung des Männchens in kalter 0.25 % (v/v) Aminobenzoesäure-Ethylester-Lösung. Nach etwa 25 Minuten wird der Tod des betäubten Männchens durch eine schnelle und schmerzfreie Durchtrennung der Halswirbelsäule herbeigeführt. Die Entnahme der Testis erfolgt durch einen medianen Schnitt entlang der Bauchdecke. Der Hoden befindet sich im dorsalen Fettgewebe ventral der Nieren. In 1x MBSH kann der Hoden bei 4 °C bis zu einer Woche gelagert werden.

Um die Eireifung zu stimulieren wird humanes Choriongonadotropin (hCG) subkutan in den Lymphsack der Froschweibchen injiziert. Abhängig vom gewünschten Zeitpunkt der Eiablage sind die Menge des zu injizierenden hCGs und der Injektionszeitpunkt. Bei einer Eiablage nach 12-14 Stunden werden 600 Einheiten

hCG injiziert. Eine Eiablage nach 20-22 Stunden erfordert zweimaliges injizieren. So werden zuerst 50 Einheiten und 5-6 Stunden vor der Eiablage erneut 600 Einheiten hCG injiziert. Zur Gewinnung der Eier werden die Weibchen durch eine sanfte Massage der Lendengegend zum Legen angeregt. Stündlich und bis zu viermal kann so ein Gelege gewonnen werden. Die Eier werden dabei in einer Petrischale aufgefangen und darin befruchtet.

4.2.3 *In vitro* Fertilisation

Die *in vitro* Fertilisation erlaubt eine zeitgleiche und somit synchrone Entwicklung der Eier eines Geleges. Die für einen Tag benötigte Menge des Hodens wird in sterilem 1x MBSH mazeriert. Die Suspension wird 1:10 mit sterilem H₂O verdünnt und auf das Gelege gegeben. Die verringerte Salzkonzentration führt bei den Spermien zu einer erhöhten Mobilität. Nach ca. 20 Minuten hebt sich die Gallerthülle und die befruchteten Embryonen drehen sich mit der pigmentierten animalen Seite nach oben. Der schwerere Dotter in der ventralen Seite sinkt dabei nach unten und löst diese Rotation der Embryonen aus.

4.2.4 Entfernen der Gallerthülle und Mikroinjektion

Eine Stunde nach der Befruchtung wird durch Zugabe einer 2 %igen Cysteinhydrochloridlösung die Gallerthülle unter Sichtkontrolle aufgelöst. Haften keine Zygoten mehr aneinander, so wird die Cysteinhydrochloridlösung durch dreimaliges Waschen mit 0.1x MBSH entfernt. Die toten, beschädigten oder nicht befruchteten Eier werden aussortiert.

Durch die extrakorporale Entwicklung der *Xenopus* Embryonen lassen sich durch die Injektion von mRNA, DNA oder Morpholino Oligonukleotiden sehr einfach Funktionsverlust- oder Gewinnstudien durchführen. Hierfür wird mit einer mechanisch gezogen Glaskapillare, einem Platin Eichgitter und N₂-Druck das Injektionsvolumen auf 4 nl festgelegt. Die Parameter zur Eichung der als Nadel dienenden Kapillare sind abhängig vom Öffnungsdurchmesser der Nadel und der Dauer des N₂-Druckintervalls. Je nach Fragestellung werden die 4 nl in unterschiedliche Blastomere injiziert. Für die Induktion sekundärer Körperachsen erfolgt die Injektion in die Marginalzone der beiden ventralen Blastomeren im 4-Zell-Stadium.

4.2.5 Embryonenpflege bei *Xenopus laevis*

Wie bei *Drosophila*, ist auch die Entwicklungsgeschwindigkeit der *Xenopus* Embryonen temperaturabhängig. Die Embryonen werden deshalb gemeinsam bei 16 °C +/- 5 °C in 0.1x MBSH kultiviert. Beim täglichen Kulturmedienwechsel werden tote Embryonen aussortiert. Die Charakterisierung der Entwicklungsstadien erfolgt nach Nieuwkoop und Faber (1967). Ist das gewünschte Entwicklungsstadium erreicht, werden die Embryonen in 1x MEMFA für eine Stunde bei Raumtemperatur fixiert. Zur endgültigen Lagerung bei 4 °C wird das MEMFA durch 100 % Ethanol ersetzt. Sollen die Embryonen zur RNA-Extraktion weiterverwendet werden, entfällt die Fixation. Stattdessen werden jeweils fünf Embryonen in *RNAlater* bei 4 °C gelagert.

4.2.6 Induktion mesodermalen Gewebes in animalen Kappen

Zur Induktion des Mesoderms in animalen Kappen wird die Aktivierung eines TGF β -Signalwegs benötigt. Dafür wird aus Embryonen in Stadium 9 mittels zweier Pinzetten zuerst die Vittelinhülle entfernt, um anschließend die animalen Kappen vom Embryo abzutrennen. Die animalen Kappen werden in 0.1x MBSH mit 0.1 % Penicillin/Streptomycin überführt. Zur Mesoderminduktion erfolgt die Zugabe von 7.5 pg/ml humanen Aktivins. Die Kappen werden in diesem Medium inkubiert, bis die Geschwisterembryonen Stadium 16 erreicht haben. Die Explantate werden dann zu fünf Stück pro Probe gruppiert und in *RNAlater* bei 4 °C gelagert.

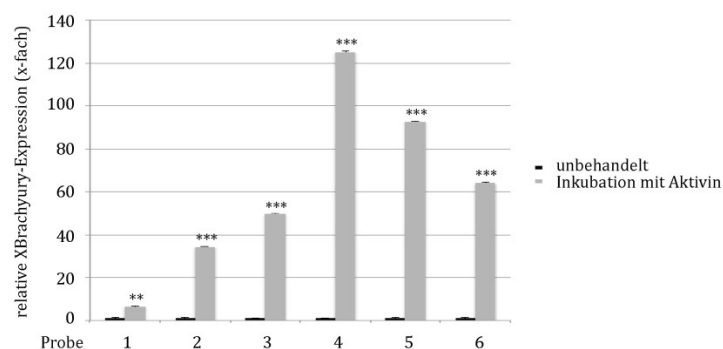


Abbildung 4.3: Aktivin induziert die Expression des mesodermalen Markergens XBrachyury

Auswertung der quantitativen Realtime PCR normiert auf die XBra mRNA-Menge in unbehandelten animalen Kappen. Die relative Expression des Markergens XBra steigt nach Inkubation der animalen Kappen in 7.5 pg Aktivin. Als Haushaltsgen dient die Ornithin Decarboxylase, auf welches die Gesamt-RNA-Menge normiert wurde. (Zweiseitiger studentischer T-Test: ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler aus drei Einzelanalysen).

4.2.7 *In situ* Hybridisierung zur Darstellung der mRNA-Expression

Mittels der *in situ* Hybridisierung kann die lokale Expression eines Gens nachgewiesen werden.

In einer absteigenden Ethanolreihe werden die in MEMFA fixierten und in Ethanol gelagerten Embryonen schrittweise in PTW überführt. Zur besseren Penetration der Antisense-Sonde und des Antikörpers werden die Embryonen je nach Alter für 10-25 Minuten in PTW mit Proteinase K bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Inaktivierung von RNasen durch Acetylierung ist eine Umpufferung in 0.1 M Triethanolamin mit pH 7.5 nötig. Nach fünfminütiger Inkubation erfolgt die Zugabe von 12.5 µl Acetanhydrid. Nach weiteren fünf Minuten wird dieser Schritt wiederholt. Zur erneuten Fixierung nach dem Proteinase K Verdau inkubieren die Embryonen für 20 Minuten in PTW mit 4 % PFA. Das PFA wird fünfmal für jeweils fünf Minuten mit PTW entfernt. Die Prähybridisierung erfolgt für 6 h im Hybridisierungspuffer bei 60 °C im Wasserbad. Der Hybridisierungspuffer wird dann durch Hybridisierungspuffer mit 1 µg/ml Sonde ersetzt und die Embryonen ebenfalls bei 60 °C über Nacht darin inkubiert. Nicht gebundene Sonde wird am nächsten Tag für eine Stunde mit 2x SSC ausgewaschen, wobei die Lösung alle 20 Minuten gewechselt wird. Dies geschieht ebenfalls bei 60 °C im Wasserbad. Um nicht gebundene Sonden vollständig zu entfernen und unspezifischen Hintergrund zu vermeiden wird für eine weitere Stunde mit 2x SSC plus RNase A und T₁ gewaschen. Hierfür werden die Proben bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Die Lösung wird nach einer halben Stunde gewechselt. Erneutes Waschen mit 2x SSC bei Raumtemperatur und 0.2x SSC bei 60 °C stoppt die Enzymaktivität und entfernt die RNasen. Vor der Antikörperzugabe erfolgt die Umpufferung zuerst in 1x MAB, dann in 1x MAB mit 2 % BMB. Die Embryonen werden für eine Stunde bei Raumtemperatur in 1x MAB/20 % BMB/20 % Pferdeserum blockiert. Der α-Dig-AP Antikörper wird 1:5000 in der Blockierlösung verdünnt und die Embryonen darin für 4 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach zweimaligem Waschen werden verbleibende, nicht gebundene Antikörper in 50 ml 1x MAB über Nacht bei 4 °C ausgewaschen. Eine erneute Umpufferung in den Entwicklungspuffer erfolgt zuerst für 10 Minuten bei Raumtemperatur und dann bei 4 °C. Zuletzt werden dem Entwicklungspuffer die Substrate NBT und BCIP zugegeben und die Embryonen darin auf Eis so lange

inkubiert, bis eine spezifische Färbung zu sehen ist. Nach erneutem Fixieren in 1x MEMFA und 20 % Tween20 für eine Stunde bei Raumtemperatur können die Embryonen in 1x MEM überführt werden um dann bei 4 °C gelagert zu werden.

4.3 Molekularbiologische und mikrobiologische Methoden

4.3.1 RNA-Isolation, Aufkonzentrierung und Bestimmung der RNA-Qualität

Für die cDNA Bibliothek des Hefe-2-Hybridsystems wird RNA aus animalen Kappen mit Hilfe des High Pure RNA Isolation Kit von Roche gewonnen. Um eine für die cDNA Bibliothek benötigte Gesamtmenge von 4 µg zu erlangen, wird die RNA mehrerer Proben aufkonzentriert. Hierfür wird das RNeasy® MinElut® Cleanup Kit von Qiagen verwendet. Die Qualität der RNA wird im Agilent 2100 Bioanalyzer bestimmt. Dieser bestimmt den RNA Integrity Wert (RIN-Wert) indem er das Verhältnis zwischen 18S und 28S ribosomaler RNA ermittelt. Hierfür werden die RNA-Proben auf einen Chip geladen, der aus einem Netz verbundener Mikrokanäle besteht. Diese Kanäle werden mit einer Gelmatrix und Fluoreszenzfarbstoff beladen. Die Proben werden elektrophoretisch aufgetrennt und die Fluoreszenzfluktuationen über der Zeit detektiert. Über die Software 2100 Expert wird der RIN-Wert der Proben errechnet (Schroeder et al., 2006). Für die cDNA Bibliothek wurde RNA mit einem RIN-Wert von mindestens 6.60 eingesetzt.

4.3.2 Reverse Transkription

Für die reverse Transkription werden 150 ng RNA mit dem Enzym M-MLV und Oligo-d(T)-Primern in cDNA umgeschrieben. Ein Ansatz enthält folglich 150 ng RNA in einem Gesamtvolumen von 8 µl sowie 2 µl Oligo-d(T)-Primer. Parallel zum eigentlichen Ansatz wird eine Kontrollprobe ohne Reverse Transkriptase mitgeführt. In der anschließenden Kontroll-PCR darf hier keine Bande detektierbar sein. Die eigentliche Probe und die Kontrollprobe werden zur Denaturierung doppelsträngiger RNA für fünf Minuten bei 70 °C erhitzt. Der Transkriptionsmix aus 4 µl 5x M-MLV Reaktionspuffer, 1 µl dNTPs (10 mM pro Nukleotid), 0.5 µl M-MLV Reverse Transkriptase und 10 µl A. bidest. wird nach der Abkühlung der Proben auf 4 °C hinzugegeben. Die Primer-Anlagerung findet für fünf Minuten bei 25 °C statt. Die

eigentliche reverse Transkription läuft beim Temperaturoptimum der M-MLV bei 42 °C ab. Die cDNA wird bei -20 °C gelagert.

4.3.3 Quantitative Realtime Polymerasekettenreaktion

Die quantitative Realtime PCR dient zur Ermittlung der relativen Menge vorhandener mRNA zum Zeitpunkt der Isolation. Anders als bei der herkömmlichen Polymerasekettenreaktion wird hier nach jedem Amplifikationsschritt die Menge doppelsträngiger DNA gemessen. Der Fluoreszenzfarbstoff SYBR® Green I bindet an doppelsträngige DNA, wodurch die Emission des gebundenen Farbstoffes bei 520 nm mit der Menge doppelsträngiger DNA korreliert. Zu Beginn der PCR wird die DNA exponentiell vermehrt. Nach n Zyklen ist somit eine Transkriptmenge von 2^n vorhanden. In den letzten Amplifikationszyklen wird die Vermehrung der DNA gehemmt. Zum einen ist die Menge an Nukleotiden limitiert, zum anderen lässt die Aktivität der Polymerase nach. Um ausschließlich im exponentiellen Bereich zu messen wird ein Schwellenwert, C_T -Wert („Cycle Threshold“), bestimmt. Dieser Wert definiert den Zyklus, bei dem die Fluoreszenz erstmals über die Hintergrundfluoreszenz steigt.

Um die DNA-Menge zweier Proben miteinander vergleichen zu können, muss die Gesamtmenge der cDNA normalisiert werden. Hierfür wird für Proben aus *Xenopus* ein Fragment der Ornithin-Decarboxylase (ODC) amplifiziert. Zur Auswertung der Realtime-Daten findet die $2^{-\Delta\Delta CT}$ Methode (Livak und Schmittgen, 2001) Anwendung. Voraussetzung für die Anwendung dieser Analyseverfahren ist, dass die PCR Effizienz der Probe und der Kontrollprobe nahe 1 liegt. Um dieselbe Effizienz der PCR auf alle Proben zu gewährleisten, muss deshalb in Vorversuchen die beste Primer-Verdünnung und Bindungstemperatur ermittelt werden. Mit der $2^{-\Delta\Delta CT}$ Methode wird letztendlich die Genexpression, im Vergleich zu einer Kontrollprobe und normalisiert auf das Haushaltsgen, ermittelt.

Für die quantitative Realtime-PCR wird die cDNA in einer 1:4 Verdünnung mit hochreinem Wasser eingesetzt. Der „iQ SYBR Green Supermix“ von Biorad enthält mit Ausnahme der cDNA und den Primern alle für die PCR notwendigen Substanzen.

Ansatz für eine Realtime PCR-Probe:

10 µl SYBR Green Supermix
7 µl steriles A. bidest
1 µl Primer Mix (10 mM)
2 µl cDNA

Zusätzlich zur Emissionskurve wird eine Schmelzkurve erstellt. Hierfür wird die cDNA durch schrittweise Erhöhung der Temperatur um 0.5 °C, beginnend bei 60 °C, für je 10 Sekunden erhitzt. Die Schmelzkurve ermöglicht die Verifizierung der Spezifität der Amplifikate. Jedes Templat hat abhängig von der Länge und dem GC-Gehalt eine spezifische Schmelztemperatur. Durch das Erhitzen der DNA kommt es zu einer Abnahme der Fluoreszenz. Die Kombination zwischen Schmelz- und Emissionskurve ermöglicht es unspezifische Amplifikate, wie zum Beispiel Primerdimere, von spezifischen Amplikons zu unterscheiden.

4.3.4 *In vitro* Transkription von Cap mRNA

Zur Mikroinjektion in *Xenopus* Embryonen wird unter Verwendung des mMessage mMachine Kits (Invitrogen™, Life Technologies GmbH, Darmstadt) mRNA synthetisiert. Das Gen muss hierfür in einem Vektor eingebracht sein, der 5'- des Gens eine Bindestelle für eine DNA-abhängige RNA Polymerase und 3'- des Gens ein Poly-Adenylierungssignal aufweist. 3 µg des Vektors werden enzymatisch so verdaut, dass eine Linearisierung des Plasmids hinter der Poly-A-Sequenz erfolgt. Nach einer Ethanolfällung wird die verdaute DNA in 7 µl A. bidest. aufgenommen. 1 µl wird zur Kontrolle der Linearisierung elektrophoretisch aufgetrennt, die anderen 6 µl zur mRNA Synthese verwendet. Zur linearisierten Plasmid-DNA werden 10 µl 2x NTP/CAP, 2 µl 10x Reaktionspuffer und 2 µl Enzym Mix hinzugegeben und der Ansatz für 2 h bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Im Anschluss wird durch die Zugabe von 1 µl DNaseI für 15 Minuten bei 37 °C die Templat-DNA abgebaut. Die fertige mRNA wird über eine G50 Säule aufgereinigt, aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

4.3.5 Sonden-Synthese für die *in situ* Hybridisierung

Zur Sonden-Synthese sollte das Gen in einem Vektor integriert sein, der das Gen beidseitig mit Restriktionsschnittstellen und Bindungsstellen für unterschiedliche DNA-abhängige RNA Polymerasen flankiert. Als Sonden werden sowohl die Antisense- als auch die zur Negativkontrolle verwendete Sense-Sonde synthetisiert.

Zur Herstellung markierter RNA-Sonden wird das Fluorescein/Digoxygenin RNA Labelling Kit (Roche Applied Science, Mannheim) verwendet.

Ein 20 µl Ansatz zur Sonden-Synthese besteht aus:

| | |
|-------------|--|
| 14 µl (1µg) | linearisiertes DNA-Templat |
| 2 µl | Fluorescein oder Digoxygenin Labelling Mix (10x) |
| 2 µl | 10x Transkriptionspuffer |
| 2 µl | DNA- abhängige RNA Polymerase (T7, Sp6 oder T3) |

Die Lösung wird für 2 h bei 37 °C inkubiert und nach Zugabe von 2 µl DNaseI weitere 15 Minuten bei 37 °C. Die Sonde wird durch Ethanol-fällung aufgereinigt. Vor dem Gebrauch wird die Sonde auf 1 µg/ml in Hybridisierungspuffer verdünnt und zum Aufbrechen der Sekundärstruktur für fünf Minuten bei 85 °C erhitzt.

4.3.6 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR) dient als Standardverfahren der Amplifikation definierter DNA-Sequenzen *in vitro*. Entwickelt wurde diese Methode 1985 von Mullis (Saiki et al., 1985). In drei Schritten wird zuerst die DNA denaturiert, so dass sich die synthetisch hergestellten Oligonukleotide (Primer) an der DNA-Matrize anlagern können und es so, im dritten Schritt der Polymerase ermöglichen die Amplifikation der spezifischen Sequenz auszuführen. Durch die Wahl der Primer können Überhänge, wie Restriktionsschnittstellen oder sogenannte Tags, an das DNA-Fragment angefügt werden. Für analytische Zwecke wird die GoTaq® DNA Polymerase von Promega bevorzugt, für präparative Ansätze die Phusion DNA Polymerase von NEB. Letztere hat eine 3'-5' Exonukleaseaktivität und korrigiert so Fehler im Amplifikat. Zur Denaturierung der DNA wird diese auf 95 °C erhitzt. Die Temperatur, bei der die Primer sich am besten an die Matrize anlagern, ist abhängig von der Primerlänge und dem GC-Gehalt. Zur Amplifikation sollte eine Temperatur gewählt werden, die im Aktivitätsoptimum der verwendeten Polymerase liegt. Das Aktivitätsoptimum der GoTaq® Polymerase liegt bei 72 °C.

4.3.7 Ortsspezifische Mutagenese

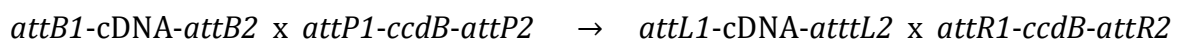
Um spezifisch Basen auszutauschen, Deletionen oder Insertionen in einen bestimmten DNA Abschnitt einzubringen, macht man sich ebenfalls die PCR zu Nutze. Der zu mutagenisierende Bereich sollte hierbei in der Mitte der Primer liegen, wobei dieser Bereich von ca. 15 Basen flankiert wird. Wichtig ist auch, dass der GC-Gehalt der Oligonukleotide bei mindestens 40 % liegt. Damit liegt die Schmelztemperatur T_m bei über 78 °C. Anders als zur gewöhnlichen Amplifikation soll hier das komplette Plasmid amplifiziert werden. Aus diesem Grund werden zwei zueinander komplementäre Primer verwendet. Als Polymerase eignet sich die Turbo Pfu Polymerase. Die eingesetzte Templatmenge liegt zwischen 20 und 50 ng. Die „Annealing“-Temperatur wird durch die verwendete Polymerase festgelegt. Für die Dauer der Elongation werden zwei min/Kilobase eingerechnet. Die Anzahl der Zyklen liegt zwischen 18 und 25. Nach Ablauf der PCR wird der komplette Ansatz für eine Stunde bei 37 °C mit der Restriktionsendonuklease DpnI verdaut. Diese baut DNA ab, die in der Plasmidamplifikation durch Bakterien methyliert wurde. Somit sollte nach dem Verdau bestenfalls kein ursprüngliches Templat mehr vorhanden sein.

4.3.8 Gateway-Klonierung

Unter der Gateway-Klonierung (Invitrogen) versteht man eine Klonierungsmethode, bei der Enzyme eine sequenzspezifische Rekombination zwischen Rekombinationsstellen (*att*: *attachment sites*) zweier Gateway-Vektoren katalysieren. Die Rekombinationsstellen flankieren zusätzlich zum Ampicillin-Resistenzgen das letal wirkende Gen *ccdB*, welches für einen Gyraseinhibitor kodiert. Die beiden Rekombinationsstellen werden von der Excisionase der Lambda Phage erkannt. Weitere Enzyme wie der Integration Host Factor (IHF) aus *E. coli* oder die Integrase aus der Bakteriophage Lambda unterstützen die Excisionase bei der Rekombination. Via PCR werden dem DNA-Fragment die beiden Attenuierungsstellen *attB1* und *attB2* angehängt. Zwei verschiedene Reaktionen katalysieren die Umklonierung vom Eingangsvektor in den Destinationsvektor (BP-Reaktion) und vice versa vom Destinationsvektor in den Übergangsvektor (LR-Reaktion).

BP-Reaktion

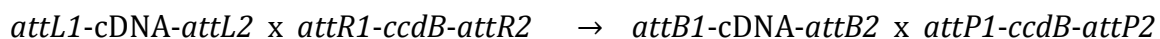
Die BP-Reaktion ermöglicht es, das von zwei Attenuierungsstellen (*attB1* und *attB2*) flankierte DNA-Fragment in einen Eingangsvektor des Gateway Systems einzubringen. Der Gateway® BP Clonase® II Enzym Mix enthält folgende Enzyme: die aus der Bakteriophage Lambda stammende Integrase sowie den Integration Host Factor (IHF). Letzterer stabilisiert die DNA und unterstützt die Bindung der Integrase an den Attenuierungsstellen. Die Integrase führt zur gerichteten Rekombination unterschiedlicher DNA-Fragmente zwischen den Attenuierungsstellen. In der BP-Reaktion findet ein Austausch der DNA zwischen den *attB*- und *attP*-Sequenzen statt.



Die Reaktion läuft über Nacht bei 25 °C ab und wird nach 16-20 h durch die Zugabe von Proteinase K gestoppt.

LR-Reaktion

In der LR-Reaktion katalysiert ein Enzymmix die gerichtete Rekombination eines DNA-Fragments vom Eingangsvektor in einen Zielvektor.



Die Enzyme, die diese Reaktion katalysieren sind zum einen die Integrase und Excisionase aus der Bakteriophage Lambda und zum anderen erneut der Integration Host Factor IHF. Sowohl IHF als auch die Excisionase unterstützen die Bindung der Integrase an das geschlossene Plasmid. So kann diese den Austausch der DNA vom Eingangsvektor in den Destinationsvektor vornehmen.

4.3.9 Ligation

Über die Ligation kann das aufgereinigte DNA-Fragment in einen Klonierungsvektor eingebracht werden. Die T4 DNA Ligase katalysiert die Phosphatbindung zwischen einer 3'-OH Gruppe und einer 5'-Phosphatgruppe. Ligationen werden für gewöhnlich in drei verschiedenen molaren Verhältnissen zwischen Vektor und Insert angesetzt: 1:3, 1:1, 3:1. Ein Ligationsansatz beinhaltet das Insert, den Vektor, 1 µl T4 DNA Ligase, die entsprechende Menge an 10x Reaktionspuffer A. bidest. für ein Gesamtvolumen

von 10 μl . Das Zeitintervall der Ligation hängt von der Temperatur ab. Bei einer Ligation über Nacht reichen 4 °C aus, eine Ligation innerhalb von drei Stunden sollte bei Raumtemperatur stattfinden.

4.3.10 Transformation chemisch kompetenter *E. coli*

Zur Vermehrung von Plasmid-DNA muss diese in *E. coli* Bakterien eingebracht werden. Ist dies der Fall spricht man von einer erfolgreichen Transformation. In der vorliegenden Arbeit wurden hierfür unter anderem JM 109 Bakterien verwendet. Die Menge an eingesetzter Plasmid-DNA unterscheidet sich je nach Ursprung des Plasmids. Aus einer Ligation werden 5 μl eingesetzt, für eine Retransformation wird 1 μl Plasmid-DNA zu 50 μl chemisch kompetenter Bakterien gegeben. Die Bakterien sollten dabei stets auf Eis gehalten werden. Das Gemisch aus Plasmid-DNA und chemisch kompetenter Bakterien inkubiert für 10 Minuten auf Eis. Die Bakterien werden durch einen 45 sekündigen Hitzeschock bei 42 °C gestresst. Dies führt zum Permeabilisieren der Membran und somit zur Aufnahme der Plasmid-DNA. Nach dem Hitzeschock werden die Bakterien sofort auf Eis gestellt. Nach einer 10-minütigen Ruhephase erfolgt die Zugabe von 300 μl SOC-Medium. In einem Schüttelinkubator kultiviert die Bakteriensuspension für 1 h bei 37 °C und 225 rpm. Die Bakteriensuspension einer Ligation wird vollständig auf einer mit Antibiotika versetzten LB-Platte ausplattiert. Für die Retransformation werden zwischen 50 und 100 μl der Bakteriensuspension ausplattiert. Der Rest der Suspension kann für eine Plasmidisolierung im Mittelmaßstab in 100 ml flüssigem 1x LB-Medium mit Antibiotika überführt werden.

4.3.11 Transformation elektrokompeter *E. coli*

In einem alternativen Ansatz zur Transformation der *E. coli* werden elektrokompeter Bakterien durch einen Elektroschock penetriert und somit zur Plasmidaufnahme gezwungen. Vor Beginn der Transformation werden die Glasküvetten mit einem Ausschnitt von 0.1 cm auf Eis gekühlt. 50 μl der ElectroMax™ DH10B™ -Zellen von Life Technologies werden auf Eis mit 1 μl Plasmid-DNA gemischt und blasenfrei in die Küvetten überführt. Bevor die Küvette in den Elektroporator gestellt wird, sollte sie gut getrocknet werden, da so ein Kurzschluss vermieden werden kann. Die Transformation wird mit 1.8 kV und einer Dauer von

2.3 mS erreicht. Nach dem Elektroschock erfolgt die sofortige Zugabe von 1 ml SOC-Medium. Im Schüttelinkubator wird die Bakteriensuspension für eine Stunde bei 225 rpm und 37 °C kultiviert.

4.3.12 Synthese und Transformation chemisch kompetenter MaV203 Hefen

Zur Transformation der Plasmide in die MaV203 Hefe muss zuvor kompetente Hefe hergestellt werden. Hierfür wird eine Hefekolonie über Nacht bei 30 °C in 10 ml YPAD-Medium kultiviert. Die optische Dichte der Übernachtskultur wird bestimmt und mit Medium auf 0.4 eingestellt. Anschließend wird die Hefekultur weitere 2-4 h im Schüttelinkubator bei 30 °C kultiviert. Nach Zentrifugation für 10 Minuten bei 2500 rpm werden die Hefen in 40 ml 1x TE aufgenommen. Erneutes Zentrifugieren und Resuspendieren in 2 ml 1x LiAc/0.5 TE bringen chemisch kompetente Hefe hervor. Bevor diese transformiert wird, sollte sie 10 Minuten bei Raumtemperatur ruhen. Zu 100 µl Hefesuspension werden 1 µg Plasmid-DNA, 100 µg durch Hitze denaturierte Hering Sperma DNA sowie 700 µl LiAc/40 % PEG-3350/1x TE hinzugegeben. Die Suspension wird gevortext und für 30 Minuten bei 30 °C im Brutschrank inkubiert. Im Anschluss erfolgt die Zugabe von 88 µl DMSO. Vor dem siebenminütigen Hitzeschock bei 42 °C wird die Suspension erneut gevortext. Nach 10sekündiger Zentrifugation wird der Überstand verworfen und das Pellet in 1 ml 1x TE Puffer aufgenommen. Nach erneutem Zentrifugieren wird die transformierte Hefe in 75 µl 1x TE-Puffer resuspendiert und ausplattiert.

4.3.13 Blau/Weiß Selektion

Um die erfolgreiche Ligation eines Transkripts in einen TA-Vektor zu visualisieren, kann die Blau/Weiß Selektion angewandt werden. Hierfür werden LB-Agarplatten mit 100 µl IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid, 0.1 M) und 40 µl X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranosid, 50 mg/ml in DMF) ausgestrichen und im Dunkeln bei 37 °C trocknen gelassen. IPTG induziert das LacZ-Operon. X-Gal ist das Substrat der β-Galaktosidase, die von LacZ kodiert wird und X-Gal in einen blauen unlöslichen Indigo-Farbstoff umsetzt. Der Polylinker im TA-Vektor liegt innerhalb des *lacZ*-Gens. Bei erfolgreicher Ligation wird folglich das *lacZ*-Gen gespalten und die β-Galaktosidase nicht exprimiert. Ohne Enzym kann der Farbstoff

nicht umgesetzt werden und die Bakterienkolonien bleiben blau. Eine erfolgreiche Ligation bringt also weiße Bakterienkolonien hervor.

4.3.14 Plasmidpräparation aus *E. coli* Bakterien mit anschließender Isopropanolfällung

Die Methode zur Plasmidisolierung ist abhängig von der Größe der Bakteriensuspension. Die Plasmidpräparation aus 100 ml Über-Nacht-Schüttelkultur (Mittelmaßstab) wird mit Hilfe des NucleoBond Xtra Midi Kits (Macherey Nagel) nach Herstellerangaben durchgeführt.

Aus Über-Nacht-Kulturen mit einem Volumen von 3 ml (Mini-Präparation) wird mittels alkalischer Lyse Plasmid-DNA gewonnen (Birnboim und Doly, 1979). Hierfür werden 2 ml der Bakteriensuspension bei 7000 rpm für zwei Minuten pelletiert. Die Resuspension erfolgt durch Vortexen in 400 µl RNase-haltigem Resuspensionspuffer. Durch Zugabe von 400 µl Lysispuffer werden die Bakterien lysiert. Nach mehrmaligem Invertieren wird die Neutralisation der Lösung durch das Zugeben von 400 µl Neutralisationspuffer erreicht. Das Gemisch aus bakterieller DNA, Plasmiden, Proteinen und SDS wird für 15 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert. Durch eine anschließende Isopropanolfällung wird die Plasmid-DNA aus 800 µl Überstand gewonnen. Hierfür wird der Überstand mit 600 µl Isopropanol gemischt und gevortext. Die Endkonzentration an Isopropanol liegt somit bei 40 % (v/v). Durch Alkohol und monovalente Kationen wird der DNA die Hydrathülle entzogen. Die Fällung der Plasmid-DNA erfolgt durch einen erneuten Zentrifugationsschritt bei 13000 rpm für 20 Minuten bei 4 °C. Um Salze zu entfernen, wird das Präzipitat mit 70 % Ethanol gewaschen. Das an der Luft getrocknete Plasmid-Pellet wird dann in einem geeigneten Volumen A. bidest. aufgenommen.

4.3.15 DNA-Isolation aus MaV203-Hefekolonien

Um genügend DNA aus Hefekolonien isolieren zu können, müssen diese über Nacht bei 225 rpm und 30 °C kultiviert werden. Hierfür werden 2.5 ml des entsprechenden Minimalmediums mit einer Kolonie inokuliert. 1.8 ml der Hefesuspension werden in ein 2 ml Reaktionsgefäß, dessen unterer konischer Teil zuvor mit kleinen Glaskugeln befüllt wurde, überführt. Zur Sedimentation wird für eine Minute bei 13000 rpm

zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 500 µl Hefe-Lysispuffer resuspendiert. Hierfür wird das Reaktionsgefäß für 15 Minuten bei Raumtemperatur in einem Thermomixer geschüttelt. Anschließend werden die Proben 15 Minuten auf 65 °C erhitzt bevor sie dann fünf Minuten auf Eis ruhen. Zur Aussalzung der Proteine erfolgt die Zugabe von 100 µl 8 M Kaliumacetat. Die Proben werden 10 mal invertiert und dann 15 Minuten bei 13000 rpm abzentrifugiert. Die DNA im Überstand wird mit 300 µl Isopropanol gefällt und in 30 µl TE-Puffer mit 50 µg/ml RNase aufgenommen. Hierfür wird die DNA für 10 Minuten auf 50 °C erhitzt, gevortext und erneut für 10 Minuten auf 50 °C erhitzt.

4.3.16 Restriktionsanalyse von DNA

Restriktionsenzyme können DNA an spezifischen Aminosäuresequenzen schneiden. Die Temperatur für den enzymatischen Verdau ist abhängig vom Temperaturoptimum des jeweiligen Enzyms. Auch die Puffer, in denen die DNA verdaut wird, bieten dem Enzym die ideale Arbeitsumgebung. Um 3 µg DNA in einem 20 µl Ansatz zu verdauen, werden 1 µl Enzym, 2 µl Enzympuffer (10x) und A. bidest. benötigt.

4.3.17 Ethanolfällung von Nukleinsäuren

Nukleinsäuren können nach vorheriger enzymatischer Behandlung mittels Ethanol aufgereinigt und aufkonzentriert werden. Hierfür wird die Probe mit A. bidest. auf 100 µl aufgefüllt. Zu den 100 µl werden 1/20 Volumen 0.5 M EDTA, pH 8.0, 1/10 Volumen 3 M NaAcetat und das 2.5-fache Volumen an 100 %igem Ethanol hinzugegeben. Die Lösung wird für 15 Minuten auf Eis oder bei -20 °C inkubiert. Zur Präzipitation erfolgt ein Zentrifugationsschritt für 15 Minuten bei 4 °C und 13000 rpm. Nach Entfernen des Überstandes wird das Pellet, um restliche Salze zu entfernen, mit 70 % Ethanol gewaschen. Nach dem Trocknen des Pellets bei Raumtemperatur kann es in einem beliebigen Volumen A. bidest. resuspendiert werden.

4.3.18 Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration und deren Reinheit

Die Menge und Reinheit isolierter Nukleinsäuren kann durch eine photometrische Messung bestimmt werden. Hierfür macht man sich zu Nutze, dass Nukleinsäuren ihr

Absorptionsmaximum bei 260 nm haben. Zur Berechnung der Konzentration werden also der Absorptionwert bei 260 nm, der Verdünnungsfaktor V und der Multiplikationsfaktor F benötigt. Letzterer unterscheidet sich zwischen RNA und DNA. Für die RNA ist er 40, da bei 40 µg/ml die Extinktion 1 entspricht. Für die DNA ist er dementsprechend 50. Die Formel zur Konzentrationsbestimmung ist wie folgt:

$$c \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \right) = A_{260} * V * F$$

Um die Nukleotidkonzentration bestimmen zu können, wird zusätzlich die Absorption bei 230 nm und 280 nm gemessen. Der Extinktionsquotient von 260 nm/ 230 nm gibt an, inwiefern die Nukleotide mit Trizol oder Polysacchariden verunreinigt sind. Idealerweise liegt der Quotient bei 2.0. Bei einer Wellenlänge von 280 nm haben aromatische Aminosäuren ihr Absorptionsmaximum. Der Quotient aus 260 nm/ 280 nm gibt sowohl eine Verunreinigung durch Proteine als auch durch Trizol an. Trizol absorbiert UV-Licht bei einer Wellenlänge von 230 nm und 270 nm. Im Idealfall liegt der Extinktionswert von 260/280 für DNA bei 1.8 und für RNA bei 2.0.

4.3.19 Sequenzanalyse der DNA

Zur Sequenzanalyse werden die DNA-Proben zu GATC-Biotech nach Konstanz verschickt. Dort erfolgt die Analyse durch die Didesoxy-Kettenabbruchmethode von Sanger (Sanger et al., 1977) mit Fluoreszenz-gekoppelten ddNTPs.

4.3.20 Analytische Flachbett-Gelelektrophorese

Nukleinsäuren lassen sich auf Grund ihres negativ geladenen Phosphatrückgrats im elektrischen Feld der Größe nach auftrennen. Durch das Anlegen einer Gleichspannung von 80-120 V wandern die Fragmente hin zur Anode. Die Nukleinsäure muss dafür auf ein 1 %iges Agarosegel geladen werden. Der prozentuale Anteil an Agarose bestimmt die Porengröße der Gelmatrix. Um DNA und RNA im UV-Licht sichtbar zu machen, wird dem Gel vor dem Auspolymerisieren 7 % Midori Green hinzugefügt. Als Ladepuffer dient 5x OrangeG. Um die aufgetrennten Fragmente einer Größe zuzuordnen zu können, wird zu den Proben parallel ein Größenstandard aufgetragen.

4.3.21 DNA-Extraktion aus dem Agarosegel mit anschließendem Anfügen des 3'-Adenosinüberhangs

Um amplifizierte DNA oder DNA-Fragmente nach enzymatischem Verdau aufzureinigen, lässt man diese über Flachbett-Gelelektrophorese auftrennen. Die benötigten Fragmente lassen sich dann mit dem High Pure RNA Isolation Kit (Roche Applied Science, Mannheim) aus dem Gel extrahieren. Mit einem Skalpell wird das Fragment aus dem Gel ausgeschnitten und das entsprechende Gelstück in Bindepuffer überführt. Dieser enthält das chaotrope Salz Guanidinthiocyanat, welches zum einen zum Auflösen des Gels bei 56 °C führt und zum anderen das Binden der DNA an das zur Aufreinigung notwendige Silikagel unterstützt.

Um das aus dem Agarosegel isolierte DNA-Fragment in einen TA-Vektor, wie zum Beispiel pGEMT (Promega, Mannheim), klonieren zu können, muss dem Fragment am 3'-Ende Adenosin angehängt werden. Hierfür reicht es aus, 19 µl des DNA-Fragments mit 1 µl 10 mM dATP, 5 µl 5x GoTaq® Reaktionspuffer und 0.25 µl GoTaq® Polymerase für 10 Minuten bei 72 °C zu inkubieren.

4.3.22 Synthese der cDNA Bibliothek

Die cDNA Bibliothek für das Hefe-2-Hybridsystem wird mit dem CloneMiner™ II cDNA library Construction Kit von Invitrogen synthetisiert. Hierfür werden 4 µg RNA mit einem RIN-Wert von mindestens 6.6 verwendet. Über den kompletten Versuch wird die vom Hersteller mitgelieferte 2.0 kB Kontroll-RNA mitgeführt. Zu der RNA werden 30 pmol biotinylierte *attB2*-Oligo(dT)-Primer gegeben. Diese Primer sind an Biotin gekoppelt, da dieses im Anschluss die Ligation am 3'-Ende der RNA unterbindet. *AttB2* ist die erste von zwei Attenuierungsstellen, die für die Klonierung der RNA in einen Gateway Vektor benötigt wird. Das Gemisch aus Primer und RNA wird sieben Minuten auf 70 °C erhitzt und dann schrittweise über 15-30 Minuten auf 45 °C gekühlt. Anschließend werden Erst-Strang Synthese Puffer, 0.1 M DTT und 10 mM dNTP Mix hinzugefügt. Mit der Zugabe der SuperScript® III Reversen Transkriptase beginnt die Synthese des ersten Stranges der cDNA. Die Reverse Transkription erfolgt für jeweils 20 Minuten bei 45 °C, 50 °C und 55 °C. Während der Vorbereitungen des Mastermixes zur Synthese des zweiten cDNA Stranges wird das Gemisch auf Eis gestellt. Der Ansatz für die Synthese des zweiten cDNA Stranges

besteht aus mit DEPC behandeltem A. bidest., Zweiter-Strang Puffer, 10 mM dNTP-Mix, sowie der *E. coli* DNA Ligase (1x 10 U/ μ l), der DNA Polymerase I (4x 10 U/ μ l) und der *E. coli*. RNase H (1x 2 U/ μ l). Letztere ist eine unspezifische Endoribonuklease, die in RNA-DNA Hybriden die RNA abbaut. Dieser Mix wird zur Erststrang-Synthese gegeben und für 2 h bei 16 °C inkubiert. Um doppelsträngige cDNA mit glatten Enden zu erhalten, wird anschließend die T4-DNA Polymerase hinzugefügt. Diese füllt die Überhänge an den Enden auf. Die Reaktion wird nach 15 Minuten bei 16 °C mit 0.5 M EDTA, pH 8.0 abgestoppt.

Extraktion und Ethanol-fällung der cDNA Fragmente

Die Extraktion der doppelsträngigen cDNA wird durch Phasentrennung mit Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) begonnen. Durch Ausschütteln der Reaktionslösung und anschließendem Zentrifugieren für 10 Minuten bei 13000 rpm ist die cDNA in der oberen wässrigen Phase gelöst. Die Proteine befinden sich dagegen in der unteren organischen Phase. Die wässrige Phase wird vorsichtig abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Mit der Ethanolpräzipitation wird die cDNA gefällt und aufkonzentriert. Der Überstand wird hierfür mit 20 μ g Glykogen, 80 μ l 7.5 M NH₄OAc und 600 μ l 100 % Ethanol versetzt. Für die eigentliche Fällung muss das Gemisch für 10 Minuten bei -80 °C inkubieren. Das Präzipitat wird in 22 μ l mit DEPC behandeltem A. bidest. aufgenommen. Zur weiteren Verwendung wird diese in einen für das Hefe-2-Hybridsystem geeigneten Vektor kloniert. Hierfür wird eine zweite Attenuierungsstelle für die Lambda Phage über eine Ligation an die cDNA angebracht. Biotin sorgt dafür, dass die Ligase den *attB1* Adapter nur an das 5'-Ende anheftet. Die Reaktion läuft für 16 h bei 16 °C ab.

Aufreinigung der cDNA-Fragmente

Um die cDNA Bibliothek von Primern und zu kurzen, unvollständigen Fragmenten zu befreien, werden diese chromatographisch von Fragmenten größer 1.5 kB getrennt. Verwendet werden hierfür die im Kit zur cDNA Bibliothek Synthese enthaltenen cDNA Size Fractionation Columns. Die in 20 % Ethanol gelagerten Säulchen müssen vor der Nutzung gewaschen werden. Nach dem Entfernen der Verschlusskappe wird die Säule mit 0.8 ml TEN Puffer beladen. Durch die Gravitationskraft tropft der TEN-Puffer durch das Packungsmaterial der Säule in einen Auffangbehälter. Der

Waschvorgang mit dem TEN-Puffer wird viermal wiederholt. Während der Waschschrte wird zur Inaktivierung der Ligase das cDNA-Gemisch für 10 Minuten bei 70 °C erhitzt. Das Volumen des cDNA Gemischs wird um 100 µl TEN-Puffer erhöht und dann auf die Säule geladen. Im ersten Auffangbehältnis wird der erste Durchfluss gemeinsam mit dem Durchfluss nach der zweiten Zugabe von 100 µl TEN Puffer aufgesammelt. Die Säule wird nochmals mit 240 µl TEN-Puffer beladen. Der Durchfluss wird in einem neuen Auffangbehältnis gesammelt. Ebenso ein dritter Durchfluss mit 80 µl TEN-Puffer. Die erste Elution enthält die längsten cDNA-Fragmente, mit jedem weiteren Auffangbehältnis reduziert sich deren Durchschnittslänge. Auch hier erfolgt die Aufreinigung der cDNA mittels Ethanolfällung. Weitergearbeitet wird mit einer Mischung aus Fraktion 2 und 3 und der Zugabe von 1 µl Glykogen, 0.5 x Volumen 7.5 M NH₄OAc und dem 2.5-fachen Volumen an 100 % Ethanol. Das Gemisch wird für 30 Minuten auf -80 °C inkubiert und dann für 30 Minuten bei 4 °C und 13000 rpm pelletiert. Es folgt erneut zweimaliges Waschen mit 70 % Ethanol. Das Pellet wird bei Raumtemperatur getrocknet, bis alles Ethanol verdampft ist und dann in 6 µl TE-Puffer durch 30-40-faches Auf- und Abpipettieren resuspendiert. Die Reinheit und Konzentration wird photometrisch bestimmt. Aus einer Ausgangsmenge von 3 µg RNA sollten jetzt ca. 150 ng doppelsträngige cDNA vorhanden sein.

Einbringen der cDNA in das Gateway-System und Amplifikation der cDNA

Die cDNA wird durch eine gerichtete enzymatische Rekombination in den für das Hefe-2-Hybridsystem vorgesehenen Eingangsvektor pDONR222 eingebracht. Die BP-Rekombination wird laut Herstellerangaben von Invitrogen im Standardverfahren durchgeführt. Auch die entsprechenden Kontrollen pUC19 sowie Negativ- und Positivkontrollen des Herstellers werden mitverwendet. Die Reinigung der Plasmide erfolgt erneut über eine Ethanolfällung. Die Vermehrung erfolgt in ElectroMax™ DH10B™ *E. coli* Bakterien.

Ausplattieren und Titerbestimmung der cDNA

Da pDONR221 ein Kanamycinresistenzgen trägt, werden alle Proben, mit Ausnahme der pUC16 Kontrolle auf LB-Kanamycinplatten ausplattiert. Für pUC19 werden zwei LB-Ampicillinplatten verwendet.

Tabelle 4.2: Ausplattierungsassay.

Durch das Ausplattieren verdünnter Bakteriensuspensionen kann die tatsächliche Kolonienzahl/ml bestimmt werden. Als Kontrolle der cDNA Bibliothek Synthese wurde während des ganzen Prozesses eine 2.0 kB RNA Kontrolle mitgeführt. Diese dient nun zum direkten Vergleich der cDNA Bibliothek zu normierter RNA. Die BP Negativkontrolle sollte kein Kolonienwachstum erlauben, die BP Positivkontrolle gibt darüber Aufschluss, wie effizient die Umklonierung der cDNA in den Übergangsvektor pDONR333 war. Die pUC19 Kontrolle definiert die Transformationseffizienz in die *E. coli* Bakterien. Für jede Verdünnung wurden Doppelbestimmungen ausgeführt.

| | cDNA Bibliothek | 2.0 kB RNA Kontrolle | BP Negativkontrolle | BP Positivkontrolle | pUC19 Kontrolle |
|-----------------------------------|------------------|----------------------|---------------------|---------------------|------------------|
| Verdünnung | 10 ⁻² | 10 ⁻² | unverdünnt | 10 ⁻² | 10 ⁻² |
| | 10 ⁻³ | 10 ⁻³ | 10 ⁻¹ | 10 ⁻³ | - |
| | 10 ⁻⁴ | 10 ⁻⁴ | 10 ⁻² | 10 ⁻⁴ | - |
| Ausplattierungsvolumen pro Platte | 2 x 100 µl | 2 x 100 µl | 2 x 100 µl | 2 x 100 µl | 2 x 100 µl |
| Plattenzahl | 6 | 6 | 6 | 6 | 2 |

Für die Titerbestimmung wird folgende Formel verwendet:

$$\frac{\text{Kolonien}}{\text{ml}} = \frac{\text{Kolonien auf der Platte} \times \text{Verdünnungsfaktor}}{\text{ausplattiertes Volumen (ml)}}$$

Um auf die totale Anzahl an Bakterienkolonien zu kommen, wird der Mittelwert des errechneten Titervolumens mit dem Komplettvolumen der cDNA Bibliothek multipliziert.

Eine erfolgreiche cDNA Synthese bringt $5 \times 10^6 - 1 \times 10^7$ Kolonien/ml hervor.

Qualitative Bestimmung der cDNA Bibliothek

Die Qualität der cDNA Bibliothek wird über die Durchschnittsgröße der im pDONR333 enthaltenen Fragmente definiert. 24 der Kolonien werden gepickt und über Nacht in 3 ml Schüttelkultur vermehrt, um anschließend in einer Mini-Präparation die Plasmide zu isolieren. Die Plasmid-DNA wird durch das

Restriktionsenzym *BsrGI* verdaut. Durch Gelelektrophorese werden die einzelnen Fragmente aufgetrennt und die durchschnittliche Größe der Inserts bestimmt.

Umklonieren der cDNA in den spezifischen Destinationsvektor pDest22

Erst wenn die Titermenge und die Insertionsdurchschnittsgröße den Richtlinien guter cDNA Bibliotheken entsprechen, wird diese in einer LR-Reaktion in den für das Hefe-2-Hybridsystem vorgesehenen pDest22 Vektor kloniert. Hierfür wird die cDNA mit 0.4-fachem Volumen an 30 % PEG/Mg Lösung präzipitiert. Durch 15 Minuten Zentrifugation bei 13000 rpm wird die cDNA pelletiert. Das Pellet wird für die Konzentrationsbestimmung in 50 µl TE Puffer resuspendiert und zu einer Endkonzentration von 25 ng/µl mit TE Puffer verdünnt. 50 µg werden für die LR-Reaktion eingesetzt. Die Umklonierung und anschließende Ethanolfällung wird nach Herstellerangaben ausgeführt. Die sich nun im spezifischen Destinationsvektor befindende cDNA wird in *E. coli* transformiert und kann in 100 ml LB-Ampicillin Lösung kultiviert werden.

4.4 Proteinbiochemische Methoden

4.4.1 Hefe-2-Hybridsystem

Das Hefe-2-Hybridsystem dient zur Identifizierung einer Proteinbindung zwischen Protein X und Protein Y. Das System beruht unter anderem auf der Nutzung der Auxotrophie genetisch manipulierter *Saccharomyces cerevisiae* Stämme und dem aus der Hefe stammenden UAS-Gal4-System. Bindet Protein X (Köder, engl: „bait“), gekoppelt an eine Aktivator-domäne, an Protein Y (Beute, engl: „prey“), gekoppelt an eine DNA-Bindedomäne, wobei beide Proteine miteinander interagieren, so komplettiert sich der Gal4 Transkriptionsfaktor aus Aktivator- und Bindedomäne. Dieser bindet die DNA an der Upstream Activating Sequenz an einem ins Genom integrierten Promotor. In diesem Fall entsprechen der E-Tail von Tcf4 oder die CRDs den Baits. Der verwendete Hefestamm MaV203 ist genetisch so manipuliert, dass er ohne die Aminosäuren Leucin, Tryptophan und Uracil im Nährmedium nicht lebensfähig ist. Die beiden ersten Aminosäuren werden synthetisiert, wenn der Hefestamm erfolgreich mit dem Bait- und Prey-Vektor transformiert wurde. Das Gen für Leucin liegt dabei auf dem Bait-Vektor, das für Tryptophan auf dem Prey-Vektor.

Bei erfolgreicher Transformation beider Plasmide ist der Hefestamm auf Leucin- und Tryptophan-Mangelmedium lebensfähig.

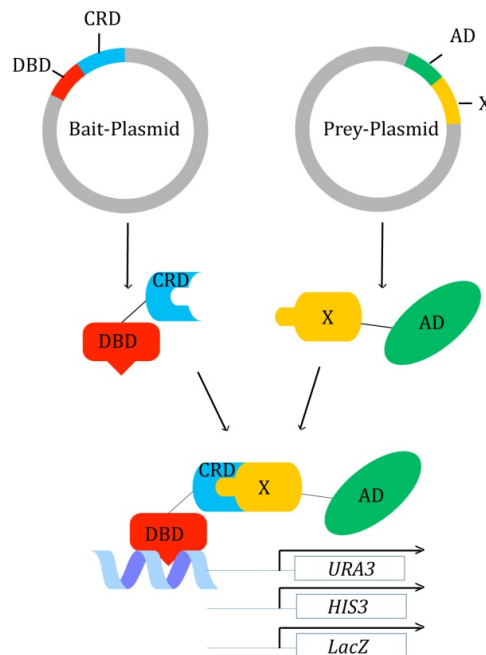


Abbildung 4.4: Das Hefe-2-Hybridsystem

Die kontext-abhängige Domäne (CRD) der Lef/Tcfs ist im Bait-Vektor im Leserahmen der DNA-Bindedomäne (DBD) inseriert. Protein X aus der cDNA Bibliothek ist Teil des Prey-Plasmids im Leserahmen mit der Aktivator-domäne (AD). Nach der Expression der Fusionsproteine kommt es zu einer Interaktion von CRD und Protein Y. Die DBD bindet an die DNA und aktiviert mit der Aktivator-domäne die drei Reporter *URA3* (Uracil), *HIS3* (Histidin) und *LacZ* (β -Galaktosidase).

Basierend auf dem UAS-Gal4-System kann die Synthese weiterer essentieller Aminosäuren gewährleistet werden. Um zusätzlich falsch positive Interaktionen auszuschließen, enthält der verwendete Hefestamm drei verschiedene Promotoren: *His*, *URA3* und *lacZ*. Die endogene Herstellung der Aminosäuren Histidin und Uracil wird nur eingeleitet, wenn die Proteininteraktion zur Komplettierung des Gal4 Transkriptionsfaktors führt und dieser an die entsprechende DNA-Sequenz vor den Promotoren bindet. In diesem Fall wird die Synthese von Histidin und Uracil eingeleitet und die Hefekolonien sind auf dem jeweiligen Mangelmedium lebensfähig. Eine weitere Möglichkeit, die Bindung zweier Proteine innerhalb des Hefe-2-Hybridsystems zu verifizieren ist mit Hilfe eines Inhibitors. Die Zugabe von 5'-Fluorotiksäure in das Uracil-Mangelmedium führt bei positiver Interaktion zur Umwandlung der Base Uracil in tödliches 5'-Fluoruracil. Folglich darf hier durch eine Proteinbindung kein Hefewachstum detektierbar sein. Zur weiteren Selektion ist der

lacZ-Promotor im transgenen MaV203-Stamm integriert. Durch die Zugabe des Substrats 5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Galactopyranosid (X-Gal) färbt sich die Hefekolonie durch die Umwandlung des Substrats bei aktivem *lacZ*-Promotor blau.

4.4.2 Überführung und Reinigung von Hefekolonien durch Stempeln

Nachdem eine Masterplatte erstellt wurde, auf der alle zu testenden Kolonien und die dazu gehörigen Kontrollen ausgestrichen sind, können die kompletten Hefekolonien auf eine andere Platte überführt werden. Hierfür wird Filterpapier so zurechtgeschnitten, dass es optimal in die Hefekulturschalen passt. Dieses Filterpapier wird mit doppelseitigem Klebeband am Boden eines Erlenmeyerkolbens befestigt. Das ganze Konstrukt dient nun als Stempel. Mit leichtem Druck wird der Stempel auf die Masterplatte gedrückt, dieser übernimmt einzelne Kolonien und beim Stempel auf eine neue Agaroseplatte werden diese Kolonien übertragen. Das Ganze kann auf fünf Platten nacheinander wiederholt werden. Das Stempelfilterpapier wird dann verworfen und ein neues angebracht. Nun werden die gestempelten Platten gesäubert. Dies bedeutet, dass alles sichtbare Zellmaterial durch das Stempeln wieder entfernt wird. Erneut wird mit leichtem Druck der Stempel auf die Platte gesetzt. Alle sichtbaren Hefezellen sollen auf dem Stempel haften bleiben. Zurück bleibt einzig ein leichter Schatten, der anzeigt, wo vorher sichtbare Kolonien waren. Dies hilft zur gleichmäßigen Übertragung der Hefekolonien.

4.4.3 Bestimmung der Eigenaktivität der Bait-Konstrukte

Es ist möglich, dass die in die MaV203 transformierten Bait-Plasmide mit dem Prey-Plasmid ohne Insert eine gewisse Eigenaktivität aufweisen. Dies bedeutet, dass ein Wachstum auf Leucin/Tryptophan/Histidin-Mangelmedium möglich ist. Um die Eigenaktivität weit möglichst zu unterdrücken, wird dem Mangelmedium 3'-Amino-1,2,4-triazol (3'-AT) in unterschiedlichen Konzentrationen hinzugefügt. Anschließend werden die transformierten Hefen auf SC-Leucin-Tryptophan-Platten ausplattiert. Nach 24 h Wachstum der Hefen wird eine Masterplatte erstellt. Diese inkubiert für weitere 18 Stunden bei 30 °C. Am nächsten Tag wird die Masterplatte auf Leucin/Tryptophan/Histidin-Mangelmediumplatten mit 10 mM, 25 mM, 50 mM, 75 mM und 100 mM 3'-AT gestempelt. 24 Stunden später werden die Platten durch erneutes Stempel gesäubert. Die Auswertung der Platten findet weitere zwei Tage

später statt. Die 3'-AT-Konzentration auf der keine Kolonien auftreten, höchstens ein leichter Schatten zu sehen ist, wird für das Hefe-2-Hybridssystem verwendet.

4.4.4 X-Gal Färbung der Hefekolonien

Zur Verifizierung einer positiven Interaktion zweier Proteine dient der Nachweis des aktiven *lacZ*-Promotors. Hierfür wird die zu untersuchende Hefekolonie auf einer Leucin/Tryptophan-Mangelmediumplatte ausgestrichen und für 24 h bei 30 °C kultiviert. Durch Stempeln wird die Kolonie auf ein Nitrozellulosefilterpapier übertragen, welches dann auf eine YPAD Platte gelegt wird und für 18-24 h bei 30 °C inkubiert. Vor der X-Gal Färbung werden zwei kreisrunde Filterpapiere aufeinander in eine Petrischale gelegt und mit 8 ml X-Gal Färbelösung getränkt. Währenddessen wird die kolonietragende Filtermembran für 30 Sekunden in flüssigen Stickstoff getaucht. Im Anschluss wird das Filterpapier mit den Kolonien nach oben blasenfrei auf die beiden mit Färbelösung getränkten Filterpapiere gelegt. Überschüssige Färbelösung wird vorher abgenommen. Die Umsetzung von X-Gal läuft für 24 h bei 37 °C im Brutschrank ab. Eine positive Proteininteraktion zeigt sich in einem blauen Farbumsatz.

4.4.5 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die in SDS-Ladepuffer aufgenommenen Proben werden zur Denaturierung der Proteine fünf Minuten bei 95 °C erhitzt. Zur Auftrennung der Proteine wird ein Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel verwendet. Das zweiteilige Gel besteht aus Sammel- und Trenngel, wobei das Sammelgel über das auspolymerisierte Trenngel gegossen wird. Die Porengröße des Trenngels ist abhängig vom Anteil an 30 % Acryl:Bisacrylamid (37.5:1).

Zusätzlich zu den mit Ladepuffer versetzten Proben wird das Gel mit einem Proteinstandard beladen. Dieser enthält Proteine mit bekanntem Molekulargewicht und dient somit zum Vergleich und der Definition der Proteingrößen unterschiedlicher Proben. Die Größenauftrennung der Proteine erfolgt in der Gelelektrophoresekammer in 1x SDS-Laufpuffer. Die Trennung basiert auf dem Glycin/Tris-Puffersystem von Laemmli (1970). Solange sich die Proben im Sammelgel befinden wird eine Spannung von 80 V angelegt. Hierbei stapeln sich die

Proteine übereinander und bewegen sich dann zeitgleich ins Trenngel. Im Trenngel angekommen kann die Spannung auf 120 V erhöht werden.

4.4.6 Western Blot

Die nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennten Proteine werden im Western Blot auf eine Nitrozellulose Membran übertragen. Hierfür wird in dieser Arbeit das semi-dry System von Biorad verwendet. Das Gel wird auf die Nitrozellulose Membran zwischen drei Lagen Filterpapier gelegt. Pro Gel werden 0.06 mA angelegt. Der komplette Blotvorgang dauert 120 Minuten. Anschließend sind alle Proteine auf der Membran frei zugänglich für spezifische Antikörperbindungen. Um dagegen unspezifische Antikörperbindungen zu vermeiden, wird die Membran für 1 h in einer 10 %igen Milchpulverlösung blockiert. Über Nacht inkubiert die Membran im primären Antikörper bei 4 °C auf einem vertikalen Schüttler. Drei 10-minütige Waschschrte in 1x TBS-T entfernen unspezifische und schwach gebundene Primärantikörper. Der Sekundärantikörper, welcher an eine alkalische Phosphatase gekoppelt ist, wird in TBS-T verdünnt und die Membran in dieser Lösung für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Erneutes Waschen entfernt auch hier unspezifisch gebundene Antikörper. Vor der Entwicklung des Blots wird die Membran kurz in AP-Puffer geschwenkt, um das pH-Optimum für die alkalische Phosphatase bereitzustellen. Die Entwicklung an sich findet im Dunkeln statt. In AP-Puffer verdünntes Substrat, NTB/BCIP, wird auf die Membran gegeben. An den Stellen, an denen die alkalische Phosphatase gebunden hat, setzt sie das Substrat um. Dies äußert sich in einer Lilafärbung auf der Membran. Gestoppt wird die Farbreaktion durch das Waschen der Membran in A. bidest.

4.4.7 Proximity Ligation Assay

Der Proximity Ligation Assay (PLA) ist eine *in situ* Methode, die entweder zur lokalen Detektion einzelner Proteine in Zellen oder aber zur Verifikation einer Protein-Protein Interaktion dient. Die Methode beruht auf einer Kombination von Antikörperdetektion mit anschließender modifizierter Polymerasekettenreaktion. Am Ende entsteht ein DNA-Fragment, das mit einer Fluoreszenz-gekoppelten Sonde detektiert werden kann. Für die lokale Detektion binden zwei verschiedene Antikörper an ein und dasselbe Protein. Zur Bestätigung einer Protein-Protein

Interaktion werden zwei verschiedene Antikörper benötigt, die jeweils eines der zu untersuchenden Proteine binden. Es gibt zwei Methoden um den PLA auszuführen. Die direkte Methode funktioniert mit modifizierten primären Antikörpern. Die zweite Methode ist ein indirekter Nachweis. In diesem Fall sind die sekundären Antikörper modifiziert und binden die primären Antikörper wirtsspezifisch. In vorliegender Arbeit findet nur die indirekte Methode zur Verifikation einer Protein-Protein Interaktion Anwendung. Die Modifikation der jeweiligen Antikörper besteht darin, dass eine von zwei möglichen DNA-Sequenzen an den Antikörper gekoppelt ist. Dabei trägt einer der Antikörper die DNA-Sequenz der so definierten MINUS-Probe und der andere die Sequenz der PLUS-Probe. Mit Hilfe von Adapter-Oligomeren und der DNA Ligase binden die MINUS- und PLUS-DNA-Sequenzen aneinander und bilden ein ringförmiges Ligationsprodukt. Durch die Zugabe der Phi29-DNA Polymerase wird ein einzelsträngiges, in sich gewundenes PCR-Produkt amplifiziert. Eine der Proben dient hierfür sowohl als Linker zum Proteinkomplex als auch als Primer für die Polymerase. Die andere Probe dient als Templat und wird von der Polymerase ständig linearisiert und in einer sogenannten „rolling circle amplification (RCA)“ vervielfältigt. Da nur eine DNA-Sequenz als Templat dient und die andere am Antikörper gebunden ist, entsteht in unmittelbarer Nähe der Proteine eine globuläre, sich wiederholende DNA-Sequenz. Mit einer Fluoreszenz-markierten Sonde kann das Amplifikat sichtbar gemacht werden.

Die Durchführung des PLA entspricht bis zur Zugabe der beiden PLA-Proben PLUS und MINUS als sekundäre Antikörper dem Protokoll der Immunfärbung in HeLa-Zellen. Die Antikörper werden im Blockierungspuffer 1:5 verdünnt und dann in einem Volumen von 40 µl pro Ansatz auf die zelltragenden Plättchen gegeben. In einer Feuchtekammer werden die Zellen für 1 h bei 37 °C mit den PLA-Proben inkubiert. In zwei Waschschrritten mit 1x Waschpuffer A werden die Zellen für jeweils 10 Minuten auf einem vertikalen Schüttler gewaschen. Im Anschluss erfolgt die Zugabe des zur Ligation der beiden PLA Proben notwendige Ligasemix. Dieser wird erneut 1:5 verdünnt und enthält 0.2 % Ligase pro Ansatz. Nach weiteren 30 Minuten in der Feuchtekammer bei 37 °C wird der Ligationsansatz mit 1x Waschpuffer A für zweimal zwei Minuten abgewaschen. Zur Amplifikation des PCR-Fragments wird die Amplifikationsstocklösung 1:5 verdünnt mit 0.5 µl Polymerase pro Ansatz (1:80)

versetzt. Die Amplifikation findet für 100 Minuten in der Feuchtekammer bei 37 °C statt. Zum Entfernen des Amplifikationsmixes wird zweimal für 10 Minuten mit 1x Waschpuffer B gewaschen. Vor der DAPI-Färbung erfolgt ein zusätzlicher Waschschriff für eine Minute mit 0.1x Waschpuffer B. Dann wird die DAPI-Lösung auf die Proben gegeben und für fünf Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Die Färbelösung wird durch zweimal fünf Minuten waschen mit PBS-T entfernt. Die Deckgläschen werden bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss getrocknet und anschließend in Mowiol/DABCO auf einem Objektträger eingebettet. Die Proben können bei -20 °C eingefroren werden.

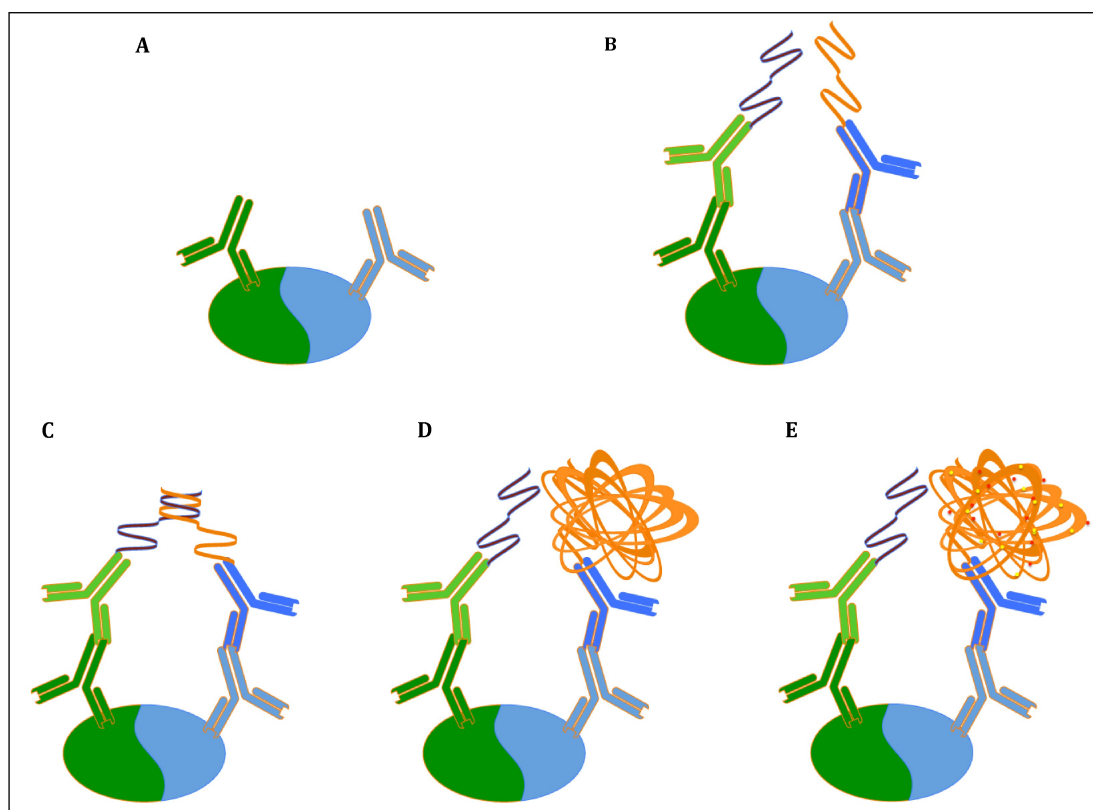


Abbildung 4.5: Proximity Ligation Assay

A: Bindung der primären Antikörper an zwei interagierende Proteine. **B:** Bindung der sekundären Antikörper gekoppelt mit MINUS- und PLUS-Probe an die Primärantikörper. **C:** Ligation der MINUS- und PLUS-Proben-Adapter und Bildung der Startsequenz für die DNA Polymerase. **D:** Die DNA Polymerase synthetisiert in einer rolling circle Amplifikation ein PCR-Amplifikat mit hundertfacher Wiederholung. **E:** Die Fluoreszenz-gekoppelte Sonde bindet an die Sequenzwiederholungen und die Proteininteraktion kann visualisiert werden.

4.4.8 Proteinextraktion aus *X. laevis* Embryonen durch nichtionisches Detergens

Für die Proteinisolation werden jeweils sechs Embryonen abgesammelt und in 1.5 ml Reaktionsgefäße überführt. Alles Weitere wird auf Eis durchgeführt. Das überschüssige *Xenopus* Medium wird abgesaugt und durch 10 µl/Embryo RIPA-Puffer plus Protease-Inhibitor (10x) und Phosphostop (10x) ersetzt. Die Homogenisierung und Lyse der Embryonen erfolgt über das Aufziehen in eine 1 ml Spritze mit einer 0.4 mm Nadel. Im Anschluss rotieren die Proben zur Gewinnung von cytoplasmatischen und membrangebundenen Proteinen für eine Stunde bei 4 °C über Kopf. Ein Zentrifugationsschritt für 10 Minuten bei 4 °C und 13000 rpm trennt das Fett der Embryonen von den Proteinen, die sich jetzt im Überstand befinden. Der Überstand wird mit SDS-Ladepuffer versetzt, für fünf Minuten auf 95 °C erhitzt und kann bei -20 °C gelagert werden.

4.5 Zellbiologische Methoden

4.5.1 Kultivieren und Passagieren von humanen Zellen

Die humanen Zelllinien Hek293 und HeLa werden im Brutschrank bei 37 °C und 7 % CO₂ gehalten. Als Kulturmedium dient für die Hek293-Zellen DMEM-, für die HeLa-Zellen RPMI-Komplettmedium. Vor dem Passagieren der Zellen wird das Kultivierungsmedium abgenommen und durch 500 µl Trypsin/EDTA ersetzt. Dies führt zum Ablösen und Vereinzeln der Zellen. Durch die Zugabe des Kultivierungsmediums wird der proteolytische Verdau gestoppt und die Zellen können in geeigneter Verdünnung in neue Gewebekulturflaschen überführt werden.

4.5.2 Kultivieren und Passagieren von *Drosophila* S2R+ Schneiderzellen

Die Haltung der Schneiderzellen erfolgt in einem Brutschrank bei 25 °C ohne zusätzliches CO₂. Als Medium dient Schneider S2 Komplettmedium. Da die Zellen semi-adherent sind reicht starkes Klopfen der Zellkulturflaschen aus, um eine vollständige Lösung der Zellen vom Flaschenboden zu erzielen. In geeigneter Verdünnung wird die Zellsuspension in eine Kultivierungsflasche mit frischem Komplettmedium überführt.

4.5.3 Konservierung von Zellen in Kryostocks

Zur längeren Aufbewahrung diverser Zellen können diese durch Kryokonservierung in flüssigem Stickstoff gelagert werden. Hierfür werden die Zellen dreimal mit 1x PBS gewaschen und trypsinisiert. Die von der Zellkulturflasche gelösten Zellen werden in Kompletmedium aufgenommen und dann fünf Minuten bei 4 °C und 1000 rpm zentrifugiert. Im Weiteren wird alles auf Eis ausgeführt. Der Überstand wird abgenommen und durch 1800 µl FCS ersetzt. Das Pellet wird darin resuspendiert und in ein Kryoröhrchen überführt. Hier erfolgt die Zugabe von 200 µl DMSO. Nach mehrmaligem Invertieren werden die Kryostocks für eine Woche in einem stark abgedichteten Styroporbehältnis bei -80 °C gelagert. Vor der Lagerung im Stickstofftank werden die Kryoröhrchen kurz in flüssigen Stickstoff getaucht und dann im Tank eingelagert.

Die Rekultivierung der Zellen erfolgt durch Auftauen der Kryostocks bei Raumtemperatur. Die Zellsuspension wird in 15 ml Gefäße überführt und mit 10 ml Kompletmedium aufgefüllt. Um das DMSO zu entfernen werden die Zellen für fünf Minuten bei 1000 rpm pelletiert. Das Pellet wird in 10 ml Kompletmedium gelöst. Mit der Überführung der 10 ml Zellsuspension in eine Zellkulturflasche sind diese erneut in Kultur genommen.

4.5.4 Transfektion mittels kationischer Polymere

Zur Transfektion von HeLa-Zellen als auch von *Drosophila* Schneiderzellen werden Vehikel benötigt, die die DNA in die Zellen einbringen können. Positiv geladene kationische Polymere sind in der Lage die negativ geladene DNA zu binden. Als Komplex bindet das Vehikel mit der DNA an die negativ geladene Zellmembran. Dort wird der Komplex vermutlich durch Endocytose in die Zelle aufgenommen. Als kationisches Polymer wurde in dieser Arbeit Turbofect™ der Firma Fermentas verwendet. Die Durchführung der Transfektion wurde abhängig von der Zellzahl nach Herstellerangaben ausgeführt.

4.5.5 Transfektion mit der Calcium-Phosphat-Methode

Um den Stoffwechsel Hek293-Zellen anzuregen, wird vier Stunden vor der Transfektion das Kulturmedium gewechselt. Die zu transfizierende DNA wird in 1x

HeBS aufgenommen. In einer spiralförmigen Bewegung vom Boden des Behältnisses nach oben erfolgt die Zugabe von 2.5 M CaCl₂. Nach mehrmaligem Invertieren und einer Inkubationszeit von 20 Minuten bei Raumtemperatur hat sich das ausgefallene Calciumphosphat mit der Plasmid-DNA zu Präzipitaten zusammengefügt, die von den Hek293-Zellen durch Endocytose aufgenommen werden. Da die Menge an Präzipitaten Stress für die Zellen verursacht, wird das Medium nach vier Stunden erneuert.

4.5.6 Reporteragenassay in Hek293- und *Drosophila* Schneiderzellen

Die Aktivierung bestimmter Zielgene kann mittels an einen Luziferase-gekoppelten Reporter festgestellt werden. Je stärker die Aktivierung ist, desto mehr Luziferase wird hergestellt und dementsprechend mehr Luziferin wird umgesetzt. Um die Aktivität unabhängig von der Transfektionseffizienz messen zu können, wird parallel zum Luziferaseassay ein β -Galaktosidaseassay ausgeführt.

Für den Reporteragenassay werden 6-well-Platten mit einer Zelldichte von 40 % benötigt. Die Transfektionsmethode ist dabei abhängig von der Zellart. Für Hek293-Zellen kann die Calcium-Phosphat-Methode angewendet werden. Für HeLa- und *Drosophila* Schneiderzellen reicht die Transfektionseffizienz der Calcium-Phosphat-Methode nicht aus. Hierfür wird dann auf die kationischen Polymere zurückgegriffen.

Der Transfektionsansatz für Hek293-Zellen setzt sich folgendermaßen zusammen:

| | |
|-------------|---|
| 400 μ l | 1x HeBS, pH 7.11 |
| 0.4 μ g | CMV- β -Galaktosidase Plasmid-DNA |
| 0.8 μ g | Reporter mit Luziferase gekoppelter Plasmid-DNA |
| 20 μ l | 2.5 M CaCl ₂ |

Der Transfektionsansatz für Schneiderzellen mit Turbofect™-Reagenz setzt sich folgendermaßen zusammen:

| | |
|-------------|---------------------------------|
| 200 μ l | Schneider-Minimalmedium |
| 1.6 μ g | Rpl-Plasmid-DNA |
| 1.6 μ g | dTcf-Reporter Plasmid-DNA |
| 1.0 μ g | Test-Plasmid-DNA |
| 8.4 μ l | Turbofect™ (doppelte DNA-Menge) |

Nach 2 Tagen Inkubationszeit werden die Zellen geerntet. Für die Hek293-Zellen wird ein Drittel der Zellen für den Luziferaseassay verwendet, zwei Drittel für den β -Galaktosidaseassay. Hierfür werden die Zellen in 1.5 ml 1x PBS aufgenommen, auf die beiden Ansätze verteilt und 10 Minuten bei 4 °C und 5000 rpm pelletiert. Alle weiteren Schritte werden auf Eis durchgeführt.

Luziferaseassay

Das Zellpellet wird in 125 μ l 1x Lysispuffer aufgenommen und mittels einer Spritze (\emptyset 0.4 mm) durch mehrmaliges Aufziehen lysiert. 20 μ l der Probe werden mit 100 μ l Luziferasereagenz versetzt. Am Luminometer wird dann die freigesetzte Lichtmenge gemessen, die bei der Oxidation von Luziferin zu Oxyluziferin durch die Luziferase umgesetzt wird.

β -Galaktosidaseassay

Die Zelllyse findet in 150 μ l 0.25 M Tris/ H_3PO_4 statt. Hierfür wird das Pellet mittels einer Spritze im Lysispuffer mehrmals aufgezogen. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 13000 rpm und 4 °C befindet sich die β -Galaktosidase im Überstand.

Reaktionsansatz pro Probe:

| | |
|-------------|------------------------------|
| 132 μ l | ONPG-Substrat |
| 6 μ l | 100x Mg-Lösung |
| 462 μ l | 0.1 M Natrium-Phosphatpuffer |
| 20 μ l | Lysat |

Das Gemisch inkubiert so lange bei Raumtemperatur, bis eine deutliche Gelbfärbung entstanden ist. Die Reaktion wird durch Zugabe von 1 ml $NaHCO_3$ gestoppt. Bei 420 nm wird am Photometer die Extinktion gemessen.

4.5.7 Renilla-Reportergenassay

Alternativ zur Bestimmung der β -Galaktosidaseaktivität wird bei Schneiderzellen die Transfektionseffizienz durch die Renilla-Luziferaseaktivität bestimmt. Hierfür wird das Renilla-Luziferase Assay System (Promega, Mannheim) verwendet. Die Hälfte der Zellmenge wird für den Renilla-Reportergenassay eingesetzt, die andere Hälfte für den Luziferaseassay. Nach dem Pelletieren der Zellen werden diese in 250 μ l Renilla Lysis-Reagenz lysiert. Das für jeden Versuch frisch angesetzte Renilla Substrat wird

1:100 verdünnt bevor es zu den Proben gegeben wird. Der Substratumsatz wird am Luminometer bestimmt.

4.5.8 Immunfärbung auf HeLa-Zellen

Für die Immunfärbung werden zunächst kleine Glasplättchen in 6-well Kammern für eine Stunde mit Fibronectin beschichtet. Nach zweimaligem Waschen mit 1x PBS werden 500 µl einer dichten HeLa-Zellsuspension in die Kammern gegeben. Vor der Transfektion haben die Zellen dann über Nacht Zeit auf den Plättchen zu adherieren. Mittels Turbofect™ werden die Zellen mit 3 µg Plasmid-DNA pro Kammer transfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion beginnt die eigentliche Immunfärbung. Hierfür wird das Zellmedium komplett abgesaugt und die Zellen dreimal für je fünf Minuten mit 1x PBS/0.5 mM CaCl₂ gewaschen. Zur Fixierung werden die Zellen bei Raumtemperatur für 10 Minuten in 1x PBS/4 % Formaldehyd inkubiert. Zur Entfernung des Formaldehyds folgen drei Waschschrte für je fünf Minuten mit 1x PBS. Um die Permeabilität der Zellen für die Antikörper zu verbessern, werden die Zellen für fünf Minuten bei Raumtemperatur mit 1 % Triton-X/1x PBS inkubiert. Nach dem Permeabilisieren werden die Plättchen erneut zweimal für fünf Minuten mit 0.1 % Triton-X/1x PBS (PBT) gewaschen. Zur Blockierung wird PBT mit 20 % Pferdeserum verwendet. Die Inkubation in der Blockierlösung dauert 30 Minuten bei Raumtemperatur. Um die benötigten Volumina zu minimieren, werden die einzelnen Glasplättchen in eine Feuchtekkammer auf Parafilm gesetzt. Der primäre Antikörper wird in der Blockierlösung verdünnt und die Zellen damit über Nacht bei 4 °C inkubiert. Dreimaliges fünfminütiges Waschen mit PBT bei Raumtemperatur entfernt ungebundene Primärantikörper. Anschließend wird erneut für 30 Minuten mit PBT und 20 % Pferdeserum blockiert. In der Blockierlösung wird auch der Fluoreszenzgekoppelte Sekundärantikörper verdünnt. Nach einer Inkubation von 30–60 Minuten im Dunkeln wird auch dieser wieder mit PBT bei Raumtemperatur gewegewaschen. Zur Färbung der Zellkerne werden die Zellen für fünf Minuten im Dunkeln mit der DAPI-Lösung bedeckt. Zweimaliges Waschen mit 1x PBS entfernt die Lösung. Die Glasplättchen werden nach kurzem Trocknen mit der beschichteten Seite auf einen Tropfen Mowiol auf einem Objektträger gebettet um im Dunkeln vollständig zu trocknen. Die Proben sind bei –20 °C lagerbar.

5. Ergebnisse

5.1 Die *Xenopus* Lef/Tcfs in der Reporterogenaktivierung in *Drosophila* Schneiderzellen

Um einen ersten Eindruck über die Wirkung der *Xenopus* Lef/Tcf Transkriptionsfaktoren in *Drosophila* zu bekommen, wurde deren Funktion *in vitro* untersucht. Hierfür wurde die Auswirkung der verschiedenen Lef/Tcfs auf die Aktivität des dTcf-Luziferase-Reporters in *Drosophila* Schneiderzellen (S2R+) analysiert. Der dTcf-Reporter enthält das kanonische dTcf-DNA-Bindemotiv CCTTTGATC in siebenfacher Wiederholung (Buechling et al., 2011) und unterscheidet sich somit kaum vom weit verbreiteten Vertebraten SuperTOPFlash Reporter-Konstrukt, das die CCTTGATC-Sequenz in achtfacher Wiederholung trägt.

Das Reportergen konnte in Fliegenzellen weder von Pangolin noch von einem der *Xenopus* Lef/Tcfs aktiviert werden (Abb.: 5.1 A). Dies steht im Gegensatz zur Promotoraktivierung in Wirbeltierzellen, wo vor allem die Geschwistergruppe XTcf1/XLef1 eine aktivierende Funktion ausübte (Pukrop et al., 2001, Ghogomu et al., 2006, Klingel et al., 2012). In der vorliegenden Arbeit führte einzig das *Drosophila* Wnt1 Homolog Wingless (Wg) zu einer signifikanten Erhöhung der Reporteraktivität ($p < 0.0005$). Diese Unterschiede könnten darauf beruhen, dass in *Drosophila* Schneiderzellen erst nach der Aktivierung durch Wg genügend Armadillo vorhanden ist, um eine etwaige Reporteraktivierung zu induzieren. Deshalb wurde der Einfluss der Lef/Tcfs auf durch Wingless voraktivierte Zellen untersucht. Tatsächlich induzierten in der Ko-Transfektion mit Wg alle getesteten Transkriptionsfaktoren die Aktivität des dTcf-Reporters. Deutlich stach dabei die hohe Aktivierung durch Lef heraus (Abb.: 5.2 B). Lef aktivierte etwa 10-fach stärker als die anderen Transkriptionsfaktoren. Selbst Tcf1, welches im phylogenetischen Stammbaum mit Lef eine Geschwistergruppe bildet und den dTcf-Reporter signifikant stärker aktivierte als Pangolin, war im Vergleich dazu ein schwacher Aktivator. In der Tat aktivierte es vergleichbar stark wie Tcf4, ein Mitglied der Geschwistergruppe Tcf3/Tcf4. Somit scheinen sich die Lef/Tcfs in diesem System funktional nicht in ihre Geschwistergruppen einzuordnen. Überraschenderweise wurde der dTcf-Reporter in diesem System auch von Tcf3 aktiviert, welches im Wirbeltiersystem generell als

Repressor angesehen wird. Hier konnte allerdings kein signifikanter Unterschied zur Aktivierung durch Pangolin ermittelt werden. Somit scheint Tcf3 in diesem Kontext funktional Pangolin am ähnlichsten zu sein.

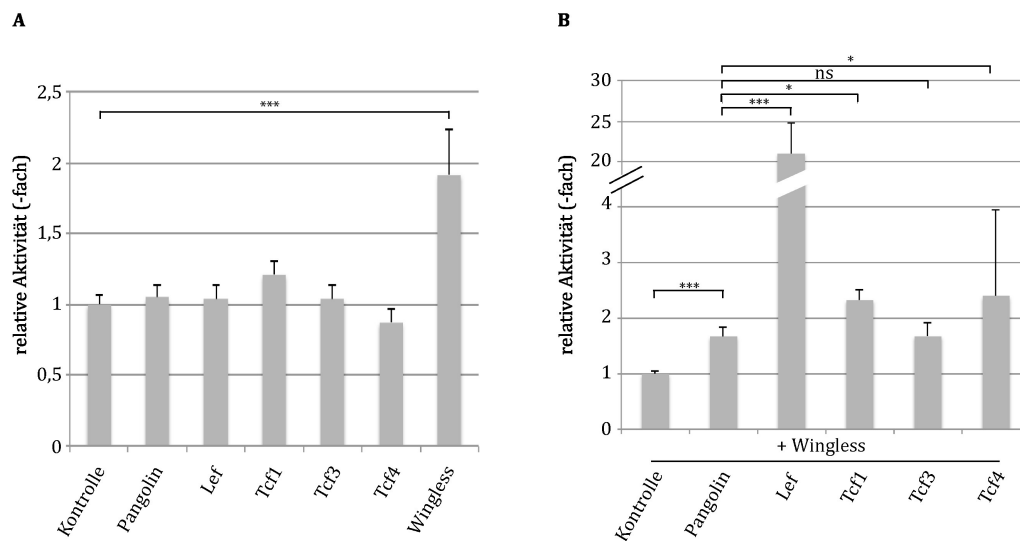


Abbildung 5.1: Nur unter Voraktivierung durch Wingless aktivieren die Lef/Tcfs und Pangolin den dTcf-Luziferase-Reporter

(A) Einzig Wg aktiviert den für den kanonischen Wnt-Weg spezifischen dTcf-Luziferase-Reporter in *Drosophila* Schneiderzellen. (B) Durch die Voraktivierung des Reporters mit Wingless erhöhen Pangolin und alle *Xenopus* Lef/Tcfs die Luziferaseaktivität. (Einseitiger studentischer T-Test: ns: nicht signifikant, * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler aus neun Einzeltransfektionen).

5.2 Einfluss der Lef/Tcfs und Pangolin auf die Distalless-Expression in Flügelimaginalscheiben

Um die funktionalen Unterschiede der Lef/Tcfs *in vivo* zu definieren, wurde die Auswirkung der Wnt-spezifischen nukleären Mediatoren auf die Zielgenexpression von Distalless in Flügelimaginalscheiben näher untersucht. Distalless ist ein anerkanntes Wingless-Zielgen, welches bereits in Flügelimaginalscheiben zur Untersuchung diverser Wnt-Signalweg Komponenten benutzt wurde (Schweizer et al., 2003, Zeng et al., 2008b). In allen Überexpressionsstudien wurden *Drosophila*-Stämme verwendet, die das Transgen hinter einer „upstream activating“-Sequenz (UAS) in ihr Genom integriert haben. Durch die Verkreuzung eines Treiberstammes (Gal4-Stamm), der die Expression des Gens hinter der UAS-Domäne in seinem spezifischen Wirkungsbereich fordert, mit einem UAS-Stamm, lässt sich die Überexpression des insertierten Gens auf distinkte Areale und Zeiträume der

Fliegenentwicklung begrenzen. Um mögliche Veränderungen der Distalless-Expression zu untersuchen, wurden die UAS-Stämme mit dem Patched-Gal4 Treiberstamm verkreuzt. Dessen Expressionsbereich erstreckt sich in der Flügelimaginalscheibe entlang der anterioren/posterioren Grenze. Dabei kreuzt er den wildtypischen Expressionsbereich von Distalless (Abb.: 5.2). Für die Überexpression wurden ausschließlich virginelle Weibchen der UAS-Stämme mit Männchen des Patched-Gal4-Stammes verkreuzt. Für jeden Transkriptionsfaktor wurde jeweils ein UAS-Stamm mit der Geninsertion auf dem zweiten (II) und einer auf dem dritten (III) Chromosom verwendet. Die Kreuzungen wurden konstant auf 25 °C gehalten, die Larven im dritten Instarlarvenstadium abgesammelt und für die Immunfärbung präpariert.

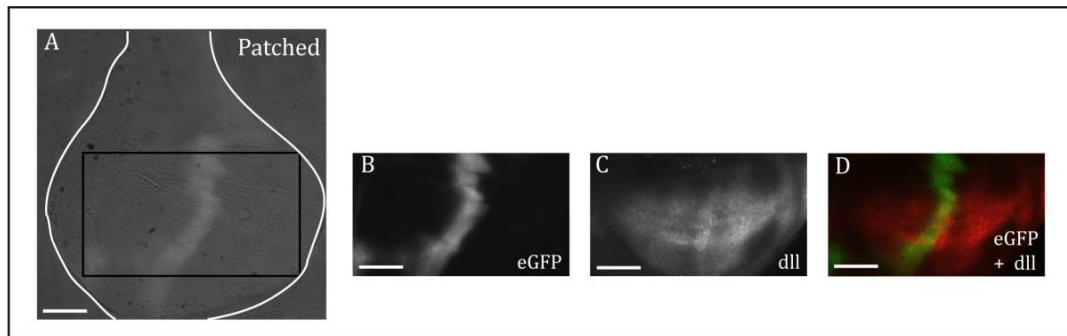


Abbildung 5.2: Der Wirkungsbereich von Patched kreuzt das Expressionsmuster von Distalless
 (A) Flügelimaginalscheibe im Durchlicht und überlagert mit dem Patched- Wirkungsbereich, dargestellt durch die eGFP-Lokalisation. (B-D) Ausschnitte der Flügelimaginalscheibe. (B) Wirkungsbereich von Patched, dargestellt durch die Expression von eGFP unter der Kontrolle des Patched-Promotors. (C) Immunhistologische Darstellung des Expressionsmusters von Distalless (dll). (D) Überlagerung von Wirkungs- und Expressionsbereich, eGFP in Grün, dll in Rot. (Balkenlänge entspricht 100 µm).

5.2.1 Die Überexpression der Wnt-Transkriptionsfaktoren in der Zielgenanalyse

Pangolin, dem sowohl eine Aktivator- als auch eine Repressorfunktion zugesprochen wird, zeigte im Hinblick auf die Distalless-Expression seine reprimierenden Eigenschaften (Cavallo et al., 1998, Schweizer et al., 2003). Unterschiede, bedingt durch den Insertionsort, führten in der Überexpression nur nach Insertion auf dem zweiten Chromosom (Pangolin(II)) zu einer Reduktion von Distalless. Dies wird deutlich durch die Unterbrechung im ansonsten durchgehenden Distalless-Expressionsmuster (Abb.: 5.3 B). Nach der Überexpression der Pangolin-Insertion im

dritten Chromosom (Pangolin(III)) blieb das Expressionsmuster ebenso wie nach der Überexpression des β -Lactamase-Gens (UAS-LacZ) unverändert.

Wie bei der Aktivierung des dTcf-Luziferasekonstrukts im Reporterassay ließen sich die *Xenopus* Lef/Tcfs auch in diesem System funktional nicht in ihre Geschwistergruppen einordnen. Während Lef keine Veränderungen in der Expression von Distalless verursachte, war nach der Überexpression von Tcf1 und Tcf4 Distalless im Patched-Expressionsbereich reduziert (Abb.: 5.3 C, D, F). Dabei war es unerheblich, ob die Insertion auf dem zweiten oder dritten Chromosom lag. Die Repression durch Tcf4 schien dabei am stärksten zu sein. Die Analyse der Flügelimaginalscheiben aus Tcf3 überexprimierenden Larven erwies sich als sehr schwierig. Häufig erschwerten starke Verformungen der Imaginalscheiben die Untersuchungen. Die wenigen auswertbaren Imaginalscheiben zeigten eine leicht verstärkte Expression von Distalless Richtung dorsal (Abb.: 5.3 E; durch Pfeile markiert). Dies unterscheidet sich qualitativ von den Effekten der anderen Lef/Tcfs, einschließlich Pangolin, und spricht für eine aktivierende Funktion von Tcf3 auf die Expression von Distalless.

Insgesamt scheint also Tcf1, das in *Xenopus* als starker Aktivator gilt, in der Flügelimaginalscheibe zumindest die Distalless-Expression zu reprimieren. Der in *Xenopus* als Repressor wirkende Transkriptionsfaktor Tcf3 scheint die Expression des Zielgens dagegen zu aktivieren. Die Überexpression von Lef, welches in der Reporteranalyse der stärkste Aktivator war, führte zu keiner Veränderung in der Distalless-Expression. In der Einteilung der *Xenopus* Lef/Tcfs nach ihrer Funktion in *Drosophila* würden hier Tcf1 und Tcf4 eine Geschwistergruppe bilden.

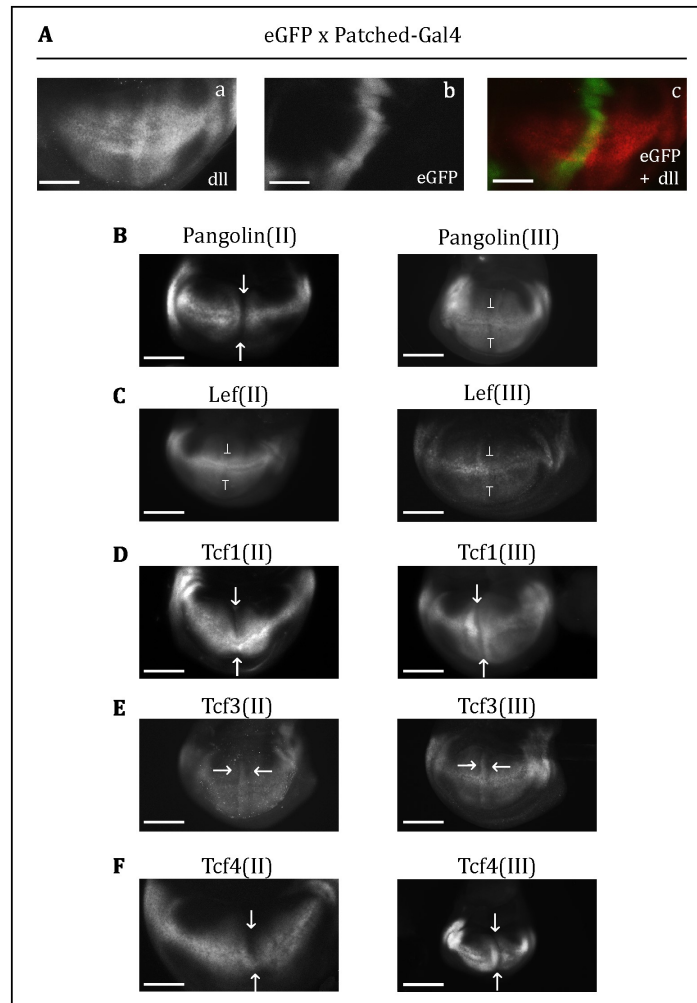


Abbildung 5.3: Die Überexpression der *Xenopus* Lef/Tcfs und Pangolin in der Analyse der Distalless-Expression

(A) Das Expressionsmuster von Distalless (dll, a) und den Wirkungsbereich von Patched, dargestellt durch die Expression von eGFP unter dem Patched-Promotor (b) sowie ihre Überlagerung (c). (B-F) Die Auswirkungen der Überexpression von Pangolin und den *Xenopus* Lef/Tcfs. (II: Insertion auf dem zweiten Chromosom, III: Insertion auf dem dritten Chromosom, Pfeile: Veränderungen im Distalless-Expressionsmuster, T: keine Veränderungen, Balkenlänge entspricht 100 µm).

5.2.2 Zielgenanalyse der *Xenopus* Lef/Tcfs in Pangolin defizientem Hintergrund

Inwieweit das einzelne *Xenopus* Lef/Tcf endogenes Pangolin ersetzen kann, sollte in der Überexpression der Lef/Tcfs in Pangolin defizientem Hintergrund genauer analysiert werden. Schweizer und Kollegen (2003) zeigten bereits, dass Pangolin nullmutante Klone in den Flügelimaginalscheiben zur Reduktion der Distalless-Expression führten. Der Überexpressionsphänotyp und der Pangolin Reduktionsphänotyp unterscheiden sich folglich nicht. Dies macht es umso spannender herauszufinden, ob eines der Lef/Tcfs die Funktion von Pangolin

übernehmen kann und somit das wildtypische Expressionsmuster wiederherstellt. Für den Pangolin defizienten Hintergrund wurden Fliegenstämme verwendet, die eine Pangolin RNA Interferenz Sequenz auf einem der beiden Chromosomen integriert hatten. Für die Insertion auf dem zweiten Chromosom war dies PangolinRNAiKK (PanRNAi(II)) und auf dem dritten Chromosom PangolinRNAiGD (PanRNAi(III)). Die Überexpression führte nur in einem der beiden Stämme, PanRNAi(III), unter dem Treiberstamm Patched-Gal4 zu einer Reduktion von Distalless. Bei PanRNAi(II) traten keine Veränderungen im Expressionsmuster von Distalless auf (nicht gezeigt). Entsprechend wurde für die weiteren Experimente einzig der PanRNAi(III)-Fliegenstamm verwendet. Die Reduktion von Distalless im Wirkungsbereich von Patched blieb erhalten, wenn die PanRNAi(III)-Fliegen mit UAS-LacZ-Fliegen gekreuzt waren (Abb.: 5.4 C).

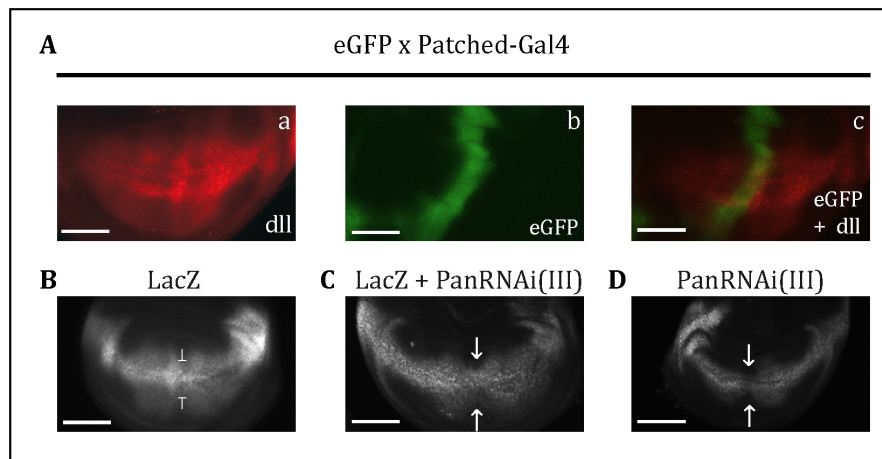


Abbildung 5.4: PangolinRNAi(III) führt zur reprimierten Distalless-Expression

(A) Das Expressionsmuster von Distalless (dll, a) und den Wirkungsbereich von Patched, dargestellt durch die Expression von eGFP unter dem Patched-Promotor (b) sowie ihre Überlagerung (c). Die Überexpression von LacZ führt zu wildtypischer Distalless-Expression (B). (C, D) Durch PanRNAi wird die Distalless-Expression reprimiert. Die Kontrolle der Pangolinspezifität ist durch LacZ;PanRNAi(III) gegeben. (Pfeile: Veränderungen im Expressionsmuster, \top : keine Veränderungen, Balkenlänge entspricht 100 μm).

Das Rekonstitutionsexperiment von PangolinRNAi(III) mit UAS-Pangolin(II) konnte nicht ausgewertet werden, da Pangolin(II) homozygot letal war und das Verkreuzen eines heterozygoten Fliegenstamms ohne die entsprechenden Markergene zu keinem definierten Genotyp führt.

Zur großen Überraschung konnte keines der *Xenopus* Lef/Tcfs in Pangolin defizientem Hintergrund die wildtypische Distalless-Expression vollständig

wiederherstellen. Während Lef und Tcf3 zu einer partiellen Wiederherstellung des Distalless-Expressionsmusters in einigen der ausgewerteten Imaginalscheiben führten (Abb.: 5.5 D, F, durch Pfeil und \perp gekennzeichnet), konnten Tcf1 und Tcf4 die durch PangolinRNAi reprimierte Distalless-Expression nicht wieder erhöhen. Weiterhin konnte kein Unterschied zu der Überexpression in wildtypischem Hintergrund detektiert werden. Die Rekonstitutionsexperimente bestärken die bereits in der Überexpression geänderte funktionelle Einteilung der Geschwistergruppen. Auch hier würden Tcf1 und Tcf4 Teil derselben Gruppe sein.

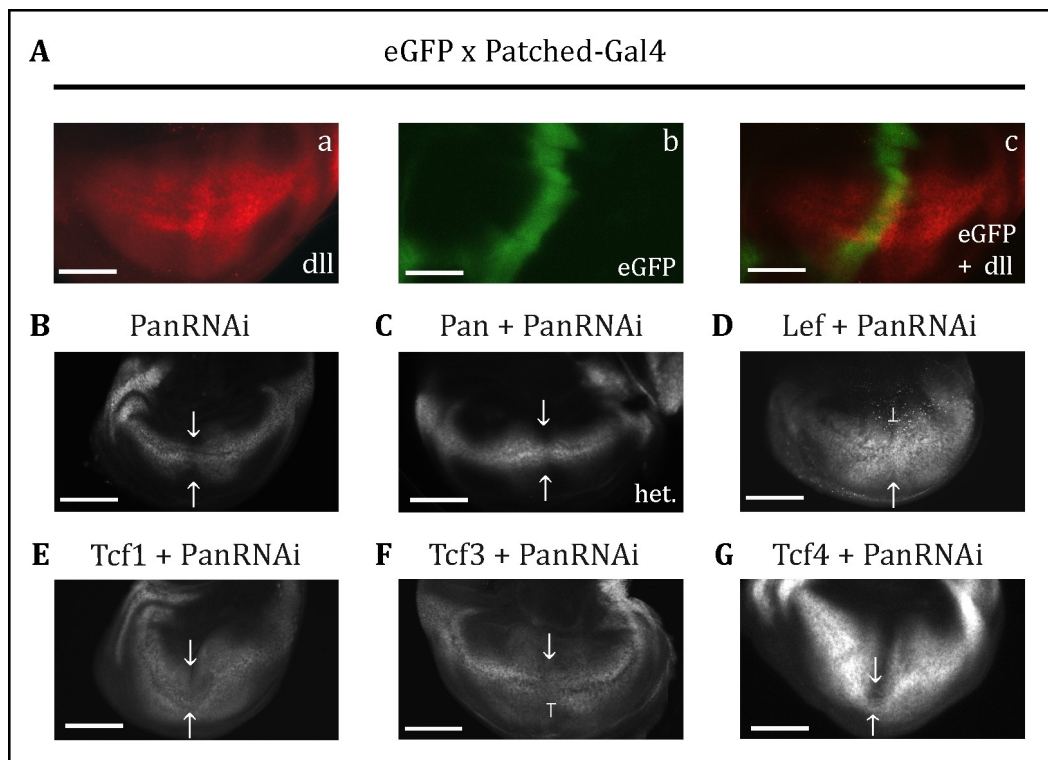


Abbildung 5.5: Die Rekonstitution von Pangolin mit den *Xenopus* Lef/Tcfs

(A) Das Expressionsmuster von Distalless (dll, a) und der Wirkungsbereich von Patched, dargestellt durch die Expression von eGFP unter dem Patched-Promotor (b) sowie ihre Überlagerung (c). (B) Die reduzierte Distalless-Expression durch PangolinRNAi(III). Die Rekonstitution mit Pangolin (Pan) konnte nicht ausgewertet werden, da der Fliegenstamm homozygot letal war und der Genotyp bei Kreuzungen mit heterozygoten Fliegen nicht bestimmt werden konnte (C). (D-G) zeigt die Rekonstitution mit den *Xenopus* Lef/Tcfs. (het.: heterozygot, Pfeile: Veränderungen im Expressionsmuster, \perp : keine Veränderung, Pfeil/ \perp : partielle Wiederherstellung des wildtypischen Expressionsmusters, Balkenlänge entspricht 100 μ m).

5.3 Funktionsanalyse der Lef/Tcfs in der Flügelmorphogenese

Für die Funktionsanalyse der unterschiedlichen UAS-Lef/Tcf-Fliegenstämme während der Flügelentwicklung in *Drosophila* wurde ausschließlich der Treiberstamm MS1096-Gal4 verwendet (Mace und Tugores, 2004). Dieser Stamm, der einer Insertion im *beadex*-Gen entspricht, führt zu einer UAS-Gen-Expression über den gesamten Flügel hinweg und wird häufig für Überexpressionen in *Drosophila* Flügeln verwendet (Lawrence et al., 2000, Sander et al., 2010). Die Fliegen wurden während der Entwicklung bis zur Imago konstant auf 25 °C gehalten. Einzig die Flügel der Weibchen aus der F1-Generation wurden nach der Präparation genauer untersucht. Für die Analyse veränderter Flügelstrukturen wurden neben einer Übersicht des Gesamtflügels auch drei unterschiedliche Detailaufnahmen dokumentiert (Abb.: 5.6). Diese Detailaufnahmen bilden folgende Flügelbereiche ab: a) die Margin nahe der Schulter, b) die Venen, wenn möglich mit anteriorer und posteriorer Quervene und c) die Margin am Übergang von der anterioren zur posterioren Flügelhälfte. Als wildtypischer Fliegenstamm wurde YellowWhite (YW) verwendet.

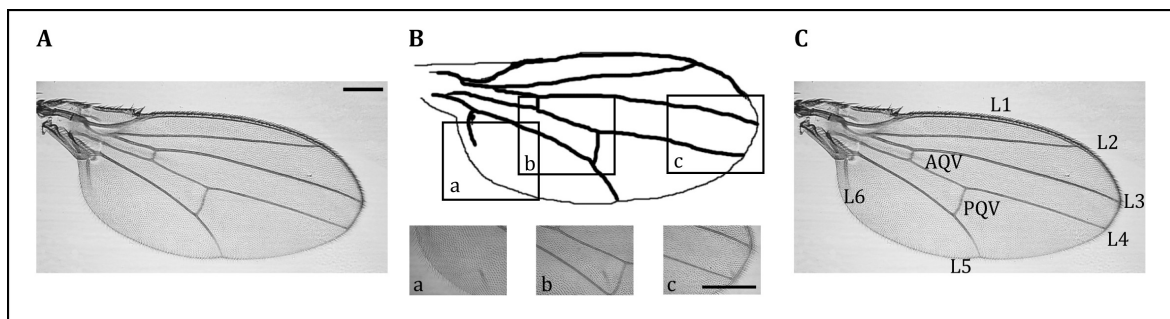


Abbildung 5.6: Analyse der Flügelmorphologie

(A) Wildtypischen Flügel einer YW-Fliege. In (B) ist der Flügel schematisch dargestellt. Die Ausschnitte für die Detailaufnahmen sind in der Skizze angezeigt. a, b und c entsprechend den Detailaufnahmen des wildtypischen Flügels von (A). (C) Die Benennung der einzelnen Flügelvenen. (AQP: anteriore Quervene. PQV: posteriore Quervene, L1-6: Longitudinalvene 1-6. Der Maßbalken im Gesamtflügel (A) entspricht 150 µm und im Flügeldetail (B a, b, c) 50 µm).

5.3.1 Veränderung der Flügelmorphologie durch die Überexpression der Wnt-Transkriptionsfaktoren von *Drosophila* und *Xenopus*

Die extremen Unterschiede, die durch den Insertionsort des Transgens hervorgerufen wurden, sind deutlich im Vergleich der Pangolin (II)- und Pangolin(III)-Fliegen zu sehen. Während nach Insertion auf dem dritten Chromosom (Pangolin(III)) keine

Veränderungen im Flügel feststellbar waren, konnten nach Insertion auf dem zweiten Chromosom (Pangolin(II)) keine Flügel ausgewertet werden. Durch starke Deformationen, unter anderem der Beine, konnten die Pangolin(II)-Imagos sich nicht aus der Verpuppung befreien und starben noch vor der Flügelentfaltung. Der für die Überexpression beschriebene Margin Verlust (Brunner et al., 1997) konnte somit in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden.

Für die Überexpression der *Xenopus* Lef/Tcfs konnten mit Ausnahme von Tcf3(II) genügend Imagos für die Flügelpräparation gesammelt werden. Die Gewinnmutante von Tcf3(II) führte wie Pangolin(II) zum Tod der Imagos noch in den Puppen.

Trotz der Gemeinsamkeit im Verlust der Flügelmargin ließen sich für die unterschiedlichen Lef/Tcfs distinkte Details definieren, die für die Überexpression einzelner Transkriptionsfaktoren charakteristisch erscheinen. So konnten Lef überexprimierende Fliegen ihre Flügel nicht mehr vollständig entfalten, was zur Überlappungen distaler Flügelbereiche führte (Abb.: 5.7 D, D'). Dieser auffallende Phänotyp trat sowohl bei Lef(II) als auch bei Lef(III) auf und scheint daher unabhängig vom Insertionsort zu sein. Die Tcf1 und Tcf4 überexprimierenden Flügel waren ununterscheidbar. Neben Verlusten in der Margin waren zusätzliche Verluste in den Quervernen offensichtlich (Abb.: 5.7 E-E', G-G'). Die Insertion auf dem dritten Chromosom verursachte in beiden Fällen stärkere Missbildungen als die Insertion auf dem zweiten Chromosom. Auch konnten ektopische Haare, wenn überhaupt, nur an den Flügelrändern bei Insertion auf dem dritten Chromosom detektiert werden (Abb.: 5.7 E-E' und G-G', mit Pfeilspitzen gekennzeichnet). Ob die durch Überexpression von Tcf3 hervorgerufenen Veränderungen prinzipiell denen von Tcf1 und Tcf4 ähneln, lässt sich mit den untersuchten Flügeln nicht belegen, da eine genaue Analyse der Margin und der Quervernen bei Tcf3(III) auf Grund sehr starker Missbildungen nicht durchgeführt werden konnte (Abb.: 5.7 F-F'). Insgesamt scheint auch hier für Tcf1 die funktionale Ähnlichkeit zu Tcf4 höher als zu Lef.

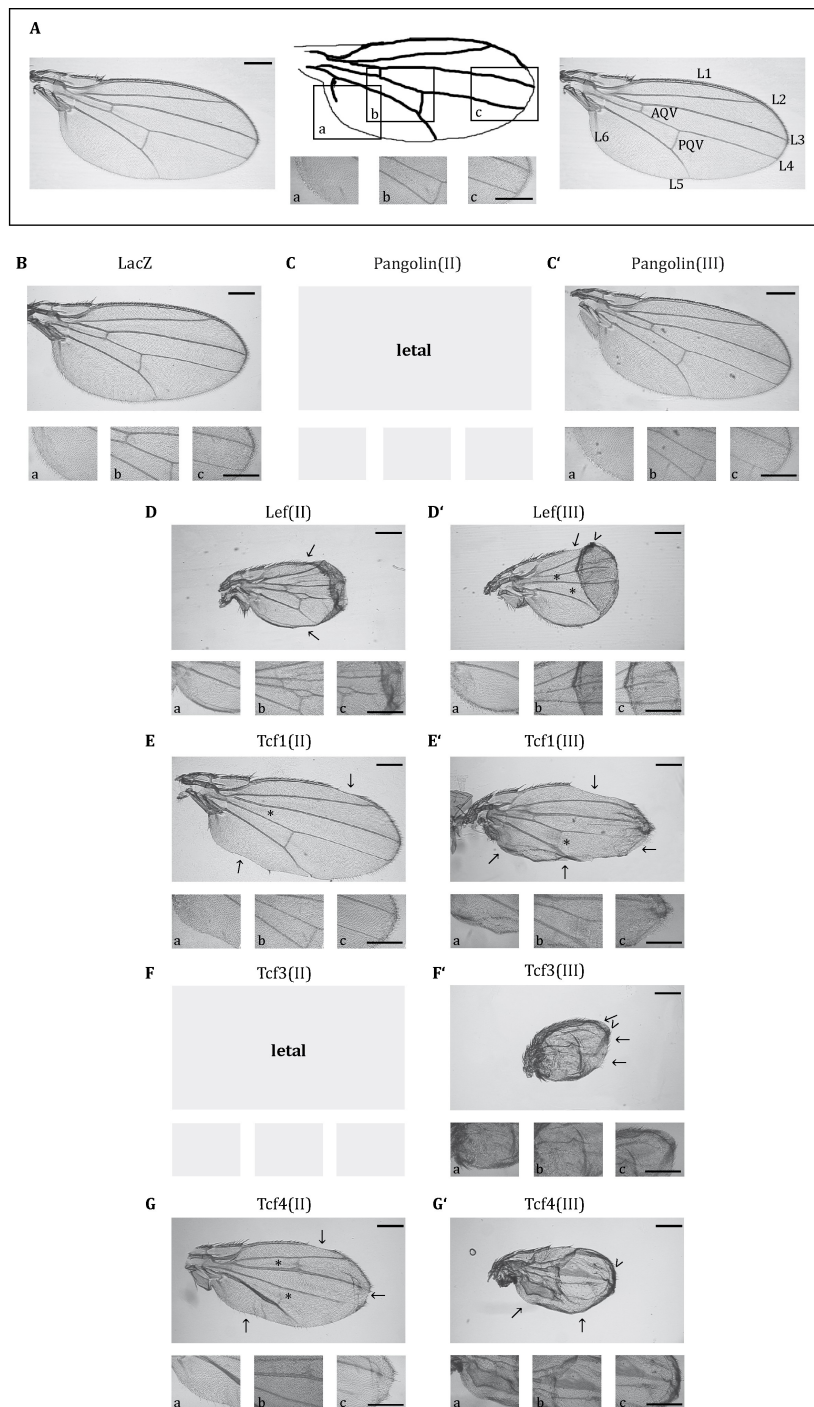


Abbildung 5.7: Lef/Tcf Überexpressionen führen zu charakteristischen Defekten der Flügelmorphologie

Als Treiberstamm wurde MS1096-Gal4 verwendet. (A) Wildtypischer Flügel des YW-Stamms, dessen schematische Darstellung und die Lokalisation der Detailaufnahmen, sowie wie das Venenmuster eines wildtypischen Flügels. (AQV: anteriore Quervene, PQV: posteriore Quervene L1-L6: Longitudinalvene 1-6). Die Überexpression von UAS-LacZ führte zu wildtypischen Flügeln (B). (C-G) Die Flügelmorphologie nach Überexpression von Pangolin und den *Xenopus* Lef/Tcfs. (Letal: Tod im Puppenstadium, II: Insertionsort auf dem zweiten Chromosom, III: Insertionsort auf dem dritten Chromosom, Pfeile: Verluste in der Flügelmargin, *: Veränderungen im Venenmuster, <: ektopische Borsten. Der Maßbalken im Gesamtflügel entspricht 150 μm , bei den Detailaufnahmen 50 μm).

5.3.2 Rekonstitutionsexperimente am Gesamtflügel

Für Rekonstitutionsexperimente wurde Pangolin durch Kreuzungen der *Drosophila* Stämme PangolinRNAi(II) und PangolinRNAi(III) mit MS1096-Gal4 im gesamten Flügel reduziert. Die Struktur des Flügels wurde damit so beeinflusst, dass erneut partielle Marginverluste in Erscheinung traten. Zusätzlich kam es häufig zu Verlusten der Quervenen und selten zu ektopischen Querven. Veränderungen in der Borstenzahl konnten nicht detektiert werden. Bei der PanRNAi(II)-Linie traten die Veränderungen bei unter 10 % der analysierten Flügel auf, bei der PanRNAi(III)-Linie in jedem Flügel. Aus diesem Grund wurden die Rekonstitutionsexperimente ausschließlich mit dem PanRNAi(III)-Stamm durchgeführt. Die Veränderungen in den Flügeln blieben erhalten, wenn PanRNAi(III)-Fliegen mit UAS-LacZ-Fliegen gekreuzt waren (Abb.: 5.8 E).

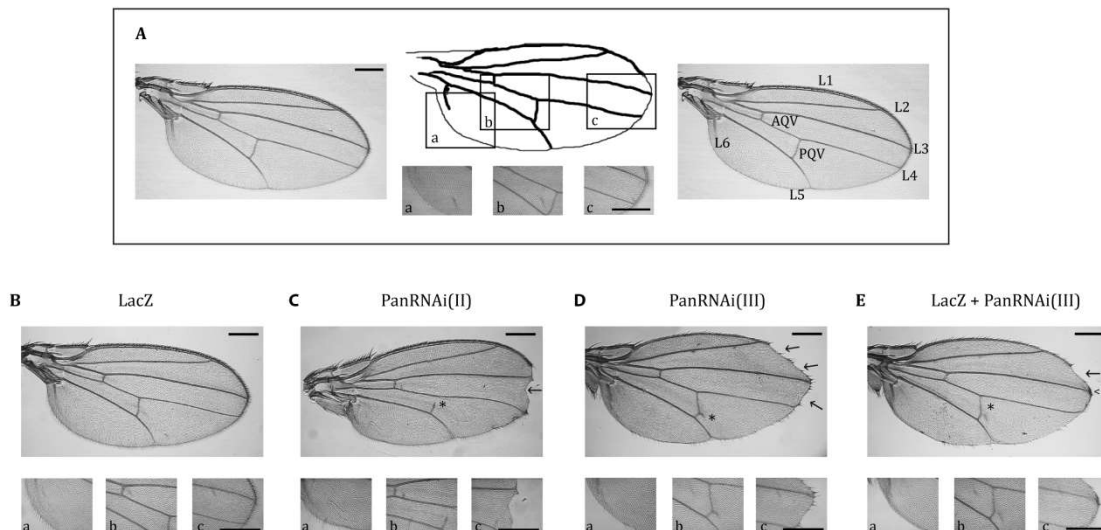


Abbildung 5.8: Flügelmorphologie der Pangolin Verlustmutanten

Als Treiberstamm wurde MS1096-Gal4 verwendet. (A) Wildtypischer Flügel des YW-Stammes, dessen schematische Darstellung und die Lokalisation der Detailaufnahmen, sowie wie das Venenmuster eines Flügels. (AQV: anteriore Quervene, PQV: posteriore Quervene L1-L6: Longitudinalvene 1-6). Die Überexpression von UAS-LacZ führte zu wildtypischen Flügeln (B). (C, D) Die Flügelstruktur nach Pangolin Verlust durch RNA Interferenz. Die Kontrolle der Pangolinspezifität ist durch LacZ;PanRNAi(III) gegeben (E). (Pfeile: Verluste in der Flügelmarginalveine, *: Veränderungen im Venenmuster. Der Maßbalken im Gesamtflügel entspricht 150 μm , bei den Detailaufnahmen 50 μm).

Nach der Kreuzung der PanRNAi(III)-Fliegen mit den Pangolin(II)-Fliegen sehen die Flügel aus wie die der PanRNAi(III)-Fliegen. Die wildtypische Entwicklung der Margin und der Venen wurde nicht wiederhergestellt. Auf den ersten Blick scheint es so, als könnte überexprimiertes Pangolin die Depletion endogenen Pangolins nicht ersetzen.

Berücksichtigt man aber, dass Pangolin(II) auf wildtypischem Hintergrund embryonal letal war, die PanRNAi(III)/Pan(II)-Fliegen aber überlebten, so wird eine Kompensation der Depletion und der Überexpression offensichtlich. Die Rekonstitutionsexperimente mit den *Xenopus* Lef/Tcfs zeigten, dass keiner dieser Transkriptionsfaktoren in Pangolin defizientem Hintergrund die wildtypische Flügelstruktur wiederherstellen konnte. Selbst eine partielle Wiederherstellung konnte nicht detektiert werden.

Überraschend war allerdings die gemeinsame Expression von Tcf3(II) und PanRNAi(III). Wie bei PanRNAi(III)/Pangolin(II) konnten hier Flügel detektiert werden, deren Erscheinungsbild dem der Pangolin Depletion entsprach. Tcf3(II) war, wie Pangolin(II), in der alleinigen Überexpression embryonal letal. Die Wirkung von Tcf3(II) entspricht in diesem Experiment der von Pangolin(II).

Trotz allem kann in den Rekonstitutionsexperimenten keines der Wirbeltier Lef/Tcfs Pangolin vollständig ersetzen. Stattdessen ähnelten die Flügel der Rekonstitutionsexperimente stark denen der Überexpression. So waren bei Lef überexprimierenden Tieren auch auf dem Hintergrund der Pangolin-Depletion unvollständig entfaltete Flügel zu finden. Die PanRNAi(III)/Tcf1(II)-Fliegen wiesen, wie die Tcf1(II)-Fliegen auf wildtypischem Hintergrund Quervenverluste und Defekte der Margin auf. Diese Effekte waren allerdings etwas stärker und vor allem waren die Flügel deutlich kleiner. Dagegen war die Flügelentwicklung der Doppel-Transgenen PanRNAi(III)/Tcf4(II)-Fliegen stärker gestört als in den jeweiligen Einzel-Transgenen. Die Effekte der Depletion von PanRNAi(III) und der Überexpression von Tcf4(II) scheinen sich also zu verstärken. So war die Flügelgröße stark reduziert und von der Margin kaum etwas erhalten. Im Großen und Ganzen waren die Phänotypen nach der Lef/Tcf Überexpression denen der Pangolin-Depletion so ähnlich, dass es schwierig ist, die phänotypischen Veränderungen der Rekonstitutionsexperimente auf den Verlust von Pangolin oder die Überexpression der Lef/Tcfs zurück zu führen. Auffallend bleibt, dass die veränderte Flügelmorphologie durch die Überexpression der Transkriptionsfaktoren auf Pangolin defizientem Hintergrund bei Lef(II) eher unverändert blieb, bei Tcf1(II) leicht verstärkt, bei Tcf4(II) kräftig verstärkt und bei Tcf3(II) abgeschwächt waren. In keinem Fall konnte ein Lef/Tcf den Verlust von Pangolin kompensieren.

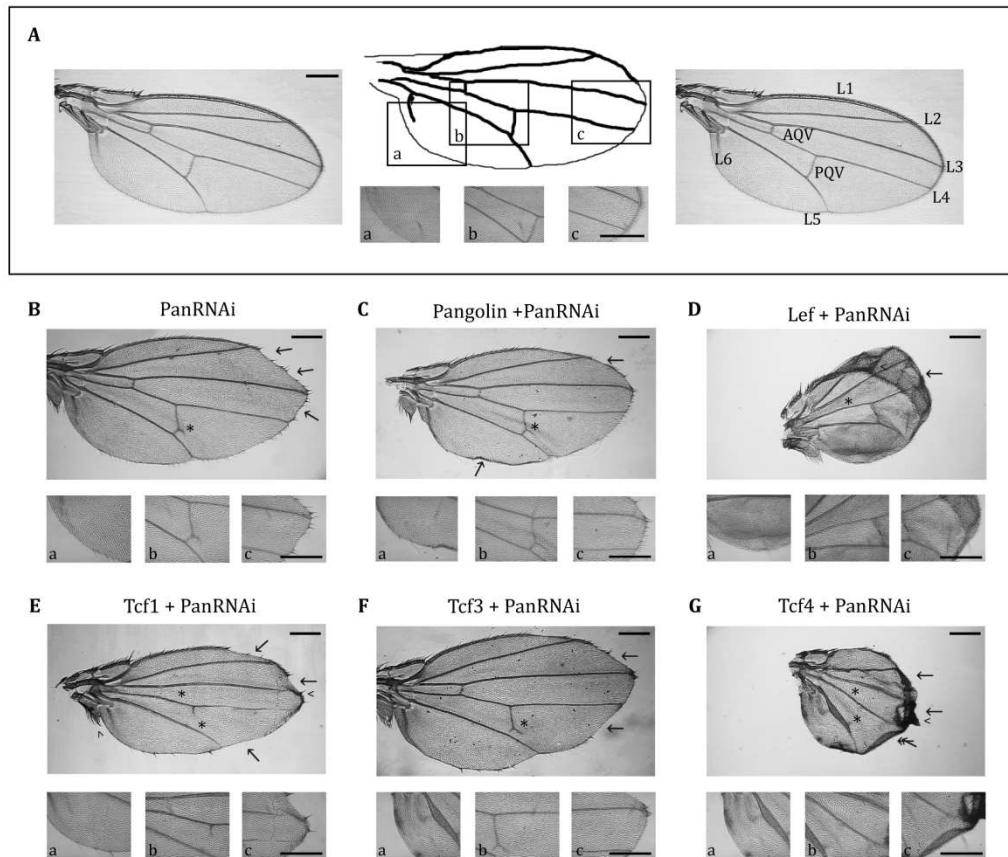


Abbildung 5.9: Die Rekonstitution von Pangolin durch die *Xenopus* Lef/Tcfs in der Flügelentwicklung

Als Treiberstamm wurde MS1096-Gal4 verwendet. (A) Wildtypischer Flügel des YW-Stamms, dessen schematische Darstellung und die Lokalisation der Detailaufnahmen, sowie wie das Venenmuster eines Flügels. (AQV: anteriore Quervene, PQV: posteriore Quervene L1-L6: Longitudinalvene 1-6). Das Flügelbild der Pangolin Verlustmutante (B). (C-G) Die Rekonstitution von PangolinRNAi(III) mit Pangolin(II) und den Lef/Tcfs. (Pfeile: Verluste in der Flügelmarginal, *: Veränderungen im Venenmuster, < ektopische Borsten. Der Maßbalken im Gesamtflügel entspricht 150 μm , bei den Detailaufnahmen 50 μm).

5.3.3 Untersuchung des Flügelbildes in Abhängigkeit zweier *Xenopus* Tcfs

Die Generierung neuer Fliegenstämme sollte helfen die phänotypische Auswirkung der Lef/Tcfs auf die Flügelentwicklung genauer zu charakterisieren. Unter anderem sollte auch ermittelt werden, ob das Expressionslevel ausschlaggebend für die nicht erfolgte Substitution zwischen zum Beispiel Pangolin(II) und PangolinRNAi(III) ist. Die neuen Fliegenstämme waren Doppelmutanten, die jeweils ein Lef/Tcf auf dem zweiten und ein anderes auf dem dritten Chromosom trugen. Antagonistisch wirkende Lef/Tcfs (z.B. Aktivatoren/Repressoren) sollten sich hier in ihrer Wirkung aufheben. Ausgewertet wurden abermals die Flügel nach der Überexpression mit dem MS1096-Gal4 Treiberstamm.

Doppelmutante Fliegen mit Pangolin(II) konnten nicht generiert werden, da ihre Verkreuzung in jeder Kombination zum embryonalen Tod führte. Die kombinierte Überexpression zweier *Xenopus* Lef/Tcfs erwies sich ebenfalls häufig als embryonal letal. Umso erstaunlicher war es, dass sich zahlreiche doppeltransgene Fliegen zur Imago entwickelten, obwohl bereits die einzeltransgenen Fliegen starke Fehlbildungen verursachten.

Auffallend war sofort, dass Tcf3(II) in der Ko-Expression mit Pangolin(III) und Tcf4(III) lebensfähig war. Überraschend war auch, dass die Flügel dieser beiden Doppelmutanten wildtypisch aussahen (Abb.: 5.10 D', D''). Pangolin(III) und Tcf4(III) scheinen damit die Wirkung von Tcf3(II) komplett zu unterdrücken. Im Gegensatz dazu konnte die veränderte Flügelmorphologie von Tcf3(III) weder durch Lef(II) noch durch Tcf1(II) oder Tcf4(II) rückgängig gemacht werden. Die gemeinsame Überexpression von zwei Transkriptionsfaktoren führte hier zu einem stärkeren Phänotyp als die Überexpression von Tcf3(III) alleine (Abb.: 5.10 B', C', E'). Die Morphologie der Tcf4(II)-Fliegen blieb durch die Überexpression von Pangolin(III) unberührt. Gemeinsam mit Tcf3(III) allerdings kam es zu additiven Effekten. Der Flügel war als solcher kaum noch zu erkennen (Abb.: 5.10 E'). Die starken Missbildungen der Tcf4(III) Flügel dagegen konnten durch die Überexpression mit Tcf3(II) vollständig unterbunden werden. Tcf3(II) scheint damit die Wirkung von Tcf4(III) komplett zu unterdrücken (Abb.: 5.10 D''). Lef(II) führte zu keinen Veränderungen des Tcf4(III) Flügels, die Effekte von Tcf1(II) und Tcf4(III) scheinen sich zu addieren. Dies gilt auch für die Ko-Expression von Tcf1(II) mit Tcf3(III) (Abb.: 5.10 C'', C'''). Eine Flügelstruktur als solche konnte nicht mehr erkannt werden. Dies wiederum spricht dafür, dass Tcf3(III) und Tcf4(III) dieselbe Wirkung ausüben, wie Tcf1(II). Auf Grund der wildtypischen Flügelmorphologie der Doppelmutante von Pangolin(III)/Tcf3(II) und Tcf4(III)/Tcf3(II) scheinen Tcf3(II) und Pangolin(III) sowie Tcf3(II) und Tcf4(III) jeweils gegensätzliche Funktionen auszuüben.

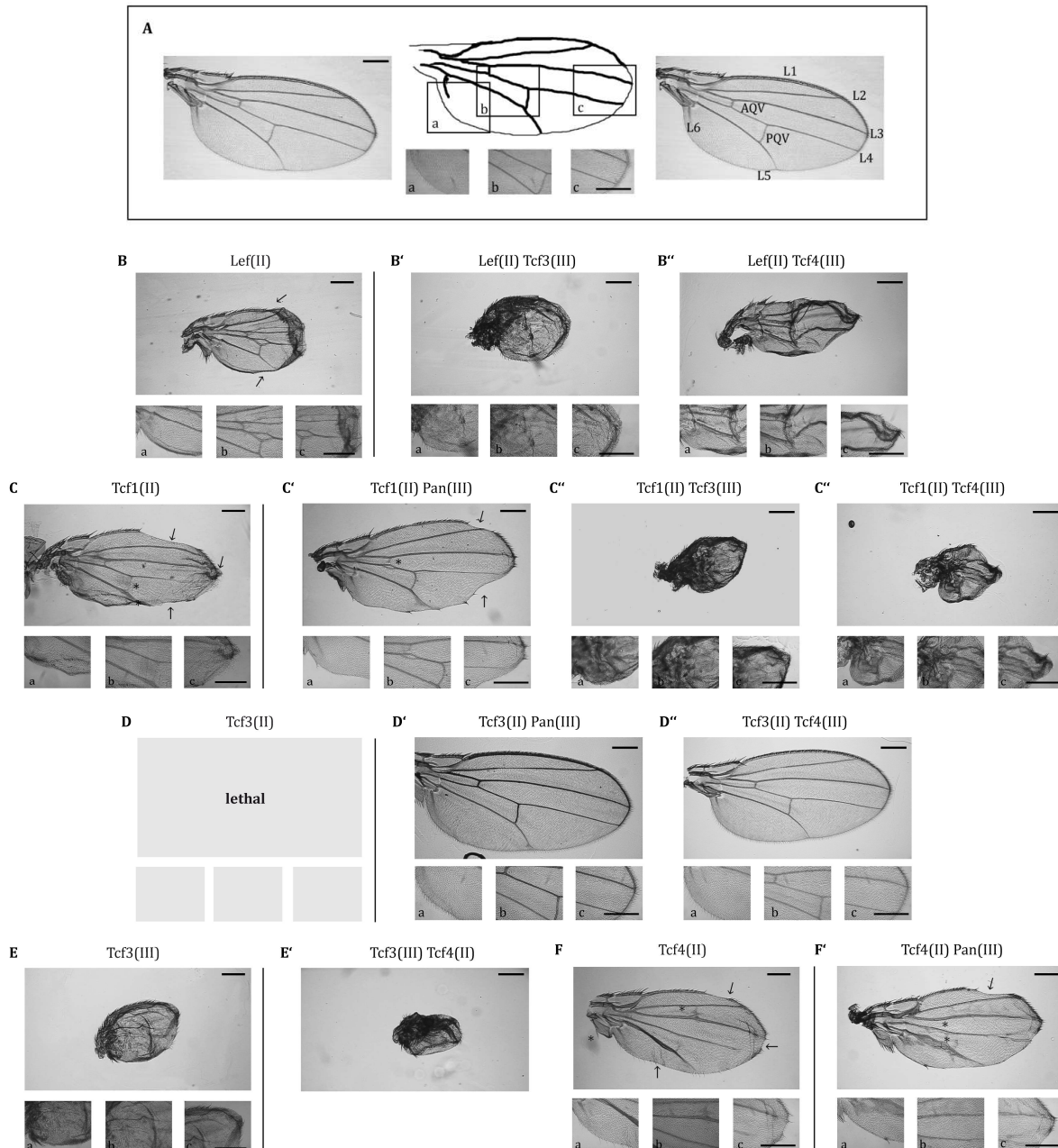


Abbildung 5.10: Die Überexpression zweier Lef/Tcfs in Komplementationsexperimenten

Als Treiberstamm wurde MS1096-Gal4 verwendet. (A) Wildtypischer Flügel des YW-Stamms, dessen schematische Darstellung und die Lokalisation der Detailaufnahmen, sowie wie das Venenmuster eines Flügels. (AQV: anteriore Quervene, PQV: posteriore Quervene, L1-L6: Longitudinalvene 1-6). (B) Überexpression von Lef(II) mit Tcf3(III) und Tcf4(III). (C) Phänotyp der Überexpression von Tcf1(II) mit Pangolin(III), Tcf3(III) und Tcf4(III). (D) Rekonstitution von Tcf3(II) mit Pangolin(III) und Tcf4(III). (E) Tcf3(III) in der Rekonstitution mit Tcf4(II). (F) Flügel der Ko-Expression von Tcf4(II) mit Pan(III). (Pfeile: Verluste in der Flügelmarginal, *: Veränderungen im Venenmuster. Der Maßbalken im gesamten Flügel entspricht 150 µm, bei den Detailaufnahmen 50 µm).

5.4 Das C-terminale Bindeprotein ist der dominante Bindepartner des *Xenopus* Tcf4 E-Tails

Zur Charakterisierung regulatorischer Mechanismen durch den langen C-Terminus, der Tcf4 E-Tail Isoform (E=elongation), sollten im Hefe-2-Hybridsystem neue Bindepartner identifiziert werden. Da zum einen während der Mesoderm Entwicklung den Lef/Tcfs unterschiedliche Funktionen zugesprochen werden und zum anderen diverse Tcf4 Spleißvarianten dort detektiert wurden (Liu et al., 2005, Weise et al., 2010, Vacik et al., 2011), sollte die cDNA Bibliothek aus mesodermalem *Xenopus* Gewebe synthetisiert werden. Das mesodermale Gewebe wurde durch die Inkubation animaler Kappen aus *Xenopus* Embryonen mit Aktivin induziert. Als Bait dienten die C-terminalen Aminosäuren 434–634 des Tcf4E (Sequenz siehe Anhang) im Destinationsvektor pDest32. Um sicher zu stellen, dass das Tcf4 E-Tail-Konstrukt für das Hefe-2-Hybridsystem geeignet ist, wurde es auf seine Selbstaktivierung hin getestet, denn eine starke Selbstaktivierung führt zur Isolation falsch-positiver Klone. Im Selbstaktivierungstest wurde das E-Tail-Konstrukt in den MaV203 Hefestamm transformiert und auf Histidin-Mangelmedien mit einer 3'-Amino-1, 2, 4-Triazol (3'-AT)-Konzentrationsreihe ausplattiert. Erst bei einer Konzentration von 100 mM 3'-AT konnte kein Wachstum mehr detektiert werden (Abb.: 5.11 A). Für die spätere Analyse wurden folglich jeder Histidin-Mangelmediumplatte 100 mM 3'-AT hinzugefügt. M. Rohrmayr (Rohrmayr, 2014) identifizierte in ihrer Masterarbeit unter meiner Anleitung 33 Klone, die für alle vier Reporter positiv waren. Kritische Klone, die nur drei der vier Reporter aktivierten, wurden in der vorliegenden Arbeit weiter ausgewertet. Dabei stellte sich heraus, dass die überwiegende Mehrzahl aller Klone mehr als ein Prey-Plasmid trug. Sequenzanalysen zahlreicher Amplifikate der Mischklone zeigten, dass eines der Plasmide meist das C-terminale Bindeprotein enthielt (Abb.: 5.11 C). Tatsächlich konnte kein einziger Klon bestätigt werden, der nicht auch CtBP trug. Somit scheint das C-terminale Bindeprotein zumindest in mesodermalem Gewebe der dominante Interaktionspartner des Tcf4 C-Terminus zu sein.

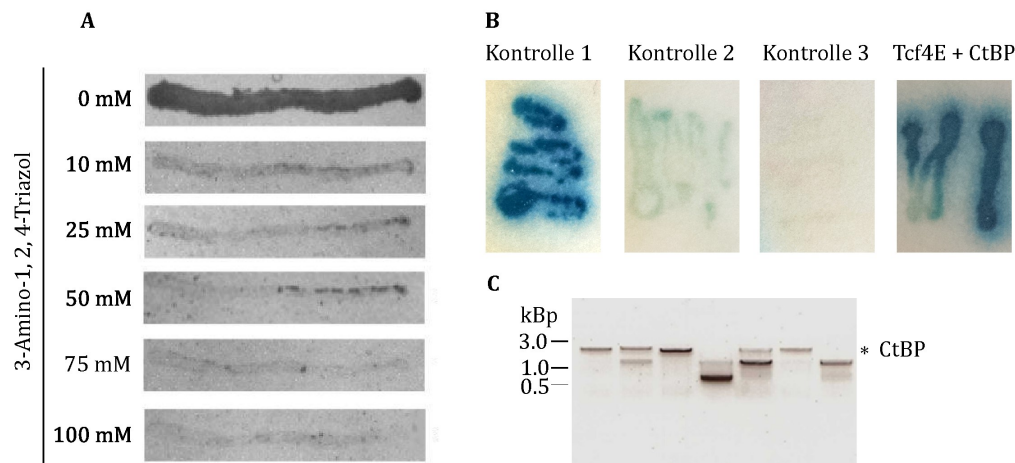


Abbildung 5.11: Der *Xenopus* Tcf4 C-Terminus im Hefe-2-Hybridssystem

(A) Die Eigenaktivierung des E-Tails endet bei einer Zugabe von 100 mM 3-Amino-1, 2, 4-Triazol. (B) X-Gal-Analyse des Tcf4 C-Terminus mit dem C-terminalen Bindeprotein (CtBP) und drei unterschiedlich starken Kontroll-Plasmid Interaktionen. Blau impliziert eine positive Interaktion. (C) Agarosegelbild nach vollzogener Polymerasekettenreaktion des Prey-Plasmids, zeigt exemplarisch die Häufigkeit der Mischklone und das Vorhandensein von CtBP. Doppelbanden entsprechen Mischklonen. (* Bande für CtBP bei 1.4 kiloBasenpaare (kbp)).

5.5 Funktionsanalyse des Tcf4 E-Tails

Xenopus Tcf4E enthält neben den CtBP-Bindemotiven auch eine Cystein-Klammer. Inwieweit diese beiden Domänen die Funktion des Transkriptionsfaktors beeinflussen wurde im Folgenden untersucht. Zur Analyse der unterschiedlichen Regulationsmodule wurden in der Cystein-Klammer zwei Cysteine, (C464A) und (C480A), sowie die Kombination beider (Tcf4E (CC->AA)) durch Alanin ersetzt. Zusätzlich wurde in einer anderen Mutation eine der Bindestellen für das C-terminale Bindeprotein von PLSL zu ALSA mutiert (Tcf4E (1. ALSA)) (Abb.: 5.12 A). Alle Konstrukte wurden durch Sequenzanalysen verifiziert und lieferten Proteine der erwarteten Größe (Abb.: 5.12 B).

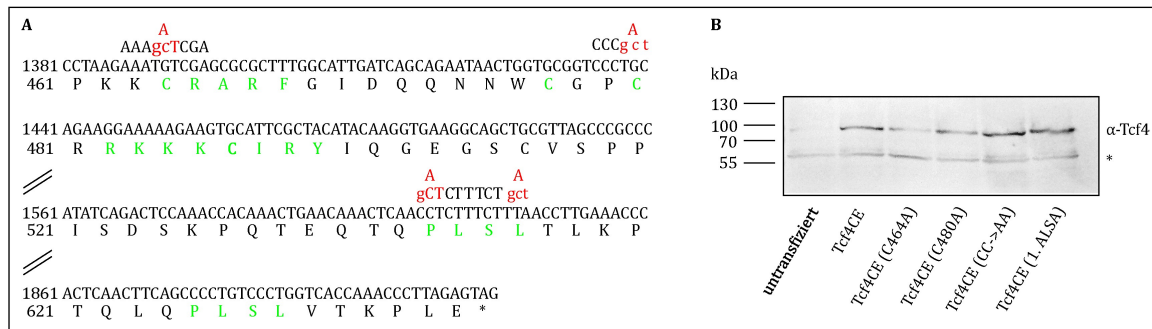


Abbildung 5.12: Sequenzspezifische Darstellung des Basen- und Aminosäureaustauschs im Tcf4 E-Tail und die Expression der Austauschkonstrukte in Hek293-Zellen

(A) Ausschnitte der *Xenopus* Tcf4 E-Tailsequenz. In Grün sind die Aminosäuren der Cystein-Klammer und der beiden CtBP-Bindedomänen (PLSL) dargestellt. Die in Rot markierten Basen und Aminosäuren zeigen die Mutationen an. (B) Transfizierte Hek293-Zellen exprimieren Proteine der erwarteten Größe (70 kDa). RIPA-Lysate aus Hek293-Zellen wurden in 10 %igem SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und mit einem Tcf4-spezifischen Antikörper sowie einem alkalische Phosphatase-gekoppelten Sekundärantikörper visualisiert. Untransfizierte Zellen dienen als Negativkontrolle. (*: unspezifische Bande).

5.5.1 Analyse unterschiedlicher Domänen des Tcf4 E-Tails auf die Aktivierung des *siamois*-Promotors und die Induktion sekundärer Körperachsen

In der ersten Analyse wurde die Wirkung der verschiedenen Tcf4E-Konstrukte auf die Aktivierung des *siamois*-Promotors (Brannon et al., 1997) untersucht. Die Auswirkungen dieser Konstrukte auf die Promotoraktivität in transfizierten Hek293-Zellen war insgesamt gering. Wildtypisches Tcf4E unterdrückte die Eigenaktivität des Reporters leicht, aber im beidseitigen studentischen T-Test signifikant ($p < 0.01$). Eine Repression war bei Einzelmutationen der C-Klammer (C464A und C480A) nicht mehr nachweisbar, trat aber bei der Doppelmutation (CC->AA) wieder auf (Abb.: 5.13 A). Auch mit mutagenisiertem CtBP-Bindemotiv (1. ALSA) blieb die leichte Repression der Promotoraktivität bestehen (Abb.: 5.13 A). Eine exaktere Analyse der Tcf4E-Konstrukte war durch die geringen Effekte auf die basale Promotoraktivität nicht möglich. Deshalb wurden die Effekte der Tcf4E-Varianten auf die Regulation des *siamois*-Promotors in vorstimulierten Zellen untersucht. Die Ko-Transfektion mit Tcf1 diente dabei der Analyse, inwieweit die unterschiedlichen Tcf4E-Konstrukte mit dem Aktivator Tcf1 um die Regulation des *siamois*-Promotors kompetieren. Die Ko-Transfektion mit konstitutiv aktivem β -Catenin (S33A) sollte aufzeigen, wie stark die Transaktivierung durch Tcf4E/ β -Catenin von einer intakten Cystein-Klammer und

der CtBP Bindestelle abhängt. Dabei war die Aktivierung durch Tcf1 5.5-fach, die durch β -Catenin (S33A) 2.3-fach.

Tatsächlich unterdrückten alle Konstrukte die Aktivierung durch Tcf1 und förderten die Aktivierung durch β -Catenin (S33A) (Abb.: 5.13 B, C). Bei der Kooperation mit Tcf1 um die Regulation des Promotors erwies sich einzig die Doppelmutante CC->AA als signifikant vom wildtypischen Tcf4E-Konstrukt unterscheidbar. Die Repression war dabei weniger stark ausgeprägt. Bei der Voraktivierung durch β -Catenin waren alle Cystein-Klammer-Mutanten stärkere Aktivoren als wildtypisches Tcf4E. Die Mutationen im CtBP-Bindemotiv (1. ALSA) verhielt sich ebenfalls dem Wildtyp entsprechend. Insgesamt scheinen in diesem Experiment Mutationen in der Cystein-Klammer die Aktivierung des *siamois*- Promotors zu fördern, wogegen Veränderungen in der CtBP Bindestelle eher ohne Einfluss bleiben.

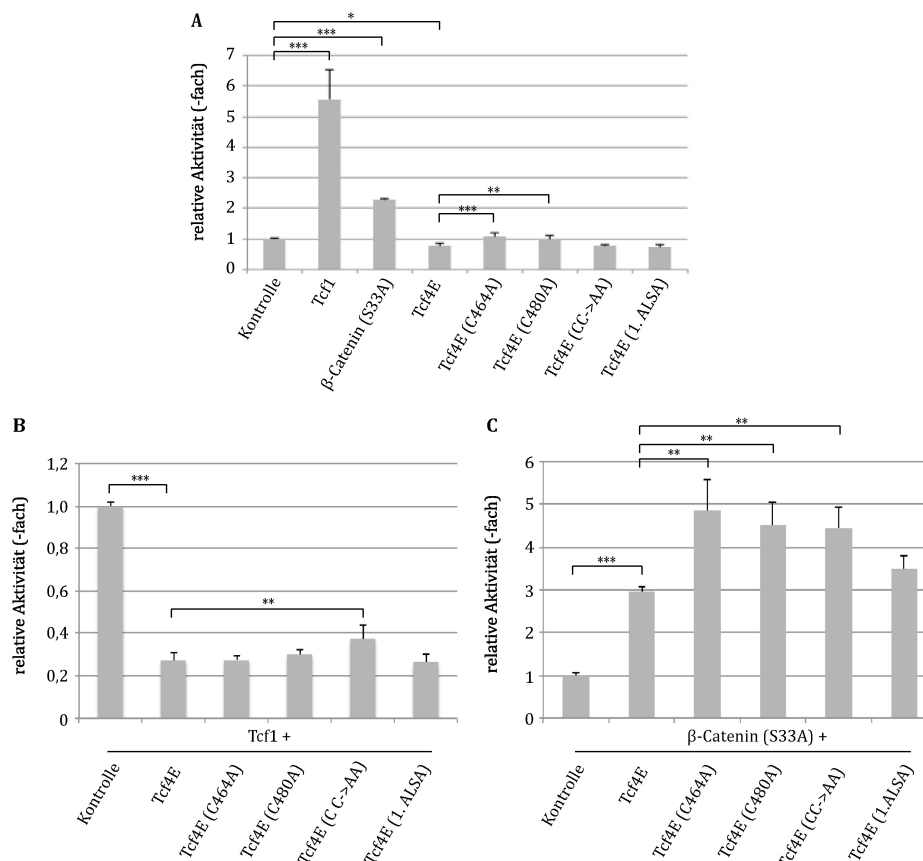


Abbildung 5.13: Funktionsanalysen der XTcf4E-Mutanten im *siamois*-Reporterassay

(A) Die relative Aktivität von konstitutiv aktivem β -Catenin (S33A), Tcf1 und der Tcf4E-Konstrukte auf den *siamois*-Promotor in Hek293-Zellen. (B) Die Ko-Transfektion von Tcf1 mit den Tcf4E-Konstrukten führt zu einer stark reduzierten Aktivität, verglichen zur Aktivierung durch Tcf1 alleine. (C) Durch die Voraktivierung des *siamois*-Reporters mit β -Catenin (S33A) wirken alle Konstrukte hyperaktivierend. (Zweiseitiger studentischer T-Test: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler aus mindestens neun Einzeltransfektionen).

Nach der Injektion von mRNA in die Marginalzone der ventralen Blastomere im 4-Zell Stadium von *Xenopus* führte keines der Tcf4E-Konstrukte zur Induktion einer sekundären Körperachse (nicht gezeigt). Erst nach Ko-Injektion mit Tcf1 offenbarten sich Unterschiede zwischen den Tcf4E-Mutanten. Durch die Injektion von 250 pg Tcf1 mRNA wurden in 62 % der Embryonen Doppelachsen induziert. Durch die Ko-Injektion von Tcf1 gemeinsam mit 500 pg Tcf4E mRNA reduzierte sich die Anzahl auf 28 % (Abb.: 5.14 A). Die Mutationen in der Cystein-Klammer führten zu keinen Veränderungen. Der Anteil an Embryonen mit sekundärer Körperachse war hier ebenfalls zwischen 25 % und 34 %. Auch die Ko-Injektion der ALSA-Konstrukts, also der Mutation im ersten CtBP-Bindemotiv, reduzierte die Anzahl an Doppelachsen (Abb.: 5.14 A), allerdings deutlich weniger effizient als wildtypisches Tcf4E und die Mutanten der Cystein-Klammer. Fast die Hälfte der Embryonen entwickelte eine sekundäre Körperachse. Im exakten Test nach Fischer ist dies mit $p < 0.005$ signifikant. Die Regulationen über die Cystein-Klammer bei der Induktion einer ektopischen Körperachse sind eher irrelevant. Die Regulation über das CtBP-Bindemotiv scheint allerdings die Induktion sekundärer Körperachsen zu unterdrücken.

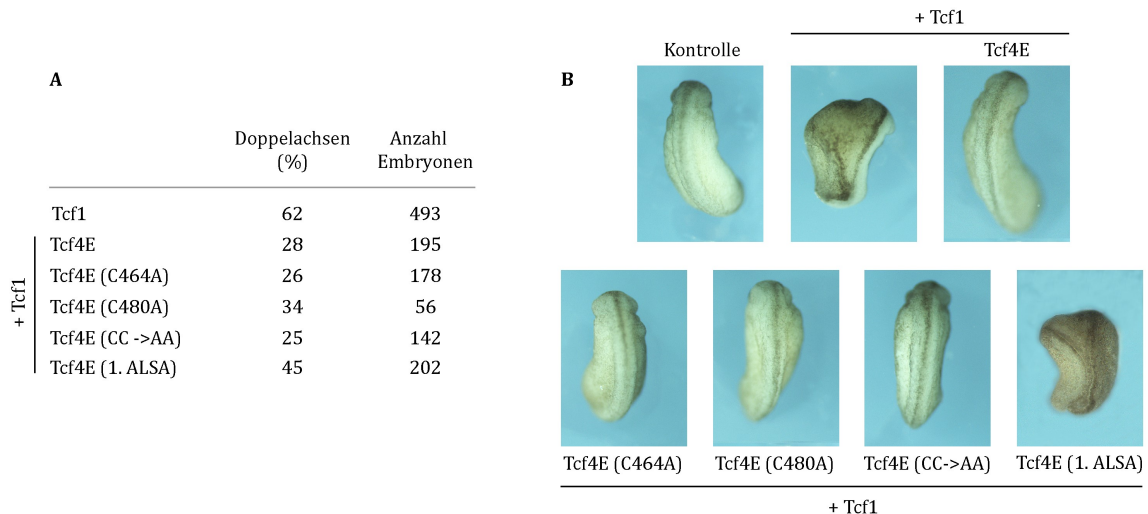


Abbildung 5.14: Die ventrale Injektion von Tcf1 gemeinsam mit den Tcf4E-Konstrukten führte zu einer Reduktion sekundärer Körperachsen

(A) Statistische Auswertung der Doppelachsen. (B) Alle Tcf4E-Konstrukte reduzieren die durch Tcf1 induzierten sekundären Körperachsen. Hierfür wurden 250 pg Tcf1 mRNA allein und gemeinsam mit 500 pg Tcf4E mRNA in die Marginalzone der beiden ventralen Blastomere injiziert. Die injizierten Embryonen wurden bis in das frühe Schwanzknospenstadium kultiviert (St. 24-25). Zur Kontrolle dienten wildtypische uninjizierte Embryonen desselben Stadiums.

5.6 Neue Interaktionspartner der *Xenopus* Lef/Tcf kontext-abhängigen Domänen

Zur Identifizierung neuer Tcf subtypspezifischer Interaktionspartner wurde die CRD der einzelnen Lef/Tcfs in pDest32 inseriert (Sequenz siehe Anhang) und im Hefe-2-Hybridsystem mit einer cDNA Bibliothek aus *Xenopus* mesoderm-induzierten animalen Kappen analysiert. Im Selbstaktivierungstest stellte sich heraus, dass selbst 100 mM 3'-AT das Wachstum der Lef-CRD enthaltenden Hefen nicht unterdrücken kann. Diese hohe Selbstaktivität führte deshalb zu einem Ausschluss von Lef als Bait. Für Tcf1 wurden 75 mM 3'-AT hinzugefügt, für Tcf3 25 mM und Tcf4 10 mM.

Nach stringenter Analyse der vier Reportergene im Hefe-2-Hybridsystem blieben nur zwei Tcf subtypspezifische Klone übrig. Einer für Tcf1, welcher alle vier Reporter aktivierte und einer für Tcf4, der allerdings auch auf der mit Inhibitor versetzten Histidin-Mangelmediumplatte wuchs.

Der neue Interaktionspartner für Tcf1 war die Dynein leichte Kette 8 Typ 2 (DYNLL2, GI:148237591, Dynein leichte Kette 2), ein Protein, das soweit noch nicht mit dem kanonischen Wnt-Signalweg in Verbindung gebracht wird. Nichtsdestotrotz aktivierte es deutlich alle vier Reporter. Für den *lacZ*-Promotor ist das in Abbildung 5.15 B dargestellt. Die Spezifität für die Bindung von DYNLL2 an Tcf1 ist gegeben, da weder Lef, noch Tcf3 oder Tcf4 gemeinsam mit DYNLL2 die Reporter aktivieren konnten (Abb.: 5.15 B). Als zusätzliche Negativkontrolle wurde Tcf1 gemeinsam mit dem wildtypischen Ralwt (Ral guanine nucleotide dissociator stimulator protein), einem Aktivatorprotein, in den Hefestamm MaV203 transformiert. Eine Interaktion konnte hier ebenfalls nicht detektiert werden, da weder die Umsetzung von X-Gal stattfand, noch ein Wachstum auf den Reporterplatten detektierbar war.

Für Tcf4 wurde die Phospholipid Scramblase 1 (PLSCR1, GI:148226095) als neuer Interaktionspartner ermittelt. Auch dieses Protein wurde bisher noch nicht mit dem kanonischen Wnt-Signalweg in Verbindung gebracht. Da diese Interaktion nur drei der vier Reporter aktivierte, wird von einer schwachen Bindung ausgegangen.

A

| Sequenzierungsergebnis (CRD) | GenInfo Identifier | Reporter | Aktivität | Bemerkung |
|----------------------------------|--------------------|----------------------|---------------|---------------------------------------|
| Dynein leichte Kette 2 (Tcf1) | 148237591 | <i>lacZ</i> | Färbung | positiver Interaktionspartner |
| | | <i>HIS3</i> | Wachstum | |
| | | <i>URA3</i> | Wachstum | |
| | | <i>URA3</i> + 5'-FOA | kein Wachstum | |
| Phospholipid Scramblase 1 (Tcf4) | 148226095 | <i>lacZ</i> | Färbung | positiv schwacher Interaktionspartner |
| | | <i>HIS3</i> | Wachstum | |
| | | <i>URA3</i> | Wachstum | |
| | | <i>URA3</i> + 5'-FOA | Wachstum | |

B

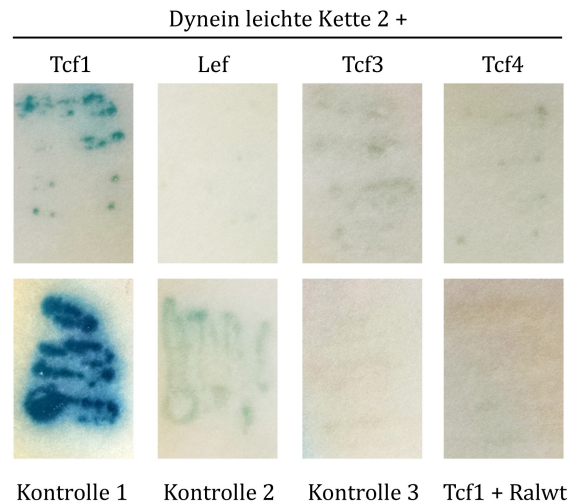


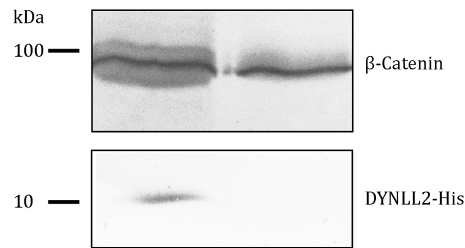
Abbildung 5.15: Im Hefe-2-Hybridsystem identifizierte Interaktionspartner der CRD-Domäne von Tcf1 und Tcf4

(A) Tabelle der identifizierten Interaktionspartner und die Reaktion in den Reporteranalysen. (B) X-Gal-Reporteranalyse mit der Dynein leichten Kette 2 (DYNLL2) in der Ko-Transformation mit allen Lef/Tcf CRD-Domänen und den internen Systemkontrollen im MaV203 Hefestamm. Blau impliziert eine positive Interaktion begründet auf der Aktivierung des *lacZ*-Promotors. (Ralwt: Kontroll-Plasmid).

5.7 Die Dynein leichte Kette 2

5.7.1 Die Expression der Dynein leichten Kette 2

Der komplette Leserahmen von DYNLL2 wurde aus *Xenopus* cDNA gewonnen. Hierfür wurde *Xenopus* RNA aus verschiedenen Entwicklungsstadien isoliert und revers transkribiert. Mit spezifischen DYNLL2 Primern konnte aus der cDNA der komplette offene Leserahmen amplifiziert werden. Für weitere Untersuchungen von DYNLL2 wurde diesem C-terminal Histidin in sechsfacher Wiederholung angehängt. Der komplette Leserahmen inklusive His-Tag wurde dann in pGEMT, pBluescriptSK+ und pCS2+ inseriert. Sämtliche Klonierungen wurden durch Sequenzanalysen verifiziert. Die Expression des DYNLL2-His-Konstrukts wurde durch His-Antikörperdetektion im Western Blot auf transfizierte Hek293-Zellen nachgewiesen (Abb.: 5.16).

**Abbildung 5.16: DYNLL2-His wird in Hek293-Zellen exprimiert**

Transfizierte Hek293-Zellen exprimieren DYNLL2-His in der erwarteten Größe (11 kDa). RIPA Lysate aus Hek293-Zellen wurden in 12 %igem SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und mit einem His-spezifischen Antikörper sowie einem alkalische Phosphatase-gekoppelten Sekundärantikörper visualisiert. Untransfizierte Zellen dienen als Negativkontrolle (rechte Spalte). Endogenes β -Catenin dient als Ladekontrolle (85 kDa).

Tcf1 ist während der *Xenopus* Gastrulation in den animalen Kappen exprimiert. In der Neurulation wurde es in der Neuralplatte detektiert. In späteren Stadien konnte es unter anderem in den Somiten, den Augen, dem Gehirn, dem Kopfmesenchym und der Schwanzknospe gefunden werden (Roël et al., 2003). Inwiefern DYNLL2 mit Tcf1 ko-lokalisiert, konnte in der Ganzkeimfärbung nicht festgestellt werden. Trotz zahlreicher Modifikationen im Protokoll und der Verwendung zweier unterschiedlicher Sonden konnten in der *in situ* Hybridisierung keine Anhäufungen der DYNLL2 mRNA in distinkten Arealen der sich entwickelnden Embryonen detektiert werden. RT-PCR Analysen ergaben aber, dass DYNLL2 bereits maternal (Stadium 8) vorliegt und während der Gastrulation (Stadium 10-12) und frühen Neurula (Stadium 15) Stadien exprimiert wird. In der späten Neurula (Stadium 20) und den Schwanzknospenstadien (Stadium 24-33) nimmt die Expression leicht ab, bis DYNLL2 in der Kaulquappe (Stadium 40) wieder vermehrt vorliegt (Abb.: 5.17 B). Somit zeigt die RNA-Analyse auf, dass DYNLL2 in der frühen Embryonalentwicklung dynamisch reguliert wird.

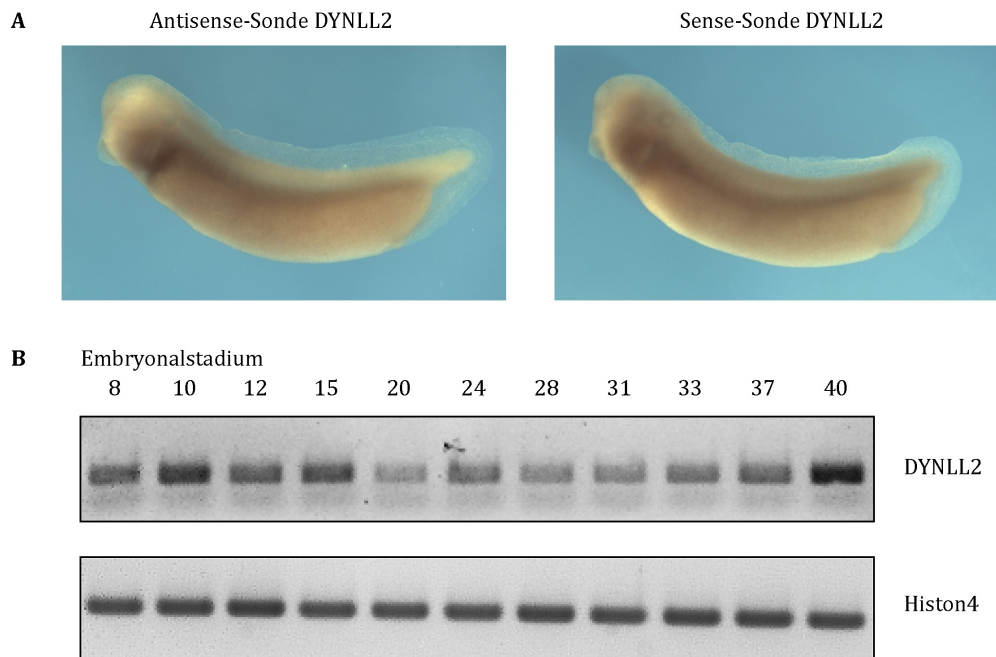


Abbildung 5.17: Die Expression von DYNLL2 in *Xenopus* Embryonen

(A) In der *in situ* Hybridisierung konnten keine Unterschiede zwischen der Sense- und Antisense-Sonde von DYNLL2 ermittelt werden. Gezeigt sind Embryonen nach der Ganzkeimfärbung im Schwanzknospenstadium. (B) Nach der RNA Extraktion aus ganzen Embryonen zwischen den Stadien 8-40 wurde diese mit Oligo-d(T)-Primern revers transkribiert. Um die mRNA Menge zwischen den einzelnen Stadien vergleichen zu können, wurde die Menge mit dem Haushaltsgen Histon4 abgeglichen. Dargestellt ist die DYNLL2 mRNA Menge in Abhängigkeit des Embryonalstadiums.

Zur Ermittlung der subzellulären Lokalisation von DYNLL2 wurden HeLa-Zellen mit DYNLL2-His transfiziert. In der Immunfärbung ist DYNLL2-His gleichmäßig über die komplette Zelle verteilt (Abb.: 5.18 A'-A''). Eine Ko-Lokalisation mit Tcf1-Flag, welches ausschließlich im Nukleus der HeLa-Zellen detektiert wurde, ist daher möglich (Abb.: 5.18 C'-C'').

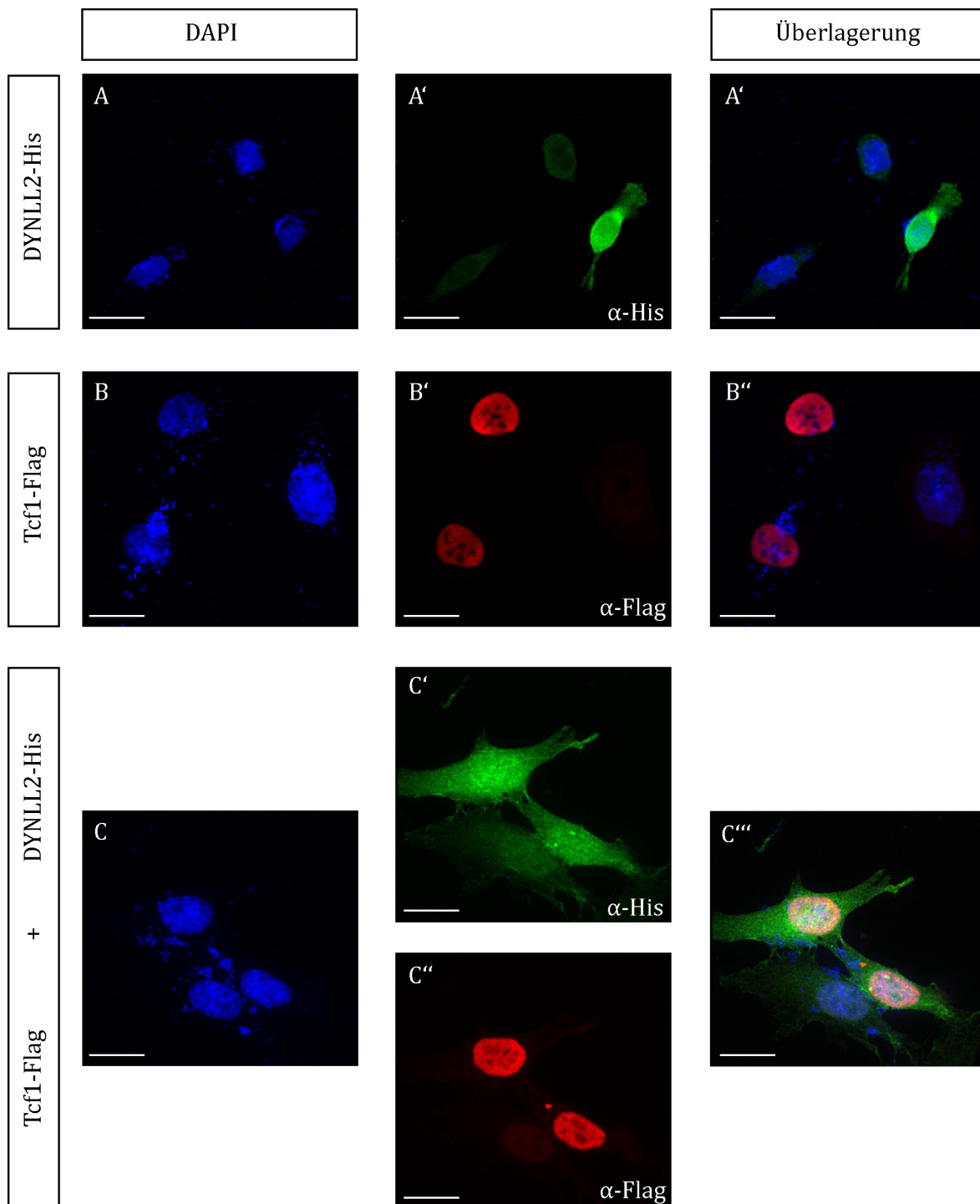


Abbildung 5.18: Immunfärbung von DYNLL2-His und Tcf1-Flag in HeLa-Zellen

Die Einzeltransfektion von DYNLL2-His (A-A'') und Tcf1-Flag (B-B'') zeigt in der Immunfärbung mit α -His und α -Flag Antikörpern, dass DYNLL2-His in der gesamten Zelle exprimiert wird, während Tcf1-Flag ausschließlich im Nukleus lokalisiert. (C-C'') Die Ko-Transfektion von DYNLL2-His mit Tcf1-Flag schließt eine Ko-Lokalisation nicht aus. (A, B, C) DAPI in Blau, α -His Antikörper in Grün (A', A'', C', C''), α -Flag Antikörper in Rot (B', B'', C'', C'''), Balkenlänge entspricht 20 μ m).

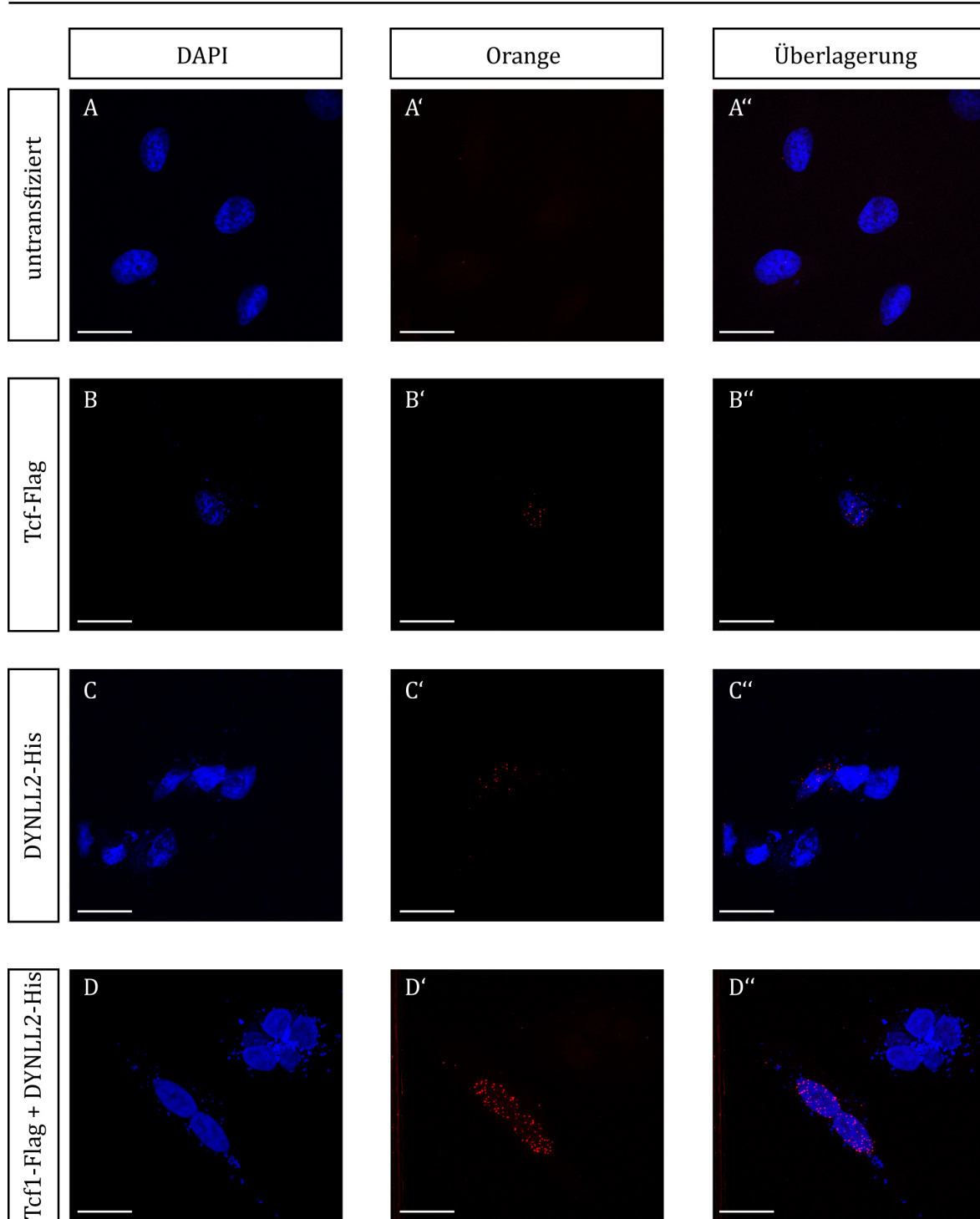


Abbildung 5.19: Die Interaktion der Dynein leichten Kette 2 mit Tcf1 wurde im Proximity Ligation Assay verifiziert

(A-A'') Als Negativkontrolle dienen untransfizierte Zellen, die eine Antikörperinteraktion ausschließen. (B-B'') Der PLA auf der Einzeltransfektion mit Tcf1-Flag. Vereinzelt rote Punkte sind sichtbar. (C-C'') Der PLA auf der Einzeltransfektion von DYNLL2-His zeigt ebenfalls wenige rote Punkte. (D-D'') Der PLA auf die Ko-Transfektion von DYNLL2-His und Tcf1-Flag. Die roten Punkte verifizieren häufige Interaktionen der beiden Proteine innerhalb des Nukleus. (DAPI: Zellkern in Blau, Interaktionen von DYNLL2-His mit Tcf1-Flag in Rot. (A'-A'', B'-B'', C'-C'' und D'-D'', Balkenlänge entspricht 20 μm).

5.7.2 Die Dynein leichte Kette 2 interagiert mit Tcf1

Eine direkte Interaktion zwischen Tcf1-Flag und DYNLL2-His konnte mit dem Proximity Ligation Assay (PLA) bestätigt werden. In den mit beiden Interaktionspartnern transfizierten HeLa-Zellen erscheinen die für einen positiven PLA typischen fluoreszenten Punkte (Abb.: 5.19 D'-D''). Diese traten vornehmlich im Zellkern auf. In untransfizierten HeLa-Zellen und in nur mit einem der Interaktionspartner transfizierten Zellen erschienen nur sehr wenige bis gar keine der PLA typischen Punkte (Abb.: 5.19 A', B', C'). Damit wurde die im Hefe-2-Hybridsystem ermittelte Interaktion von DYNLL2 und Tcf1 in einem unabhängigen Testsystem bestätigt.

5.7.3 Die Dynein leichte Kette 2 moduliert die Aktivität des SuperTOPFlash-Reporters

Inwiefern Proteine den kanonischen Wnt-Signalweg modulieren, lässt sich am einfachsten in SuperTOPFlash-Reporteranalysen untersuchen. Tatsächlich induzierte DYNLL2 die Reporteraktivität deutlich (Abb.: 5.20 A, $p < 0.001$). Selbst die Aktivierung durch konstitutiv aktives β -Catenin (S33A) wird durch DYNLL2 signifikant verstärkt (Abb.: 5.20 A, $p < 0.05$). Im Vergleich zur Aktivierung durch die Lef/Tcfs (Abb.: 5.10 B) war die Aktivierung durch DYNLL2 ähnlich stark, wie die durch Lef, schwächer als die durch Tcf1 und deutlich stärker als die durch Tcf3 und Tcf4.

Die Ko-Transfektion von DYNLL2 mit den Lef/Tcfs sollte aufzeigen, inwieweit dieser neue Tcf1-spezifische Interaktionspartner die Zielgenregulation durch die einzelnen Lef/Tcfs moduliert. Abbildung 5.20 C zeigt, dass DYNLL2 tatsächlich modulierend auf die Transkriptionsfaktoren wirkt, überraschenderweise aber nicht spezifisch auf Tcf1. Wenn es gemeinsam mit Tcf1 oder Lef transfiziert wird, verstärkt es deren Aktivierung zusätzlich. Im Gegensatz dazu unterstützt DYNLL2 Tcf3 bei der Reprimierung des Reportergens. Auf Tcf4 scheint es keinen Einfluss zu haben, hier unterscheidet sich die Reporteraktivität mit oder ohne DYNLL2 nicht.

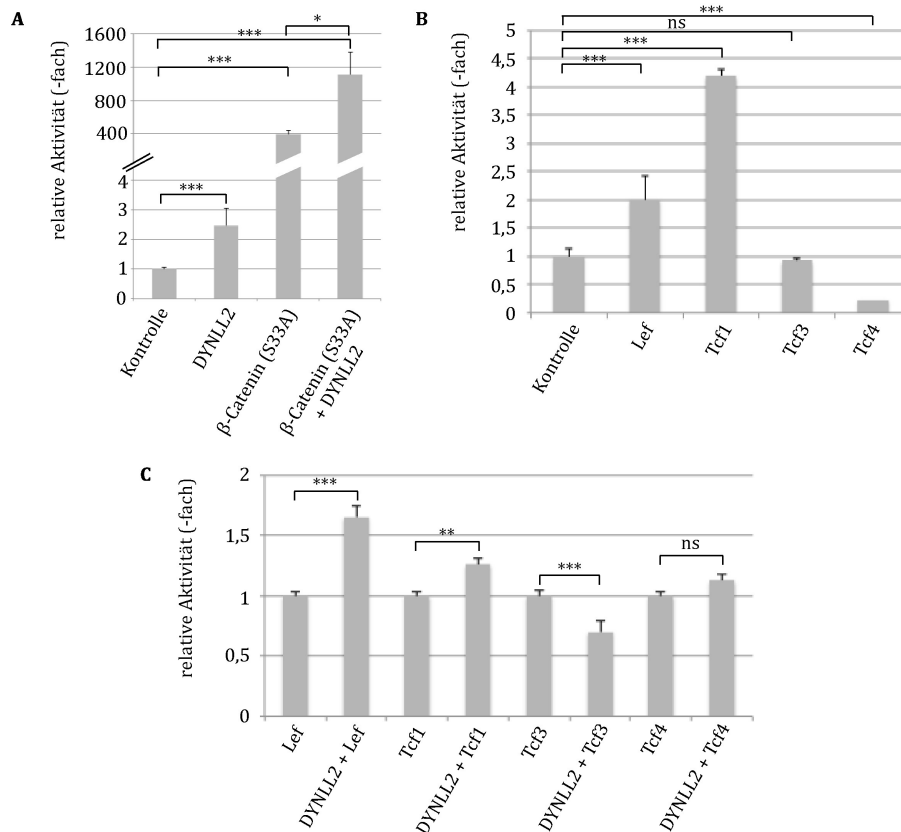


Abbildung 5.20: Der modulierende Einfluss von DYNLL2 im SuperTOPFlash-Reportergenassay (A) DYNLL2 aktiviert den SuperTOPFlash-Reporter signifikant und verstärkt die Wirkung von konstitutiv aktivem β -Catenin (S33A). (B) Tcf1 und Lef aktivieren den SuperTOPFlash-Reporter. Tcf3 übt keinen Einfluss aus und Tcf4 wirkt reprimierend. (C) DYNLL2 beeinflusst die Wirkung von Tcf1, Tcf3 und Lef. (zweiseitiger studentischer T-Test: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, ns: nicht signifikant, dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler aus mindestens neun Einzeltransfektionen).

5.8 Die Phospholipid Scramblase 1

5.8.1 Die Expression der Phospholipid Scramblase 1

Die Phospholipid Scramblase 1 (PLSCR1) wurde im Hefe-2-Hybridsystem als Interaktionspartner der kontext-abhängigen Domäne von Tcf4C identifiziert. Wie bereits DYNLL2 wurde der komplette offene Leserahmen aus *Xenopus* cDNA mit PLSCR1-spezifischen Primern amplifiziert. Die cDNA stammt aus revers transkribierter RNA, isoliert aus diversen *Xenopus* Embryonen unterschiedlicher Entwicklungsstadien. Dem PLSCR1-Amplifikat wurden in der PCR C-terminal entweder sechsfach Histidin oder ein Ha-Tag angehängt. Diese Fragmente wurden für weitere Verwendungsmöglichkeiten in pCS2+, pGEMT und den pBluescriptSK+-

Vektor inseriert. Die Klonierungen wurden durch Sequenzanalysen verifiziert. Nach der Injektion von 500 pg PLSCR1 mRNA in beide Blastomere im 2-Zellsatdium und anschließender Proteinextraktion durch RIPA-Lysate, konnte die Synthese von PLSCR1 in *Xenopus* Embryonen nachgewiesen werden. Proteine der zu erwartenden Größe von 36 kDa konnten im Western Blot durch einen His-Antikörper detektiert werden (Abb.: 5.21 A).

Auch hier konnte in der Ganzkeimfärbung keine spezifische Lokalisation der Expression von PLSCR1 nachgewiesen werden (nicht gezeigt). In der RT-PCR zeigte sich, dass die PLSCR1 maternal exprimiert wird, in der späten Neurula die Expression etwas abschwächt, um dann wieder stärker zu werden (Abb.: 5.21 B).

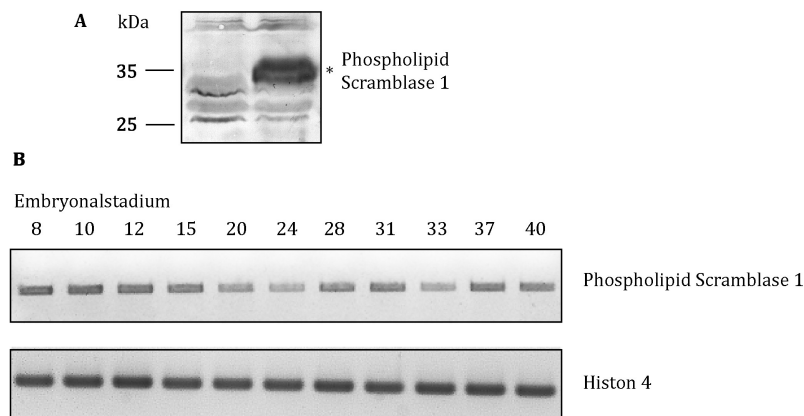


Abbildung 5.21: Die Expression der Phospholipid Scramblase 1 im *Xenopus* Embryo

(A) Die Injektion von 500 pg PLSCR1-His mRNA in beide Blastomere des 2-Zell Stadium Embryos erfolgt in der Proteinsynthese erwarteter Größe (36 kDa). RIPA Lysate aus injizierten Embryonen des Stadium 16 wurden in 10 %igem SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und mit einem His-spezifischen Antikörper sowie einem alkalische Phosphatase-gekoppelten Sekundärantikörper visualisiert (rechte Spalte). Uninjizierte Embryonen desselben Stadiums dienen als Negativkontrolle (linke Spalte). (B) Nach der RNA Extraktion aus ganzen Embryonen zwischen den Stadien 8-40 wurde diese mit Oligo-d(T)-Primern revers transkribiert. Um die mRNA Menge zwischen den einzelnen Stadien vergleichen zu können, wurde die Menge mit dem Haushaltsgen Histon4 abgeglichen. Dargestellt ist die PLSCR1 mRNA Menge in Abhängigkeit des Embryonalstadiums.

Die subzelluläre Lokalisation transfizierter PLSCR1 in HeLa-Zellen ließ sich in der Immunfärbung weder mit dem 6x His- noch mit dem Flag-getaggten Konstrukt darstellen. Es ließ sich kein Signal detektieren, das sich deutlich vom Hintergrund abhob (nicht gezeigt).

5.8.2 Die Phospholipid Scramblase 1 moduliert die Aktivität des SuperTOPFlash-Reporters

In Reporteranalysen erwies sich die Phospholipid Scramblase 1 als Repressor. Transfizierte PLSCR1-His reprimierte den SuperTOPFlash-Reporter signifikant, wobei es die starke Aktivierung durch konstitutiv aktives β -Catenin (S33A) nicht aufheben konnte (Abb.: 5.22 A, $p < 0.01$).

Die generell reprimierende Wirkung von PLSCR1 blieb auch bei der Ko-Transfektion mit Lef und Tcf3 erhalten (Abb.: 5.22 B). So scheint es, dass die PLSCR1 gemeinsam mit Lef, Tcf3 und Tcf4 die Aktivität des für den kanonischen Wnt-Signalweg spezifischen Reporters modulieren kann. Die Modulation ist weiterhin abhängig von der Tcf4 Isoform, da einzig die Isoform, die beide repressiven DNA-Motive LVPQ und SxxSS enthält, eine Veränderung der Aktivierung mit PLSCR1 induzierte. Die Isoform ohne die beiden Motive wurde in ihrer Wirkung von PLSCR1 nicht beeinflusst.

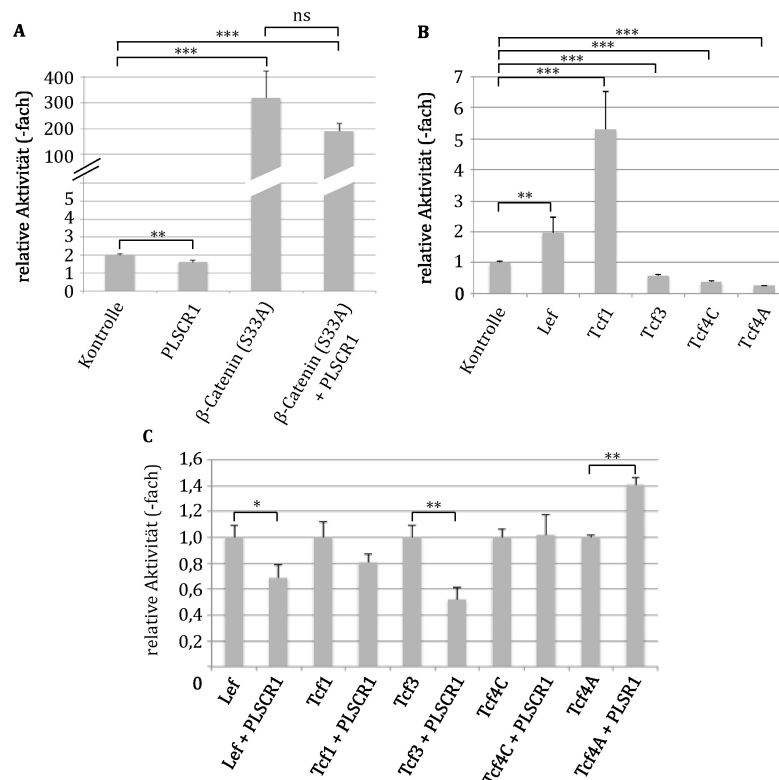


Abbildung 5.22: Die Phospholipid Scramblase 1 moduliert die Aktivität des SuperTOPFlash-Reporters

(A) PLSCR1 reprimiert die SuperTOPFlash-Reporteraktivität signifikant. Allerdings geschieht dies größtenteils unabhängig von konstitutiv aktiven β -Catenin (S33A). (B) Lef und Tcf1 aktivieren, Tcf3, Tcf4A und Tcf4B inhibieren den Reporter (C) Auf Lef, Tcf3 und Tcf4A wirkt PLSCR1 modulierend. (zweiseitiger studentischer T-Test: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, ns: nicht signifikant, dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler aus mindestens sechs Einzeltransfektionen).

6. Diskussion

6.1 Der Einfluss der *Xenopus* Lef/Tcfs in *Drosophila*

Pangolin, der einzige Lef/Tcf Transkriptionsfaktor in *Drosophila*, kann durch die Bindung an unterschiedliche DNA-Sequenzen einen funktionellen Wechsel ausüben. Je nachdem an welcher DNA-Sequenz Pangolin bindet, kann die Expression von Zielgenen gefördert oder gehemmt werden (Blauwkamp et al., 2008, Bhambhani et al., 2014). Diese gegensätzlichen Funktionen wurden bei den Vertebraten auf vier Lef/Tcf Proteine verteilt. Basierend auf Stammbaumanalysen bilden jeweils zwei der Lef/Tcfs eine Geschwistergruppe, wobei die Geschwister Lef/Tcf1 überwiegend aktivierende Eigenschaften aufweisen (Lin et al., 2006, Klingel et al., 2012). Da Pangolin in Rekonstitutionsexperimenten in *Xenopus* für drei der vier Lef/Tcfs substituieren konnte, kann davon ausgegangen werden, dass dieses Protein die ursprünglichen Funktionen des gemeinsamen Vorläufers beibehalten hat. In Rekonstitutionsexperimenten in der Fliege sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, welches der vier Lef/Tcfs der Wirbeltiere diese ursprüngliche Funktion am stärksten beibehalten hat.

6.1.1 Lef/Tcf-abhängige Induktion der Reporterogenaktivität in *Drosophila* Schneiderzellen

Funktionale Unterschiede der Transkriptionsfaktoren lassen sich am schnellsten durch die Zielgenaktivierung eines Reportersystems *in vitro* analysieren. Spezifisch für die Transkriptionsfaktoren des Wnt-Signalwegs ist der TOPFlash-Reporter (Korinek et al., 1997) und der davon abgeleitete SuperTOPFlash-Reporter. Dieser enthält eine siebenfache Wiederholung des Wnt-responsiven Elements (WRE) CCTTTGATC (van de Wetering et al., 1997, Buechling et al., 2011). In *Drosophila* Schneiderzellen konnte weder Pangolin noch einer der *Xenopus* Transkriptionfaktoren die Aktivierung des Reporters induzieren. Erst nach Stimulation durch Wingless zeigte sich eine transkriptionelle Regulation durch die Lef/Tcfs. Offensichtlich ist in diesen Zellen Armadillo der limitierende Faktor und Armadillo-unabhängige Regulation irrelevant. Dies unterscheidet sich grundlegend von zahlreichen Gewebekulturzellen aus Wirbeltieren, inklusive *Xenopus*, Maus und

Mensch. Hier werden Wnt-responsive Promotoren selbst ohne Stimulation des Wnt-Signalwegs durch überexprimierte Lef/Tcfs reguliert, wobei die Geschwistergruppe Lef/Tcf1 generell aktivierend wirkt, Tcf3 reprimierend und Tcf4 abhängig von der Spleißvariante aktivierend oder reprimierend (Gradl et al., 1999, Pukrop et al., 2001, Hecht und Stemmler, 2003, Ghogomu et al., 2006, Weise et al., 2010). Einige wenige Beispiele zeigten aber auch, dass Lef/Tcfs im Vertebratensystem stark kontextabhängig wirken. So führte die Geschwistergruppe Lef/Tcf1 in den Vertebratenzelllinien BW5147 und COS7 auf das im T-Zell-Rezeptor α enthaltene Konkatamer AACAAAG zu keiner Aktivierung (van de Wetering et al., 1993). Auch die alleinige Transfektion von Tcf3 in einer B-Lymphozyten Zelllinie hatte keinen Einfluss auf die Aktivierung des pTK(56) Motivs (Molenaar et al., 1996). Inwieweit in diesen Zellen aber noch Spuren endogenen β -Catenins vorhanden war ist unklar. Bei Schneiderzellen kann jedoch davon ausgegangen werden, dass die endogene Menge an freiem Armadillo marginal ist. Dies steht im Einklang mit *in vivo Drosophila* Experimenten, wo murines Lef die Aktivierung des B-Enhancer vor dem *ultrabithorax*-Promotor nur im Komplex mit Armadillo induzieren konnte (Riese et al., 1997). Bei allen nachfolgenden Experimenten *in vivo* muss also berücksichtigt werden, dass die Funktion der Lef/Tcfs in *Drosophila* offensichtlich streng von der Menge an endogenem Armadillo abhängt.

Nach der Voraktivierung durch Wingless offenbarten sich auch in *Drosophila* Schneiderzellen Unterschiede zwischen den Transkriptionsfaktoren. Überraschenderweise aktivierten alle Lef/Tcfs, einschließlich Pangolin, den Reporter. Tcf3 wirkt in diesem System also nicht als Repressor. Am auffallendsten war die starke Aktivierung durch Lef. Selbst Tcf1, das Geschwister von Lef, das in Vertebratenzellen den SuperTOPFlash stark aktiviert und in *Xenopus* sehr effizient sekundäre Achsen induziert (Klingel et al., 2012 und vorliegende Arbeit), war verglichen zu Lef nur ein schwacher Aktivator. Eventuell rekrutiert Lef Armadillo besser als alle anderen hier getesteten Tcfs. Dies wäre insofern überraschend, als die β -Catenin Bindedomäne nicht nur innerhalb der Lef/Tcf Transkriptionsfaktoren stark konserviert ist, sondern in seiner Struktur auch der Bindedomäne von E-Cadherin und APC ähnelt (Graham et al., 2000, Huber und Weis, 2001, Spink et al., 2001). Allerdings wurde auch gezeigt, dass sich die Bindung zwischen β -Catenin und Tcf3

bzw. β -Catenin und Tcf4 unterscheidet (Poy et al., 2001). Solche Bindungsunterschiede könnten durch Phosphorylierungen (Wang und Jones, 2006) oder Acetylierungen (Elfert et al., 2013) induziert werden. In jedem Fall ordnen sich die Lef/Tcfs in diesem Experiment nicht in die erwarteten Geschwistergruppen. Die Aktivierung von Tcf1, Tcf3 und Tcf4 war von der Aktivierung durch Pangolin nicht unterscheidbar.

6.1.2 Die Auswirkungen der Lef/Tcfs in der Flügelentwicklung

Bei der Analyse des direkten Wingleless-Zielgens *distalless* in Flügelimaginalscheiben hatten nur noch Tcf1 und Tcf4 dieselben Auswirkungen wie Pangolin(II). Alle drei reduzierten die Distalless (*dll*)-Expression. Lef dagegen führte zu keinen messbaren Veränderungen der *dll*-Expression, während Tcf3 die Expression sogar leicht erhöhte. Offensichtlich greifen in die Regulation der *dll*-Expression weitere Faktoren ein, die promotor-spezifisch und/oder gewebespezifisch die transkriptionelle Regulation durch die Lef/Tcfs beeinflussen. In jedem Fall ordnen sich die Lef/Tcf Transkriptionsfaktoren auch in diesem Experiment nicht in die erwarteten Geschwistergruppen.

Überraschend war aber zunächst, dass die Überexpression von Pangolin zu einer Reduktion der *dll*-Expression führte (Pangolin(II)), bzw. keinen Effekt hatte (Pangolin(III)). Dabei war der nicht nachweisbare Effekt bei Pangolin(III) weniger überraschend, denn eine unveränderte Zielgenexpression konnte auch in Pangolin überexprimierenden flip-out Klonen bezogen auf das Wg-Zielgen *senseless* beobachtet werden (Zeng et al., 2008b). Da in Pangolin defizienten Klonen die Expression der beiden Zielgene *distalless* und *vestigial* vermindert war (Schweizer et al., 2003), wurde allerdings bei der Überexpression eher eine Hyperaktivierung von *distalless* erwartet. Insgesamt scheint demnach die Dosis von Pangolin ausschlaggebend zu sein. Die Depletion von Pangolin zeigt die endogene Funktion dieses Proteins. In der Überexpression, also in zu hohen Konzentrationen, könnte es als dominant-negatives Protein wirken.

Entsprechend führen auch später im adulten Flügel sowohl die Überexpression von Pangolin (Lawrence et al., 2000) als auch die Pangolin Defizienz (Schweizer et al.,

2003 und vorliegende Arbeit) zu einer unvollständig ausgebildeten Margin, also Gewebeverlusten an den Flügelrändern. Es gibt eine einfache Möglichkeit dies zu erklären: Bindeproteine, die für die Funktion von Pangolin im sich entwickelnden Flügel notwendig sind, könnten limitierend vorliegen. Diese Bindeproteine könnten Armadillo für die Zielgenaktivierung sein oder CtBP als relevanter Repressor. Für beide Proteine wurde nachgewiesen, dass sie kontext-abhängig zur Regulation beitragen (Blauwkamp et al., 2008, Bhambhani et al., 2011, Zhang et al., 2014). Die Rekonstitution von PangolinRNAi(III) mit Pangolin(II) induzierte zwar keine wildtypischen Flügel, sorgte aber für das Überleben der Fliegen bis hin zur Imago. Somit konnte der letale Überexpressionsphänotyp von Pangolin(II) durch PanRNAi(III) gemildert werden. Ein möglicher Erklärungsansatz wäre, dass die Haarnadelstruktur der Pangolin RNAi im PanRNAi(III)-Stamm nicht nur spezifisch gegen endogenes Pangolin gerichtet ist, sondern auch gegen das durch UAS induzierte Pangolin. Somit wird überexprimiertes Pangolin gemeinsam mit endogenem Pangolin abgebaut und der Überexpressionsphänotyp gemildert (Bhambhani et al., 2014).

Die offensichtliche Dosisabhängigkeit der Effekte erschwert die Beurteilung der durch Lef/Tcfs verursachten Phänotypen. Da es kaum Antikörper gegen die *Xenopus* Lef/Tcfs gibt, kann die vorhandene Menge an Transkriptionsfaktoren in *Drosophila* nicht näher bestimmt werden. Alle in der vorliegenden Arbeit getesteten Antikörper erwiesen sich für diese Analyse als untauglich (nicht gezeigt).

Die Reduktion der *dll*-Expression in Tcf1- und Tcf4-Fliegen kann darauf beruhen, dass diese Tcfs wie Pangolin wirken aber auch darauf, dass sie endogenes Pangolin verdrängen. Überraschend war dann die leicht erhöhte *dll*-Expression durch Tcf3. Dieser als Repressor deklarierte Transkriptionsfaktor wirkte in der Überexpression induzierend, verhielt sich also so, wie man es von überexprimiertem Pangolin erwartet hätte. Entsprechend ließ sich die Expression von *dll* in PanRNAi-Fliegen durch die Überexpression von Tcf3, nicht aber durch Tcf1 und Tcf4 teilweise wiederherstellen. Möglicherweise ist das Bindemotiv für das C-terminale Bindeprotein in Tcf3 ausschlaggebend. Zwar kann Pangolin nicht direkt mit CtBP interagieren, da ihm das Bindemotiv fehlt, doch ist eine Wnt-abhängige Regulation durch CtBP in *Drosophila* essentiell. Dabei ist dimerisiertes CtBP ein Repressor im

Transkriptionsfaktor-Komplex auf WREs (Fang et al., 2006). Weiterhin trägt dieses Bindemotiv kein anderes der hier untersuchten transgenen *Drosophila*-Stämme. Anders als Vertebraten exprimiert *Drosophila* nur ein einziges CtBP, welches durch alternatives Spleißen in einer langen und einer kurzen C-terminalen Isoform auftreten kann (Nibu et al., 1998, Poortinga et al., 1998, Chinnadurai, 2007). Die beiden Vertebraten CtBPs und dCtBP weisen eine hohe Aminosäuresequenzhomologie in ihrer regulatorischen Domäne auf (Schaeper et al., 1995). dCtBP unterstützt viele Repressoren, wie zum Beispiel Knirps, Krüppel oder Brinker in ihrer Funktion (Hasson et al., 2001, Aihara et al., 2007). Eine direkte Interaktion von XTcf3 mit XCtBP sowie eine durch die Überexpression von CtBP erzeugte Reprimierung Lef/Tcf-spezifischer Zielgene wurde bereits gezeigt (Brannon et al., 1999, Valenta et al., 2003). Ein mögliches Szenario wäre dann, dass überexprimiertes Tcf3 den Ko-Repressor CtBP bindet und somit das in den PanRNAi-Fliegen verbleibende Pangolin von der Repression befreit und dadurch die Expression des Zielgens dll erlaubt (Abb.: 6.1).

Im Gesamtflügel rief Tcf3(II) von allen untersuchten Lef/Tcfs die stärksten Veränderungen hervor, die Insertion auf dem zweiten Chromosom war sogar embryonal letal. Die Überexpression von Tcf3 gemeinsam mit Pangolin oder in Pangolin defizientem Hintergrund erlaubte es den Tieren sich zu Imagos zu entwickeln, wobei die Flügel von Tcf3/Pangolin wildtypisch aussahen und die von Tcf3/PanRNAi leichte Einkerbungen der Margin aufwiesen. Auch hier lässt sich beides mit der Konkurrenz um den Ko-Repressor CtBP erklären. Überexprimiertes Tcf3 rekrutiert CtBP, das endogene Pangolin wird hyperaktiviert, wodurch die Überexpression von Tcf3 einer Hyperaktivierung des Wg-Signalwegs ähnelt. Überexprimiertes Pangolin kompetitiert mit Tcf3 um CtBP und die Hyperaktivierung wird aufgehoben. Ebenso wird die Hyperaktivierung durch die Depletion von Pangolin in den PanRNAi-Fliegen aufgehoben.

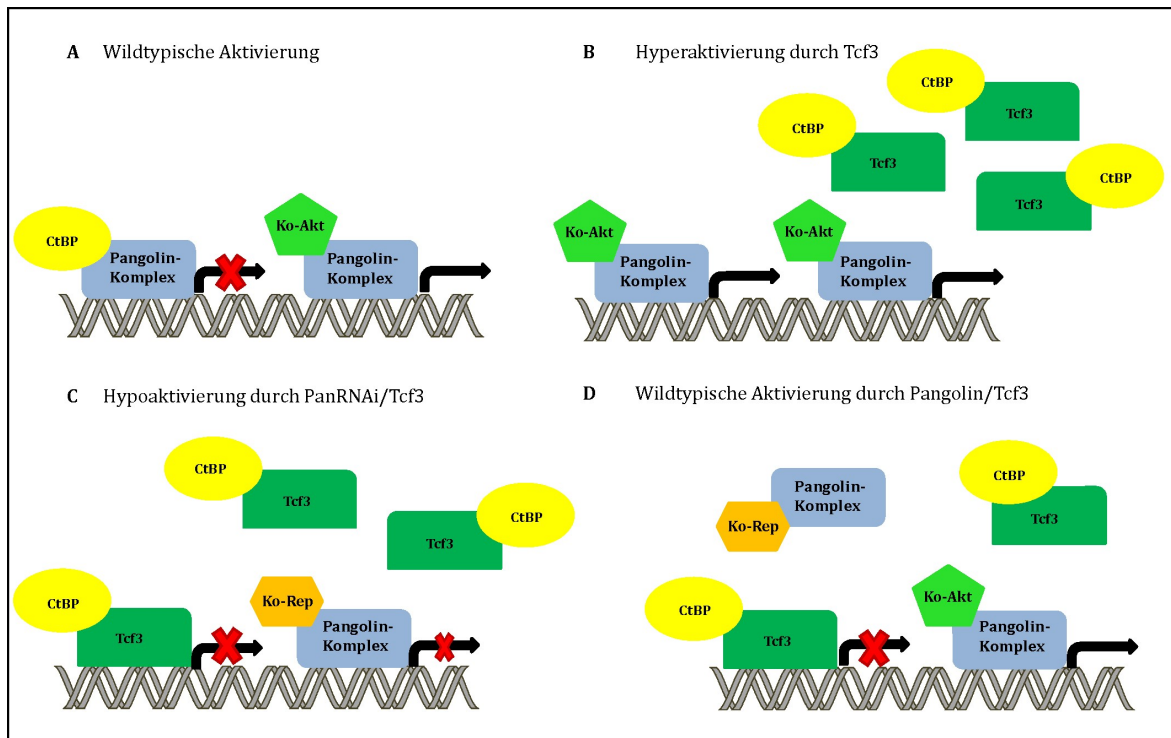


Abbildung 6.1: Schematische Darstellung zur Konkurrenz um CtBP zwischen dem Pangolin-Komplex und Tcf3

(A) In wildtypischem Zustand bindet der Pangolin-Komplex den Ko-Repressor CtBP und induziert so die Zielgenrepression. Wenn CtBP nicht gebunden ist, aktiviert der Pangolin-Komplex die Zielgenexpression. (B) Tcf3 fängt CtBP ab, welches so nicht mehr mit dem Pangolin-Komplex interagiert. Dies führt zur Hyperaktivierung Pangolin-regulierter Zielgene. (C) In der Überexpression von Tcf3 in Pangolin defizientem Hintergrund bindet Tcf3 CtBP und als Komplex an die WREs. Geringe Mengen an verbliebenen Pangolin-Komplexen können zu einer Hypoaktivierung Wnt-regulierter Zielgene führen (durch ein kleineres Kreuz gekennzeichnet). (D) Die gemeinsame Überexpression von Tcf3 und Pangolin führt zu einer wildtypischen Zielgenaktivierung. Während Tcf3 im Komplex mit CtBP WREs inhibiert, bleiben mehr Pangolin-Komplexe übrig, die zur Zielgenaktivierung führen, wodurch die Inhibition durch Tcf3/CtBP wieder ausgeglichen wird. Mögliche Ko-Aktivatoren wie Armadillo, Pygopus und Legless oder Ko-Repressoren wie Groucho können das ganze Regulationsgefüge zusätzlich beeinflussen.

Die partielle Wiederherstellung der *dll*-Expression in PanRNAi-Fliegen durch Lef lässt sich durch einen anderen Mechanismus erklären. Lef war in den Reporteranalysen der mit Abstand stärkste Aktivator. In den Imaginalscheiben mag dieses Protein damit unabhängig von allen Pangolin-spezifischen regulatorischen Mechanismen, sei es posttranslationale Modifikation, hohe Affinität zu Armadillo oder Binden an zusätzliche, die WRE flankierenden Sequenzen, die Expression von *dll* aktivieren und damit den Verlust von Pangolin kompensieren. Inwieweit Lef tatsächlich unterschiedliche WREs oder zusätzliche Helfersequenzen binden kann, könnte durch DNase Footprinting Assays oder Chromatin-

Immunopräzipitation näher untersucht werden. Die aktivierende Wirkung von Lef wird allerdings erst in PanRNAi-Fliegen offensichtlich. In wildtypischen Fliegen vermag Lef endogenes Pangolin nicht zu verdrängen, die Effekte bleiben marginal.

Lef-überexprimierende Fliegen wiesen sowohl in wildtypischem als auch in Pangolin defizientem Hintergrund Wg-spezifische Flügelmorphologien auf. Die Margin zeigte leichte Einkerbungen. Wie in den Reporteranalysen tritt Lef auch hier als starker Aktivator auf. Das Ausmaß der phänotypischen Veränderungen könnte erneut durch die limitierende Menge an Armadillo gehemmt werden. Viel deutlicher als die Margin-Defekte war allerdings, dass kein einziger Flügel vollständig entfaltet vorlag. Da dieser Flügeltyp in keiner einzigen Mutante einer Wg-Signalwegkomponente zu finden war, spricht dies erneut dafür, dass Lef nicht denselben regulatorischen Mechanismen wie Pangolin unterliegt. Auch dass der Phänotyp der gefalteten Flügel unabhängig von Pangolin konsistent bleibt, würde dafür sprechen. Pangolin würde von Lef von den WREs verdrängt werden, welches so eine starke Zielgenaktivierung initiiert. Da regulatorische Mechanismen, die zur Hemmung der Zielgenexpression führen würden, wie zum Beispiel die Phosphorylierung von Pangolin durch Nemo (Zeng und Verheyen, 2004) oder von Lef durch die Nemo-like Kinase (Ishitani et al., 2003), auf das Paar Lef/Nemo nicht anwendbar sind, verbleiben die Flügel eingeklappt und der Wg-Signalweg konstitutiv aktiv.

Die Überexpression von Tcf1 in den Imaginalscheiben resultierte in der Inhibition der *dll*-Expression. Auch in Pangolin defizienten Fliegen, also im Pangolin mutanten Hintergrund, änderte sich daran nichts. Eine genaue Funktion für Tcf1 zu ermitteln ist insofern schwer, als sowohl die Überexpression als auch die verminderte Expression von Pangolin zur reduzierten *dll*-Expression führten. Entsprechend könnte Tcf1 entweder als dominant-negatives Pangolin agieren und somit Pangolin vom *dll*-Promotor verdrängen, ohne selbst eine Zielgenaktivierung zu induzieren. Tcf1 könnte aber auch antagonistisch zu Pangolin wirken, in dem es selbstständig die Zielgenexpression hemmt. Dies würde allerdings der Tatsache widersprechen, dass Tcf1 im Reporterassay aktivierend wirkte. Als Aktivator könnte Tcf1 dieselben Auswirkungen wie Pangolin erzeugen und die sind, wie die beiden Pangolin-Mutanten zeigen, dosisabhängig.

Der Gesamtflügel der Tcf1-überexprimierenden Flügel zeigte die typischen Pangolin Verlustmerkmale auf: Defekte in der Quervernenbildung und klassische Verluste in der Flügelmargin. Der Effekt verstärkte sich im PangolinRNAi Hintergrund insoweit, dass die Flügelfläche kleiner erschien. Dies würde dafür sprechen, dass Pangolin und Tcf1 gegenteilige Funktionen ausüben. Wenn Tcf1 antagonistisch zu Pangolin agieren würde, dann müsste in der gemeinsamen Überexpression eine wildtypische Flügelmorphologie zu sehen sein, oder sich die durch Pangolin und Tcf1 verursachten Veränderungen zumindest teilweise aufheben. Dies war nicht der Fall, was dafür spricht, dass Tcf1 und Pangolin gegensätzliche Funktionen ausüben oder dass Tcf1 wie dominant-negatives Pangolin wirkt. Möglicherweise verdrängt Tcf1 an einem Teil der für die Flügelentwicklung wichtigen WREs Pangolin. Ohne Cystein-Klammer, und damit ohne die Möglichkeit an zusätzliche Helferstellen zu binden, fehlt eine ausschlaggebende Domäne, die eine Zielgenaktivierung erlaubt (Ravindranath und Cadigan, 2014). Eine andere Möglichkeit wäre, dass Tcf1 an Armadillo bindet und dieses abfängt. Wenn man berücksichtigt, dass auch die Bindung weiterer Ko-Aktivatoren beeinflusst sein könnte, erscheinen die den morphologischen Veränderungen zugrunde liegenden Mechanismen noch deutlich komplexer. So konnte gezeigt werden, dass Smad, ein Modulatorprotein des BMP-Signalwegs, Pangolin binden kann und somit die Wg-Zielgenunterdrückung fördert (Zeng et al., 2008b). Dabei sind die Smad-Bindedomänen zwischen Pangolin und den Vertebraten Lef/Tcfs konserviert (Labbé et al., 2000). Auch wurde in *Xenopus* und *Mus musculus* eine Interaktion der Lef/Tcfs mit Smad nachgewiesen, die zur Zielgenaktivierung führte (Nishita et al., 2000, Theil et al., 2002, Lim und Hoffmann, 2006). *Drosophila* Smad könnte folglich Tcf1 abfangen und die Zielgenexpression modulieren. Die tatsächliche Bindung von Tcf1 an dSmad könnte in Ko-Immunopräzipitationen nachgewiesen werden, wobei hier wieder spezifische Antikörper der limitierende Faktor sind. Alternativ könnten neue Fliegenstämme generiert werden, die Austausch-/ und/oder Deletionskonstrukte der Lef/Tcfs exprimieren und so mögliche Bindungen an Ko-Aktivatoren oder -Repressoren verhindern. Die Auswirkung dieser Veränderungen könnten dann spezifisch in klonalen Analysen charakterisiert werden.

Wie bei Tcf1 führte auch die Überexpression von Tcf4 zur Reduktion der *dll*-Expression. Auch hier fällt es schwer eine Aussage über die Funktion von Tcf4 als Repressor bzw. dominant-negatives Pangolin oder als Aktivator zu definieren.

Der Tcf4 Phänotyp im adulten Flügel war gemeinsam mit Tcf3 am stärksten. Die Flügel waren zum Teil so deformiert, dass eine genaue Aussage über die Margin und das Venenmuster nicht getroffen werden konnte. Im schwächeren Fliegenstamm waren die Margindefekte und Venenverluste allerdings deutlich zu sehen. Stärker als bei Tcf1 kam es in Pangolin defizientem Hintergrund zu einer Addition der Effekte, was darauf schließen lässt, dass auch Tcf4 entweder wie dominant-negatives Pangolin oder antagonistisch zu Pangolin wirkt. Wäre letzteres der Fall, dann müssten Tcf4/Pangolin Flügel wildtypisch erscheinen. Dies traf nicht zu. Es traten keine Unterschiede zwischen der Überexpression von Tcf4 in wildtypischem Hintergrund oder in Pangolin überexprimierendem Hintergrund auf. Dies spricht für dominant-negatives Tcf4 oder erneut für eine dosisabhängige Regulation. Überraschend war allerdings die Beobachtung, dass Flügel Tcf3/Tcf4-doppeltransgener Tiere wildtypisch aussahen. Nach dem Modell (Abb.: 6.1) müsste Tcf4 hier als Aktivator wirken. Die Doppelmutante *Lef/Tcf4* zeigt keine additiven Effekte. Die Flügel entsprechen denen der Tcf4 Überexpression, was die Vermutung von Tcf4 als dominant-negatives Pangolin stärkt. Die Regulationsmechanismen erscheinen deutlich komplexer als im einfachen Modell mit Pangolin, Tcf3 und CtBP. Da das transgene Tcf4 im Vergleich zu Tcf3 kein Bindemotiv für CtBP aufweist, scheint die Regulation über andere Ko-Faktoren zu erfolgen. Eine Möglichkeit dafür könnte sein, dass Tcf3 durch CtBP in seinen reprimierenden Eigenschaften bestärkt wird und gleichzeitig CtBP von Pangolin abfängt. Sowohl Tcf4 als auch Pangolin werden dann durch CBP acetyliert, was bei Pangolin die Bindungsaktivität zu Armadillo erhöht und bei Tcf4 zu Konformationsänderungen führt, die die Bindung weiterer Ko-Repressoren erschweren (Mosimann et al., 2009, Elfert et al., 2013). So wären Tcf4 und Pangolin gemeinsame Aktivatoren, die im Gleichgewicht mit dem Repressorkomplex Tcf3/CtBP liegen würden und so eine wildtypische Flügelmorphogenese ermöglichen. Weitere Ko-Aktivatoren wie Pygopus und Legless/Bcl9 nehmen dabei zusätzlich Einfluss (Hoffmans et al., 2005, Jessen et al., 2008).

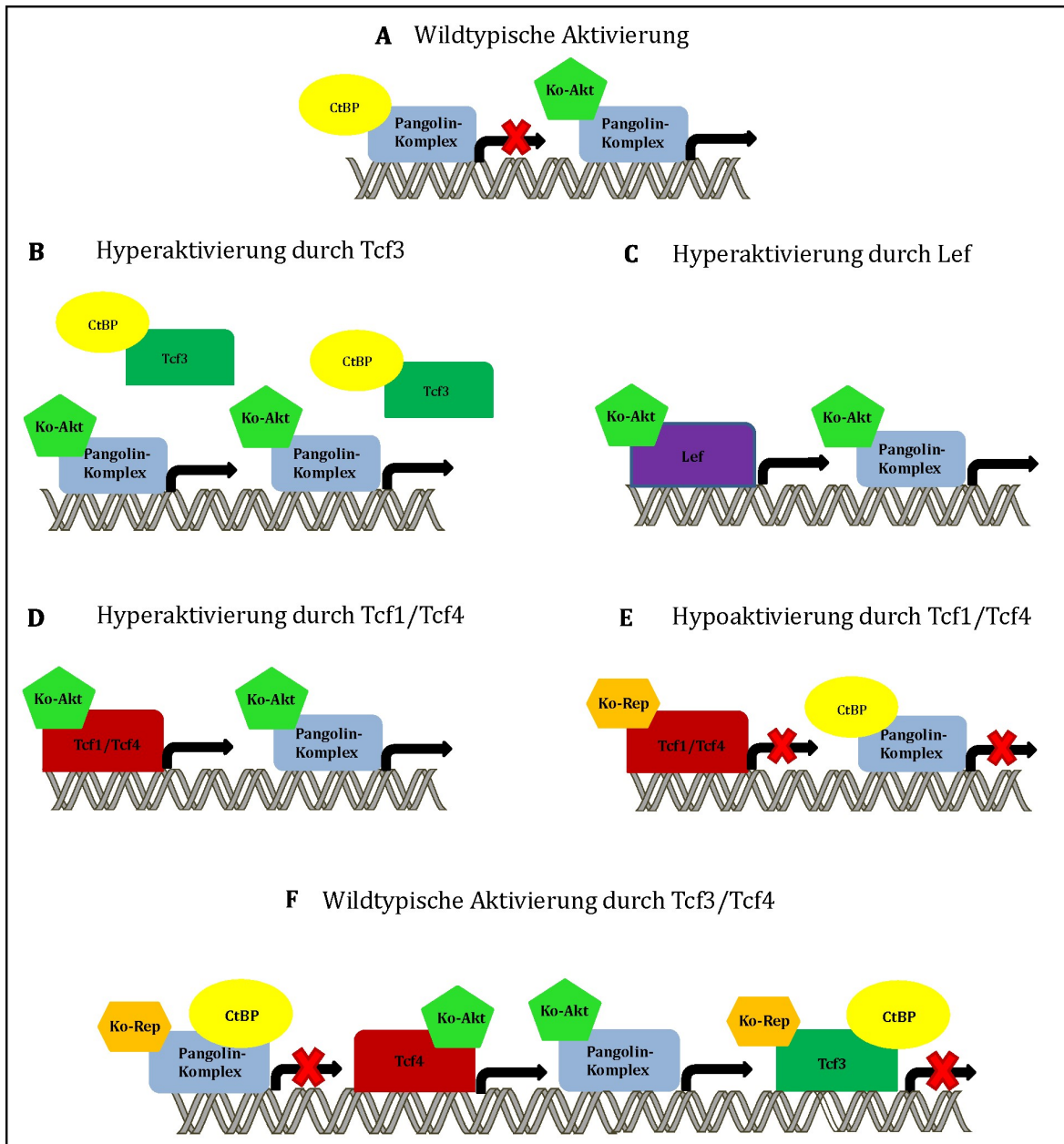


Abbildung 6.2: Schematische Darstellung der Zielgenregulation durch die Lef/Tcfs

(A) In wildtypischem Zustand interagiert der Pangolin-Komplex mit dem Ko-Repressor CtBP, was zur Repression der Zielgenexpression führt. Wenn CtBP nicht gebunden ist, aktiviert der Pangolin-Komplex die Zielgenexpression. (B) Tcf3 fängt CtBP ab, welches so nicht mehr mit dem Pangolin-Komplex wechselwirkt. Dies führt zur Hyperaktivierung Pangolin-regulierter Zielgene. (C) Lef als starker Aktivator bindet selbständig an die WREs und induziert so eine Hyperaktivierung. (D) Tcf1 und Tcf4 können sowohl als Aktivatoren eine Hyperaktivierung induzieren, oder als dominant-negatives Tcf eine Hypoaktivierung erwirken (E). Dafür verdrängen sie Pangolin von den WREs, an denen sie selbst keine Zielgenaktivierung zu induzieren vermögen. Der Pangolin-Komplex wird zusätzlich durch CtBP reprimiert. (F) Eine wildtypische Zielgenaktivierung wird hervorgerufen durch Tcf3, welches CtBP abfängt, wodurch weniger davon mit dem Pangolin-Komplex interagiert. Tcf4 kann an die richtigen WREs binden und gemeinsam mit Pangolin in der Induktion der Zielgenaktivierung mitwirken. Mögliche Ko-Aktivatoren wie Armadillo, Pygopus und Legless oder Ko-Repressoren wie Groucho können das ganze Regulationsgefüge zusätzlich beeinflussen. Dosisabhängige Effekte sind aus diesem Schema ausgeschlossen.

Da die gemeinsame Überexpression von Tcf3 und Tcf4 aber auch in sehr stark deformierten Flügeln resultierte, scheint auch das obere Schema (Abb.: 6.2) nicht auszureichen um die tatsächliche Situation während der Flügelentwicklung darzustellen. Zusätzlich müsste noch beachtet werden, wie stark die Dosiseffekte die Genregulation beeinflussen, dass Pangolin und die Lef/Tcfs an unterschiedliche WREs binden können und Pangolin mit seiner Cystein-Klammer auch weitere auf der DNA liegende Helferstellen bedienen kann (Atcha et al., 2007, Blauwkamp et al., 2008). Diese WREs in Verbindung mit den Helferelementen wiederum beeinflussen die aktivierende oder reprimierende Funktion der Transkriptionsfaktoren im Komplex mit Armadillo und weiteren Ko-Faktoren (Zhang et al., 2014). Beachtet man nun die modulare Vielfalt an unterschiedlichen Ko-Aktivatoren und -Repressoren, posttranslationalen Modifikationen, die zusätzliche Bindung der Cystein-Klammer an Helfersequenzen oder die Nutzung unterschiedlicher WREs, dann ist es umso erstaunlicher, dass eine Chimäre bestehend aus der Cystein-Klammer von Pangolin und humanem Lef Pangolin ersetzen kann (Bhambhani et al., 2014). Auch die vorliegende Arbeit unterstreicht die Bedeutung des C-Terminus der Transkriptionsfaktoren für die Zielgenregulation in *Drosophila*. Dabei zeigten die hier analysierten Transkriptionsfaktoren, dass neben der konservierten Cystein-Klammer in den E-Varianten der Vertebraten Tcfs, Tcf1E und Tcf4E, offensichtlich auch die in Tcf3 und Tcf4E konservierte Rekrutierung von CtBP bedeutsam ist.

Insgesamt war die Analyse in *Drosophila* dadurch erschwert, dass die Pangolin Überexpression und die Pangolin Defizienz phänotypisch nicht unterscheidbar sind und auch dosisabhängige Effekte nicht ausgeschlossen werden konnten. Trotzdem konnten Unterschiede in der Funktion der *Xenopus* Lef/Tcfs während der Flügelentwicklung ermittelt werden.

Da keines der Lef/Tcfs vollständig für Pangolin substituieren konnte, deuten die in vorliegender Arbeit erbrachten Ergebnisse darauf hin, dass entweder eine ursprüngliche Funktion bei der Aufspaltung der Lef/Tcfs verloren ging, oder dass Pangolin seit der Abspaltung vom gemeinsamen Vorläufer neue Eigenschaften angenommen hat, die keines der Wirbeltier Lef/Tcfs übernehmen kann. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, zusammen mit den Rekonstitutions-

experimenten mit chimären Lef/Pangolin-Konstrukten von Bhambhani und Kollegen (2014) deuten an, dass eine ursprüngliche Funktion des gemeinsamen Vorläufers im C-Terminus liegt und Regulationen über die Cystein-Klammer und das Rekrutieren von CtBP beinhalten.

Die Gruppierung der Geschwistergruppen Lef/Tcf1 und Tcf3/Tcf4 ließ sich mit funktionalen Experimenten in *Drosophila* nicht bestätigen. Die funktionale Bedeutung des C-Terminus und die Ähnlichkeiten der C-Termini (sowie alternativen Spleißvarianten) von Tcf1 und Tcf4 geben Anlass über eine Geschwistergruppe Tcf1/Tcf4 nachzudenken. Dabei bleibt aber die zwischen Tcf3 und Tcf4 konservierte Bindestelle für CtBP unberücksichtigt.

6.2 Die Analyse des Tcf4 C-Terminus auf seine aktivierenden und reprimierenden Eigenschaften

6.2.1 Analyse der Cystein-Klammer des Tcf4 E-Tails

Die Cystein-Klammer ist Teil der Invertebraten Tcf (Chang et al., 2008, Bhambhani et al., 2014), bei den Vertebraten allerdings nur in Tcf1E und Tcf4E Isoformen vorhanden (Atcha et al., 2003, Weise et al., 2010). Für *Xenopus laevis* konnte die Cystein-Klammer einzig in Tcf4E Isoformen identifiziert werden (Vacik et al., 2011, Gomarteli, 2012), eine Tcf1 Isoform mit Cystein-Klammer ist bis heute nicht bekannt. Die Bindung der Cystein-Klammer an DNA-spezifische Helferstellen nahe der WREs unterstützt die Regulierung diverser Wnt-Zielgene (Hecht und Stemmler, 2003, Atcha et al., 2007). Für die Aktivierung des *lef*-Promotors konnte gezeigt werden, dass das zweite und dritte Cystein der Cystein-Klammer unabdingbar sind (Atcha et al., 2007). Auch für die Aktivierung des *nkd IntE*-Promotors, der aus funktionaler HMG-Bindestelle mit zusätzlicher Helferstelle besteht, wurde jedes einzelne Cystein benötigt (Atcha et al., 2007). In der vorliegenden Arbeit stellte sich heraus, dass die Aktivierung des *siamois*-Reporters in Hek293-Zellen ebenfalls durch die Cystein-Klammer beeinflusst wird. Überraschenderweise schienen Mutationen in der Cystein-Klammer insgesamt die Aktivierung des *siamois*-Reporters zu fördern was dafür spricht, dass die Cystein-Klammer in Tcf4E einen hemmenden Einfluss auf den *siamois*-Promotor ausübt. Dies lässt sich am einfachsten dadurch erklären, dass über

die Cystein-Klammer die Bindung von Tcf4 an die WREs des *siamois*-Reporters verstärkt wird und damit die Repression durch die CRD und den restlichen C-Terminus von Tcf4E dominiert. In der Ko-Transfektion mit Tcf1 scheint es so, als ob Tcf1 durch Tcf4 vom *siamois*-Reporter verdrängt wird. Diese Verdrängung ist dann weniger effizient, wenn durch den Austausch zweier Cysteine in der Cystein-Klammer die Bindung an die Helferstellen unterbleibt. Dabei ist ein Austausch selbst der endogenen Lef/Tcfs auf Wnt-regulierten Genen nicht ungewöhnlich und wurde beispielsweise bei der Regulation des *vent2*-Promotors detailliert beschrieben (Hikasa und Sokol, 2011). Bei diesem Promotor wird der Austausch von Tcf3 zu Tcf1 durch β -Catenin eingeleitet. Dieses bestimmt, ob der *vent2*-Promotor über Tcf1 aktiviert oder ob er über Tcf3 reprimiert wird (Hikasa und Sokol, 2011). In kolorektalen Karzinomzellen wird durch den Austausch von Tcf3 durch Tcf4 am *myc*-WRE die Expression von Myc induziert (Shah et al., 2015). Diese Verdrängung ließ sich in der vorliegenden Arbeit nach der Voraktivierung durch konstitutiv aktives β -Catenin (S33A) natürlich nicht beobachten. Hier war in jedem Fall das transfizierte Tcf4E-Konstrukt im Überschuss vorhanden und aktivierte somit den *siamois*-Reporter. Dies entspricht dem gängigen Model, dass nach Aktivierung und Bindung an β -Catenin die Zielgenexpression eingeleitet wird (Blauwkamp et al., 2008, Archbold et al., 2012). Überraschend war dabei, dass die Tcf4E-Konstrukte mit Mutationen in der Cystein-Klammer offensichtlich stärker aktivierten als wildtypisches Tcf4E oder sogar das mit mutierter CtBP-Bindestelle. Damit scheint die Cystein-Klammer in nicht stimulierten Zellen die *siamois*-Repression zu fördern, in mit β -Catenin transfizierten Zellen dagegen die Aktivierung zu hemmen. Dabei sollten diese subtilen Änderungen in der Promotoraktivität aber nicht überinterpretiert werden, zumal im Achsenduplikationsassay kein Effekt der Cystein-Klammer mehr zu erkennen war (Abb.: 5.14). Dies könnte daran liegen, dass die Mutation zweier Cysteine für das endogene System nicht ausreicht, um eine Bindung an die nötigen Helferstellen zu verhindern. Eine schwache Bindung ermöglicht es allerdings anderen Transkriptionsfaktoren mutiertes Tcf4 leichter vom Promotor zu verdrängen. So könnte hier Tcf1 Tcf4 leichter am Promotor ersetzen. Weiterhin wird die Induktion einer sekundären Körperachse nicht ausschließlich von Tcf1 und Tcf4 über den *siamois*-Promotor reguliert (Liu et al., 2005). Weitere Transkriptionsfaktoren binden

an andere responsive Elemente und nehmen dadurch Einfluss auf die Ausbildung der Körperachse. So zum Beispiel auch der Transkriptionsfaktor VegT (Li et al., 2015). Für ihn wurde erst kürzlich gezeigt, dass er an den *siamois*-Promotor bindet. Diese Bindung besteht an anderen Konsensusstellen, als die WREs, die für den Wnt-Signalweg spezifisch sind. Zusätzlich wurde gezeigt, dass VegT synergistisch mit Tcf1 die Aktivierung des *siamois*-Promotors induziert (Li et al., 2015). Die Interaktion mit anderen Proteinen schließt auch Ko-Repressoren wie Groucho mit ein (Costa et al., 2013). Diese Interaktionen können in der Entwicklung einer sekundären Körperachse effektiver und stärker sein, als die Interaktion der Cystein-Klammer mit etwaigen responsiven Elementen.

Letztendlich scheint es so, als ob das Umfeld darüber entscheidet, wann die Cystein-Klammer auf die Wirkung von Tcf4 Einfluss nimmt und wann sie eher gering beteiligt ist. So ist in Hek293-Zellen bei der Aktivierung des *siamois*-Reporters die Cystein-Klammer von Bedeutung, wohingegen sie *in vivo* bei der Achsenduplikation keine auffallende Rolle inne hat. Dies steht in scharfem Kontrast zu publizierten Daten. Vacik und Kollegen (2011) zeigten, dass E-Tail Varianten von Tcf4, selbst Varianten, denen die N-terminale β -Catenin Bindestelle fehlt, nach ventraler Injektion sekundäre Körperachsen hervorrufen. Dies konnte hier nicht bestätigt werden. Im Gegenteil, Tcf4E wirkt der Bildung sekundärer Körperachsen offensichtlich entgegen. Die dürre Datenlage der Publikation von Vacik und Kollegen (2011), die Anzahl injizierter Embryonen im Achsenduplikationsassay war kleiner 10, verglichen mit den hier durchgeführten Experimenten und den nicht in die vorliegende Arbeit eingeflossenen Einzelinjektionen lassen nur den Schluss zu, dass zumindest auf der ventralen Seite, zur Induktion ektopischer Körperachsen die Cystein-Klammer im Tcf4 E-Tail völlig irrelevant ist. Stattdessen wurde in der vorliegenden Arbeit der reprimierende Einfluss des CtBP mit Mutationen im CtBP-Bindemotiv vollauf bestätigt.

6.2.2 Tcf4E und das C-terminale Bindeprotein

Das C-terminale Bindeprotein ist nach neueren Studien ähnlich bifunktional wie Tcf4 oder die ursprünglichen Tcfs. Es agiert als Repressor und als Aktivator (Fang et al., 2006, Bhambhani et al., 2011). Die funktionalen Eigenschaften von CtBP werden zu dem durch deren Möglichkeit zur Dimerisierung variiert. So konnte gezeigt werden, dass Dimere tendenziell reprimieren, wogegen Monomere eher aktivierende

Eigenschaften aufweisen (Bhambhani et al., 2011). Für den kanonischen Wnt-Signalweg wird CtBP gemeinhin als Repressor anerkannt. Die Frage, wie diese Repression eintritt ist allerdings umstritten. Eine Hypothese geht davon aus, dass CtBP gemeinsam mit dem Tumorsuppressor APC den Export und Abbau von β -Catenin aus dem Nukleus fördert. Dies resultiert in weniger nukleärem β -Catenin und somit in einer schwächeren Aktivierung des Wnt-Signalwegs (Hamada und Bienz, 2004, Sierra et al., 2006). Eine andere Hypothese geht von einer direkten Interaktion des CtBPs mit Tcf3 und Tcf4 aus, da ausschließlich diese beiden Vertebraten Tcfs das CtBP spezifische Bindemotiv PLSL im C-Terminus beinhalten (Schaeper et al., 1995, Brannon et al., 1999, Kumar et al., 2002, Hecht und Stemmler, 2003). Eine direkte Interaktion von CtBP mit Tcf3 oder Tcf4 konnte *in vivo* lange nicht nachgewiesen werden. Für XTcf3 und XCtBP wurde allerdings *ex vivo* die Interaktion im Hefe-2-Hybridsystem und im GST-Pulldown bewiesen (Brannon et al., 1999). In der vorliegenden Arbeit war XCtBP2 der Faktor, der im Hefe-2-Hybridsystem prominent mit dem E-Tail von Tcf4 interagiert. Die physische Interaktion von Tcf4 mit CtBP1 konnte zwischenzeitlich durch Ko-Immunopräzipitation aus Zellkernextrakten von HCT-166-Zellen weiter verifiziert werden (Patel et al., 2014). In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass der Aminosäureaustausch in nur einer der beiden CtBP Bindestellen keinen Einfluss auf die *siamois*-Reporteraktivität ausübt (Abb.: 5.13). Möglicherweise reicht für die Repression des *siamois*-Reporters in transfizierten Hek293-Zellen ein einziges funktionales Bindemotiv aus, um weiterhin wildtypisch zu agieren. Dies wäre insofern wenig überraschend, da viele Proteine nur ein CtBP Bindemotiv enthalten (Snow et al., 2010, Cohen et al., 2013, Liu et al., 2013). Der reprimierende Einfluss des CtBP-Bindemotivs wurde allerdings im Achsenduplikationsassay offensichtlich. Während wildtypisches Tcf4 die Anzahl sekundärer Achsen deutlich senkte, reduzierte mutiertes Tcf4 die Anzahl weniger drastisch (Abb.: 5.14). Es lässt sich darüber spekulieren, dass allein durch die Anzahl an gebundenen CtBPs die repressorischen Eigenschaften des Tcf4/CtBP-Komplexes erhöht werden und in diesem System die Bindung eines einzigen CtBPs nicht ausreicht, um weiterhin wildtypisch agieren zu können. Als Folge des Verlustes eines Bindemotivs in Tcf4 kann es zu keiner Anhäufung von CtBP am Tcf4 und dadurch zu

weniger Dimerisierungen kommen. Letztendlich könnte deshalb eine strikte Repression nicht mehr eingehalten werden.

Aus einem anderen Grund war die schwache Unterdrückung der Tcf1-induzierten Doppelachsen durch das mutierte Tcf4E (1. ALSA)-Konstrukt völlig überraschend. Denn sowohl von Tcf3C als auch von Tcf4A und Tcf4C, also alles Tcf3/4 Varianten ohne CtBP Bindestelle (und ohne Cystein-Klammer) wurde gezeigt, dass sie effizient Lef-induzierte Doppelachsen zu verhindern vermögen (Brannon et al., 1999, Gradl et al., 2002). Ein Erklärungsansatz könnte sein, dass die Interaktion mit dem Ko-Repressor CtBP sowie Tcf3/Tcf4 gemeinsam mit Groucho/TLE für die strikte Unterdrückung sekundärer Doppelachsen essentiell ist. Deletionskonstrukte von Tcf3, denen zum einen die Bindestelle für Groucho/TLE fehlte und zum anderen der C-Terminus und damit die entsprechenden Bindestellen für CtBP, vermochten trotzdem noch effizient Doppelachsen zu unterdrücken. Erst die Deletion der Groucho/TLE Bindestelle und des C-Terminus führte zur Inhibition der Doppelachsen-Repression (Brannon et al., 1999, Gradl et al., 2002). Auch in der vorliegenden Arbeit reichte die alleinige Mutation des CtBP-Bindemotivs nicht aus, um die Unterdrückung vollständig zu revidieren. Es kann allerdings nur darüber spekuliert werden, inwieweit dabei die Mutation in nur einer der beiden CtBP Bindemotiven oder die Interaktion mit Groucho eine Rolle spielen. Auch die beiden Tcf4 Isoformen weisen Bindestellen für Groucho/TLE auf, bei Tcf4A sind sogar zusätzliche inhibierende DNA-Sequenzen enthalten, die die reprimierenden Eigenschaften verstärken (Pukrop et al., 2001).

Vergleicht man nun die beiden Motive Cystein-Klammer und CtBP-Bindemotiv, die sich gemeinsam auf ein und demselben Protein befinden, so können beide sowohl aktivierende als auch reprimierende Eigenschaften aufweisen. Alleine die in vorliegender Arbeit durchgeführten Versuche weisen darauf hin, dass die Funktion der Motive stark auf den jeweiligen Kontext bezogen ist. So scheint die Cystein-Klammer aktivierend auf den *siamois*-Promotor zu wirken und funktional irrelevant bei der Unterdrückung sekundärer Körperachsen zu sein. Die Bindung von CtBP dagegen ist nicht relevant bei der Aktivierung des *siamois*-Reporters in Hek293-Zellen, dafür aber bei der Reprimierung sekundärer Körperachsen. Die Wirkung der beiden Domänen ist also, wie die der CRD-Domänen, stark kontext-abhängig

(Phippen et al., 2000, Liu et al., 2005). Inwiefern beide Domänen gemeinsam die Zielgenregulation beeinflussen, könnte mit einem zusätzlichen Konstrukt ermittelt werden, bei dem sowohl die Mutationen der Cystein-Klammer als auch die der CtBP Bindestelle vorhanden sind. Rekonstitutionsexperimente in Tcf4 Morphanten mit den jeweiligen E-Tail-Konstrukten könnten darüber aufklären, welches Motiv für die Regulation diverser Zielgene relevant ist und wann keines der beiden Motive Einfluss auf die Zielgenregulation ausübt.

6.3 Identifizierung neuer Lef/Tcf Interaktionspartner

Die kontext-abhängigen Domänen (CRD) der vier *Xenopus* Lef/Tcfs wurden als Bait im Hefe-2-Hybridsystem eingesetzt. Als cDNA Bibliothek diente eine in der vorliegenden Arbeit synthetisierte mesodermale cDNA aus *Xenopus* animalen Kappen, welche in humanem Aktivin kultiviert wurden. Die cDNA Bibliothek entsprach den Standardangaben einer guten cDNA Bank nach der Bedienungsanleitung des CloneMiner™II cDNA Library Construction Kits (Invitrogen™, Life Technologies GmbH, Carlsbad, USA). Überraschenderweise ließen sich nach stringenter Analyse der möglichen Interaktionspartner nur zwei Klone im Hefe-2-Hybridsystem verifizieren. Ein möglicher Grund für die geringe Ausbeute könnte sein, dass die CRD-Domäne keine hinreichende, stabile räumliche Konfiguration einnimmt, die es erlaubt mit anderen Proteinen stabil zu interagieren. Tatsächlich wurde durch Zirkulardichroismus Spektroskopie und Analysen nach proteolytischem Verdau gezeigt, dass ungebundene Lef/Tcfs größtenteils ungefaltet vorliegen. Erst durch die Bindung an die DNA bilden sie ihre funktionale Struktur aus (Arce et al., 2006). Dies macht sie anfällig für schwache, unspezifische Bindungen. Für die β -Catenin Bindedomäne ist bekannt, dass bei der Bindung an β -Catenin eine Konformationsänderung auftritt. So bildet sie mit Beginn der Interaktion eine α -Helix aus, die dann mit β -Catenin interagiert und über Glutamin zusätzliche Salzbrücken ausbildet (Graham et al., 2000, Graham et al., 2001). Auch die HMG Box ändert ihre Struktur während der Bindung an die DNA. So konnte zum Beispiel für Lef gezeigt werden, dass das Protein vor der DNA-Bindung nicht komplett unstrukturiert vorliegt, es die funktionale Struktur aber erst erlangt, wenn es an die DNA bindet (Love et al., 2004). Eine Struktur in der kontext-abhängigen Domäne ist soweit noch

nicht beschrieben worden. Strukturvorhersagen über die CRD geben keine Hinweise für β -Faltblätter und α -Helices (persönliche Mitteilung G. Stier, EMBL Heidelberg). Es scheint so, als gäben die hoch konservierten Domänen, die β CBD und die HMG-Box, den Lef/Tcfs ihre Struktur. Eine Interaktion mit einem ungefalteten Protein ist schwer möglich. Ein spezifischer Interaktionspartner, der innerhalb der CRD bindet, kann das nur, wenn das komplette Protein bereits mit β -Catenin oder der DNA interagiert hat. Da aber einzig die CRD als Bait diente, wurde so die Möglichkeit, eine Vielzahl an Interaktionspartnern zu finden unterbunden. Als Methode der Wahl, trotzdem neue Bindeproteine zu identifizieren bieten sich Tandem-Affinitätschromatographische Aufreinigungen mit anschließender massenspektrometrischer Analyse an.

6.3.1 Die Dynein leichte Kette 2 als Interaktionspartner von Tcf1 und Modulator des kanonischen Wnt-Signalweges

Die Dynein leichte Kette 2, im Folgenden mit DYNLL2 bezeichnet, trat als eindeutiger Interaktionspartner von Tcf1 aus der Hefe-2-Hybrid Analyse auf. DYNLL2 ist unter anderem Teil des cytoplasmatischen Dynein-Komplexes und damit Teil eines Transportkomplexes, der Richtung Minus-Ende des Mikrotubulus wandert (Akhmanova und Hammer, 2010, Hirokawa et al., 2010). Dynein-Komplexe werden in zwei Gruppen unterteilt, die axonemalen Dynein-Komplexe und die cytoplasmatischen Dynein-Komplexe (Höök und Vallee, 2006). Multimere Dynein-Komplexe bestehen aus schweren, mittel schweren, leicht schweren und leichten Untereinheiten (Vallee et al., 2004). Nichts davon spricht für die Interaktion mit einem Transkriptionsfaktor im Zellkern. Allerdings wurden durch das Hefe-2-Hybridsystem schon viele unerwartete Interaktionspartner nachgewiesen, deren Rollen im Wnt-Signalweg mittlerweile etabliert sind. Unter diesen Proteinen ist zum Beispiel Hic-5 (Hydrogen peroxide-induced clone-5), dessen Bindung an das alternativ gespleißte Exon4 zu einer Zielgenreprimierung führt (Ghogomu et al., 2006). Überraschend war sicher auch die Entdeckung, dass die beiden ATPasen Pontin und Reptin an β -Catenin binden und somit den kanonischen Wnt-Signalweg negativ beeinflussen (Bauer et al., 1998, Bauer et al., 2000). Sowohl die Analyse des Hefe-2-Hybridsystems als auch der Proximity Ligation Assay bestätigen DYNLL2 als Interaktionspartner von Tcf1. Eine Voraussetzung für die Interaktion mit dem

nukleären Tcf1 ist allerdings, dass DYNLL2 auch im Zellkern lokalisiert ist. Dass DYNLL2 nicht ausschließlich im Cytosol vorhanden ist, konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden. Zum einen zeigte die Immunfärbung deutlich, dass transfiziertes DYNLL2 homogen über die gesamte Zelle exprimiert wird. Zum anderen war die Interaktion mit Tcf1 im Proximity Ligation Assay ausschließlich auf den Nukleus begrenzt. Auch andere Arbeitsgruppen konnten DYNLL2 sowohl im Zellkern, als auch im Cytosol detektieren (Crépieux et al., 1997, Herzig et al., 2000, Kaiser et al., 2003).

Die auf den ersten Blick überraschende Interaktion von Tcf1 und DYNLL2 erscheint weniger überraschend, wenn man bedenkt, dass auch andere Transkriptionsfaktoren mit der Dynein leichten Kette 2 interagieren. NRF-1 (nuclear respiratory factor-1) und sein *Drosophila* Homolog EWG (erect wing gene) sind zwei davon (Herzig et al., 2000). Sie sind in Mitochondrien lokalisiert und beeinflussen dort die Aktivität und Regulation der Atmungskette (Herzig et al., 2000). Der TRPS1 Transkriptionsfaktor bindet an die GATA Konsensussequenz und unterdrückt damit die Expression GATA-regulierter Zielgene. Seine Interaktion mit DYNLL2 wurde ebenfalls durch das Hefe-2-Hybridensystem entdeckt und durch Ko-Immunopräzipitation in COS-1-Zellen bestätigt. Dort übt DYNLL2 eine aktivierende Funktion auf einen TRPS1-regulierten Promotor aus, was in diesem Fall bedeutet, dass es die Hemmung durch TRPS1 dosisabhängig unterdrückt (Kaiser et al., 2003). Die Funktionen von DYNLL2 sind also nicht ausschließlich auf den retrograden Transport von Vesikeln beschränkt. Hierfür spricht auch, dass DYNLL2 mit einem Mitglied der Bcl2 Familie interagiert, um Bim in seiner proapoptotischen Aktivität zu regulieren (Puthalakath et al., 1999). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass DYNLL2 die Aktivität des für den kanonischen Wnt-Weg spezifischen SuperTOPFlash-Reporters positiv beeinflussen kann (Abb.: 5.20 A). Überraschend daran ist nicht nur, dass nicht ausschließlich Tcf1 beeinflusst wird, sondern mit Ausnahme von Tcf4 alle Lef/Tcfs und dass DYNLL2 konstant die Funktion des jeweiligen Tcfs unterstützt (Abb.: 5.20 C). Für β -Catenin, Lef und Tcf1 induziert es eine stärkere Aktivierung, wogegen Tcf3 in der Reprimierung unterstützt wird. Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass DYNLL2 als eine Art Gerüstprotein funktioniert und somit die Bindung an die WREs verstärkt, womit es eine höhere Aktivierung/Reprimierung der Reporteraktivität in

Abhängigkeit des Lef/Tcfs fördert. Dies würde bedeuten, dass DYNLL2 eine ähnliche Rolle wie Legless/Bcl9 im Wnt-Signalweg einnehmen würde (Kramps et al., 2002, Städeli und Basler, 2005). Für TRPS1 wurde gezeigt, dass DYNLL2 die Bindung zwischen TRPS1 und der GATA Konsensussequenz schwächt (Kaiser et al., 2003). Da in der vorliegenden Arbeit die Wirkung der Lef/Tcfs durch DYNLL2 zunahm, muss hier davon ausgegangen werden, dass die Bindung an die DNA nicht geschwächt sondern verstärkt wurde. Dies wiederum lässt darauf schließen, dass DYNLL2 abhängig vom Transkriptionsfaktor und der DNA-Konsensussequenz deren Bindungsstärke beeinflussen kann. Inwiefern DYNLL2 tatsächlich mit der DNA interagiert und an welche DNA-Sequenzen es bindet, könnte durch DNase Footprinting Assays ermittelt werden. Zur weiteren Bestätigung dienen dann Chromatin-Immunopräzipitationen oder Electrophoretic Mobility Shift Assays (EMSA).

Obwohl für die Lef/Tcfs soweit einzig die Bindung an Tcf1 bestätigt wurde, kann nicht komplett ausgeschlossen werden, dass die anderen Lef/Tcfs nicht auch mit der Dynein leichten Kette 2 interagieren. Auf Grund der konformationslosen CRD-Domänen, also keine β -Faltblätter oder α -Helices, könnte eine Bindung der anderen Lef/Tcfs einzig nicht stark genug gewesen sein, um sämtliche Promotoren des Hefe-2-Hybridsystems zu aktivieren. In weiteren Untersuchungen sollte die mögliche Spezifität von DYNLL2 und Tcf1 im Vergleich zu den anderen Lef/Tcfs genauer untersucht werden. Da der PLA in diesem Labor zwischenzeitlich etabliert ist, kann die Interaktion von DYNLL2 mit den anderen drei Lef/Tcfs genauer analysiert werden.

Spannend bleibt zu untersuchen, inwieweit die nuklären Wnt-Mediatoren die Funktion der Dynein leichten Kette 2 beeinflussen können. Möglicherweise spielen diese Transkriptionsfaktoren eine Rolle in der Cilienbildung, welche bekanntermaßen der strengen Kontrolle des Wnt-Signalwegs unterliegt (Lancaster et al., 2011). Unter Umständen interagieren die Lef/Tcfs mit dem Dynein-Komplex und sind dadurch mit am retrograden Transport beteiligt. Da die allgemeinen Abläufe des retrograden Transports oder der Cilienbildung bereits bekannt sind, werden die Lef/Tcfs darauf eher eine modulierende denn eine essentielle Funktion ausüben. Für weitere

Untersuchungen der funktionalen Bedeutung der Interaktion von DYNLL2 mit den Lef/Tcfs während der frühen Embryonalentwicklung stehen nun Morpholino- und Rekonstitutionsexperimente in *Xenopus* Embryonen an. Auch könnte der Einfluss von DYNLL2 im Doppelachsen Assay und somit in mesodermalem Gewebe näher untersucht werden. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen darauf hin, dass es sich lohnen könnte, den Einfluss von DYNLL2 auf die nukleären Effektoren des Wnt-Signalwegs genauer zu untersuchen.

6.3.2 Die Phospholipid Scramblase 1 als Modulator des kanonischen Wnt-Signalwegs

Ähnlich überraschend wie die Entdeckung von DYNLL2 als Interaktionspartner von Tcf1 war die Entdeckung der Phospholipid Scramblase 1 als Interaktionspartner von Tcf4C. Die ursprünglich beschriebenen Funktionen der Phospholipid Scramblasen in der Regulation der Apoptose, der Blutgerinnung und der allgemeinen Umverteilung von Phospholipiden in der Plasmamembran (Schroit und Zwaal, 1991, Williamson et al., 1995, Yu et al., 2003) wurden in der Zwischenzeit ergänzt. Heute gelten die Scramblasen auch als Signalmoleküle (Bever und Williamson, 2010). So kann die Phospholipid Scramblase 1 an den Promotor des Inositol-1, 4, 5-triphosphat-Rezeptor Typ2 (IP3R2) binden und dessen Expression induzieren (Zhou et al., 2005). Der genaue Mechanismus der dahinter steckt ist allerdings noch nicht geklärt. In Verbindung mit Angiogenin, das ebenfalls an PLSCR1 bindet, konnte gezeigt werden, dass PLSCR1 positiv auf die Regulation der rRNA Synthese wirkt, dies allerdings nur in Verbindung mit Angiogenin, was für PLSCR1 als Ko-Aktivator spricht (Zhu et al., 2013). Somit kann PLSCR1 an Promotorsequenzen auf der DNA binden, wie es bei IP3R2 der Fall ist und in der Interaktion mit Angiogenin die rRNA Expression erhöhen. Eine Überschneidung mit Tcf4 liegt insofern vor, als die Expression beider Proteine, Phospholipid Scramblase 1 und Tcf4, in myeloiden Leukämiezellen stark erhöht vorliegt (Yokoyama et al., 2004, Sadras et al., 2014). In der vorliegenden Arbeit konnte weder die Lokalisation der PLSCR1 in der Ganzkeimfärbung, noch die subzelluläre Lokalisation in der Immunfärbung in transfizierten HeLa-Zellen detektiert werden. Es konnte allerdings gezeigt werden, dass die Phospholipid Scramblase 1 die Aktivität des SuperTOPFlash-Reporters signifikant reprimiert und so im kanonischen Wnt-Signalweg mitwirkt. Da die Interaktion von PLSCR1 mit Tcf4

oder einem anderen Lef/Tcf noch nicht in einem anderen unabhängigen System verifiziert wurde, ist es schwer zu sagen, inwiefern die PLSCR1 tatsächlich die nukleären Mediatoren des Wnt-Signalwegs beeinflusst. Möglicherweise bindet PLSCR1 direkt an Wnt-spezifische Konsensussequenzen und rekrutiert weitere Faktoren um die Zielgenaktivierung/ -reprimierung zu regulieren. Somit würde eine Konkurrenz um die DNA-Bindungsstelle zwischen den Lef/Tcfs und PLSCR1 entstehen. Eine direkte Interaktion scheint dafür nicht notwendig zu sein.

Um weitere Untersuchungen über die Phospholipid Scramblase 1 durchzuführen, sollte unbedingt erst die Interaktion mit Tcf4 und/oder einem der anderen Lef/Tcfs bestätigt werden. Dies könnte erneut durch den Proximity Ligation Assay verifiziert werden, oder durch Ko-Immunopräzipitationen. Auch funktionale Analysen in *Xenopus* sollten solange zurückgestellt werden, bis die physische Interaktion zwischen einem der Lef/Tcfs und PLSCR1 verifiziert wurde.

7. Literaturverzeichnis

- Aberle H, Bauer A, Stappert J, Kispert A, Kemler R** (1997) Beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J* **16**:3797-3804.
- Adamska M, Larroux C, Adamski M, Green K, Lovas E, Koop D, Richards GS, Zwafink C, Degnan BM** (2010) Structure and expression of conserved Wnt pathway components in the demosponge *Amphimedon queenslandica*. *Evol Dev* **12**:494-518.
- Adler PN** (2002) Planar signaling and morphogenesis in *Drosophila*. *Dev Cell* **2**: 525-535.
- Agarwal M, Kumar P, Mathew SJ** (2015) The Groucho/Transducin-like enhancer of split protein family in animal development. *IUBMB Life* **67**:472-481.
- Aihara H, Perrone L, Nibu Y** (2007) Transcriptional repression by the CtBP corepressor in *Drosophila*. In: GtBP Family Proteins, pp 18-27: *Springer* New York.
- Akhmanova A, Hammer I JA** (2010) Linking molecular motors to membrane cargo. *Curr Opin Cell Biol* **22**:479-487.
- Arce L, Yokoyama NN, Waterman ML** (2006) Diversity of LEF/TCF action in development and disease. *Oncogene* **25**:7492-7504.
- Archbold HC, Yang YX, Chen L, Cadigan KM** (2012) How do they do Wnt they do?: regulation of transcription by the Wnt/ β -catenin pathway. *Acta Physiol* **204**:74-109.
- Atcha FA, Munguia JE, Li TWH, Hovanes K, Waterman ML** (2003) A New β -catenin-dependent activation domain in t-cell factor. *J Biol Chem* **278**:16169-16175.
- Atcha FA, Syed A, Wu B, Hoverter NP, Yokoyama NN, Ting J-HT, Munguia JE, Mangalam HJ, Marsh JL, Waterman ML** (2007) A unique DNA binding domain converts t-cell factors into strong Wnt effectors. *Mol Cell Biol* **27**: 8352-8363.
- Axelrod JD** (2001) Unipolar membrane association of Dishevelled mediates Frizzled planar cell polarity signaling. *Genes Dev* **15**:1182-1187.
- Bastock R, Strutt H, Strutt D** (2003) Strabismus is asymmetrically localised and binds to Prickle and Dishevelled during *Drosophila* planar polarity patterning. *Development* **130**:3007-3014.
- Bauer A, Chauvet S, Huber O, Usseglio F, Rothbacher U, Aragnol D, Kemler R, Pradel J** (2000) Pontin52 and Reptin52 function as antagonistic regulators of β -catenin signalling activity. *EMBO J* **19**:6121-6130.
- Bauer A, Huber O, Kemler R** (1998) Pontin52, an interaction partner of β -catenin, binds to the TATA box binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 14787-14792.
- Behrens J, von Kries JP, Kühl M, Bruhn L, Wedlich D, Grosschedl R, Birchmeier W** (1996) Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature* **382**:638-642.
- Berasi SP, Xiu M, Yee AS, Paulson KE** (2004) HBP1 repression of the p47phox gene: cell cycle regulation via the NADPH oxidase. *Mol Cell Biol* **24**:3011-3024.
- Berriman M, Haas BJ, LoVerde PT, Wilson RA, Dillon GP, Cerqueira GC, Mashiyama ST, Al-Lazikani B, Andrade LF, Ashton PD, Aslett MA, Bartholomeu DC, Blandin G, Caffrey CR, Coghlan A, Coulson R, Day TA, Delcher A, DeMarco R, Djikeng A, Eyre T, Gamble JA, Ghedin E, Gu Y,**

- Hertz-Fowler C, Hirai H, Hirai Y, Houston R, Ivens A, Johnston DA, Lacerda D, Macedo CD, McVeigh P, Ning Z, Oliveira G, Overington JP, Parkhill J, Pertea M, Pierce RJ, Protasio AV, Quail MA, Rajandream M-A, Rogers J, Sajid M, Salzberg SL, Stanke M, Tivey AR, White O, Williams DL, Wortman J, Wu W, Zamanian M, Zerlotini A, Fraser-Liggett CM, Barrell BG, El-Sayed NM (2009) The genome of the blood fluke *Schistosoma mansoni*. *Nature* **460**:352-358.
- Bevers EM, Williamson PL (2010) Phospholipid scramblase: an update. *FEBS Lett* **584**:2724-2730.
- Bhambhani C, Chang JL, Akey DL, Cadigan KM (2011) The oligomeric state of CtBP determines its role as a transcriptional co-activator and co-repressor of Wingless targets. *EMBO J* **30**:2031-2043.
- Bhambhani C, Ravindranath AJ, Mentink RA, Chang MV, Betist MC, Yang YX, Koushika SP, Korswagen HC, Cadigan KM (2014) Distinct DNA binding sites contribute to the TCF transcriptional switch in *C. elegans* and *Drosophila*. *PLoS Genet* **10**.
- Bilić J, Huang Y-L, Davidson G, Zimmermann T, Cruciat C-M, Bienz M, Niehrs C (2007) Wnt induces LRP6 signalosomes and promotes Dishevelled-dependent LRP6 phosphorylation. *Science* **316**:1619-1622.
- Birnboim HC, Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**:1513-1523.
- Blair SS (1992) Shaggy (zeste-white 3) and the formation of supernumerary bristle precursors in the developing wing blade of *Drosophila*. *Dev Biol* **152**:263-278.
- Blauwkamp TA, Chang MV, Cadigan KM (2008) Novel TCF-binding sites specify transcriptional repression by Wnt signalling. *EMBO J* **27**:1436-1446.
- Brannon M, Brown JD, Bates R, Kimelman D, Moon RT (1999) XCtBP is a XTcf-3 co-repressor with roles throughout *Xenopus* development. *Development* **126**:3159-3170.
- Brannon M, Gomperts M, Sumoy L, Moon RT, Kimelman D (1997) A β -catenin/XTcf-3 complex binds to the siamois promoter to regulate dorsal axis specification in *Xenopus*. *Genes Dev* **11**:2359-2370.
- Brantjes H, Barker N, Van Es J, Clevers H (2005) TCF: Lady justice casting the final verdict on the outcome of Wnt signaling. *Biol Chem* **383**:225-261.
- Bruhn L, Munneryn A, Grosschedl R (1997) ALY, a context-dependent coactivator of LEF-1 and AML-1, is required for TCRalpha enhancer function. *Genes Dev* **11**:640-653.
- Brunner E, Peter O, Schweizer L, Basler K (1997) Pangolin encodes a Lef-1 homologue that acts downstream of Armadillo to transduce the Wingless signal in *Drosophila*. *Nature* **385**:829-833.
- Buechling T, Chaudhary V, Spirohn K, Weiss M, Boutros M (2011) p24 proteins are required for secretion of Wnt ligands. *EMBO Rep* **12**:1265-1272.
- Cadigan KM, Waterman ML (2012) TCF/LEFs and Wnt signaling in the nucleus. *CSH Perspect Biol* **4**.
- Campos-Ortega JA, Hartenstein V (1985) The embryonic development of *Drosophila melanogaster*. *Springer Verlag* Berlin.
- Carlsson P, Waterman ML, Jones KA (1993) The hLEF/TCF-1 alpha HMG protein contains a context-dependent transcriptional activation domain that induces the TCR alpha enhancer in T cells. *Genes Dev* **7**:2418-2430.

- Cavallo R, Cox R, Moline M, Roose J, Polevoy G, Clevers H, Peifer M, Bejsovec A** (1998) Drosophila Tcf and Groucho interact to repress Wingless signalling activity. *Nature* **395**:604 - 608.
- Cavallo R, Rubenstein D, Peifer M** (1997) Armadillo and dTCF: a marriage made in the nucleus. *Curr Opin Genet Dev* **7**:459-466.
- Chae J, Kim MJ, Goo JH, Collier S, Gubb D, Charlton J, Adler PN, Park WJ** (1999) The Drosophila tissue polarity gene starry night encodes a member of the protocadherin family. *Development* **126**:5421-5429.
- Chan S-K, Struhl G** (2002) Evidence that Armadillo transduces Wingless by mediating nuclear export or cytosolic activation of Pangolin. *Cell* **111**:265-280.
- Chang MV, Chang JL, Gangopadhyay A, Shearer A, Cadigan KM** (2008) Activation of Wingless targets requires bipartite recognition of DNA by TCF. *Curr Biol* **18**:1877-1881.
- Chen W-S, Antic D, Matis M, Logan CY, Povelones M, Anderson GA, Nusse R, Axelrod JD** (2008) Asymmetric homotypic interactions of the atypical Cadherin Flamingo mediate intercellular polarity signaling. *Cell* **133**:1093-1105.
- Chinnadurai G** (2007) Transcriptional regulation by C-terminal binding proteins. *Int J Biochem Cell Biol* **39**:1593-1607.
- Clevers H, Nusse R** (2012) Wnt/ β -catenin signaling and disease. *Cell* **149**:1192-1205.
- Cohen MJ, Yousef AF, Massimi P, Fonseca GJ, Todorovic B, Pelka P, Turnell AS, Banks L, Mymryk JS** (2013) Dissection of the C-terminal region of E1A redefines the roles of CtBP and other cellular targets in oncogenic transformation. *J Virol* **87**:10348-10355.
- Collier S, Gubb D** (1997) Drosophila tissue polarity requires the cell-autonomous activity of the fuzzy gene, which encodes a novel transmembrane protein. *Development* **124**:4029-4037.
- Costa ÂMS, Pereira-Castro I, Ricardo E, Spencer F, Fisher S, Costa LT** (2013) GRG5/AES interacts with t-cell factor 4 (TCF4) and downregulates Wnt signaling in human cells and zebrafish embryos. *PLoS ONE* **8**.
- Couso JP, Bishop SA, Martinez Arias A** (1994) The wingless signalling pathway and the patterning of the wing margin in Drosophila. *Development* **120**:621-636.
- Crépieux P, Kwon H, Leclerc N, Spencer W, Richard S, Lin R, Hiscott J** (1997) I kappaB alpha physically interacts with a cytoskeleton-associated protein through its signal response domain. *Mol Cell Biol* **17**:7375-7385.
- Daniels D, Weis W** (2005) Beta-catenin directly displaces Groucho/TLE repressors from Tcf/Lef in Wnt-mediated transcription activation. *Nat Struct Mol Biol* **12**:364 - 371.
- Dorsky RI, Itoh M, Moon RT, Chitnis A** (2003) Two tcf3 genes cooperate to pattern the zebrafish brain. *Development* **130**:1937-1947.
- Duval A, Rolland S, Tubacher E, Bui H, Thomas G, Hamelin R** (2000) The human t-cell transcription factor-4 gene: structure, extensive characterization of alternative splicings, and mutational analysis in colorectal cancer cell lines. *Cancer Res* **60**:3872-3879.
- Elfert S, Weise A, Bruser K, Biniossek ML, Jäggle S, Senghaas N, Hecht A** (2013) Acetylation of human TCF4 (TCF7L2) proteins attenuates inhibition by the HBP1 repressor and induces a conformational change in the TCF4:DNA complex. *PLoS ONE* **8**.

- Fang M, Li J, Blauwkamp T, Bhambhani C, Campbell N, Cadigan KM** (2006) C-terminal-binding protein directly activates and represses Wnt transcriptional targets in *Drosophila*. *EMBO J* **25**:2735-2745.
- Galceran J, Fariñas I, Depew MJ, Clevers H, Grosschedl R** (1999) Wnt3a^{-/-}-like phenotype and limb deficiency in Lef1^{-/-}Tcf1^{-/-} mice. *Genes Dev* **13**:709-717.
- Ghogomu S, van Venrooy S, Ritthaler M, Wedlich D, Gradl D** (2006) HIC-5 is a novel repressor of lymphoid enhancer factor/T-cell factor-driven transcription. *J Biol Chem* **281**:1755-1764.
- Giese K, Amsterdam A, Grosschedl R** (1991) DNA-binding properties of the HMG domain of the lymphoid-specific transcriptional regulator LEF-1. *Genes Dev* **5**:2567-2578.
- Giese K, Grosschedl R** (1993) LEF-1 contains an activation domain that stimulates transcription only in a specific context of factor-binding sites. *EMBO J* **12**:4667-4676.
- Gomarteli K** (2012) Alternative Varianten des Transkriptionsfaktors TCF4 in *Xenopus laevis*. Bachelorarbeit am Zoologischen Institut, Abteilung für Zell- und Entwicklungsbiologie. Karlsruher Institut für Technologie (KIT).
- Gradl D, König A, Wedlich D** (2002) Functional diversity of *Xenopus* lymphoid enhancer factor/T-cell factor transcription factors relies on combinations of activating and repressing elements. *J Biol Chem* **277**:14159-14171.
- Gradl D, Kühl M, Wedlich D** (1999) The Wnt/Wg signal transducer β -catenin controls fibronectin expression. *Mol Cell Biol* **19**:5576-5587.
- Graham TA, Ferkey DM, Mao F, Kimelman D, Xu W** (2001) Tcf4 can specifically recognize beta-catenin using alternative conformations. *Nat Struct Mol Biol* **8**:1048-1052.
- Graham TA, Weaver C, Mao F, Kimelman D, Xu W** (2000) Crystal structure of a β -catenin/Tcf complex. *Cell* **103**:885-896.
- Gregorieff A, Grosschedl R, Clevers H** (2004) Hindgut defects and transformation of the gastro-intestinal tract in Tcf4^{-/-}/Tcf1^{-/-} embryos. *EMBO J* **23**:1825-1833.
- Hamada F, Bienz M** (2004) The APC tumor suppressor binds to C-terminal binding protein to divert nuclear β -catenin from TCF. *Dev Cell* **7**:677-685.
- Hämmerlein A, Weiske J, Huber O** (2005) A second protein kinase CK1-mediated step negatively regulates Wnt signalling by disrupting the lymphocyte enhancer factor-1/ β -catenin complex. *Cell Mol Life Sci* **62**:606-618.
- Hasson P, Müller B, Basler K, Paroush Ze** (2001) Brinker requires two corepressors for maximal and versatile repression in Dpp signalling. *EMBO J* **20**:5725-5736.
- Hecht A, Stemmler MP** (2003) Identification of a promoter-specific transcriptional activation domain at the C-terminus of the Wnt effector protein t-cell factor 4. *J Biol Chem* **278**:3776-3785.
- Hecht A, Vleminckx K, Stemmler M, van Roy F, Kemler R** (2000) The p300/CBP acetyltransferases function as transcriptional coactivators of beta-catenin in vertebrates. *EMBO J* **19**:1839-1850.
- Herzig RP, Andersson U, Scarpulla RC** (2000) Dynein light chain interacts with NRF-1 and EWG, structurally and functionally related transcription factors from humans and *Drosophila*. *J Cell Sci* **113**:4263-4273.

- Hikasa H, Ezan J, Itoh K, Li X, Klymkowsky MW, Sokol SY** (2010) Regulation of TCF3 by Wnt-dependent phosphorylation during vertebrate axis specification. *Dev Cell* **19**:521-532.
- Hikasa H, Sokol SY** (2011) Phosphorylation of TCF proteins by homeodomain-interacting protein kinase 2. *J Biol Chem* **286**:12093-12100.
- Hirokawa N, Niwa S, Tanaka Y** (2010) Molecular motors in neurons: transport mechanisms and roles in brain function, development and disease. *Neuron* **68**:610-638.
- Hoeppner LH, Secreto F, Jensen ED, Li X, Kahler RA, Westendorf JJ** (2009) Runx2 and bone morphogenic protein 2 regulate the expression of an alternative Lef1 transcript during osteoblast maturation. *J Cell Physiol* **221**:480-489.
- Hoffmans R, Städeli R, Basler K** (2005) Pygopus and Legless provide essential transcriptional coactivator functions to Armadillo/ β -catenin. *Curr Biol* **15**:1207-1211.
- Höök P, Vallee RB** (2006) The dynein family at a glance. *J Cell Sci* **119**:4369-4371.
- Hoppler S, Kavanagh CL** (2007) Wnt signalling: variety at the core. *J Cell Sci* **120**:385-393.
- Hovanes K, Li T, Munguia J, Truong T, Milovanovic T, Lawrence Marsh J, Holcombe R, Waterman M** (2001) Beta-catenin-sensitive isoforms of lymphoid enhancer factor-1 are selectively expressed in colon cancer. *Nat Genet* **28**:53-57.
- Hovanes K, Li TWH, Waterman ML** (2000) The human LEF-1 gene contains a promoter preferentially active in lymphocytes and encodes multiple isoforms derived from alternative splicing. *Nucleic Acids Res* **28**:1994-2003.
- Hoverter NP, Zeller MD, McQuade MM, Garibaldi A, Busch A, Selwan EM, Hertel KJ, Baldi P, Waterman ML** (2014) The TCF c-clamp DNA binding domain expands the Wnt transcriptome via alternative target recognition. *Nucleic Acids Res* **42**:13615-13632.
- Huang S, Shetty P, Robertson SM, Lin R** (2007) Binary cell fate specification during *C. elegans* embryogenesis driven by reiterated reciprocal asymmetry of TCF POP-1 and its coactivator β -catenin SYS-1. *Development* **134**:2685-2695.
- Huber AH, Weis WI** (2001) The structure of the β -catenin/E-Cadherin complex and the molecular basis of diverse ligand recognition by β -catenin. *Cell* **105**:391-402.
- Huber O, Korn R, McLaughlin J, Ohsugi M, Herrmann BG, Kemler R** (1996) Nuclear localization of β -catenin by interaction with transcription factor LEF-1. *Mech Dev* **59**:3-10.
- Ishitani T, Ninomiya-Tsuji J, Matsumoto K** (2003) Regulation of lymphoid enhancer factor 1/t-cell factor by mitogen-activated protein kinase-related nemo-like kinase-dependent phosphorylation in Wnt/ β -catenin signaling. *Mol Cell Biol* **23**:1379-1389.
- Jennings BH, Ish-Horowicz D** (2008) The Groucho/TLE/Grg family of transcriptional co-repressors. *Genome Biol* **9**:205-205.
- Jessen S, Gu B, Dai X** (2008) Pygopus and the Wnt signaling pathway: a diverse set of connections. *Bio Essays* **30**:448-456.
- Jia Y, Nie F, Du A, Chen Z, Qin Y, Huang T, Song X, Li L** (2014) Thymine DNA glycosylase promotes transactivation of β -catenin/TCFs by cooperating with CBP. *J Mol Cell Biol* **6**:231-239.

- Kafka A, Bašić-Kinda S, Pećina-Šlaus N** (2014) The cellular story of dishevelleds. *Croat Med J* **55**:459-46667.
- Kaiser FJ, Tavassoli K, Van den Bemd G-J, Chang GTG, Horsthemke B, Möröy T, Lüdecke H-J** (2003) Nuclear interaction of the dynein light chain LC8a with the TRPS1 transcription factor suppresses the transcriptional repression activity of TRPS1. *Hum Mol Genet* **12**:1349-1358.
- Katoh M, Katoh M** (2007) WNT signaling pathway and stem cell signaling network. *Clin Cancer Res* **13**:4042-4045.
- Kaul AK, Schuster EF, Jennings BH** (2015) Recent insights into Groucho co-repressor recruitment and function. *Transcription* **6**:7-11.
- Kennell JA, O'Leary EE, Gummow BM, Hammer GD, MacDougald OA** (2003) T-cell factor 4N (TCF-4N), a novel isoform of mouse TCF-4, synergizes with β -catenin to coactivate C/EBP α and steroidogenic factor 1 transcription factors. *Mol Cell Biol* **23**:5366-5375.
- Kimelman D, Xu W** (2006) Beta-catenin destruction complex: insights and questions from a structural perspective. *Oncogene* **25**:7482-7491.
- King N, Westbrook MJ, Young SL, Kuo A, Abedin M, Chapman J, Fairclough S, Hellsten U, Isogai Y, Letunic I, Marr M, Pincus D, Putnam N, Rokas A, Wright KJ, Zuzow R, Dirks W, Good M, Goodstein D, Lemons D, Li W, Lyons JB, Morris A, Nichols S, Richter DJ, Salamov A, Sequencing JGI, Bork P, Lim WA, Manning G, Miller WT, McGinnis W, Shapiro H, Tjian R, Grigoriev IV, Rokhsar D** (2008) The genome of the choanoflagellate *Monosiga brevicollis* and the origin of metazoans. *Nature* **451**:783-788.
- Klingel S, Morath I, Strietz J, Menzel K, Holstein TW, Gradl D** (2012) Subfunctionalization and neofunctionalization of vertebrate Lef/Tcf transcription factors. *Dev Biol* **368**:44-53.
- Koenig SF, Brentle S, Hamdi K, Fichtner D, Wedlich D, Gradl D** (2010) En2, Pax2/5 and Tcf-4 transcription factors cooperate in patterning the *Xenopus* brain. *Dev Biol* **340**:318-328.
- Korinek V, Barker N, Moerer P, van Donselaar E, Huls G, Peters PJ, Clevers H** (1998a) Depletion of epithelial stem-cell compartments in the small intestine of mice lacking Tcf-4. *Nat Genet* **19**:379-383.
- Korinek V, Barker N, Morin PJ, van Wichen D, de Weger R, Kinzler KW, Vogelstein B, Clevers H** (1997) Constitutive transcriptional activation by a β -catenin-Tcf complex in APC^{-/-} colon carcinoma. *Science* **275**:1784-1787.
- Korinek V, Barker N, Willert K, Molenaar M, Roose J, Wagenaar G, Markman M, Lamers W, Destree O, Clevers H** (1998b) Two members of the tcf family implicated in Wnt/ β -catenin signaling during embryogenesis in the mouse. *Mol Cell Biol* **18**:1248-1256.
- Kramps T, Peter O, Brunner E, Nellen D, Froesch B, Chatterjee S, Murone M, Züllig S, Basler K** (2002) Wnt/Wingless signaling requires BCL9/Legless-mediated recruitment of Pygopus to the nuclear β -catenin-TCF complex. *Cell* **109**:47-60.
- Kumar V, Carlson JE, Ohgi KA, Edwards TA, Rose DW, Escalante CR, Rosenfeld MG, Aggarwal AK** (2002) Transcription corepressor CtBP is an NAD⁺-regulated dehydrogenase. *Mol Cell* **10**:857-869.
- Kunz M, Herrmann M, Wedlich D, Gradl D** (2004) Autoregulation of canonical Wnt signaling controls midbrain development. *Dev Biol* **273**:390-401.

- Labbé E, Letamendia A, Attisano L** (2000) Association of Smads with lymphoid enhancer binding factor 1/T cell-specific factor mediates cooperative signaling by the transforming growth factor- β and Wnt pathways. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**:8358-8363.
- Laemmli UK** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685.
- Lancaster MA, Schroth J, Gleeson JG** (2011) Subcellular spatial regulation of canonical Wnt signalling at the primary cilium. *Nat Cell Biol* **13**:700-707.
- Lawrence N, Dearden P, Hartley D, Roose J, Clevers H, Arias AM** (2000) dTcf antagonises Wingless signalling during the development and patterning of the wing in *Drosophila*. *Int J Dev Biol* **44**:749-756.
- Lee E, Salic A, Kirschner MW** (2001) Physiological regulation of β -catenin stability by Tcf3 and CK1 ϵ . *J Cell Biol* **154**:983-994.
- Li HY, El Yakoubi W, Shi L** (2015) Direct regulation of *siamois* by VegT is required for axis formation in *Xenopus* embryo. *Int J Dev Biol* In Press.
- Li J, Sutter C, Parker DS, Blauwkamp T, Fang M, Cadigan KM** (2007) CBP/p300 are bimodal regulators of Wnt signaling. *EMBO J* **26**:2284-2294.
- Li TWH, Ting J-HT, Yokoyama NN, Bernstein A, van de Wetering M, Waterman ML** (2006) Wnt activation and alternative promoter repression of LEF1 in colon cancer. *Mol Cell Biol* **26**:5284-5299.
- Lien W-H, Fuchs E** (2014) Wnt some lose some: transcriptional governance of stem cells by Wnt/ β -catenin signaling. *Genes Dev* **28**:1517-1532.
- Lim SK, Hoffmann FM** (2006) Smad4 cooperates with lymphoid enhancer-binding factor 1/T cell-specific factor to increase c-myc expression in the absence of TGF- β signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**:18580-18585.
- Lin H-C, Holland LZ, Holland ND** (2006) Expression of the AmphiTcf gene in amphioxus: insights into the evolution of the TCF/LEF gene family during vertebrate evolution. *Dev Dyn* **235**:3396-3403.
- Lin R, Hill RJ, Priess JR** (1998) POP-1 and anterior-posterior fate decisions in *C. elegans* embryos. *Cell* **92**:229-239.
- Lin R, Thompson S, Priess JR** (1995) Pop-1 encodes an HMG box protein required for the specification of a mesoderm precursor in early *C. elegans* embryos. *Cell* **83**:599-609.
- Liu B, Shats I, Angus SP, Gatza ML, Nevins JR** (2013) Interaction of E2F7 transcription factor with E2F1 and C-terminal-binding Protein (CtBP) provides a mechanism for E2F7-dependent transcription repression. *J Biol Chem* **288**:24581-24589.
- Liu C, Li Y, Semenov M, Han C, Baeg G-H, Tan Y, Zhang Z, Lin X, He X** (2002) Control of β -catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism. *Cell* **108**:837-847.
- Liu F, van den Broek O, Destrée O, Hoppler S** (2005) Distinct roles for *Xenopus* Tcf/Lef genes in mediating specific responses to Wnt/ β -catenin signalling in mesoderm development. *Development* **132**:5375-5385.
- Livak KJ, Schmittgen TD** (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* **25**:402-408.
- Lo M-C, Gay F, Odom R, Shi Y, Lin R** (2004) Phosphorylation by the β -catenin/MAPK complex promotes 14-3-3-mediated nuclear export of TCF/POP-1 in signal-responsive cells in *C. elegans*. *Cell* **117**:95-106.

- Logan CY, Nusse R** (2004) The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* **20**:781-810.
- Love JJ, Li X, Case DA, Giese K, Crosschedl R, Wright PE** (1995) Structural basis for DNA bending by the architectural transcription factor LEF-1. *Nature* **376**:791-795.
- Love JJ, Li X, Chung J, Dyson HJ, Wright PE** (2004) The LEF-1 high-mobility group domain undergoes a disorder-to-order transition upon formation of a complex with cognate DNA. *Biochemistry* **43**:8725-8734.
- Lu Q, Schafer DA, Adler PN** (2015) The Drosophila planar polarity gene multiple wing hairs directly regulates the actin cytoskeleton. *Development* **142**:2478-2486.
- MacDonald BT, He X** (2012) Frizzled and LRP5/6 receptors for Wnt/ β -catenin signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **4**.
- Mace K, Tugores A** (2004) The product of the split ends gene is required for the maintenance of positional information during Drosophila development. *BMC Dev Biol* **4**:15-15.
- Maher MT, Mo R, Flozak AS, Peled ON, Gottardi CJ** (2010) β -catenin phosphorylated at serine 45 is spatially uncoupled from β -catenin phosphorylated in the GSK3 domain: implications for signaling. *PLoS ONE* **5**.
- Mahmoudi T, Li VSW, Ng SS, Taouatas N, Vries RGJ, Mohammed S, Heck AJ, Clevers H** (2009) The kinase TNIK is an essential activator of Wnt target genes. *EMBO J* **28**:3329-3340.
- Matthews BJ, Corty MM, Grueber WB** (2008) Of cartridges and columns: new roles for Cadherins in visual system development. *Neuron* **58**:1-3.
- McNeill H, Woodgett JR** (2010) When pathways collide: collaboration and connivance among signaling proteins in development. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**:404-413.
- Minde DP, Anvarian Z, Rüdiger SGD, Maurice MM** (2011) Messing up disorder: how do missense mutations in the tumor suppressor protein APC lead to cancer? *Mol Cancer* **10**:101-101.
- Miravet S, Piedra J, Miró F, Itarte E, García de Herreros A, Duñach M** (2002) The transcriptional factor Tcf-4 contains different binding sites for β -catenin and plakoglobin. *J Biol Chem* **277**:1884-1891.
- Molenaar M, van de Wetering M, Oosterwegel M, Peterson-Maduro J, Godsave S, Korinek V, Roose J, Destree O, Clevers H** (1996) XTcf-3 transcription factor mediates β -catenin-induced axis formation in *Xenopus* embryos. *Cell* **86**:391-399.
- Morata G, Lawrence PA** (1977) The development of wingless, a homeotic mutation of *Drosophila*. *Dev Biol* **56**:227-240.
- Mosimann C, Hausmann G, Basler K** (2009) Beta-catenin hits chromatin: regulation of Wnt target gene activation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**:276-286.
- Najdi R, Syed A, Arce L, Theisen H, Ting J-HT, Atcha F, Nguyen AV, Martinez M, Holcombe RF, Edwards RA, Marsh JL, Waterman ML** (2009) A Wnt-kinase network alters nuclear localization of TCF-1 in colon cancer. *Oncogene* **28**:4133-4146.
- Nguyen H, Merrill BJ, Polak L, Nikolova M, Rendl M, Shaver TM, Pasolli HA, Fuchs E** (2009) Tcf3 and Tcf4 are essential for long-term homeostasis of skin epithelia. *Nat Genet* **41**:1068-1075.

- Nibu Y, Zhang H, Levine M** (1998) Interaction of short-range repressors with Drosophila CtBP in the embryo. *Science* **280**:101-104.
- Nieuwkoop PD, Faber J** (1967) Normtabelle von *Xenopus laevis*. North Holland Biomedical Press, Amsterdam.
- Nishita M, Hashimoto MK, Ogata S, Laurent MN, Ueno N, Shibuya H, Cho K W Y** (2000) Interaction between Wnt and TGF-beta signalling pathways during formation of Spemann's organizer. *Nature* **403**:781-785.
- Nishita M, Itsukushima S, Nomachi A, Endo M, Wang Z, Inaba D, Qiao S, Takada S, Kikuchi A, Minami Y** (2010) Ror2/Frizzled complex mediates Wnt5a-induced AP-1 activation by regulating Dishevelled polymerization. *Mol Cellular Biol* **30**:3610-3619.
- Oishi I, Suzuki H, Onishi N, Takada R, Kani S, Ohkawara B, Koshida I, Suzuki K, Yamada G, Schwabe GC, Mundlos S, Shibuya H, Takada S, Minami Y** (2003) The receptor tyrosine kinase Ror2 is involved in non-canonical Wnt5a/JNK signalling pathway. *Genes to Cells* **8**:645-654.
- Omer CA, Miller PJ, Diehl RE, Kral AM** (1999) Identification of Tcf4 residues involved in high-affinity β -catenin binding. *Biochem Biophys Res Commun* **256**:584-590.
- Oosterwegel M, van de Wetering M, Dooijes D, Klomp L, Winoto A, Georgopoulos K, Meijlink F, Clevers H** (1991) Cloning of murine TCF-1, a T cell-specific transcription factor interacting with functional motifs in the CD3-epsilon and T cell receptor alpha enhancers. *J Exp Med* **173**:1133-1142.
- Park J-i, Kim SW, Lyons JP, Ji H, Nguyen TT, Cho K, Barton MC, Deroo T, Vleminckx K, McCrea PD** (2005) Kaiso/p120-catenin and TCF/ β -catenin complexes coordinately regulate canonical Wnt gene targets. *Dev Cell* **8**: 843-854.
- Patel J, Baranwal S, Love IM, Patel NJ, Grossman SR, Patel BP** (2014) Inhibition of C-terminal binding protein attenuates transcription factor 4 signaling to selectively target colon cancer stem cells. *Cell Cycle* **13**:3506-3518.
- Phillips RG, Whittle JR** (1993) Wingless expression mediates determination of peripheral nervous system elements in late stages of Drosophila wing disc development. *Development* **118**:427-438.
- Phippen TM, Sweigart AL, Moniwa M, Krumm A, Davie JR, Parkhurst SM** (2000) Drosophila C-terminal binding protein functions as a context-dependent transcriptional co-factor and interferes with both Mad and Groucho transcriptional repression. *J Biol Chem* **275**:37628-37637.
- Poortinga G, Watanabe M, Parkhurst SM** (1998) Drosophila CtBP: a Hairy-interacting protein required for embryonic segmentation and hairy-mediated transcriptional repression. *EMBO J* **17**:2067-2078.
- Poy F, Lepourcelet M, Shivdasani RA, Eck MJ** (2001) Structure of a human Tcf4-beta-catenin complex. *Nat Struct Mol Biol* **8**:1053-1057.
- Pukrop T, Gradl D, Henningfeld KA, Knöchel W, Wedlich D, Kühl M** (2001) Identification of two regulatory elements within the high mobility group box transcription factor XTcf-4. *J Biol Chem* **276**:8968-8978.
- Puthalakath H, Huang DCS, O'Reilly LA, King SM, Strasser A** (1999) The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex. *Mol Cell* **3**:287-296.

- Ravindranath A, Cadigan KM** (2014) Structure-function analysis of the c-clamp of TCF/Pangolin in Wnt/ β -catenin signaling. *PLoS ONE* **9**.
- Reya T, Clevers H** (2005) Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature* **434**: 843-850.
- Riese J, Yu X, Munneryn A, Eresh S, Hsu S-C, Grosschedl R, Bienz M** (1997) LEF-1, a nuclear factor coordinating signaling inputs from wingless and decapentaplegic. *Cell* **88**:777-787.
- Rigo-Watermeier T, Kraft B, Ritthaler M, Wallkamm V, Holstein T, Wedlich D** (2012) Functional conservation of Nematostella Wnts in canonical and non-canonical Wnt-signaling. *Biol Open* **1**:43-51.
- Robertson SM, Lo M-C, Odom R, Yang X-D, Medina J, Huang S, Lin R** (2011) Functional analyses of vertebrate TCF proteins in *C. elegans* embryos. *Dev Biol* **355**:115-123.
- Rocheleau CE, Yasuda J, Shin TH, Lin R, Sawa H, Okano H, Priess JR, Davis RJ, Mello CC** (1999) WRM-1 activates the LIT-1 protein kinase to transduce anterior/posterior polarity signals in *C. elegans*. *Cell* **97**:717-726.
- Roël G, van den Broek O, Spieker N, Peterson-Maduro J, Destrée O** (2003) Tcf-1 expression during *Xenopus* development. *Gene Expr Patterns* **3**:123-126.
- Rohrmayr M** (2014) Identifizierung neuer Interaktionspartner der Lef/Tcf Transkriptionsfaktoren. Bachelorarbeit am Zoologischen Institut, Abteilung für Zell- und Entwicklungsbiologie. Karlsruher Institut für Technologie (KIT).
- Roose J, Huls G, Van Beest M, Moerer P, van der Horn K, Goldschmeding R, Logtenberg T, Clevers H** (1999) Synergy between tumorsuppressor APC and the beta-catenin-Tcf4 target Tcf1. *Science* **285**:1923-1926.
- Roth W, Sustmann C, Kieslinger M, Gilmozzi A, Irmer D, Kremmer E, Turck C, Grosschedl R** (2004) PIASy-deficient mice display modest defects in IFN and Wnt signaling. *J Immunol* **173**:6189-6199.
- Sachdev S, Bruhn L, Sieber H, Pichler A, Melchior F, Grosschedl R** (2001) PIASy, a nuclear matrix-associated SUMO E3 ligase, represses LEF1 activity by sequestration into nuclear bodies. *Genes Dev* **15**:3088-3103.
- Sadras T, Perugini M, Kok CH, Iarossi DG, Heatley SL, Brumatti G, Samuel MS, To LB, Lewis ID, Lopez AF, Ekert PG, Ramshaw HS, D'Andrea RJ** (2014) Interleukin-3-mediated regulation of β -catenin in myeloid transformation and acute myeloid leukemia. *J Leukoc Biol* **96**:83-91.
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N** (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**:1350-1354.
- Salic A, Lee E, Mayer L, Kirschner MW** (2000) Control of β -catenin stability. *Mol Cell* **5**:523-532.
- Sampson EM, Haque ZK, Ku M-C, Tevosian SG, Albanese C, Pestell RG, Paulson K, Yee AS** (2001) Negative regulation of the Wnt- β -catenin pathway by the transcriptional repressor HBP1. *EMBO J* **20**:4500-4511.
- Sander V, Eivers E, Choi RH, De Robertis EM** (2010) *Drosophila* Smad2 opposes Mad signaling during wing vein development. *PLoS ONE* **5**.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR** (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**:5463-5467.

- Satow R, Shitashige M, Jigami T, Honda K, Ono M, Hirohashi S, Yamada T** (2010) Traf2- and Nck-interacting kinase is essential for canonical Wnt signaling in *Xenopus* axis formation. *J Biol Chem* **285**:26289-26294.
- Schaeper U, Boyd JM, Verma S, Uhlmann E, Subramanian T, Chinnadurai G** (1995) Molecular cloning and characterization of a cellular phosphoprotein that interacts with a conserved C-terminal domain of adenovirus E1A involved in negative modulation of oncogenic transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**:10467-10471.
- Schroeder A, Mueller O, Stocker S, Salowsky R, Leiber M, Gassmann M, Lightfoot S, Menzel W, Granzow M, Ragg T** (2006) The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol Biol* **7**:3-3.
- Schroit AJ, Zwaal RFA** (1991) Transbilayer movement of phospholipids in red cell and platelet membranes. *BBA Biomembranes* **1071**:313-329.
- Schweizer L, Nellen D, Basler K** (2003) Requirement for Pangolin/dTCF in *Drosophila* Wingless signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:5846-5851.
- Shah M, Rennoll SA, Raup-Konsavage WM, Yochum GS** (2015) A dynamic exchange of Tcf3 and Tcf4 transcription factors controls MYC expression in colorectal cancer cells. *Cell Cycle* **14**:323-332.
- Sharma RP, Chopra VL** (1976) Effect of the Wingless (*wg1*) mutation on wing and haltere development in *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol* **48**:461-465.
- Shitashige M, Satow R, Jigami T, Aoki K, Honda K, Shibata T, Ono M, Hirohashi S, Yamada T** (2010) Traf2- and Nck-interacting kinase is essential for Wnt signaling and colorectal cancer growth. *Cancer Res* **70**:5024-5033.
- Shou J, Jing J, Xie J, You L, Jing Z, Yao J, Han W, Pan H** (2015) Nuclear factor of activated t-cells in cancer development and treatment. *Cancer Lett* **361**:174-184.
- Sierra J, Yoshida T, Joazeiro C, Jones K** (2006a) The APC tumor suppressor counteracts beta-catenin activation and H3K4 methylation at Wnt target genes. *Genes Dev* **20**:586-600.
- Smit L, Baas A, Kuipers J, Korswagen H, van de Wetering M, Clevers H** (2004) Wnt activates the Tak1/nemo-like kinase pathway. *J Biol Chem* **279**:17232-17240.
- Snow JW, Kim J, Currie CR, Xu J, Orkin SH** (2010) Sumoylation regulates interaction of FOG1 with C-terminal-binding protein (CTBP). *J Biol Chem* **285**:28064-28075.
- Song H, Goetze S, Bischof J, Spichiger-Haeusermann C, Kuster M, Brunner E, Basler K** (2010) Coop functions as a corepressor of Pangolin and antagonizes Wingless signaling. *Genes Dev* **24**:881-886.
- Spink KE, Fridman SG, Weis WI** (2001) Molecular mechanisms of β -catenin recognition by adenomatous polyposis coli revealed by the structure of an APC- β -catenin complex. *EMBO J* **20**:6203-6212.
- St Johnston D** (2002) The art and design of genetic screens: *Drosophila melanogaster*. *Nat Rev Genet* **3**:176-188.
- Staal FJT, Clevers H** (2001) Tcf/Lef transcription factors during t-cell development: unique and overlapping functions. *Hematol J* **1**:3-6.

- Städeli R, Basler K** (2005) Dissecting nuclear Wingless signalling: recruitment of the transcriptional co-activator Pygopus by a chain of adaptor proteins. *Mech Dev* **122**:1171-1182.
- Strutt DI** (2001) Asymmetric localization of Frizzled and the establishment of cell polarity in the Drosophila wing. *Mol Cell* **7**:367-375.
- Strutt DI, Weber U, Mlodzik M** (1997) The role of RhoA in tissue polarity and Frizzled signalling. *Nature* **387**:292-295.
- Sun J, Weis WI** (2011) Biochemical and structural characterization of β -catenin interactions with nonphosphorylated and CK2-phosphorylated Lef-1. *J Mol Biol* **405**:519-530.
- Taelman VF, Dobrowolski R, Plouhinec J-L, Fuentealba LC, Vorwald PP, Gumper I, Sabatini DD, De Robertis EM** (2010) Wnt signaling requires the sequestration of glycogen synthase kinase 3 inside multivesicular endosomes. *Cell* **143**:1136-1148.
- Tahinci E, Symes K** (2003) Distinct functions of Rho and Rac are required for convergent extension during Xenopus gastrulation. *Dev Biol* **259**:318-335.
- Takada K, Zhu D, Bird GH, Sukhdeo K, Zhao J-J, Mani M, Lemieux M, Carrasco DE, Ryan J, Horst D, Fulciniti M, Munshi NC, Xu W, Kung AL, Shivdasani RA, Walensky LD, Carrasco DR** (2012) Targeted disruption of the BCL9/ β -catenin complex inhibits oncogenic Wnt signaling. *Sci Transl Med* **4**.
- Takamaru K-I, Moon RT** (2000) The transcriptional coactivator Cbp interacts with β -catenin to activate gene expression. *J Cell Biol* **149**:249-254.
- Theil T, Aydin S, Koch S, Grotewold L, Rütther U** (2002) Wnt and Bmp signalling cooperatively regulate graded Emx2 expression in the dorsal telencephalon. *Development* **129**:3045-3054.
- Thompson B, Townsley F, Rosin-Arbesfeld R, Musisi H, Bienz M** (2002) A new nuclear component of the Wnt signalling pathway. *Nat Cell Biol* **4**:367-373.
- Thorpe CJ, Moon RT** (2004) Nemo-like kinase is an essential co-activator of Wnt signaling during early zebrafish development. *Development* **131**:2899-2909.
- Tomimaru Y, Xu CQ, Nambotin SB, Yan T, Wands JR, Kim M** (2013) Loss of exon 4 in a human t-cell factor-4 isoform promotes hepatic tumorigenicity. *Liver Int* **33**:1536-1548.
- Travis A, Amsterdam A, Belanger C, Grosschedl R** (1991) LEF-1, a gene encoding a lymphoid-specific protein with an HMG domain, regulates t-cell receptor alpha enhancer function. *Genes Dev* **5**:880-894.
- Vacik T, Stubbs JL, Lemke G** (2011) A novel mechanism for the transcriptional regulation of Wnt signaling in development. *Genes Dev* **25**:1783-1795.
- Valenta T, Lukas J, Korinek V** (2003) HMG box transcription factor TCF-4's interaction with CtBP1 controls the expression of the Wnt target Axin2/Conductin in human embryonic kidney cells. *Nucleic Acids Res* **31**:2369-2380.
- Vallee RB, Williams JC, Varma D, Barnhart LE** (2004) Dynein: an ancient motor protein involved in multiple modes of transport. *J Neurobiol* **58**:189-200.
- van Beest M, Dooijes D, van de Wetering M, Kjaerulff S, Bonvin A, Nielsen O, Clevers H** (2000) Sequence-specific HMG box factors recognize 10-12 base pair minor groove motifs. *J Biol Chem* **275**:27266-27273.

- van de Wetering M, Castrop J, Korinek V, Clevers H** (1996) Extensive alternative splicing and dual promoter usage generate Tcf-1 protein isoforms with differential transcription control properties. *Mol Cell Biol* **16**:745-752.
- van de Wetering M, Cavallo R, Dooijes D, van Beest M, van Es J, Loureiro J, Ypma A, Hursh D, Jones T, Bejsovec A, Peifer M, Mortin M, Clevers H** (1997) Armadillo coactivates transcription driven by the product of the *Drosophila* segment polarity gene dTCF. *Cell* **88**:789-799.
- van de Wetering M, Oosterwegel M, Dooijes D, Clevers H** (1991) Identification and cloning of TCF-1, a T lymphocyte-specific transcription factor containing a sequence-specific HMG box. *EMBO J* **10**:123-132.
- van de Wetering M, Oosterwegel M, Holstege F, Dooyes D, Suijkerbuijk R, Geurts van Kessel A, Clevers H** (1992) The human t cell transcription factor-1 gene. Structure, localization, and promoter characterization. *J Biol Chem* **267**:8530-8536.
- van de Wetering M, Oosterwegel M, van Norren K, Clevers H** (1993) Sox-4, an Sry-like HMG box protein, is a transcriptional activator in lymphocytes. *EMBO J* **12**:3847-3854.
- van Houte L, van Oers A, van de Wetering M, Dooijes D, Kaptein R, Clevers H** (1993) The sequence-specific high mobility group 1 box of TCF-1 adopts a predominantly alpha-helical conformation in solution. *J Biol Chem* **268**:18083-18087.
- van Venrooy S, Fichtner D, Kunz M, Wedlich D, Gradl D** (2008) Cold-inducible RNA binding protein (CIRP), a novel XTcf-3 specific target gene regulates neural development in *Xenopus*. *BMC Dev Biol* **8**:77.
- Veien ES, Grierson MJ, Saund RS, Dorsky RI** (2005) Expression pattern of zebrafish *tcf7* suggests unexplored domains of Wnt/ β -catenin activity. *Dev Dynam* **233**:233-239.
- Verbeek S, Izon D, Hofhuis F, Robanus-Maandag E, te Riele H, Watering Mvd, Oosterwegel M, Wilson A, Robson MacDonald H, Clevers H** (1995) An HMG-box-containing t-cell factor required for thymocyte differentiation. *Nature* **374**:70-74.
- Vinson CR, Adler PN** (1987) Directional non-cell autonomy and the transmission of polarity information by the frizzled gene of *Drosophila*. *Nature* **329**:549-551.
- Wallmen B, Schrempp M, Hecht A** (2012) Intrinsic properties of Tcf1 and Tcf4 splice variants determine cell-type-specific Wnt/ β -catenin target gene expression. *Nucleic Acids Res* **40**:9455-9469.
- Waltzer L, Bienz M** (1998) *Drosophila* CBP represses the transcription factor TCF to antagonize Wingless signalling. *Nature* **395**:521-525.
- Wang S, Jones KA** (2006) CK2 controls the recruitment of Wnt regulators to target genes in vivo. *Curr Biol* **16**:2239-2244.
- Weise A, Bruser K, Elfert S, Wallmen B, Wittel Y, Wöhrle S, Hecht A** (2010) Alternative splicing of Tcf7l2 transcripts generates protein variants with differential promoter-binding and transcriptional activation properties at Wnt/ β -catenin targets. *Nucleic Acids Res* **38**:1964-1981.
- Williamson P, Bevers EM, Smeets EF, Comfurius P, Schlegel RA, Zwaal RFA** (1995) Continuous analysis of the mechanism of activated transbilayer lipid movement in platelets. *Biochemistry* **34**:10448-10455.

- Winter CG, Wang B, Ballew A, Royou A, Karess R, Axelrod JD, Luo L** (2001) Drosophila Rho-associated kinase (Drok) links Frizzled-mediated planar cell polarity signaling to the actin cytoskeleton. *Cell* **105**:81-91.
- Yamada M, Ohnishi J, Ohkawara B, Iemura S, Satoh K, Hyodo-Miura J, Kawachi K, Natsume T, Shibuya H** (2006) NARF, an nemo-like kinase (NLK)-associated ring finger protein regulates the ubiquitylation and degradation of t-cell factor/lymphoid enhancer factor (TCF/LEF). *J Biol Chem* **281**:20749-20760.
- Yamamoto H, Ihara M, Matsuura Y, Kikuchi A** (2003) Sumoylation is involved in β -catenin-dependent activation of Tcf-4. *EMBO J* **22**:2047-2059.
- Yi F, Pereira L, Hoffman JA, Shy BR, Yuen CM, Liu DR, Merrill BJ** (2011) Opposing effects of Tcf3 and Tcf1 control Wnt stimulation of embryonic stem cell self-renewal. *Nat Cell Biol* **13**:762-770.
- Yokoyama A, Yamashita T, Shiozawa E, Nagasawa A, Okabe-Kado J, Nakamaki T, Tomoyasu S, Kimura F, Motoyoshi K, Honma Y, Kasukabe T** (2004) MmTRA1b/phospholipid scramblase 1 gene expression is a new prognostic factor for acute myelogenous leukemia. *Leukemia Res* **28**:149-157.
- Yost C, Torres M, Miller JR, Huang E, Kimelman D, Moon RT** (1996) The axis-inducing activity, stability, and subcellular distribution of beta-catenin is regulated in *Xenopus* embryos by glycogen synthase kinase 3. *Genes Dev* **10**:1443-1454.
- Yu A, McMaster CR, Byers** (2003) Stimulation of phosphatidylserin biosynthesis and facilitation of UV-induced apoptosis in chinese hamster ovary cells overexpressing phospholipid scramblase 1. *J Biol Chem* **278**:9706-9714.
- Zecca M, Basler K, Struhl G** (1996) Direct and long-range action of a Wingless morphogen gradient. *Cell* **87**:833-844.
- Zeng X, Huang H, Tamai K, Zhang X, Harada Y, Yokota C, Almeida K, Wang J, Doble B, Woodgett J, Wynshaw-Boris A, Hsieh J-C, He X** (2008a) Initiation of Wnt signaling: control of Wnt coreceptor Lrp6 phosphorylation/activation via frizzled, dishevelled and axin functions. *Development* **135**:367-375.
- Zeng YA, Rahnama M, Wang S, Lee W, Verheyen EM** (2008b) Inhibition of *Drosophila* Wg signaling involves competition between Mad and Armadillo/ β -catenin for dTcf binding. *PLoS ONE* **3**.
- Zeng YA, Verheyen EM** (2004) Nemo is an inducible antagonist of Wingless signaling during *Drosophila* wing development. *Development* **131**:2911-2920.
- Zhang CU, Blauwkamp TA, Burby PE, Cadigan KM** (2014) Wnt-mediated repression via bipartite DNA recognition by TCF in the *Drosophila* hematopoietic system. *PLoS Genet* **10**.
- Zhou Q, Ben-Efraim I, Bigcas J-L, Junqueira D, Wiedmer T, Sims PJ** (2005) Phospholipid scramblase 1 binds to the promoter region of the inositol 1,4,5-triphosphate receptor type 1 gene to enhance its expression. *J Biol Chem* **280**:35062-35068.
- Zhu J, Sheng J, Dong H, Kang L, Ang J, Xu Z** (2013) Phospholipid scramblase 1 functionally interacts with angiogenin and regulates angiogenin-enhanced rRNA transcription. *Cell Physiol Biochem* **32**:1695-1706.

8. Anhang

8.1 Liste der verwendeten Abkürzungen

| | |
|------------|--|
| (v/v) | Volumen/Volumen Verhältnis |
| (w/v) | Gewichts/Volumen Verhältnis |
| A. bidest. | bidestilliertes Wasser |
| <i>att</i> | Attachement sites, Attenuierungsstellen |
| APC | Adenomatous Polyposis Coli |
| AS | Aminosäure |
| βCBD | β-Catenin Bindedomäne |
| Bcl9 | B-cell lymphoma 9 |
| CaMKII | Calcium-abhängige Calmodulin Kinase II |
| CBP/p300 | CREB binding protein/E1A-Binding protein 300 kDa |
| Cirp | Cold inducible RNA binding protein |
| CK | Casein Kinase |
| CRD | Context-dependent regulatory domain, kontext-abhängige regulatorische Domäne |
| CtBP | C-terminal binding protein, C-terminales Bindeprotein |
| Coop | Co-Repressor of Pangolin |
| dll | Distalless |
| dTcf | <i>Drosophila melanogaster</i> Tcf |
| DYNLL2 | Dynein leichte Kette 8 Typ 2 |
| Dvl | Dishevelled |
| eGFP | Enhanced green fluorescent protein, intensiv grün fluoreszierendes Protein |
| FCS | Fetal Calf Serum, Fötale Kälberserum |
| GSK3β | Glykogen Synthase Kinase 3β |
| Hic-5 | Hydrogen peroxide-induced clone 5 |
| HIPK | Homeodomain interacting protein kinase |
| HMG | High Mobility Group Box |
| IHF | Integration Host Factor aus <i>E. coli</i> |
| cJUNK | c-Jun N-terminale Kinase |
| Lef | Lymphoid enhancer binding factor 1 |
| LRP | Low Density Lipoprotein Receptor Related Protein |
| Pan | Pangolin |
| PanRNAi | Pangolin RNA Interferenz |
| PCP | Planar Cell Polarity, Planare Zellpolarität |
| PLA | Proximity Ligation Assay |
| PLSCR1 | Phospholipid Scramblase 1 |
| Pop-1 | Posterior pharynx defect-1 (<i>Caenorhabditis elegans</i> Tcf) |
| Tcf | T-cell factor, T-Zell Faktor |

| | |
|-----|-----------------------------------|
| TLE | Transducin Like Enhancer of split |
| UAS | Upstream activating sequence |
| Wnt | Wingless/Int-related-1 |
| Wg | Wingless |
| WRE | Wnt-responsives Element |

8.2 Aminosäuresequenz der für das Hefe-2-Hybridsystem verwendeten Baits

Tcf4 E-Tail (AS: 434-634)

QQGEANEHSECYLNPCLSLPPITDLSAPKKCRARFGIDQQNNWCGPCRRKKKCIRYIQEGGS
 CVSPSSDGSLLDSPSSPAMPDSPISDSKPQTEQTQPLSLTLKPDPLTRICGTHSPLAESPVR
 RPNTLAAAICHNGAELSHPHNSLPSSLHSSLHSSLHSSLPYLSLSTQPSTSFPLSHRSLVATQL
 QPLSLVTKPLE

Lef CRD (AS: 67-260)

PSSNSHEISRRRLDSYHEKSREHPEDAGKHPDGGLYSKGPSYTGYPYIMMPNMNNEPYMS
 NGLSPPIPRTSNKVPVVQPSHAVHPLTPLITYSDEHFAPGVHPSHIPSDINTKQGMHRHPQ
 APDLPTFYPMSPGSVGQMTPLGWYPHMHVSGPPGPHATGIPHPAIVNPQVKQEHSNDH
 DLMHMKPHHEQ

Tcf1 CRD (AS: 55 – 239)

SHPRVPETHPEAIRRAQDVQLVYQDKFSAHMEDGIKHQDEGMYKGSYGYPPFLMLSDPYL
 SNGSVSALS NKVPVVQPSHGVHPLIPYNSEFSHSGHSPHLPVDLNQKQGVHRPSQTPDVPT
 FYPLPSGGVGQISPSMGWFPHPLMLSPSMHTTGIPHPAIPHSGNKDMDIYERNMKQHSEP

Tcf3 CRD (AS: 54 – 314)

HSSDSDSEVERRPPPRETFEKPRDYLSEAFRRQQDAAFFKGPPYAGYPFLMIPDLGGHYLPN
 GALSPSARAYLQMKWPLL DSPSTAGLKDARSPSPAHL SNKVPVVQH PHHMHPLTPLITYSN
 EHFSPGTPPGHLSPEIDPKTGIPRPPHPSELSPYYPLSPGAVGQIPHPLGWLVPQQGQPMYSI
 PPGFRHPYPALAMNASMSSLVSSRFSPHMVPPHSLHTSGIPHPAIVSPIVKQEPSSGNIS
 PNLSTKSNVVV

Tcf4 CRD (AS: 55 – 339)

PHSSDSETERPPRPESFRDKSRDSLEDAAKRPDGGFLFKGPTYGGYPFIMIPDLSSPYLPN
 GLSPTARQCVNVPLDLHLASCCSPFMQYLQMKWPLL DVQAGSLQGRQGMKDTRSPSPA
 H I VSNKVPVVQH PHHMHPLTPLITYSNEHFTPGNPPPHLQADVDPKTGIPRPPHPPDISPYYP
 LSPGAVGQIPHPLGWLVPQQGQPVYPITTTGGFRHPYPTALTVNASMSSLSSRFPPH MVPP
 HSLHTTGIPHPAIVNPTVKQESSQSDMGSLHSSKHQDS

Danksagung

Bedanken möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Doris Wedlich und bei Herrn Prof. Dr. Ferdinand le Noble für die Möglichkeit diese Arbeit am Zoologischen Institut, Abteilung für Zell- und Entwicklungsbiologie durchzuführen.

Mein besonderer Dank gilt PD Dr. Dietmar Gradl für die Vergabe des interessanten Themas, sowie der hervorragenden Betreuung und Förderung. Diese Arbeit wäre ohne seinen unerschütterlichen Optimismus, seine konstruktive Kritik und seinem persönlichen Engagement wohl nie so zu Stande gekommen. Am Ende wird doch alles gut.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Dr. Martin Bastmeyer für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Karolin Rahm und Claudia Winter danke ich für jegliche Unterstützung im Laboralltag und die gemeinsamen und unterhaltsamen Mittagspausen.

Ganz besonders möchte ich mich auch bei meinem Mann Steffen bedanken, der mir mit seiner Zuversicht und seiner Geduld immer eine seelische und moralische Stütze war.

Ein großes Dankeschön gilt auch meiner Mama und meiner Schwester für die offenen Ohren, die motivierenden Gespräche und die Ablenkungen zu den richtigen Zeitpunkten.

Publikationen

I. Veröffentlichungen

Halbedl S., Kratzer M.-C., Rahm K., Crosta N., Masters K.S., **Zippert J.**, Bräse S., Gradl D. (2013). Synthesis of novel inhibitors blocking Wnt signaling downstream of β -catenin. *FEBS Letters*. 587:522-527.

II. Poster

Zippert, J., Klingel, S., Sperrlich, J., Gradl, D.: Functional analysis of Lef/Tcf transcription factors. *Retreat FOR 1036 Mechanisms, functions and evolution of Wnt-signaling pathways*, Kloster Schöntal, Deutschland. (2013)

Zippert, J., Gradl, D.: Functional analysis of Lef/Tcf transcription factors. *Regional Drosophila Meeting*, Heidelberg, Deutschland. (2014)

Zippert, J., Gradl, D.: Functional analysis of Lef/Tcf transcription factors. *Retreat FOR 1036 Mechanisms, functions and evolution of Wnt-signaling pathways*, Kloster Schöntal, Deutschland. (2014)

Schunk, J., Gradl, D.: Functional analysis of *Xenopus* Lef/Tcf transcription factors in *Drosophila*. *Wnt Symposium Mechanisms, functions and evolution of Wnt-signaling*, Heidelberg, Deutschland. (2015)

III. Vorträge

Functional analysis of TCF4 isoforms. *Retreat FOR 1036 Mechanisms, functions and evolution of Wnt-signaling pathways*, Kloster Schöntal, Deutschland. (2013)

Functional analysis of the Lef/Tcf transcription factors. *Retreat FOR 1036 Mechanisms, functions and evolution of Wnt-signaling pathways*, Kloster Schöntal, Deutschland. (2014)

Lebenslauf

I. Persönliche Daten

Name: Jessica Schunk, geborene Zippert
Geburtsdatum: 15. August 1985
Geburtsort: Ludwigsburg
Familienstand: verheiratet

II. Schulausbildung

1992-1996 Grund- und Hauptschule, Löchgau
1996-2005 Christoph-Schrempf-Gymnasium, Besigheim

III. Hochschulausbildung

10/2006 – 11/2011 Studiengang Diplom Biologie, Universität Hohenheim

Hauptfach: Physiologie

Nebenfach: Virologie, Membranphysiologie

Thema der Diplomarbeit: „Charakterisierung von lichtabhängigen Phosphorylierungsstellen des TRP-Ionenkanals von *Drosophila melanogaster*“ vergeben vom Institut der Physiologie, Fachgebiet Biosensorik, Universität Hohenheim

IV. Promotion

Seit 04/2012 Zoologisches Institut, Abteilung für Zell- und Entwicklungsbiologie, Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Campus Süd