

Casein-Kinase-2 β und neuronale Entwicklungsprozesse

-

Untersuchungen am neurogenetischen Modellorganismus *Drosophila melanogaster*

Dissertation

zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Eike Mathias U. Kibler
Geislingen an der Steige

Würzburg 2002

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. R. Hedrich

Gutachter: Prof. Dr. M. Heisenberg

Gutachter: Prof. Dr. J. Tautz

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Inhaltsverzeichnis

A Einleitung

A 1	Die Pilzkörperentwicklung im Licht einer vergleichenden Gehirnentwicklungsbiologie	1
A 2	Allgemeine Betrachtung der Pilzkörper: Vorkommen, Definition und Funktionen	1
A 3	Entwicklung und Aufbau der Pilzkörper bei <i>Drosophila melanogaster</i>	3
A 4	Genetische Grundlagen der Pilzkörperentwicklung bei <i>Drosophila melanogaster</i>	5
A 5	<i>mushroom bodies undersized</i> ^{P1} (<i>mbu</i> ^{P1}) - eine neue hypoplastische Pilzkörperstrukturmutante	6
A 6	Ziel der Arbeit	7

B Material

B 1	anti-CK2 β -Antiserum/Antikörper	9
B 2	Bakterien	9
B 3	cDNAs	9
B 4	Chemikalien/Antibiotika	9
B 5	Computerprogramme	9
B 6	Einbettmedium	9
B 7	Enzyme	10
B 8	Filme	10
B 9	Fliegenstämme	10
B 10	Kits	12
B 11	Lösungen, Medien und Puffer	12
B 12	Membranen	12
B 13	Mikroskopie	12
B 13	Molekulargewichts-Standards	12
B 14	Plasmide	12
B 15	Primer	13
B 16	P1-Bakteriophagen-Klon	15
B 17	Radionukleotide	15

C Methoden

C 1	Aufzuchtbedingungen für Fliegen	16
C 2	Keimbahntransformation von Fliegen	16
C 3	DNA-Präparationen	16
C 3.1	Minipräparation von Plasmid-DNA	16
C 3.2	Midi- und Maxipräparation von Plasmid-DNA	16
C 3.3	P1-Bakteriophagen-DNA-Gewinnung	16

C 3.4	Gewinnung genomischer DNA	17
C 3.5	DNA-Elution aus Agarosegelen	17
C 3.6	Plasmid-Rettungsexperimente	17
C 3.7	Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen	17
C 4	Klonierung von DNA	17
C 4.1	Ligationen	17
C 4.2	Bakterien-Transformation	18
C 5	DNA-Sequenzierung	18
C 6	Auswertung von DNA-Sequenzen	18
C 7	PCR	18
C 8	Markierung von DNA	19
C 9	Southern-Blot-Analysen	19
C 10	Anfertigung histologischer Gehirnschnitte	19
C 11	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	20
C 12	Western-Blot-Analysen	20
C 13	Protein-Detektion auf Western-Blots	20
C 14	Planimetrie und Volumenrekonstruktion von Neuropilen	20
C 15	Statistik	20

D Ergebnisse

D 1	Allgemeine Beschreibung von <i>mushroom bodies undersized</i> ^{P1}	21
D 2	Die <i>mbu</i> ^{P1} -Mutation führt in beiden Geschlechtern zu einer Reduktion des Pilzkörpercalyxvolumens um etwa die Hälfte	21
D 2.1	Der Pilzkörpercalyxphänotyp der <i>mbu</i> ^{P1} -Mutation in Männchen	21
D 2.2	Der Pilzkörpercalyxphänotyp der <i>mbu</i> ^{P1} -Mutation in Weibchen	25
D 2.3	Der Quotient V(Ff K)/V(Ca) als Maß für die Pilzkörpercalyxgröße	28
D 3	<i>mbu</i> ^{P1} ist eine durch P[lacW]-Elemente verursachte Mutation des Casein-Kinase-2β-Gens	29
D 3.1	Das <i>mbu</i> ^{P1{P3843/2}} -Chromosom trägt eine geschachtelte Insertion zweier P[lacW]-Elemente im Casein-Kinase-2β-Gen	29
D 3.2	Die beiden P[lacW]-Insertionen des <i>mbu</i> ^{P1{P3843/2}} -Chromosoms sind die Ursache des mit der <i>mbu</i> ^{P1} -Mutation assoziierten Pilzkörperphänotyps	31
D 4	Die Letalität eines der drei isolierten Letalchromosomen ist ausschließlich auf eine letale Mutation des Casein-Kinase-2β-Gens zurückzuführen	36
D 4.1	Das Casein-Kinase-2β-Gen ist in <i>Drosophila melanogaster</i> ein essentielles Gen	36
D 4.2	Die Letalität des <i>mbu</i> ^{ΔA6-1L,w⁻} -Chromosoms wird durch mindestens eine Mutation verursacht, die keine Letalmutation des CK2β-Gens ist	42
D 4.3	Das <i>mbu</i> ^{Δ20-1L,w⁻} -Chromosom trägt sowohl eine Letalmutation des CK2β-Gens als auch eine zweite, von CK2β unabhängige Letalmutation	45
D 5	<i>mbu</i> ^{P1} verhält sich genetisch wie ein hypomorphes CK2β-Allel	47

D 5.1	Charakterisierung des Pilzkörperphänotyps verschiedener <i>mbu</i> -Allele im trans-heterozygoten Zustand zur Defizienz Df(1)KA6	47
D 5.2	Charakterisierung des Pilzkörperphänotyps verschiedener <i>mbu</i> -Allele im trans-heterozygoten Zustand zu der Defizienz <i>mbu</i> ^{ΔA26-2L}	49
D 6	Nahezu alle <i>mbu</i> -Exzisionsallele interagieren im transheterozygoten Zustand mit dem <i>mbu</i> ^{P1{P3843/2}} -Chromosom	51
D 7	Die meisten vitalen <i>mbu</i> ^{P1{P3843/2}} -P[lacW]-Exzisionsallele zeichnen sich molekular durch P[lacW]-Restinsertionen im 5'-Bereich des CK2β-Gens aus	53
D 7.1	Southern-Blot-Analysen der <i>mbu</i> ^{ΔBuchstaben} - und <i>mbu</i> ^{ΔZahl/Zahl} - Exzisionschromosomen	54
D 7.2	PCR-Analyse der <i>mbu</i> -Exzisionschromosomen	56
D 8	Vom CK2β-Gen werden mindestens sieben Transkripte gebildet	61
D 8.1	Verfügbare genomische DNA-Sequenzen	61
D 8.2	Kartierung der exonischen Bereiche des CK2β-Genlokus	61
D 8.3	Die CK2β-Transkriptionseinheit codiert vermutlich für mindestens vier Proteinisoformen	64
D 8.4	Die Verwendung zweier Promotoren könnte Teil der Regulation des CK2β-Gens sein	66
D 9	Die <i>mbu</i> ^{P1{P3843/2}} -P[lacW]-Elemente sind in das vorhergesagte offene Leseraster des Exons Ic inseriert	66
D 10	Mindestens drei verschiedene CK2β-Isoformen lassen sich durch Western-Blots nachweisen	70
D 11	Zusätzliche genomische CK2β-Transgene führen zu keiner Veränderung der Pilzkörperentwicklung	74
D 12	Der Pilzkörperdefekt in <i>mbu</i> ^{P1} -Männchen läßt sich durch ein genomisches CK2β-Transgen retten	75
D 13	Gewebespezifische Expression der CK2β-VIIa-Isoform im wildtypischen Hintergrund verändert die normale Pilzkörperentwicklung nicht	77
D 14	Gewebespezifische Expression der CK2β-VIIa-Isoform in <i>mbu</i> ^{P1} -Männchen kann deren Pilzkörperphänotyp teilweise retten	79
D 15	Ubiquitäre Expression der CK2β-VIIa-Isoform ermöglicht eine normale Pilzkörperentwicklung in <i>mbu</i> ^{P1} -Männchen	83
D 16	Ubiquitäre Expression der CK2β-VIIa-Isoform rettet die Letalität des <i>mbu</i> ^{ΔA26-2L} -Chromosoms	85
D 17	N-terminale Phosphorylierung der CK2β-Untereinheit durch die CK2α-Untereinheit ist kein lebensnotwendiger Prozess	86
D 18	Die CK2β-Mutation des <i>mbu</i> ^{P1{P3843/2}} -Chromosoms verhindert die Entwicklung von Fliegen, die eine aktivierte Form der MAP-Kinase Rolled (Rl ^{Sem}) exprimieren	89
D 19	Die Casein-Kinase-2β-Untereinheit wird vermutlich für eine normale Augen- und Flügelentwicklung benötigt	92
E	Diskussion	
E 1	Casein-Kinase-2 - ein Überblick	93
E 2	<i>mbu</i> ^{P1} - ein CK2β-Allel mit wenigen detektierbaren Phänotypen	93
E 3	Mutagene Wirkung der <i>mbu</i> ^{P1} -P[lacW]-Elemente	94

E 4	Mögliche Funktion von CK2 β in den Reproduktionsorganen von <i>Drosophila</i>	95
E 5	Überexpression von CK2 β führt zu keinen Entwicklungsstörungen	96
E 6	Zellbiologische Ursachen des Pilzkörperentwicklungsdefekts von <i>mbu</i> ^{P1}	97
E 7	Letale Mutierbarkeit von CK2 β in <i>Drosophila melanogaster</i>	99
E 8	<i>In vivo</i> -Analyse potentiell wichtiger Aminosäurereste der CK2 β -Untereinheit	99
E 8.1	N-terminale Phosphorylierung der CK2 β -Untereinheit	99
E 8.2	Zinkfingervermittelte β - β -Dimerisierung und nachfolgende Holoenzymbildung	100
E 8.3	Bedeutung der Destruction-Box	103
E 9	Interaktion von freien CK2-Untereinheiten mit Komponenten des MAP-Kinase-Signaltransduktionswegs	105
E 9.1	Interaktionen der freien CK2 β -Untereinheit	105
E 9.1.1	CK2 β inhibiert Mos	105
E 9.1.2	CK2 β aktiviert A-Raf	105
E 9.1.3	CK2 β interagiert mit p90 ^{rsk}	106
E 9.2	CK2 α interagiert mit PP2A	106
E 10	<i>mbu</i> ^{P1} und der MAPK-Signaltransduktionsweg	106
F Anhang		
F 1	Southern-Blot-Analysen	108
F 2	CK2 β -cDNA-Klon-Informationen	116
F 3	Aminosäureübersetzungen von CK2 β -cDNA-Splicevarianten	119
F 4	Vergleich des Calyxphänotyps in <i>mbu</i> ^{P1[P3843/2]} - und WTB-Weibchen	123
G Literaturverzeichnis		
	Adams - Callaerts	124
	Canton - Dujardin	125
	Faust - Hinke	126
	Hinrichs - Krehan	127
	Krehan - Lee	128
	Lin - Melzig	129
	Melzig - Prokop	130
	Putz - Technau	131
	Tettamanti - Zars	132
	Zars - Zhao	133
	 Zusammenfassung	 134
	Summary	135
	Danksagung	136
	Widmung	137
	Lebenslauf	139
	Publikationsliste	140
	Erklärung	141

A 1 Die Pilzkörperentwicklung im Licht einer vergleichenden Gehirnentwicklungsbiologie

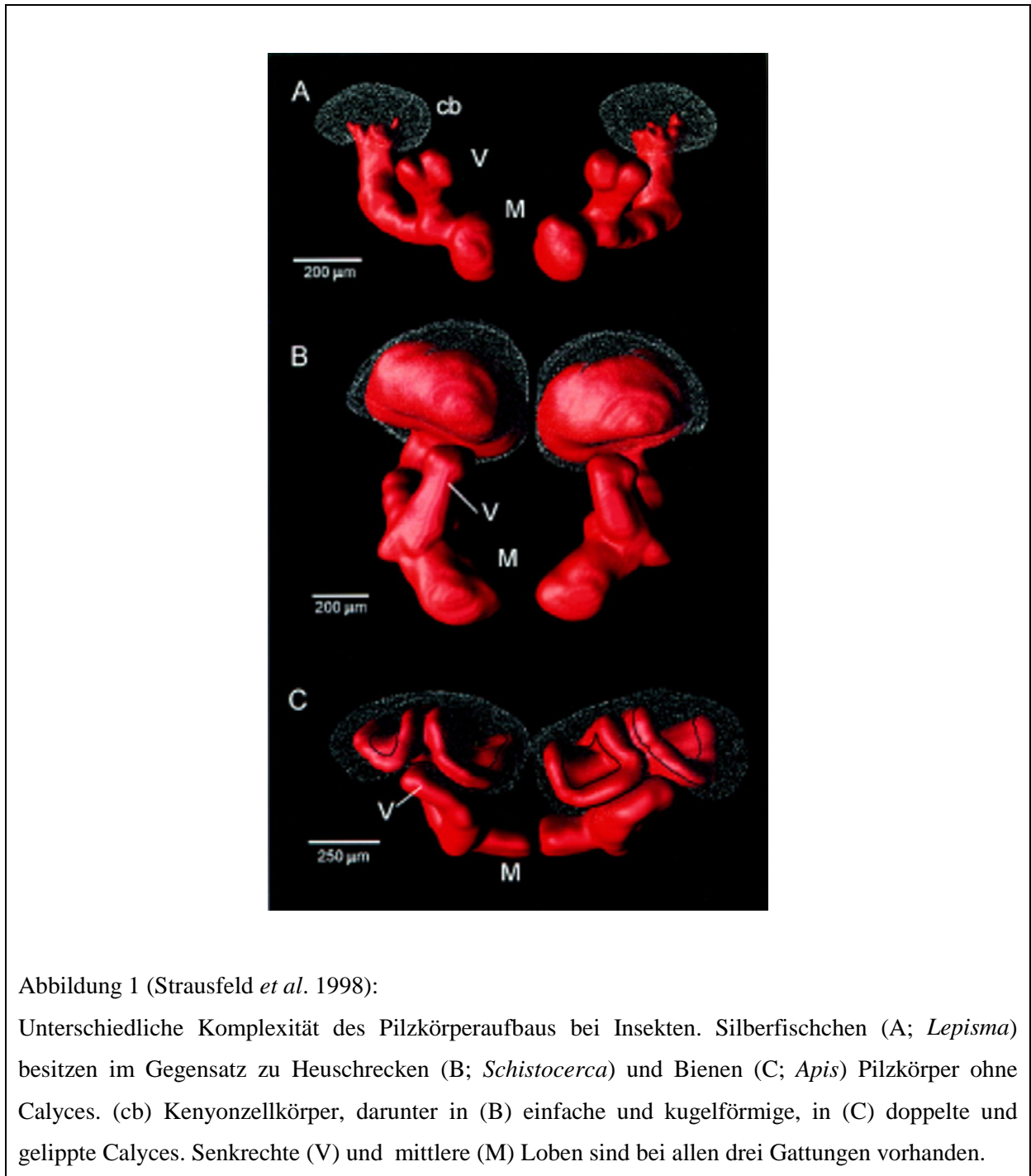
Obwohl sich der Aufbau und die Funktionalität des komplexesten Körperorgans im Tierreich nur als spezifische Anpassung der jeweiligen Tierart an ihre Umwelt verstehen läßt, kann ein anatomischer und funktioneller Vergleich eines Insektengehirns mit einem Säugerhirn unerwartete Übereinstimmungen aufdecken. Die morphologische und funktionelle Ähnlichkeit zwischen den Antennalglomeruli der Insekten und den Glomeruli des olfaktorischen Bulbus der Wirbeltiere (beides primär verarbeitende Neuropile) wurde von Shepherd und Greer (1998) hervorgehoben. Die in nächster Ebene nachgeschaltete Verarbeitung olfaktorischer Information findet bei Säugern in einem phylogenetisch betrachtet alten und konservierten Gehirnareal, dem olfaktorischen Kortex, bei stammesgeschichtlich jüngeren Insekten in den Pilzkörpern statt. Obwohl eine Homologisierung dieser beiden Neuropile schwierig erscheinen mag, befindet sich der Insektenpilzkörper im neuronalen Netzwerk der olfaktorischen Informationsverarbeitung seriell an gleicher Stelle wie der olfaktorische Kortex der Säugetiere. Die Untersuchung der genetischen Grundlagen der Pilzkörperentwicklung und somit auch die der Entwicklungsbiologie neuronaler Stammzellen könnte daher auf grundlegende genetische Mechanismen der Entwicklung des olfaktorischen Kortex hinweisen. Interessanterweise führen Defekte in Pax-6 bei der Maus unter anderem zu Störungen bei der Entwicklung des olfaktorischen Kortex; Mutationen in den *Drosophila*-Pax-6-Homologen *eyeless* (*ey*) und *twin of eyeless* (*toy*) stören hingegen die Entwicklung der Pilzkörper (Kurusu *et al.* 2000). Die vergleichbar erfolgende genetische Kontrolle der Augenentwicklung bei *Drosophila melanogaster* und *Mus musculus* (Callaerts *et al.* 1997) wurde durch Studien an den jeweiligen Pax-6-Genen belegt.

A 2 Allgemeine Betrachtung der Pilzkörper: Vorkommen, Definition und Funktionen

Gehirnstrukturen, die aufgrund ihrer Form an die Fruchtkörper von Flechten erinnern (erstmalig beschrieben von Dujardin 1850) und daher als Pilzkörper (lat. corpora pedunculata, frz. corps pédonculés, engl. mushroom bodies) bezeichnet werden, finden sich bei Ringelwürmern (Anneliden) und, mit Ausnahme der Krebse (Crustaceen), bei allen Gliederfüßlern (Arthropoden) (erste phylogenetische Studien bei Holmgren 1916).

Kennzeichnend für Pilzkörperneuropile sind paarige, dorsal liegende basophile Nervenzellhaufen des am meisten anterior gelegenen Neuromers des zentralen

Nervensystems, deren Neurone (Kenyonzellen, nach Kenyon 1896) von einem kleinen Soma lange, nahezu parallel zueinander liegende Axone entsenden. Die Komplexität ihres Aufbaus ist bei verschiedenen Arthropodentaxa und verschiedenen Kastenmitgliedern einer sozialen Insektenspezies unterschiedlich (Übersicht in Strausfeld *et al.* 1998; Abbildung 1).



Während bei phylogenetisch tiefstehenden Insekten auf anatomischer Ebene keine (vorherrschende) Verknüpfung der Kenyonzellen mit olfaktorische Information übertragenden Nervenzellen nachgewiesen werden konnte, ist dies bei phylogenetisch höherstehenden

Arthropoden ein allgemein beobachtetes Phänomen. Solche vergleichenden evolutionsbiologischen und anatomischen Studien legen nahe, daß bei jungen Insektenordnungen die Prozessierung olfaktorischer Information durch die Pilzkörper ein sekundär erworbenes Merkmal ist. Mögliche Funktionen der Pilzkörper bei Insekten (Übersicht in Zars 2000) umfassen unter anderem olfaktorische Lern- und Gedächtnisleistungen (Menzel 1974, Heisenberg *et al.* 1985, de Belle und Heisenberg 1994, Connolly *et al.* 1996, McGuire *et al.* 2001, Dubnau *et al.* 2001), die Kontrolle komplexer Verhaltensabläufe (Balzverhalten: O'Dell *et al.* 1995; Kontrolle der Lokomotionsaktivität: Mizunami *et al.* 1993, Martin *et al.* 1998), Ortsgedächtnis (Mizunami *et al.* 1993) und Kontextgeneralisierung beim visuellen Lernen (Liu *et al.* 1999).

A 3 Entwicklung und Aufbau der Pilzkörper bei *Drosophila melanogaster*

Die Entwicklung der Pilzkörper von *Drosophila melanogaster* beginnt mit der Segregation der für die Bildung dieses Neuropils zuständigen neuronalen Stammzellen (Pilzkörperneuroblasten) während der frühen Embryogenese (Stadium 7) als Teil der Pc3-Neuroblastengruppe (Younossi-Hartenstein *et al.* 1996) vom zentralen protocerebralen Neuroektoderm (Noveen *et al.* 2000) und endet nach der Einstellung der Pilzkörperneuroblasten-Proliferationsaktivität in der späten Puppe (Technau und Heisenberg 1982, Ito und Hotta 1992). Insgesamt vier Pilzkörperneuroblasten je Gehirnhemisphäre bilden durch ihre ununterbrochene Teilungsaktivität (Ito und Hotta 1992) die 2000 – 2500 Kenyonzellen (Hinke 1961; Balling *et al.* 1987) und die den Pilzkörper als Lamelle umgebenden Gliazellen (Technau 1984, Ito *et al.* 1997), die den adulten Pilzkörper aufbauen. Durch eine Zellstammbaumanalyse wurde belegt, daß jeder Pilzkörperneuroblast im Verlauf seiner Teilungsaktivität alle für den Pilzkörper beschriebenen Zellsubtypen zu bilden vermag (Ito *et al.* 1997). Die Anzahl der im adulten Pilzkörper gefundenen Kenyonzellen hängt von Faktoren wie Alter, Geschlecht und Erfahrung ab (Technau 1984).

Der Proliferationszyklus eines (Pilzkörper-)Neuroblasten beträgt 50-120 Minuten (Truman und Bate 1988, Ito und Hotta 1992). Durch inäquale Teilung wird unter Bildung einer kleineren Gangliennutterzelle der Pilzkörperneuroblast regeneriert. Die Gangliennutterzelle bildet durch äquale Teilung zwei postmitotische Gangliennutterzellen, aus denen sich prinzipiell alle Zelltypen eines Pilzkörpers bilden können.

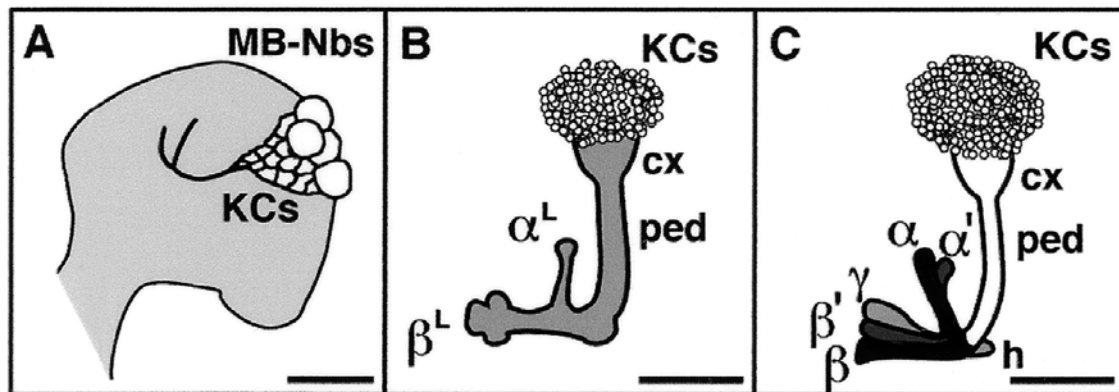


Abbildung 2 (Kurusu *et al.* 2000):

Schematischer Überblick über den Pilzkörperaufbau verschiedener Entwicklungsstadien von *Drosophila melanogaster*. Während der Embryogenese (A) bilden je Gehirnhemisphäre vier Pilzkörperneuroblasten (MB-Nbs) embryonale Kenyonzellen (KCs). Im larvalen Pilzkörper (B) bilden die dendritischen Kenyonzellanteile den Calyx (cx); die axonalen Anteile bilden den Pedunkel (ped) und teilen sich in ein mittleres (β^L) und senkrecht (α^L) Lobensystem. Ein spätpupaler und adulter Pilzkörper (C) hingegen besitzt drei mittlere (β , β' und γ) und zwei senkrechte, nach dorsal weisende Loben (α und α'). (Balken = 60 μm)

Bereits während der Embryogenese (Abbildung 2A) beginnt die Morphogenese der Pilzkörperneurone. Die Axogenese der Kenyonzellen kann ab dem späten vierzehnten Stadium beobachtet werden; die dendritischen Calyces der Pilzkörper jedoch sind erst in den letzten Embryonalstadien detektierbar (Kurusu *et al.* 2002).

Die Axone der embryonalen und larvalen Pilzkörperneurone wachsen unter Bildung des Pedunkels in das Zentralgehirnneuropil ein und verzweigen sich dann in eine dorsal und eine zur Mitte des Gehirns auswachsende Faser (Abbildung 2B). Hierdurch entsteht ein aus zwei Loben bestehender Pilzkörper, wobei die dorsal projizierenden Fasern den α^L - und die zur Mitte auswachsenden Fasern den β^L -Lobus bilden. Wie detaillierte Studien während der Entwicklung des larvalen Pilzkörpers ergaben, entsenden jüngere Kenyonzellen ihre Axone in den Kern des Pedunkels und verdrängen so zuvor gebildete ältere Fasern nach außen. Hierdurch entsteht eine durch differentielle Genexpression nachweisbare Schichtung der axonalen Faserbestandteile des Pedunkels (Kurusu *et al.* 2002).

Bis zur Mitte des dritten Larvenstadiums gleichen sich alle gebildeten Kenyonzellen in ihrem Projektionsmuster. Ein entwicklungsbiologisches Signal (eventuell Ecdyson) bewirkt dann eine Veränderung des Charakters aller neugebildeten Kenyonzellen, die sich in der

Ausbildung eines neuen Lobensystems äußert (α' und β'). Ob dieses Signal auf die Pilzkörperneuroblasten und/oder auf die Gangliennutterzellen wirkt, ist nicht bekannt. Die Fasern des α' - und β' -Lobus entstehen durch Axonverzweigung der zugehörigen Kenyonzellneurite.

Während der frühen Pupalentwicklung findet einerseits eine Reorganisation der Projektion larvaler Kenyonzellen, andererseits eine dritte Neubildung eines Lobensystems (α und β) statt. Die axonalen Bestandteile eines großen Teils der in die α^L/β^L -Loben projizierenden Kenyonzellen degenerieren. Sie bilden neue Axone, die lediglich zur Mitte hin wieder auswachsen (siehe aber Heisenberg *et al.* 1985). Hierdurch entsteht der γ -Lobus eines spätpupalen und adulten Pilzkörpers. Die in die α - und β -Loben projizierenden Kenyonzellen entstehen wiederum aufgrund eines unbekanntem entwicklungsbiologischen Signals und sind dann der einzige Kenyonzelltyp, der ab diesem Zeitpunkt neu gebildet wird. Der Pilzkörper einer Fliege (Abbildung 2C) besitzt demnach drei zur Mitte projizierende Loben (β , β' und γ) und zwei dorsal projizierende Loben (α und α'), die entwicklungsbiologisch betrachtet aus drei unterschiedlichen Zellsubtypen gebildet werden. Vermutlich entsenden alle Kenyonzelltypen Dendriten in den Calyx.

A 4 Genetische Grundlagen der Pilzkörperentwicklung bei *Drosophila melanogaster*

Über die Gene, welche die Entwicklung der Pilzkörper steuern, ist im Vergleich zur genetischen Kontrolle der Augenentwicklung wenig bekannt. Die bisher isolierten Mutationen betreffen mehrere Aspekte der Pilzkörperentwicklung. Allele von *mud* (*mushroom body defect*) zeigen einen Defekt, der zur Bildung zusätzlicher Pilzkörper-Stammzellen führt (Prokop *et al.* 1994). *mbt*-Allele (*mushroom bodies tiny*, Melzig *et al.* 1998) hingegen führen vermutlich zu einer Verringerung der Anzahl gebildeter Pilzkörperneuroblasten. Allele von *na* (*narrow abdomen*) und *mbg* (*mushroom bodies gnomish*) zeigen im adulten Stadium verkleinerte Pilzkörper (persönliche Mitteilung Antonio Prado und Thomas Raabe). Eine Beteiligung an der Kontrolle der Proliferation von Pilzkörperneuroblasten wurde auch für Enok (Enoki mushroom; Scott *et al.* 2001), Mbt (Melzig *et al.* 1998) und für RhoA (Lee *et al.* 2000) diskutiert bzw. gezeigt.

Eine Nullmutation des Fasciclin II-Gens (*fas II*) führt zu Fasziationsdefekten bei der Bildung der Lobensysteme (Kurusu *et al.* 2002). Die Expression des *fas II*-Gens und die Verteilung des *fas II*-Genprodukts könnte von Ey (Eyeless) reguliert werden (Kurusu *et al.* 2000). Larven, die sowohl mutant für *ey* als auch für *dac* (*dachshund*) sind, weisen neuronale

Degenerationserscheinungen im Pedunkel und in den Loben auf. Dac und Ey scheinen auch für die Reorganisation der Pilzkörper während des Pupalstadiums von Bedeutung zu sein. Für Mutationen in *usp* (*ultraspiracle*) und im Genlokus, der für EcR-Isoformen (Ecdyson-Rezeptor) codiert, wurde ein Defekt in der Degeneration der in die larvalen α^L - und β^L -Loben projizierenden Axone während der Pupalentwicklung gefunden (Lee *et al.* 2000). Usp und EcR stellen als Heterodimer den nukleären Hormonrezeptor dar, der für die Umsetzung des Ecdysonhormonsignals in differentielle Genexpression verantwortlich ist. Ecdyson scheint auch wichtig für das Auswachsen der Kenyonzellneurite während der Metamorphose zu sein (Kraft *et al.* 1998). *mbm*^{N337} (*mushroom body miniature*, Heisenberg *et al.* 1985) verhindert in Weibchen das erneute Auswachsen degenerierter larvaler Axone, die Bildung der anderen Lobensysteme und des Calyx. Schließlich führen Mutationen in *mud*, *mbd* (*mushroom bodies deranged*; Technau *et al.* 1982, Heisenberg *et al.* 1985) und *ceb* (*central brain deranged*, Strauss und Heisenberg 1993) zu Projektionsdefekten auswachsender Kenyonzellaxone.

A 5 *mushroom bodies undersized*^{P1} (*mbu*^{P1}) – eine neue hypoplastische Pilzkörperstrukturmutante

Das *mbu*^{P1}-Chromosom wurde während eines massenhistologischen Gehirnstrukturscreens hemizygot lebensfähiger P[lacW]-Insertionen auf dem X-Chromosom aufgrund verkleinerter Pilzkörpercalyces isoliert (Melzig, Dissertationsarbeit 1998). Eine Anti-Leonardo-Färbung auf frontalen 7 μ m-Gehirnschnitten (Melzig, Dissertationsarbeit 1998; Abbildung 3) zeigt, daß zwar alle Pilzkörperstrukturen in *mbu*^{P1} im Vergleich zum Wildtyp vorhanden, diese aber deutlich verkleinert sind.

Das durch Anti-Leonardo-Färbung gefärbte und durch ein auf Planimetrie beruhendes Volumenrekonstruktionsverfahren errechnete Pilzkörperneuropilvolumen ist in *mbu*^{P1} um etwa 50%, das Kenyonzellschichtvolumen um etwa 70% reduziert (Melzig, Dissertationsarbeit 1998). Die Verkleinerung des Kenyonzellschichtvolumens beruht nicht auf einer Verkleinerung oder dichterem Packung der Kenyonzellsomata, sondern auf einer Reduktion der Kenyonzellanzahl (Melzig, Dissertationsarbeit 1998). *mbu*^{P1} zeigt keinen Geschlechtsdimorphismus (Melzig, Dissertationsarbeit 1998).

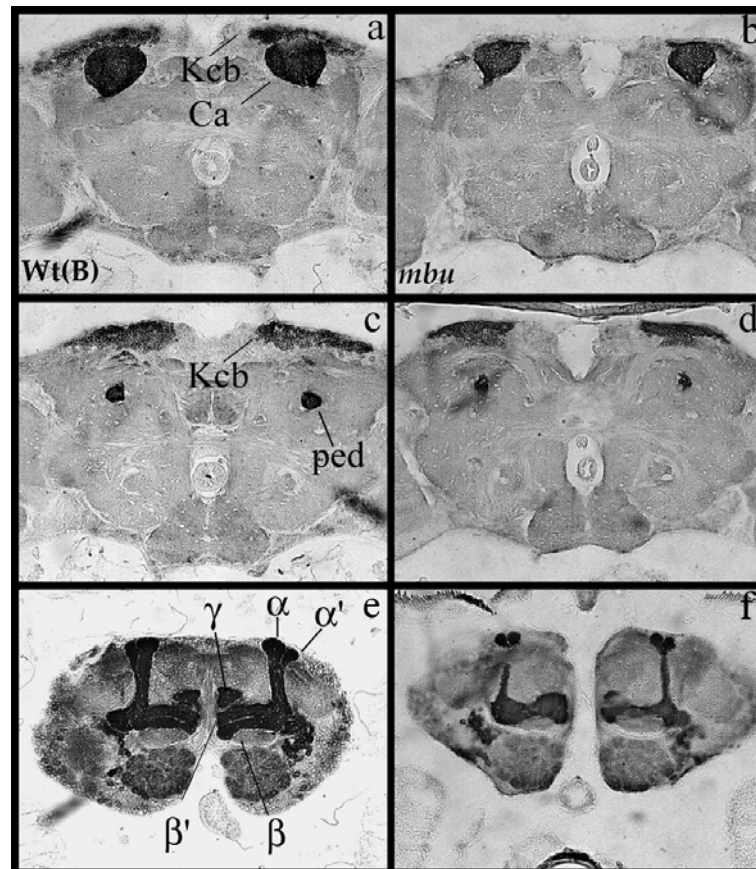


Abbildung 3 (Melzig, Dissertationsarbeit 1998, verändert):

Anti-Leonardo-Färbung auf frontalen 7 µm-Gehirnschnitten. In mbu^{P1} (*mbu*; b, d und f) sind alle Pilzkörperstrukturen vorhanden, jedoch im Vergleich zum Wildtyp (Wt(B); a, c und e) schwächer ausgebildet. In (a) und (b) sind die Calyces (Ca), in (c) und (d) die Kenyonzellschichten (Kcb) und die querschnittenen Pedunkel (ped), und in (e) und (f) die Lobensysteme (α , α' , β , β' und γ) gezeigt.

A 6 Ziel der Arbeit

Die von Jörg Melzig angestellten Untersuchungen waren Ausgangspunkt für eine eingehende Untersuchung des mbu^{P1} -Chromosoms. Zunächst sollte die Natur der für den beobachteten Pilzkörperphänotyp verantwortlichen Mutation genetisch und molekularbiologisch charakterisiert werden. Nach Identifikation des in mbu^{P1} mutierten Gens sollten geeignete Rettungsexperimente auf genomischer und cDNA-Ebene etabliert werden. Verfügbare Informationen über funktionell wichtige Aminosäurereste des von der mbu^{P1} -Mutation betroffenen Proteins sollten für eine funktionelle Analyse dieser Reste im Rahmen von *in vitro*-Mutagenesen

verwendet und die veränderten Proteine *in vivo* auf ihr funktionelles Potential hin untersucht werden. Um das in *mbu^{Pl}* mutierte Gen in einen entwicklungsbiologischen Kontext stellen zu können, sollten genetische Interaktionspartner gefunden werden. Die zellulären Grundlagen für den beobachteten Pilzkörperphänotyp sollten ermittelt und analysiert werden.

B Material

B 1 anti-CK2 β -Antiserum/Antikörper

Das polyklonale, affinitätsgereinigte anti-CK2 β -Serum SA8269 wurde von EUROGENTEC BEL S.A. hergestellt und bezogen. Ein monoklonaler anti-CK2 β -Antikörper aus Maus wurde von Calbiochem bezogen.

B 2 Bakterien

Für die Klonierung von Plasmid-DNA wurden elektrokompetente E.coli XL1-Blue-MRF' oder DH5 α eingesetzt (Sambrook *et al.* 1989).

B 3 cDNAs

DmA15-12ZAP wurde von Ashok Bidwai zur Verfügung gestellt. Alle anderen EST-Klone wurden von Research Genetics Inc. bezogen.

B 4 Chemikalien/Antibiotika

Laborchemikalien (p.a. Qualität) und Antibiotika wurden von folgenden Firmen bezogen: Roche Applied Science, BioRad, BIOzym, InvitrogenTM life technologies, Merck, Sigma, Roth und andere.

B 5 Computerprogramme

Für DNA-Analysen und Primer-Auswahl wurden folgende Software und Datenbanken verwendet:

Oligo DNA analysis software version 3.5 (NBI): DNA/RNA Primer Selection Software

Software und Datenbanken: BCM Search Launcher (Human Genome Center, Baylor College of Medicine, USA), BDGP (Berkeley Drosophila Genome Project), FlyBase, NCBI (National Center for Biotechnology Information).

Zur statistischen Analyse planimetrisch gewonnener Volumetriedaten wurde Statistica (StatSoft Inc) verwendet.

B 6 Einbettmedium

Autofluoreszierende Fliegenhirnschnitte wurden in Entellan eingebettet.

B 7 Enzyme

Restriktionsenzyme wurden bezogen von:

Roche Applied Science, Invitrogen™ life technologies, Fermentas MBI, New England Biolabs NEB und Pharmacia Biotech.

Andere Enzyme (soweit nicht Bestandteil eines Kits):

- Klenow-DNA-Polymerase I (Invitrogen™ life technologies)
- Taq-DNA-Polymerase (Perkin Elmer)
- Pfu-DNA-Polymerase (Stratagene)
- T4-DNA-Ligase (Invitrogen™ life technologies)
- Shrimp Alkaline Phosphatase (USB)
- RNase A (Roche Applied Science)
- Proteinase K (Invitrogen™ life technologies)

B 8 Filme

Kodak Ektachrome 160T fanden bei lichtmikroskopischen und fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen Verwendung; Kodak X-OMAT DS Film 18x24 und XBD x-ray Retina 18x24 wurden bei Autoradiogrammen und Western-Blots eingesetzt.

B 9 Fliegenstämme

Balancer:

Folgende Balancerstämme wurden der Würzburger Stammsammlung (WüStSa) entnommen:

- FM7a
- attachedX, y^-, w^-, f /FM6, w^-
- w^- ; SM6a, CyO/Sco und y^-, w^- ; SM6a, CyO/Sco
- w^- ; TM3, Sb, e/TM6, Hu, Tb, e

Wildtyp:

Als Wildypkontrolle wurde Wildtyp Berlin (WTB) bzw. w^{1118} (WüStSa) verwendet.

P-Element-Transformationen:

Transformationsexperimente wurden mit dem w^{1118} -Stamm (WüStSa) durchgeführt.

Defizienzen:

Df(1)KA6/FM7c (BL-960) wurde vom Bloomington Stock Center bezogen.

Pilzkörperstrukturmutanten:

$mbu^{P1\{P3843/2\}}$, w^- /FM7a wurde von Thomas Raabe zur Verfügung gestellt.

Transposasedonorstamm:

Als P-Element-Transposasedonorstamm diente ein w^- ; $\Delta 2-3$, Sb/TM3, Ser-Stamm (WüStSa).

Mutationen in der *Drosophila* MAP-Kinase Rolled (*rl*):

Die Stämme

- $l(1)phlC^{110}$; rl^{Sem}/rl^{Sem}
- rl^{10a}/CyO
- rl^1/rl^1

wurden von Ernst Hafen, Zürich, bezogen.

S6KII-Mutationen:

ign^{P1} , w^- und zwei davon abgeleitete Defizienzen ($ign^{\Delta 28/1}$, w^- und $ign^{\Delta 58/3}$, w^-) wurden von Gabi Putz zur Verfügung gestellt.

Gal4-Treiberstämme:

- w^- ; 189Y-P[Gal4] (II) (beschrieben in Zars *et al.* 2000; Kim Kaiser)
- w^- ; 201Y-P[Gal4] (II) (Yang *et al.* 1995)
- w^- ; 238Y-P[Gal4] (III) (Yang *et al.* 1995)
- w^- ; 30Y-P[Gal4] (II) (Yang *et al.* 1995)
- w^- ; 47Y-P[Gal4] (II) (Kim Kaiser)
- w^- ; c492b-P[Gal4] (II) (Tettamanti *et al.* 1997)
- w^- ; H24-P[Gal4] (III) (beschrieben in Zars *et al.* 2000; Thomas Raabe)
- w^- ; P[MB247/36Y-Gal4] (III) (beschrieben in Zars *et al.* 2000)
- w^- ; P[ey-Gal4] (II) (Ursprung unbekannt)
- w^- ; OK107-P[Gal4] (IV) (Tettamanti *et al.* 1997)
- w^- ; P[tubP-Gal4]/TM3,Sb (Bloomington Stock Center)
- w^- ; P[hsP-Gal4]/ SM6a;CyO (Bloomington Stock Center)

B 10 Kits

Abi Prism™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin Elmer)

Qiagen® Plasmid Mini Kit (Qiagen)

Qiagen® Plasmid Midi Kit (Qiagen)

Qiagen® Plasmid Maxi Kit (Qiagen)

QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen)

QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen)

Quick Change™ Site Directed Mutagenesis Kit (Stratagene)

ECL™ Western Blotting Kit (Amersham LIFE SCIENCE)

Megaprime™ DNA labelling systems (Amersham LIFE SCIENCE)

VECTASTAIN® Elite ABC Kit (Vectastain Laboratories)

Opti-Prime™ PCR Optimization Kit (Stratagene)

B 11 Lösungen, Medien und Puffer

Medien zur Aufzucht von Bakterien, Lösungen und Puffer wurden nach Sambrook *et al.* (1989) hergestellt.

B 12 Membranen

Biodyne A Transfermembran (Pall) wurde für Southern Blots, Nitrocellulose für Western Blots eingesetzt. Aktivierte NA 45 DEAE Membran (Schleicher&Schuell) wurde bei manchen DNA-Elutionen benutzt.

B 13 Mikroskopie

Licht- und Fluoreszenzmikroskopie wurde an einem Leitz Aristoplan Mikroskop ausgeführt.

B 13 Molekulargewichts-Standards

Zur Größenbestimmung linearer, doppelsträngiger DNA-Fragmente wurde die 1kb und die 1kb plus DNA-Leiter (Invitrogen™ life technologies) eingesetzt. Für Western-Blots wurde der 6,5-175kD Prestained Protein Marker von NEB verwendet.

B 14 Plasmide

pBluescript II SK+ (Stratagene) wurde für DNA-Subklonierungen in Bakterien verwendet. pP[UAST], diente als Fliegentransformationsvektor, pUCHs $\pi\Delta$ 2-3 als Transposasedonorplasmid bei Fliegenkeimbahntransformationen.

B 15 Primer

Sämtliche Primer, die bei DNA-Sequenzierungen, *in vitro*-Mutagenesen oder PCR-Reaktionen eingesetzt wurden, stammen von Invitrogen™ life technologies.

Kennzeichnung	Sequenz 5'-3'
CCK2AAA (232-276)	CCC TTA ATC AAA ATG GCA GCA GCC GAG GAA GTC TCC TGG GTC ACC
CCK2AAARC (276-232)	GGT GAC CCA GGA GAC TTC CTC GGC TGC TGC CAT TTT GAT TAA GGG
CCK2AAS (232-276)	CCC TTA ATC AAA ATG GCA GCA TCC GAG GAA GTC TCC TGG GTC ACC
CCK2AASRC (276-232)	GGT GAC CCA GGA GAC TTC CTC GAA TGC TGC CAT TTT GAT TAA GGG
CCK2SSA (232-276)	CCC TTA ATC AAA ATG AGC AGC GCC GAG GAA GTC TCC TGG GTC ACC
CCK2SSARC (276-232)	GGT GAC CCA GGA GAC TTC CTC GGC GCT GCT CAT TTT GAT TAA GGG
CCKIASS (232-276)	CCC TTA ATC AAA ATG GCA AGC TCC GAG GAA GTC TCC TGG GTC ACC
CCKIASSRC (276-232)	GGT GAC CCA GGA GAC TTC CTC GGA GCT TGC CAT TTT GAT TAA GGG
CCKIISAS (232-276)	CCC TTA ATC AAA ATG AGC GCA TCC GAG GAA GTC TCC TGG GTC ACC
CCKSASRC (276-232)	GGT GAC CCA GGA GAC TTC CTC GGA TGC GCT CAT TTT GAT TAA GGG
CFI (553-596)	GGC GAT TTC GGA CAT TCT CCA CGT GTC TAC TCT GAA AGT CAG CCC
CFIREV (596-553)	GGG CTG ACT TTC AGA GTA GAC ACG TGG AGA ATG TCC GAA ATC GCC
CFII (629-680)	GCG AGG CAA TGG TTA AGA CCT ATT CCC CCA AGT CCA TTG ACG TGT ACA CAC
CFIIREV (680-629)	GGT GTG TAC ACG TCA ATG GAC TTG GGG GAA TAG GTC TTA ACC ATT GCC TCG
D-BOX (363-406)	GGG CCC GGT ACC CAA CTA TTG CCA AGC GTT GGA CAT GAT CTT GG
D-BOX REV (406-363)	CCA AGA TCA TGT CCA ACG CTT GGC AAT AGT TGG GTA CCG GGC CC

Tabelle 1:

CK2B (DmA15-12ZAP)- cDNA-*in vitro*- Mutagenese-Primer. Die durch die *in vitro*-Mutagenese betroffenen Codons sind rot dargestellt. Unter der Primerkennzeichnung ist in Klammern die Lage des Primers bezogen auf die DmA15-12ZAP-Sequenz angegeben.

Kennzeichnung	Sequenz 5'-3'
GCK2DEL1	GCT GCT CGG CAC ATT TTG TAT GAG CGC TTG TCA ATT GTC ACA ATA CG
GCK2DEL2	CGT ATT GTG ACA ATT GAC AAG CGC TCA TAC AAA ATG TGC CGA GCA GC

Tabelle 2:

CK2 β -gDNA-*in vitro*-Mutagenese Primer

Kennzeichnung	Sequenz 5'-3'
CK2A	GAC GCC AGA GAG CCA AGG
CK2B	CGC TTC AAC TCG CTC AGG
CK3A	CCT GAG CGA GTT GAA GCG
CK3B	GCA AAC ACG CAC ACC GCG
CKS1	CGC GGT GTG CGT GTT TGC
CKS2	CCG TTT AAT TCG CGT TGC
CK4A	GCA ACG CGA ATT AAA CGG
CK4B	CGC TTG CCG ATA GTT GGG
CK5A	CCC AAC TAT CGG CAA GCG
CK5B	CGG GAA GCG TTG CGA AGG

Tabelle 3:

CK2 β -gDNA-PCR-Primer

Kennzeichnung	Sequenz 5'-3'
DMSSEQ1	GGT CAC CTG GTT CTG TGG
MDSEQ2	CTT GGG ACG ATA TTC GGG
DMSEQ3	CCA CAG AAC CAG GTG ACC
DMSEQ4	CCG AAT ATC GTC CCA AGC
CKEXVI	CAG CTG CAG GCA GCA GCC
CKEXVII	GGT GGG TGG GTA TAC GGC

Tabelle 4:

CK2 β -cDNA-Sequenzierungsprimer

Kennzeichnung	Sequenz 5'-3'
PCR1 (P5' und P3')	CGA CGG GAC CAC CTT ATG TT
PCR2 (P3')	TCA CTC AGA CTC AAT ACG ACA

Tabelle 5:

P[lacW]-Sequenzierungsprimer

Kennzeichnung	Sequenz 5'-3'
T7 (pBSSK)	GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C
T7 (pOT2)	AAT ACG ACT CAC TAT AGG
PM001 (pOT2)	CGT TAG AAC GCG GCT ACA AT
T3 (pBSSK)	AAT TAA CCC TCA CTA AAG GG

Tabelle 6:

pBSSK/pOT2-Sequenzierungsprimer

Kennzeichnung	Sequenz 5'-3'
pUAST-up	TCT CTG TAG GTA GTT TGT CCA
pUAST-down	AAA TCA ACT GCA ACT ACT GAA

Tabelle 7:

pP[UAST]-Sequenzierungsprimer

B 16 P1-Bakteriophagen-Klon

Der BDGP P1-Klon DS01551 wurde über Michael Ashburner bezogen.

B 17 Radionukleotide

[α -³²P]-dCTP wurde von Amersham bezogen.

C Methoden

Allgemeine molekularbiologische Methoden wurden wie in Sambrook *et al.* (1989) beschrieben durchgeführt.

C 1 Aufzuchtbedingungen für Fliegen

Fliegen wurden bei 25°C und einem 12 Stunden Hell-Dunkel-Zyklus auf Standardmedium gehalten.

C 2 Keimbahntransformation von Fliegen

Die Keimbahntransformation von dechorionisierten w^{118} -Embryonen wurde mit geringen Abweichungen nach einem Protokoll von Twardzik (1993) durchgeführt.

Injiziert wurde eine Injektionslösung bestehend aus 20µg Transformationsvektor-DNA und 10µg pUChs π Δ 2-3 in 50 µl Injektionspuffer.

C 3 DNA-Präparationen

C 3.1 Minipräparation von Plasmid-DNA

Minipräparationen von Plasmid-DNA erfolgten modifiziert nach Sambrook *et al.* (1989). Der RNA-Abbau erfolgte mit einer RNase A-Endkonzentration von 40µg/ml für dreißig Minuten bei 37°C. Die Fällung der Plasmid-DNA durch Ethanol erfolgte durch Zentrifugation bei Raumtemperatur für zehn Minuten. Das Plasmid-DNA-Pellet wurde immer in dH₂O aufgenommen. Sollte die DNA sequenziert werden, wurde sie unter Verwendung des QIAquick PCR Purification Kits aufgereinigt.

Alternativ wurde der Qiagen Plasmid Mini Kit verwendet, der direkt eine nachfolgende Sequenzierung erlaubt.

C 3.2 Midi- und Maxipräparation von Plasmid-DNA

Beide Präparationen wurden unter Verwendung des entsprechenden Kits (Qiagen Plasmid Midi Kit; Qiagen Plasmid Maxi Kit) nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. So gewonnene Plasmid-DNA konnte direkt sequenziert werden.

C 3.3 P1-Bakteriophagen-DNA-Gewinnung

P1-Bakteriophagen-DNA wurde unter Verwendung des Qiagen Plasmid Maxi Kits nach einem Protokoll von EDGP/BDGP gewonnen.

C 3.4 Gewinnung genomischer DNA

Genomische Fliegen-DNA wurde einerseits für Plasmid-Rettungsexperimente und Southern-Blots, andererseits für genomische PCR-Reaktionen benötigt. Die Isolation genomischer DNA für Plasmid-Rettungsexperimente und Southern-Blots erfolgte nach einem von Gert Pflugfelder modifizierten Protokoll. Zur Gewinnung genomischer DNA für PCR-Reaktionen wurde nach dem Single Fly PCR Protokoll (Ron Davis Lab) verfahren.

C 3.5 DNA-Elution aus Agarosegelen

Die Elution einzelner DNA-Fragmente erfolgte entweder nach Sambrook *et al.* (1989) durch Elektrophorese in einem SEAKEM[®]GTG[®] Agarosegel auf aktivierte DEAE-Cellulose-Membran oder unter Verwendung des QIAquick Gel Extraction Kits. Eluierte DNA wurde entweder für radioaktive Markierungsreaktionen oder für Klonierungen eingesetzt.

C 3.6 Plasmid-Rettungsexperimente

Plasmid-Rettungsexperimente wurden nach dem Methoden-Büchlein „Site-selected P element mutagenesis“ von Nikolaus Walter, Mario Jenni & Ernst Hafen durchgeführt.

C 3.7 Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen

Konzentrationsbestimmungen wurden an verschiedenen Photometern vorgenommen.

C 4 Klonierung von DNA

C 4.1 Ligationen

Ligation von DNA in Plasmide wurde wie in Sambrook *et al.* (1989) beschrieben durchgeführt. Die Dephosphorylierung der Vektor-DNA erfolgte durch Zugabe von SAP (shrimp alkaline phosphatase) in den entsprechenden Restriktionsverdau. Es wurden standardgemäß ca. 50 ng Vektor-DNA mit 200-250 ng Insertions-DNA unter Zusatz von 1U T4-DNA-Ligase in den Ligationansatz gegeben. Die Ligation erfolgte entweder über Nacht bei 18°C oder bei 25°C für etwa 2-3 Stunden.

C 4.2 Bakterien-Transformation

Transformation von Plasmid-DNA in elektrokompetente XL1-Blue- oder DH5 α -Bakterien erfolgte durch Elektrotransformation nach Sambrook *et al.* (1989). Zur Selektion wurden die transformierten Bakterien auf antibiotikahaltige LB-Agarplatten ausplattiert. Restriktionsverdau von Minipräparations-DNA einzelner Klone und anschließende Gelelektrophorese dienten zur Überprüfung des Erfolgs der Transformation.

C 5 DNA-Sequenzierung

DNA-Sequenzierungen wurden unter Verwendung von vektor- oder insertspezifischen Primern unter Verwendung des Abi PrismTM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kits durchgeführt. PCR-Fragmente wurden nach Aufreinigung mit dem QIAquick PCR Purification Kit direkt sequenziert.

C 6 Auswertung von DNA-Sequenzen

Für die Auswertung von Sequenzdaten wurden Programme des BCM Search Launchers, BDGP, EDGP, FlyBase und NCBI verwendet.

C 7 PCR

PCR-Reaktionen wurden unter Verwendung des Opti-PrimeTM PCR Optimization Kit optimiert. Nachfolgend sind die für verschiedene Primerpaare verwendeten Puffer des Opti-PrimeTM PCR Optimization Kits aufgelistet.

Primerpaar	Opti-Prime TM -Puffer
CK2A/CK2B	#2
CK3A/CK3B	#10
CKS1/CKS2	#10
CK4A/CK4B	#6
CK5A/CK5B	#6

Tabelle 8:

Primerpaare und die in der PCR eingesetzten Puffer

Alle PCR-Reaktionen wurden nach folgendem Standard-Programm durchgeführt :

Programmschritt	Zyklen	Temperatur	Zeit
1	1	95°C	45 sec
2	30	95°C	45 sec
		58°C	45 sec
		72°C	60 sec
3	1	72°C	120 sec

Tabelle 9:

Standard-PCR-Programm

C 8 Markierung von DNA

Alle verwendeten DNA-Sonden wurden durch „random priming“ mit dem Megaprime™ DNA labelling systems Kit unter Verwendung von [α - 32 P]-dCTP radioaktiv markiert und nachfolgend auf ihre Einbaurrate unter Verwendung eines hausinternen Protokolls hin überprüft:

- 990 μ l 3,5% perchloric acid, 100 mM NaPP_i mit 10 μ l salmon sperm DNA (10 mg/ml) mischen
- 1 μ l radioaktiv markierte Probe zugeben
- GF/C-Rundfilter in Büchnertrichter 2 x mit ~2 ml 1N HCl, 10 mM NaPP_i befeuchten
- Probe auf GF/C-Rundfilter geben; 3 x mit ~2 ml 1N HCl, 10 mM NaPP_i waschen
- radioaktive Kontamination des GF/C-Rundfilter mit Geigerzähler messen

C 9 Southern-Blot-Analysen

Die Elektrophorese der genomischen DNA wurde in einem 0,8%igen Agarosegel durchgeführt. Der Transfer denaturierter und depurinierter DNA auf Nylonmembranen erfolgte durch Kapillartransfer wie in Sambrook *et al.* (1989) beschrieben. Die DNA wurde durch UV-Crosslinking (Auto-Crosslinking mit 1,2 mJoule/cm² im UV-Stratalinker 1800) fixiert. Die Prähybridisierung und Hybridisierung mit radioaktiv markierten, denaturierten DNA-Sonden erfolgte nach Sambrook *et al.* (1989).

C 10 Anfertigung histologischer Gehirnschnitte

7 μ m-Paraffindünnschnitte wurden wie bei Heisenberg und Böhl (1979) beschrieben, erweitert nach Jäger und Fischbach (1987), angefertigt.

C 11 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Elektrophorese wurde ein 12%iges Trenngel verwendet und nach dem Handbuch der Firma Biometra verfahren.

C 12 Western-Blot-Analysen

Western-Blots wurden in der Biometra-Fastblot-Apparatur nach dem Biometra-Handbuch durchgeführt.

C 13 Protein-Detektion auf Western-Blots

Das anti-CK2 β -Serum SA8269 wurde 1:100, der monoklonale anti-CK2 β -Antikörper (Calbiochem) 1:100 mit TBST verdünnt. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C. Die Inkubation mit HRP-konjugierten Zweitantikörpern erfolgte für eine Stunde bei Raumtemperatur; diese wurden nach Herstellerangaben mit TBST verdünnt. Die Signaldetektion erfolgte nach dem Protokoll des ECLTM Western Blotting Kits.

C 14 Planimetrie und Volumenrekonstruktion von Neuropilen

Planimetrische Bestimmungen von Neuropilvolumina wurden nach Heisenberg *et al.* (1995) durchgeführt.

C 15 Statistik

Zur statistischen Auswertung der gemessenen Neuropilvolumina wurde jeweils das Volumen des Fächerförmigen Körpers durch das gemittelte Calyxvolumen einer Fliege geteilt $V(\text{FfK})/[0,5*\{V(\text{Ca}^{\text{li}})+V(\text{Ca}^{\text{re}})\}]$; und diese Werte in Genotypengruppen zusammengefaßt. Da diese Genotypengruppenwerte zum Teil aus verschiedenen Stichproben stammten, konnte nicht mehr von einer parametrischen (Normal-)Verteilung ausgegangen werden. Daher fand ein nichtparametrischer Signifikanztest [Mann-Whitney U-Test, beschrieben in Zar (1999)] beim Vergleich zweier Genotypengruppen Anwendung. In allen Fällen wurde bei der Beurteilung von Unterschieden zweier Genotypengruppen eine Irrtumswahrscheinlichkeit von einem Prozent ($p \leq 0,01$) zugrunde gelegt. Diese niedrig gewählte Irrtumswahrscheinlichkeit schien aufgrund der Abschätzung der Größenordnung der Meßfehler beim Erheben der Primärdaten (Planimetriedaten) angebracht. Alle statistischen Methoden wurden mit der Software Statistica durchgeführt.

D 1 Allgemeine Beschreibung von *mushroom bodies undersized*^{P1}

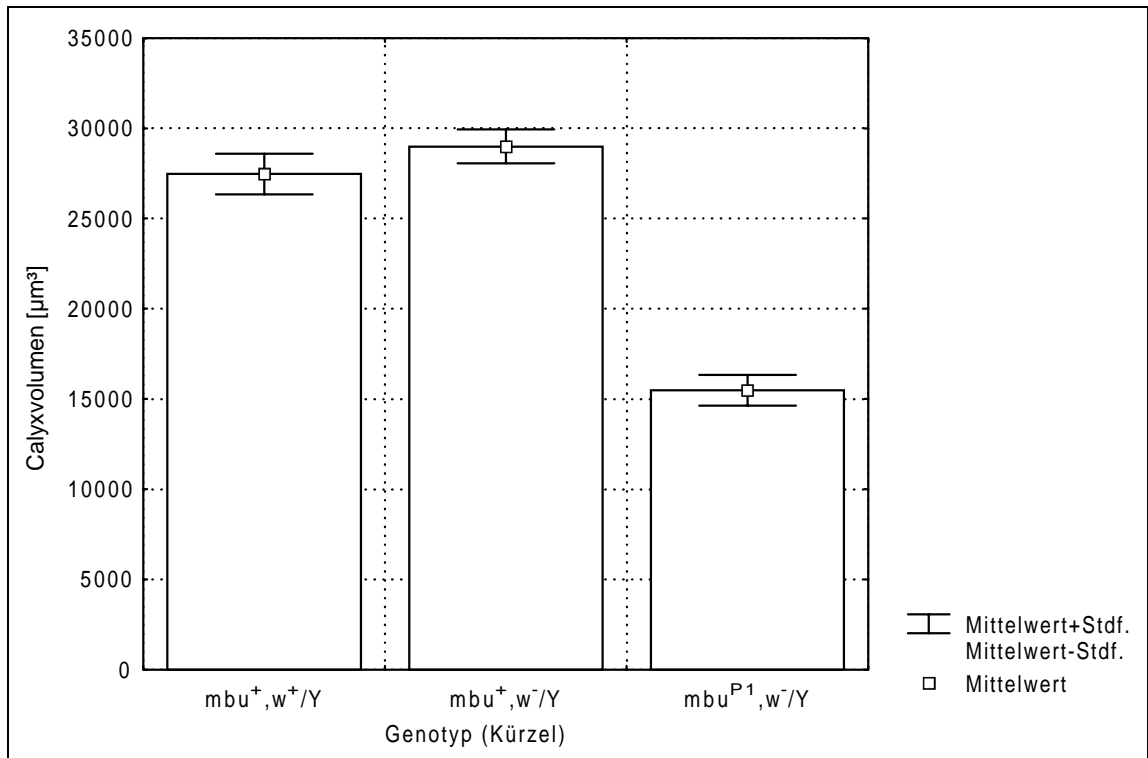
Die Entwicklung von *mushroom bodies undersized*^{P1} (*mbu*^{P1})-Fliegen bei 25°C scheint im Vergleich zu wildtypischen Fliegen um 12-24 Stunden verzögert zu sein. Diese langsamere Entwicklung wurde in vielen Kreuzungen beobachtet, jedoch nie gezielt experimentell untersucht. Das ursprüngliche *mbu*^{P1{P3843/2}}-Chromosom war mit einem Fertilitätsmangel assoziiert, der jedoch durch mehrmalige Rekombination mit einem *w*¹¹¹⁸-Chromosom unter Beibehaltung des Pilzkörperphänotyps abgeschwächt werden konnte. Das so entstandene, die *mbu*^{P1}-Mutation tragende Chromosom wurde als *mbu*^{P1{D}} bezeichnet und erlaubte die Etablierung eines homozygoten *mbu*^{P1{D}}-Stammes. Dies war mit dem *mbu*^{P1{P3843/2}}-Chromosom unmöglich. Obwohl nicht im Detail überprüft, scheinen *mbu*^{P1}-Fliegen bei optimalen Haltungsbedingungen die gleiche Größe wie wildtypische Fliegen zu erreichen. In dicht bevölkerten Kulturgläsern sind sie dagegen häufig kleiner als vergleichbare Kontrolltiere, was sich vermutlich auch durch die beobachtete Entwicklungsverzögerung erklären läßt.

D 2 Die *mbu*^{P1}-Mutation führt in beiden Geschlechtern zu einer Reduktion des Pilzkörpercalyxvolumens um etwa die Hälfte

Die *mbu*^{P1}-Mutation des *mbu*^{P1{P3843/2}}-Chromosoms wurde ursprünglich aufgrund einer starken Reduktion des Pilzkörpercalyxvolumens in Männchen isoliert. Eine Quantifizierung des Phänotyps in beiden Geschlechtern zeigt, daß sich dieser Phänotyp nicht geschlechtsdimorph verhält. In Männchen wie in Weibchen ist das Calyxvolumen im Vergleich zu wildtypischen Tieren um ungefähr 50 % reduziert. Die *white*-Mutation auf dem *mbu*^{P1{P3843/2}}-Chromosom kann als Ursache für den beobachteten Pilzkörperstrukturdefekt ausgeschlossen werden. In den folgenden zwei Abschnitten D 2.1 und D 2.2 wurde eine detaillierte Darstellung der Analyse des Pilzkörpercalyxphänotyps der *mbu*^{P1}-Mutation in Männchen und Weibchen gewählt, um den Nutzen der Verwendung eines von der absoluten Größe der untersuchten Fliegen unabhängigen Quotienten (Abschnitt D 2.3) aufzuzeigen.

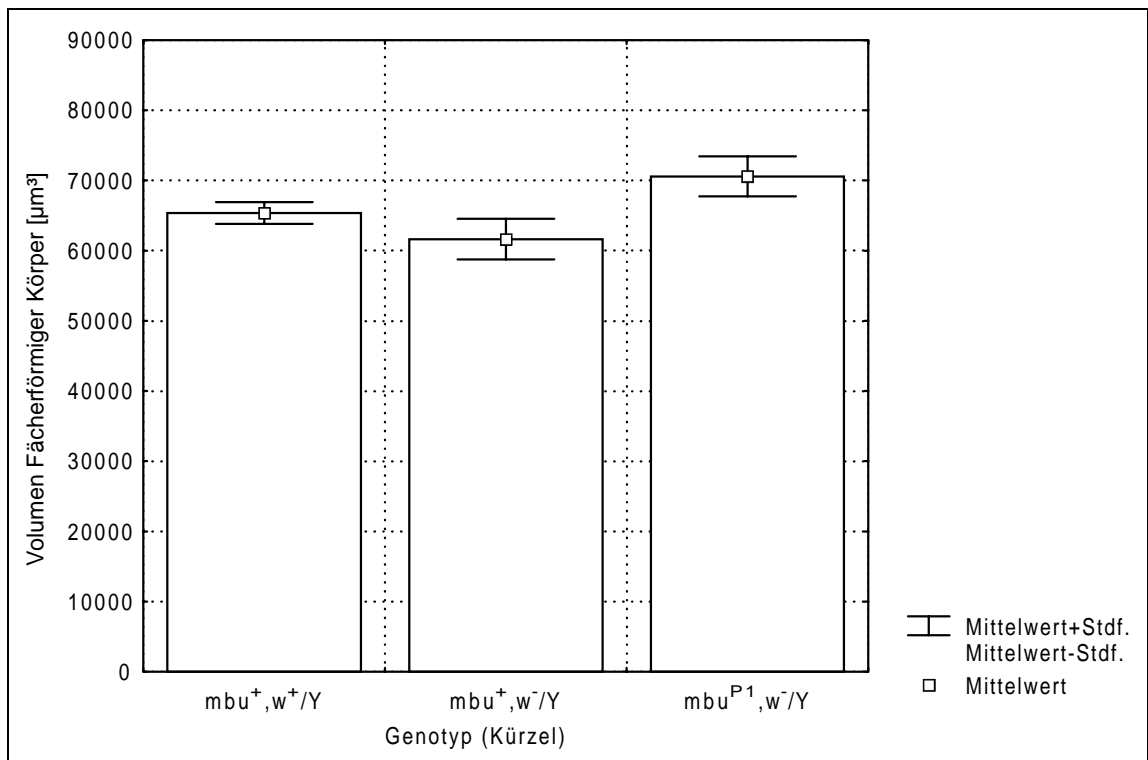
D 2.1 Der Pilzkörpercalyxphänotyp der *mbu*^{P1}-Mutation in Männchen

Ein Vergleich des mittleren Calyxvolumens von Wildtyp Berlin (WTB)- und *w*¹¹¹⁸-Männchen mit dem von *mbu*^{P1}-Männchen (Grafik 1) zeigt, daß in *mbu*^{P1}-Männchen bei wildtypischem Volumen des Fächerförmigen Körpers (Grafik 2) das Calyxvolumen um etwa die Hälfte reduziert ist. Demnach besitzt der Fächerförmige Körper in männlichen *mbu*^{P1}-Fliegen ein



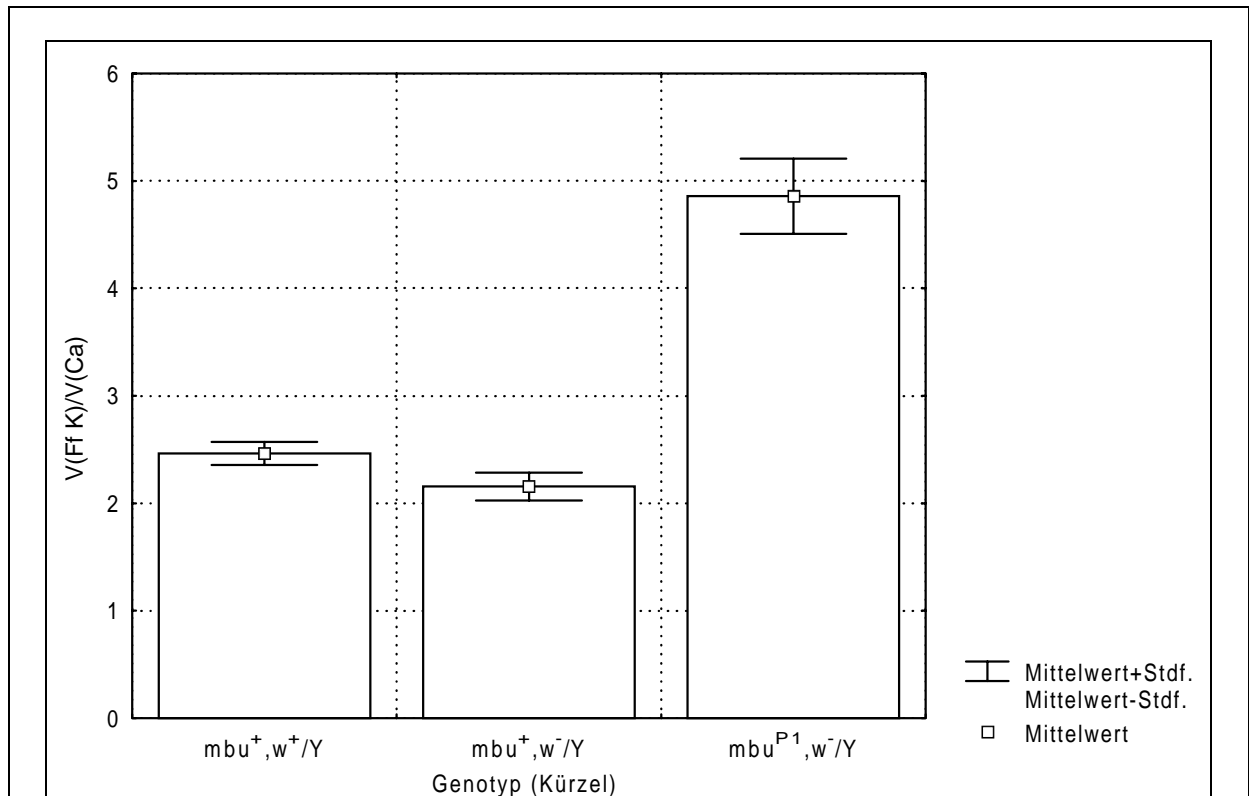
Grafik 1:

Vergleich der mittleren Calyxvolumina von mbu^{P1} -, WTB- und w^{1118} -Männchen.



Grafik 2:

Vergleich des mittleren Volumens des Fächerförmigen Körpers männlicher mbu^{P1} -Fliegen mit dem von WTB- und w^{1118} - Männchen.



Grafik 3:

Vergleich des mittleren Volumenverhältnisses (Fächerförmiger Körper/Calyx) von mbu^{P1} -Männchen mit denen von WTB- und w^{1118} -Männchen.

Legende Grafik 1 – Grafik 3:

Genotyp (Kürzel):	Genotyp:	Anzahl Tiere:
$mbu^+, w^+/Y$:	$mbu^+, w^+/Y$ (Wildtyp Berlin)	n=26
$mbu^+, w^-/Y$:	$mbu^+, w^-/Y$ (w^{1118})	n=12
$mbu^{P1}, w^-/Y$:	$mbu^{P1}, w^-/Y$ ($mbu^{P1(P3843/2)}$)	n=21

ungefähr fünffach größeres Volumen als ein Pilzkörpercalyx (Grafik 3). In WTB- und w^{1118} -Männchen übersteigt das Volumen des Fächerförmigen Körpers das eines Pilzkörpercalyx um ungefähr den Faktor 2,5 (Grafik 3).

Um beurteilen zu können, ob der beim Meßwertevergleich zweier Genotypenstichproben beobachtete Unterschied zufällig zustande kommt oder mutationsbedingt ist, wurde durch einen Mann-Whitney U-Test (siehe Abschnitt C 16) bei jedem Vergleich die Wahrscheinlichkeit ermittelt, mit der fälschlicherweise ein zufälliger Unterschied als ein mutationsbedingter Unterschied interpretiert wird (Irrtumswahrscheinlichkeit p). Ist diese Irrtumswahrscheinlichkeit ein Prozent oder geringer ($p \leq 0,01$), wird davon ausgegangen, daß der beobachtete Unterschied mutationsbedingt ist.

Die sich bei einem gegenseitigen Vergleich der Volumenmeßwerte der Gehirnstrukturen und der ermittelten Volumenquotienten von mbu^{PI} -, WTB- und w^{1118} - Männchen ergebenden Irrtumswahrscheinlichkeiten sind in den Tabellen 10 – 12 aufgelistet.

	V(Ca) mbu^+w^+/Y	V(Ca) $mbu^+,w^-/Y$	V(Ca) $mbu^{PI},w^-/Y$
V(Ca) mbu^+w^+/Y	-	0,396500	0,000000
V(Ca) $mbu^+,w^-/Y$	0,396500	-	0,000003
V(Ca) $mbu^{PI},w^-/Y$	0,000000	0,000003	-

Tabelle 10:

Irrtumswahrscheinlichkeiten, die sich beim Vergleich der Calyxvolumenmeßwerte [V(Ca)] der drei untersuchten Genotypen untereinander ergeben.

Die Irrtumswahrscheinlichkeiten, die sich beim Vergleich der der Grafik 1 zugrundeliegenden Stichprobendaten untereinander ergeben, lassen den Schluß zu, daß sich das Calyxvolumen von WTB- nicht von dem von w^{1118} -Männchen unterscheidet. Das Calyxvolumen von mbu^{PI},w^- - Männchen hingegen ist kleiner als das von WTB- und w^{1118} -Männchen.

	V(Ff K) mbu^+w^+/Y	V(Ff K) $mbu^+,w^-/Y$	V(Ff K) $mbu^{PI},w^-/Y$
V(Ff K) mbu^+w^+/Y	-	0,148588	0,128707
V(Ff K) $mbu^+,w^-/Y$	0,148588	-	0,039567
V(Ff K) $mbu^{PI},w^-/Y$	0,128707	0,039567	-

Tabelle 11:

Irrtumswahrscheinlichkeiten, die sich beim Vergleich der Volumenmeßwerte der Fächerförmigen Körper [V(Ff K)] von WTB-, w^{1118} - und mbu^{PI},w^- -Männchen untereinander ergeben.

Die in Tabelle 11 gezeigten Irrtumswahrscheinlichkeiten erlauben den Schluß, daß sich die Volumina der Fächerförmigen Körper von WTB -, w^{1118} - und mbu^{PI},w^- -Männchen nicht unterscheiden.

	V(Ff K)/V(Ca) mbu^+w^+/Y	V(Ff K)/V(Ca) $mbu^+,w^-/Y$	V(Ff K)/V(Ca) $mbu^{PI},w^-/Y$
V(Ff K)/V(Ca) mbu^+w^+/Y	-	0,096043	0,000000
V(Ff K)/V(Ca) $mbu^+,w^-/Y$	0,096043	-	0,000006
V(Ff K)/V(Ca) $mbu^{PI},w^-/Y$	0,000000	0,000006	-

Tabelle 12:

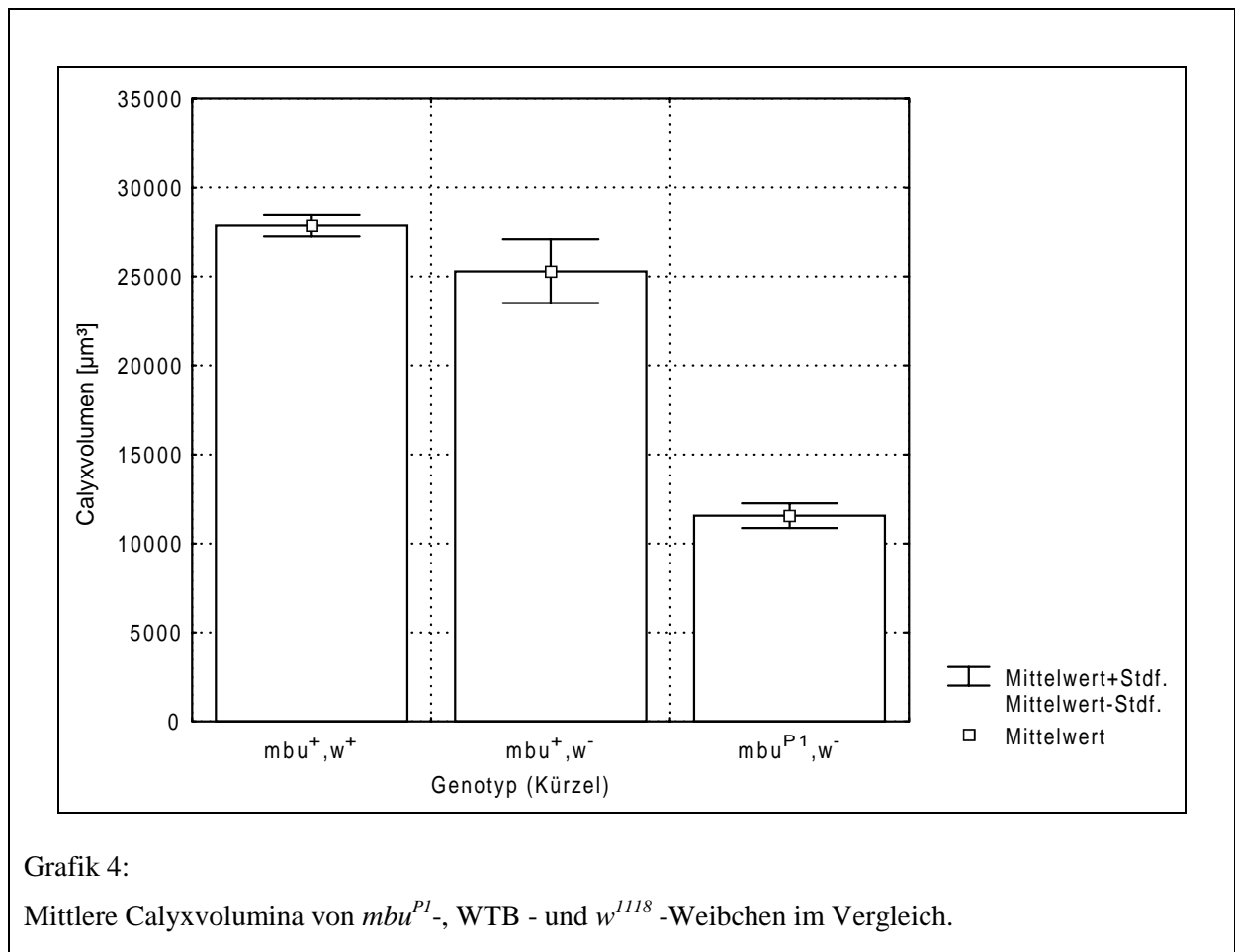
Irrtumswahrscheinlichkeiten, die sich beim Vergleich der Volumenverhältniszerte [V(Ff K)/V(Ca)] der drei untersuchten Genotypen untereinander ergeben.

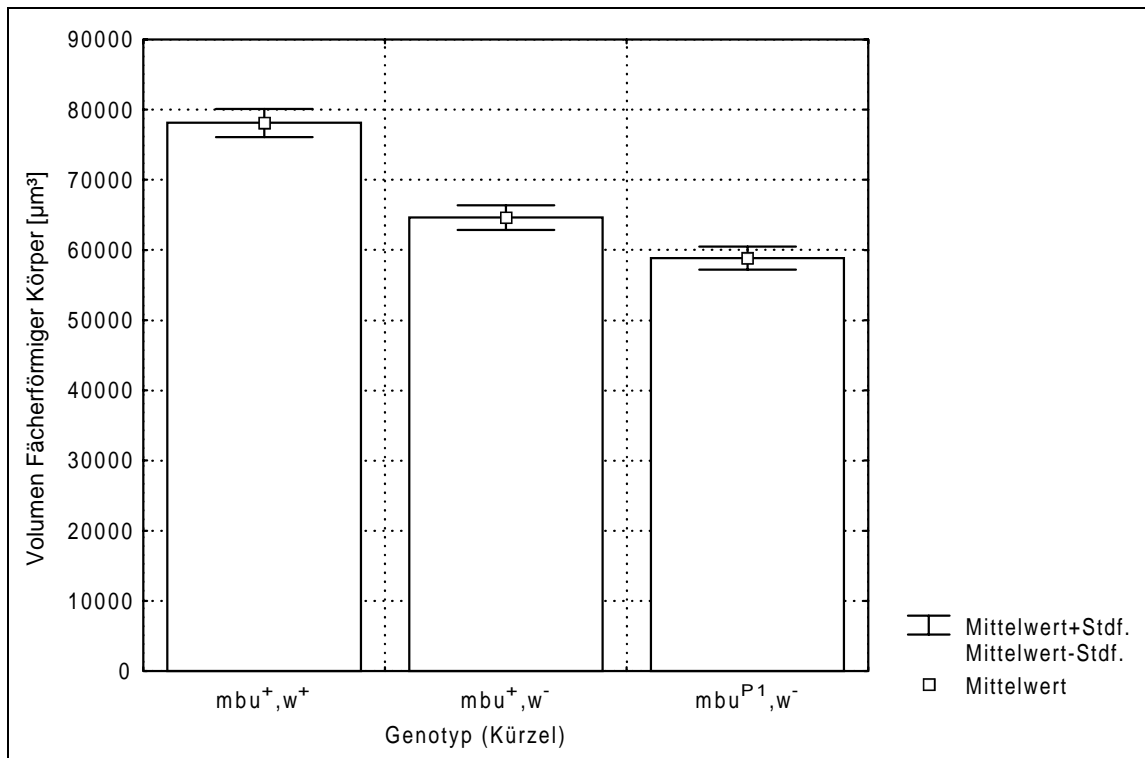
Die Irrtumswahrscheinlichkeiten, die sich beim Vergleich der Volumenverhältniszerte von WTB -, w^{1118} - und mbu^{PI},w^- -Männchen ergeben (Tabelle 12), sprechen dafür, daß sich die

Verhältnisse der Volumina der Fächerförmigen Körper zu den Volumina der Calyces in WTB- und w^{1118} -Männchen gleichen. In mbu^{P1},w^- - Männchen ist das Volumenverhältnis $[V(\text{Ff K})/V(\text{Ca})]$ ungefähr um den Faktor zwei größer als in WTB - und w^{1118} -Männchen. Ursache hierfür sind die verkleinerten Calyces. Eine Beteiligung des *white*-Gens an der Entwicklung der Pilzkörpercalyces und des Fächerförmigen Körpers konnte nicht beobachtet werden.

D 2.2 Der Pilzkörpercalyxphänotyp der mbu^{P1} -Mutation in Weibchen

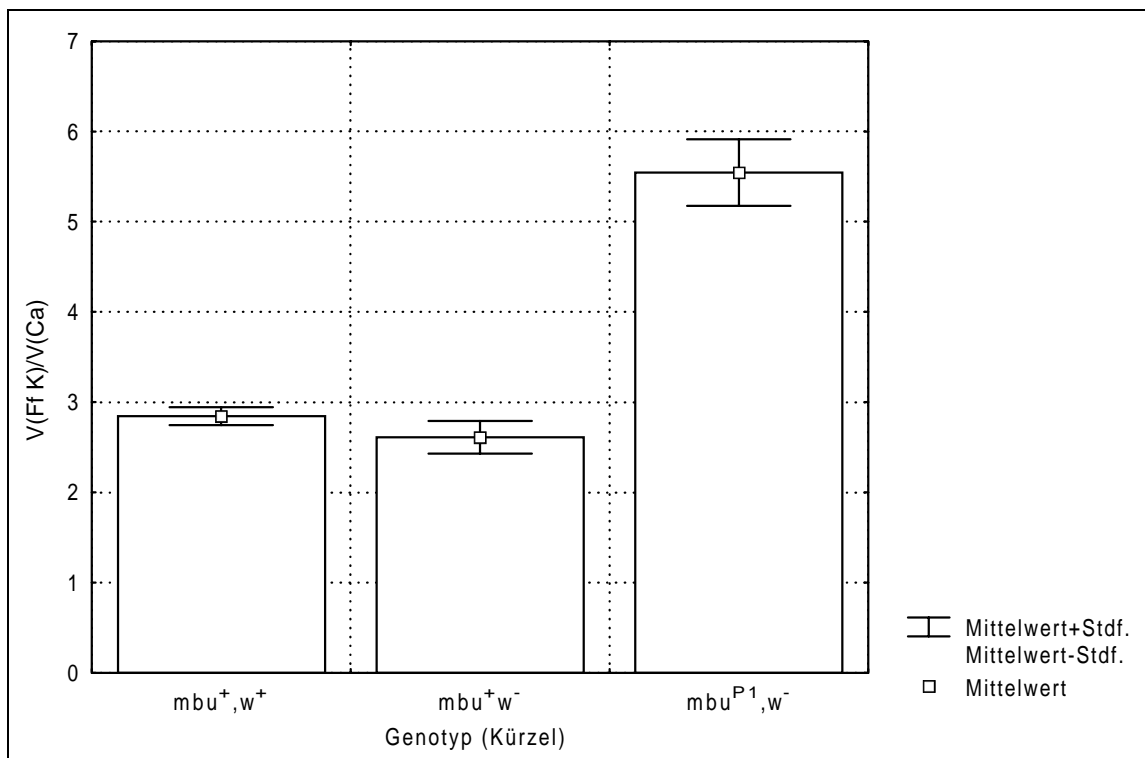
Alle untersuchten mbu^{P1}/mbu^{P1} -Weibchen stammten aus Kreuzungen zwischen $mbu^{P1}/\text{FM7a}$ -Jungfrauen und mbu^{P1}/Y -Männchen, da mit dem $mbu^{P1(P3843/2)}$ -Chromosom die Etablierung eines homozygoten Stammes nicht gelang, und fertile $mbu^{P1(D)}$ -Fliegen erst gegen Ende der Arbeit zur Verfügung standen. Außerdem waren aus heterozygoten Kulturen isolierte mbu^{P1}/mbu^{P1} -Weibchen im Vergleich zu heterozygoten Weibchen selten, auffällig klein und schlüpfen zudem spät. In Weibchen führt die mbu^{P1} -Mutation ebenfalls zu einer ungefähr 50%igen Reduktion des Calyxvolumens (siehe auch Anhang 18).





Grafik 5:

Vergleich des mittleren Volumens des Fächerförmigen Körpers von mbu^{P1} -Weibchen mit denen von WTB- und w^{118} - Weibchen.



Grafik 6:

Vergleich des mittleren Volumenquotienten $V(Ff K)/V(Ca)$ von mbu^{P1} -Weibchen mit denen von WTB- und w^{118} - Weibchen.

Legende zu den Grafiken 4-6:

Genotyp (Kürzel):	Genotyp:		Anzahl Tiere:
mbu^+,w^+ :	$mbu^+,w^+/mbu^+,w^+$	(Wildtyp Berlin)	n=31
mbu^+,w^- :	$mbu^+,w^-/mbu^+,w^-$	(w^{1118})	n=6
mbu^{P1},w^- :	$mbu^{P1},w^-/mbu^{P1},w^-$	($mbu^{P1(P3843/2)}$)	n=26

Wie zuvor bei der Charakterisierung des Pilzkörpercalyxphänotyps von Männchen wurden wiederum die sich bei einem gegenseitigen Vergleich der Volumenmeßwerte der Gehirnstrukturen und der ermittelten Quotienten ergebenden Irrtumswahrscheinlichkeiten ermittelt. Diese sind in den Tabellen 13 – 15 aufgelistet.

	V(Ca) [$mbu^+,w^+/mbu^+,w^+$]	V(Ca) [$mbu^+,w^-/mbu^+,w^-$]	V(Ca) [$mbu^{P1},w^-/mbu^{P1},w^-$]
V(Ca) [$mbu^+,w^+/mbu^+,w^+$]	-	0,117414	0,000000
V(Ca) [$mbu^+,w^-/mbu^+,w^-$]	0,117414	-	0,000166
V(Ca) [$mbu^{P1},w^-/mbu^{P1},w^-$]	0,000000	0,000166	-

Tabelle 13:

Irrtumswahrscheinlichkeiten, die sich beim Vergleich der Calyxvolumenmeßwerte von WTB, w^{1118} - und mbu^{P1},w^- -Weibchen untereinander ergeben.

Die in Tabelle 13 gezeigten Irrtumswahrscheinlichkeiten lassen den Schluß zu, daß sich das Calyxvolumen von WTB-Weibchen nicht von dem von w^{1118} -Weibchen unterscheidet. Das Calyxvolumen von mbu^{P1},w^- -Weibchen ist kleiner als das von WTB- und w^{1118} -Weibchen.

	V(Ff K) [$mbu^+,w^+/mbu^+,w^+$]	V(Ff K) [$mbu^+,w^-/mbu^+,w^-$]	V(Ff K) [$mbu^{P1},w^-/mbu^{P1},w^-$]
V(Ff K) [$mbu^+,w^+/mbu^+,w^+$]	-	0,001311	0,000000
V(Ff K) [$mbu^+,w^-/mbu^+,w^-$]	0,001311	-	0,100696
V(Ff K) [$mbu^{P1},w^-/mbu^{P1},w^-$]	0,000000	0,100696	-

Tabelle 14:

Irrtumswahrscheinlichkeiten, die sich beim Vergleich der Volumenmeßwerte der Fächerförmigen Körper der drei untersuchten weiblichen Genotypen untereinander ergeben.

Das Volumen des Fächerförmigen Körpers der vermessenen WTB-Weibchen unterscheidet sich von dem der vermessenen w^{1118} -Weibchen. Das Volumen des Fächerförmigen Körpers von mbu^{P1},w^- -Weibchen ist mit dem von w^{1118} -Weibchen vergleichbar.

	V(Ff K)/V(Ca) [$mbu^+,w^+ / mbu^+,w^+$]	V(Ff K)/V(Ca) [$mbu^+,w^- / mbu^+,w^-$]	V(Ff K)/V(Ca) [$mbu^{P1},w^- / mbu^{P1},w^-$]
V(Ff K)/V(Ca) [$mbu^+,w^+ / mbu^+,w^+$]	-	0,433703	0,000000
V(Ff K)/V(Ca) [$mbu^+,w^- / mbu^+,w^-$]	0,433703	-	0,000201
V(Ff K)/V(Ca) [$mbu^{P1},w^- / mbu^{P1},w^-$]	0,000000	0,000201	-

Tabelle 15:

Irrtumswahrscheinlichkeiten, die sich beim Vergleich der Volumenverhältniswerte [V(Ff K)/V(Ca)] der drei untersuchten Genotypen untereinander ergeben.

Die in Tabelle 15 gezeigten Irrtumswahrscheinlichkeiten erlauben den Schluß, daß sich die Verhältnisse des Volumens des Fächerförmigen Körpers zu dem Volumen der Calyces in WTB- und w^{1118} - Weibchen gleichen. Somit hat auch in Weibchen eine Mutation des *white*-Gens keinen Einfluß auf die Entwicklung dieser Gehirnstrukturen. In mbu^{P1},w^- -Weibchen ist dieses Volumenverhältnis ungefähr um den Faktor 2 größer als in WTB - und w^{1118} -Weibchen.

D 2.3 Der Quotient V(Ff K)/V(Ca) als Maß für die Pilzkörpercalyxgröße

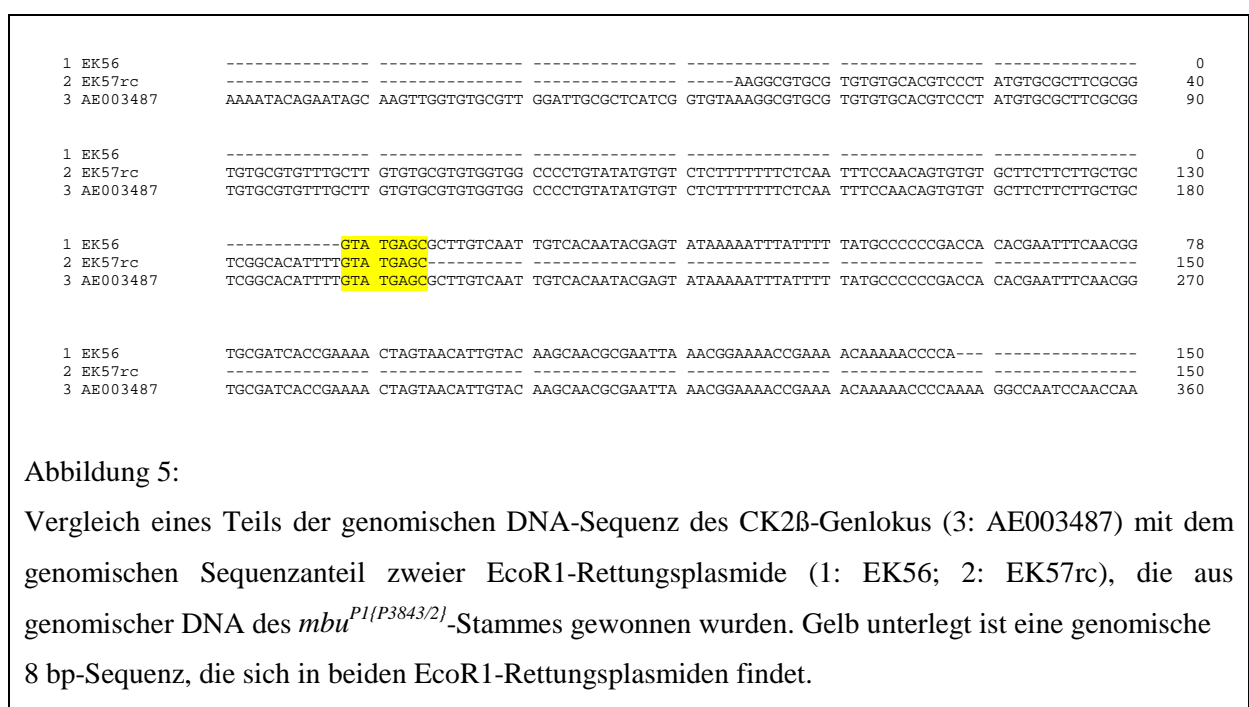
Da unterschiedliche Kulturbedingungen die absolute Größe von Gehirnstrukturen beeinflussen können (Heisenberg *et al.* 1995), sind die absoluten Größenangaben der Calyxvolumina und der Volumina der Fächerförmigen Körper von nur bedingter Aussagekraft. Sie können als direktes Maß herangezogen werden, wenn aus mehreren Stichproben eine genügend große Anzahl von Fliegen vermessen werden. Wie sich bei den obigen Analysen des Pilzkörpercalyxphänotyps in Männchen und Weibchen gezeigt hat, stellt der Quotient V(Ff K)/V(Ca) ein im Vergleich zu den absoluten Größen aussagekräftigeres Maß zur Charakterisierung eines Pilzkörpercalyxphänotyps dar (vor allem bei einer relativ kleinen Stichprobe, siehe w^{1118} -Weibchen), wenn die zu untersuchende Mutation keinen (oder nur sehr geringen) Einfluß auf die Bezugsgröße (in diesem Fall das Volumen des Fächerförmigen Körpers) hat. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurde daher der Quotient V(Ff K)/V(Ca) als Maß für die Pilzkörpercalyxgröße verwendet.

D 3 *mbu^{P1}* ist eine durch P[lacW]-Elemente verursachte Mutation des Casein Kinase-2 β -Gens

In den folgenden zwei Abschnitten wird die molekulare Natur der *mbu^{P1}*-Mutation aufgezeigt (Abschnitt D 3.1) und der Beweis erbracht, daß *mbu^{P1}* ein Allel des Casein-Kinase-2 β -Gens darstellt (Abschnitt D 3.2).

D 3.1 Das *mbu^{P1{P3843/2}}*-Chromosom trägt eine geschachtelte Insertion zweier P[lacW]-Elemente im Casein-Kinase-2 β -Gen

Jörg Melzig durchmusterte in einem massenhistologischen Gehirnstruktur-Screen etwa 2000 hemizygot lebensfähige X-chromosomale P[lacW]-Insertionslinien und isolierte hierbei das *mbu^{P1{P3843/2}}*-Chromosom, da es mit einer Mutation assoziiert war, die zu einem hypoplastischen Pilzkörperphänotyp führt (Melzig, Dissertationsarbeit 1998). Joachim Wahl kartierte die P[lacW]-Element-Insertion des *mbu^{P1{P3843/2}}*-Chromosoms durch *in situ* Hybridisierung an Polytäanchromosomen auf die zytologische Position 10E (Joachim Wahl, persönliche Mitteilung) und führte erste EcoR1-Plasmid-Rettungsexperimente durch. Diese wurden wiederholt und die erhaltenen zwei EcoR1-Rettungsplasmide sequenziert. Abb. 5 zeigt einen Vergleich der ersten 150 Basen der sequenzierten genomischen DNA der beiden EcoR1-Rettungsplasmide mit einem dem Casein-Kinase-2 β -Genlokus zugeordneten genomischen Sequenzabschnitt (AE003487).



Betrachtet man die P[lacW]-Sequenzanteile der beiden Rettungsplasmide mit den 5'- bzw. 3'-Enden eines P[lacW]-Elements (Abbildung 6), ergibt sich ein stimmiges Modell für die ineinander erfolgte Insertion zweier P[lacW]-Elemente: Die P-Element-Transposase verwendete für die Insertion des ersten P[lacW]-Elements die Sequenz GTATGAGC als Zielsequenz und inserierte dieses in 5'-3'-Richtung relativ zur genomischen Sequenz. Für die Insertion des zweiten P[lacW]-Elements wurde von der P-Element-Transposase die Zielsequenz AGCCATGA geschnitten und das P-Element in 3'-5'-Richtung relativ zur genomischen Sequenz inseriert. Ein solches Szenario wäre allerdings nur dann denkbar, wenn bei der P-Element-Mutagenese, die zur Erzeugung des *mbu*^{P1{P3843/2}}-Chromosoms führte, ein P[lacW]-Donorchromosom verwendet wurde, das mindestens zwei P[lacW]-Elemente zur Remobilisierung zur Verfügung stellte. Grafik 7 faßt die Natur der P[lacW]-Insertionen des *mbu*^{P1{P3843/2}}-Chromosoms zusammen.

```

>P[lacW] 3'-Endsequenz
  CG TTAAGTGGAT GTCTCTTGCC GACGGGACCA CCTTATGTTA TTTCATCATG

>EK56 P[lacW]-Element-Sequenz
NNNC CNTTGTGGAT GTCTCTTGCC GACGGGACCA CCTTATGTTA TTTCATCATG

>EK57 P[lacW]-Element-Sequenz
  CC TTAAGTGGAT GTCTCTTGCC GACGGGACCA CCTTATGTTA TTTCATCATG TCATG

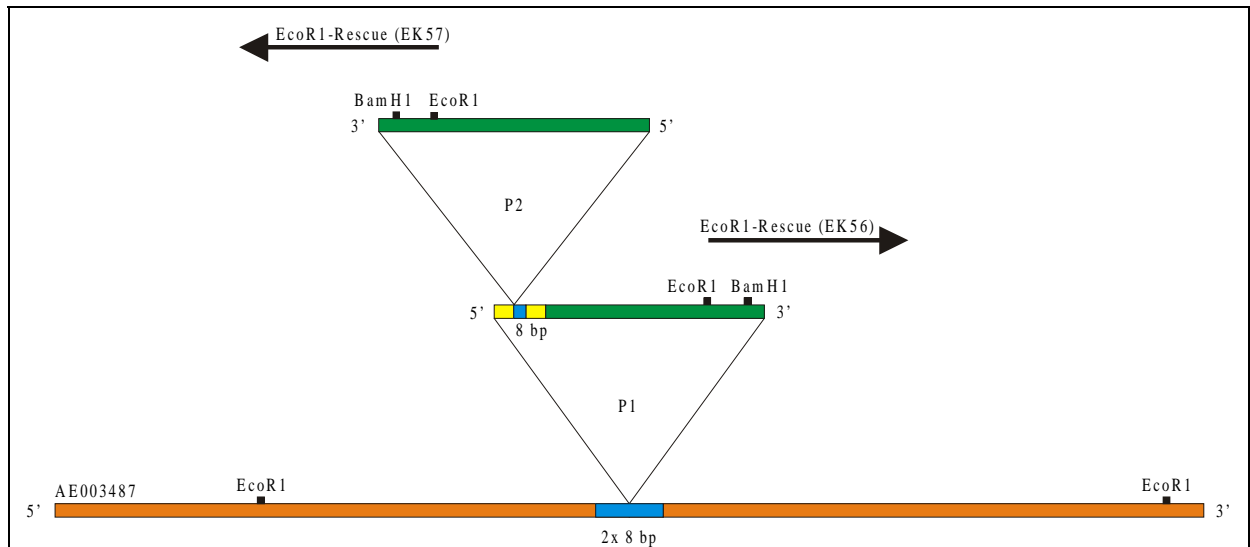
> P[lacW] 5'-revers-komplementäre Endsequenz
      TTCGG TAAGCTTCGG CTATCGACGG GACCACCTTA TGTATTTCATG TCATG

```

Abbildung 6:

Vergleich der P[lacW]-Sequenzanteile (EK56, EK57) der beiden Rettungsplasmide mit den 5'- bzw. 3'-Enden eines P[lacW]-Elements. Die letzten gut lesbaren 40 Basen von Sequenz EK56 sind mit der P[lacW]-3'-Sequenz identisch (Fettschrift), die letzten 5 Basen von Sequenz EK57 stimmen mit der revers-komplementären P[lacW]-5'-Sequenz überein (Kursivschrift unterstrichen), die davor liegende gut lesbare Sequenz ist identisch mit der P[lacW]-3'-Sequenz (Fettschrift).

Um sicherzustellen, daß das *mbu*^{P1{P3843/2}}-Chromosom keine weitere, nicht durch die EcoR1-Plasmidrettungsexperimente erfaßte P[lacW]-Element-Insertion enthält, wurde im Rahmen einer Southern-Blot-Analyse auf das Vorhandensein von P-Element-Sequenzen in *mbu*^{P1{P3843/2}} getestet (siehe D 7.1). Es ergaben sich jedoch keinerlei Hinweise auf das Vorhandensein weiterer P-Elemente. Somit kann davon ausgegangen werden, daß das *mbu*^{P1{P3843/2}}-Chromosom lediglich zwei ineinandergeschachtelte P[lacW]-Element-Insertionen im Casein-Kinase-2β-Genlokus trägt.



Grafik 7:

Modell der P-[lacW]-Insertionen des $mbu^{P1(P3843/2)}$ -Chromosoms. Pfeile geben die Richtung der zugehörigen EcoRI-Rettungsplasmide an; die entsprechenden Sequenznummern sind in Klammern gesetzt. Die 8 bp-Duplikation genomischer DNA, die bei der Insertion des P1-P[lacW]-Elements erzeugt wurde und vermutlich teilweise durch die Insertion des P2-P[lacW]-Elements erneut dupliziert wurde, ist blau dargestellt; die genomische DNA des Casein-Kinase-2 β -Genlokus (AE003487) orange. P5'-P[lacW]-DNA, die vermutlich bei der Insertion des P2-P[lacW]-Elements dupliziert wurde, ist gelb, sonstige P[lacW]-DNA grün wiedergegeben.

D 3.2 Die beiden P[lacW]-Insertionen des $mbu^{P1(P3843/2)}$ -Chromosoms sind die Ursache des mit der mbu^{P1} -Mutation assoziierten Pilzkörperphänotyps

Durch Remobilisierung der beiden $mbu^{P1(P3843/2)}$ -P[lacW]-Elemente und der damit verbundenen teilweisen oder vollständigen Entfernung der P[lacW]-Elemente und gegebenenfalls auch flankierender genomischer DNA wurde eine Reihe neuer CK2 β -Allele erzeugt (Tabelle 16). Die in mehreren Remobilisierungsmutagenesen isolierten $mbu^{\Delta P[lacW]}$ -Chromosomen fallen in zwei Klassen. Der weitaus größte Teil der neuen Chromosomen sind wie das $mbu^{P1(P3843/2)}$ -Chromosom hemizygot lebensfähig. Es konnten jedoch auch drei letale Chromosomen isoliert werden.

$mbu^{\Delta P[lacW]}$ -Chromosom	Eigenschaften
$mbu^{\Delta I-1}$	vital
$mbu^{\Delta A}$	vital
$mbu^{\Delta C}$	vital
$mbu^{\Delta G}$	vital
$mbu^{\Delta H}$	vital
$mbu^{\Delta A20-1V}$	vital
$mbu^{\Delta A24-3}$	vital
$mbu^{\Delta 20-1L}$	letal
$mbu^{\Delta A26-2L}$	letal
$mbu^{\Delta A6-1L}$	letal

Tabelle 16

zu Tabelle 16:

Überblick über die in dieser Arbeit untersuchten $mbu^{\Delta P[lacW]}$ -Chromosomen

- $mbu^{\Delta Zahl/Zahl}$ -Chromosomen wurden durch Remobilisierung in Weibchen gewonnen

- $mbu^{\Delta Buchstaben}$ -Chromosomen wurden in der 1. Mutagenese durch Remobilisierung in Männchen gewonnen

- $mbu^{\Delta AZahl-Zahl}$ -Chromosomen wurden in der zweiten Mutagenese durch Remobilisierung in Männchen gewonnen

Gegebenenfalls wurde der Kürzel L für letal und V für vital zugefügt.

Die beiden P[lacW]-Elemente wurden durch Einkreuzen eines Transposase-Donorchromosoms remobilisiert und die so erhaltenen Chromosomen durch erstchromosomale Balancerchromosomen stabilisiert. Ein Remobilisierungsereignis der P[lacW]-Elemente wurde durch Abwesenheit des $white^+$ -Markers der P[lacW]-Elemente detektiert. Die Remobilisierung erfolgte in einem Mutageneseansatz in Weibchen und in zwei Mutageneseansätzen in Männchen, wobei auf Unabhängigkeit der Remobilisierungsereignisse durch Einzeltierkreuzungen in der F1 (Einzeltierverpaarung von ♀ $mbu^{P1}/FM7a; +/+; \Delta 2-3, Sb/+$ bzw. ♂ $mbu^{P1}/Y; +/+; \Delta 2-3, Sb/+$) geachtet wurde. Die Remobilisierung in Weibchen sollte nebst impräzisen auch zu präzisen Remobilisierungsereignissen führen. In Männchen sollten wegen der Abwesenheit eines zweiten X-Chromosoms und der damit fehlenden Möglichkeit, dieses im Rahmen eines Reparaturmechanismus als Template zu verwenden, in den allermeisten Fällen impräzise Remobilisierungsereignisse stattfinden. Abb. 7 und Abb. 8 zeigt die angewandte Genetik.

P:	♀♀ $mbu^{P1\{P3843/2\}}/FM7a; +/+; +/+$	x	♂♂ $FM7a / Y; +/+; \Delta 2-3, Sb/TM3, Ser$
F1:	♀♀ $mbu^{P1\{P3843/2\}}/FM7a; +/+; \Delta 2-3, Sb/+$	x	♂♂ $FM6, w/Y; +/+; +/+$
F2:	♀♀ $mbu^{\Delta P[lacW]}/FM6, w; +/+; +/+$	x	♂♂ $FM7a / Y; +/+; +/+$
F3:	♀♀ $mbu^{\Delta P[lacW]}/FM7a; +/+; +/+$	x	♂♂ $FM7a / Y; +/+; +/+$
		x	♂♂ $mbu^{\Delta P[lacW]}/Y; +/+; +/+$ (falls lebensfähig)

Abbildung 7:

Remobilisierung der beiden P[lacW]-Elemente des $mbu^{P1\{P3843/2\}}$ -Chromosoms in Weibchen.

P:	♀♀ $mbu^{P1\{P3843/2\}}/FM7a; +/+; +/+$	x	♂♂ $FM7a / Y; +/+; \Delta 2-3, Sb/TM3, Ser$
F1:	♀♀ $FM6, w/FM7a; +/+; +/+$	x	♂ $mbu^{P1\{P3843/2\}}/Y; +/+; \Delta 2-3, Sb/+$
F2:	♀♀ $mbu^{\Delta P[lacW]}/FM6, w; +/+; +/+$	x	♂♂ $FM7a / Y; +/+; +/+$
F3:	♀♀ $mbu^{\Delta P[lacW]}/FM7a; +/+; +/+$	x	♂♂ $FM7a / Y; +/+; +/+$
		x	♂♂ $mbu^{\Delta P[lacW]}/Y; +/+; +/+$ (falls lebensfähig)

Abbildung 8:

Remobilisierung der beiden P[lacW]-Elemente des $mbu^{P1\{P3843/2\}}$ -Chromosoms in Männchen.

Legende zu den Abbildungen 7 und 8:

♀:	Jungfrau
♂:	Männchen
$mbu^{\Delta P[lacW]}$:	$mbu^{P1\{P3843/2\}}$ -Exzisionschromosom
$\Delta 2-3, Sb$:	drittchromosomales Transposase-Donorchromosom
TM3,Ser:	drittchromosomaler Balancer
FM6,w bzw. FM7a:	X-chromosomale Balancerchromosomen

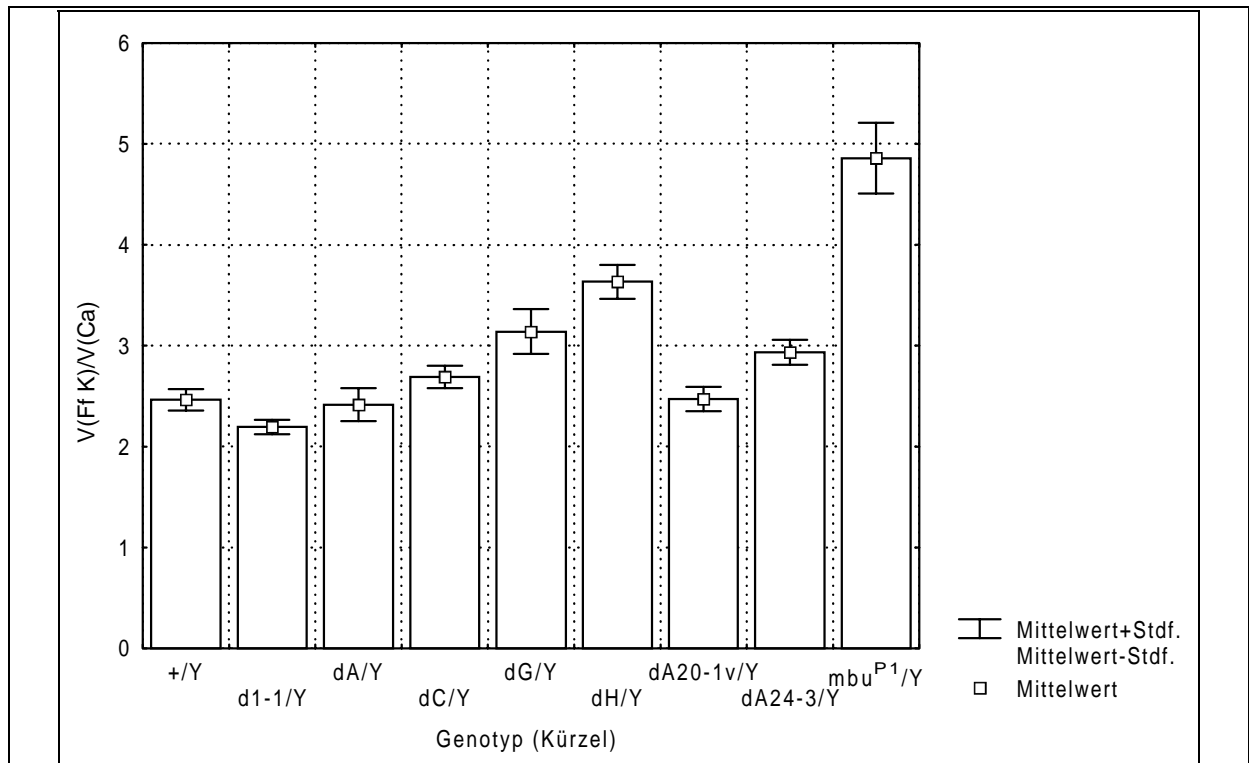
Die lebensfähigen Linien wurden in beiden Geschlechtern auf eine Reversion des in mbu^{P1} beobachteten Pilzkörpercalyxphänotyps hin untersucht (Grafik 8 und 9; Tabelle 17 und 18). Da ein Teil der neuen Casein-Kinase-2 β -Allele einen wildtypischen Pilzkörpercalyxphänotyp aufwiesen, konnte gezeigt werden, daß die P[lacW]-Elemente des $mbu^{P1\{P3843/2\}}$ -Chromosoms den mit der mbu^{P1} -Mutation assoziierten Pilzkörperphänotyp verursachen. Die isolierten Letalchromosomen werden in den Abschnitten D 4.1 – D 4.3 behandelt.

Genotyp (n)	d1-1/Y (9)	dA/Y (10)	dC/Y (15)	dG/Y (9)	dH/Y (12)	dA20-1v/Y (8)	dA24-3/Y (8)	mbu^{P1}/Y (21)
+/Y (26)	0,242002	0,887654	0,051329	0,003661	0,000026	0,597643	0,011834	0,000000
$p \leq 0,01$	-	-	-	+	+	-	-	+

Tabelle 17 :

Irrtumswahrscheinlichkeiten, die sich beim Vergleich der Volumenverhältniswerte $V(Ff K)/V(Ca)$ der in Grafik 8 gezeigten mbu -Allele mit dem von Wildtyp Berlin ergeben.

Aus den in Tabelle 17 gezeigten Irrtumswahrscheinlichkeiten kann der Schluß gezogen werden, daß sich die Verhältnisse der Volumina der Fächerförmigen Körper zu den Volumina der Calyces in WTB-, $mbu^{\Delta 1-1}, w^-$, $mbu^{\Delta A}, w^-$, $mbu^{\Delta C}, w^-$, $mbu^{\Delta A20-1v}, w^-$ und $mbu^{\Delta A24-3}, w^-$ Männchen gleichen und somit die stattgefundene Exzision der beiden P[lacW]-Elemente des $mbu^{P1\{P3843/2\}}$ -Chromosoms in diesen Linien zu einer Reversion des Pilzkörperphänotyps in Männchen führte. Da während der Remobilisierungsmutagenesen das $mbu^{P1\{P3843/2\}}$ -Chromosom und die davon abgeleiteten $mbu^{\Delta P[lacW]}$ -Exzisionschromosomen stets balanciert waren, scheidet Rekombination einer Zweitmutation als Erklärung für die Reversion des Phänotyps aus. In zwei Exzisionslinien ($mbu^{\Delta G}, w^-$ und $mbu^{\Delta H}, w^-$) findet sich im hemizygoten Zustand der Exzisionschromosomen im Vergleich zur mbu^{P1} -Mutation lediglich eine Abschwächung, nicht aber eine vollständige Reversion des Pilzkörperphänotyps.



Grafik 8:

Vergleich der mittleren Volumenquotienten $V(\text{Ff K})/V(\text{Ca})$ der lebensfähigen $mbu^{AP[lacW]}$ -Exzisionsallele in Männchen mit dem von wildtypischen und mbu^{P1} -Männchen.

Genotyp (Kürzel):

+/Y:	$mbu^{+},w^{+}/Y$	(Wildtyp Berlin)
d1-1/Y:	$mbu^{\Delta 1-1},w^{-}/Y$	
dA/Y :	$mbu^{\Delta A},w^{-}/Y$	
dC/Y :	$mbu^{\Delta C},w^{-}/Y$	
dG/Y :	$mbu^{\Delta G},w^{-}/Y$	
dH/Y :	$mbu^{\Delta H},w^{-}/Y$	
dA20-1v/Y :	$mbu^{\Delta A20-1v},w^{-}/Y$	
dA24-3/Y :	$mbu^{\Delta A24-3},w^{-}/Y$	
$mbu^{P1}/Y :$	$mbu^{P1},w^{-}/Y$	($mbu^{P1(P3843/2)}$)

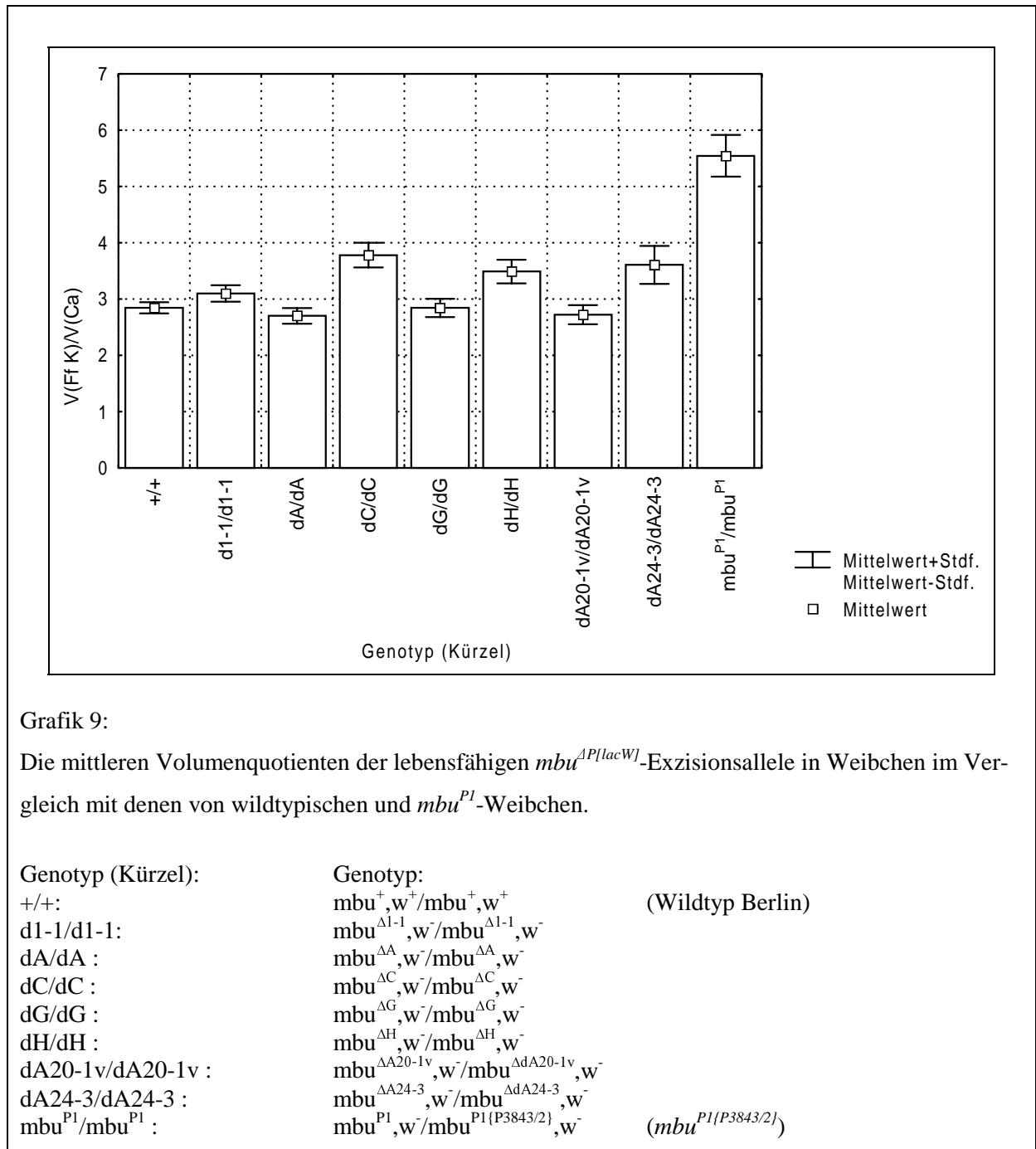
Genotyp	d1-1/d1-1	dA/dA	dC/dC	dG/dG	dH/dH	dA20-1v/ dA20-1v	dA24-3/ dA24-3	mbu^{P1}/mbu^{P1}
(n)	(12)	(10)	(11)	(10)	(12)	(8)	(5)	(26)
+/+ (31)	0,184601	0,429925	0,000630	0,855464	0,003455	0,417365	0,014401	0,000000
$p \leq 0,01$	-	-	+	-	+	-	-	+

Tabelle 18:

Irrtumswahrscheinlichkeiten, die beim Vergleich der Volumenverhältniswerte der in Grafik 9 dargestellten weiblichen mbu -Genotypen mit dem von WTB-Weibchen ermittelt wurden.

Die in Tabelle 18 aufgelisteten Irrtumswahrscheinlichkeiten sprechen dafür, daß sich die Quotienten $V(\text{Ff K})/V(\text{Ca})$ in WTB-, $mbu^{\Delta 1-1},w^{-}$, $mbu^{\Delta A},w^{-}$, $mbu^{\Delta G},w^{-}$, $mbu^{\Delta A20-1v},w^{-}$ und

$mbu^{\Delta A24-3}, w^-$ -Weibchen gleichen. Der Pilzkörperphänotyp in $mbu^{\Delta C}, w^-$ - und $mbu^{\Delta H}, w^-$ -Weibchen ist hingegen nicht vollständig revertiert.



Somit belegen vier unabhängig erzeugte Exzisionslinien ($mbu^{\Delta 1-1}, w^-$, $mbu^{\Delta A}, w^-$, $mbu^{\Delta A20-1v}, w^-$ und $mbu^{\Delta A24-3}, w^-$) in beiden Geschlechtern, daß die im Casein-Kinase-2 β -Gen inserierten P[lacW]-Elemente des $mbu^{P1\{P3843/2\}}$ -Chromosoms den mit der mbu^{P1} -Mutation assoziierten Pilzkörpercalyxphänotyp verursachen und dessen einzige Ursache sind.

D 4 Die Letalität eines der drei isolierten Letalchromosomen ist ausschließlich auf eine letale Mutation des Casein-Kinase-2 β -Gens zurückzuführen

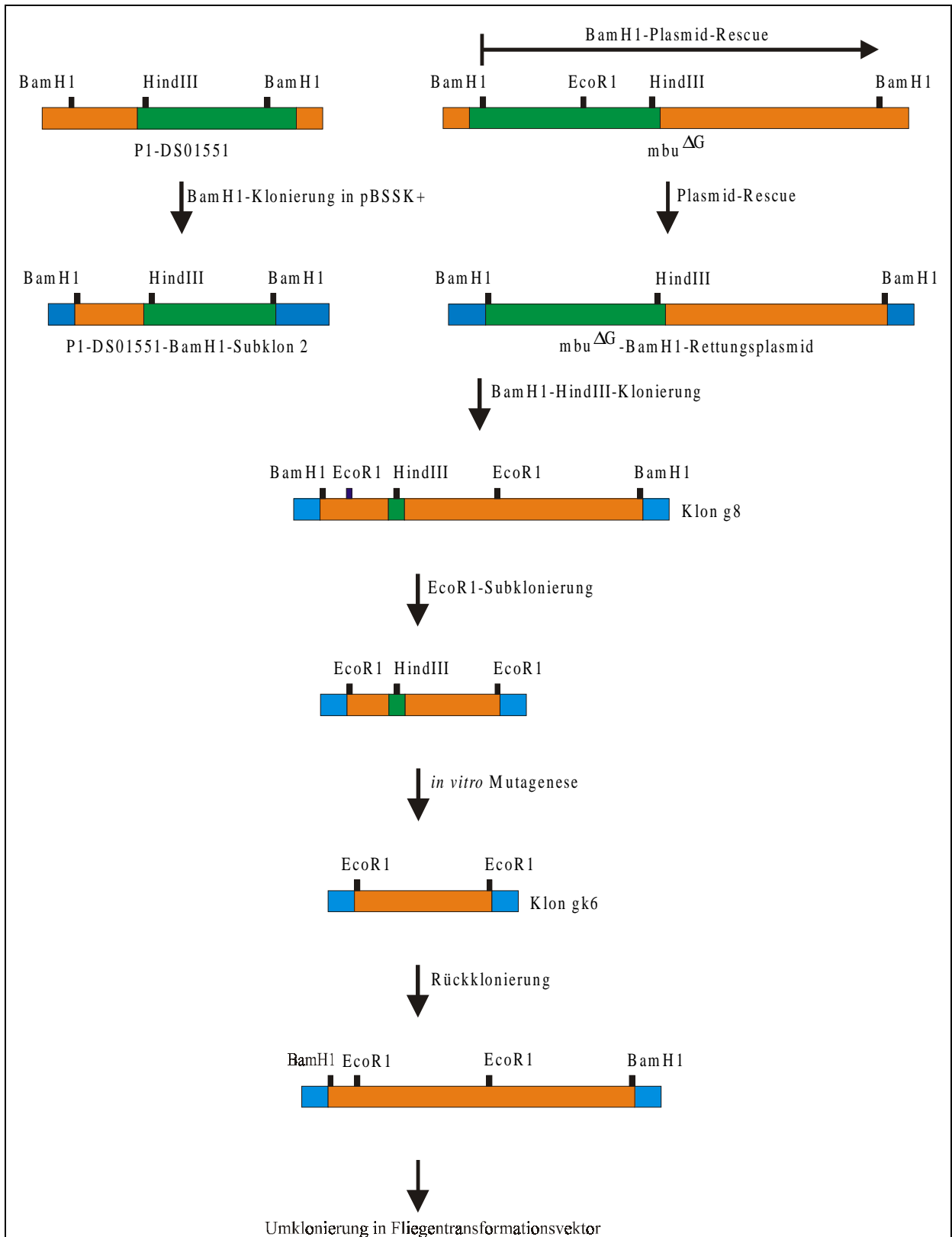
Durch die Lokalisierung der für den Pilzkörperphänotyp verantwortlichen Mutation des *mbu*^{P1(P3843/2)}-Chromosoms im Casein-Kinase-2 β -Genlokus und die Isolation dreier Letalchromosomen im Verlauf der P[lacW]-Remobilisierungsexperimente bestand die Möglichkeit, daß das Casein-Kinase-2 β -Gen ein für *Drosophila* lebensnotwendiges Gen ist.

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden 6 kb genomischer DNA (siehe Grafik 10 und 25) des CK2 β -Genlokus in einen Fliegentransformationsvektor kloniert, und das genomische CK2 β -Transgen in die das jeweilige Letalchromosom tragende *mbu*^{AP[lacW]}-Exzisionslinie eingekreuzt. Hierdurch konnte einerseits gezeigt werden, daß der Casein-Kinase-2 β -Genlokus letal mutierbar ist, und daß andererseits nur in einem der drei isolierten Letalchromosomen die letale Mutierbarkeit des CK2 β -Gens die (alleinige) Ursache der beobachteten Letalität ist. Abschnitt D 4.1 beschreibt die Klonierung des genomischen Rettungsfragments und zeigt, daß dieses in der Lage ist, die Letalität eines der drei isolierten Letalchromosomen zu retten und in diesen geretteten Tieren eine normale Pilzkörperentwicklung zu ermöglichen. In den Abschnitten D 4.2 und D 4.3 sind die Experimente beschrieben, die zu der Schlußfolgerung führten, daß die beiden anderen Letalchromosomen andere oder zusätzliche Letalmutationen tragen und daher für weiterführende Experimente unbrauchbar sind.

D 4.1 Das Casein-Kinase-2 β -Gen ist in *Drosophila melanogaster* ein essentielles Gen

Ausgangspunkte für die Klonierung von Teilen der genomischen DNA des CK2 β -Gens (Grafik 10) waren die bekannte genomische Organisation des CK2 β -Genlokus (Bidwai *et al.* 2000) und zwei genomische DNA-Fragmente, die aus einem P1-Bakteriophagenklon und einem BamH1-Rettungsplasmid des *mbu*^{AG}-Exzisionschromosoms isoliert wurden.

Aufgrund seiner kartierten cytologischen Position (10D5-10E4; Casein-Kinase-2 β : 10E1-2) erschien der P1-Klon DS01551 ein geeigneter Kandidat für die Subklonierung eines genomischen CK2 β -DNA-Fragments. Daher wurde BamH1-verdaute DS01551-DNA in pBSSK+ subkloniert und anschließend im Rahmen einer Koloniehybridisierung mit einer PCR-erzeugten Sonde durchgemustert.



Grafik 10:

Klonierungsstrategie des genomischen 6 kb großen CK2B-Rettungskonstrukts. Genomische DNA-Anteile sind orange, P-Element-Anteile grün und Vektoranteile blau dargestellt. Vom Bakteriophagenklon P1-DS01551 und dem *mbu*^{ΔG}-Allel sind nur die für die Klonierung relevanten Bereiche wiedergegeben.

Nachdem ein isolierter Klon (P1-DS01551-BamH1-Subklon 2) durch Restriktionsverdau und Sequenzierungen näher charakterisiert war, stellte sich heraus, daß das isolierte BamH1-Fragment (~4,3 kb) die ersten 1800 Basenpaare des CK2 β -Genlokus sowie eine P-Element-Insertion an eben der Stelle trug, an der auch im *mbu*^{P1{P3843/2}}-Chromosom die beiden P[lacW]-Elemente inseriert hatten. Daher konnte der P1-Klon nicht direkt zur Klonierung eines genomischen Rettungskonstrukts verwendet werden. Die Orientierung dieses P-Elements entsprach der des P1-P[lacW]-Elements von *mbu*^{P1{P3843/2}} (siehe Grafik 7). Die für das P5'-Ende eines P-Elements beschriebene HindIII-Schnittstelle konnte sowohl durch Sequenzierung als auch durch Restriktionsverdau nachgewiesen werden.

Die Southern-Blot-Analyse des *mbu* ^{Δ G}- Exzisionschromosoms (siehe Anhang 6 und Abschnitt D 7.1) legte nahe, daß die in diesem Chromosom vorhandene P[lacW]-Restinsertion die BamH1- und EcoR1-Restriktionsschnittstellen des *mbu*^{P1{P3843/2}}-P2-P[lacW]-Elements trug, die BamH1- und EcoR1-Restriktionsschnittstellen des *mbu*^{P1{P3843/2}}-P1-P[lacW] Elements dagegen nicht mehr vorhanden waren. Daher konnte auf genomischer DNA dieses Allels ein BamH1-Plasmid-Rettungsexperiment durchgeführt werden, das zur Isolation des fehlenden 3'- Bereichs (4,2 kb) des bis dahin beschriebenen CK2 β -Genlokus führte. Dieses BamH1-Rettungsplasmid enthielt ebenfalls eine im P-Element-Anteil gelegene HindIII-Schnittstelle.

Durch BamH1-HindIII-Doppelverdau und anschließende Ligation wurden die genomischen Fragmente des P1-DS01551-BamH1-Subklons 2 und des *mbu* ^{Δ G}- BamH1-Rettungsplasmids über BamH1 in pBSSK+ kloniert (Klon g8). Um die ~100 bp-Restsequenzen der P-Elemente zu deletieren, wurde ein ~2,9 kb großes EcoR1-Fragment aus Klon g8 isoliert und über EcoR1 in pBSSK+ kloniert . Unter Verwendung des Primerpaares GCK2DEL1/GCK2DEL2 (siehe B 15) konnte im Rahmen einer *in vitro*-Mutagenese eine Deletion der P-Element-Insertionssequenzen erreicht werden (Klon gk6). Durch einen EcoR1-Partialverdau des Klons g8 wurde das zu ersetzende, P-Element-Restinsertion-tragende EcoR1-Fragment entfernt und das *in vitro*-mutagenisierte EcoR1-Fragment des Klons gk6 rückkloniert. Die Orientierung dieses EcoR1-Fragments wurde durch entsprechende Restriktionsanalysen kartiert, und die richtigen Klone selektiert.

Um die so erhaltene genomische CK2 β -DNA in Fliegen transformieren zu können, wurde der Transformationsvektor pP[UAST] BamH1-verdaut. Hierdurch wurden die 5xUAS-Sequenzen, der hsp70-TATA-Promotor und das SV40-Polyadenylierungssignal entfernt. Das

CK2 β -BamH1-Fragment wurde anstelle dieser Sequenzen inseriert. Eine partielle Sequenzierung des in den Fliegentransformationsvektor klonierten gDNA-Inserts offenbarte eine 7 bp-Deletion an der ursprünglichen P-Element-Insertionsstelle.

Drei nach der Fliegentransformation erhaltene genomische CK2 β -Transgen-tragende Linien wurden nach dem in Abbildung 9 gezeigten Schema in die ein Letalchromosom tragenden Linien ($mbu^{\Delta A6-1L}, w^-/FM7a$, $mbu^{\Delta A26-2L}, w^-/FM7a$ und $mbu^{\Delta 20-1L}, w^-/FM7a$) eingekreuzt und die F1-Generation auf das Vorhandensein von Männchen durchsucht, die keinen X-chromosomalen Balancer trugen. Um ein Nondisjunction-Ereignis auszuschließen wurden solche Männchen gegen die ein Letalchromosom tragenden Linien rückgekreuzt und die Nachkommen auf die Abwesenheit eines nichtletalen w^- -Chromosoms hin überprüft. Hierdurch konnte eine erfolgte Rettung der Letalität eines Letalchromosoms sichergestellt werden.

P:	♀♀ $mbu^{\Delta P[lacW]L}, w^-/FM7a; +/+; +/+$	x	♂♂ $w^-/Y; P[CK2\beta-gDNA]^x/Bal$
F1:	♀♀ $mbu^{\Delta P[lacW]L}, w^-/FM7a; +/+; +/+$	x	♂♂ $mbu^{\Delta P[lacW]L}, w^-/Y; P[CK2\beta-gDNA]^x/+ (?)$
F2:	♀♀ $mbu^{\Delta P[lacW]L}, w^-/w^- (?)$		

Abbildung 9:

Kreuzungsschema, das zum Testen der Rettbarkeit der Letalität einzelner $mbu^{\Delta P[lacW]}, w^-$ -Exzisionschromosomen angewendet wurde. Die in der F2-Generation dargestellten Weibchen traten nur auf, wenn Männchen der F1-Kreuzung durch ein Nondisjunction-Ereignis das w^- -Chromosom der Parentalmännchen anstelle des mütterlichen $mbu^{\Delta P[lacW]}, w^-$ -Exzisionschromosoms erhielten.

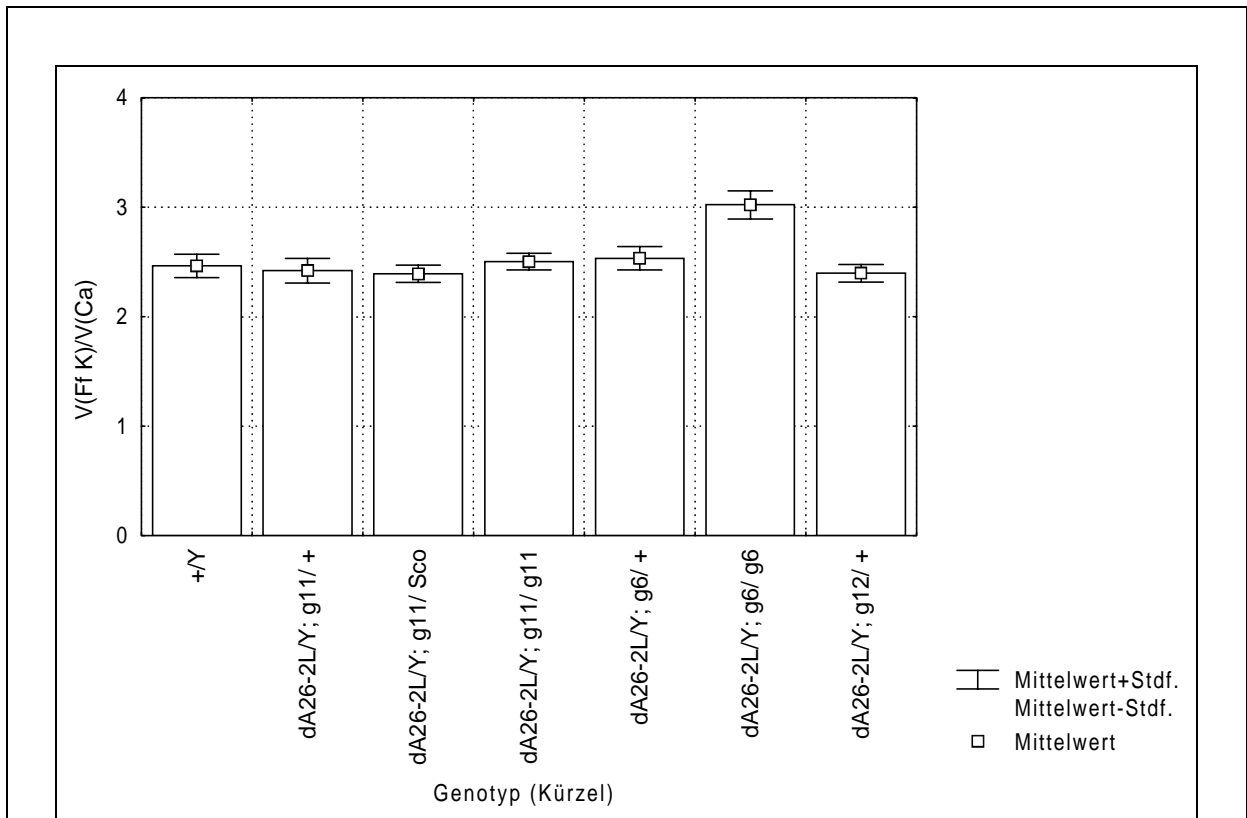
{ $w^-/Y; P[CK2\beta-gDNA]^x/+$ }-Männchen sind (bei gegebener Rettung der Letalität) phänotypisch nicht von { $mbu^{\Delta P[lacW]L}, w^-/Y; P[CK2\beta-gDNA]^x/+$ }-Männchen zu unterscheiden.

$mbu^{\Delta P[lacW]L}, w^-$ steht für ein letales $mbu^{P1\{P3843/2\}}$ -Exzisionschromosom ($mbu^{\Delta A6-1L}, w^-$, $mbu^{\Delta A26-2L}, w^-$ oder $mbu^{\Delta 20-1L}, w^-$), $P[CK2\beta-gDNA]^x$ für ein genomisches CK2 β -Transgen ($P[CK2\beta-gDNA]^6$, $P[CK2\beta-gDNA]^{11}$ oder $P[CK2\beta-gDNA]^{12}$) und Bal für ein Balancerchromosom.

Lediglich die Letalität des $mbu^{\Delta A26-2L}, w^-$ -Chromosoms konnte auf diese Weise gerettet werden. Mit allen drei genomischen CK2 β -Transgen-Insertionslinien wurden daraufhin für das $mbu^{\Delta A26-2L}, w^-$ -Chromosom homozygote Linien etabliert, die im Rahmen einer Southern-Blot-Analyse überprüft wurden. Demnach trägt das $mbu^{\Delta A26-2L}, w^-$ -Chromosom eine Deletion, die sich auf den Casein-Kinase-2 β -Genlocus beschränkt (Brkulj, Diplomarbeit 2002) und Ursache der Letalität dieses Chromosoms ist.

Da das verwendete genomische CK2 β -Transgen nicht alle exonischen Bereiche des CK2 β -Genlocus umfaßt (siehe Abschnitt D 8.2 und Grafik 25), eine 7 bp-Deletion im 5'-Bereich des

CK2 β -Genlocus trägt und somit nicht für alle CK2 β -Isoformen codiert (Abschnitt D 10), wurden sowohl Männchen als auch Weibchen dieser Linien auf ihren Pilzkörperphänotyp hin untersucht (Grafik 11 und Grafik 12).



Grafik 11:

Vergleich der mittleren Volumenquotienten der mit genomischer CK2 β -DNA geretteten $mbu^{\Delta A26-2L}, w^-$ -Männchen mit dem von wildtypischen Männchen.

Genotyp (Kürzel):

+/Y:
dA26-2L/Y;g11/+:
dA26-2L/Y;g11/Sco:
dA26-2L/Y;g11/g11:
dA26-2L/Y;g6/+:
dA26-2L/Y;g6/g6:
dA26-2L/Y;g12/+:

Genotyp:

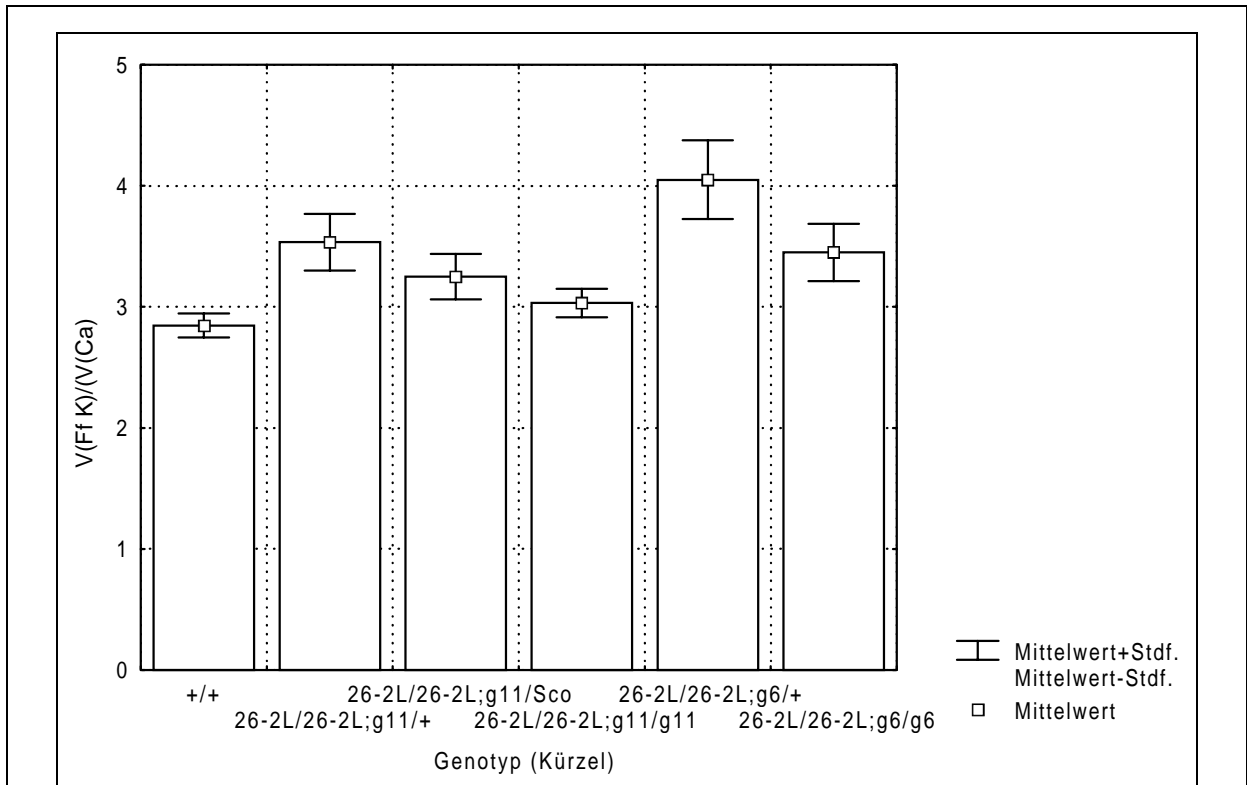
$mbu^+, w^+/Y$ (WTB)
 $mbu^{\Delta A26-2L}, w^-/Y; P[CK2\beta\text{-gDNA}]^{11}/+$
 $mbu^{\Delta A26-2L}, w^-/Y; P[CK2\beta\text{-gDNA}]^{11}/Sco$
 $mbu^{\Delta A26-2L}, w^-/Y; P[CK2\beta\text{-gDNA}]^{11}/ P[CK2\beta\text{-gDNA}]^{11}$
 $mbu^{\Delta A26-2L}, w^-/Y; P[CK2\beta\text{-gDNA}]^6/+$
 $mbu^{\Delta A26-2L}, w^-/Y; P[CK2\beta\text{-gDNA}]^6/ P[CK2\beta\text{-gDNA}]^6$
 $mbu^{\Delta A26-2L}, w^-/Y; P[CK2\beta\text{-gDNA}]^{12}/+$

p	Genotyp (n)	dA26-2L/Y; g11/+ (n=17)	dA26-2L/Y; g11/Sco (n=6)	dA26-2L/Y; g11/g11 (n=14)	dA26-2L/Y; g6/+ (n=10)	dA26-2L/Y; g6/g6 (13)	dA26-2L/Y; g12/+ (13)
	+/Y (n=26)	0,920853	0,663911	0,244999	0,358478	0,001050	0,788601
	$p \leq 0,01$	-	-	-	-	+	-

Tabelle 19:

Irrtumswahrscheinlichkeiten, die sich beim Vergleich der Volumenverhältniswerte V(Ff K)/V(Ca) der geretteten $mbu^{\Delta A26-2L}, w^-$ -Männchen mit dem von WTB-Männchen ergeben.

Wie Grafik 11 und Tabelle 19 zeigen, gleicht der jeweilige Calyxphänotyp fast aller durch Letalitätsrettung erhaltenen männlichen Genotypen (Ausnahme: $mbu^{\Delta A26-2L}, w^-/Y ; P[CK2\beta\text{-gDNA}]^6/ P[CK2\beta\text{-gDNA}]^6$ -Männchen) dem der Wildtyp Berlin-Kontrolle. Somit ist die als Transgen zur Verfügung gestellte genomische DNA des CK2 β -Genlokus in der Lage, eine normale Pilzkörperentwicklung in $mbu^{\Delta A26-2L}, w^-$ -Männchen zu ermöglichen.



Grafik 12:

Volumenquotienten geretteter $mbu^{\Delta A26-2L}, w^-$ -Weibchen im Vergleich zu dem von wildtypischen Weibchen.

Genotyp (Kürzel):

+/+:
 26-2L/26-2L;g11/+:
 26-2L/26-2L;g11/Sco:
 26-2L/26-2L;g11/g11:
 26-2L/26-2L;g6/+:
 26-2L/26-2L;g6/g6:

Genotyp:

$mbu^+, w^+/mbu^+, w^+$ (WTB)
 $mbu^{\Delta A26-2L}, w^-/mbu^{\Delta A26-2L}, w^-; P[CK2\beta\text{-gDNA}]^{11}/+$
 $mbu^{\Delta A26-2L}, w^-/mbu^{\Delta A26-2L}, w^-; P[CK2\beta\text{-gDNA}]^{11}/Sco$
 $mbu^{\Delta A26-2L}, w^-/mbu^{\Delta A26-2L}, w^-; P[CK2\beta\text{-gDNA}]^{11}/P[CK2\beta\text{-gDNA}]^{11}$
 $mbu^{\Delta A26-2L}, w^-/mbu^{\Delta A26-2L}, w^-; P[CK2\beta\text{-gDNA}]^6/+$
 $mbu^{\Delta A26-2L}, w^-/mbu^{\Delta A26-2L}, w^-; P[CK2\beta\text{-gDNA}]^6/P[CK2\beta\text{-gDNA}]^6$

p	Genotyp (n)	26-2L/26-2L; g11/+ (8)	26-2L/26-2L; g11/Sco (7)	26-2L/26-2L; g11/g11 (23)	26-2L/26-2L; g6/+ (9)	26-2L/26-2L; g6/g6 (10)
	+/+ (31)	0,008214	0,067816	0,198544	0,001423	0,009870
	$p \leq 0,01$	+	-	-	+	+

Tabelle 20:

Die sich beim Vergleich der Volumenquotienten geretteter $mbu^{\Delta A26-2L}, w^-$ -Weibchen mit dem von WTB-Kontrollweibchen ergebenden Irrtumswahrscheinlichkeiten.

Nur zwei ($mbu^{\Delta A26-2L}, w^- / mbu^{\Delta A26-2L}, w^-; P[CK2\beta\text{-gDNA}]^{11} / Sco$ und $mbu^{\Delta A26-2L}, w^- / mbu^{\Delta A26-2L}, w^-; P[CK2\beta\text{-gDNA}]^{11} / P[CK2\beta\text{-gDNA}]^{11}$) der fünf untersuchten, durch das genomische Transgen geretteten weiblichen $mbu^{\Delta A26-2L}, w^-$ -Stichproben weisen einen dem WTB vergleichbaren Volumenquotienten auf (Tabelle 20), wobei die größte Stichprobe ($mbu^{\Delta A26-2L}, w^- / mbu^{\Delta A26-2L}, w^-; P[CK2\beta\text{-gDNA}]^{11} / P[CK2\beta\text{-gDNA}]^{11}$; n=23) der wildtypischen Kontrolle am ähnlichsten ist. Daher wird angenommen, daß eine als Transgen zur Verfügung gestellte genomische DNA des CK2 β -Genlokus auch in Weibchen eine normale Pilzkörperentwicklung ermöglicht.

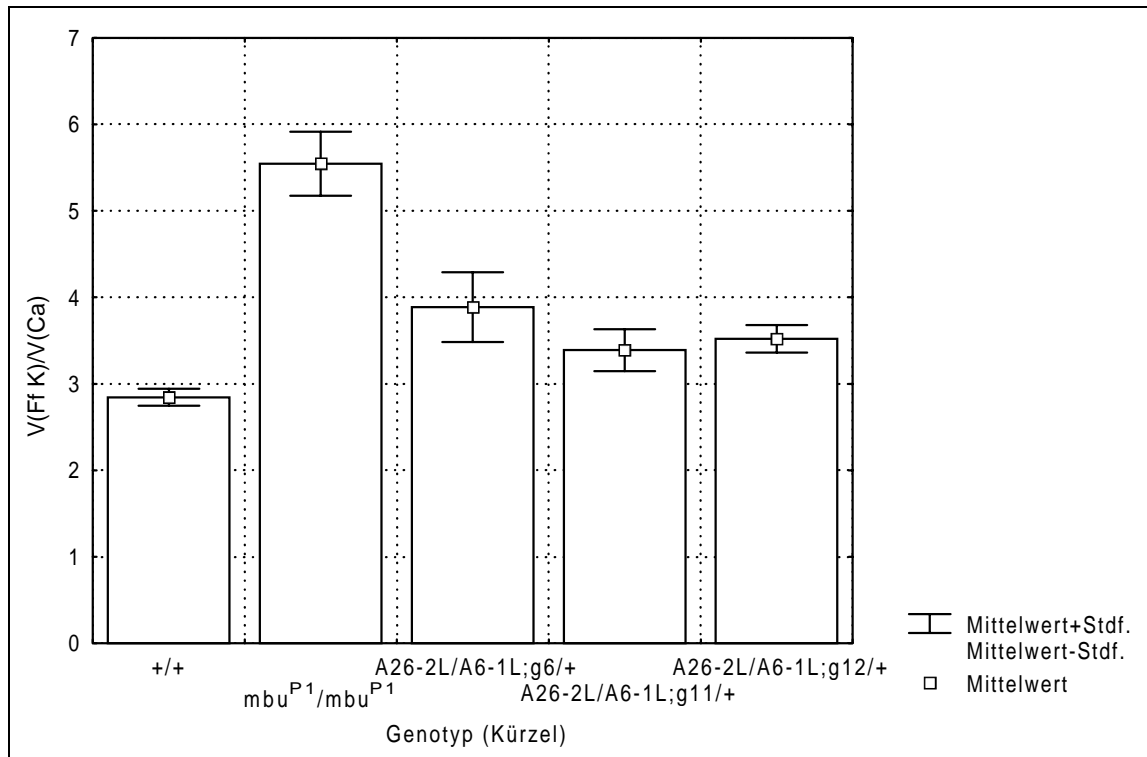
D 4.2 Die Letalität des $mbu^{\Delta A6-1L}, w^-$ -Chromosoms wird durch mindestens eine Mutation verursacht, die keine Letalmutation des CK2 β -Gens ist

Da es sich bei der $mbu^{\Delta A26-2L}, w^-$ -Mutation um eine Nullmutation (teilweise Deletion) des Casein-Kinase-2 β Gens handelt (Brkulj, Diplomarbeit 2002), kann gefolgert werden, daß das im Rettungsexperiment als Transgen verwendete 6 kb große genomische CK2 β -DNA-Fragment alle essentiellen regulatorischen und proteincodierenden Anteile des CK2 β -Gens trägt. Nachdem eine Rettung der mit dem $mbu^{\Delta A6-1L}, w^-$ -Chromosom assoziierten Letalität mit einem solchen genomischen Transgen unmöglich ist (Abschnitt D 4.1), muß diese weitere oder andere Ursachen als die Deletion des Casein-Kinase-2 β Gens haben. Um diese Schlußfolgerung zu überprüfen, wurden gerettete $mbu^{\Delta A26-2L}, w^-$ -Männchen mit balancierten, heterozygoten $mbu^{\Delta A6-1L}, w^-$ -Weibchen verpaart (Abbildung 10) und die erhaltenen, für die beiden mbu -Exzisionschromosomen transheterozygoten F1-Töchter auf eine Lebensfähigkeit ohne genomisches CK2 β -Transgen hin überprüft. Diese konnten isoliert werden und wurden (Grafik 14 und Tabelle 22) nebst transheterozygoten Weibchen mit genomischem Transgen (Grafik 13 und Tabelle 21) auf ihren Pilzkörperphänotyp hin überprüft. Hierdurch wurde die CK2 β -Mutation des $mbu^{\Delta A6-1L}, w^-$ -Chromosoms charakterisiert.

P:	$\Delta\Delta mbu^{\Delta A6-1L}, w^- / FM7a; +/+; +/+$	x	$\Gamma\Gamma mbu^{\Delta A26-2L}, w^- / Y; P[CK2\beta\text{-gDNA}]^x / Bal$
F1:	$\Delta\Delta mbu^{\Delta A6-1L}, w^- / mbu^{\Delta A26-2L}, w^-; +/+; +/+$	und	$\Delta\Delta mbu^{\Delta A6-1L}, w^- / mbu^{\Delta A26-2L}, w^-; P[CK2\beta\text{-gDNA}]^x / +$

Abbildung 10:

Kreuzungsschema, das zum Testen der CK2 β -Mutation des $mbu^{\Delta A6-1L}, w^-$ -Chromosoms angewendet wurde.



Grafik 13:

Vergleich der Volumenverhältnisse (Fächerförmiger Körper/Calyx) der ein genomisches CK2 β -transgen tragenden $mbu^{\Delta A26-2L},w^-/mbu^{\Delta A6-1L},w^-$ -Weibchen mit denen von wildtypischen und mbu^{P1} -Weibchen.

Genotyp (Kürzel):

+/+:
 mbu^{P1}/mbu^{P1} :
 A26-2L/A6-1L; g6/+:
 A26-2L/A6-1L; g11/+:
 A26-2L/A6-1L; g12/+:

Genotyp:

$mbu^+,w^+/mbu^+,w^+$ (WTB)
 $mbu^{P1},w^-/mbu^{P1},w^-$ ($mbu^{P1(P3843/2)}$)
 $mbu^{\Delta A26-2L},w^-/mbu^{\Delta A6-1L},w^-$; P[CK2 β -gDNA]⁶/+
 $mbu^{\Delta A26-2L},w^-/mbu^{\Delta A6-1L},w^-$; P[CK2 β -gDNA]¹¹/+
 $mbu^{\Delta A26-2L},w^-/mbu^{\Delta A6-1L},w^-$; P[CK2 β -gDNA]¹²/+

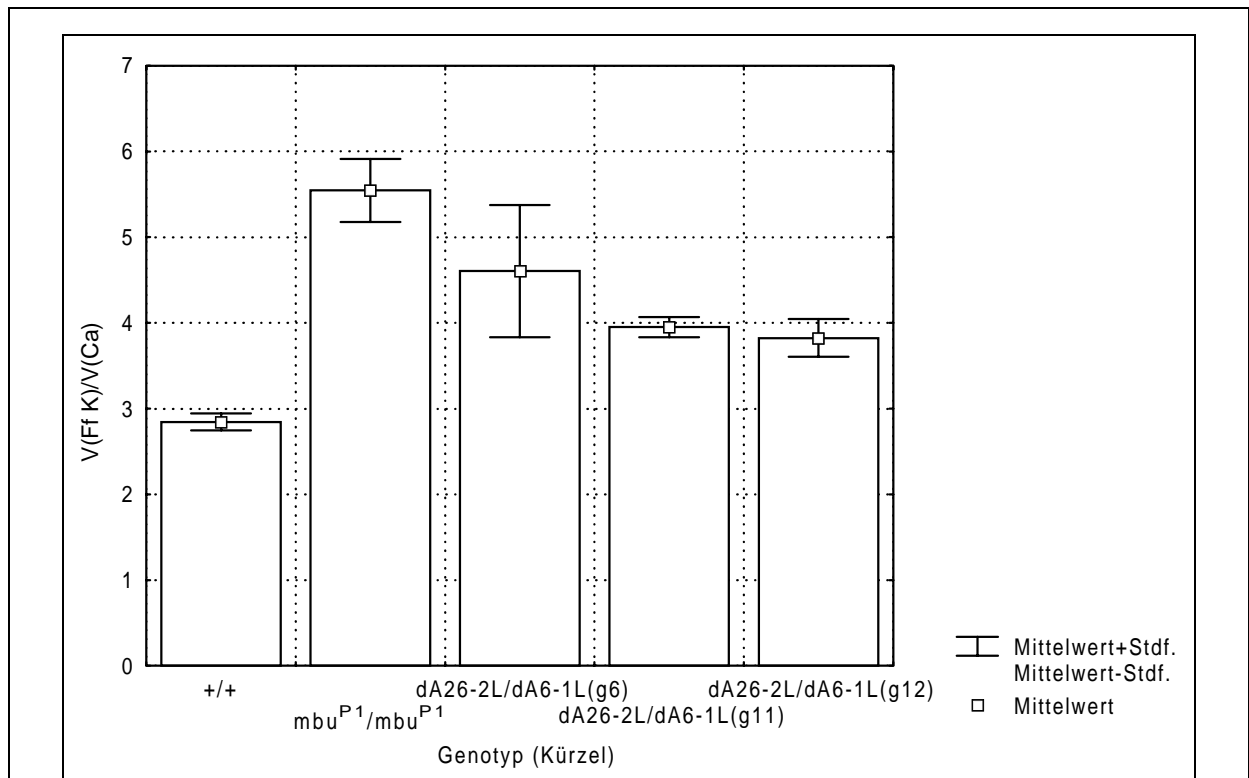
p	Genotyp (n)	A26-2L/A6-1L;g6/+ (7)	A26-2L/A6-1L;g11/+ (9)	A26-2L/A6-1L;g12/+ (10)
	+/+ (31)	0,004472	0,020575	0,000840
	mbu^{P1}/mbu^{P1} (26)	0,019605	0,000517	0,000361

Tabelle 21:

Irrtumswahrscheinlichkeiten, die beim Vergleich der Volumenverhältniswerte der in Grafik 13 dargestellten, ein genomisches transgen tragenden $mbu^{\Delta A26-2L},w^-/mbu^{\Delta A6-1L},w^-$ -Weibchen mit denen von WTB- und mbu^{P1} -Weibchen ermittelt wurden.

Die Bereitstellung nur eines genomischen CK2 β -Transgens kann zwar zu einer normalen Pilzkörperentwicklung in $mbu^{\Delta A26-2L},w^-/mbu^{\Delta A6-1L},w^-$ -Weibchen führen (siehe $mbu^{\Delta A26-2L},w^-/mbu^{\Delta A6-1L},w^-$; P[CK2 β -gDNA]¹¹/+), jedoch wurde in den zwei anderen Fällen eine unvoll-

ständige Rettung des Pilzkörperphänotyps beobachtet. Wie in Grafik 14 und Tabelle 22 gezeigt ist der Pilzkörpercalyxphänotyp von transheterozygoten $mbu^{\Delta A26-2L},w^-/mbu^{\Delta A6-1L},w^-$ -Weibchen entweder nicht von dem der mbu^{P1} -Weibchen zu unterscheiden (Weibchen der Kreuzung, in der $mbu^{\Delta A26-2L},w^-/Y$; P[CK2 β -gDNA]⁶/Tm3,Sb-Männchen als Väter verwendet wurden) oder aber er liegt zwischen dem von wildtypischen und mbu^{P1} -Weibchen.



Grafik 14:

Vergleich der mittleren Volumenquotienten der kein genomisches transgenetragenden Schwesterfliegen der in Grafik 13 gezeigten $mbu^{\Delta A26-2L},w^-/mbu^{\Delta A6-1L},w^-$ -Weibchen mit denen von wildtypischen und mbu^{P1} -Weibchen. In Klammern stehen hinter den Genotypen Abkürzungen für die Kreuzungen (z.B. P-Männchen in Abbildung 10: $mbu^{\Delta A26-2L},w^-/Y$; P[CK2 β -gDNA]⁶/TM3,Sb ► g6-Kreuzung), aus denen diese Weibchen stammen.

Genotyp (Kürzel):

+/+:

mbu^{P1}/mbu^{P1} :

dA26-2L/dA6-1L(g6):

dA26-2L/dA6-1L(g11):

dA26-2L/dA6-1L(g12):

Genotyp:

$mbu^+,w^+/mbu^+,w^+$

$mbu^{P1},w^-/mbu^{P1},w^-$

$mbu^{\Delta A26-2L},w^-/mbu^{\Delta A6-1L},w^-$; TM3,Sb/+

$mbu^{\Delta A26-2L},w^-/mbu^{\Delta A6-1L},w^-$; SM6a,CyO/+

$mbu^{\Delta A26-2L},w^-/mbu^{\Delta A6-1L},w^-$; TM3,Sb/+

(WTB)

($mbu^{P1(P3843/2)}$)

(aus g6-Kreuzung)

(aus g11-Kreuzung)

(aus g12-Kreuzung)

Genotyp (n)	dA26-2L/dA6-1L(g6) (7)	dA26-2L/dA6-1L(g11) (10)	dA26-2L/dA6-1L(g12) (9)
+/+ (31)	0,000374	0,000021	0,000391
mbu^{PI}/mbu^{PI} (26)	0,085910	0,002684	0,004648

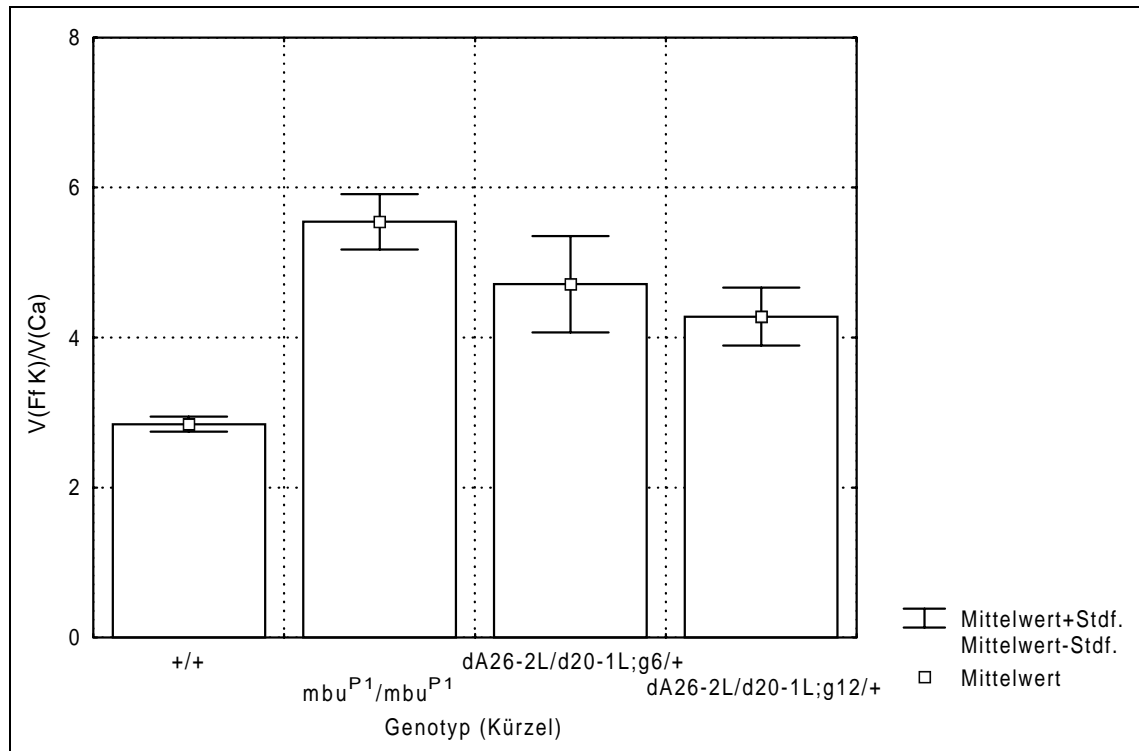
Tabelle 22:

Irrtumswahrscheinlichkeiten, die sich beim Vergleich der Volumenverhältniswerte $V(\text{Ff K})/V(\text{Ca})$ der kein genomisches transgen tragenden $mbu^{\Delta A26-2L},w^-/mbu^{\Delta A6-1L},w^-$ -Weibchen mit denen von WTB- und mbu^{PI} -Weibchen ergeben.

Somit trägt das $mbu^{\Delta A6-1L},w^-$ -Chromosom einerseits eine Mutation im Casein-Kinase-2 β -Genlocus, die eine normale Entwicklung der Pilzkörper verhindert (Tabelle 22 und Grafik 14), durch Bereitstellung eines genomischen Casein-Kinase-2 β -Transgens rettbar ist (siehe $mbu^{\Delta A26-2L},w^-/mbu^{\Delta A6-1L},w^-$; $P[\text{CK2}\beta\text{gDNA}]^{11}/+$) und durch das $mbu^{\Delta A26-2L},w^-$ -Chromosom aufgedeckt wird, andererseits ist diese CK2 β -Mutation keine Letalmutation, da transheterozygote $mbu^{\Delta A26-2L},w^-/mbu^{\Delta A6-1L},w^-$ -Weibchen lebensfähig sind. Eine im Rahmen einer Zusammenarbeit von Akten Bikem durchgeführte Southern-Blot-Analyse dieses Chromosoms ergab, daß die beiden mbu^{PI} -P[lacW]-Elemente nur teilweise durch Remobilisierung entfernt wurden und hierbei keine flankierende genomische CK2 β -DNA deletiert wurde (persönliche Mitteilung). Die Letalität des $mbu^{\Delta A6-1L},w^-$ -Chromosoms wurde vermutlich während der Remobilisierungsmutagenese in einem zweiten X-chromosomal Genlocus induziert und wird durch das $mbu^{\Delta A26-2L},w^-$ -Chromosom komplementiert. Dieses Chromosom wurde daher in keinem weiteren Experiment verwendet.

D 4.3 Das $mbu^{\Delta 20-1L},w^-$ -Chromosom trägt sowohl eine Letalmutation des CK2 β -Gens als auch eine zweite, von CK2 β unabhängige Letalmutation

Da die Letalität des $mbu^{\Delta 20-1L},w^-$ -Chromosoms nicht durch die Bereitstellung eines genomischen Casein-Kinase-2 β -Transgens rettbar war (Abschnitt D 4.1) wurde zur weiteren Analyse wie für die Untersuchung des $mbu^{\Delta A6-1L},w^-$ -Chromosoms verfahren. Bei einer Kreuzung von balancierten, heterozygoten $mbu^{\Delta 20-1L},w^-$ -Weibchen mit durch ein genomisches CK2 β -Transgen geretteten $mbu^{\Delta A26-2L},w^-$ -Männchen (Abbildung 10) konnten in der F1 jedoch nur Weibchen isoliert werden, die beide Letalchromosomen und zusätzlich ein genomisches CK2 β -Transgen trugen. Der Pilzkörpercalyxphänotyp dieser Weibchen ist in Grafik 15 gezeigt.



Grafik 15:

Vergleich der mittleren Volumenverhältnisse $[V(Ff K)/V(Ca)]$ der mit genomischer CK2 β -DNA geretteten $mbu^{\Delta A26-2L},w^-/mbu^{\Delta 20-1L},w^-$ -Weibchen mit denen von wildtypischen und mbu^{P1} -Weibchen.

Genotyp (Kürzel):

+/+:

mbu^{P1}/mbu^{P1} :

$dA26-2L/d20-1L;g6/+$:

$dA26-2L/d20-1L;g12/+$:

Genotyp:

$mbu^+,w^+/mbu^+,w^+$

$mbu^{P1},w^-/mbu^{P1},w^-$

$mbu^{\Delta A26-2L},w^-/mbu^{\Delta 20-1L},w^-; P[CK2\beta-gDNA]^6/+$

$mbu^{\Delta A26-2L},w^-/mbu^{\Delta 20-1L},w^-; P[CK2\beta-gDNA]^{12}/+$

(WTB)

($mbu^{P1(P3843/2)}$)

Genotyp (n)	$dA26-2L/d20-1L;g6/+$ (9)	$dA26-2L/d20-1L;g12/+$ (9)
+/+ (31)	0,001590	0,001271
mbu^{P1}/mbu^{P1} (26)	0,273729	0,076089

Tabelle 23:

Die sich beim Vergleich der Volumenquotienten geretteter $mbu^{\Delta A26-2L},w^-/mbu^{\Delta 20-1L},w^-$ -Weibchen mit denen von WTB- und mbu^{P1} -Weibchen ergebenden Irrtumswahrscheinlichkeiten.

Demnach konnte durch Bereitstellung eines genomischen CK2 β -Transgens zwar die Letalität transheterozygoter $mbu^{\Delta A26-2L},w^-/mbu^{\Delta 20-1L},w^-$ -Weibchen, nicht aber deren Pilzkörpercalyxphänotyp gerettet werden. Da keine für die beiden Letalchromosomen transheterozygoten Weibchen ohne genomisches Rettungskonstrukt isoliert werden konnten, trägt das $mbu^{\Delta 20-1L},w^-$ -Chromosom eine Letalmutation des CK2 β -Gens. Zusätzlich muß mindestens

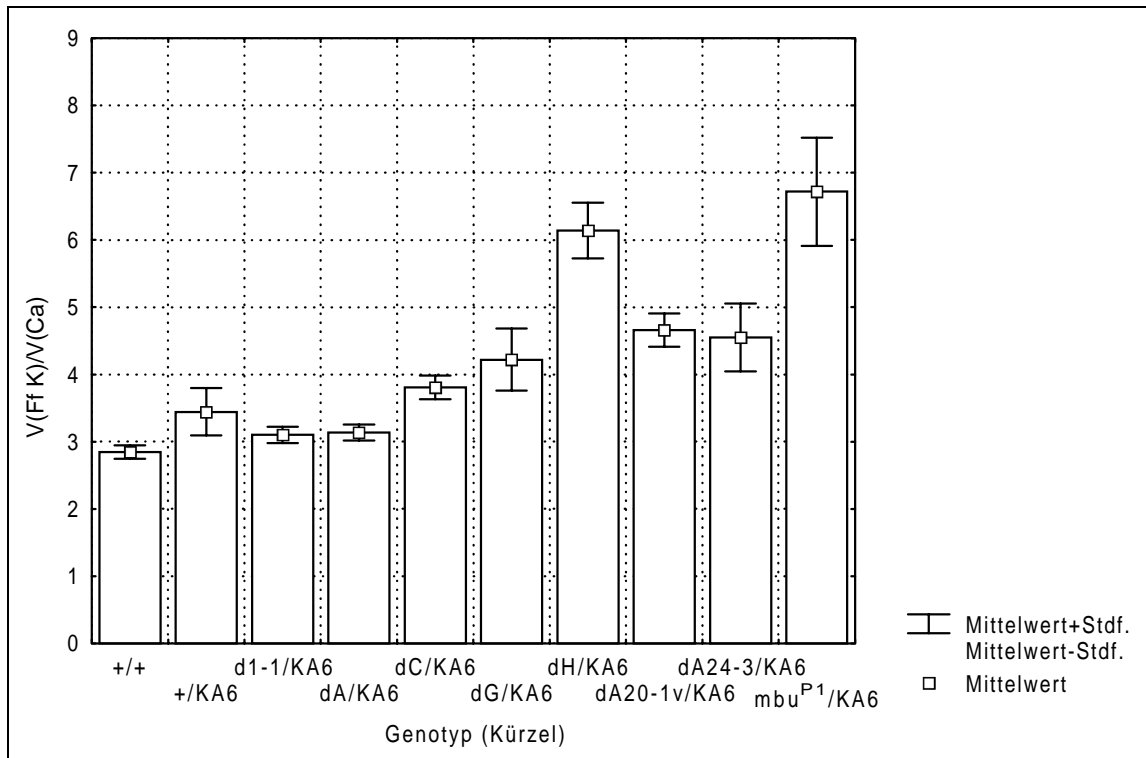
eine zweite X-chromosomale Letalmutationen vorhanden sein, die durch das $mbu^{\Delta A26-2L}, w^-$ -Chromosom komplementiert wird, da ein genomisches CK2 β -Rettungskonstrukt die Letalität des $mbu^{\Delta 20-1L}, w^-$ -Chromosoms nicht retten kann (Abschnitt D 4.1). Eine von Akten Bikem durchgeführte Southern-Blot-Analyse dieses Chromosoms ergab, daß Teile der $mbu^{P1\{P3843/2\}}$ -P[lacW]-Elemente und Teile der flankierenden genomischen 3'-CK2 β -DNA durch Remobilisierung entfernt wurden (der Deletionsbruchpunkt liegt bei 5300-5500 bezogen auf das klonierte genomische CK2 β -Fragment; persönliche Mitteilung). Dieses Chromosom wurde von weiteren Experimenten ausgeschlossen.

D 5 mbu^{P1} verhält sich genetisch wie ein hypomorphes CK2 β -Allel

Die Insertion der beiden $mbu^{P1\{P3843/2\}}$ -P[lacW]-Elemente im 5'-Bereich des CK2 β -Gens und dessen letale Mutierbarkeit legten die Vermutung nahe, daß es sich bei mbu^{P1} und davon abgeleiteten mbu -Allelen um keine Nullallele, sondern um hypomorphe Allele von CK2 β handeln könnte. Um diese Arbeitshypothese zu überprüfen, wurden die lebensfähigen $mbu^{\Delta P\{lacW\}}$ -Exzisionschromosomen einerseits über die letale Defizienz Df(1)KA6 (Abschnitt D 5.1), die unter anderem das CK2 β -Gen vollständig entfernt, und andererseits über das CK2 β -Deletionschromosom $mbu^{\Delta A26-2L}, w^-$ (Abschnitt D 5.2) gelegt und die Expressivität des Pilzkörperstrukturdefekts ermittelt. Hierdurch konnte der Charakter der mbu^{P1} -CK2 β -Mutation und die der anderen lebensfähigen mbu -Allele durch Vergleich des beobachteten Pilzkörperphänotyps genetisch genauer charakterisiert werden. Die durchgeführten Messungen zeigen, daß mbu^{P1} und manche davon abgeleitete mbu -Allele hypomorphe Mutationen des CK2 β -Gens sind, da sich der Pilzkörperphänotyp über CK2 β -Defizienzchromosomen verstärken kann oder in diesem Zustand erst ausgeprägt wird.

D 5.1 Charakterisierung des Pilzkörperphänotyps verschiedener mbu -Allele im transheterozygoten Zustand zur Defizienz Df(1)KA6

Die Defizienz Df(1)KA6 wurde für die genetische Charakterisierung der lebensfähigen mbu -Allele verwendet, da sie in einem von mbu^{P1} unabhängigen Mutageneseansatz erzeugt wurde und daher keine eventuell auf dem $mbu^{P1\{P3843/2\}}$ -Chromosom (und somit auch auf den $mbu^{\Delta P\{lacW\}}$ -Exzisionschromosomen) vorhandene Zweitmutationen tragen sollte. Zur Erzeugung der transheterozygoten Weibchen wurden w^{1118} -, mbu^{P1} - oder $mbu^{\Delta P\{lacW\}}$ -Männchen mit FM7a-balancierten Df(1)KA6-Weibchen verpaart. Grafik 16 zeigt die Phänotypen der F1-Weibchen dieser Kreuzungen.



Grafik 16:

Vergleich der mittleren Volumenquotienten verschiedener transheterozygoter Weibchen mit dem von wildtypischen Weibchen.

Genotyp (Kürzel):

+/+:

+/KA6:

d1-1/KA6:

dA/KA6 :

dC/KA6 :

dG/KA6 :

dH/KA6 :

dA20-1v/KA6 :

dA24-3/KA6 :

mbu^{P1}/KA6 :

Genotyp:

mbu⁺,w⁺/mbu⁺,w⁺

mbu⁺,w⁻/Df(1)KA6,w⁺

mbu^{Δ1-1},w⁻/Df(1)KA6,w⁺

mbu^{ΔA},w⁻/Df(1)KA6,w⁺

mbu^{ΔC},w⁻/Df(1)KA6,w⁺

mbu^{ΔG},w⁻/Df(1)KA6,w⁺

mbu^{ΔH},w⁻/Df(1)KA6,w⁺

mbu^{ΔA20-1v},w⁻/Df(1)KA6,w⁺

mbu^{ΔA24-3},w⁻/Df(1)KA6,w⁺

mbu^{P1},w⁻/Df(1)KA6,w⁺

(Wildtyp Berlin)

Genotyp	+/KA6	d1-1/ KA6	dA/KA6	dC/KA6	dG/KA6	dH/KA6	dA20-1v /KA6	dA24-3/ KA6	mbu ^{P1} /KA6
(n)	(16)	(15)	(10)	(15)	(14)	(15)	(10)	(15)	(5)
+/+ (n=31)	0,101244	0,085029	0,048467	0,000032	0,000047	0,000000	0,000008	0,000032	0,000393
p ≤ 0,01	-	-	-	+	+	+	+	+	+

Tabelle 24:

Irrtumswahrscheinlichkeiten, die sich beim Vergleich der Volumenquotienten V(Ff K)/V(Ca) der transheterozygoten Weibchen aus Grafik 16 mit dem von WTB-Weibchen ergeben.

Wie im Abschnitt D 3.2 gezeigt, unterscheiden sich im homozygoten Zustand lediglich die mittleren Volumenverhältniswerte der *mbu*-Allele *mbu*^{ΔC}, *mbu*^{ΔH} und *mbu*^{P1} signifikant vom mittleren Volumenverhältniswert von WTB-Weibchen. Legt man die lebensfähigen *mbu*-Allele über die Defizienz Df(1)KA6, sind fast alle mittleren Volumenverhältniswerte der transheterozygoten Weibchen (Ausnahmen sind *mbu*^{ΔI-1} und *mbu*^{ΔA} über Df(1)KA6) signifikant in ihrem Unterschied zu WTB-Kontrolltieren. Auch der Phänotyp der *mbu*^{ΔH}- und *mbu*^{P1}-Allele wird über dieser Defizienz im Vergleich zum homozygoten Zustand dieser Allele verstärkt (vergleiche Grafik 9).

D 5.2 Charakterisierung des Pilzkörperphänotyps verschiedener *mbu*-Allele im transheterozygoten Zustand zu der Defizienz *mbu*^{ΔA26-2L}

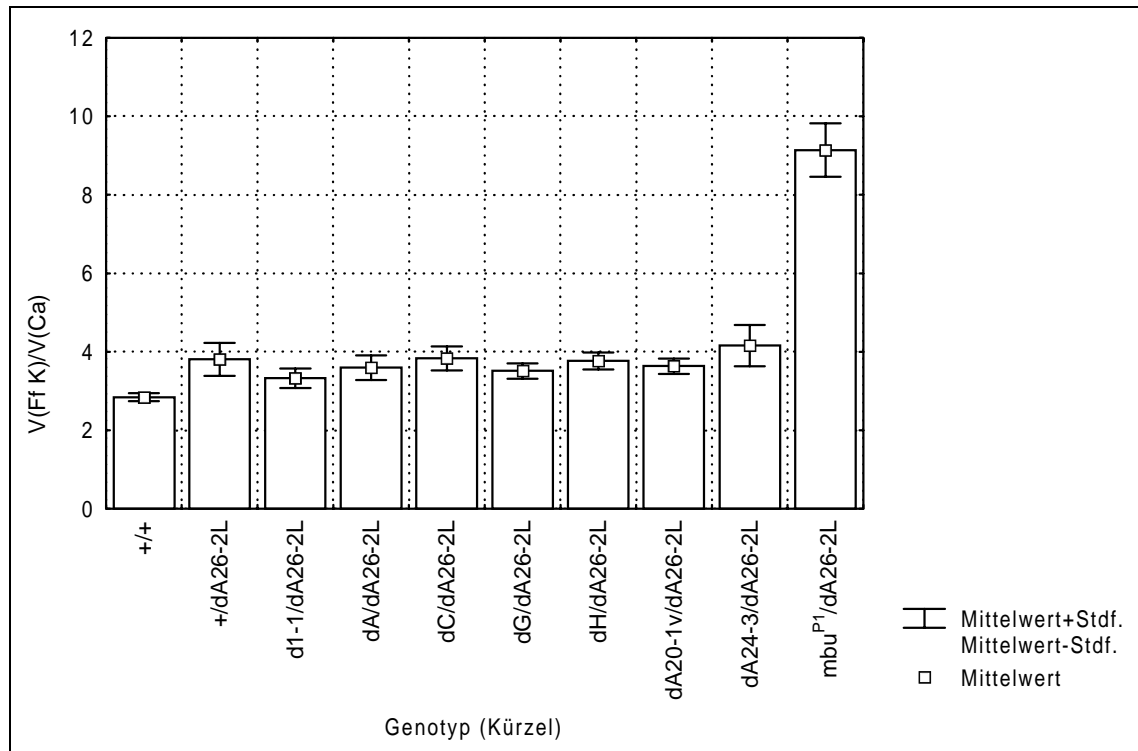
Um die im vorherigen Abschnitt erhaltenen Resultate zu überprüfen, wurden alle lebensfähigen *mbu*-Allele über das eine CK2β-defizienztragende *mbu*^{ΔA26-2L}-Allel gelegt. Hierzu wurden *w*¹¹¹⁸-, *mbu*^{P1}- oder *mbu*^{ΔP[lacW]}-Männchen mit FM7a-balancierten *mbu*^{ΔA26-2L}-Weibchen verpaart. In Grafik 17 sind die Phänotypen der F1-Weibchen dieser Kreuzungen dargestellt. Die in diesem Experiment ermittelten Ergebnisse gleichen denen, die im vorherigen Abschnitt beschrieben wurden. Einzig die Verstärkung des Phänotyps des *mbu*^{ΔH}-Allels konnte nicht in dem oben beobachteten Ausmaß gefunden werden. Die Verstärkung des *mbu*^{P1}-Phänotyps durch die Defizienz *mbu*^{ΔA26-2L} hingegen ist noch ausgeprägter als im transheterozygoten Zustand dieses Allels zur Defizienz Df(1)KA6.

Genotyp	+/ dA26-2L	d1-1/ dA26-2L	dA/ dA26-2L	dC/ dA26-2L	dG/ dA26-2L	dH/ dA26-2L	dA20-1v/ dA26-2L	dA24-3/ dA26-2L	<i>mbu</i> ^{P1} / dA26-2L
(n)	(12)	(12)	(8)	(10)	(16)	(15)	(10)	(12)	(15)
+/+ (31)	0,039616	0,098612	0,019797	0,003928	0,002102	0,000246	0,000840	0,000714	0,000000
p ≤ 0,01	-	-	-	+	+	+	+	+	+

Tabelle 25:

Irrtumswahrscheinlichkeiten, die sich beim Vergleich der Volumenverhältniswerte V(Ff K)/V(Ca) der transheterozygoten *w*¹¹¹⁸/*mbu*^{ΔA26-2L},*w*⁻-, *mbu*^{ΔP[lacW]},*w*⁻/*mbu*^{ΔA26-2L},*w*⁻- und *mbu*^{P1},*w*⁻/*mbu*^{ΔA26-2L},*w*⁻- Weibchen mit dem von WTB-Weibchen ergeben.

Betrachtet man die Pilzkörperphänotypen der verschiedenen *mbu*-Allele im transheterozygoten Zustand zu den zwei CK2β-Defizienzen, kann man zunächst folgern, daß ein wildtypisches CK2β-Allel in Weibchen genügt, um eine normale Pilzkörperentwicklung zu gewährleisten (vgl. *w*¹¹¹⁸/*mbu*^{ΔA26-2L},*w*⁻). Zwei von *mbu*^{P1} abgeleitete P[lacW]-Exzisionsallele (*mbu*^{ΔI-1} und *mbu*^{ΔA}) zeigen über den beiden CK2β-Defizienzen ebenfalls eine normale Pilzkörperentwicklung.



Grafik 17:

Vergleich der mittleren Volumenverhältniswerte von verschiedenen Weibchen mit einem *mbu*-Allel über der Defizienz *mbu*^{ΔA26-2L} mit dem mittleren Volumenquotienten von wildtypischen Weibchen.

Genotyp (Kürzel):

+/+:

+/dA26-2L:

d1-1/dA26-2L:

dA/dA26-2L:

dC/dA26-2L:

dG/dA26-2L:

dH/dA26-2L:

dA20-1v/dA26-2L:

dA24-3/dA26-2L:

mbu^{P1}/dA26-2L:

Genotyp:

mbu⁺,w⁺/mbu⁺,w⁺

mbu⁺,w⁻/mbu^{ΔA26-2L},w⁻

mbu^{Δ1-1},w⁻/mbu^{ΔA26-2L},w⁻

mbu^{ΔA},w⁻/mbu^{ΔA26-2L},w⁻

mbu^{ΔC},w⁻/mbu^{ΔA26-2L},w⁻

mbu^{ΔG},w⁻/mbu^{ΔA26-2L},w⁻

mbu^{ΔH},w⁻/mbu^{ΔA26-2L},w⁻

mbu^{ΔA20-1v},w⁻/mbu^{ΔA26-2L},w⁻

mbu^{ΔA24-3},w⁻/mbu^{ΔA26-2L},w⁻

mbu^{P1},w⁻/mbu^{ΔA26-2L},w⁻

(Wildtyp Berlin)

Diese beiden Allele weisen auch im hemi- oder homozygoten Zustand einen normalen Pilzkörpercalyxphänotyp auf (Abschnitt D 3.2). Alle anderen Allele zeigen über beiden Defizienzen einen Pilzkörperentwicklungsdefekt, auch diejenigen, die dies im hemi- und/oder homozygoten Zustand nicht tun (*mbu*^{ΔC}, *mbu*^{ΔG}, *mbu*^{ΔA20-1v} und *mbu*^{ΔA24-3}; sie könnten daher hypomorphe *mbu*-Allele sein). Am deutlichsten trat eine Verstärkung des Pilzkörperphänotyps in *mbu*^{P1},w⁻/mbu^{ΔA26-2L},w⁻ - und *mbu*^{ΔH},w⁻/Df(1)KA6,w⁺ -Weibchen auf. Der mittlere Volumenquotient liegt in *mbu*^{P1}-Weibchen bei ≈ 5 (Abschnitt D 2.2), in *mbu*^{P1},w⁻/mbu^{ΔA26-2L},w⁻ -Weibchen hingegen bei ≈ 9 (diese Weibchen zeigen in histologischen

Schnitten extrem verkleinerte Pilzkörper). $mbu^{\Delta H}$ -Weibchen haben einen mittleren Volumenquotienten von $\approx 3,5$ (Abschnitt D 3.2), in $mbu^{\Delta H}, w^- / Df(1)KA6, w^+$ -Weibchen liegt er bei ≈ 6 . Somit verhalten sich die Allele $mbu^{\Delta H}$ und mbu^{P1} genetisch wie hypomorphe Allele.

D 6 Nahezu alle mbu -Exzisionsallele interagieren im transheterozygoten Zustand mit dem $mbu^{P1\{P3843/2\}}$ -Chromosom

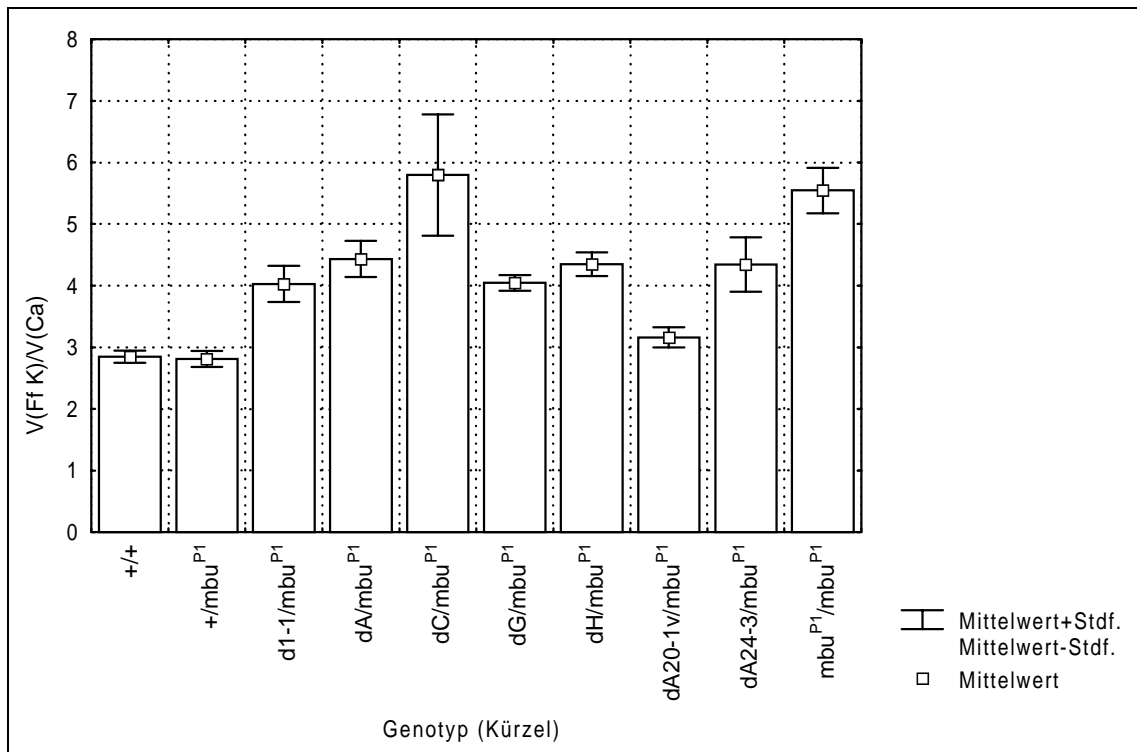
Die durch Remobilisierungsmutagenese erzeugten vitalen $mbu^{\Delta P[lacW]}$ -Exzisionsallele wurden zur abschließenden genetischen Charakterisierung über das $mbu^{P1\{P3843/2\}}$ -Chromosom gelegt. Zur Erzeugung der transheterozygoten Weibchen wurden w^{1118} - und $mbu^{\Delta P[lacW]}$ -Männchen mit $mbu^{P1}/FM7a$ -Weibchen verpaart und der Pilzkörperphänotyp in den erhaltenen transheterozygoten F1-Weibchen untersucht. Grafik 18 und Tabelle 26 zeigen die gewonnenen Daten.

Genotyp	+/ mbu^{P1}	d1-1/ mbu^{P1}	dA/ mbu^{P1}	dC/ mbu^{P1}	dG/ mbu^{P1}	dH/ mbu^{P1}	dA20-1v/ mbu^{P1}	dA24-3/ mbu^{P1}	mbu^{P1}/mbu^{P1}
(n)	(30)	(16)	(13)	(11)	(16)	(13)	(8)	(9)	(26)
+/+ (31)	0,593504	0,000048	0,000012	0,000022	0,000001	0,000002	0,095036	0,000124	0,000000
$p \leq 0,01$	-	+	+	+	+	+	-	+	+

Tabelle 26:

Irrtumswahrscheinlichkeiten, die sich beim Vergleich der Volumenverhältniswerte der in Grafik 18 gezeigten transheterozygoten Genotypen mit dem von wildtypischen Weibchen ergeben.

Die erhaltenen Ergebnisse weichen teilweise von allen anderen bei der genetischen Charakterisierung der verschiedenen mbu -Allele erhalten Daten ab (Abschnitte D 3.2, D 5.1 und D 5.2). So zeigten die Exzisionschromosomen $mbu^{\Delta I-1}, w^-$ und $mbu^{\Delta A}, w^-$ eine Interaktion mit dem $mbu^{P1\{P3843/2\}}$ -Chromosom, die zu einer Fehlentwicklung der Pilzkörpercalyces führt, obwohl sie sich in allen anderen durchgeführten genetischen Tests wie wildtypische Allele verhielten. Der beobachtete Calyxphänotyp in $mbu^{\Delta C}/mbu^{P1}$ -, $mbu^{\Delta G}/mbu^{P1}$ -, $mbu^{\Delta H}/mbu^{P1}$ - und $mbu^{\Delta A24-3}/mbu^{P1}$ - Weibchen war wegen den in den Abschnitten D 5.1 und D 5.2 erhaltenen Daten zu erwarten. Einzig das $mbu^{\Delta A20-1v}$ -Chromosom zeigt keine Interaktion mit dem $mbu^{P1\{P3843/2\}}$ -Chromosom. Da sich das $mbu^{P1\{P3843/2\}}$ -Chromosom über einem für CK2 β wildtypischen w^{1118} -Chromosom vollständig rezessiv verhält, scheidet Dominanz der mbu^{P1} -Mutation als Erklärung für den in $mbu^{\Delta I-1}/mbu^{P1}$ - und $mbu^{\Delta A}/mbu^{P1}$ -Weibchen beobachteten Phänotyp aus.



Grafik 18:

Mittlere Volumenquotienten von verschiedenen $mbu^{\Delta P1[lacW]}/mbu^{P1}$ -Weibchen im Vergleich zu denen von wildtypischen Weibchen und homozygoten und heterozygoten mbu^{P1} -Weibchen.

Genotyp (Kürzel):

+/+:
 +/mbu^{P1}:
 d1-1/mbu^{P1}:
 dA/mbu^{P1}:
 dC/mbu^{P1}:
 dG/mbu^{P1}:
 dH/mbu^{P1}:
 dA20-1v/mbu^{P1}:
 dA24-3/mbu^{P1}:
 mbu^{P1}/mbu^{P1}:

Genotyp:

$mbu^+, w^+ / mbu^+, w^+$
 $mbu^+, w^- / mbu^{P1}, w^-$
 $mbu^{\Delta 1-1}, w^- / mbu^{P1}, w^-$
 $mbu^{\Delta A}, w^- / mbu^{P1}, w^-$
 $mbu^{\Delta C}, w^- / mbu^{P1}, w^-$
 $mbu^{\Delta G}, w^- / mbu^{P1}, w^-$
 $mbu^{\Delta H}, w^- / mbu^{P1}, w^-$
 $mbu^{\Delta A20-1v}, w^- / mbu^{P1}, w^-$
 $mbu^{\Delta A24-3}, w^- / mbu^{P1}, w^-$
 $mbu^{P1}, w^- / mbu^{P1}, w^-$

(Wildtyp Berlin)
 (w^{1118}/mbu^{P1})

D 7 Die meisten vitalen $mbu^{P1\{P3843/2\}}$ -P[lacW]-Exzisionsallele zeichnen sich molekular durch P[lacW]-Restinsertionen im 5'-Bereich des CK2 β -Gens aus

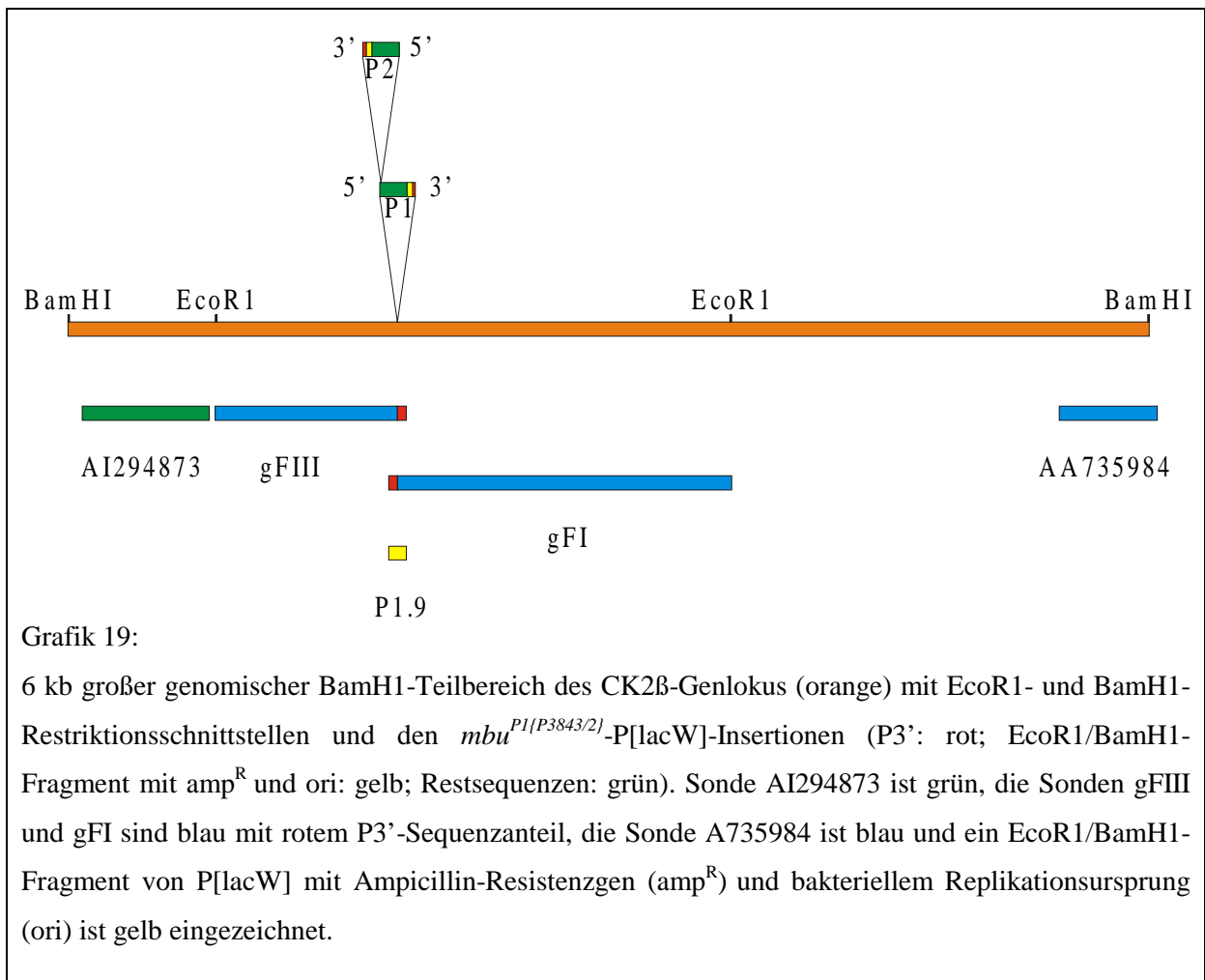
Um die in den Abschnitten D 3.2, D 5.1, D 5.2 und D 6 untersuchten genetischen Interaktionen der vitalen mbu -Allele einem molekularen Defekt des CK2 β -Gens zuordnen zu können wurden diese einer Southern-Blot-Analyse (Abschnitt D 7.1) und/oder einer PCR-Analyse (Abschnitt D 7.2) unterzogen. Hierbei wurden zwei Ziele verfolgt:

Einerseits sollte festgestellt werden, in welchem Ausmaß die Remobilisierung der beiden mbu^{P1} -P[lacW]-Elemente diese bei den verschiedenen lebensfähigen mbu -Allelen aus dem CK2 β -Genlokus entfernte, und andererseits sollte die eventuell erfolgte Deletion flankierender genomischer CK2 β -DNA ermittelt werden. In Abschnitt D 9 werden die gewonnenen Daten im Licht der ermittelten Organisation des CK2 β -Genlokus genauer betrachtet.

Zur Charakterisierung der molekularen Natur der aus der ersten Remobilisierung in Männchen und der Remobilisierung in Weibchen erhaltenen $mbu^{\Delta P[lacW]}$ -Chromosomen ($mbu^{\Delta Buchstaben}$ und $mbu^{\Delta Zahl/Zahl}$, siehe Tabelle 16) wurden sowohl Southern-Blot-Analysen als auch Einzelfliegen-PCR-Reaktionen mit anschließender Sequenzierung der PCR-Fragmente durchgeführt. Die aus der zweiten Remobilisierungsmutagenese erhaltenen mbu -Allele ($mbu^{\Delta AZahl-Zahl}$) wurden ausschließlich durch Einzelfliegen-PCRs charakterisiert, da in diesem Experiment gezielt nach kleineren, auf den CK2 β -Lokus beschränkte Deletionen gesucht wurde.

D 7.1 Southern-Blot-Analysen der $mbu^{\Delta Buchstaben}$ - und $mbu^{\Delta Zahl/Zahl}$ - Exzisionschromosomen

Für die Analysen wurden insgesamt 5 verschiedene radioaktiv markierte Sonden verwendet. Diese erkennen Teile des CK2 β -Genlokus und Teile eines P[lacW]-Elements. Grafik 19 und Tabelle 27 geben einen Überblick.



Die genomische DNA männlicher Fliegen der Linien $mbu^{\Delta A}$, $mbu^{\Delta C}$, $mbu^{\Delta G}$, $mbu^{\Delta H}$, $mbu^{\Delta I-1}$, mbu^{P1} ($mbu^{P1\{P3843/2\}}$), WTB und FM7a wurden einmal mit BamHI und einmal mit EcoRI verdaut und geblottet. Die bei der Hybridisierung mit den in Tabelle 27 aufgeführten Sonden detektierten Restriktionsfragmente wurden untereinander verglichen, wobei WTB und FM7a als wildtypischer Standard betrachtet wurden. Die mit den in Grafik 19 gezeigten Sonden detektierten Signale auf EcoRI- bzw. BamHI-verdauter DNA sind nach Genotypen sortiert in den Anhängen 1 – 8 gezeigt. Die Tabellen 28 und 29 fassen die Ergebnisse zusammen.

Sonden-Namen	Ursprung	Zielsequenz	Bemerkung
AI294873	EST-Klon LP08348	äußerer 5'-Bereich des in Grafik 19 gezeigten 6 kb großen genomischen BamH1-Fragments des CK2 β -Genlokus	besteht aus 2 EcoRV-Fragmenten des EST-Klons; enthält Karl-cDNA- 3'-Ende (siehe Grafik 25) und ein nichthybridisierendes Fragment (Vektor- oder Fremd-DNA)
gFIII	5'-EcoR1-Plasmid-Rescue (siehe auch Grafik 7)	5'-Bereich relativ zu den mbu ^{P1} -P[lacW]-Insertionen	EcoR1/BamH1-Fragment, erkennt nebst genomischer CK2 β -DNA noch das 3'-Ende eines P-Elements
P1.9	pP[lacW]: EcoR1/BamH1-pBR322 ori/amp-Fragment	P[lacW] : pBR322 ori/amp-Fragment	
gFI	3'-EcoR1-Plasmid-Rescue (siehe auch Grafik 7)	3'-Bereich relativ zu den mbu ^{P1} -P[lacW]-Insertionen	EcoR1/BamH1-Fragment, erkennt nebst genomischer CK2 β -DNA noch das 3'-Ende eines P-Elements
AA735984	EST-Klon GM10245	äußerer 3'-Bereich des in Grafik 19 gezeigten 6 kb großen genomischen BamH1-Fragments des CK2 β -Genlokus und ein weiteres 3'- BamH1-Fragment	EST-Klon GM10245 ist ein partieller CK2 β -cDNA-Klon (Exon VIIa/VIIb; Grafik 25); verwendet wurde das gesamte EcoR1/Xho1-Insert

Tabelle 27:

Sonden, die für die Southern-Blot-Analysen genomischer DNA der *mbu* ^{Δ Buchstaben}- und *mbu* ^{Δ Zahl/Zahl}-Exzisionschromosomen verwendet wurden; ihr Ursprung und ihre Zielsequenzen.

Linie	Sonde	AI294873	gFIII	P1.9	gFI	AA735984
WTB	(A1)	~ 6,1 kb	~ 6,1 kb	-	~ 6,1 kb	~ 6,1 kb/~ 3,2 kb
FM7a	(A2)	~ 6,1 kb	~ 6,1 kb	-	~ 6,1 kb	~ 6,1 kb/~ 3,1 kb
<i>mbu</i> ^{ΔA}	(A4)	~ 6,2 kb	~ 6,2 kb	-	~ 6,2 kb	~ 6,2 kb/~3,1 kb
<i>mbu</i> ^{ΔC}	(A5)	~ 7,5 kb	~ 7,5 kb	-	~ 7,5 kb	~ 7,5 kb/~3,1 kb
<i>mbu</i> ^{ΔG}	(A6)	~ 2,2 kb	~ 2,2 kb	~7,5 kb	~ 7,5 kb/~2,2 kb	~ 7,5 kb/~3,1 kb
<i>mbu</i> ^{ΔH}	(A7)	~ 2,2 kb	~ 2,2 kb/~4,5 kb	~9,5 kb	~ 4,5 kb/~2,2 kb	~ 4,5 kb/~3,1 kb
<i>mbu</i> ^{ΔI-1}	(A3)	~ 6,1 kb	~ 6,1 kb	-	~ 6,1 kb	~ 6,1 kb/~3,1 kb
<i>mbu</i> ^{P1}	(A8)	~ 2,2 kb	~ 2,2 kb/~4,5 kb	>> 12 kb	~ 4,5 kb/~2,2 kb	~ 4,5 kb/~3,1 kb

Tabelle 28:

Zusammenfassung der auf BamH1-verdauter genomischer DNA unter Verwendung verschiedener Sonden detektierten Signale der untersuchten Linien (schwächere Signale sind durch Kleinschrift angezeigt). A1-A8: Anhänge 1-8.

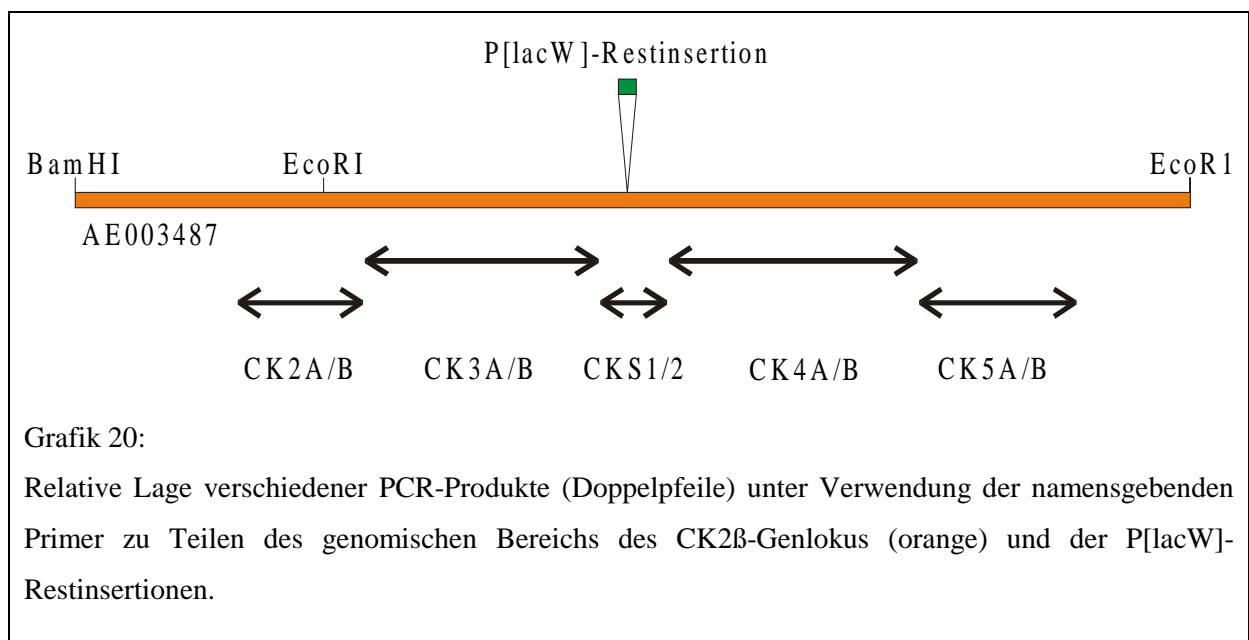
Linie	Sonde	AI294873	gFIII	gFI	AA735984
WTB	(A1)	~ 2,3 kb	~ 2,8 kb	~ 2,8 kb	~ 2,9 kb
FM7a	(A2)	~ 2,2 kb	~ 2,8 kb	~ 2,8 kb	~ 2,8 kb
<i>mbu</i> ^{ΔA}	(A4)	~ 2,2 kb	~ 2,9 kb	~ 2,9 kb	~ 2,8 kb
<i>mbu</i> ^{ΔC}	(A5)	~ 2,2 kb	~ 4,0 kb	~ 4,0 kb	~ 2,8 kb
<i>mbu</i> ^{ΔG}	(A6)	~ 2,2 kb	~ 3,2 kb	~ 3,1 kb	~ 2,8 kb
<i>mbu</i> ^{ΔH}	(A7)	~ 2,2 kb	~ 3,2 kb/~4,0 kb	~ 4,0 kb/~3,2 kb	~ 2,8 kb
<i>mbu</i> ^{ΔI-1}	(A3)	~ 2,2 kb	~ 2,8 kb	~ 2,8 kb	~ 2,8 kb
<i>mbu</i> ^{PI}	(A8)	~ 2,2 kb	~ 3,2 kb/~4,0 kb	~ 4,0 kb/~3,2 kb	~ 2,8 kb

Tabelle 29:

Zusammenfassung der auf EcoRI-verdauter genomischer DNA unter Verwendung verschiedener Sonden detektierten Signale der untersuchten Linien (schwächere Signale sind durch Kleinschrift angezeigt). A1-A8: Anhänge 1-8.

D 7.2 PCR-Analyse der *mbu*-Exzisionschromosomen

Um die erhaltenen Southern-Blot Daten zu überprüfen und Informationen über die nicht in die Southern-Blot-Analysen einbezogenen lebensfähigen *mbu*-Allele (*mbu*^{ΔA20-1V} und *mbu*^{ΔA24-3}) zu erhalten, wurden zunächst mit dem Primerpaar CKS1/CKS2 (Grafik 20) auf genomischer DNA von männlichen Einzelfliegen PCR-Reaktionen durchgeführt.



Grafik 20:

Relative Lage verschiedener PCR-Produkte (Doppelpfeile) unter Verwendung der namensgebenden Primer zu Teilen des genomischen Bereichs des CK2β-Genlokus (orange) und der P[lacW]-Restinsertionen.

Die erhaltenen PCR-Produkte wurden durch Gelelektrophorese aufgetrennt und unter Verwendung obiger PCR-Primer sequenziert. Die Länge der erhaltenen CKS1/CKS2-PCR-Produkte und deren Sequenzierungsergebnisse sind in Tabelle 30 aufgelistet.

Linie	Größe des PCR-Produkts	Sequenzierungsergebnisse
WTB	~ 0,25 kb	wildtypische Sequenz
FM7a	~ 0,25 kb	wildtypische Sequenz
$mbu^{\Delta I-1}$	~ 0,25 kb	Teile der 3'-Sequenz unleserlich, der Rest wildtypisch. 8 bp-Duplikation nicht mehr vorhanden
$mbu^{\Delta A}$	~ 0,30 kb	56 bp-Insertion, 8 Basenpaare stellen P-Element-Insertionsduplikation dar
$mbu^{\Delta C}$	~ 1,60 kb	3'-Anteil der Insertions-DNA konnte ansequenziert werden, diese enthielt 8 bp Insertionsduplikation

Tabelle 30:

Sequenzierungsergebnisse der erhaltenen CKS1/CKS2-PCR-Produkte.

Die Linien, bei denen kein CKS1/CKS2-PCR-Produkt erhalten werden konnte, wurden durch flankierende PCR-Reaktionen (Primerpaare CK2A/CK2B, CK3A/CK3B, CK4A/CK4B und CK5A/CK5B, Grafik 20) genauer charakterisiert, um mögliche Deletionsbruchpunkte zu kartieren. Hierbei wurden die $mbu^{\Delta A20-1V}$ - und $mbu^{\Delta A24-3}$ -Allele wegen des wiederholten Scheiterns der CK4A/CK4B-PCR-Reaktion als mögliche Kandidaten für eine kleinere 3'-Deletion etabliert. Für die Allele $mbu^{\Delta G}$ und $mbu^{\Delta H}$ konnten größere 5'- bzw. 3'-Deletionen ausgeschlossen werden (Tabelle 31).

Allel	Primerpaar (Größe)	CK2A/CK2B (~420 bp)	CK3A/CK3B (~800 bp)	CKS1/CKS2 (~235 bp)	CK4A/CK4B (~960 bp)	CK5A/CK5B (~640 bp)
$mbu^{\Delta A20-1V}$			+/+	-/-	-/-/-/-/-/-/-	+
$mbu^{\Delta A24-3}$		-/+	+	-/-/+ (< WT)	-/-	+
$mbu^{\Delta G}$		-/+	+	-/-/-	+	+
$mbu^{\Delta H}$			-/+	-	+/-	

Tabelle 31:

Flankierende PCR-Reaktionen auf genomischer DNA von Einzelfliegen verschiedener *mbu*-Exzisionsallele. Die Anzahl der „+“ bzw. „-“ spiegelt die Anzahl der durchgeführten Reaktionen und ihr jeweiliges Ergebnis wieder.

Zusammenfassend lassen sich die bisher untersuchten *mbu*-Allele folgendermaßen charakterisieren:

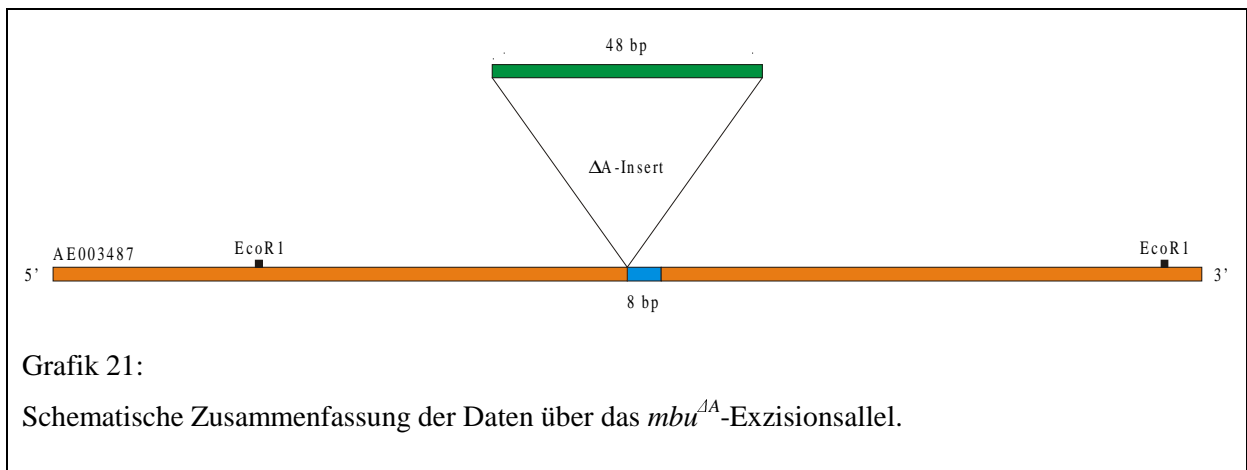
Keine der drei P[lacW]-Sequenzen detektierenden Sonden (gFIII, gFI und P1.9) lieferten Signale, die auf das Vorhandensein von weiteren als die für das *mbu*^{P1{P3843/2}}-Chromosom in Abschnitt D 3.1 beschriebenen P-Element-Insertionen hindeuten.

mbu^{Δ1-1}:

Das *mbu*^{Δ1-1}-Allel entstand durch eine präzise P-Element-Remobilisierung. Ob eine vollständige Wiederherstellung der wildtypischen Sequenz stattfand, kann nicht entschieden werden, da die erhaltene 3'-Sequenz des PCR-Produkts teils unleserlich war. Die 8 bp Insertionsduplikation fehlt.

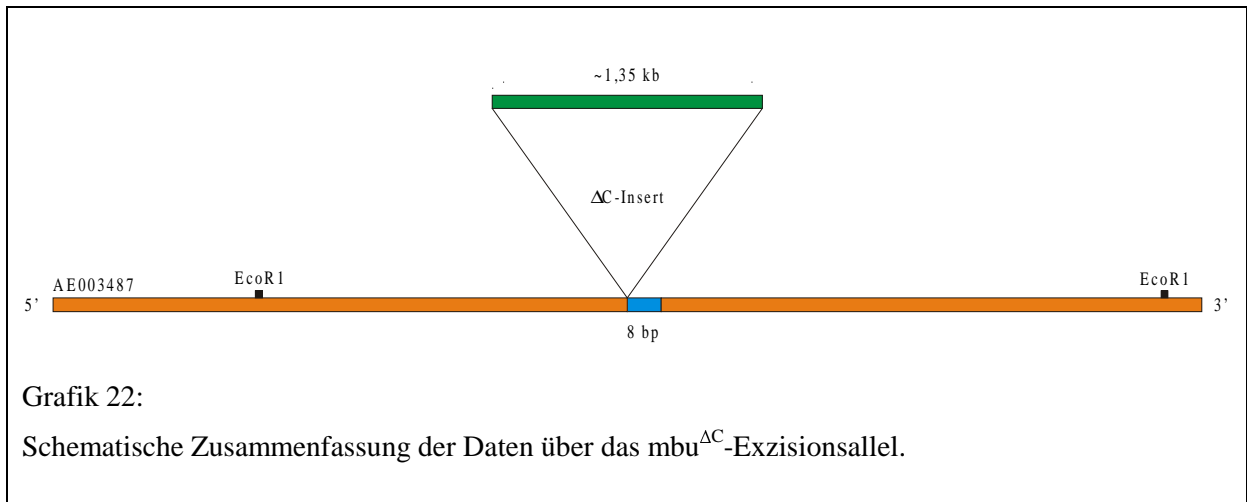
mbu^{ΔA}:

Das *mbu*^{ΔA}-Allel ist Produkt einer impräzisen P-Element-Remobilisierung, die eine 56 bp lange Insertion, welche die 8 bp Insertionsduplikation enthält, zurückließ. Diese enthält weder eine BamH1- noch eine EcoR1-Restriktionsschnittstelle (Grafik 21).



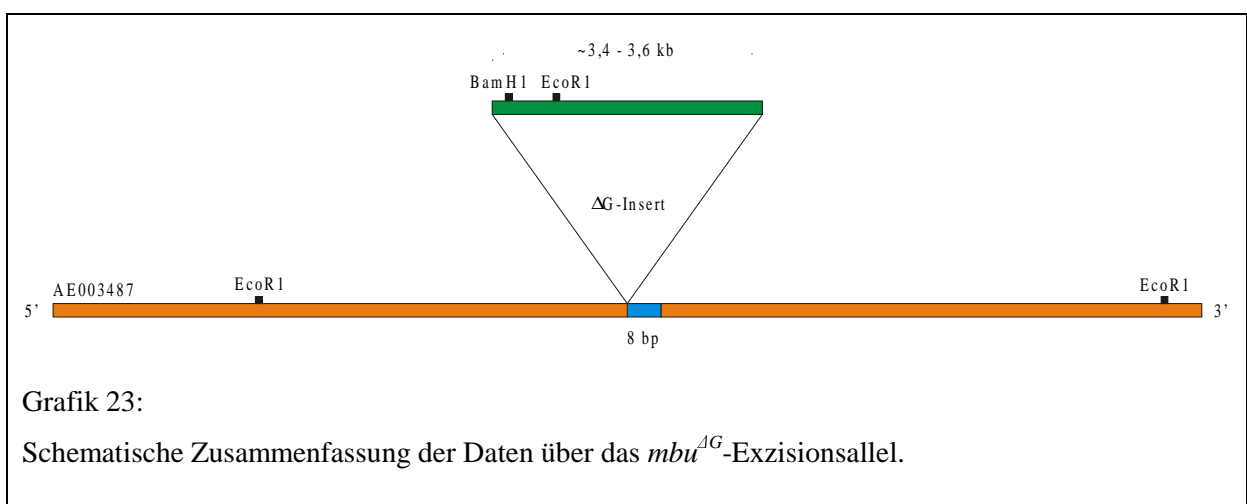
mbu^{ΔC}:

mbu^{ΔC} entstand durch eine ungenaue P-Element-Remobilisierung, welche eine ~ 1,35 kb lange Insertion, die eine 8 bp-Insertionsduplikation enthält, zurückließ (Grafik 22). Diese enthält weder eine BamH1- noch eine EcoR1-Restriktionsschnittstelle. P[lacW]-Sequenzen, die eine Replikation in Bakterien erlauben (ori-Sequenzen) und eine Ampicillin-Resistenz vermitteln (amp^R-Sequenzen) sind nicht mehr vorhanden. Eine 5'-Deletion erscheint unwahrscheinlich.



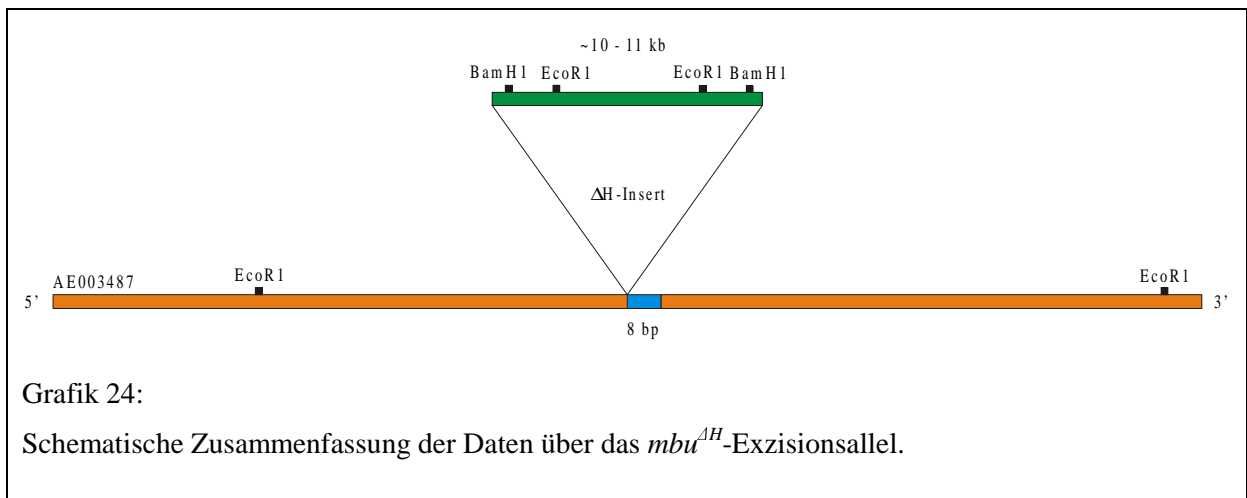
$mbu^{\Delta G}$:

Eine impräzise P-Element-Remobilisierung führte zur Erzeugung des $mbu^{\Delta G}$ -Allels. Diese ließ eine $\sim 3,4\text{--}3,6$ kb lange Insertion zurück (Grafik 23). Die BamH1- und EcoR1-Restriktionsschnittstellen des $mbu^{P1\{P3843/2\}}\text{-P2-P[lacW]}$ -Elements (siehe Grafik 7) sind beide vorhanden, die BamH1- und EcoR1-Restriktionsschnittstellen des $mbu^{P1\{P3843/2\}}\text{-P1-P[lacW]}$ -Elements fehlen. P[lacW]-Sequenzen, die eine Replikation in Bakterien erlauben und eine Ampicillin-Resistenz vermitteln, sind vorhanden und stammen vom $mbu^{P1\{P3843/2\}}\text{-P2-P[lacW]}$ -Element. Da das Primerpaar CK3a/CK3b ein PCR-Produkt der richtigen Länge liefert, ist eine größere 5'-Deletion auszuschließen (Tabelle 31). Eine größere 3'-Deletion konnte im Rahmen der Klonierung genomischer CK2 β -DNA (Abschnitt D 4.1) und den einhergehenden Sequenzierungen ausgeschlossen werden. Die 8 bp-Insertionsduplikation in Grafik 23 ist postuliert.



mbu^{AH}:

Eine ungenaue P-Element-Remobilisierung ließ im *mbu*^{AH}-Allel eine ~ 10-11 kb lange Restinsertion zurück. Die BamH1- und EcoR1-Restriktionsschnittstellen des *mbu*^{P1{P3843/2}}-P1- und des *mbu*^{P1{P3843/2}}-P2-P[lacW]-Elements sind erhalten geblieben. P[lacW]-Sequenzen, die eine Replikation in Bakterien erlauben und eine Ampicillin-Resistenz vermitteln, sind vorhanden. Größere Deletionen flankierender genomischer DNA sind ausgeschlossen, da die Primerpaare CK3A/CK3B und CK4A/CK4B wildtypische PCR-Produkte liefern (siehe Tabelle 31). Die 8 bp-Insertionsduplikation in Grafik 24 ist postuliert.

*mbu*^{ΔA20-1V} und *mbu*^{ΔA24-3}:

Vermutlich tragen beide Allele noch P[lacW]-Restinsertionen. Wegen des wiederholten negativen Ausgangs der CK4A/CK4B-PCR-Reaktion (Tabelle 31) besteht bei beiden Allelen die Möglichkeit einer kleineren 3'-Deletion.

D 8 Vom CK2 β -Gen werden mindestens sieben Transkripte gebildet

Das X-chromosomale CK2 β -Gen (CG15224) wird in 5'-Richtung vom Karl-Gen (CG4139) und in 3'-Richtung vom Hsc70-3-Gen (CG4147) flankiert. Bisher wurden vom CK2 β -Gen insgesamt 28 cDNA-Klone isoliert und teilweise charakterisiert. Ein Vergleich der vorhandenen cDNA-Sequenzen mit der genomischen Sequenz AE003487 führt zu dem Ergebnis, daß jede vom CK2 β -Gen transkribierte mRNA aus sieben Exons zusammengesetzt ist. Bidwai *et al.* (2000) beschrieben 5 alternativ gesplizierte, nicht überlappende erste Exons (Ia-Ie) und zwei alternativ gesplizierte, überlappende siebte Exons. Eine umfassende Datenbank- und Literaturlauswertung ergänzt die bisher publizierten Daten und legt nahe, daß vom CK2 β -Gen unter Verwendung eines dritten alternativen siebten Exons mindestens sieben Transkripte gebildet werden (Abschnitt D 8.2). Diese codieren für vermutlich vier Proteinisoformen (Abschnitt D 8.3). Die Lage der alternativen ersten Exons zu vorhergesagten Promotoren stützt die Vermutung, daß die Transkription des CK2 β -Gens von 2 Promotoren aus begonnen wird (Abschnitt D 8.4). Der CK2 β -Genlokus erstreckt sich über mindestens 8,5 kb genomische DNA.

D 8.1 Verfügbare genomische DNA-Sequenzen

Eine FlyBase-Datenbanksuche lieferte zwei den CK2 β -Genlokus (teilweise) abdeckende genomische DNA-Sequenzen [Datenbank-Zugangsnummern U52952 [6009 bp; Bidwai *et al.* (2000) und AE003487 (301051 bp)]. AE003487 wurde als Teil des *Drosophila* - Genomprojekts publiziert (Adams *et al.* 2000). Für sämtliche Sequenzvergleiche, Datenbanksuchen und Vorhersagen wurde AE003487 gewählt, da U52952 den CK2 β -Genlokus nur teilweise abdeckt.

D 8.2 Kartierung der exonischen Bereiche des CK2 β -Genlokus

Die vorhandenen Sequenzen der 28 CK2 β -cDNA-Klone wurden durch Vergleich mit der genomischen Sequenz AE003487 zunächst in zwei Klassen aufgeteilt. Klasse 1 (Anhang 9) enthält diejenigen cDNA-Klone, die zur Charakterisierung der 5 alternativen ersten Exons verwendet wurden. Die Exons II-VI werden offensichtlich von allen cDNAs verwendet. Klasse 2 (Anhang 10) umfaßt alle cDNA-Klone, deren Sequenzen oder Beschreibungen in der Literatur Informationen über die 3 alternativen siebten Exons enthielten. Um das 5'- und 3'-Ende der alternativen 5 ersten Exons zu ermitteln, wurden diese untereinander und mit der genomischen DNA-Sequenz AE003487 verglichen. Die jeweils längsten Sequenzen der

alternativen 5 ersten Exons dienten als Grundlage für deren Kartierung. Anhang 11 faßt die Ergebnisse der Sequenzvergleiche zusammen. Den verfügbaren Sequenzinformationen nach überlappt Exon Ie mit den Exons Ib, Ic und Id, nicht jedoch mit Exon Ia. Exone Ib und Ic überlappen ebenfalls (siehe Grafik 25). Für keines der 5 alternativen Exons ist die maximale 5'-Ausdehnung bekannt. Die Länge der Exons II-VI wurde wie oben beschrieben ermittelt; Anhang 12 faßt dies zusammen. Um das 5'- und 3'-Ende der alternativen 3 siebten Exons zu ermitteln, wurden die verfügbaren Sequenzen ebenfalls untereinander und mit der genomischen DNA-Sequenz AE003487 verglichen. Anhang 13 faßt die Ergebnisse dieser Sequenzvergleiche zusammen. Demnach überlappt Exon VIIa mit Exon VIIb [Bidwai *et al.* (2000)]. Für Exon VIIa existiert vermutlich nur ein Polyadenylierungssignal; die maximale Ausdehnung des Exons VIIb ist nicht bekannt. Der Beginn des polyA-Schwanzes des Exons VIIc ist in zwei sequenzierten Klonen um wenige Basen verschoben (siehe Grafik 25 und Anhang 13).

Legende zu Grafik 25:

Oranger Balken: Genomische DNA mit BamH1- und EcoR1-Restriktionsschnittstellen, der *mbu*^{P1(P3843/2)}- P[lacW]-Insertionsstelle und Lokalisation zweier vorhergesagter TATA-Promotoren (grün). Oberhalb sind Gennamen und die Transkriptionsrichtung dieser Gene (Pfeilkopf) eingetragen.

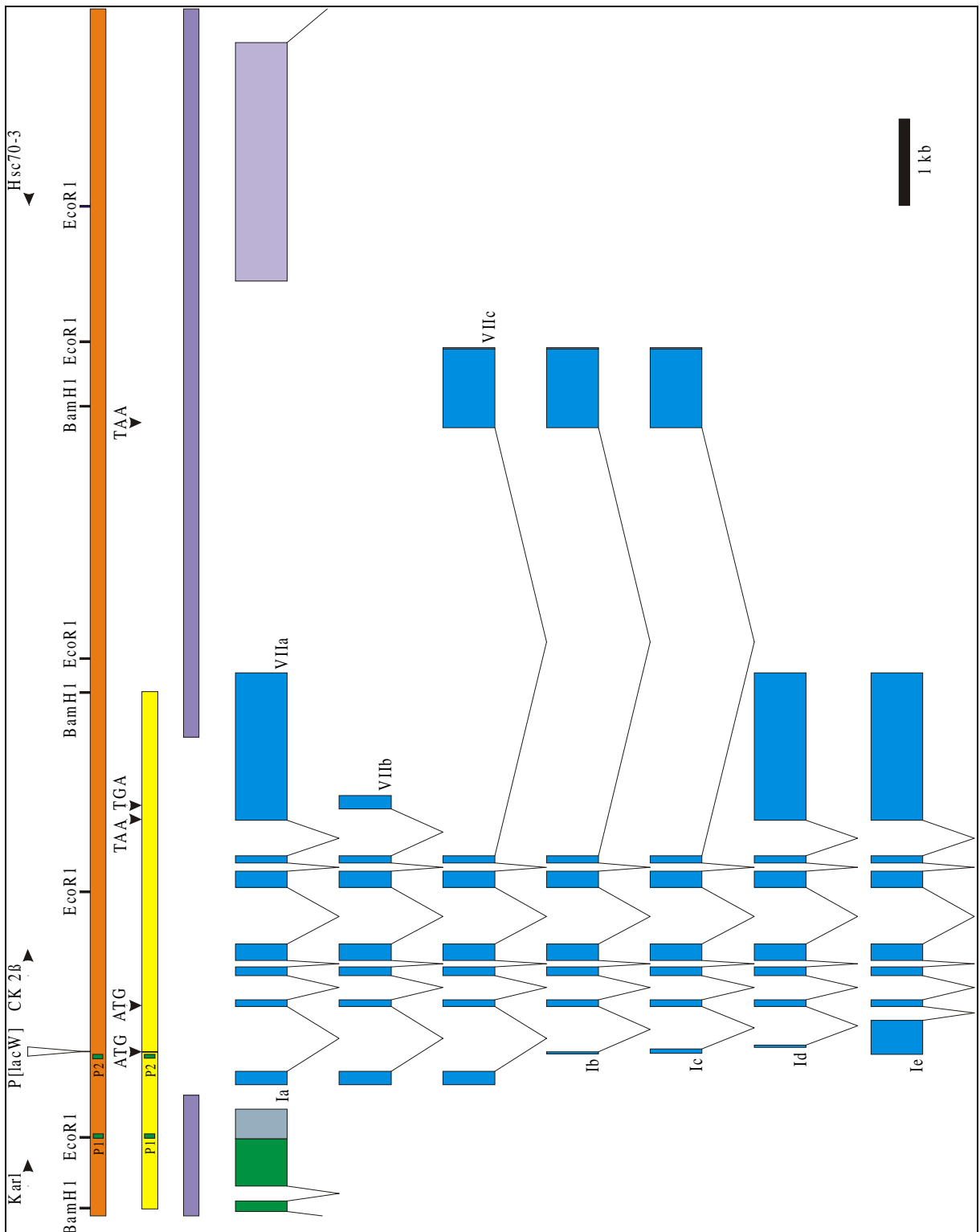
Gelber Balken: Genomische DNA, die in Rettungsexperimenten Verwendung fand (grün: vorhergesagte TATA-Promotoren). Die angedeutete Unterbrechung des Balkens spiegelt die durch Sequenzierung ermittelte 7 bp-Deletion wider. Oberhalb ist die Lage potentieller Translationsstarts und -stops gekennzeichnet (Pfeilköpfe; ATG: Translationsstart; TAA/TGA: Translationsstop).

Lilauer, unterbrochener Balken: Ungefähre Lage der CK2β-Deletion in *mbu*^{AA26-2L}.

Die Exon-Intron-Struktur der alternativen Transkripte des CK2β-Gens ist durch blaue, v-förmig verbundene Balken dargestellt. Römische Zahlen mit Buchstaben benennen alternative Exons. Exon VIIc ist mit einer alternativen Polyadenylierung (grau) dargestellt.

Die letzten zwei 3'-Exone zweier bekannter Karl-Transkripte sind durch grüne, v-förmig verbundene Balken mit grauer Verlängerung (alternative Polyadenylierung) dargestellt. Das 3'-Ende eines Hsc70-3-Transkripts ist graublau eingezeichnet.

Der schwarze Balken zeigt die Größe einer Kilobase genomischer DNA.



Grafik 25:

Schematischer Überblick über die Organisation des CK2β-Genlokus.

Legende siehe vorherige Seite.

D 8.3 Die CK2 β -Transkriptionseinheit codiert vermutlich für mindestens vier Proteinisoformen

Theoretisch wären aufgrund der bisher bekannten alternativen ersten und siebten CK2 β -Exons 15 verschiedene Transkripte möglich. Sieben davon wurden bisher aus verschiedenen cDNA-Bibliotheken isoliert; diese erlauben eine Zuordnung zu bestimmten Entwicklungsstadien und/oder Gewebetypen. Tabelle 32 enthält die Informationen, die zu diesen Transkripten gesammelt werden konnten.

Transkript-Splicevariante	cDNA-Ursprungsgewebe	CK2 β -Isoform	cDNA (Publikationsnamen oder Datenbank-Zugriffsnummer)
Ia/VIIa	Embryo	CK2 β -VIIa	DmA17
Ia/VIIb	Embryo	CK2 β -VIIb	DmA41
Ia/VIIc	Kopf adulte Männchen/Weibchen	CK2 β -VIIc	AI517689
Ib/VIIc	Kopf adulte Männchen/Weibchen	CK2 β -VIIc	AI109297
Ic/VIIc	Kopf adulte Männchen/Weibchen	CK2 β * VIIc	AI109634
Id/VIIa	Embryo	CK2 β -VIIa	AF236950.1
Ie/VIIa	Embryo	CK2 β -VIIa	M16535, AF236851.1

Tabelle 32:

Bekannte CK2 β -Transkripte, ihre bisher bekannte Gewebeverteilung und die durch Analyse des von ihnen enthaltenen offenen Leserasters vorhergesagten Proteinisoformen.

Ordnet man die bekannten Splicevarianten nach dem Gewebe, aus dem die zugehörigen cDNA-Bibliotheken hergestellt wurden, ergibt sich das in Tabelle 33 zusammengefaßte Bild.

Gewebe	CK2 β -Isoform	cDNA (Publikationsnamen oder Datenbank-Zugriffsnummer)
Embryo	CK2 β -VIIa	DmA17, M16535, AA263902, AF236851.1, AF236850.1
	CK2 β -VIIb	DmA41
Testikel Männchen	CK2 β * VII? und CK2 β -VII?	BE978385, BG634847, AI945171
Ovar Weibchen	?	AA735984
Kopf adulte Männchen/Weibchen	CK2 β -VIIc	AI517689, AI109297, AI387980
	CK2 β * VIIc	AI109634

Tabelle 33:

Gewebeverteilung der bisher isolierten CK2 β -cDNAs und die mutmaßlich von ihnen codierten Proteinisoformen (Fragezeichen spiegeln ungeklärte Zuordnungen wieder).

Die in den Tabellen 32 und 33 erwähnten CK2β-Isoformen CK2β-VIIa (Anhang 14), CK2β-VIIb (Anhang 15), CK2β-VIIc (Anhang 16) und CK2β*-VIIa (Anhang 17) ergeben sich aus dem längsten offenen Leseraster der in Tabelle 32 aufgelisteten CK2β-Splicevarianten.

Diese können in vier Gruppen geordnet werden:

Gruppe 1 beinhaltet die Splicevarianten Ia/VIIa, Id/VIIa und Ie/VIIa. Anhang 14 zeigt exemplarisch für diese Gruppe die codierende Sequenz von M16535 (Ie/VIIa) und die dazugehörige Aminosäuresequenz der CK2β-Isoform CK2β-VIIa.

Die Gruppe 2 wird durch die Splicevariante Ia/VIIb repräsentiert und codiert für die CK2β-VIIb-Isoform. Der entsprechende cDNA-Klon wurde in Bidwai *et al.* (2000) als DmA41 ausführlich beschrieben, und die DNA-Sequenz mit der dazugehörenden Aminosäuresequenz nach dieser Beschreibung zusammengestellt, da die Sequenz des cDNA-Klons DmA41 nicht in den Datenbanken abgelegt wurde (Anhang 15).

Gruppe 3 wird von den Splicevarianten Ia/VIIc und Ib/VIIc gebildet. Die codierende Sequenz von AI517689 (Ia/VIIc) und ihre Aminosäureübersetzung (CK2β-VIIc-Isoform) ist in Anhang 16 wiedergegeben.

Die vierte Gruppe wird von der Splicevariante Ic/VIIc gebildet. Weder die Sequenz von BG634847 noch die von AI109634 ist sowohl im 5'- als auch im 3'-Bereich vollständig. Daher wurde die vorhandene Sequenz von AI109634 am 5'-Ende mit der Sequenz von BG634847 und die fehlende 3'-Sequenz des Exons VIIc mit der Sequenz von AI517689 (Ia/VIIc) ergänzt. Die Übersetzung in Aminosäuren (CK2β*-VIIa-Isoform) ist in Anhang 17 wiedergegeben. Wie Abbildung 11 zeigt, besitzen alle vorhergesagten Casein-Kinase-2β-Isoformen den gleichen Aminosäurekern mit N- und/oder C-terminalen Variationen.

	1	15	16	30	31	45	46	60	61	75	76	90	
1	CK2βVIIa	-----MSSS	EEVSWVTWFCGLRGN	EFFCEVDEDYIQDKF	NLTGLNEQVPNYRQA	LDMILDLEPEDELED	NPLQSDMTEQAAEML	79					
2	CK2βVIIb	-----MSSS	EEVSWVTWFCGLRGN	EFFCEVDEDYIQDKF	NLTGLNEQVPNYRQA	LDMILDLEPEDELED	NPLQSDMTEQAAEML	79					
3	CK2βVIIc	-----MSSS	EEVSWVTWFCGLRGN	EFFCEVDEDYIQDKF	NLTGLNEQVPNYRQA	LDMILDLEPEDELED	NPLQSDMTEQAAEML	79					
4	CK2β*VIIc	MSACQLSQYDK MSSS	EEVSWVTWFCGLRGN	EFFCEVDEDYIQDKF	NLTGLNEQVPNYRQA	LDMILDLEPEDELED	NPLQSDMTEQAAEML	90					
		91	105	106	120	121	135	136	150	151	165	166	180
1	CK2βVIIa	YGLIHARYILTNRGI	AQMIEKYQTGDFGHC	PRVYCESQPMLPLGL	SDIPGEAMVKTYCPK	CIDVYTPKSSRRHHT	DGAYFGTGFPHMLFM	169					
2	CK2βVIIb	YGLIHARYILTNRGI	AQMIEKYQTGDFGHC	PRVYCESQPMLPLGL	SDIPGEAMVKTYCPK	CIDVYTPKSSRRHHT	DGAYFGTGFPHMLFM	169					
3	CK2βVIIc	YGLIHARYILTNRGI	AQMIEKYQTGDFGHC	PRVYCESQPMLPLGL	SDIPGEAMVKTYCPK	CIDVYTPKSSRRHHT	DGAYFGTGFPHMLFM	169					
4	CK2β*VIIc	YGLIHARYILTNRGI	AQMIEKYQTGDFGHC	PRVYCESQPMLPLGL	SDIPGEAMVKTYCPK	CIDVYTPKSSRRHHT	DGAYFGTGFPHMLFM	180					
		181	195	196	210	211	225	226	240	241			
1	CK2βVIIa	VHPEYRKRPTNQFV	PRLYGFKIHSLAYQI	QLQAAANFKMPLRAK	N -----	215							
2	CK2βVIIb	VHPEYRKRPTNQFV	PRLYGFKIHSLAYQI	QLQAAANFKMPLRAF	TTGRPIDSNTOQQQQ	QQPH --	233						
3	CK2βVIIc	VHPEYRKRPTNQFV	PRLYGFKIHSLAYQI	QLQAAANFKMPLRAQ	RGQPPKDEEPENNAD	TVPKRI	235						
4	CK2β*VIIc	VHPEYRKRPTNQFV	PRLYGFKIHSLAYQI	QLQAAANFKMPLRAQ	RGQPPKDEEPENNAD	TVPKRI	246						

Abbildung 11:
Vergleich der vier aufgrund bekannter CK2β-Transkripte vorhergesagten CK2β-Proteinisoformen. N- und C-terminale Variationen sind gelb unterlegt wiedergegeben.

D 8.4 Die Verwendung zweier Promotoren könnte Teil der Regulation des CK2 β -Gens sein

Wie bereits in Bidwai *et al.* (2000) diskutiert, könnte die Vielfalt der 5 alternativen ersten Exons durch die Verwendung mehrerer Promotoren erklärt werden. Verwendet man die Teilsequenz AE003487 74101-76000 zur Vorhersage eukaryotischer Promotoren (searchlauncher.bcm.tmc.edu/cgi-bin/seq-search/gene-search.pl), werden die in Abbildung 12 gezeigten Promotoren vorhergesagt.

Start	End	Score	Promoter Sequence
58	108	0.89	AACTTTAGCTACATATTTGCGGAGGATCCGCTGCGCGAGAAGCTCGTGGG
317	367	0.93	TTTTCGTTTCTATATGTACCTCCTTGCAGATGAGGGCATCTACAACACAT
903	953	0.94	CAATAATTATATAAAGGTTATTTACAGAATGGAACAAGACAAAACAAA
1826	1876	0.84	GGTGGCCCCCTGTATATGTGTCTCTTTTTTTCTCAATTTCCACAGTGTGT

Abbildung 12:
Promotorvorhersagen für das CK2 β -Gen.
Positon 1 in der Startspalte entspricht Position 74101 in AE003487. Die Scorespalte gibt die Wahrscheinlichkeit für die tatsächliche Verwendung des vorhergesagten Promotors wieder. Gelb unterlegt wurde die Promotor-TATA-Box der Promotoren, die in einer - bezogen auf die 5'-Ausdehnung der bekannten Sequenzen der fünf alternativen ersten Exone - relevanten Position liegen (siehe Grafik 25 und Bidwai *et al.* 2000). Die rot gekennzeichneten Nukleotide entsprechen dem ersten transkribierten Nukleotid. Die TATA-Box Consensus-Sequenz lautet T₈₂A₉₇T₉₃A₈₅[A₆₃/T₃₇]A₈₃[A₅₀/T₃₇].

D 9 Die $mbu^{P1\{P3843/2\}}$ - P[lacW]-Elemente sind in das vorhergesagte offene Leseraster des Exons Ic inseriert

Vergleicht man die Daten der $mbu^{P1\{P3843/2\}}$ - P[lacW]-Insertionen (Abschnitt D 3.1) mit der Exon-Intron-Struktur des CK2 β -Gens (Abschnitt D 8.2) kommt man zu dem Schluß, daß sich die P[lacW]-Insertionen des $mbu^{P1\{P3843/2\}}$ -Chromosoms intronisch zu den alternativen ersten Exons Ia und Ib und exonisch zu den Exons Ic, Ie und vermutlich Id verhalten. Hierdurch wird das vorhergesagte beginnende offene Leseraster des Exons Ic zerstört oder verändert. Die durch die (erste) P-Element-Insertion entstandene 8-Basenpaar-Duplikation betrifft den Sequenzabschnitt AE003487: 76003-76010. Diese Sequenz liegt direkt hinter dem Ende des Exons Ib (die GT-Donorseite des folgenden Introns ist somit nicht zerstört) und überlappt mit dem Translationsinitiationscodon des Exons Ic (Abbildung 13).

1	EK56	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	0
2	EK57rc	-----	-----	-----	-----AAGGCGTGCG	TGTGTGCACGTCCCCT	ATGTGCGCTTCGCGG	-----	40
3	AE003487	AAAATACAGAATAGC	AAGTTGGTGTGCGTT	GGATTGCGCTCATCG	GTGTAAAGGCGTGCG	TGTGTGCACGTCCCCT	ATGTGCGCTTCGCGG	-----	90
1	EK56	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	0
2	EK57rc	TGTGCGTGTGCTT	GTGTGCGTGTGGTGG	CCCCTGTATATGTGT	CTCTTTTTTCTCAA	TTTCCAACAGTGTGT	GCTTCTTCTGCTGC	-----	130
3	AE003487	TGTGCGTGTGCTT	GTGTGCGTGTGGTGG	CCCCTGTATATGTGT	CTCTTTTTTCTCAA	TTTCCAACAGTGTGT	GCTTCTTCTGCTGC	-----	180
1	EK56	-----	-----GTA TGAGCGCTTGTCAAT	TGTCACAATACGAGT	ATAAAAAATTATTTT	TATGCCCCCGGACCA	CACGAATTTCAACGG	-----	78
2	EK57rc	TCGGCACATTTT	GTA TGAGC-----	-----	-----	-----	-----	-----	150
3	AE003487	TCGGCACATTTT	GTA TGAGCGCTTGTCAAT	TGTCACAATACGAGT	ATAAAAAATTATTTT	TATGCCCCCGGACCA	CACGAATTTCAACGG	-----	270
1	EK56	TGCGATCACCGAAAA	CTAGTAACATTGTAC	AAGCAACGCGAATTA	AACGAAAAACCGAAA	ACAAAAACCCCA	-----	-----	150
2	EK57rc	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	150
3	AE003487	TGCGATCACCGAAAA	CTAGTAACATTGTAC	AAGCAACGCGAATTA	AACGAAAAACCGAAA	ACAAAAACCCCAAAA	GGCCAATCCAACCAA	-----	360

Abbildung 13:

Vergleich eines Teils der genomischen DNA-Sequenz des CK2 β -Genlokus (3: AE003487) mit dem genomischen Sequenzanteil der P2- und P1-EcoR1-Rettungsplasmide (P2: EK56; P1: EK57rc). Gelb unterlegt ist die genomische 8 bp-Insertionsduplikationssequenz, die nicht in der Sequenz AE003487 dargestellt ist. Bekannte Sequenzen des Exons Ib sind unterstrichen, des Exons Ic grün unterlegt dargestellt. Das putative Translationsinitiationscodon des Exons Ic ist durch Fettschrift hervorgehoben (vergleiche auch Anhang 17).

Durch die teils exonische Insertion der *mbu*^{P1{P3843/2}}- P[lacW]-Elemente könnten sich diese und alle Restinsertionen in den lebensfähigen *mbu*^{AP[lacW]}-Allelen auf Translationsebene bestimmter CK2 β -Transkripte störend auswirken.

Da nur die 56 bp-Insertion des *mbu*^{ΔA}- Exzisionschromosoms vollständig sequenziert wurde, soll an diesem eine solche theoretische Störung der Translation durch Vorhersage neuer offener Leseraster durchgespielt werden. Tatsächlich wurden für das *mbu*^{ΔC}-Allel zwei nicht im Wildtyp beobachtete, mit einem anti-CK2 β -Serum detektierbare Proteine nachgewiesen (siehe Abschnitt D 10).

Betrachtet man eine Übersetzung der sich ergebenden drei möglichen Leseraster im Exon Ic des *mbu*^{ΔA}-Allels (Abbildung 14), zeichnet sich ein komplexes Bild ab. Die 56 bp-Insertion fügt mehrere Translationsinitiationscodons und mehrere Translationsstopcodons in das im Wildtyp verwendete Leseraster +2 ein. Im Leseraster +3 ergibt sich ein erst in einem folgenden Exon abgebrochenes neues Leseraster. Da jedoch die 8 bp-Insertionsduplikation das putative Translationsinitiationscodon des Exon Ic dupliziert, kann möglicherweise im Leseraster +1 die vorhergesagte CK2 β *-VIIc-Isoform translatiert werden.

```

DNA: CTTCTTGCTGCTCGGCACATTTTGTATGAGCCATGACATGATGAAATAACA
+3:  S C C S A H F V * A M T * * N N I
+2:  F L L L G T F C M S H D M M K * H
+1:  L L A A R H I L Y E P * H D E I T

DNA: TATGTTATGTTATGGTTATTTTCATCATGGTATGAGCGCTTGTCAATTGTCA
+3:  C Y V M V I S S W Y E R L S I V T
+2:  M L C Y G Y F I M V * A L V N C H
+1:  Y V M L W L F H H G M S A C Q L S

DNA: CAATACGA
+3:  I R
+2:  N T
+1:  Q Y

```

Abbildung 14:

Übersetzung der drei Leseraster des Exon Ic (wildtypische Sequenz unterstrichen) des *mbu^{ΔA}*-Exzisionschromosoms in Aminosäuresequenzen. Gelb unterlegte DNA-Sequenzen entsprechen dem wildtypischen Exon Ic, blau unterlegte DNA-Sequenzen stammen von der P[lacW]-Restinsertion und 8 bp-Insertionsduplikation des *mbu^{ΔA}*-Exzisionschromosoms. Das sich neu ergebende Peptid des Leserasters +1 ist grün unterlegt; die N-terminale Aminosäuresequenz der CK2β*VIIC-Isoform im Leseraster +3 ist blau unterlegt (davor rot unterlegt einige Aminosäuren, die bei Verwendung des ersten ATGs dieses Leserasters N-terminal angehängt wären). Das CK2β*VIIC-Leseraster +3 würde im Exon II normal weitergeführt. Im Leseraster +2 sind die Peptide durch gelbe Hervorhebung gekennzeichnet, die sich bei der Verwendung dieses Leserasters neu ergeben würden.

Um mögliche Effekte der 56 bp-Insertion des *mbu^{ΔA}*-Exzisionschromosoms auf die Leseraster des Exons Ie zu untersuchen, wurde wie bereits für Exon Ic gezeigt verfahren. Abbildung 15 zeigt, welche neuen Peptide potentiell synthetisiert werden könnten. Im Exon Ie befindet sich normalerweise kein bei der Translation verwendetes ATG.

```

DNA: ATTTTGTATGAGCCATGACATGATGAAATAACATATGTTATGTTATGGTTA
+3:  F V * A M T * * N N I C Y V M V I
+2:  F C M S H D M M K * H M L C Y G Y
+1:  I L Y E P * H D E I T Y V M L W L

DNA: TTTTCATCATGGTATGAGCGCTTGTCAATTGTCCACAATACGAGTATAAAAAAT
+3:  S S W Y E R L S I V T I R V * K F
+2:  F I M V * A L V N C H N T S I K I
+1:  F H H G M S A C Q L S Q Y E Y K N

```

DNA: TTATTTTTATGCCCCCGACCACACGAATTTCAACGGTGCATCACCGAAA
+3: I F M P P D H T N F N G A I T E N
+2: Y F Y A P R P H E F Q R C D H R K
+1: L F L C P P T T R I S T V R S P K

DNA: ACTAGTAACATTGTACAAGCAACGCGAATTAAACGGAAAACCGAAAACAAA
+3: * * H C T S N A N * T E N R K Q K
+2: L V T L Y K Q R E L N G K P K T K
+1: T S N I V Q A T R I K R K T E N K

DNA: AACCCCAAAGGCCAATCCAACCAAAAAAAAAAGAGGAGGAAAGAAGAAAA
+3: P Q K A N P T K K K E E E R R K K
+2: T P K G Q S N Q K K R G G K K K K
+1: N P K R P I Q P K K K R R K E E K

DNA: AGCGGAAAAAGAGAGTGTGGTTTGTGCGAGCAACAAGAAGCGGAACCAAAA
+3: R K K R V W F V R A T R S G T K R
+2: A E K E S V V C A S N K K R N Q K
+1: S G K R E C G L C E Q Q E A E P K

DNA: GGAAACGTGAAGAAAGCAGGGGGGGTGGGGTAGACAAGAAAGTGCCAAGAT
+3: K R E E S R G G G V D K K V P R F
+2: E T * R K Q G G W G R Q E S A K I
+1: G N V K K A G G V G * T R K C Q D

DNA: TCCGTTCCAAGATATTTTAAACAATAAATTTTCGCACGCCAGCCCAAATTACG
+3: R S K I F * Q * I S H A S P N Y A
+2: P F Q D I L T I N F A R Q P K L R
+1: S V P R Y F N N K F R T P A Q I T

DNA: CAAAATAATCCCCTTAAT
+3: K * S P *
+2: K I I P L
+1: Q N N P L N

Abbildung 15:

Übersetzung der drei Leseraster des Exon 1e (wildtypische Sequenz unterstrichen) des *mbu*^{ΔA}-Exzisionschromosoms in Aminosäuresequenzen. Blau unterlegte DNA-Sequenzen stammen von der P[lacW]-Restinsertion und 8 bp-Insertionsduplikation des *mbu*^{ΔA}-Exzisionschromosoms. Das sich durch die Insertion neu ergebende Peptid des Leserasters +1 ist grün, des Leserasters +2 blau und des Leserasters +3 gelb unterlegt.

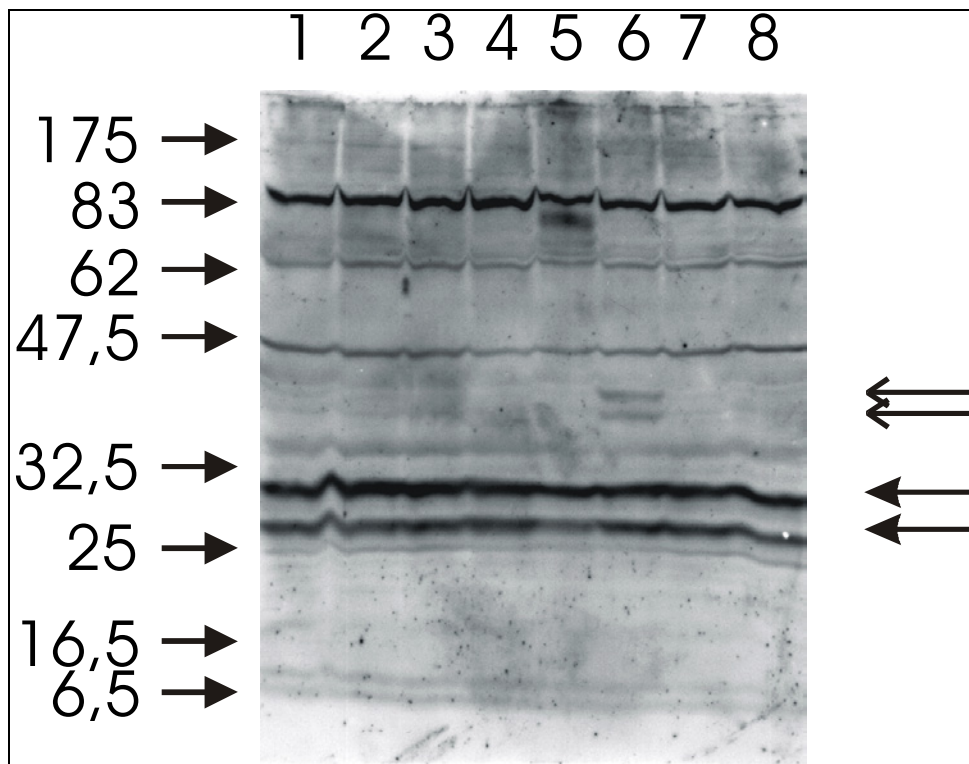


Abbildung 17:

Western-Blot-Analyse der Kopf-Proteinfraction von Männchen verschiedener Linien mit dem polyklonalen CK2 β -Peptidantiserum SA8269. Marker: 6,5 kD-175 kD. Pfeile mit vollen Köpfen sind rechts auf der Höhe zweier CK2 β -Signale eingezeichnet. Die einfachen Pfeile liegen auf der Höhe zweier Signale, die nur in der Kopf-Proteinfraction der *mbu* ^{Δ C}-Männchen in dieser Stärke zu sehen sind.

Spurenbeladung:

1:	WTB	2:	<i>w</i> ¹¹¹⁸	3:	<i>mbu</i> ^{P1{P3843/2}}
4:	<i>mbu</i> ^{Δ1-1}	5:	<i>mbu</i> ^{ΔA}	6:	<i>mbu</i> ^{ΔC}
7:	<i>mbu</i> ^{ΔG}	8:	<i>mbu</i> ^{ΔH}		

Vergleicht man die mit dem polyklonalen Serum SA8269 erhaltenen Signale auf den Kopf-Proteinfractionen von Männchen verschiedener Linien untereinander (Abbildung 17, Spuren 1 bis 8) und mit den Signalen, die mit dem monoklonalen Antikörper auf der Kopf-Proteinfraction von *w*¹¹¹⁸-Männchen und *mbu* ^{Δ A26-2L,w/Y};P[CK2 β -gDNA]⁶/P[CK2 β -gDNA]⁶ erhalten werden (Abbildungen 18, Spuren 1 und 8), kommt man zunächst zu dem Schluß, daß im Kopf männlicher Fliegen mindestens zwei CK2 β -Signale (prominente Signale zwischen 25 und 35 kD) detektierbar sind. Daß es sich hierbei um zwei CK2 β -Isoformen und nicht um die Modifikation eines CK2 β -Polypeptids oder um ein oder mehrere CK2 β '-Signale handelt, kann aus mehreren Beobachtungen gefolgert werden:

- a.) Genomische, als Transgen zur Verfügung gestellte CK2 β -DNA in einem CK2 β -Nullhintergrund führt unter Beibehaltung des kleineren zu einem Verlust des größeren Signals (Spur 7 in Abbildung 18). Dies identifiziert die größere Bande eindeutig als CK2 β -Isoform
- b.) Für das kleinere Signal kann in Weibchen sowohl in der Kopf- als auch in der Restkörperfraktion ein Gendosisseffekt beobachtet werden (Spuren 3-6 in Abbildung 18, durch den untersten Pfeil auf der rechten Seite angezeigt)
- c.) Die beiden Signale werden auch mit dem polyklonalen Serum detektiert, das nicht mit CK2 β' kreuzreagieren sollte (diese Möglichkeit besteht für den monoklonalen Antikörper, da 4 der 5 als Epitop kartierten Aminosäuren in beiden CK2 β -Untereinheiten vorhanden sind)

Die P[lacW]-Insertionen des *mbu*^{P1{P3843/2}}-Chromosoms haben auf die Expression dieser CK2 β -Isoformen im Kopf männlicher Fliegen keinen detektierbaren Einfluß (Spuren 1-3 in Abbildung 17). Für die Exzisionsallele *mbu* ^{Δ 1-1}, *mbu* ^{Δ G} und *mbu* ^{Δ H} (Spuren 4, 7 und 8 in Abbildung 17) kann ebenfalls keine Veränderung im Vergleich zu wildtypischen Fliegen (Spuren 1 und 2 in Abbildung 17) festgestellt werden. Das Exzisionsallel *mbu* ^{Δ A} zeigt ein zusätzliches Signal bei ungefähr 80 kD. Beim *mbu* ^{Δ C}-Exzisionsallel ist die Verstärkung zweier normalerweise sehr schwachen Signale im 40 kD-Bereich zu erkennen.

Die beiden in der Kopf-Proteinfraktion detektierten CK2 β -Isoformen sind mit dem monoklonalen Antikörper ebenfalls in der Restkörper-Proteinfraktion von *w*¹¹¹⁸-Männchen detektierbar (Spur 2 in Abbildung 18). Wiederum fehlt in der Restkörper-Proteinfraktion der *mbu* ^{Δ A26-2L},*w*⁻/Y ;P[CK2 β -gDNA]⁶/ P[CK2 β -gDNA]⁶-Männchen das größere der beiden Signale (Spur 8 in Abbildung 18).

In der Kopf-Proteinfraktion von *w*¹¹¹⁸-Weibchen werden mit dem monoklonalen Antikörper drei prominente Signale detektiert (Spur 3 in Abbildung 18). Ob es sich bei dem größten Signal um eine Kreuzreaktion mit einem anderen Protein oder um eine CK2 β -Isoform handelt kann mit den vorhandenen Daten nicht entschieden werden. In *mbu* ^{Δ A26-2L},*w*⁻/*mbu* ^{Δ A26-2L},*w*⁻; P[CK2 β -gDNA]⁶/ P[CK2 β -gDNA]⁶-Weibchen fehlt wie in Männchen das größere der beiden zwischen 25 und 32,5 kD laufende Signal (Spur 5 in Abbildung 18).

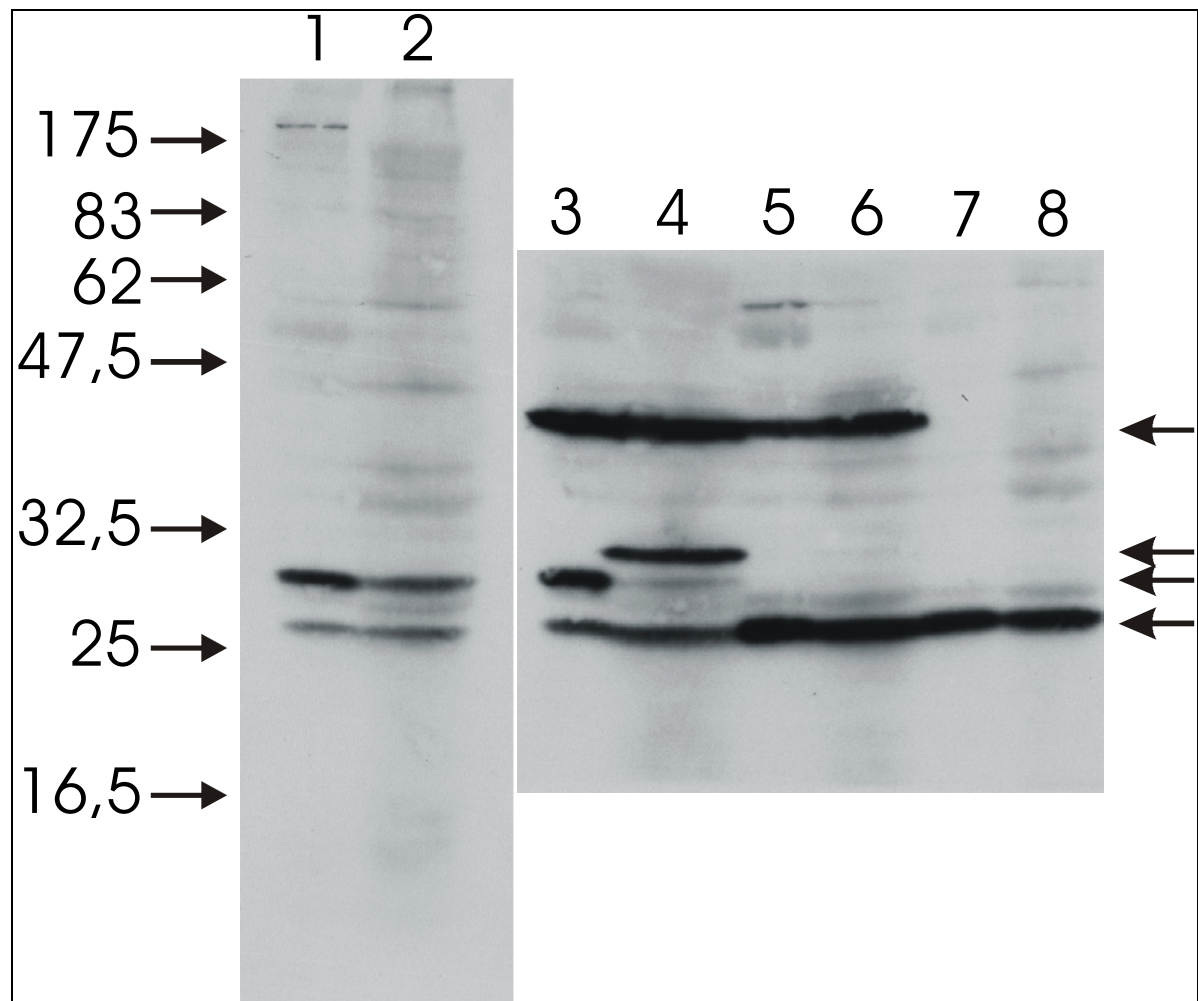


Abbildung 18:

Western-Blot-Analyse mit dem monoklonalen CK2 β -Antikörper. Marker: 6,5 kD-175 kD. Die Pfeile mit vollen Köpfen auf der rechten Seite zeigen prominente CK2 β -Signale an (das obere Signal der Spuren 3-6 kann noch nicht zweifelsfrei als ein CK2 β -Signal eingestuft werden).

- 1: Kopf-Proteinfraktion männlicher w^{1118} -Fliegen
- 2: Restkörper-Proteinfraktion männlicher w^{1118} -Fliegen
- 3: Kopf-Proteinfraktion weiblicher w^{1118} -Fliegen
- 4: Restkörper-Proteinfraktion befruchteter weiblicher w^{1118} -Fliegen
- 5: Kopf-Proteinfraktion von $mbu^{\Delta A26-2L}, w^- / mbu^{\Delta A26-2L}, w^-$; P[CK2 β -gDNA]⁶/ P[CK2 β -gDNA]⁶ – Weibchen
- 6: Restkörper-Proteinfraktion befruchteter $mbu^{\Delta A26-2L}, w^- / mbu^{\Delta A26-2L}, w^-$; P[CK2 β -gDNA]⁶/ P[CK2 β -gDNA]⁶ – Weibchen
- 7: Kopf-Proteinfraktion von $mbu^{\Delta A26-2L}, w^- / Y$; P[CK2 β -gDNA]⁶/ P[CK2 β -gDNA]⁶ – Männchen
- 8: Restkörper-Proteinfraktion von $mbu^{\Delta A26-2L}, w^- / Y$; P[CK2 β -gDNA]⁶/ P[CK2 β -gDNA]⁶ – Männchen

Die Restkörper-Proteinfraktion eiertragender w^{1118} -Weibchen (Spur 4 in Abbildung 18) enthält drei sicher als CK2 β -Isoformen ansprechbare Proteine. Wiederum kann das größte, vierte Signal nicht sicher als CK2 β -Isoform angesprochen werden. Zwei der drei gesicherten Signale sind in der Restkörper-Fraktion von eiertragenden $mbu^{\Delta A26-2L},w^-/mbu^{\Delta A26-2L},w^-$; P[CK2 β -gDNA]⁶/ P[CK2 β -gDNA]⁶-Weibchen nicht detektierbar (Spur 6 in Abbildung 18).

Vergleicht man die auf Kopf- und Restkörper-Proteinfraktionen erhaltenen kleinsten Signale der w^{1118} - und $mbu^{\Delta A26-2L},w^-/mbu^{\Delta A26-2L},w^-$; P[CK2 β -gDNA]⁶/ P[CK2 β -gDNA]⁶-Weibchen, kann ein Gendosisseffekt postuliert werden. Dieser wird vermutlich durch fehlende Gendosisregulation des genomischen CK2 β -Transgens verursacht.

Somit liefern die bisher durchgeführten Western-Blot-Analysen den Beweis für die Existenz von mindestens drei CK2 β -Isoformen in adulten Fliegen und/oder Embryonen. Eine Zuordnung zu den vorhergesagten Isoformen kann mit den vorhandenen Daten noch nicht getroffen werden.

D 11 Zusätzliche genomische CK2 β -Transgene führen zu keiner Veränderung der Pilzkörperentwicklung

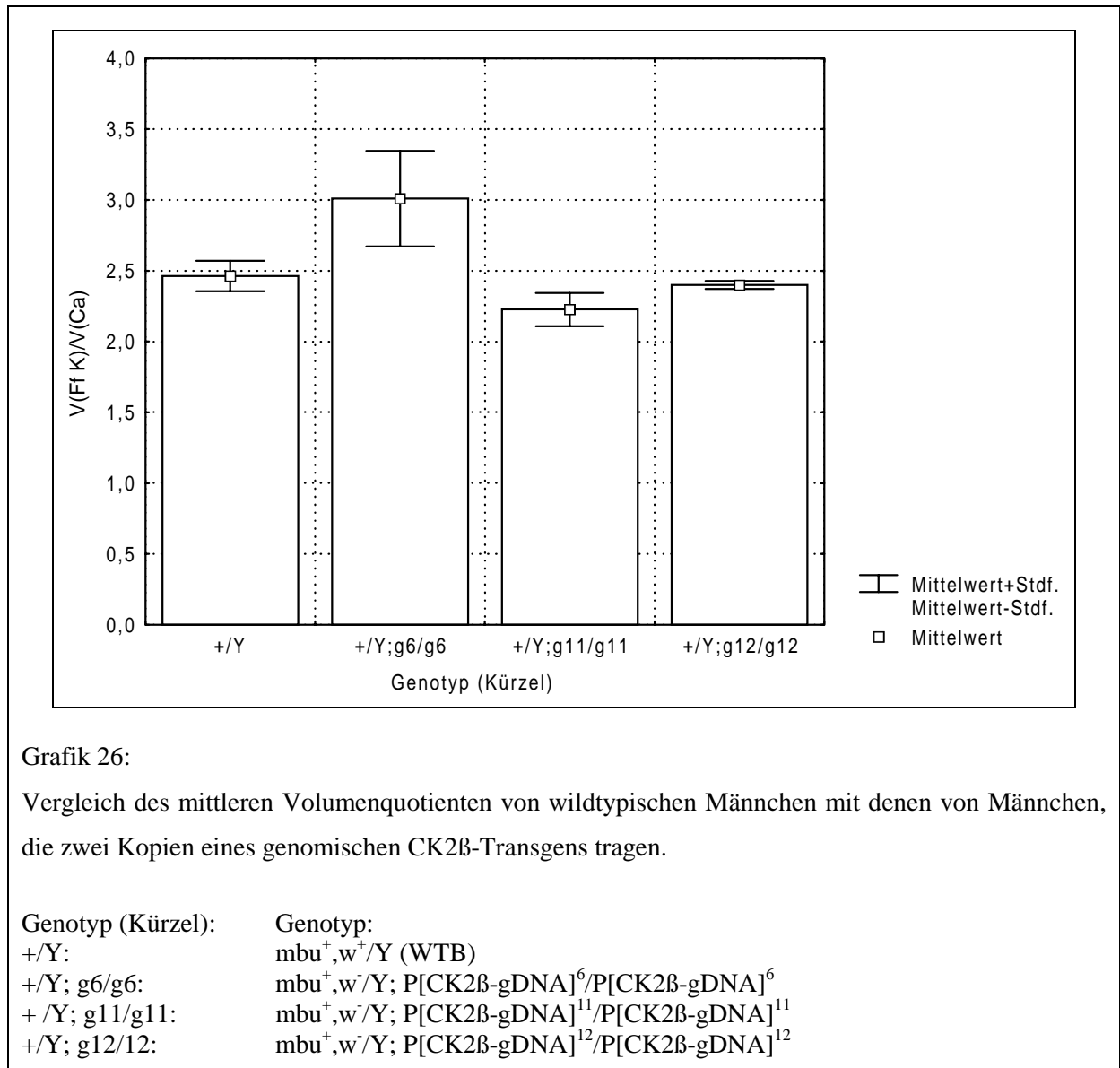
Da die Möglichkeit bestand, daß transgene genomische CK2 β -DNA in einem wildtypischen Hintergrund zu einer Fehl- oder Überexpression einzelner CK2 β -Isoformen führt, und hierdurch eine Störung der Pilzkörperentwicklung verursacht werden könnte, wurde die Pilzkörperentwicklung von Fliegen untersucht, die wildtypisch für CK2 β waren und zusätzlich zwei Kopien eines genomischen CK2 β -Transgens trugen (Grafik 26 und Tabelle 34).

Genotyp (n)	+/Y;g6/g6 (6)	+ /Y;g11/g11 (6)	+/Y;g12/12 (5)
+/Y (26)	0,100696	0,595364	0,519254

Tabelle 34:

Irrtumswahrscheinlichkeiten, die sich beim Vergleich der Volumenverhältniswerte der transgenen Männchen von Grafik 26 mit dem von wildtypischen Männchen ergeben

Die in Tabelle 34 gezeigten Irrtumswahrscheinlichkeiten sprechen dafür, daß die zusätzlichen genomischen CK2 β -Transgene eine normale Pilzkörperentwicklung in Männchen erlauben. Die gleichen Ergebnisse wurden für weibliche Fliegen erhalten (nicht gezeigt).



Grafik 26:

Vergleich des mittleren Volumenquotienten von wildtypischen Männchen mit denen von Männchen, die zwei Kopien eines genomischen CK2 β -Transgen tragen.

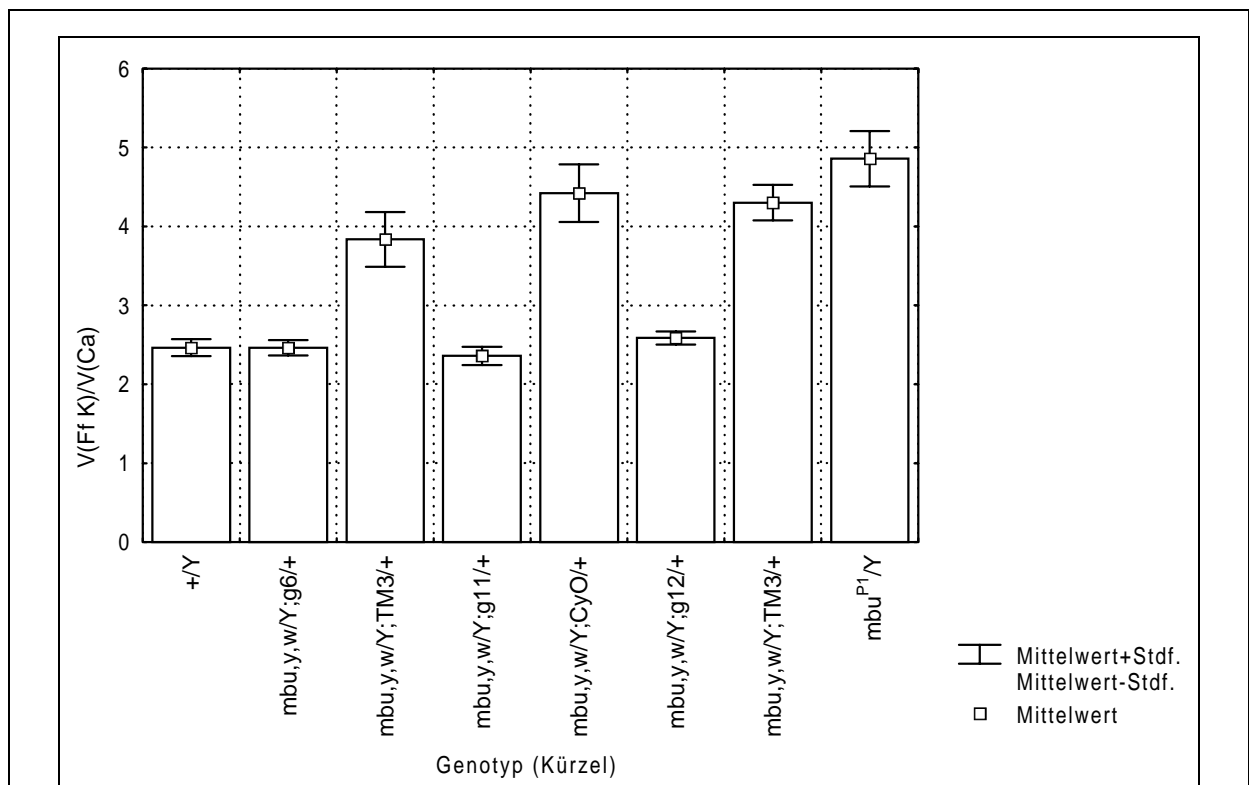
D 12 Der Pilzkörperdefekt in mbu^{P1} -Männchen läßt sich durch ein genomisches CK2 β -Transgen retten

Wie die Analyse der Organisation des CK2 β -Genlokus zeigt (Abschnitt D 8.2), beinhaltet das klonierte genomische CK2 β -Fragment das alternative Exon VIIc nicht (Grafik 25). In Western-Blot-Analysen bestätigt sich, daß nur ein Teil der im Wildtyp zu detektierenden CK2 β -Isoformen von diesem als Transgen zur Verfügung gestellten genomischen Fragment transkribiert werden können (Abbildung 18). Dennoch entwickelt sich der Pilzkörper normal, wenn dieses Transgen im Nullhintergrund verwendet wird (Abschnitt D 4.1). Dies gilt auch für mbu^{P1} -Männchen, die ein solches genomisches Rettungskonstrukt tragen (Grafik 27 und Tabelle 35). In diesem Experiment wurde ein mbu^{P1} -Chromosom verwendet, das als zusätzlichen Marker eine y^- -Mutation trug, wodurch Nondisjunction ausgeschlossen werden

konnte. Die genomischen Transgene wurden im balancierten Zustand eingekreuzt. Hierdurch konnten die Phänotypen von mbu^{P1},y^-,w^- -Männchen derselben Kreuzung verglichen werden, die entweder das genomische Transgen oder den Balancer (Kontrolltiere) trugen.

Alle Kreuzungen wurden nach folgendem Schema durchgeführt:

♀♀ $mbu^{P1},y^-,w^-/FM7a ; +/+$ x ♂♂ $w^-/Y ; P[CK2\beta-gDNA]^x/Bal$



Grafik 27:

Vergleich der mittleren Volumenquotienten von wildtypischen und mbu^{P1},w^- -Männchen mit den mittleren Volumenquotienten von mbu^{P1},y^-,w^- -Männchen, die entweder ein genomisches Transgen oder einen Balancer tragen.

Genotyp (Kürzel):	Genotyp:
+/Y:	$mbu^+,y^+,w^+/Y$ (WTB)
$mbu,yw/Y;g6/+$:	$mbu^{P1},y^-,w^-/Y ; P[CK2\beta-gDNA]^6/+$
$mbu,yw/Y;TM3/+$:	$mbu^{P1},y^-,w^-/Y ; TM3,Sb/+$ (Kontrolle zu $mbu^{P1},y^-,w^-/Y ; P[CK2\beta-gDNA]^6/+$)
$mbu,yw/Y;g11/+$:	$mbu^{P1},y^-,w^-/Y ; P[CK2\beta-gDNA]^{11}/+$
$mbu,yw/Y ;CyO/+$:	$mbu^{P1},y^-,w^-/Y;SM6a,CyO/+$ (Kontrolle zu $mbu^{P1},y^-,w^-/Y;P[CK2\beta-gDNA]^{11}/+$)
$mbu,yw/Y;g12/+$:	$mbu^{P1},y^-,w^-/Y ; P[CK2\beta-gDNA]^{12}/+$
$mbu,yw/Y;TM3/+$:	$mbu^{P1},y^-,w^-/Y ; TM3,Sb/+$ (Kontrolle zu $mbu^{P1},y^-,w^-/Y ; P[CK2\beta-gDNA]^{12}/+$)
mbu^{P1}/Y :	$mbu^{P1},y^+,w^-/Y$ ($mbu^{P1\{P3843/2\}}$)

Genotyp (n)	mbu,y,w/Y; g6/+ (9)	mbu,y,w/Y; TM3/+ (3)	mbu,y,w/Y; g11/+ (9)	mbu,y,w/Y ; CyO/+ (7)	mbu,y,w/Y; g12/+ (21)	mbu,y,w/Y; TM3/+ (21)
+/Y (26)	0,496911	0,012202	0,909851	0,000182	0,123410	0,000000
mbu ^{P1} /Y (21)	0,000051	0,315482	0,000035	0,541772	0,000001	0,324134
mbu,y,w/Y; g6/+ (9)	-	0,012560	-	-	-	-
mbu,y,w/Y; g11/+ (9)	-	-	-	0,000856	-	-
mbu,y,w/Y; g12/+ (21)	-	-	-	-	-	0,000000

Tabelle 35:

Zur Ermittlung der Irrtumswahrscheinlichkeiten wurden die Werte der *mbu^{P1},y⁻,w⁻*-Männchen, die ein genomisches Transgen tragen, mit denen von WTB-, *mbu^{P1},w⁻*- und den Kontrollmännchen verglichen.

Die in Tabelle 35 gezeigten Irrtumswahrscheinlichkeiten bestätigen, daß der Pilzkörperphänotyp von *mbu^{P1},y⁻,w⁻*-Männchen durch die Bereitstellung eines genomischen CK2β-Transgens gerettet werden kann, und somit CK2β das in *mbu^{P1}* mutierte Gen darstellt. Jede andere, möglicherweise auf dem *mbu^{P1{P3843/2}}*-Chromosom vorhandene Zweitmutation kann nicht die Ursache des Pilzkörperentwicklungsdefekts von *mbu^{P1}*-Fliegen sein.

D 13 Gewebespezifische Expression der CK2β-VIIa-Isoform im wildtypischen Hintergrund verändert die normale Pilzkörperentwicklung nicht

Eine für die CK2β-VIIa-Isoform codierende cDNA (DmA15-12ZAP, Bidwai *et al.* (2000); Splicevariante Ie/VIIa, siehe Grafik 25) wurde durch EcoR1-Vollverdau und anschließenden Xho1-Partialverdau des die cDNA enthaltenden Plasmids isoliert und über EcoR1/Xho1 (EcoR1-5'-3'-Xho1) in den Fliegentransformationsvektor pP[UAST] kloniert. Die nach der Transformation erhaltenen P[UAS:CK2β]^x-Transgene wurden zunächst auf ihre Funktionalität hin überprüft. Hierzu wurde ein Hitzeschockpromotor-Gal4-Treiber (P[hsP-Gal4]) eingekreuzt und die erhaltenen Tiere einem Hitzeschock ausgesetzt. Auf Western-Blots konnte nachgewiesen werden, daß solche Tiere deutlich mehr CK2β-Protein enthielten als Vergleichstiere, die keinem Hitzeschock ausgesetzt waren (nicht gezeigt).

Transgene Fliegen, die ein solches balanciertes CK2β-VIIa-cDNA-Konstrukt (P[UAS:CK2β]^{III}) trugen, wurden dann mit den in Tabelle 36 aufgelisteten Gal4-Treiberlinien gekreuzt. Hierdurch wurde eine Expression der CK2β-VIIa-Isoform in verschiedenen Teilen des Pilzkörpers zu unterschiedlichen Entwicklungszeitpunkten oder eine

ubiquitäre Expression erzielt. Solche Tiere wurden zusammen mit Kontrolltieren (balancertragende Geschwistertiere) auf ihren Pilzkörperphänotyp hin untersucht. Durch diese Experimente sollte ermittelt werden, ob eine gewebespezifische oder ubiquitäre Expression dieser Isoform im wildtypischen Hintergrund zu einer Pilzkörperfehlentwicklung führen kann. In keinem Fall konnte eine durch die Expression der CK2 β -VIIa-Isoform verursachte veränderte Pilzkörperentwicklung festgestellt werden.

Gal4-Treiber	Beginn der Gal4-Expression
189Y-P[Gal4]	?
201Y-P[Gal4]	Larve**
238Y-P[Gal4]	Embryo**
30Y-P[Gal4]	erste Larve**
47Y-P[Gal4]	?
c492b-P[Gal4]	? (nach der dritten Larve)**
P[ey-Gal4]	?
H24-P[Gal4]	?
P[MB247/36Y-Gal4]	Ende dritte Larve*
OK107-P[Gal4]	erste Larve*** (Embryo?)
P[tubP-Gal4]	ubiquitäre Expression

Tabelle 36:

Gal4-Treiberlinien, die zur Expression der CK2 β -VIIa-Isoform im wildtypischen Hintergrund verwendet wurden. Für manche Treiber ist der Beginn der Gal4-Expression nicht bekannt; für P[ey-Gal4] ist eine Expression im Pilzkörper nicht gesichert. [* Michael Marder, persönliche Mitteilung; **Tettamanti *et al.* (1997); *** Lee *et al.* (1999)].

D 14 Gewebespezifische Expression der CK2 β -VIIa-Isoform in *mbu^{P1}*-Männchen kann deren Pilzkörperphänotyp teilweise retten

Durch Expression der CK2 β -VIIa-Isoform mit den Tabelle 36 aufgelisteten Gal4-Treiberlinien in *mbu^{P1}*-Männchen wurde untersucht, ob die Expression dieser Isoform in dem durch die Treiberlinien bestimmten zeitlichen und gewebespezifischen Muster genügt, eine teilweise oder vollständige Reversion des *mbu^{P1}*-Pilzkörperentwicklungsdefekt zu erreichen. Die zur Erzeugung der untersuchten *mbu^{P1}*-Männchen durchgeführten Kreuzungen wurden nach folgendem Schema durchgeführt:

♀♀ *mbu^{P1}/FM7a; P[UAS:CK2 β]^{III}/SM6a,CyO* x ♂♂ Treiber-P[Gal4]/Treiber-P[Gal4]

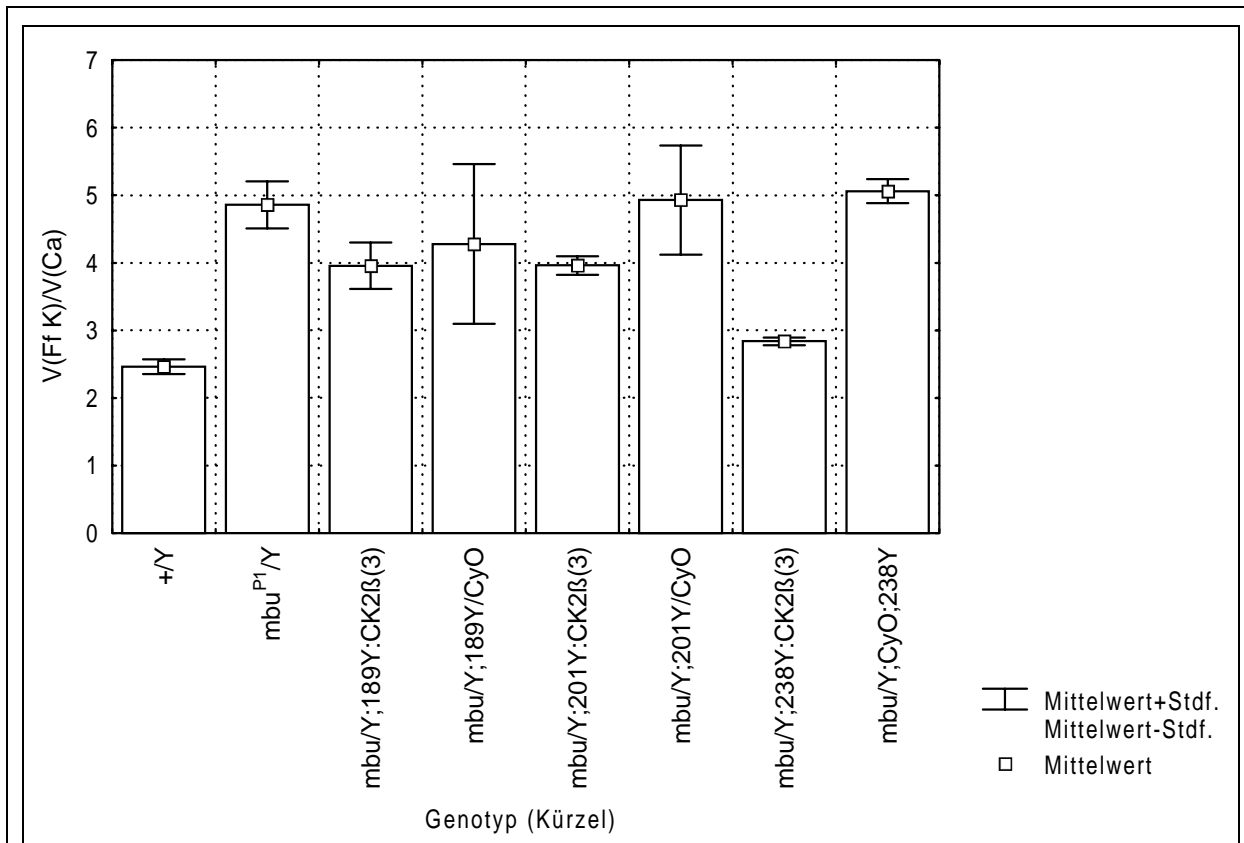
Die den SM6a,CyO-Balancer tragenden *mbu^{P1}*-Männchen der F1 wurden als Kontrolltiere verwendet.

Mit fünf verschiedenen Treiberlinien (H24-P[Gal4], c492b-P[Gal4], 238Y-P[Gal4], OK107-P[Gal4] und P[tubP-Gal4]) konnte eine Expression der CK2 β -VIIa-Isoform erreicht werden, die zu einer teilweisen (H24-P[Gal4], c492b-P[Gal4], OK107-P[Gal4] und 238Y-P[Gal4]; dieser Abschnitt) oder vollständigen (P[tubP-Gal4]; Abschnitt D 15) Reversion des *mbu^{P1}*-Pilzkörperentwicklungsdefekts führte. Die Grafiken 28 – 30 und die Tabellen 37 – 39 zeigen die gewonnenen Daten. Die unter Verwendung des P[tubP-Gal4]-Treibers in *mbu^{P1}*- und *mbu ^{Δ A26-2L}*-Männchen durchgeführten Experimente sind in den Abschnitten D 15 und D 16 beschrieben.

Genotyp (n)	<i>mbu/Y ;189Y:CK2β(3)</i> (5)	<i>mbu/Y ;201Y:CK2β(3)</i> (9)	<i>mbu/Y ;238Y:CK2β(3)</i> (38)
+/Y (26)	0,001840	0,000033	0,000201
<i>mbu^{P1}/Y</i> (21)	0,204568	0,230424	0,000000
<i>mbu/Y ;189Y/CyO</i> (4)	0,327194	-	-
<i>mbu/Y ;201Y/CyO</i> (3)	-	0,229430	-
<i>mbu/Y ;CyO;238Y</i> (27)	-	-	0,000000

Tabelle 37:

Die Irrtumswahrscheinlichkeiten wurden ermittelt, indem die Volumenverhältniswerte der die CK2 β -VIIa-Isoform exprimierenden *mbu^{P1}*-Männchen mit denen von WTB-, *mbu^{P1}*- und Kontrollmännchen verglichen wurden.



Grafik 28:

Vergleich der mittleren Volumenquotienten von wildtypischen und mbu^{P1} -Männchen mit denen von mbu^{P1} -Männchen, die heterozygot für einen bestimmten Treiber und $P[UAS:CK2B]^{III}$ oder heterozygot für den jeweiligen Treiber und ein Balancerchromosom sind.

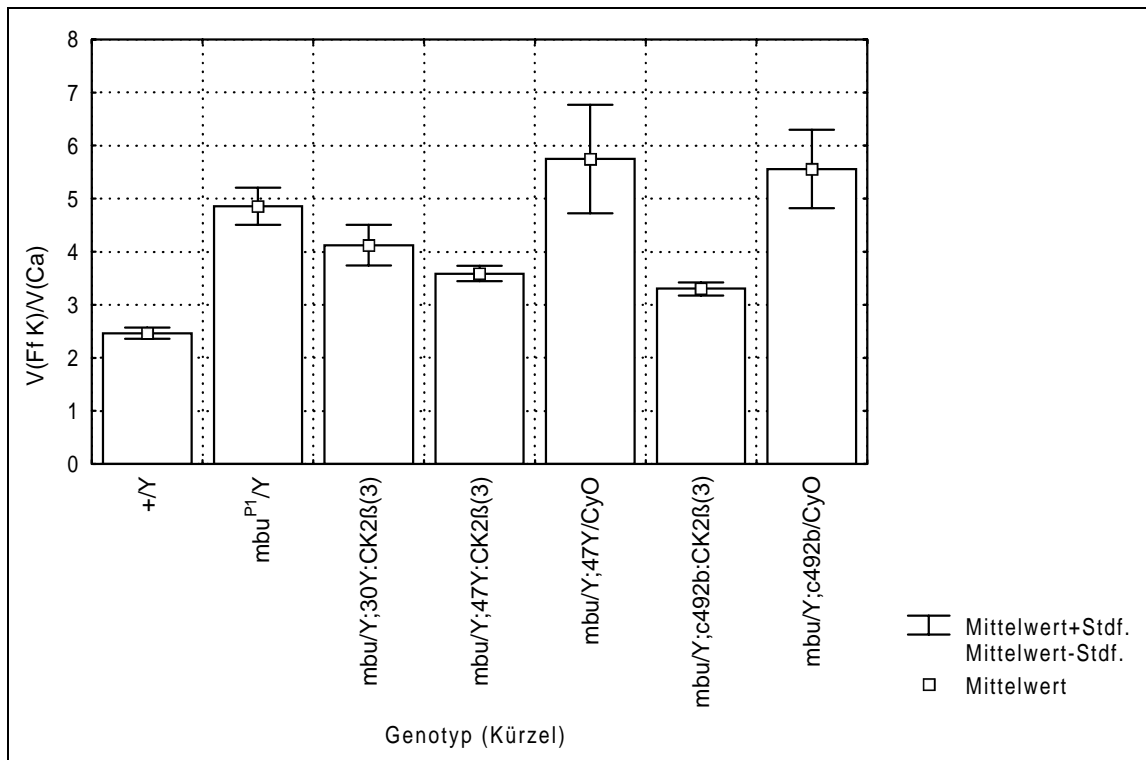
Genotyp (Kürzel)

+Y:	w^+/Y (WTB)
mbu^{P1}/Y :	$mbu^{P1},w^-/Y$ ($mbu^{P1\{P3843/2\}}$)
$mbu/Y;189Y:CK2B(3)$:	$mbu^{P1},w^-/Y;189Y-P[Gal4]/P[UAS:CK2B]^{III}$
$mbu/Y;189Y/CyO$:	$mbu^{P1},w^-/Y;189Y-P[Gal4]/SM6a,CyO$
$mbu/Y;201Y:CK2B(3)$:	$mbu^{P1},w^-/Y;201Y-P[Gal4]/P[UAS:CK2B]^{III}$
$mbu/Y;201Y/CyO$:	$mbu^{P1},w^-/Y;201Y-P[Gal4]/SM6a,CyO$
$mbu/Y;238Y:CK2B(3)$:	$mbu^{P1},w^-/Y;P[UAS:CK2B]^{III}/+;238Y-P[Gal4]/+$
$mbu/Y;CyO;238Y$:	$mbu^{P1},w^-/Y;SM6a,CyO/+;238Y-P[Gal4]/+$

Genotyp (n)	$mbu/Y;30Y:CK2B(3)$ (9)	$mbu/Y;47Y:CK2B(3)$ (11)	$mbu/Y;c492b:CK2B(3)$ (25)
+Y (26)	0,000074	0,000038	0,000013
mbu^{P1}/Y (21)	0,267534	0,037260	0,000474
-	-	-	-
$mbu/Y;47Y/CyO$ (3)	-	0,010202	-
$mbu/Y;c492b;CyO$ (6)	-	-	0,000809

Tabelle 38:

Zur Ermittlung der Irrtumswahrscheinlichkeiten wurden wiederum die Volumenverhältniswerte der die CK2B-VIIa-Isoform exprimierenden mbu^{P1} -Männchen mit denen von WTB-, mbu^{P1} - und Kontrollmännchen verglichen.



Grafik 29:

Vergleich der mittleren Volumenquotienten von WTB- und *mbu^{P1}*-Männchen mit denen von *mbu^{P1}*-Männchen, die entweder heterozygot für einen Treiber und P[UAS:CK2β]^{III} oder heterozygot für einen Treiber und ein Balancerchromosom sind.

Genotyp (Kürzel)

+/Y:

mbu^{P1}/Y:

mbu/Y; 30Y:CK2β(3) :

mbu/Y; 47Y:CK2β(3) :

mbu/Y; 47Y/CyO:

mbu/Y; c492b:CK2β(3) :

mbu/Y; c492b ; CyO:

Genotyp

w⁺/Y (WTB)

mbu^{P1},w⁻/Y (mbu^{P1}{P3843/2})

mbu^{P1},w⁻/Y; 30Y-P[Gal4]/[UAS:CK2β]^{III}

mbu^{P1},w⁻/Y; 47Y-P[Gal4]/P[UAS:CK2β]^{III}

mbu^{P1},w⁻/Y; 47Y-P[Gal4]/SM6a,CyO

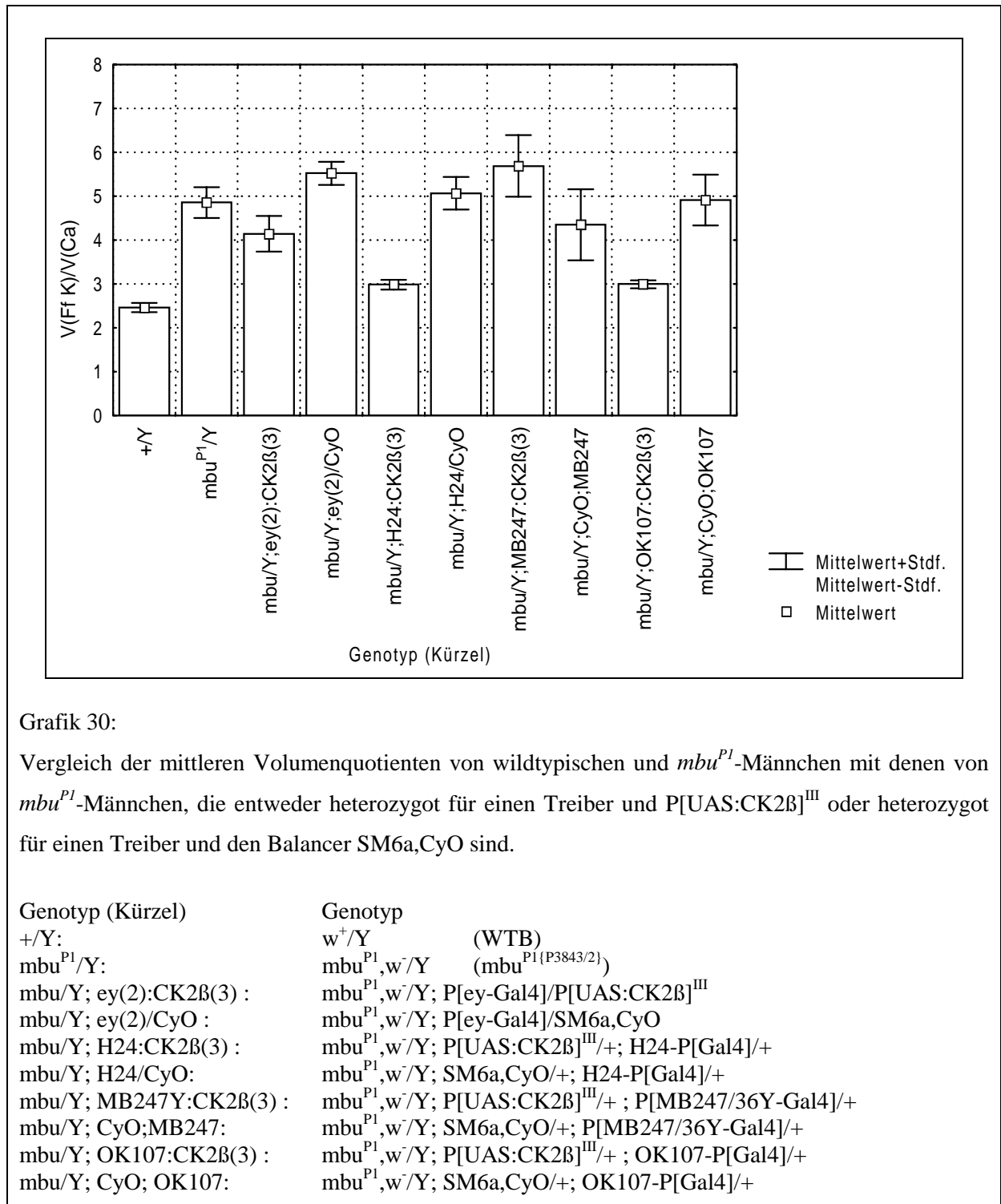
mbu^{P1},w⁻/Y; c492b-P[Gal4]/P[UAS:CK2β]^{III}

mbu^{P1},w⁻/Y; c492b-P[Gal4]/SM6a,CyO

Genotyp (n)	mbu/Y ; ey(2):CK2β(3) (8)	mbu/Y ; H24:CK2β(3) (15)	mbu/Y ; MB247Y:CK2β(3) (6)	mbu/Y ; OK107:CK2β(3) (23)
+/Y (26)	0,000259	0,001279	0,000166	0,000195
mbu ^{P1} /Y (21)	0,283059	0,000111	0,381680	0,000012
mbu/Y ;ey(2):CyO (8)	0,015720	-	-	-
mbu/Y ;H24/CyO (4)	-	0,002702	-	-
mbu/Y ;CyO;MB247 (3)	-	-	0,196715	-
mbu/Y ;CyO;OK107 (6)	-	-	-	0,000695

Tabelle 39:

Zur Ermittlung der Irrtumswahrscheinlichkeiten wurden die Volumenquotienten der die CK2β-VIIa-Isoform exprimierenden *mbu^{P1}*-Männchen mit denen von WTB-, *mbu^{P1}*- und Kontrollmännchen verglichen.



Grafik 30:

Vergleich der mittleren Volumenquotienten von wildtypischen und mbu^{P1} -Männchen mit denen von mbu^{P1} -Männchen, die entweder heterozygot für einen Treiber und $P[UAS:CK2\beta]^{III}$ oder heterozygot für einen Treiber und den Balancer SM6a,CyO sind.

Die in den Tabellen 37 – 39 gezeigten Irrtumswahrscheinlichkeiten lassen den Schluß zu, daß sich die Volumenquotienten der $mbu^{P1}, w^-/Y; P[UAS:CK2\beta]^{III}/+; 238Y-P[Gal4]/+ -$, $mbu^{P1}, w^-/Y; c492b-P[Gal4]/P[UAS:CK2\beta]^{III} -$, $mbu^{P1}, w^-/Y; P[UAS:CK2\beta]^{III}/+; H24-P[Gal4]/+$ und $mbu^{P1}, w^-/Y; P[UAS:CK2\beta]^{III}/+; OK107-P[Gal4]/+$ -Männchen sowohl signifikant von den Volumenquotienten wildtypischer als auch signifikant von den Volumenquotienten von mbu^{P1} -Männchen ($mbu^{P1\{P3843/2\}}$ - und Kontrollmännchen) unterscheiden. Diese Tiere zeigen somit eine teilweise Reversion des in mbu^{P1} beobachteten Pilzkörpercalyxphänotyps.

D 15 Ubiquitäre Expression der CK2β-VIIa-Isoform ermöglicht eine normale Pilzkörperentwicklung in *mbu^{P1}*-Männchen

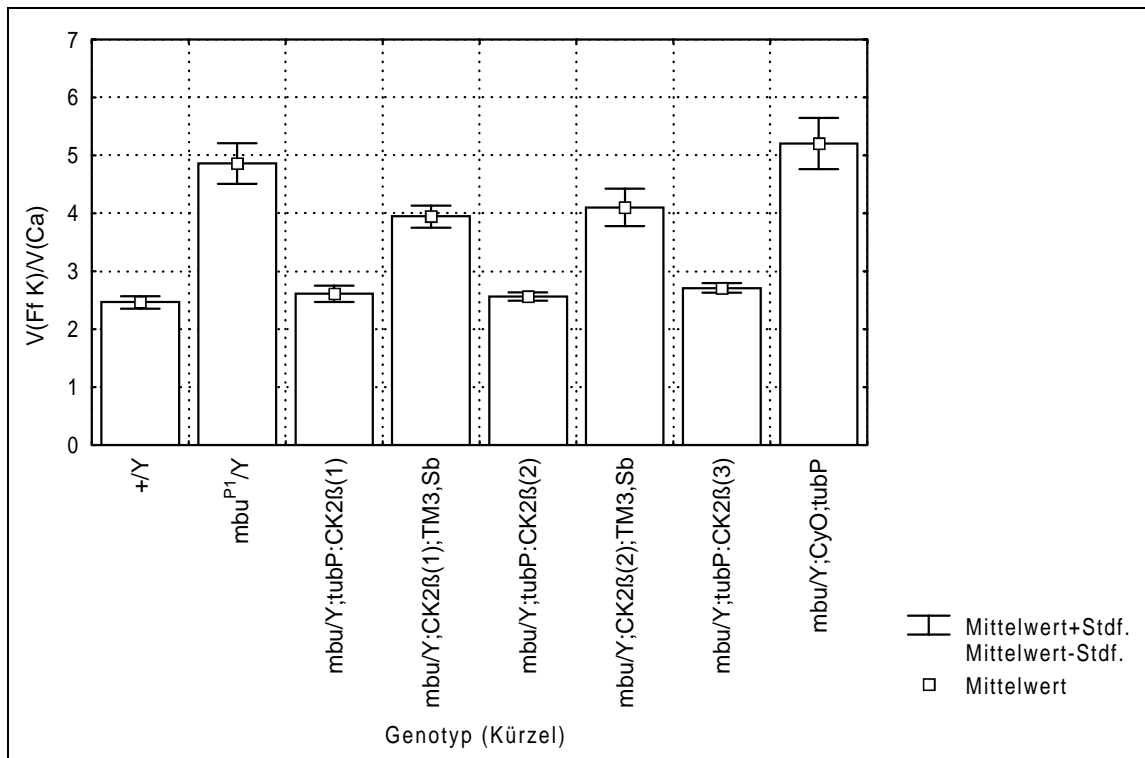
Drei verschiedene, balancierte P[UAS:CK2β]-Insertionslinien wurden durch Einkreuzen des tubP-Gal4-Treibers und des *mbu^{P1{P3843/2}}*-Chromosoms zur ubiquitären Expression der CK2β-VIIa-Isoform in *mbu^{P1}*-Männchen verwendet. Sowohl die *mbu^{P1}*-F1-Männchen, welche diese CK2β-Isoform ubiquitär exprimierten, als auch die als Kontrolle dienenden balancertragenden *mbu^{P1}*-F1-Männchen wurden auf ihren Pilzkörpercalyxphänotyp hin untersucht (Grafik 31 und Tabelle 40).

Durch diese Experimente konnte gezeigt werden, daß ubiquitäre Expression der CK2β-VIIa-Isoform in *mbu^{P1}*-Männchen eine vollständige Reversion des *mbu^{P1}*-Pilzkörperphänotyps verursacht. Der chromosomale Insertionsort des jeweils verwendeten P[UAS:CK2β]-Transgens spielt hierbei keine Rolle.

p	Genotyp (n)	mbu/Y ;tubP :CK2β(1) (7)	mbu/Y ;tubP :CK2β(2) (8)	mbu/Y ;tubP :CK2β(3) (13)
	+/Y (26)	0,186476	0,133056	0,025463
	<i>mbu^{P1}</i> /Y (21)	0,000342	0,000116	0,000020
	<i>mbu</i> /Y ;CK2β(1) ;TM3,Sb (6)	0,002702	-	-
	<i>mbu</i> /Y ;CK2β(2) ;TM3,Sb (7)	-	0,005482	-
	<i>mbu</i> /Y ;CyO ;tubP (6)	-	-	0,000626

Tabelle 40:

Die Irrtumswahrscheinlichkeiten wurden ermittelt, indem die Volumenverhältniswerte der die CK2β-VIIa-Isoform ubiquitär exprimierenden *mbu^{P1}*-Männchen mit denen von WTB-, *mbu^{P1}*- und Kontrollmännchen verglichen wurden.



Grafik 31:

Vergleich der mittleren Volumenquotienten von WTB- und *mbu*^{P1}-Männchen mit denen von *mbu*^{P1}-Männchen, die entweder heterozygot für den tubP-Gal4-Treiber und ein P[UAS:CK2β]-Transgen oder heterozygot für eines der Transgene und ein Balancerchromosom sind.

Genotyp (Kürzel):

+/Y:

mbu^{P1}/Y:*mbu*/Y; tubP :CK2β(1) :*mbu*/Y; CK2β(1) ;TM3,Sb :*mbu*/Y; tubP :CK2β(2) :*mbu*/Y; CK2β(2) ;TM3,Sb :*mbu*/Y; tubP :CK2β(3) :*mbu*/Y; CyO; tubP :

Genotyp:

w⁺/Y (WTB)*mbu*^{P1},*w*⁻/Y (*mbu*^{P1{P3843/2}})*mbu*^{P1},*w*⁻/Y; P[UAS:CK2β]^I/+; P[tubP-Gal4]/+*mbu*^{P1},*w*⁻/Y; P[UAS:CK2β]^I/+; TM3,Sb/+*mbu*^{P1},*w*⁻/Y; P[UAS:CK2β]^{II}/+; P[tubP-Gal4]/+*mbu*^{P1},*w*⁻/Y; P[UAS:CK2β]^{II}/+; TM3,Sb/+*mbu*^{P1},*w*⁻/Y; P[UAS:CK2β]^{III}/+; P[tubP-Gal4]/+*mbu*^{P1},*w*⁻/Y; SM6a,CyO/+; P[tubP-Gal4]/+

D 16 Ubiquitäre Expression der CK2β-VIIa-Isoform rettet die Letalität des $mbu^{\Delta A26-2L}$ -Chromosoms

Die Letalität des $mbu^{\Delta A26-2L}$ -Chromosoms ist durch die Bereitstellung eines genomischen Transgens rettbar (Abschnitt D 4.1). Von diesem werden nicht alle im Wildtyp detektierbaren CK2β-Isoformen gebildet (Abschnitt D 10). Daher bestand die Möglichkeit, daß die ubiquitäre Expression nur einer CK2β-Isoform ausreichend ist, die Letalität des $mbu^{\Delta A26-2L}$ -Chromosoms zu retten. Um diese Möglichkeit zu prüfen, wurde CK2β-VIIa-cDNA durch Einkreuzen eines Tubulinpromotor-Gal4-Treiberkonstrukts (P[tubP-Gal4]) im $mbu^{\Delta A26-2L}$ -Hintergrund ubiquitär exprimiert und in der Folgegeneration nach geretteten $mbu^{\Delta A26-2L}$ -Fliegen gesucht. Da Männchen, die dem Phänotyp nach gerettete $mbu^{\Delta A26-2L}$ -Männchen sein konnten, gefunden wurden, mußte wegen der fehlenden geeigneten Markierung des Letalchromosoms Nondisjunction durch Kreuzung dieser Männchen mit $mbu^{\Delta A26-2L},w^-/FM7a$ -Weibchen ausgeschlossen werden. Unter den weiblichen Nachkommen einer solchen Kreuzung dürfen bei erfolgter Letalitätsrettung keine $mbu^{\Delta A26-2L},w^-/w^-$ -Weibchen sein (Abbildung 19). Die unter Verwendung dieser Genetik als erfolgreich gewertete Rettung der Letalität des $mbu^{\Delta A26-2L},w^-$ -Chromosoms wurde nachfolgend (Abschnitt D 17) durch die Verwendung eines $mbu^{\Delta A26-2L},y^-,w^-$ -Chromosoms bestätigt. Die Volumenquotienten von potentiell durch ubiquitäre cDNA-Expression geretteten $mbu^{\Delta A26-2L}$ -Männchen (F1-Männchen des in Abbildung 19 gezeigten Erbgangs) entsprachen dem von WTB-Männchen (nicht gezeigt).

P:
 $\text{♀♀ } mbu^{\Delta A26-2L},w^-/FM7a ; P[tubP-Gal4]/+ \quad \times$
 $\text{♂♂ } w^-/Y ; P[UAS:CK2\beta]/Bal$

F1:
 $\text{♀♀ } mbu^{\Delta A26-2L},w^-/FM7a ; P[tubP-Gal4]/+ \quad \times$
 $\text{♂♂ } mbu^{\Delta A26-2L},w^-/Y ; P[UAS:CK2\beta]/+ ; P[tubP-Gal4]/+ \text{ (geretteter 'rotäugiger' Genotyp)}$
 oder
 $\text{♂♂ } w^-/Y ; P[UAS :CK2\beta]/+ ; P[tubP-Gal4]/+ \quad \text{('rotäugiger' Nondisjunction Genotyp)}$

F2 :
 $mbu^{\Delta A26-2L},w^-/w^-$ - Weibchen vorhanden --> Nondisjunction
 abwesend --> Rettung durch ubiquitäre cDNA-Expression

Abbildung 19:

Kreuzungsschema, das bei cDNA-Rettungsexperimenten im Letalhintergrund zum Testen auf Nondisjunction verwendet wurde.

D 17 N-terminale Phosphorylierung der CK2 β -Untereinheit durch die CK2 α -Untereinheit ist kein lebensnotwendiger Prozess

Die im vorherigen Abschnitt ermittelte Letalitätsrettung des *mbu* ^{$\Delta A26-2L$} ,*w*⁻-Chromosoms durch ubiquitäre Expression einer unter UAS-Kontrolle stehenden CK2 β -cDNA eröffnete die Möglichkeit, in der Literatur als funktionell wichtig beschriebene Aminosäurereste der CK2 β -Untereinheit durch cDNA-*in vitro*-Mutagenese gegen sterisch ähnliche Aminosäurereste auszutauschen, und derart veränderte CK2 β -Proteine im CK2 β -Nullhintergrund zu charakterisieren.

Ausgangspunkt für eine CK2 β -*in vitro*-Mutagenese war die in Abschnitt D 13 beschriebene CK2 β -cDNA (DmA15-12ZAP). Von anderen Arbeitsgruppen durchgeführte *in vitro*-Experimente und Homologien zu anderen Proteinen [Cyclin: Allende und Allende (1995)] unterstreichen die potentielle *in vivo*-Funktion dreier CK2 β -Strukturmodule. N-terminal gelegene Serinreste (Ser² und Ser³) gelten als Phosphorylgruppenakzeptoren bei CK2-Holoenzym-Autophosphorylierungsreaktionen [Litchfield *et al.* (1991), Tuazon *et al.* (1991), Hinrichs *et al.* (1993), Lin *et al.* (1994)]; vier Cysteinresten (Cys¹⁰⁹, Cys¹¹⁴, Cys¹³⁷ und Cys¹⁴⁰) wird die für eine β - β -Dimerisierung notwendige koordinierte Bindung eines Zn²⁺-Ions zugeschrieben [Meggio *et al.* (2000), Canton *et al.* (2001), Graham *et al.* (2000), Chantalat *et al.* (1999)], und ein Argininrest (Arg⁴⁷) eines als Destruction-Box bezeichneten Strukturmoduls [Allende und Allende (1995)] gilt als bedeutend für die Funktionalität dieses Steuerungselements des ubiquitinvermittelten Proteinabbaus [Glutzer *et al.* (1991)].

Um den Anteil der cDNA, auf dem die *in vitro*-Mutagenesen durchgeführt wurde, möglichst klein zu halten, wurden zwei Konstrukte hergestellt. CK2 $\beta\Delta$ KpnI entstand durch KpnI-Verdau von DmA15-12ZAP und anschließende Religation des Vektoranteils. Dieses Plasmid enthält die ersten 373 Basenpaare der CK2 β -cDNA und wurde für N-terminale Serin-Alanin-Substitutionen verwendet. CK2 β KpnI entstand durch KpnI-Verdau von DmA15-12ZAP und anschließender Klonierung dieses Fragments über KpnI in pBSSK+. Auf diesem Konstrukt wurden die Cystein-Serin-Substitutionen zur Mutagenese der zinkfingerbildenden Cysteine und die Arginin-Cystein-Substitution zur Mutagenese der potentiellen Destruction-Box durchgeführt. Abbildung 20 gibt einen Überblick über die durchgeführten Aminosäureaustausche, Tabelle 1 (Material B 15) listet die zur *in vitro*-Mutagenese verwendeten Primer auf.

1 CKIIβ WT	1	15	16	30	31	45	46	60	61	75	76	90
	MSSS	EEVSWVTWFCG	LRGNEFFCEVDEDEYI	QDKFNLTGLNEQVFN	YRQALDMILDLEPED	ELEDNPLQSDMTEQA	AEMLYGLIHARYILT					
2 CKIIβ SSS	MAAA	EEVSWVTWFCG	LRGNEFFCEVDEDEYI	QDKFNLTGLNEQVFN	YRQALDMILDLEPED	ELEDNPLQSDMTEQA	AEMLYGLIHARYILT					
3 CKIIβ AAS	MAAS	EEVSWVTWFCG	LRGNEFFCEVDEDEYI	QDKFNLTGLNEQVFN	YRQALDMILDLEPED	ELEDNPLQSDMTEQA	AEMLYGLIHARYILT					
4 CKIIβ SAS	MSAS	EEVSWVTWFCG	LRGNEFFCEVDEDEYI	QDKFNLTGLNEQVFN	YRQALDMILDLEPED	ELEDNPLQSDMTEQA	AEMLYGLIHARYILT					
5 CKIIβ ASS	MASS	EEVSWVTWFCG	LRGNEFFCEVDEDEYI	QDKFNLTGLNEQVFN	YRQALDMILDLEPED	ELEDNPLQSDMTEQA	AEMLYGLIHARYILT					
6 CKIIβ SSA	MSSA	EEVSWVTWFCG	LRGNEFFCEVDEDEYI	QDKFNLTGLNEQVFN	YRQALDMILDLEPED	ELEDNPLQSDMTEQA	AEMLYGLIHARYILT					
7 CKIIβ D-Box	MSSS	EEVSWVTWFCG	LRGNEFFCEVDEDEYI	QDKFNLTGLNEQVFN	YRQALDMILDLEPED	ELEDNPLQSDMTEQA	AEMLYGLIHARYILT					
8 CKIIβ CF1	MSSS	EEVSWVTWFCG	LRGNEFFCEVDEDEYI	QDKFNLTGLNEQVFN	YRQALDMILDLEPED	ELEDNPLQSDMTEQA	AEMLYGLIHARYILT					
9 CKIIβ CF2	MSSS	EEVSWVTWFCG	LRGNEFFCEVDEDEYI	QDKFNLTGLNEQVFN	YRQALDMILDLEPED	ELEDNPLQSDMTEQA	AEMLYGLIHARYILT					
1 CKIIβ WT	91	105	106	120	121	135	136	150	151	165	166	180
	NRGIAQMIEKYQTGD	FGHC	PRVY	ESQPML	PLGLSDIPGEAMVKT	YCPKC	IDVYTPKSSR	HHHTDGAYFGTGFPF	MLFMVHPEYRPKRPT			
2 CKIIβ AAA	NRGIAQMIEKYQTGD	FGHC	PRVY	ESQPML	PLGLSDIPGEAMVKT	YCPKC	IDVYTPKSSR	HHHTDGAYFGTGFPF	MLFMVHPEYRPKRPT			
3 CKIIβ AAS	NRGIAQMIEKYQTGD	FGHC	PRVY	ESQPML	PLGLSDIPGEAMVKT	YCPKC	IDVYTPKSSR	HHHTDGAYFGTGFPF	MLFMVHPEYRPKRPT			
4 CKIIβ SAS	NRGIAQMIEKYQTGD	FGHC	PRVY	ESQPML	PLGLSDIPGEAMVKT	YCPKC	IDVYTPKSSR	HHHTDGAYFGTGFPF	MLFMVHPEYRPKRPT			
5 CKIIβ ASS	NRGIAQMIEKYQTGD	FGHC	PRVY	ESQPML	PLGLSDIPGEAMVKT	YCPKC	IDVYTPKSSR	HHHTDGAYFGTGFPF	MLFMVHPEYRPKRPT			
6 CKIIβ SSA	NRGIAQMIEKYQTGD	FGHC	PRVY	ESQPML	PLGLSDIPGEAMVKT	YCPKC	IDVYTPKSSR	HHHTDGAYFGTGFPF	MLFMVHPEYRPKRPT			
7 CKIIβ D-Box	NRGIAQMIEKYQTGD	FGHC	PRVY	ESQPML	PLGLSDIPGEAMVKT	YCPKC	IDVYTPKSSR	HHHTDGAYFGTGFPF	MLFMVHPEYRPKRPT			
8 CKIIβ CF1	NRGIAQMIEKYQTGD	FGHC	PRVY	ESQPML	PLGLSDIPGEAMVKT	YCPKC	IDVYTPKSSR	HHHTDGAYFGTGFPF	MLFMVHPEYRPKRPT			
9 CKIIβ CF2	NRGIAQMIEKYQTGD	FGHC	PRVY	ESQPML	PLGLSDIPGEAMVKT	YCPKC	IDVYTPKSSR	HHHTDGAYFGTGFPF	MLFMVHPEYRPKRPT			
1 CKIIβ WT	181	195	196	210	211	215						
	NQFVPRLYGFKIHSL	AYQIQLQAAANFKMP	LRAKN									
2 CKIIβ AAA	NQFVPRLYGFKIHSL	AYQIQLQAAANFKMP	LRAKN									
3 CKIIβ AAS	NQFVPRLYGFKIHSL	AYQIQLQAAANFKMP	LRAKN									
4 CKIIβ SAS	NQFVPRLYGFKIHSL	AYQIQLQAAANFKMP	LRAKN									
5 CKIIβ ASS	NQFVPRLYGFKIHSL	AYQIQLQAAANFKMP	LRAKN									
6 CKIIβ SSA	NQFVPRLYGFKIHSL	AYQIQLQAAANFKMP	LRAKN									
7 CKIIβ D-Box	NQFVPRLYGFKIHSL	AYQIQLQAAANFKMP	LRAKN									
8 CKIIβ CF1	NQFVPRLYGFKIHSL	AYQIQLQAAANFKMP	LRAKN									
9 CKIIβ CF2	NQFVPRLYGFKIHSL	AYQIQLQAAANFKMP	LRAKN									

Abbildung 20:

Vergleich der vorhergesagten Aminosäuresequenz der CK2β-VIIa-Isoform gegen die durch *in vitro*-Mutagenese veränderten Polypeptidketten. Die relevanten Sequenzmotive sind gelb unterlegt, durchgeführte Aminosäuresubstitutionen durch rote Buchstaben gekennzeichnet.

CKIIβ AAA:	Ser ² , Ser ³ , Ser ⁴ - Ala ² , Ala ³ , Ala ⁴ -Substitutionen
CKIIβ AAS:	Ser ² , Ser ³ - Ala ² , Ala ³ -Substitutionen
CKIIβ SAS:	Ser ³ - Ala ³ -Substitution
CKIIβ ASS:	Ser ² - Ala ² -Substitution
CKIIβ SSA:	Ser ⁴ - Ala ⁴ -Substitution
CKIIβ D-Box:	Arg ⁴⁷ – Cys ⁴⁷ -Substitution
CKIIβ CF1 :	Cys ¹⁰⁹ , Cys ¹¹⁴ – Ser ¹⁰⁹ , Ser ¹¹⁴ -Substitutionen
CKIIβ CF2 :	Cys ¹³⁷ , Cys ¹⁴⁰ – Ser ¹³⁷ , Ser ¹⁴⁰ -Substitutionen

Der Mutageneserfolg wurde durch Sequenzierung selektionierter Einzelklone überprüft. Durch Rückklonierung des jeweils mutagenisierten CK2β-cDNA-Anteils in CK2βΔKpn1 bzw. durch Rückklonieren des CK2β-Kpn1-Fragments in den mutagenisierten CK2βΔKpn1-Vektor wurden die vollständigen, mutationstragenden CK2β-cDNAs wiederhergestellt. Mutagenisierte CK2β-cDNAs wurden durch EcoR1-Vollverdau und anschließenden Xho1-

Partialverdau des entsprechenden Konstrukts isoliert und über EcoR1/Xho1 (EcoR1-5'-3'-Xho1) in den Fliegentransformationsvektor pP[UAST] kloniert.

Um die Bedeutung der ausgetauschten Aminosäuren für die Funktionalität der CK2 β -Untereinheit zu testen, wurden die unter UAS-Kontrolle stehenden Transgene der *in vitro*-mutagenisierten CK2 β -cDNAs ubiquitär (tubP-Gal4-vermittelt) im CK2 β -Nullhintergrund des *mbu* ^{$\Delta A26-2L$} ,*w*⁻-Chromosoms exprimiert. Der Test auf die Rettung der Letalität folgte dem in Abbildung 19 gezeigten Schema. Tabelle 41 listet die Resultate dieser Testkreuzungen auf. Einige Kreuzungen wurden unter Verwendung eines markierten Letalchromosoms (*mbu* ^{$\Delta A26-2L$} ,*y*⁻,*w*⁻) zum definitiven Ausschluß von Nondisjunction-Ereignissen wiederholt; die so getesteten Linien sind Tabelle 41 rot eingetragen.

Transgen	Letalitätsrettung	getestete Linien {x}
UAS:[CK2 β VIIa] ^{WT{x}}	+	III; VI
UAS:[CK2 β VIIa] ^{D-Box{x}}	+	4; 8; 9
UAS:[CK2 β VIIa] ^{CF1{x}}	-	2, 4, 5
UAS:[CK2 β VIIa] ^{CF2{x}}	-	1, 4, 8
UAS:[CK2 β VIIa] ^{AAA{x}}	+	3; 12
UAS:[CK2 β VIIa] ^{AAS{x}}	+	6; 15
UAS:[CK2 β VIIa] ^{SAS{x}}	+	1; 5; 9
UAS:[CK2 β VIIa] ^{ASS{x}}	+	5; 9
UAS:[CK2 β VIIa] ^{SSA{x}}	+	3; 11

Tabelle 41:

Auflistung der Transgene, die im Nullhintergrund (*mbu* ^{$\Delta A26-2L$}) durch die Treiber-Linie tubP-[Gal4] ubiquitär exprimiert wurden; Ausgang der Rettungsexperimente (+/-) und die Insertionslinien, bei denen eine solche Rettung beobachtet wurde. Die rot eingetragenen Linien wurden sowohl unter Verwendung des *mbu* ^{$\Delta A26-2L$} ,*w*⁻- als auch des *mbu* ^{$\Delta A26-2L$} ,*y*⁻,*w*⁻-Chromosoms getestet.

Diese Ergebnisse legen nahe, daß einerseits weder die N-terminalen Serinreste in ihrer Funktion als Phosphorylgruppenakzeptoren bei CK2-Holoenzym-Autophosphorylierungsreaktionen, noch der für die Funktionalität der Destruction-Box in Cyclinen wichtige Argininrest für die Funktionalität von CK2 β eine essentielle Funktion besitzen. Andererseits scheint die Dimerisierung der CK2 β -Untereinheit essentiell für die Funktionalität von CK2 β zu sein, da die Mutagenese der hierfür notwendigen Cysteinreste zu Polypeptidketten führt, die nicht in der Lage sind, bei ubiquitärer Expression die Letalität des *mbu* ^{$\Delta A26-2L$} -Chromosoms zu retten.

D 18 Die CK2 β -Mutation des *mbu*^{P1{P3843/2}}-Chromosoms verhindert die Entwicklung von Fliegen, die eine aktivierte Form der MAP-Kinase Rolled (Rl^{Sem}) exprimieren

Um Hinweise auf die von CK2 β regulierten Signalwege zu bekommen wurden im Rahmen eines genetischen Interaktionsscreens Mutationen von Komponenten des MAPK-Signaltransduktionswegs auf ihre genetische Interaktion mit dem *mbu*^{P1{P3843/2}}-Chromosom bei der Entwicklung der Pilzkörper hin untersucht. Während ein hypomorphes Allel der *Drosophila*-MAP-Kinase *rolled* (*rl*^l) im homozygoten Zustand und ein MAPK-Nullallel (*rl*^{l0a}) im heterozygoten Zustand eine normale Entwicklung der Pilzkörper im *mbu*^{P1{P3843/2}}-Hintergrund zu erlauben scheinen (nicht gezeigt), konnten keine Fliegen isoliert werden, die eine Kopie des aktivierten MAP-Kinase-Allels *rolled*^{Sevenmaker} (*rl*^{Sem}; Oellers und Hafn (1996)) im *mbu*^{P1{P3843/2}}-Hintergrund trugen. Abbildung 21 zeigt die angewandte Genetik.

♀♀ *mbu*^{P1{P3843/2}},w⁻/FM7a ; +/+ ; +/+ x ♂♂ l(1)*phl*^{C110},w⁺/Y ; r1^{Sem}/ r1^{Sem}

Abbildung 21:

Kreuzung, die zum Interaktionstest von *mbu*^{P1{P3843/2}} mit *rl*^{Sem} durchgeführt wurde. l(1)*phl*^{C110} ist eine Nullmutation des X-chromosomalen *Drosophila*-Raf-Gens und unterdrückt die Sterilität des *rolled*^{Sevenmaker}-Allels in Weibchen. Hierdurch erklärt sich seine Anwesenheit in den verwendeten Männchen.

Männchen, die aus einem Nondisjunction-Ereignis stammen, können durch das w⁺ des l(1)*phl*^{C110},w⁺-Chromosoms von *mbu*^{P1{P3843/2}},w⁻-Männchen unterschieden werden. In der F1-Generation dieser mehrmals durchgeführten Kreuzung fanden sich nie Männchen, die das *mbu*^{P1{P3843/2}},w⁻- und das *rl*^{Sem}-Chromosom besaßen. Um zu überprüfen, ob die beobachtete letale Interaktion ursächlich auf die beiden P[lacW]-Elemente des *mbu*^{P1{P3843/2}}-Chromosoms und nicht auf potentielle Zweitmutationen zurückzuführen ist, wurden die in Abschnitt D 3.2 charakterisierten, vom *mbu*^{P1{P3843/2}}-Chromosom durch Remobilisierung abgeleiteten *mbu*-Exzisionsallele auf Interaktion mit der *rl*^{Sem}-Mutation hin untersucht (Abbildung 22).

P:
 $\text{♀♀ } mbu^{\Delta P[lacW]}, w^-/FM7a; +/+; +/+ \quad \times \quad \text{♂♂ } l(1)phl^{C110}, w^+/Y; rl^{Sem}/rl^{Sem}$

F1:
 $\text{♂♂ } mbu^{\Delta P[lacW]}, w^-/Y; rl^{Sem}/+ ?$

Abbildung 22:

Kreuzungsschema, das zur Erzeugung von heterozygoten rl^{Sem} -Fliegen führt, die X-chromosomal ein mbu -Exzisionsallele tragen.

Für alle vitalen, in Tabelle 16 aufgelisteten mbu -Exzisionsallele konnten Männchen isoliert werden, die eine Kopie der rl^{Sem} -Mutation trugen. Dies belegt, daß die für das $mbu^{P1\{P3843/2\}}$ -Chromosom beobachtete Letalinteraktion mit der rl^{Sem} -Mutation nicht auf Zweitmutationen zurückzuführen ist. Zusätzlich wurde getestet, ob Männchen isoliert werden können, die ein $mbu^{\Delta A26-2L}$ -Letalchromosom, ein genomisches CK2 β -Transgen und die rl^{Sem} -Mutation tragen (Abbildung 23). Die in Abbildung 23 gesuchten Männchen konnten ebenfalls isoliert werden.

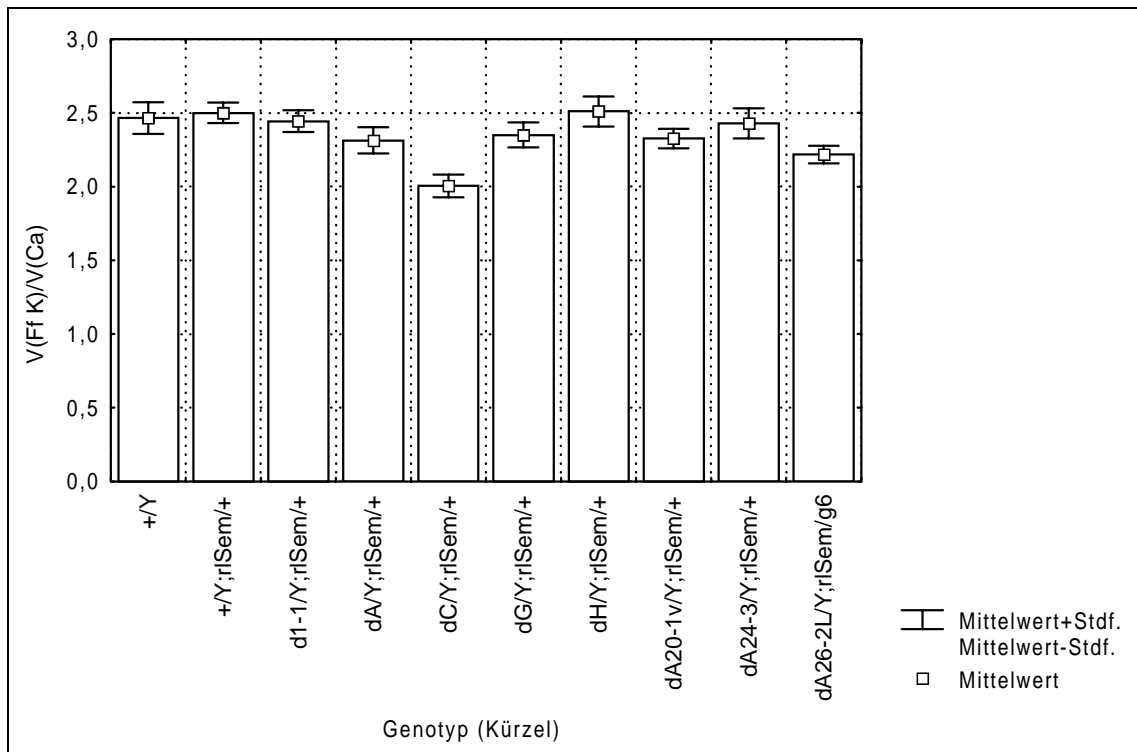
P:
 $\text{♀♀ } mbu^{\Delta A26-2L}, w^-/FM7a; +/+; P[CK2\beta\text{-gDNA}]^6/TM6, Tb \quad \times$
 $\text{♂♂ } l(1)phl^{C110}, w^+/Y; rl^{Sem}/rl^{Sem}; +/+$

F1:
 $\text{♀♀ } mbu^{\Delta A26-2L}, w^-/Y; rl^{Sem}/+; P[CK2\beta\text{-gDNA}]^6/+ ?$

Abbildung 23:

Interaktionstest der rl^{Sem} -Mutation mit ein genomisches Transgen tragenden $mbu^{\Delta A26-2L}$ -Männchen.

Die nichtletale Interaktion der rl^{Sem} -Mutation mit den $mbu^{\Delta P[lacW]}$ -Exzisionschromosomen erlaubte die Untersuchung einer genetischen Interaktion von rl^{Sem} mit schwächeren mbu -Allelen bei der Pilzkörperentwicklung. Hierbei war insbesondere das $mbu^{\Delta H}$ -Allel interessant, da es in Männchen einen deutlichen Pilzkörpercalyxdefekt verursacht (Abschnitt D 3.2). Grafik 32 und Tabelle 42 zeigen die Daten, die für die Interaktion von rl^{Sem} mit $mbu^{\Delta P[lacW]}$ -Exzisionschromosomen bei der Pilzkörperentwicklung ermittelt wurden. Zusätzlich wurde der Calyxphänotyp von $mbu^{\Delta A26-2L}, w^-/Y; rl^{Sem}/+; P[CK2\beta\text{-gDNA}]^6/+$ -Männchen untersucht, da herausgefunden werden sollte, ob das genomische CK2 β -Transgen eine normale Pilzkörperentwicklung im mbu -Nullhintergrund bei Anwesenheit einer aktivierten Form der MAP-Kinase erlaubt.



Grafik 32:

Vergleich des mittleren Volumenquotienten von wildtypischen Männchen mit denen von Männchen, die verschiedene *mbu*-Allele und eine Kopie der *rl^{Sem}*-Mutation tragen und von durch ein genomisches Transgen geretteten *mbu^{ΔA26-2L}*-Männchen, die heterozygot ein *rl^{Sem}*-Allel tragen.

Genotyp (Kürzel)	Genotyp (WTB)
+/Y:	w ⁺ /Y
+/Y; rlSem/+ :	w ⁻ /Y; rl ^{Sem} /+
d1-1/Y; rlSem/+ :	<i>mbu</i> ^{Δ1-1} ,w ⁻ /Y; rl ^{Sem} /+
dA/Y; rlSem/+ :	<i>mbu</i> ^{ΔA} ,w ⁻ /Y; rl ^{Sem} /+
dC/Y; rlSem/+ :	<i>mbu</i> ^{ΔC} ,w ⁻ /Y; rl ^{Sem} /+
dG/Y; rlSem/+ :	<i>mbu</i> ^{ΔG} ,w ⁻ /Y; rl ^{Sem} /+
dH/Y; rlSem/+ :	<i>mbu</i> ^{ΔH} ,w ⁻ /Y; rl ^{Sem} /+
dA20-1v/Y; rlSem/+:	<i>mbu</i> ^{ΔA20-1v} ,w ⁻ /Y; rl ^{Sem} /+
dA24-3/Y; rlSem/+ :	<i>mbu</i> ^{ΔA24-3} ,w ⁻ /Y; rl ^{Sem} /+
dA26-2L/Y0; rlSem/g6:	<i>mbu</i> ^{ΔA26-2L} ,w ⁻ /Y; rl ^{Sem} / P[CK2β-gDNA] ⁶

Genotyp	+/Y ; rlSem/+	d1-1/Y ; rlSem/+	dA/Y ; rlSem/+	dC/Y ; rlSem/+	dG/Y ; rlSem/+	dH/Y ; rlSem/+	dA20- 1v/Y ; rlSem/+	dA24-3/ Y ; rlSem/+	dA26- 2L/Y ; rlSem/g6
(n)	(11)	(14)	(13)	(7)	(14)	(12)	(9)	(8)	(12)
+/Y (26)	0,218905	0,427217	0,676615	0,022033	0,954775	0,396500	0,969893	0,569768	0,258260

Tabelle 42:

Irrtumswahrscheinlichkeit, die sich beim Vergleich der Volumenverhältnisse der ein *rl^{Sem}*-Allel-tragenden Männchen der Grafik 32 zu wildtypischen Männchen ergibt.

Der Pilzkörperphänotyp der $mbu^{AP[lacW],w^-/Y}; rl^{Sem/+}$ - und $mbu^{\Delta A26-2L,w^-/Y}; rl^{Sem/+}$; P[CK2 β -gDNA]^{6/+} -Männchen unterscheidet sich nicht von dem wildtypischer Fliegen (Grafik 32 und Tabelle 42); das gleiche gilt für heterozygote rl^{Sem} -Männchen, die ein wildtypisches CK2 β -Allel tragen. Da in allen genetischen Untersuchungen sichergestellt werden konnte, daß das $mbu^{\Delta H}$ -Allel eine Verkleinerung der Pilzkörper bewirkt (Abschnitte D 3.2, D 5.1 und D 5.2), kann rl^{Sem} als eine zu dieser Mutation antagonistisch wirkende Mutation (Suppressor) eingestuft werden.

D 19 Die Casein-Kinase-2 β -Untereinheit wird vermutlich für eine normale Augen- und Flügelentwicklung benötigt

Direkte Interaktionsstudien (yeast-two-hybrid) von Vertebratenproteinen zeigten, daß die CK2 β -Untereinheit unabhängig von der CK2 α -Untereinheit mit einer S6-Kinase (S6-Kinase p90^{rsk}) interagieren kann (Kusk *et al.* 1999). Die X-chromosomale Lernmutante *ignorant* zeichnet sich durch eine P[lacW]-Insertion in der transkribierten 5'-Region des *Drosophila*-Homologs S6KII (RPS6-protein kinase-II) der Vertebraten-S6-Kinase p90^{rsk} aus (Putz, Dissertationsarbeit 2002). Um eine mögliche Interaktion in *Drosophila* zu überprüfen, wurden die ursprüngliche *ignorant*-P[lacW]-Insertion und zwei davon abgeleitete Deletionen (*ign*^{A28/1} - partielle Deletion und *ign*^{A58/3} - vollständige Deletion) des S6KII-Genlokus durch meiotische Rekombination mit der CK2 β -P[lacW]-Insertion des $mbu^{P1(D)}$ -Chromosoms vereint. Die erfolgreiche Rekombination der beiden P[lacW]-Mutationen *ignorant* und mbu^{P1} wurde durch die stärkere Pigmentierung der Augen abgeleitet. Zur Überprüfung der Rekombination von mbu^{P1} und den S6KII-Deletionsallelen *ign*^{A28/1} und *ign*^{A58/3} wurden PCR-Reaktionen durchgeführt, die diese Deletionen auf mbu^{P1} -Chromosomen nachwiesen. Erste phänotypische Untersuchungen zeigen, daß alle drei Rekombinationschromosomen-Klassen rauhe Augen aufweisen. Ein Fehlen einzelner Photorezeptorzellen scheint hierfür bei den Fliegen, die beide P[lacW]-induzierten Mutationen tragen, die Ursache zu sein. Dies wurde aus der mikroskopischen Betrachtung der tiefen Pseudopupille geschlossen. Außerdem konnte mit veränderlicher Penetranz bei allen drei Rekombinationschromosomen-Klassen ein Flügelphänotyp festgestellt werden, der sich in einem Fehlen von Teilen des Flügelepithels äußert. Ob diese Phänotypen ursächlich mit den rekombinierten Mutationen zusammenhängen, konnte noch nicht gezeigt werden. Jedoch zeigen weder das $mbu^{P1(D)}$ -Chromosom noch das *ignorant*-Chromosom für sich allein genommen diese Phänotypen.

E 1 Casein-Kinase-2 – ein Überblick

Bei der Protein-Kinase CK2 handelt es sich um eine konstitutiv aktive, ubiquitäre und pleiotropische Kinase, die sowohl GTP als auch ATP als Phosphorylgruppendonor verwendet. Phosphoryliert werden Serin- und Threoninreste, die sich in der Nachbarschaft saurer Aminosäuren befinden; jedoch ist die Spezifität so gering, daß bisher keine Consensussequenz ermittelt wurde. Bisherige Studien ergaben, daß sie sowohl an Transkriptions- und Signalübertragungsvorgängen als auch an Entwicklungs- und Proliferationsprozessen beteiligt ist. Ihre Aktivität wird -soweit bekannt- nicht durch second-messenger-Moleküle reguliert. Vielmehr handelt es sich bei CK2 um ein $\alpha_2\beta_2$ -Heterotetramer, wobei die katalytische Aktivität der α -Untereinheit und die regulatorische Aktivität der β -Untereinheit zugeschrieben wird. In Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) und im Menschen wurden zwei unterschiedliche α -Untereinheiten beschrieben, für die bisher jedoch keine spezifischen Unterschiede ausgemacht werden konnten. In *Drosophila melanogaster*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Zea mays* und anderen Organismen hingegen wurde nur eine α -Untereinheit gefunden. Zwei verschiedene β -Untereinheiten (β und β') wurden bisher für *Arabidopsis thaliana*, *Saccharomyces cerevisiae* und *Drosophila melanogaster* beschrieben. Die verschiedenen α - und β -Untereinheiten sind *in vitro* frei miteinander kombinierbar. Neuere Studien erweitern das bisher beschriebene Bild der Casein-Kinase-2 dahingehend, daß vermutlich auch beide Untereinheiten unabhängig von der jeweils anderen spezifische Funktionen ausüben können (siehe Abschnitte E 9.1 und E 9.2).

Einen ersten, guten Überblick über die Vielzahl der Studien über CK2 vermitteln die Reviews von Barbara Guerra & Olaf-Georg Issinger (1999) und Michael Faust & Mathias Montenarh (2000).

E 2 *mbu^{PI}* – ein CK2 β -Allel mit wenigen detektierbaren Phänotypen

Obwohl das CK2 β -Gen ein essentielles Gen in *Drosophila* ist, konnten erstaunlicherweise bisher für das *mbu^{PI}*-CK2 β -Allel, abgesehen vom Pilzkörperentwicklungsdefekt, einer Entwicklungsverzögerung und der verminderten Fertilität beider Geschlechter, keine weiteren Phänotypen gefunden werden. Erste immunhistologische Färbungen auf wildtypischen Embryonen und adulten Gehirnen unter Verwendung des polyklonalen CK2 β -Antiserums SA8269 (nicht gezeigt) legen nahe, daß CK2 β -Isoformen in diesen Geweben nahezu ubiquitär exprimiert werden. Außerdem wurden CK2 β -cDNAs aus vielen unterschiedlichen cDNA-Bibliotheken isoliert (siehe Tabelle 32 und 33). Eine CK2 β -mRNA-Expressionsstudie an

Mausembryonen (Mestres *et al.* 1994) führte zu der Erkenntnis, daß CK2 β -mRNA in beinahe allen Gewebetypen eines Mausembryos zu detektiert ist. Geht man von einer nahezu ubiquitären Expression der CK2 β -Untereinheit im sich entwickelnden *Drosophila*-Embryo (und eventuell im Verlauf der gesamten Entwicklung) aus, bieten sich die möglicherweise vielfältigen Effekte der *mbu*^{P1}-P[lacW]-Elemente auf die Expression der verschiedenen CK2 β -Isoformen als Erklärungsmöglichkeit der beobachteten Phänotypen an. Demnach könnte die Entwicklungsverzögerung und verminderte Fertilität durch die postulierte verminderte Transkriptionsrate erklärt werden; die spezifische Störung der Pilzkörperentwicklung jedoch durch Interferenz der P[lacW]-Elemente mit der Bildung einer oder mehrerer CK2 β -Isoformen im Verlauf der Entwicklung. CK2 β -Proteinexpressionsstudien von verschiedenen Entwicklungsstadien werden zeigen, ob dieses Erklärungsmodell zutreffend ist.

E 3 Mutagene Wirkung der *mbu*^{P1}-P[lacW]-Elemente

Die durch Southern-Blot-Analysen (Abschnitt D 7.1) und Plasmid-Rettungsexperimente (Abschnitt D 3.1) für *mbu*^{P1} gewonnenen Daten legen nahe, daß zwei vollständige P[lacW]-Elemente und somit etwa 20 kb Fremd-DNA im 5'-Bereich des CK2 β -Gens inseriert sind. Daß diese P[lacW]-Elemente die Ursache des Pilzkörperphänotyps der *mbu*^{P1}-Fliegen sind, konnte durch Remobilisierungs- und Rettungsexperimente zweifelsfrei gezeigt werden (Abschnitte D 3.2, D 12 und D 15). Durch die Insertion von etwa 20 kb Fremd-DNA würde die bei einer Transkription des CK2 β -Gens zu synthetisierende Primär-RNA in ihrer Länge ungefähr verdreifacht. Dies könnte Einfluß auf die Transkriptionseffizienz des CK2 β -Gens nehmen und den beobachteten hypomorphen Charakter von *mbu*^{P1} (Abschnitte D 5.1 und D5.2) erklären.

Tatsächlich konnte durch Vergleich der Insertionsstelle der P[lacW]-Elemente mit den bekannten 5'-Splicevarianten gezeigt werden, daß sich diese im Intron der CK2 β -Splicevarianten befindet, die Exon Ia oder Exon Ib als erstes Exon verwenden. Vorausgesetzt, daß diese Introns in *mbu*^{P1} korrekt gesplicet werden, könnten so vier der bisher charakterisierten sieben CK2 β -Splicevarianten in *mbu*^{P1}-Tieren gebildet werden (Grafik 25). Ob und in welchem Umfang die exonische Insertion der beiden P[lacW]-Elemente mit der Bildung der mRNAs und deren Translation wechselwirkt, die Exon Ic und Ie (und vermutlich auch Id) als erstes Exon verwenden, wurde in Abschnitt D 9 angedeutet. Weitergehende Untersuchungen sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene werden zeigen, welche Auswirkungen die P[lacW]-Insertionen auf die Bildung verschiedener mRNA-Splicevarianten und somit auch auf die Bildung verschiedener CK2 β -Isoformen haben. Die bisher

durchgeführten Western-Blot-Analysen (Abschnitt D10) zeigten in Männchen keinen Unterschied zwischen mbu^{P1} - und wildtypischen Tieren. Daher sollten alle Entwicklungsstadien auf einen solchen Unterschied hin untersucht werden. Die durch impräzise Remobilisierung erzeugten mbu -Allele unterscheiden sich von mbu^{P1} bezüglich der Größe der P[lacW]-Restinsertion und insbesondere auch bezüglich der inserierten DNA-Sequenz und sollten daher gegebenenfalls jeweils gesondert untersucht werden. Man kann aus der unterschiedlichen Größe der jeweiligen P[lacW]-Restinsertion der einzelnen mbu -Allele nicht den Schluß ziehen, daß es sich um eine einfache allelische Reihe handelt (Abschnitt D9)!

E 4 Mögliche Funktion von CK2 β in den Reproduktionsorganen von *Drosophila*

Im Abschnitt D1 wurde erwähnt, daß es mit dem $mbu^{P1\{P3843/2\}}$ -Chromosom nicht gelang, eine homozygote Linie zu etablieren. Homozygote $mbu^{P1\{P3843/2\}}$ -Jungfrauen zeigten nicht die im Wildtyp beobachtete, durch Oogenese verursachte Anschwellung des Abdomens. Bei Verpaarungen von homozygoten $mbu^{P1\{P3843/2\}}$ -Jungfrauen mit $mbu^{P1\{P3843/2\}}$ -Männchen wurden zudem in den seltensten Fällen abgelegte Eier gefunden. Außerdem mußten in Kreuzungen, die $mbu^{P1\{P3843/2\}}$ -Männchen verwendeten, stets viele solche Männchen zugegeben werden, um eine erfolgreiche Befruchtung der Jungfrauen zu erzielen. Das durch Rekombination mit dem w^{1118} -Chromosom entstandene $mbu^{P1\{D\}}$ -Chromosom ermöglichte die Etablierung einer homozygoten Linie. Dennoch scheint die Fertilität in beiden Geschlechtern im Vergleich zu wildtypischen Fliegen verringert zu sein, wobei $mbu^{P1\{D\}}$ -Männchen stärker als homozygote $mbu^{P1\{D\}}$ -Weibchen beeinträchtigt zu sein scheinen.

Drei CK2 β -cDNAs wurden bisher aus cDNA-Bibliotheken, die aus den Testikel von Männchen hergestellt wurden, und eine CK2 β -cDNA wurde aus einer cDNA-Bibliothek, die aus den Ovarien von Weibchen gewonnen wurden, isoliert (siehe Tabelle 33). Dies läßt eine Rolle von CK2 β in den Reproduktionsorganen wahrscheinlich erscheinen.

Interessant könnten in diesem Zusammenhang folgende Beobachtungen sein:

- a.) Das genomische CK2 β -Transgen erlaubt im $mbu^{\Delta A26-2L}$ -Hintergrund die Etablierung einer homozygoten Linie. Somit sind beide Geschlechter fertil, obwohl nicht alle CK2 β -Isoformen gebildet werden (Abschnitt D 10).
- b.) Ein CK2 β -cDNA-Transgen führt bei ubiquitärer Expression im Nullhintergrund zu fertilen Männchen. Weibchen hingegen zeigen den oben für $mbu^{P1\{P3843/2\}}$ -Jungfrauen beschriebenen Phänotyp. Aus solchen Jungfrauen wurden Ovarien präpariert, in denen sich keine Eier befanden.

Experimente, die mit *Xenopus*-Oocyten durchgeführt wurden, legen nahe, daß in diesem *in vivo*-System CK2 β als Inhibitor der Serin/Threonin Kinase Mos agiert und in dieser Funktion am richtigen Ablauf der Oocytenreifung beteiligt ist (Chen *et al.* 1997). Auch in Maus wird CK2 β in den männlichen Reproduktionsorganen gefunden, wobei die Konzentration in sich differenzierenden Keimzellen zunimmt (Xu *et al.* 1999).

E 5 Überexpression von CK2 β führt zu keinen Entwicklungsstörungen

Überexpression der CK2 β -, nicht aber der CK2 α -Untereinheit in der Hefe *Schizosaccharomyces pombe* führt zu einer Inhibition des Zellwachstums (vermutlich durch Störung der Cytokinese; Roussou *et al.* 1994). Darüber hinaus legen Untersuchungen der regulatorischen Regionen der humanen CK2 α - und CK2 β -Gene nahe, daß diese beiden Gene einer koordinierten Transkriptionskontrolle unterliegen, um die Synthese einer ausgeglichenen Menge der entsprechenden Transkripte zu ermöglichen (Krehan *et al.* 2001). Daher lag es nahe, CK2 β -cDNA gewebespezifisch oder ubiquitär im wildtypischen Hintergrund zu exprimieren und nach Phänotypen zu suchen, die durch solch eine Überexpression verursacht werden. Diese konnten jedoch nicht gefunden werden (Abschnitt D 13). Möglicherweise werden daher Zellproliferationsprozesse in *Drosophila* nicht durch einen Überschuß an CK2 β gestört. Dies steht im Einklang mit einer Studie, bei der die Induktion von CK2 β in humanen Osteosarcomazellen (U2OS) unter der Regulation von Tetracyclin stand, und eine induzierte Überexpression von CK2 β zwar die Gesamt-CK2-Aktivität erhöhte, aber zu keiner Veränderung des Zellzyklusprofils und des Proliferationsverhaltens der Zellen führte (Vilk *et al.* 2001). Oder aber die für CK2 β diskutierte Destruction-Box (Abschnitt E 8.3) ist tatsächlich funktional und führt durch Ubiquitinierung überschüssiger, nicht in das Holoenzym integrierter CK2 β -Untereinheiten und einhergehendem Abbau der so markierten Proteine zu einer Aufrechterhaltung des in der Zelle benötigten CK2 β -Proteinspiegels. Überexpression der in Abschnitt D 17 beschriebenen, eine potentielle Destruction-Box-mutationtragende CK2 β -cDNA im wildtypischen Hintergrund könnte helfen, diese Frage eingehender zu untersuchen. Andererseits könnte das Fehlen einer Entwicklungsstörung von *Drosophila* durch Überexpression von CK2 β ein Experiment ermöglichen, das eine Klärung der Ursache des durch *mbu*^{PI} bewirkten Pilzkörperentwicklungsdefekts erlauben könnte (Abschnitt E 6).

E 6 Zellbiologische Ursachen des Pilzkörperentwicklungsdefekts von mbu^{P1}

A priori sind mehrere entwicklungsbiologische Ursachen denkbar, die einzeln oder in Kombination den Pilzkörperstrukturdefekt in mbu^{P1} -Fliegen erklären könnten.

Zunächst wäre denkbar, daß CK2 β für die Determination der korrekten Anzahl von Pilzkörperneuroblasten benötigt wird, und mbu^{P1} diesen Prozess stört. Zur Klärung dieser Frage sind mehrere experimentelle Ansätze möglich. BrdU-Inkorporationsexperimente, wie sie für *mud*-Larven durchgeführt wurden (Prokop *et al.* 1994), würden eine selektive Markierung der Pilzkörperneuroblasten und der lateralen Neuroblasten im ersten Larvenstadium erlauben. Dieses Experiment konnte indes nicht durchgeführt werden, da kein homozygoter $mbu^{P1[P3843/2]}$ -Stamm etabliert werden konnte und eine Geschlechterunterscheidung unter Verwendung eines sogenannten „green Balancers“ (FM7^{[tubP-GFP]}) sich in diesem Entwicklungsstadium als unzuverlässig erwies. Die Etablierung des homozygoten $mbu^{P1(D)}$ -Stamms hat dieses Problem gegen Ende der Arbeit behoben. Durchgeführt wurden immunhistochemische Färbungen an Gehirnpräparationen von mbu^{P1} -Männchen, die unter Kontrolle der 17d-P[Gal4]-Enhancer-Trap-Linie (Melzig *et al.* 1998) einen unter UAS-Kontrolle stehenden Reporter exprimierten. Immunhistochemisch wurden die Kenyonzellen, die in die α - und β -Loben projizieren und in denen 17d-P[Gal4] aktiv ist, durch konfokale Mikroskopie sichtbar gemacht. Da hierdurch Kenyonzellfraktionen angefärbt werden, die einen Rückschluß auf die Anzahl der während der Entwicklung je Gehirnhemisphäre proliferativ aktiven Pilzkörperneuroblasten erlauben (Melzig *et al.* 1998), schien der Ansatz für mbu^{P1} -Männchen möglich. Es stellte sich jedoch heraus, daß in mbu^{P1} -Männchen die Anzahl der so sichtbar gemachten Kenyonzellen zu gering war, um einen Rückschluß auf die Anzahl der vorhandenen Pilzkörperneuroblasten ziehen zu können.

Als zweite mögliche Ursache des mbu^{P1} -Pilzkörperdefekts wäre eine Beteiligung von CK2 β an der Proliferationskontrolle von Pilzkörperneuroblasten denkbar. Diese Frage könnte durch puls-chase Experimente (Prokop *et al.* 1994) - wiederum auf der Basis von BrdU-Inkorporation in die Pilzkörperneuroblasten während des frühen ersten Larvenstadiums - geklärt werden. Auch dieses Experiment könnte nun mit dem $mbu^{P1(D)}$ -Stamm durchgeführt werden.

Letztlich wäre denkbar, daß eine gewisse Menge an CK2 β -Protein in Kenyonzellen benötigt wird, um einen programmierten Zelltod zu unterdrücken. In diesem Modell würde mbu^{P1} die Synthese der Mindestmenge an CK2 β -Protein in einer gewissen Fraktion der Kenyonzellen verhindern und diese würden daher durch Apoptose eliminiert. Um dieses Modell zu testen, wurden drei verschiedene, unter UAS-Kontrolle stehende Apoptose-Inhibitorproteine (p35,

Reaper und Hid) während der Entwicklung der Pilzkörper von mbu^{P1} -Tieren unter Verwendung einer Enhancer-Trap-Linie (238Y-P[Gal4]) exprimiert (nicht gezeigt). Da 238Y-P[Gal4] zur partiellen Rettung des mbu^{P1} -Pilzkörperstrukturdefekts durch Expression von UAS:CK2 β verwendet werden kann (Abschnitt D 14), bestand die Hoffnung, daß die Expression der Apoptose-Inhibitoren unter der Kontrolle von 238Y-P[Gal4] zur partiellen Reversion des mbu^{P1} -Pilzkörperstrukturdefekts führt. Eine solche wurde jedoch nicht beobachtet.

Da Überexpression von CK2 β durch einen tubP-Gal4-Treiber im wildtypischen Hintergrund keine negativen Auswirkungen auf die Pilzkörperentwicklung hatte (Abschnitt D 13), und derselbe Treiber dazu verwendet werden kann, den Pilzkörperdefekt in mbu^{P1} -Fliegen vollständig zu retten (Abschnitt D 15), wäre die Verwendung eines ubiquitären, jedoch steuerbaren Treibers eine Möglichkeit, zwischen einem Pilzkörperneuroblasten-Determinations- und Proliferationsdefekt in mbu^{P1} -Tieren zu unterscheiden. Hierzu müßte sichergestellt werden, daß ein Hitzeschockpromotor-Gal4-Treiber (P[hsP-Gal4]) dazu verwendet werden kann, den Pilzkörperdefekt in mbu^{P1} -Fliegen vollständig zu retten. Gelingt dies, könnte ein Anschalten dieses Treibers ab dem ersten Larvenstadium dazu dienen, einen Pilzkörperneuroblasten-Determinationsdefekt auszuschließen und einen Pilzkörperneuroblasten-Proliferationsdefekt wahrscheinlich zu machen – vorausgesetzt, daß in solchen mbu^{P1}/Y ; P[hsP-Gal4]/+; P[UAS:CK2 β]/+ -Tieren eine (partielle) Reversion des Phänotyps beobachtet werden kann. Tatsächlich wurde durch Mikroinjektion von CK2 β -Antikörper in primäre humane Fibroblasten (IMR-90) gezeigt, daß aktives CK2-Holoenzym für einige Phasenübergänge des Zellzyklus notwendig ist und diese Phasenübergänge durch CK2 β -Antikörper inhibiert werden können (Pepperkok *et al.* 1994).

Schließlich liefern die von Jörg Melzig durchgeführten Leonardo-Antikörperfärbungen (Abbildung 3) den Hinweis, daß alle Lobensysteme des Pilzkörpers in mbu^{P1} -Fliegen gebildet werden, und somit eine Proliferation der vorhandenen Pilzkörperneuroblasten durch die gesamte Entwicklung gegeben sein muß (Lee *et al.* 1999). Außerdem kann davon ausgegangen werden, daß in mbu^{P1} -Fliegen die vorhandenen Kenyonzellen eine normale Größe erreichen und in einer wildtypischen Packungsdichte vorliegen, und der Phänotyp somit durch ein Fehlen von Kenyonzellen verursacht wird (Melzig, Dissertationsarbeit 1998).

E 7 Letale Mutierbarkeit von CK2 β in *Drosophila melanogaster*

Die letale Mutierbarkeit von CK2 β und die Rettung eines letalen *mbu*-Allels durch ein genomisches CK2 β -Transgen wurden in Abschnitt D 4.1 behandelt. Diese war insofern überraschend, da die Zerstörung der beiden CK2 β -Gene in *Saccharomyces cerevisiae* weder für sich allein genommen noch in Kombination letal ist (Bidwai *et al.* 1995). Auch das CK2 β -Gen von *Schizosaccharomyces pombe* kann nicht durch Deletion letal mutiert werden (Roussou *et al.* 1994). Daher besteht die Möglichkeit, daß CK2 β auch in anderen, höher entwickelten Eukaryoten ein im Gegensatz zu Hefe essentielles Gen darstellt.

E 8 *In vivo*-Analyse potentiell wichtiger Aminosäurereste der CK2 β -Untereinheit

E 8.1 N-terminale Phosphorylierung der CK2 β -Untereinheit

Für die N-terminale Phosphorylierung der CK2 β -Untereinheit durch die katalytische α -Untereinheit wurde bei einer *in vitro*-Studie eine die Holoenzymaktivität regulierende Funktion ermittelt. Lin *et al.* (1994) untersuchten die katalytische Aktivität von *Drosophila*-CK2-Holoenzymen, die entweder aus den wildtypischen α - und β -Untereinheiten oder aus wildtypischen α - und mutagenisierten β -Untereinheiten bestanden. Die beiden mutagenisierten β -Untereinheiten zeichneten sich durch Serin-Alanin-Austausche aus (Ser²⁻⁴ ► Ala²⁻⁴ und Ser⁴ ► Ala⁴) und entsprechen somit den in dieser Arbeit untersuchten, *in vitro*-mutagenisierten CK2 β ^{AAA} und CK2 β ^{SSA}-Proteinen (Abschnitt D 17). Die Ergebnisse dieser *in vitro* Studie legen einerseits nahe, daß Ser² und Ser³ die Hauptphosphorylgruppenakzeptoren der *Drosophila*-CK2 β -Untereinheit sind und andererseits Ser⁴ *in vitro* in einem nur geringen Umfang durch CK2 α phosphoryliert werden kann. Überdies sind diese drei Serinreste die einzigen von der CK2 α -Untereinheit verwendeten Phosphorylgruppenakzeptoren der CK2 β -Untereinheit. Die N-terminalen Serinreste können durch Alaninreste substituiert werden, ohne die Bildung des $\alpha_2\beta_2$ -Holoenzym *in vitro* zu beeinträchtigen. Ein weiteres Ergebnis dieser Studie war, daß sowohl wildtypische als auch mutagenisierte CK2 β -Untereinheiten die katalytische Aktivität der α -Untereinheit um etwa den Faktor 5 stimulieren können. Weder das Salzoptimum des Holoenzym noch die Phosphorylierungsrate des nichtphysiologischen Substrats Casein wurden durch die vorgenommenen Serin-Alanin-Substitutionen beeinträchtigt. Jedoch wurde die Phosphorylierungsrate von physiologischen Substraten (Glycogen-Synthase, EF-1 β , EF-1 δ und Calmodulin) durch das CK2-Holoenzym verringert,

wenn wildtypisches CK2 β zuvor durch CK2 α phosphoryliert wurde. Der gleiche Effekt konnte mit der Ser⁴ \blacktriangleright Ala⁴-, nicht aber mit der Ser²⁻⁴ \blacktriangleright Ala²⁻⁴- CK2 β -Untereinheit beobachtet werden. Aus diesen Beobachtungen wurde geschlossen, daß der Phosphorylierungsgrad der β -Untereinheit wichtig für die katalytische Aktivität des Holoenzym gegenüber physiologischen Substraten ist und die Phosphorylierung der β -Untereinheit die katalytische Aktivität des Holoenzym negativ reguliert.

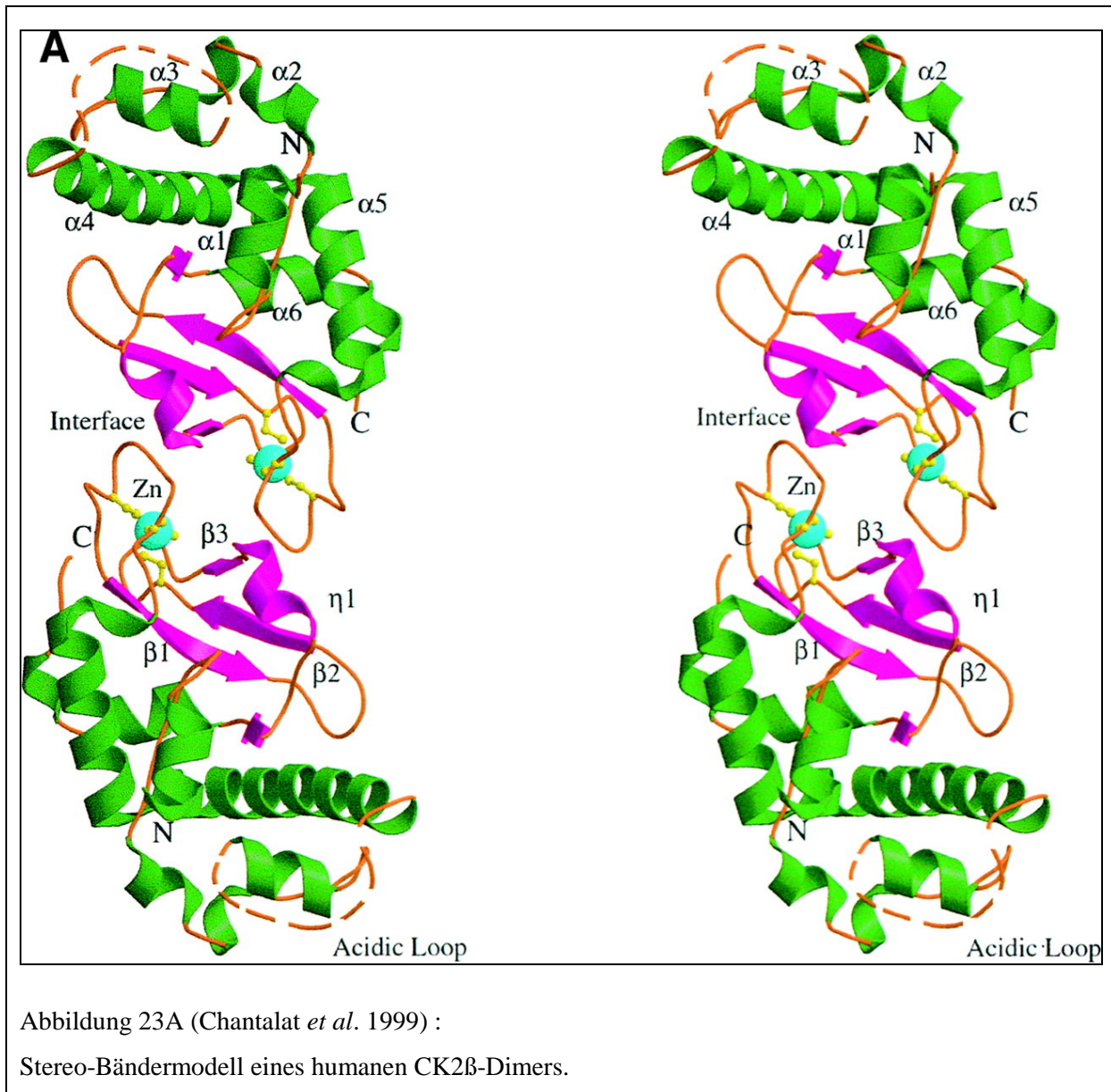
Interpretiert man die in Abschnitt D 17 beschriebenen Rettungsexperimente mit den fünf verschiedenen Serin-Alanin-Austausch-CK2 β -Untereinheiten im Sinne dieser *in vitro*-Daten, dann stellt diese negative Regulation der Holoenzymaktivität durch den N-terminalen Phosphorylierungsgrad der β -Untereinheit keinen lebensnotwendigen Prozess dar. Da jedoch nur wenige Tiere erhalten wurden, die durch ubiquitäre Expression der Ser²⁻⁴ \blacktriangleright Ala²⁻⁴-CK2 β -Untereinheit im Nullhintergrund gerettet wurden, ist eine physiologische Rolle der CK2 β -Phosphorylierung wahrscheinlich.

E 8.2 Zinkfingervermittelte β - β -Dimerisierung und nachfolgende Holoenzymbildung

Mehrere *in vitro*-Studien belegen die Bedeutung von vier Cystein-Resten (Cys¹⁰⁹, Cys¹¹⁴, Cys¹³⁷ und Cys¹⁴⁰) für die koordinierte Bindung eines Zn²⁺-Ions [Chantalat *et al.* (1999), Meggio *et al.* (2000), Canton *et al.* (2001), Graham *et al.* (2000)]. Dieser Zinkfinger ist Voraussetzung für die Dimerisierung zweier CK2 β -Untereinheiten, welche wiederum Voraussetzung für die Bildung des $\alpha_2\beta_2$ -Holoenzym ist.

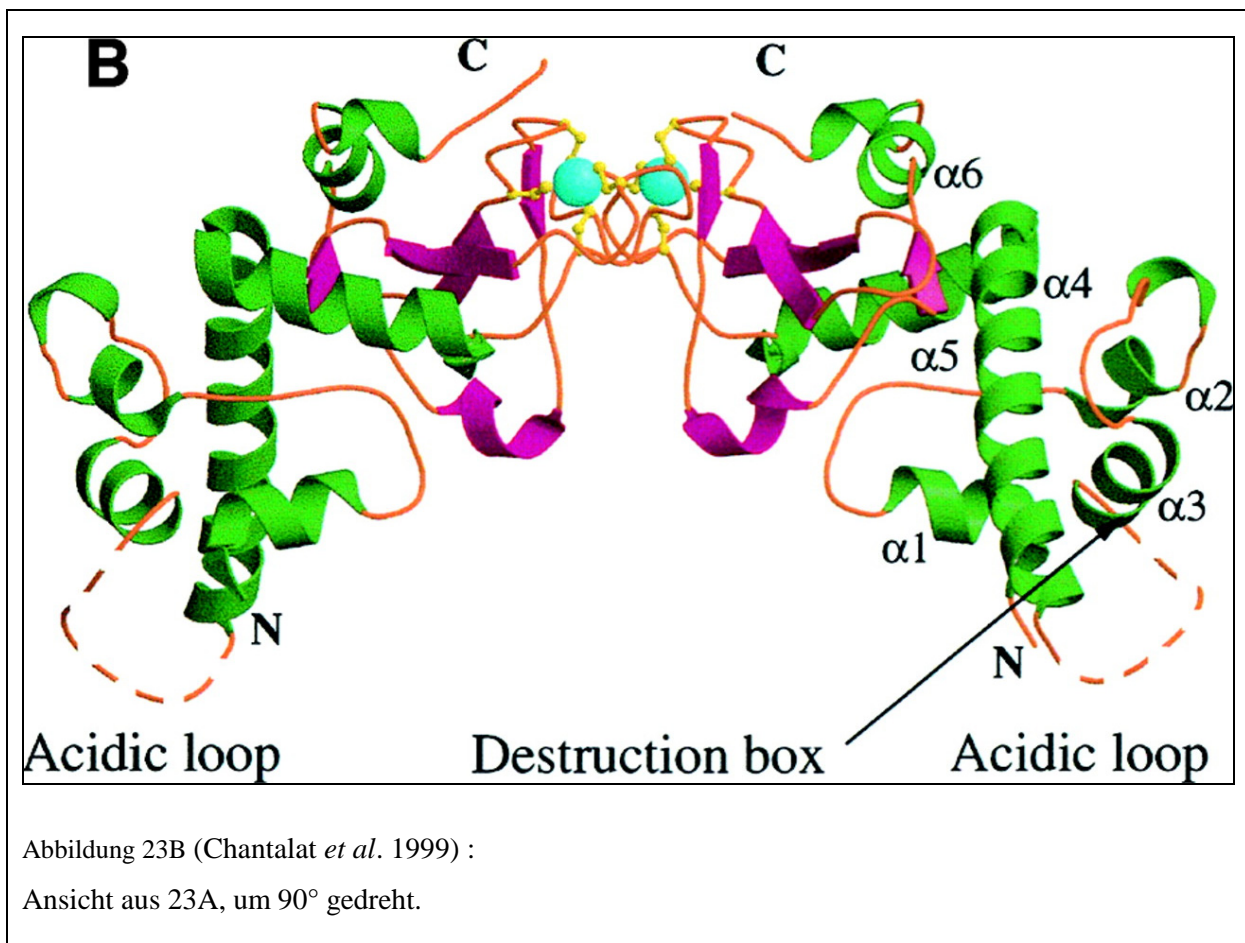
Chantalat *et al.* (1999) zeigten durch die Kristallisierung einer N-terminal um 33 Aminosäurereste gekürzten humanen CK2 β -Untereinheit und nachfolgende Röntgenstrukturanalyse, daß zwei β -Untereinheiten unter Verwendung des Zinkfingers dimerisieren (Abbildung 23A und 23B).

Meggio *et al.* (2000) untersuchten die *in vitro*-Interaktionseigenschaften von CK2 β -Untereinheiten, die mit pCMP (p-chloromercuribenzoic acid; ein mit Sulfhydrylgruppen reagierendes Agens) behandelt wurden. Hierdurch wurden unter anderem die Sulfhydrylgruppen der vier den Zinkfinger bildenden Cysteinreste modifiziert. So behandelte CK2 β -Proteine sind *in vitro* weder in der Lage, β - β -Homodimere noch heterotetramere $\alpha_2\beta_2$ -Holoenzymkomplexe auszubilden. Außerdem können pCMP-behandelte β -Untereinheiten die katalytische Aktivität der α -Untereinheit gegen bestimmte Peptidsubstrate nicht mehr steigern.



Sie sind jedoch weiterhin in der Lage, die Phosphorylierungsrate des physiologischen Substrats Calmodulin durch die α -Untereinheit zu verringern. Eine physikalische Interaktion mit der α -Untereinheit führt zu einem inaktiven Komplex, der jedoch durch Behandlung mit einem reduzierenden Agens (Dithiothreitol, DTT) wieder in voll aktive Holoenzymkomplexe überführt werden kann.

Canton *et al.* (2001) untersuchten die Interaktionseigenschaften einer *in vitro*-mutagenisierten humanen CK2 β -Untereinheit, CK2 $\beta^{C109,114S}$. Die Cysteinreste 109 und 114 wurden durch Serinreste ersetzt. Diese entspricht der in dieser Arbeit untersuchten CK2 β^{CF1} -Untereinheit (Abschnitt D 17).



Im yeast-two-hybrid-System wurde ermittelt, daß $CK2\beta^{C109,114S}$ nicht mehr in der Lage ist, β - β -Homodimere zu bilden. Durch mit epitopmarkierter $CK2\beta^{C109,114S}$ -Untereinheit durchgeführte Immunopräzipitationsexperimente auf cotransfiziertem COS-7-Zelllysaten wurde gezeigt, daß die epitopmarkierte $CK2\beta^{C109,114S}$ -Untereinheit nicht mehr in der Lage ist, mit einer epitopmarkierten, ansonsten unmodifizierten $CK2\beta$ -Untereinheit zu dimerisieren. Auch eine Interaktion von $CK2\beta^{C109,114S}$ mit der humanen α - und α' -Untereinheit konnte nicht beobachtet werden. Weiterhin legt diese Studie nahe, daß $CK2\beta^{C109,114S}$ -Untereinheiten *in vivo* einer schnelleren Degradation unterliegen und nicht mehr den Phosphorylierungsgrad unmodifizierter $CK2\beta$ -Untereinheiten besitzen. Die Unterphosphorylierung der $CK2\beta^{C109,114S}$ -Untereinheiten wurde damit erklärt, daß erst bei der Holoenzymbildung die Phosphorylierung der β -Untereinheit vollzogen wird. Im Licht dieser Studien sind mehrere Interpretationen der mit den $CK2\beta^{CF1}$ - und $CK2\beta^{CF2}$ -Untereinheiten durchgeführten Expressionsexperimente im $CK2\beta$ -Nullhintergrund (Abschnitt D 17) möglich. Zunächst besteht die Möglichkeit, daß beide mutierten β -Untereinheiten nicht mehr zur Homodimerisierung in der Lage sind und daher die Bildung eines $\alpha_2\beta_2$ -Heterotetramers nicht erfolgen kann. Demnach wäre die

Holoenzymbildung *in vivo* ein essentieller Prozess, da eine ubiquitäre Expression der CK2 β^{CF1} - und CK2 β^{CF2} -Untereinheiten im CK2 β -Nullhintergrund zu keiner Rettung der Letalität führt. Weiterhin besteht die Möglichkeit, daß durch die schnellere Degradation der CK2 β^{CF1} - und CK2 β^{CF2} -Untereinheiten *in vivo* nicht das zur Rettung der Letalität nötige Expressionsniveau erzielt wird. Mithin könnte also ein reiner Dosisseffekt den negativen Ausgang der Rettungsexperimente erklären und eine nichtdimerisierende β -Untereinheit sehr wohl in der Lage sein, die Letalität des *mbu^{ΔA26-2L}*-Chromosoms zu retten. In diesem Zusammenhang interessant ist die Beobachtung, daß ein anderer ubiquitärer Treiber (actP-Gal4) nicht dazu verwendet werden kann, durch Expression wildtypischer CK2 β -cDNA die Letalität des *mbu^{ΔA26-2L}*-Chromosoms zu retten. Daher sollte zunächst versucht werden, die Letalität des *mbu^{ΔA26-2L}*-Chromosoms durch eine Erhöhung des CK2 β^{CF1} - und CK2 β^{CF2} -Expressions-niveaus zu retten. Eine dritte Erklärungsmöglichkeit besteht in der nicht vorhersehbaren Änderung der Proteinfaltung durch Wegnahme des Zinkfingers. Es könnte sein, daß eine veränderte Faltung der CK2 β^{CF1} - und CK2 β^{CF2} -Untereinheiten ihre biologische Wirksamkeit unterbindet.

E 8.3 Bedeutung der Destruction-Box

Lüscher *et al.* (1994) untersuchten die Biosynthese der Casein-Kinase-2-Untereinheiten in exponentiell wachsenden lymphoidalen Zellkulturlinien. Einerseits stellten sie fest, daß in solchen Zellen die β -Untereinheit im Überschuß zur α -Untereinheit synthetisiert wird;

D-Box Consensus	- - - R x x L x y z x N - - -
S.c. MAT α 2-Rep.	v e l R D I L G F L S R a n k
A.p. Cyclin B	p a q R A A L G N I S N v v r
X.l. Cyclin A	l p r R T V L G V I G D n e q
D.m. CK2 β	p n y R Q A L D M I L D l e p
S.p. CK2 β	p h y S Q S L D M I L D v i d

Abbildung 24:

Vergleich der Destruction-Box-Consensussequenz mit den entsprechenden Sequenzmotiven von *Saccharomyces cerevisiae*-MAT α 2-Repressor, *Arbacia punctulata*-Cyclin B, *Xenopus laevis*-Cyclin A, *Drosophila melanogaster*-CK2 β und *Schizosaccharomyces pombe*-CK2 β . Die die Destruction-Box flankierenden Aminosäuren sind in Kleinbuchstaben wiedergegeben.

andererseits erfolgte eine schnelle Degradation der nicht in ein $\alpha_2\beta_2$ -Heterotetramer integrierten β -Untereinheiten in einem proteolytischen System, das wenig ATP verbraucht und sich nicht in Lysosomen befindet.

Allende *et al.* (1995) hoben die Ähnlichkeit eines neun Aminosäure langen Casein-Kinase-2 β -Strukturmotivs (RQALDMILD) zu einer in den Cyclinen A und B gefundenen Destruction-Box hervor (Consensussequenz RxxLxyzN, Abbildung 24) und betonte die funktionelle Ähnlichkeit von Cyclinen und CK2 β -Untereinheiten als regulatorische Proteine, welche die katalytische Aktivität des zu regulierenden Proteins erhöhen und dessen Substratspezifität verändern. Krehan *et al.* (1999) wiesen darauf hin, daß die CK2 β -Destruction-Box' vermutlich im $\alpha_2\beta_2$ -Holoenzym unzugänglich ist und erklärten damit das Ergebnis von Lüscher *et al.* (1994). In diesem Erklärungsmodell verhindert erst der Einbau der β -Untereinheit ins Holoenzym einen ubiquitinvermittelten Abbau. Für ein anderes Protein, das eine solche Destruction-Box enthält, den *Saccharomyces cerevisiae*-MAT α 2-Repressor, wurde *in vivo*-Ubiquitinierung gezeigt [Hochstrasser *et al.* (1991)]. Schließlich zeigten Glotzer *et al.* (1991), daß Cyclin B des Seeigels *Arbacia punctulata* ubiquitinvermittelt abgebaut wird, und daß die Cyclin-Destruction-Box hierfür notwendig ist. Ein Austausch des invarianten ersten Argininrestes (R) der Cyclin-Destruction-Box durch einen Cysteinrest (C) verhinderte eine proteolytische Degradation des so veränderten Cyclinmoleküls. In diesem Zusammenhang ist interessant, daß die von Roussou *et al.* 1994 verwendete *Schizosaccharomyces pombe* CK2 β -Untereinheit (Abschnitt E 5) an Stelle des Argininrestes einen Serinrest trägt (Abbildung 24). Es könnte daher sein, daß die Überexpression der *Schizosaccharomyces pombe* CK2 β -Untereinheit nicht durch gerichteten Abbau überschüssiger β -Untereinheiten kompensiert werden kann und daher eine Störung des Zellwachstums zu beobachten ist.

Die in dieser Arbeit untersuchte ‚Destruction-Box‘-Mutation der β -Untereinheit (CK2 β ^{D-Box}; Abschnitt D17) wurde so gewählt, daß sie dem mit *Arbacia punctulata*-Cyclin B durchgeführten Experiment gleicht. Der invariante Argininrest der CK2 β -Destruction-Box' wurde durch einen Cysteinrest ersetzt. Den erhaltenen Ergebnissen nach kann die CK2 β ^{D-Box}-Untereinheit durch ubiquitäre Expression zur Rettung der Letalität des *mbu*^{A26-2L}-Chromosoms verwendet werden. Eine genauere phänotypische Analyse wird zeigen, ob die CK2 β ^{D-Box}-Untereinheit bei Überexpression entweder im Null- oder im wildtypischen Hintergrund zur Störung von Zellproliferationsvorgängen führt. Es ist zu erwarten, daß hierbei Dosiseffekte eine entscheidende Rolle spielen werden.

E 9 Interaktion von freien CK2-Untereinheiten mit Komponenten des MAP-Kinase-Signaltransduktionswegs

Wie schon in der Einleitung (Abschnitt E 1) angedeutet, gibt es eine ganze Anzahl von Studien, die eine Funktion der CK2-Untereinheiten unabhängig von der jeweils anderen nahelegen. Da in dieser Arbeit eine genetische Interaktion von *mbu^{P1}* mit *rt^{Sem}*, einem Allel von *rolled*, das für eine aktivierte Form der *Drosophila*-MAP-Kinase codiert (Abschnitt D 18), und *ign^{P1}*, einem vermutlich hypomorphen Allel von *ignorant*, das für die *Drosophila*-RS-Kinase (p90^{rsk} oder S6K2) codiert (Abschnitt D 19), gefunden wurde, wird in den folgenden Abschnitten E 9.1 und E 9.2 zunächst dargestellt, welche spezifischen Interaktionen der freien CK2 α - und CK2 β -Untereinheiten mit Komponenten des MAP-Kinase-Signaltransduktionsnetzwerks bisher beschrieben wurden. In Abschnitt E 9.3 sollen dann in diesem Kontext erste Überlegungen zu einer Interaktion von *Drosophila*-CK2 β mit dem MAPK-Signalübertragungsweg angestellt werden.

E 9.1 Interaktionen der freien CK2 β -Untereinheit

E 9.1.1 CK2 β inhibiert Mos

Chen *et al.* (1997) zeigten auf unterschiedliche Weise, daß CK2 β spezifisch an *Xenopus*-Mos (eine keimzellspezifische Serin/Threonin-Kinase) bindet. Die Bindung von CK2 β an Mos ist regulatorischer Natur, da auf diese Weise Mos-vermittelte, aktivierende Phosphorylierung von MKK/MEK (MAPK kinase) inhibiert wird. Die von Mos verwendeten Phosphorylgruppenakzeptoren von MEK (Ser-218 und Ser-222) sind identisch mit denen, die von Raf, einem anderen MEK-Aktivator, benutzt werden. Daher diskutierten die Autoren, daß die Menge an freiem CK2 β im Verhältnis zur verfügbaren Menge an Mos-Protein in *Xenopus*-Oocyten über die Aktivierung von MKK/MEK und nachfolgend ERK/MAPK entscheidet.

E 9.1.2 CK2 β aktiviert A-Raf

Eine entgegengesetzte Rolle scheint die β -Untereinheit der Casein-Kinase-2 bei der Regulation der Aktivität von A-Raf zu spielen. Sowohl Boldyreff *et al.* (1997) als auch Hagemann *et al.* (1997) zeigten eine direkte Interaktion zwischen A-Raf, das in Maus ubiquitär, jedoch vornehmlich in urogenitalem Gewebe detektiert werden kann (Storm *et al.* 1990; Luckett *et al.* 2000) und für sich allein genommen nur basale katalytische Aktivität zeigt (Daum *et al.* 1994, Hagemann *et al.* 1997), und CK2 β . Im Sf9-Zellkultursystem konnte

nachgewiesen werden, daß freies CK2 β einen spezifischen A-Raf-Aktivator darstellt und die A-Raf-vermittelte Phosphorylierung von MEK durch CK2 β um das ~10fache erhöht wurde. Eine Punktmutation des Aminosäurerestes 175 (CK2 β A175) führt zu einer CK2 β -Untereinheit, die nicht mehr mit A-Raf interagieren kann [Boldyreff *et al.* (1997)].

E 9.1.3 CK2 β interagiert mit p90^{rsk}

Drei Mitglieder der Säugetier-p90^{rsk}-Familie (ribosomale S6-Kinasen; RSK1, RSK2 und RSK3) werden im Zellkultursystem nach Stimulation mit dem epidermalen Wachstumsfaktor EGF durch die MAP-Kinase ERK1 aktiviert (Zhao *et al.* 1996) und stellen somit Zielproteine der mitogeninduzierten MAP-Kinase-Aktivität dar. In einem yeast-two-hybrid-Screen einer HeLa-cDNA-Bibliothek wurde RSK2 als direkter Interaktionspartner der humanen CK2 β -Untereinheit identifiziert (Kusk *et al.* 1999). Ob diese Interaktion stimulatorischer oder inhibitorischer Natur ist, wurde bisher nicht berichtet.

E 9.2 CK2 α interagiert mit PP2A

Chung *et al.* (1999) berichten, daß die katalytische Untereinheit der Protein-Phosphatase-2A (PP2Ac) im COS-7-Zellkultursystem in der Lage ist, die serumstimulierte MAP-Kinase-Aktivität negativ zu regulieren. Heriche *et al.* (1997) zeigten, daß CK2 α sowohl *in vitro* als auch *in vivo* mit PP2A interagiert, und daß Überexpression von CK2 α in einer Deaktivierung der MAPK-Kinase MEK1 und einer Unterdrückung des Zellwachstums resultiert. Diese indirekte Regulation von MEK1 durch CK2 α könnte entweder durch Aktivierung von PP2A durch CK2 α und/oder durch CK2 α -vermittelte Ausrichtung von PP2A auf eines der Elemente des Ras/Raf/MEK-Signaltransduktionsweges erfolgen. Lebrin *et al.* (1999) führen an, daß aktiviertes Ras und aktiviertes Raf die Interaktion von CK2 α mit PP2Ac in NIH3T3-Zellen modulieren kann, daß PP2Ac ein zelluläres Substrat von CK2 α ist, und daß überexprimiertes CK2 α dosisabhängig die Aktivierung von MAPK durch Serumstimulation inhibiert.

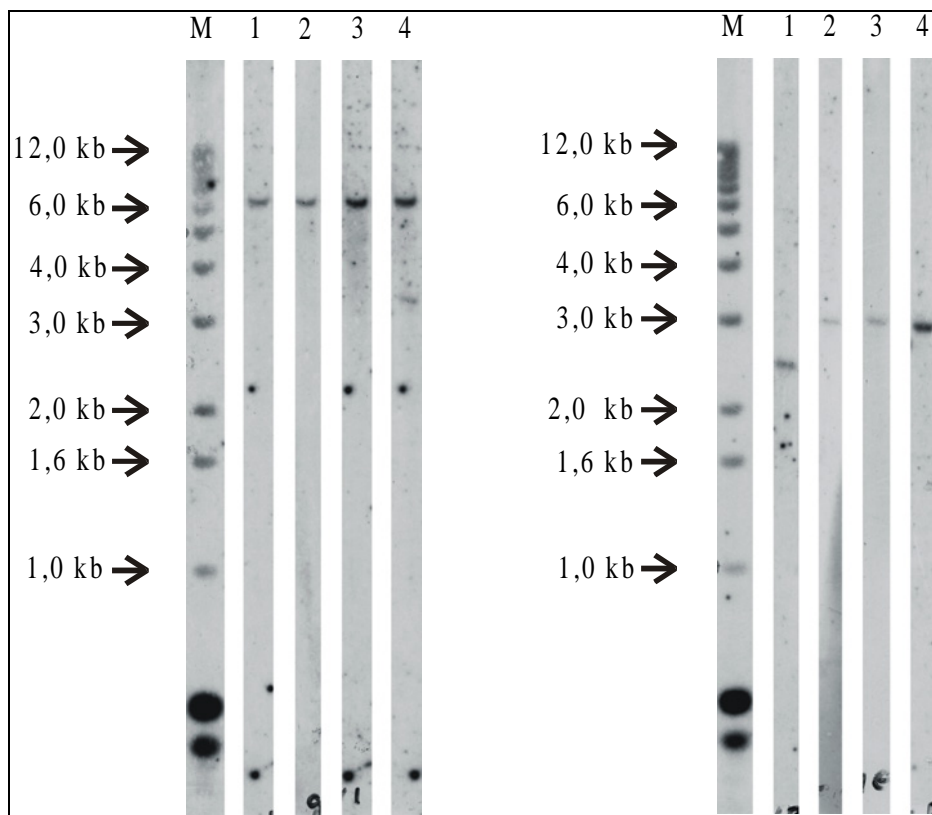
E 10 *mbu*^{P1} und der MAPK-Signaltransduktionsweg

Genetisch verhält sich *mbu*^{P1} wie ein hypomorphes Allel (Abschnitt D 5). Daher könnte es sein, daß *mbu*^{P1} zu einer verminderten Expression aller oder bestimmter CK2 β -Isoformen führt. Gleichzeitig besteht die Möglichkeit, daß es in den von *mbu*^{P1} betroffenen Zellen zu einem Überschuß an nicht ins Holoenzym integrierter CK2 α -Untereinheit kommt. Daher besteht die prinzipielle Möglichkeit, daß *mbu*^{P1} einerseits zu einer fehlenden Stimulation von

Drosophila-Raf und/oder andererseits zu einer übermäßigen Repression der *Drosophila*-MEK-Aktivität (Dsor1) führt. Voraussetzung für ein solches Szenario wäre eine zu zeigende Interaktion einer oder mehrerer *Drosophila*-CK2 β -Isoformen mit *Drosophila*-Raf, die stimulatorischer Natur sein sollte, und eine zu zeigende, indirekt inhibitorische Funktion von *Drosophila*-CK2 α auf Dsor1. Der hypoplastische Pilzkörperphänotyp von *mbu*^{P1} wäre mit einem abgeschwächten Signalübertragungspotential des MAPK-Signaltransduktionswegs vereinbar.

Daß *mbu*^{P1} mit dem MAPK-Signalübertragungsweg interagiert, konnte in dieser Arbeit durch zwei genetische Wechselwirkungen belegt werden (Abschnitt D 18 und D19), jedoch lassen die bisher durchgeführten Experimente noch keine schlüssige Interpretation der Natur der beobachteten Interaktionen zu. Bemerkenswert ist jedoch, daß *mbu*^{P1} eine letale Wechselwirkung mit *rt*^{Sem} zeigt, *rt*^{Sem} selbst zu keiner Störung der Pilzkörperentwicklung führt und gleichzeitig den Pilzkörperphänotyp eines schwächeren *mbu*-Allels zu unterdrücken scheint (Abschnitt D 18). *rt*^{Sem} zeigt keine letale Interaktion mit *ign*^{P1}; *mbu*^{P1} führt in Kombination mit *ign*^{P1} ersten Beobachtungen nach zu einem teilweisen Verlust von Flügelepithel und Photorezeptorzellen. *In vitro*-Studien werden zeigen, ob *Drosophila*-CK2 β direkt mit *Drosophila*-p90^{rsk} interagieren kann, oder ob die beobachtete Interaktion zwischen *mbu*^{P1} und *ign*^{P1} indirekter Natur ist.

F 1 Southern-Blot-Analysen



Anhang 1:

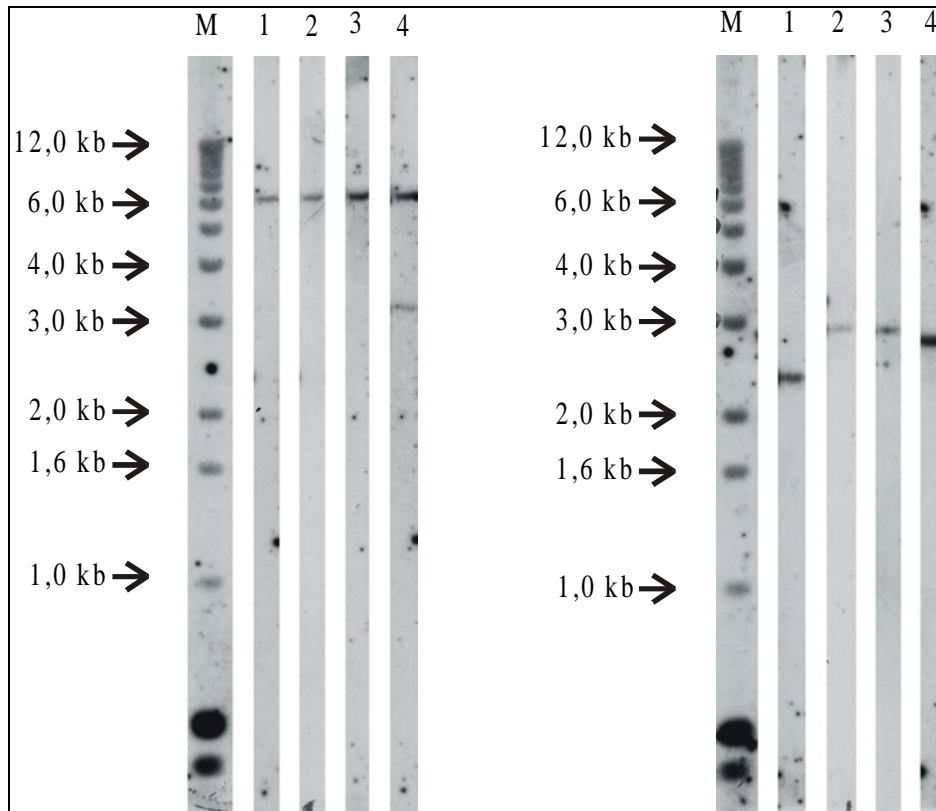
Verdau genomischer DNA von WTB-Männchen mit BamH1 (links) und EcoR1 (rechts). Spuren 1-4 geben die Signale wieder, die mit den entsprechenden Sonden detektiert wurden.

BamH1: M: Marker; 1: AI294873; 2: gFIII; 3: gFI; 4: AA735984

EcoR1: M: Marker; 1: AI294873; 2: gFIII; 3: gFI; 4: AA735984

Auf BamH1-verdauter, wildtypischer DNA detektieren alle 4 Sonden ein c.a. 6,1 kb großes DNA-Fragment. AA735984 detektiert zusätzlich ein 3,2 kb großes Fragment (schwächeres Signal Spur 4).

Auf EcoR1-verdauter DNA von WTB detektiert die Sonde AI294873 ein 2,3 kb großes, die beiden Sonden gFIII und gFI ein (identisches) 2,8 kb großes und die Sonde AA735984 ein 2,9 kb großes Fragment.



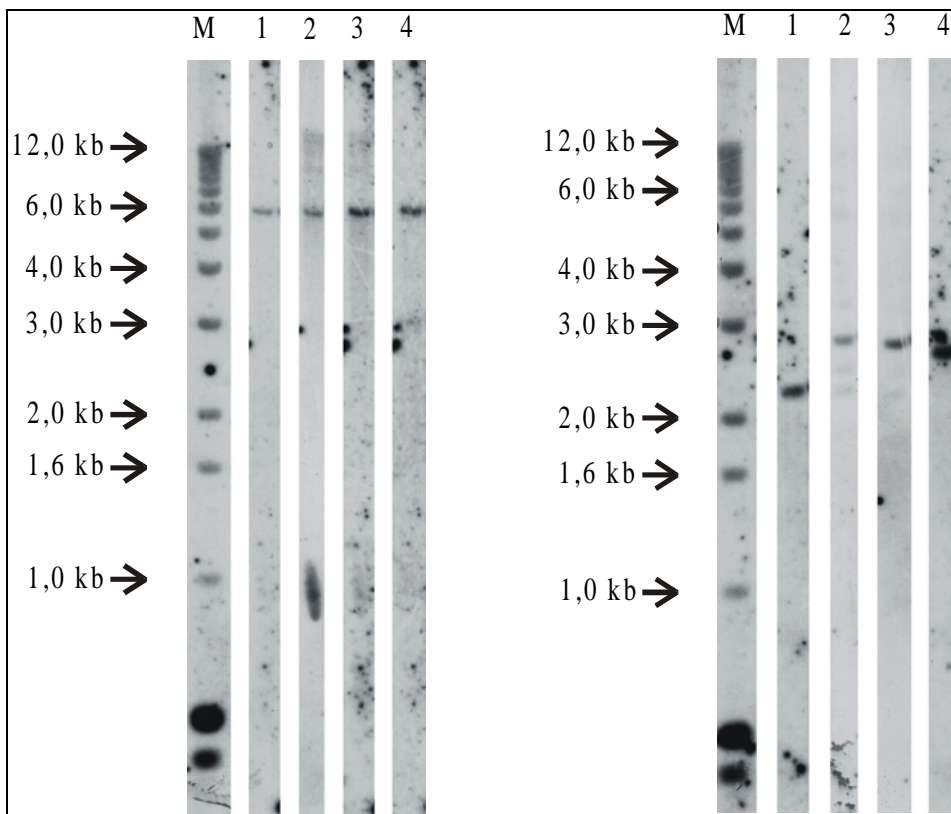
Anhang 2:

Verdau genomischer DNA von FM7a-Männchen mit BamH1 (links) und EcoR1 (rechts). Spuren 1-4 geben die Signale wieder, die mit den entsprechenden Sonden detektiert wurden.

BamH1: M: Marker; 1: AI294873; 2: gFIII; 3: gFI; 4: AA735984

EcoR1: M: Marker; 1: AI294873; 2: gFIII; 3: gFI; 4: AA735984

Fast alle Signale auf entweder BamH1-verdauter oder EcoR1-verdauter FM7a-DNA sind wildtypisch. Das schwächere Signal der Spur 4 des BamH1-Blots scheint etwa 100 Basenpaare kleiner zu sein als im Wildtyp. Dieser Polymorphismus wird auch im EcoR1-Verdau detektiert (Spur 4 des EcoR1-Blots). Die Sonde AI294873 detektiert auf EcoR1-verdauter FM7a-DNA möglicherweise einen zweiten Polymorphismus, da das Signal ebenfalls c.a. 100 Basenpaare kleiner als im Wildtyp ist.



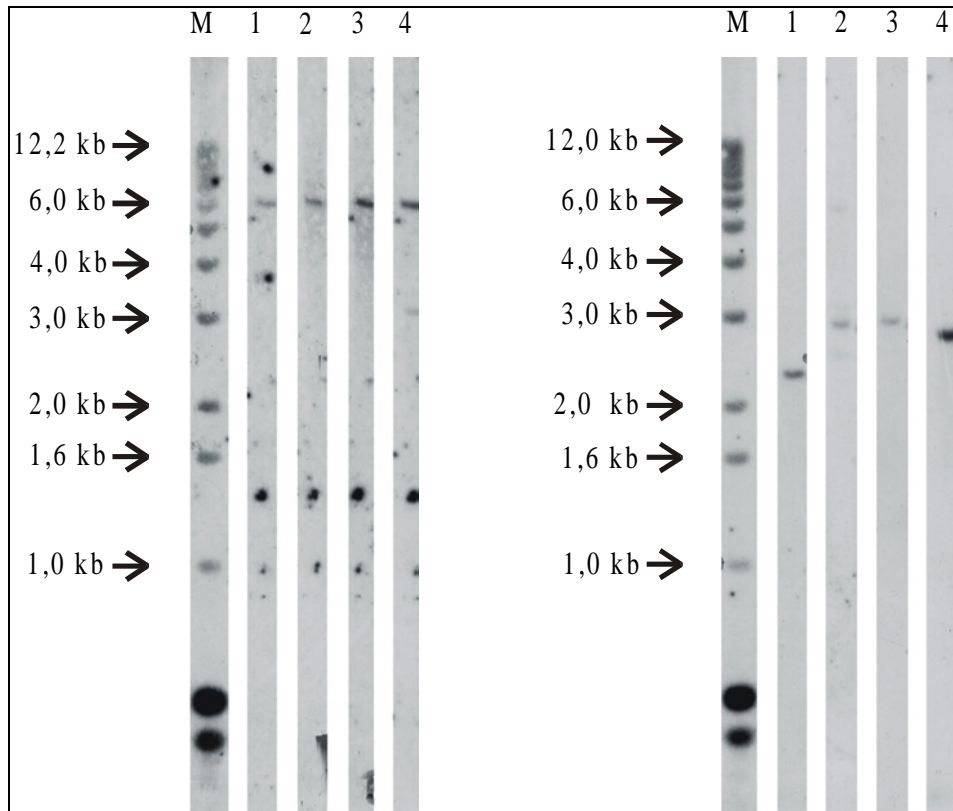
Anhang 3:

Verdau genomischer DNA von *mbu*^{Δ1-1}-Männchen mit BamH1 (links) und EcoR1 (rechts). Spuren 1-4 geben die Signale wieder, die mit den entsprechenden Sonden detektiert wurden.

BamH1: M: Marker; 1: AI294873; 2: gFIII; 3: gFI; 4: AA735984

EcoR1: M: Marker; 1: AI294873; 2: gFIII; 3: gFI; 4: AA735984

Alle Signale der BamH1- und EcoR1-verdauten *mbu*^{Δ1-1}-DNA sind in ihrer Größe mit den entsprechenden Signalen der BamH1- bzw. EcoR1-verdauten FM7a-DNA identisch.



Anhang 4:

Verdau genomischer DNA von *mbu*^{ΔA}-Männchen mit BamH1 (links) und EcoR1 (rechts). Spuren 1-4 geben die Signale wieder, die mit den entsprechenden Sonden detektiert wurden.

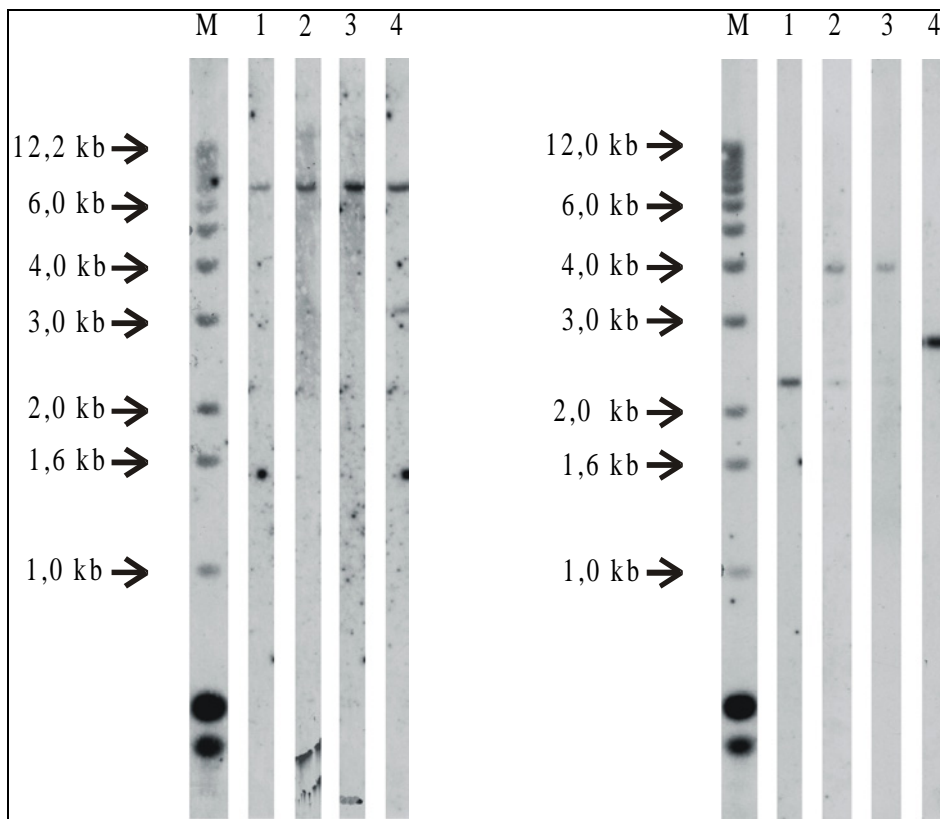
BamH1: M: Marker; 1: AI294873; 2: gFIII; 3: gFI; 4: AA735984

EcoR1: M: Marker; 1: AI294873; 2: gFIII; 3: gFI; 4: AA735984

Auf BamH1-verdauter *mbu*^{ΔA}-DNA detektieren alle 4 Sonden ein c.a. 6,2 kb großes DNA-Fragment. AA735984 detektiert zusätzlich ein 3,1 kb großes Fragment (schwächeres Signal Spur 4), das dem mit dieser Sonde detektierten Signal auf BamH1-verdauter FM7a-DNA entspricht.

Auf EcoR1-verdauter DNA von *mbu*^{ΔA}-Männchen detektiert die Sonde AI294873 ein 2,2 kb großes (≡ FM7a), die beiden Sonden gFIII und gFI ein (identisches) 2,9 kb großes und die Sonde AA735984 ein 2,8 kb großes (≡ FM7a) Fragment.

Somit befindet sich eine kleine Insertion in dem von gFIII und gFI detektierten EcoR1-Fragment.



Anhang 5:

Verdau genomischer DNA von *mbu^{AC}*-Männchen mit BamH1 (links) und EcoR1 (rechts). Spuren 1-4 geben die Signale wieder, die mit den entsprechenden Sonden detektiert wurden.

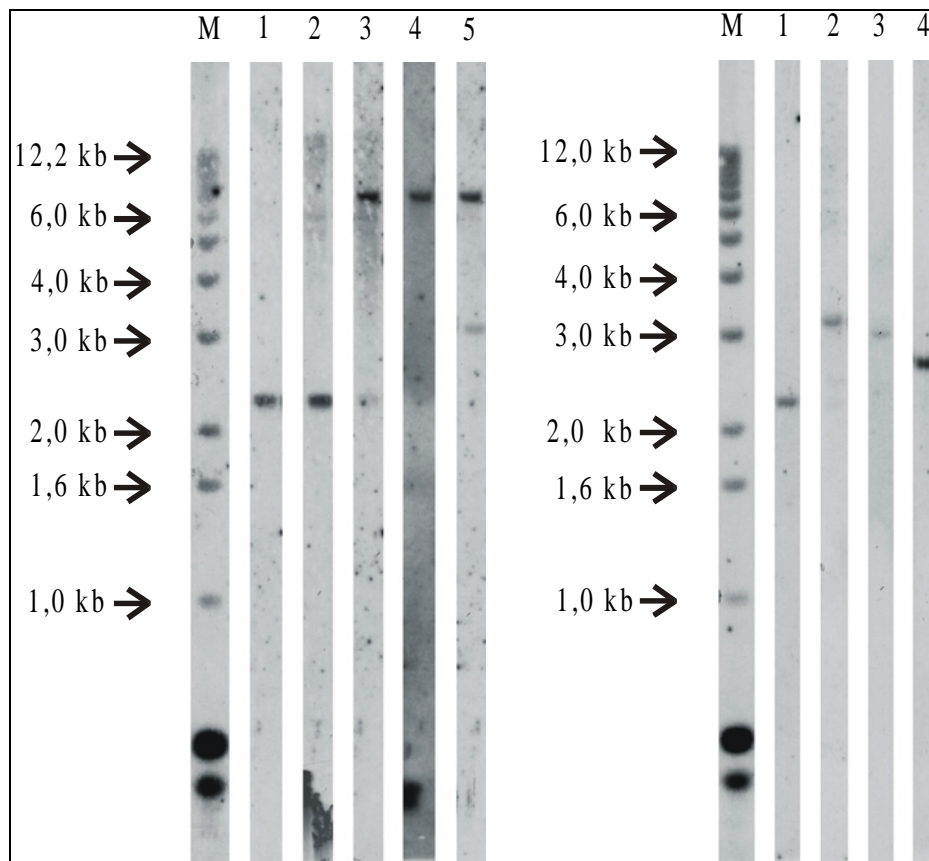
BamH1: M: Marker; 1: AI294873; 2: gFIII; 3: gFI; 4: AA735984

EcoR1: M: Marker; 1: AI294873; 2: gFIII; 3: gFI; 4: AA735984

Auf BamH1-verdauter *mbu^{AC}*-DNA detektieren alle 4 Sonden ein c.a. 7,5 kb großes DNA-Fragment. AA735984 detektiert zusätzlich ein 3,1 kb großes Fragment (schwächeres Signal Spur 4), das dem mit dieser Sonde detektierten Signal auf BamH1-verdauter FM7a-DNA entspricht.

Auf EcoR1-verdauter DNA von *mbu^{AC}*-Männchen detektiert die Sonde AI294873 ein 2,2 kb großes (\equiv FM7a), die beiden Sonden gFIII und gFI ein (identisches) 4,0 kb großes und die Sonde AA735984 ein 2,8 kb großes (\equiv FM7a) Fragment.

Somit befindet sich eine c.a. 1,4 kb große Insertion in dem von gFIII und gFI detektierten EcoR1-Fragment.



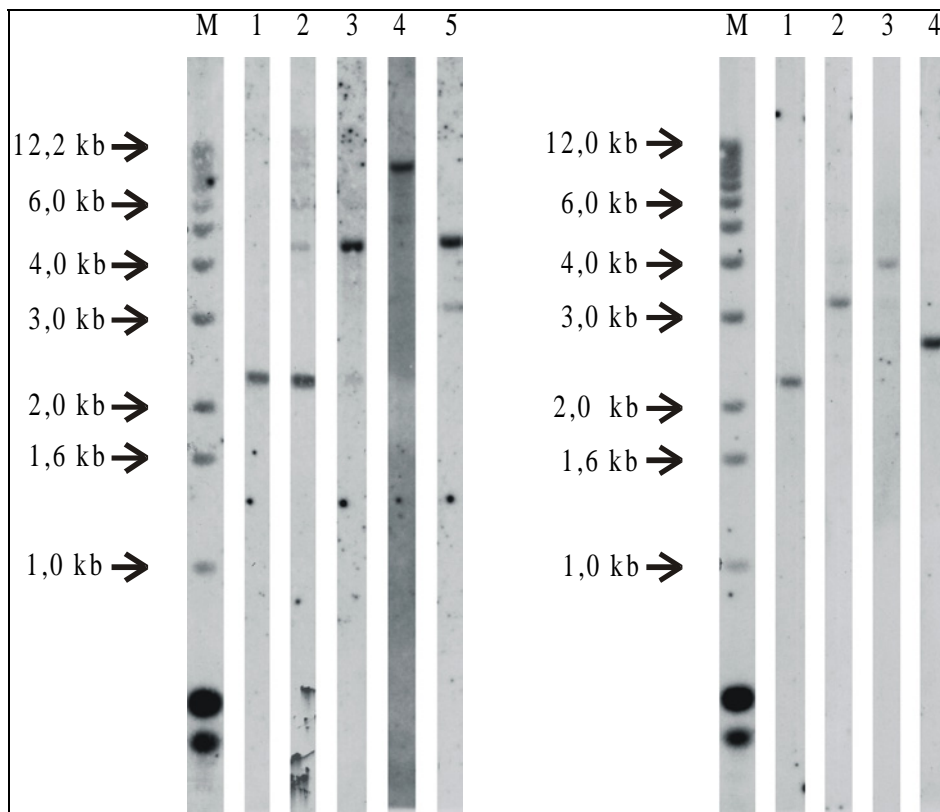
Anhang 6:

Verdau genomischer DNA von $mbu^{\Delta G}$ -Männchen mit BamH1 (links) und EcoR1 (rechts). Spuren 1-5 (1-4) geben die Signale wieder, die mit den entsprechenden Sonden detektiert wurden.

BamH1: M: Marker; 1: AI294873; 2: gFIII; 3: gFI; 4: P1.9; 5: AA735984

EcoR1: M: Marker; 1: AI294873; 2: gFIII; 3: gFI; 4: AA735984

Auf BamH1-verdauter $mbu^{\Delta G}$ -DNA detektieren die Sonden AI294873 und gFIII ein 2,2 kb großes DNA-Fragment. Dieses wird mit den gleichen Sonden auch bei BamH1-verdauter $mbu^{\Delta H}$ - und mbu^{P1} -DNA gefunden (Anhang 7 und 8). P1.9, gFI und AA735984 detektieren ein 7,5 kb großes Fragment; zusätzlich erkennt Sonde AA735984 ein 3,1 kb großes Fragment (schwächeres Signal Spur 5), das dem mit dieser Sonde detektierten Signal auf BamH1-verdauter FM7a-DNA entspricht. In der Spur 3 ist auf dem Originalblot noch ein schwaches 2,2 kb-Signal zu sehen, das dem mit Sonde AI294873 und gFIII detektierten entspricht (gFI hybridisiert schwach mit dem P3'-Anteil dieses Fragments, siehe auch Anhang 7 und 8). Auf EcoR1-verdauter DNA von $mbu^{\Delta G}$ -Männchen detektiert die Sonde AI294873 ein 2,2 kb großes (\equiv FM7a), die Sonden gFIII ein 3,2 kb großes ($\equiv mbu^{\Delta H}$ und mbu^{P1}), die Sonde gFI ein 3,1 kb großes und die Sonde AA735984 ein 2,8 kb großes (\equiv FM7a) Fragment. Die Signale der Spuren 1 und 2 im BamH1- und EcoR1-Verdau sind mit den entsprechenden Spuren von mbu^{P1} (Anhang 8) identisch. Daher müssen bei diesem Allel die BamH1- und EcoR1-Schnittstellen des mbu^{P1} -P2-P[lacW]-Elements erhalten geblieben sein. Diese Eigenschaft des $mbu^{\Delta G}$ -Allels wurde bei der Klonierung der genomischen DNA des CK 2 β -Genlokus im Rahmen eines BamH1-Rettungsexperiments ausgenutzt (siehe Abschnitt D 4.1).



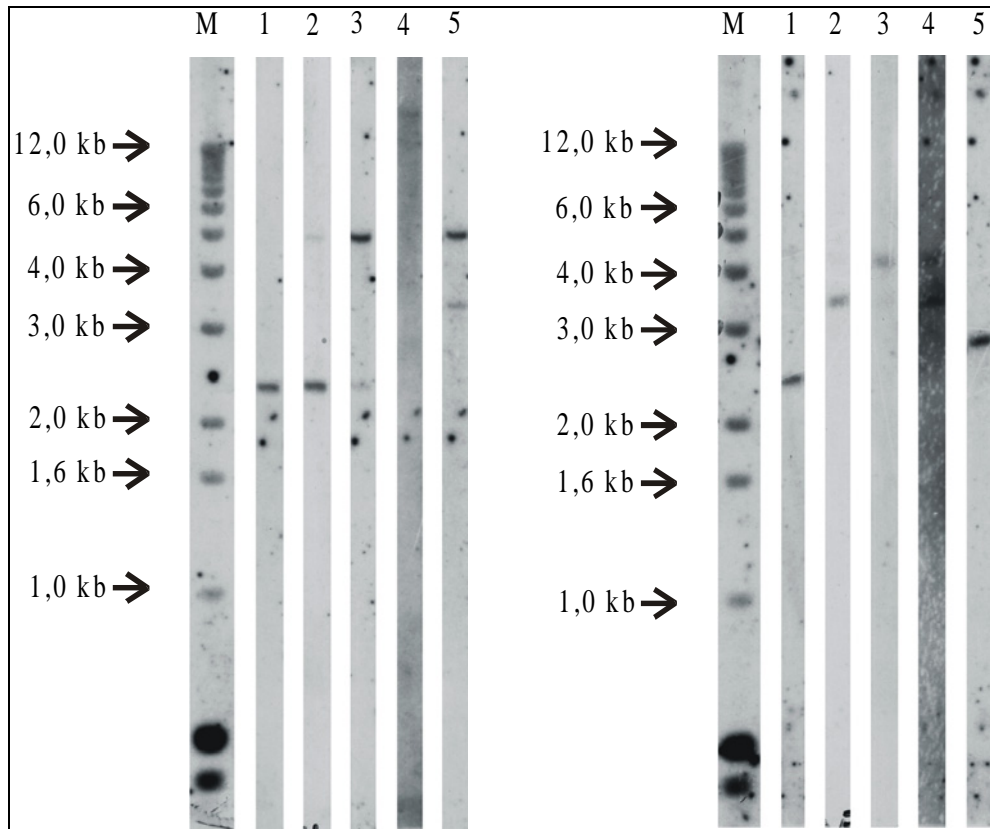
Anhang 7:

Verdau genomischer DNA von *mbu*^{ΔH}-Männchen mit BamHI (links) und EcoRI (rechts). Spuren 1-5 (1-4) geben die Signale wieder, die mit den entsprechenden Sonden detektiert wurden.

BamHI: M: Marker; 1: AI294873; 2: gFIII; 3: gFI; 4: P1.9; 5: AA735984

EcoRI: M: Marker; 1: AI294873; 2: gFIII; 3: gFI; 4: AA735984

Fast alle Signale der BamHI- und EcoRI-verdauten *mbu*^{ΔH}-DNA sind in ihrer Größe mit den entsprechenden Signalen der BamHI- bzw. EcoRI-verdauten *mbu*^{P1}-DNA identisch. Der einzige Unterschied besteht in der Größe des von der Sonde P1.9 (Spur 4 BamHI-Verdau) detektierten Signals. Dieses ist in *mbu*^{ΔH} c.a. 9,5 kb groß; die Größe dieses Signals in *mbu*^{P1} kann dagegen nicht mehr geschätzt werden, da es sich oberhalb des verwendeten Markers befindet.



Anhang 8:

Verdau genomischer DNA von *mbu^{PI}*-Männchen mit BamHI (links) und EcoRI (rechts). Spuren 1-5 geben die Signale wieder, die mit den entsprechenden Sonden detektiert wurden.

BamHI: M: Marker; 1: AI294873; 2: gFIII; 3: gFI; 4: P1.9; 5: AA735984

EcoRI: M: Marker; 1: AI294873; 2: gFIII; 3: gFI; 4: P1.9; 5: AA735984

Auf BamHI-verdauter *mbu^{PI}*-DNA detektieren die Sonden AI294873 und gFIII ein 2,2 kb großes DNA-Fragment. Sonde gFIII hybridisiert zusätzlich schwach mit einem 4,5 kb großen Fragment; dieses Signal entspricht dem starken 4,5 kb-Signal, das mit Sonde gFI detektiert wird. Umgekehrt liefert gFI zusätzlich ein schwaches 2,2 kb-Signal; das entsprechende Fragment hybridisiert stark mit Sonde gFIII (beide Sonden hybridisieren mit dem P3'-Ende eines P-Elements, wodurch die Kreuzhybridisierung verständlich wird; siehe auch Grafik 19). Das von P1.9 detektierte Signal ist zu groß um in seiner Größe abgeschätzt werden zu können. AA735984 detektiert das gleiche 4,5 kb große Fragment wie gFI und zusätzlich ein 3,1 kb Fragment (schwaches Signal Spur 5 \equiv FM7a). Auf EcoRI-verdauter DNA von *mbu^{PI}*-Männchen detektiert die Sonde AI294873 ein 2,2 kb großes Fragment (\equiv FM7a). Die Sonden gFIII hybridisiert stark mit einem 3,2 kb großen und schwach mit einem 4,0 kb großen Fragment. Umgekehrt liefert die Sonde gFI ein starkes 4,0 kb- und ein schwaches 3,2 kb-Signal. Die Sonde AA735984 detektiert ein 2,8 kb großes Fragment, das bei gleichem Verdau auch in FM7a-Männchen detektiert wird.

F 2 CK2 β -cDNA-Klon-Informationen

5'-Splicevariante	GenBank ID
Ia	AF236852.1/ BE978385/ AI517689/ BI230719/ BI235229/ BI236976/ BI367082/ BI368534/ BI486990/ BI577192/ BI580319/ BI580487 [DmA17*/ DmA41*]
Ib	AI109297
Ic	BG634847/ AI109634
Id	AF236850.1
Ie	AF236851.1/ AI945171/ BI214079/ BI231261/ M16535

Anhang 9:

Auflistung der CK2 β -cDNAs, die Informationen über die 5 alternativen ersten Exons enthalten. Für die mit * gekennzeichneten cDNA-Klone wurden keine Sequenzdaten an die Datenbanken übermittelt. Die Informationen stammen aus Bidwai *et al.* (1999).

GenBank ID	3'-Splicevariante	Anmerkung
- DmA17*	VIIa	VIIa geht über mittlere BamHI hinaus
- Dm107**	VIIa	polyadenyliert
AF236851.1	VIIa	vollständige Sequenz von A. Bidwai zur Verfügung gestellt, gibt Start Exon VIIa vor
AF236850.1	VIIa	Bidwai 2000
M16535	VIIa	gibt Start Exon VIIa vor, vermutlich nicht am polyA-Schwanz, sondern intern geprimed (Saxena 1987)
AA263902	VIIa	erste 44 nt sind reverse Sequenz von Exon VIIa, gibt Start Exon VIIa vor
- DmA41*	VIIb	gibt Start Exon VIIb vor
AA735984	VIIa/b	kleines Insert, sequenziert, polyadenyliert
AI109634	VIIc	gibt Start Exon VIIc vor
AI517689	VIIc	5'-Sequenz gibt Start Exon VIIc vor, 3'-Sequenz stammt von einem anderen Transkript
AI109297	VIIc	polyadenyliert, ansequenziert
AI387980	VIIc	polyadenyliert

Anhang 10:

Auflistung der CK2 β -cDNAs, die Informationen über die 3 alternativen siebten Exons enthielten. Für die mit * gekennzeichneten cDNA-Klone wurden keine Sequenzdaten an die Datenbanken übermittelt. Die Informationen stammen aus Bidwai *et al.* (1999). Für den mit ** gekennzeichneten cDNA-Klon wurde ebenfalls keine Sequenz an die Datenbanken überstellt. Die Informationen zu diesem cDNA-Klon stammt aus Saxena *et al.* (1987).

Exon	5'-3'- Ausdehnung auf AE003487	Länge	Ursprung
Ia	75624-75774	151	BI235229, BI236976, BI368534, BI580319, BI580487
Ib	75980-76002	23	AI109297
Ic	75983-76033	51	BG634847
Id	76055-76079	25	AF236850.1
Ie	75969-76367	399	BI231261

Anhang 11:

Kartierung der 5 alternativen ersten CK2 β -Exons; ihre Länge und ihr Ursprung.

Exon	5'-3'-Ausdehnung auf AE003487	Länge
II	76531-76606	76
III	76886-76988	103
IV	77062-77253	192
V	77907-78096	190
VI	78193-78274	82

Anhang 12:

Kartierung der von allen bekannten cDNAs verwendeten Exons II-VI und ihre Länge.

Exon	5'-3'-Ausdehnung auf AE003487	Länge	Ursprung	Anmerkung
VIIa	78689-78975	285	M16535	internes Priming, siehe Saxena <i>et al.</i> (1987)
VIIa	78689-78948	260	AA263902	
VIIa/b	79569-80402	834	AA735984	geht über die rechte BamH1-Schnittstelle hinaus und überlappt mit Exon VIIa der Sequenzen NM 080762, NM 080761 und NM 078576; polyA-Schwanz vorhanden
Maximale Gesamtaus- dehnung VIIa	78689-80402	1713	NM080762, NM080761, NM078576, AA735984, DmA17 und Dm107	Sequenzen NM 080762, NM 080761 und NM 078576 geben die Länge des Exons VIIa bis zur rechten BamH1- Schnittstelle an; Bidwai <i>et al.</i> (2000) gibt an, daß Exon VIIa über die rechte BamH1-Schnittstelle hinausreicht.
VIIb	78820-	?	Dm41	Größe des Exons siehe Bidwai <i>et al.</i> (2000)
VIIc	83240-83311	72	AI517689	gibt Start von Exon VIIc vor
VIIc	83240-84167	927	AI109297	Exon VIIc wurde vollständig sequenziert; polyA- Schwanz vorhanden
VIIc	83240-84152	912	AI387980	Exon VIIc wurde vollständig sequenziert; polyA- Schwanz vorhanden

Anhang 13:

Kartierung der 3 alternativen siebten Exons; ihre Länge und ihr Ursprung.

F 3 Aminosäureübersetzungen von CK2β-cDNA-Splicevarianten

```

23 atgagcagctccgaggaagtctcctgggtcacctggttctgtgga
   M S S S E E V S W V T W F C G
68 cttcgtggcaatgagttcttctgcgaggtggatgaggactacata
   L R G N E F F C E V D E D Y I
113 caggataaattcaatttaactggtttaaatgagcaggtaccaac
   Q D K F N L T G L N E Q V P N
158 tatcggcaagcgttggacatgatccttggacttgaaccggaggac
   Y R Q A L D M I L D L E P E D
203 gagctcgaggacaatccactgcagtccgacatgaccgagcaggcc
   E L E D N P L Q S D M T E Q A
248 gccgagatgctctacggcctcatacacgccagatatataactaaca
   A E M L Y G L I H A R Y I L T
293 aatcgcggcatcgctcaaatgatcgagaaatatcaaactggcgat
   N R G I A Q M I E K Y Q T G D
338 ttcggacattgtccacgtgtctactgtgaaagtcagcccattgctg
   F G H C P R V Y C E S Q P M L
383 ccattgggtctgtcggacatccccggcgaggcaatggttaagacc
   P L G L S D I P G E A M V K T
428 tattgccccaaagtgcattgacgtgtacacacaaaatcgtcgcgt
   Y C P K C I D V Y T P K S S R
473 caccaccataccgatggcgcctatctcggcactggatttccacac
   H H H T D G A Y F G T G F P H
518 atgctcttcatgggtgcaccccgaatatcgtccaagcgtcctact
   M L F M V H P E Y R P K R P T
563 aatcagtttggtccaaggctatatggatttaaaatacacagctta
   N Q F V P R L Y G F K I H S L
608 gcttatcaaattcagctgcaggcagcagccaatttttaaatagcca
   A Y Q I Q L Q A A A N F K M P
653 ctacgagcgaaaaaactaa 670
   L R A K N *

```

Anhang 14:

Darstellung des offenen Leserasters der CK2β-Splicevarianten Ia/VIIa, Id/VIIa und Ie/VIIa. Die resultierende 215 Aminosäuren lange Isoform CK2β-VIIa besitzt ein theoretisches Molekulargewicht von 24829.26 Dalton.

```

1 atgagcagctccgaggaagtctcctgggtcacctggttctgtgga
  M S S S E E V S W V T W F C G
36 cttcgtggcaatgagttcttctgcgaggtggatgaggactacata
  L R G N E F F C E V D E D Y I
71 caggataaattcaatttaactggtttaaatgagcaggtacccaac
  Q D K F N L T G L N E Q V P N
106 tatcggcaagcgttggacatgatccttggacttgaaccggaggac
  Y R Q A L D M I L D L E P E D
141 gagctcgaggacaatccactgcagtcgacatgaccgagcaggcc
  E L E D N P L Q S D M T E Q A
176 gccgagatgctctacggcctcatacacgccagatatataactaaca
  A E M L Y G L I H A R Y I L T
211 aatcgcggcatcgtcaaatgatcgagaaatatcaaactggcgat
  N R G I A Q M I E K Y Q T G D
246 ttcggacattgtccacgtgtctactgtgaaagtcagcccatgctg
  F G H C P R V Y C E S Q P M L
281 ccattgggtctgtcggacatccccggcgaggcaatggttaagacc
  P L G L S D I P G E A M V K T
316 tattgcccgaagtgcattgacgtgtacacacaaaaatcgtcgcgt
  Y C P K C I D V Y T P K S S R
351 caccaccataccgatggcgcctatctcggcactggatttccacac
  H H H T D G A Y F G T G F P H
386 atgctcttcatgggtgcatcccgaatatcgtcccaagcgtcctact
  M L F M V H P E Y R P K R P T
421 aatcagtttgttccaaggctatatggattttaaatacacagctta
  N Q F V P R L Y G F K I H S L
456 gcttatcaaattcagctgcaggcagcagccaattttaaaatgccca
  A Y Q I Q L Q A A A N F K M P
491 ctacgagcgtttacaacgggaagaccgatagacagcaacacacaaa
  L R A F T T G R P I D S N T Q
526 caacaacaacaacaacagccacactga 552
  Q Q Q Q Q Q P H *

```

Anhang 15:

Darstellung des offenen Leserasters der CK2 β -Splicevariante Ia/VIIb. Die CK2 β -Isoform CK2 β -VIIb besitzt mit 233 Aminosäuren ein theoretisches Molekulargewicht von 26908.43 Dalton.

```

86 atgagcagctccgaggaagtctcctgggtcacctggttctgtgga
  M S S S E E V S W V T W F C G
131 cttcgtggcaatgagttcttctgcgaggtggatgaggactacata
  L R G N E F F C E V D E D Y I
176 caggataaattcaatttaactggtttaaatgagcaggtacccaac
  Q D K F N L T G L N E Q V P N
221 tatcggcaagcgttggacatgatccttggacttgaaccggaggac
  Y R Q A L D M I L D L E P E D
266 gagctcgaggacaatccactgcagtcgacatgaccgagcaggcc
  E L E D N P L Q S D M T E Q A
311 gccgagatgctctacggcctcatacacgccagatatataactaaca
  A E M L Y G L I H A R Y I L T
356 aatcgcggcatcgcctcaaatgatcgagaaatatcaaactggcgat
  N R G I A Q M I E K Y Q T G D
401 ttcggacattgtccacgtgtctactgtgaaagtcagcccatgctg
  F G H C P R V Y C E S Q P M L
446 ccattgggtctgtcggacatccccggcgaggcaatggttaagacc
  P L G L S D I P G E A M V K T
491 tattgcccgaagtgcattgacgtgtacacacaaaatcgctcgctg
  Y C P K C I D V Y T P K S S R
536 caccaccataccgatggcgctatcttggcactggatttccacac
  H H H T D G A Y F G T G F P H
581 atgctcttcatgggtgcatcccgaatatcgtcccaagcgtcctact
  M L F M V H P E Y R P K R P T
626 aatcagtttgttccaaggctatatggattttaaatacacagctta
  N Q F V P R L Y G F K I H S L
671 gcttatcaaattcagctgcaggcagcagccaatttttaaatagcca
  A Y Q I Q L Q A A A N F K M P
716 ctacgagcgcaacgtggtcagccgccaaggacgaagagcctgag
  L R A Q R G Q P P K D E E P E
761 aataatgccgatacggtgcccaagcgctctaa 793
  N N A D T V P K R L *

```

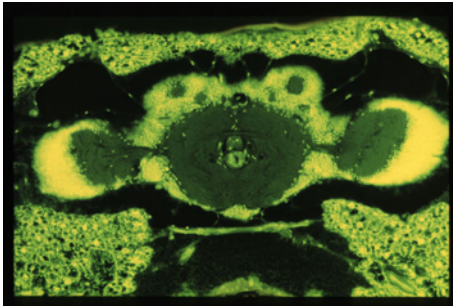
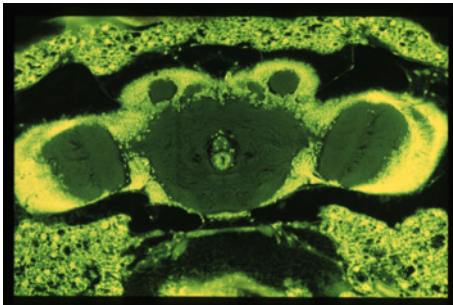
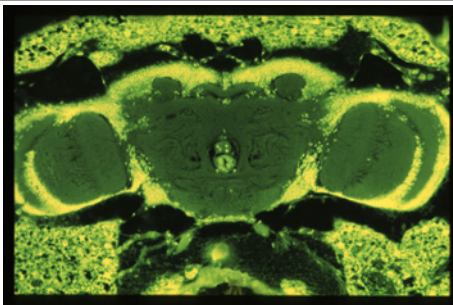
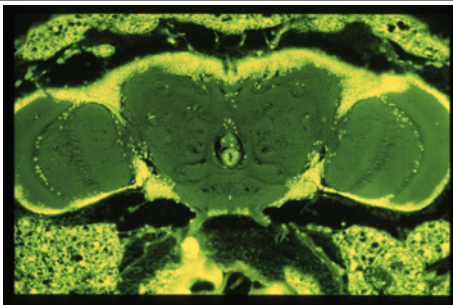
Anhang 16:

Darstellung des offenen Leserasters der CK2 β -Splicevarianten Ia/VIIc und Ib/VIIc. Das resultierende, 27087.69 Dalton schwere und 235 Aminosäuren lange Protein stellt die CK2 β -VIIc-Isoform dar.

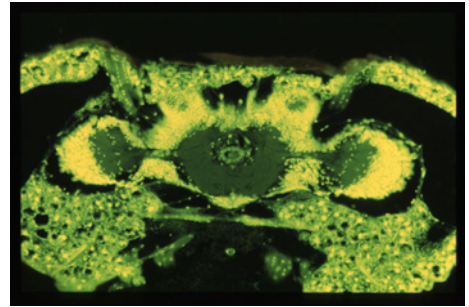
23 **atgagcgccttgcaattg***tcacaatacgacaaaatgagcagctcc*
 M S A C Q L S Q Y D K M S S S
 68 *gaggaagtctcctgggtcacctgggttctgtggacttcgtggcaat*
 E E V S W V T W F C G L R G N
 113 *gagttcttctgcgaggtggatgaggactacatacaggataaattc*
 E F F C E V D E D Y I Q D K F
 158 *aatttaactggtttaaatgagcaggtacccaactatcggcaagcg*
 N L T G L N E Q V P N Y R Q A
 203 *ttggacatgatcttggacttgaaccggaggacgagctcgaggac*
 L D M I L D L E P E D E L E D
 248 *aatccactgcagtcgacatgaccgagcaggccgagatgctc*
 N P L Q S D M T E Q A A E M L
 293 *tacggcctcatacagccagatatataactaaciaaatcgggcatc*
 Y G L I H A R Y I L T N R G I
 338 *gctcaaagtatcgagaaaatcaaaactggcgatttcggacattgt*
 A Q M I E K Y Q T G D F G H C
 383 *ccacgtgtctactgtgaaagtgcagccatgctgccattgggtctg*
 P R V Y C E S Q P M L P L G L
 428 *tcggacatccccggcgaggcaatgggtaagacctattgccccaaag*
 S D I P G E A M V K T Y C P K
 473 *tgcattgacgtgtacacacaaaatcgtcgcgtcaccaccataacc*
 C I D V Y T P K S S R H H H T
 518 *gatggcgcctatttcggcactggatttcacacatgctcttcatg*
 D G A Y F G T G F P H M L F M
 563 *gtgcatcccgaatatcgtcccgaagcgtcctactaatcagtttggt*
 V H P E Y R P K R P T N Q F V
 608 *ccaaggctatatggatttaaaatacacagcttagcttatcaaatt*
 P R L Y G F K I H S L A Y Q I
 653 *cagctgcaggcagcagccaattttaaaatgccactacgagcgcaa*
 Q L Q A A A N F K M P L R A Q
 698 *cgtgggtcagccgcccaaggacgaagagcctgagaataatgccgat*
 R G Q P P K D E E P E N N A D
 743 *acggtgcccaagcgcctctaa* 763
 T V P K R L *

Anhang 17:

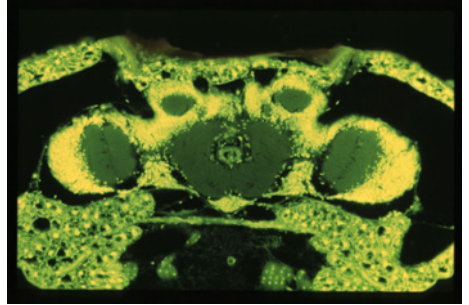
Darstellung des offenen Leserasters der CK2 β -Splicevariante Ic/VIIc. Die vorhandene Sequenz von AI109634 ist kursiv wiedergegeben, die von BG634847 ist fett dargestellt. Diese 246 Aminosäuren lange CK2 β -Isoform (CK2 β^* -VIIc) besitzt ein theoretisches Molekulargewicht von 28343.12 Dalton.

F 4 Vergleich des Calyxphänotyps in *mbu*^{P1{P3843/2}}- und WTB-WeibchenSchnitt 1 Weibchen *mbu*^{P1}Schnitt 2 Weibchen *mbu*^{P1}Schnitt 3 Weibchen *mbu*^{P1}Schnitt 4 Weibchen *mbu*^{P1}

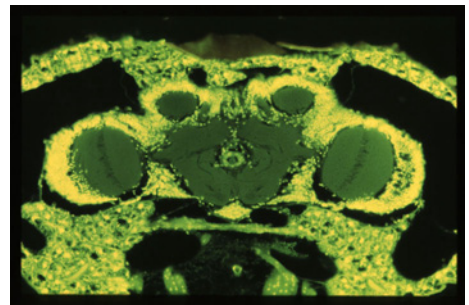
Anhang 18
 Frontale 7 µm-Autofluoreszenz-
 schnittserie durch das Gehirn
 eines *mbu*^{P1}- und eines WTB-
 Weibchens. Schnitt 1 ist jeweils
 der erste Schnitt, bei dem die
 Calyces (vgl. Abb.3) der
 Pilzkörper angeschnitten wurden.



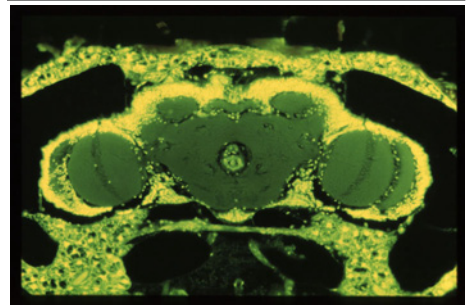
Schnitt 1 Weibchen WTB



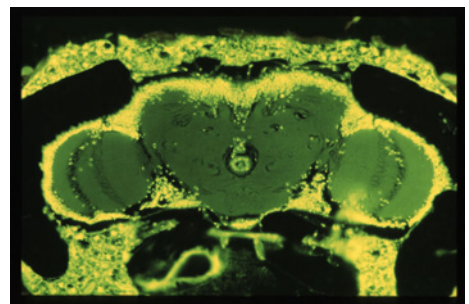
Schnitt 2 Weibchen WTB



Schnitt 3 Weibchen WTB



Schnitt 4 Weibchen WTB



Schnitt 5 Weibchen WTB

G Literaturverzeichnis

Adams, M.D. et al. (2000). The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* **287** (5461): 2185-2195

Allende, J.E., and Allende, C.C. (1995). Protein kinases 4. Protein kinase CK2: an enzyme with multiple substrates and a puzzling regulation. *FASEB J.* **9**(5): 313-23

Balling, A., Technau, G.M., and Heisenberg, M. (1987). Are the structural changes in adult *Drosophila* mushroom bodies memory traces? Studies on biochemical learning mutants. *J. Neurogenet.* **4**: 65-73

Bidwai, A.P., Reed, J.C., and Glover, C.V. (1995). Cloning and disruption of CKB1, the gene encoding the 38-kDa beta subunit of *Saccharomyces cerevisiae* casein kinase II (CKII). Deletion of CKII regulatory subunits elicits a salt-sensitive phenotype. *J. Biol. Chem.* **270**(18): 10395-10404

Bidwai A.P., Zhao, W., and Glover, C.V.C. (1999). A gene located at 56F1-2 in *Drosophila melanogaster* encodes a novel metazoan β -like subunit of Casein Kinase II. *Mol. Cell. Biol. Res. Commun.* **1**(1): 21-8

Bidwai A.P., Saxena, A., Zhao, W., McCann, R.O., and Glover, C.V.C. (2000). Multiple, closely spaced alternative 5' exons in the DmCKII β gene of *Drosophila melanogaster*. *Mol. Cell. Biol. Res. Commun.* **3**(5): 283-91

Boldyreff, B., and Issinger, O.G. (1997). A-Raf kinase is a new interacting partner of protein kinase CK2 β subunit. *FEBS Letters* **403**: 197-199

Brkulj, M. (2002). Untersuchungen zur Rolle der β -Untereinheit der Casein Kinase II in *Drosophila melanogaster*. Diplomarbeit, Universität Würzburg.

Callaerts, P., Halder, G., and Gehring, W.J. (1997). Pax-6 in development and evolution. *Annu. Rev. Neurosci.* **20**: 483-532

Canton, D.A., Zhang, C., and Litchfield, D.W. (2001). Assembly of protein kinase CK2: investigation of complex formation between catalytic and regulatory subunits using a zinc-finger-deficient mutant of CK2 β . *Biochem. J.* **358**: 87-94

Chantalat, L., Leroy, D., Filhol, O., Nueda, A., Benitez, M.J., Chambaz, E.M., Cochet, C., and Dideberg, O. (1999). Crystal structure of the human protein kinase CK2 regulatory subunit reveals its zinc finger-mediated dimerization. *EMBO J.* **18(11)**: 2930-2940

Chen, M., Li, D., Krebs, E.G., and Cooper, J.A. (1997). The casein kinase II beta subunit binds to Mos and inhibits Mos activity. *Mol Cell Biol.* **17(4)**: 1904-12

Chen, M. and Cooper, J.A. (1997). The beta subunit of CKII negatively regulates *Xenopus* oocyte maturation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94(17)**: 9136-40

Chung, H., and Brautigan, D.L. (1999). Protein phosphatase 2A supresses MAP kinase signalling and ectopic protein expression. *Cell. Signal.* **11(8)**: 575-580

Connolly, J.B., Roberts, I.J., Armstrong, J.D., Kaiser, K., Forte, M., Tully, T., and O'Kane, C.J. (1996). Associative learning disrupted by impaired G_s signaling in *Drosophila* mushroom bodies. *Science* **274(5295)**: 2104-2107

Daum, G., Eisenmann-Trappe, I., Fries, H.W., Troppmair, J., and Rapp, U.R. (1994). The ins and outs of Raf kinases. *Trends Biochem. Sci.* **19(11)**: 474-480

de Belle, J.S., and Heisenberg, M. (1994). Associative odor learning in *Drosophila* abolished by chemical ablation of mushroom bodies. *Science* **263(5147)**: 692-695

Dubnau, J., Grady, L., Kitamoto, T., and Tully, T. (2001). Disruption of neurotransmission in *Drosophila* mushroom body blocks retrieval but not acquisition of memory. *Nature* **411(6836)**: 476-480

Dujardin, F. (1850). Mémoire sur le système nerveux des insectes. *Ann. Sci. Nat. Zool.* **14**: 195-206

- Faust, M., and Montenarh, M.** (2000). Subcellular localization of protein kinase CK2. A key to its function? *Cell. Tissue Res.* **301**: 329-340
- Glotzer, M., Murray, A.W., and Kirschner, M.W.** (1991). Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature* **349**: 132-138
- Graham, K.C., and Litchfield, D.W.** (2000). The regulatory β subunit of protein kinase CK2 mediates formation of tetrameric CK2 complexes. *J. Biol. Chem.* **275(7)**: 5003-5010
- Guerra, B., and Issinger, O.-G.** (1999). Protein kinase CK2 and its role in cellular proliferation, development and pathology. *Electrophoresis* **20**, 391-408
- Hagemann, C., Kalmes, A., Wixler, V., Wixler, L., Schuster, T., and Rapp, U.R.** (1997). The regulatory subunit of protein kinase CK2 is a specific A-Raf activator. *FEBS Letters* **403**: 200-202
- Heisenberg, M., and Böhl, R.** (1979). Isolation of anatomical brain mutants of *Drosophila* by histological means. *Z. Naturforsch.* **34**: 143-147
- Heisenberg, M., Borst, A., Wagner, S., and Byers, D.** (1985). *Drosophila* mushroom body mutants are deficient in olfactory learning. *J. Neurogenet.* **2(1)**: 1-30
- Heisenberg, M., Heusipp, M., and Wanke, C.** (1995). Structural plasticity in the *Drosophila* Brain. *J. Neurosci.* **15(3)**: 1951-1960
- Heriche, J.K., Lebrin, F., Rabilloud, T., Leroy, D., Chambaz, E.M., and Goldberg, Y.** (1997). Regulation of protein phosphatase 2A by direct interaction with casein kinase 2 α . *Science* **276(5314)**: 952-955
- Hinke, W.** (1961). Das relative postembryonale Wachstum der Hirnteile von *Culex pipiens*, *Drosophila melanogaster* und *Drosophila*-Mutanten. *Z. Morph. Ökol. Tiere* **50**: 81-118

Hinrichs, M.V., Jedlicki, A., Tellez, R., Pongor, S., Gatica, M., Allende, M.M.; and Allende, J.E. (1993): Activity of recombinant α - subunits and β -subunits of casein kinase II from *Xenopus laevis*. *Biochemistry* **32**: 7310-7316

Hochstrasser, M., Ellison, M.J., Chau, V., and Varshavsky, A. (1991). The short-lived MAT α 2 transcriptional regulator is ubiquitinated *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88** : 4606-4610

Holmgren, N. (1916). Zur vergleichenden Anatomie des Gehirns von Polychaeten, Onychophoren, Xiphosuren, Arachniden, Crustaceen, Myriapoden, und Insekten. *K. Svenska Vetensk. Akad. Handl.* **56**: 1-303

Ito, K., and Hotta, Y. (1992). Proliferation pattern of postembryonic neuroblasts in the brain of *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.* **149**(1): 134-148

Ito, K., Awano, W., Suzuki, K., Hiromi, Y., and Yamamoto, D. (1997). The *Drosophila* mushroom body is a quadruple structure of clonal units each of which contains a virtually identical set of neurones and glial cells. *Development* **124**(4): 761-771

Jäger, R.F., and Fischbach, K.F. (1987). Some improvements of the Heisenberg-Böhl method for mass histology of *Drosophila* heads. *D. I. S.* **66**: 162-165

Kenyon, F.C. (1896). The meaning and structure of the so-called "mushroom bodies" of the hexapod brain. *Am. Naturalist* **30**: 643-650

Kraft, R., Levine, R.B., and Restifo, L.L. (1998). The steroid hormone 20-hydroxyecdysone enhances neurite growth of *Drosophila* mushroom body neurons isolated during metamorphosis. *J. Neurosci.* **18**(21): 8886-8899

Krehan, A., and Pyerin, W. (1999). Intermolecular contact sites in protein kinase CK2. *Mol Cell Biol.* **19**1: 21-28

Krehan, A., Schmalzbauer, R., Böcher, O., Ackermann, K., Wirkner, U. Brouwers, S., and Pyerin, W. (2001). Ets1 is a common element in directing transcription of the alpha and beta genes of human protein kinase CK2. *Eur. J. Biochem.* **268(11)**: 3243-3252

Kurusu, M., Nagao, T., Walldorf, U., Flister, S., Gehring, W.J., and Furukubo-Tokunaga, K. (2000). Genetic control of development of the mushroom bodies, the associative learning centers in the *Drosophila* brain, by the *eyeless*, *twin of eyeless*, and *dachshund* genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97(5)**: 2140-2144

Kurusu, M., Awasaki, T., Masuda-Nakagawa, L.M., Kawauchi, H., Ito, K. and Furukubo-Tokunaga, K. (2002). Embryonic and larval development of the *Drosophila* mushroom bodies: concentric layer subdivisions and the role of fasciclin II. *Development* **129(2)**: 409-419

Kusk, M., Ahmed, R., Thomsen, B., Bendixen, C., Issinger, O.-G., and Boldyreff, B. (1999). Interactions of protein kinase CK2 β subunit within the holoenzyme and with other proteins. *Mol. Cell. Biochem.* **191**: 51-58

Lebrin, F., Bianchini, L., Rabilloud, T., Chambaz, E.M., and Goldberg, Y. (1999). CK2 α -protein phosphatase 2A molecular complex: Possible interaction with the MAP kinase pathway. *Mol. Cell. Biochem.* **191**: 207-212

Lee, T., Lee, A., and Luo, L. (1999). Development of the *Drosophila* mushroom bodies: sequential generation of three distinct types of neurons from a neuroblast. *Development* **126(18)**: 4065-4076

Lee, T., Winter, C., Marticke, S.S., Lee, A. and Luo, L. (2000). Essential roles of *Drosophila* RhoA in the regulation of neuroblast proliferation and dendritic but not axonal morphogenesis. *Neuron* **25(2)**: 307-316

Lee, T., Marticke, S., Sung, C., Robinow, S., and Luo, L. (2000). Cell-autonomous requirement of the USP/EcR-B ecdysone receptor for mushroom body neuronal remodeling in *Drosophila*. *Neuron* **28(3)**: 807-818

- Lin, W.-J., Sheu, G.-T., and Traugh, J. A.** (1994). Effects of autophosphorylation on casein kinase II activity: evidence from mutations in the β -subunit. *Biochemistry* **33**: 6998-7004
- Litchfield, D.W., Lozeman, F.J., Cicirelli, M.F., Harrylock, M., Ericsson, L.H., Piening, C.J., and Krebs, E.G.** (1991). Phosphorylation of the beta subunit of casein kinase II in human A431 cells. Identification of the autophosphorylation site and a site phosphorylated by p34cdc2. *J. Biol. Chem.* **266(30)**: 20380-20389
- Liu, L., Wolf, R., Ernst, R., and Heisenberg, M.** (1999). Context generalization in *Drosophila* visual learning requires the mushroom bodies. *Nature* **400(6746)**: 753-756
- Luckett, J.C., Huser, M.B., Giagtzoglou, N., Brown, J.E., and Pritchard, C.A.** (2000). Expression of the A-raf proto-oncogene in the normal adult and embryonic mouse. *Cell. Growth. Differ.* **11(3)**: 163-171
- Lüscher, B., Litchfield, D.W.** (1994). Biosynthesis of casein kinase II in lymphoid cell lines. *Eur. J. Biochem.* **220**: 521-526
- Martin, J.R., Ernst, R., and Heisenberg, M.** (1998). Mushroom bodies suppress locomotor activity in *Drosophila melanogaster*. *Learning Memory* **5(1-2)**: 179-191
- McGuire, S.E., Le, P.T., and Davis, R.L.** (2001). The role of *Drosophila* mushroom body signaling in olfactory memory. *Science* **293(5533)**: 1330-1333
- Meggio, F., Ruzzene, M., Sarno, S., Pagano, M.A., and Pinna, L.A.** (2000). pCMB treatment reveals the essential role of cysteinyl residues in conferring functional competence to the regulatory subunit of protein kinase CK2. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **267(1)**: 427-432
- Melzig, J., Rein, K.-H., Schäfer, U., Pfister, H., Jäckle, H., Heisenberg, M. and Raabe, T.** (1998). A protein related to p21-activated kinase (PAK) that is involved in neurogenesis in the *Drosophila* adult nervous system. *Curr. Biol.* **8**: 1223-1226

Melzig, J. (1998). Genetische und molekulare Charakterisierung der beiden strukturellen Pilzkörpermutanten *mushroom body defect* und *mushroom bodies tiny* von *Drosophila melanogaster*. Dissertationsarbeit, Universität Würzburg

Menzel, R., Erber, J., and Mashur, T. (1974). Learning and memory in the honey bee. In *Experimental analysis of insect behaviour* (ed. L. Barton Browne), pp. 195-217. Springer, Heidelberg, Germany.

Mestres, P., Boldyreff, B.S., Marin, O., Pinna, L.A., and Issinger, O.-G. (1994). Expression of casein kinase 2 during mouse embryogenesis. *Acta Anat.* **149**: 13-20

Mizunami, M., Weibrecht, J.M., and Strausfeld, N.J. (1993). A new role for the insect mushroom bodies: Place memory and motor control. In *Biological neural networks in invertebrate neuroethology and robotics* (ed. R.D. Beer, R.Ritzmann and T. McKenna), pp. 199-225. Academic Press, Cambridge, MA.

Noveen, A., Daniel, A., and Hartenstein, V. (2000). Early development of the *Drosophila* mushroom body: the roles of *eyeless* and *dachshund*. *Development* **127(16)**: 3475-3488

O'Dell, K.M.C., Armstrong, J.D., Yang, M.Y., and Kaiser, K. (1995). Functional dissection of the *Drosophila* mushroom bodies by selective feminization of genetically defined subcompartments. *Neuron* **15(1)**: 55-61

Oellers, N., and Hafen, E. (1996). Biochemical characterization of Rolled^{Sem}, an activated form of *Drosophila* mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* **271(40)**: 24939-24944

Pepperkok, R., Lorenz, P., Ansorge, W., and Pyerin, W. (1994). Casein kinase II is required for transition of G₀/G₁, early G₁, and G₁/S phases of the cell cycle. *J. Biol. Chem.* **269(9)**: 6986-6991

Prokop, A., and Technau, G.M. (1994). Normal function of the *mushroom body defect* gene of *Drosophila* is required for the regulation of the number and proliferation of neuroblasts. *Dev. Biol.* **161(2)**: 321-337

Putz, G. (2002). Dissertationsarbeit, Universität Würzburg, in press :)

Roussou, G., and Draetta, G. (1994). The *Schizosaccharomyces pombe* casein kinase II alpha and beta subunits: evolutionary conservation and positive role of the beta subunit. *Mol. Cell. Biol.* **14(1)**: 576-86

Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989). Molecular cloning, a laboratory manual. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York, 2nd Edition

Saxena, A., Padmanabha, R., and Glover, C.V. (1987). Isolation and sequencing of cDNA clones encoding alpha and beta subunits of *Drosophila melanogaster* casein kinase II. *Mol. Cell. Biol.* **7**: 3409-3417

Scott, E.K., Lee, T., and Luo, L. (2001). *enok* encodes a *Drosophila* putative histone acetyltransferase required for mushroom body neuroblast proliferation. *Curr. Biol.* **11(2)**: 99-104

Shepherd, G.M., and Greer, C.A. (1998). Olfactory bulb. In *The synaptic organization of the brain* (ed. G.M. Shepherd), pp. 159-204. Oxford University Press, Oxford, UK.

Storm, S.M., Cleveland, J.L., and Rapp, U.R. (1990). Expression of raf family proto-oncogenes in normal mouse tissues. *Oncogene* **5**: 345-351

Strauss, R., and Heisenberg, M. (1993) A higher control center of locomotor behavior in the *Drosophila* brain. *J. Neurosci.* **13(5)**: 1852-1861

Strausfeld, N.J., Hansen, L., Li, Y., Gomez, R.S., and Ito, K. (1998). Evolution, discovery, and interpretations of arthropod mushroom bodies. *Learning Memory* **5(1-2)**: 11-37

Technau, G.M., and Heisenberg, M. (1982). Neural reorganization during metamorphosis of the corpora pedunculata in *Drosophila melanogaster*. *Nature* **295(5848)**: 405-407

Technau, G.M. (1984). Fiber number in the mushroom bodies of adult *Drosophila melanogaster* depends on age, sex and experience. *J. Neurogenet.* **1(2)**: 113-126

Tettamanti, M., Armstrong, J.D., Endo, K., Yang, M.Y., Furukubo-Tokunaga, K., Kaiser, K., and Reichert, H. (1997). Early development of the *Drosophila* mushroom bodies, brain centres for associative learning and memory. *Dev. Genes Evol.* **207(4)**: 242 - 252

Truman, J.W. and Bate, M. (1988). Spatial and temporal patterns of neurogenesis in the central nervous system of *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.* **125**: 145-157

Tuazon, P.T., and Traugh, J.A. (1991). Casein kinase I and II – multipotential serine protein kinases: structure, function and regulation. *Adv. Second Messenger Phosphoprot. Res.* **23**: 123-163

Twardzik, T. (1993). Diplomarbeit, Universität Würzburg

Vilk, G., Derksen, D.R., and Litchfield, D.W. (2001). Inducible expression of the regulatory protein kinase CK2 β subunit: incorporation into complexes with catalytic CK2 subunits and reexamination of the effects of CK2 β on cell proliferation. *J. Cell. Biochem.* **84(1)**: 84-99

Xu, X., Toselli, P.A., Russell, L.D., and Seldin, D.C. (1999). Globozoospermia in mice lacking the casein kinase II α' catalytic subunit. *Nat. Genet.* **23**: 118,121

Yang, M.Y., Armstrong, J.D., Vilinsky, I., Strausfeld, N.J., and Kaiser, K. (1995). Subdivision of the *Drosophila* mushroom bodies by enhancer-trap expression patterns. *Neuron* **15(1)**: 45-54

Younossi-Hartenstein, A., Nassif, C., Green, P. and Hartenstein, V. (1996). Early neurogenesis of the *Drosophila* brain. *J. Comp. Neur.* **370** : 313-329

Zar, J.H. (1999). Biostatistical Analysis, Fourth Edition, Prentice Hall International Editions

Zars, T., Wolf, R., Davis, R., and Heisenberg, M. (2000). Tissue-specific expression of a type I adenylyl cyclase rescues the rutabaga mutant memory defect: in search of the engram. *Learning Memory* **7(1)**: 18-31

Zars, T., Fischer, M., Schulz, R., and Heisenberg, M. (2000). Localization of a short-term memory in *Drosophila*. *Science* **288(5466)**: 672-675

Zars, T. (2000). Behavioral functions of the insect mushroom bodies. *Curr. Opin. Neurobiol.* **10(6)**: 790-795

Zhao, Y., Bjorbaek, C., and Moller, D.E. (1996). Regulation and interaction of pp90(rsk) isoforms with mitogen-activated protein kinases. *J. Biol. Chem.* **271(47)**: 29773-29779

Zusammenfassung

Die Pilzkörper von *Drosophila melanogaster* stellen eine für die Lebensfähigkeit dieses Organismus entbehrliche Gehirnstruktur dar. Die Entwicklungsprozesse, die der Bildung dieser zentralnervösen Struktur zugrunde liegen, sind gut erforscht. Die neuronalen Stammzellen, die für die Bildung dieser Gehirnstruktur verantwortlich sind, sind identifiziert und experimentell gut zugänglich. Daher bietet sich die *Drosophila*-Pilzkörperentwicklung als neurogenetisches Modellsystem an, grundlegende Mechanismen der Gehirnentwicklung durch die Untersuchung von Pilzkörperstrukturmutanten zu erforschen.

In dieser Arbeit wurde *mushroom bodies undersized*^{P1} (*mbu*^{P1}) als eine durch Transposon-Insertion in den Casein-Kinase-2 β -Genlocus verursachte, hypomorphe Mutation identifiziert, die zu einer starken Verringerung der Anzahl der die Pilzkörper bildenden intrinsischen Neurone führt. Eine Reversion des *mbu*^{P1}-Pilzkörperphänotyps konnte unter anderem durch die Expression von Casein-Kinase-2 β -(CK2 β)-Transgenen im *mbu*^{P1}-Hintergrund erzielt werden. Durch Rekombination wurde ein fertiler *mbu*^{P1}-Stamm etabliert, der nun die Untersuchung der zellulären *mbu*^{P1}-Defekte ermöglicht. Eine partielle, letale Deletion der CK2 β -Transkriptionseinheit wurde erzeugt. Die Letalität dieser Deletion konnte sowohl durch ein genomisches CK2 β -Transgen als auch durch die ubiquitäre Expression einer CK2 β -cDNA gerettet, und hierdurch die essentielle Funktion der CK2 β -Transkriptionseinheit in *Drosophila* belegt werden. Durch die ubiquitäre Expression von *in vitro*-mutagenisierten CK2 β -cDNAs im CK2 β -Letalhintergrund wurde gezeigt, daß die Phosphorylierung der regulatorischen CK2 β -Untereinheit durch die katalytisch aktive CK2 α -Untereinheit kein lebensnotwendiger Prozess ist. Gleichartige Experimente wurden zur Untersuchung der funktionellen Bedeutung eines CK2 β -Zinkfingermotivs und eines CK2 β -Destruction-Box-Motivs durchgeführt. Diese legen nahe, daß das Zinkfingermotiv im Gegensatz zum Destruction-Box-Motiv für die *in vivo*-Funktion der CK2 β -Untereinheit essentiell ist. Expression der *in vitro*-mutagenisierten CK2 β -cDNAs im *mbu*^{P1}-Hintergrund werden die funktionelle Bedeutung der ausgetauschten Aminosäuren für die Pilzkörperentwicklung zeigen.

Eine letale genetische Interaktion von *mbu*^{P1} mit einer Mutation des *Drosophila*-MAP-Kinase-Gens *rolled* (*rl*^{Sem}) und eine lebensfähige Interaktion von *mbu*^{P1} mit einer Mutation des *Drosophila*-S6-Kinase-p90^{rsk}-Gens *ignorant* (*ign*^{P1}), bei der Flügel- und Augenentwicklungsdefekte zu beobachten sind, wurden gefunden. Es wurde zudem gezeigt, daß *rl*^{Sem} als Suppressor des Pilzkörperphänotyps eines schwächeren *mbu*-Allels wirkt. Hierdurch konnte eine Beteiligung der Casein-Kinase-2 an MAP-Kinase-Signalübertragungswegen wahrscheinlich gemacht werden.

Summary

Mushroom bodies are dispensable for the developing and adult *Drosophila* fly. The developmental processes underlying mushroom body formation are well studied, the neural stem cells responsible for their development are identified and experimentally well accessible. Therefore *Drosophila* mushroom body development can be used as a powerful neurogenetic model system to find out about fundamental mechanisms underlying brain development by studying mutant flies showing aberrant mushroom body development.

In the course of this work, *mushroom bodies undersized*^{P1} (*mbu*^{P1}) was identified as a hypomorphic casein kinase 2 β -allele (CK2 β) caused by the insertion of transposable elements in the casein kinase 2 β gene locus. The *mbu*^{P1}-mutation leads to a drastic reduction of the number of intrinsic neurons forming the adult mushroom body. Expression of transgenic CK2 β in a *mbu*^{P1}-mutant background led to a reversion of the *mbu*^{P1}-associated mushroom body phenotype. Fertility of *mbu*^{P1}-flies could be partially restored by recombining the original *mbu*^{P1{P3843/2}}-chromosome with a *w*¹¹¹⁸-chromosome. This will allow future studies to identify the cellular defects caused by *mbu*^{P1}. A partial deletion of the CK2 β gene causes lethality which could be rescued by either a genomic CK2 β -transgene or by ubiquitous expression of a CK2 β -cDNA. Therefore, CK2 β has been shown to be an essential gene in *Drosophila*. By ubiquitous expression of *in vitro* mutagenized CK2 β -cDNAs in a CK2 β -lethal background, a non-essential role of phosphorylation of the regulatory CK2 β -subunit by the catalytically active CK2 α -subunit could be shown. Similar experiments were performed to examine the role of a CK2 β -zincfinger motif and a CK2 β -destruction-box motif. The obtained results suggest a non-essential *in vivo* function for the destruction-box motif and an essential *in vivo* function for the zincfinger-motif. Expression of the *in vitro* mutagenized CK2 β -cDNAs in a *mbu*^{P1}-background will reveal the functional significance of the substituted amino acids for mushroom body development.

Performed genetic interaction studies showed a lethal interaction of *mbu*^{P1} with a mutation in the *Drosophila*-MAP-kinase gene *rolled* (*rl*^{Sem}) and a viable genetic interaction with a mutation in the *Drosophila*-S6-kinase-p90^{rsk} gene *ignorant* (*ign*^{P1}) which revealed defects in wing formation and eye development. It also could be shown that *rl*^{Sem} acts as a suppressor of the mushroom body phenotype associated with a weaker *mbu*-allele. These observations point towards a role of casein kinase 2 in MAP-kinase signalling.

Danksagung

Am 14.06.1975 erhielt ich zu meinem 6. Geburtstag das Buch „Insekten auf Feld und Wiese in Farben – Über 600 Schmetterlinge, Käfer und andere Kleintiere“. Zum 7. hielten die Säugetiere, Lurche und Kriechtiere ihren Einzug – natürlich auch in Farbe! Es folgten noch viele mehr ... bis ich 1984 im Abuko Nationalpark in Gambia meinen ersten Spaziergang mit der jungen Gorilladame Julia machen durfte und meine Freizeit in den vielen Monaten danach im photohide verbrachte. Eine stete Begleiterin war ab 1978 die Zeitschrift „Sielmanns Tierwelt“ ... ob mich all dies geprägt hat, weiß ich nicht, jedoch sei meinen Eltern dafür gedankt, daß sie mir all diese Wunder zugänglich gemacht haben.

Den ersten „echten“ Biologen durfte ich bereits während meiner Schulzeit kennenlernen. Pater Agnellus Schneider - unser Vogelpater - ist wohl dafür verantwortlich zu machen, daß ich heute noch einen Vogeltick habe; ihm sei daher diese Doktorarbeit gewidmet. Dr. Snow indes wies mich in die Kunst des Moskito- und Tsetsefliegenfangs ein; auch ihm sei hierfür gedankt.

Mohammed Ali Missaoui, Raphael Hitier und Senad Joguncic waren mir dagegen Freunde und Begleiter unter der Sonne Afrikas ... ihnen verdanke ich die Sichtung meines ersten Wiedehopfs, der ersten Braunen Hyäne, des ersten Klippschliefers, die Wanderungen im Atlasgebirge und den Besuch der Naturvölker Südäthiopiens.

Genet Hampl und Banjugu Jawara schließlich halfen mir, ein Stück des schwarzen Kontinents in Deutschland zu bewahren. Danke!

Prof. Dr. Heisenberg und Thomas Raabe haben mich nicht nur wissenschaftlich angeleitet, sondern mir auch in schwierigen Zeiten weit über die Biologie hinaus geholfen. Vielen Dank.

Ohne Susanne hingegen wären viele kleinere Fliegenprobleme schwieriger zu lösen gewesen und manches Lachen nicht gefallen. Antonio weihte mich in den Umgang mit Computern ein ... auch das ein kleines Heldenstück! Bertram und André entpuppten sich als katalytisch wirksame Statistikberater, während Danni nun einmal eine spitzenmäßige Laborkollegin war (und ist), da kann man nichts ändern :) Ohne Matze und Bone wäre das fränkische Element zu kurz gekommen; und ohne Heike so manches Protein noch in der Fliege! Dank Euch allen – und dem Rest der Genetik, der sich hier namentlich nicht wiederfindet. Halt! Dieter ... Dir sei ganz besonders gedankt ... Du weißt ja, ohne Kaffee, Milch und Zucker taug' ich nix!

Und meiner lieben Mandy gilt Dank für vieles, was den Rest der Menschheit aber einfach nichts angeht - sorry!

Widmung

Diese Arbeit widme ich meiner lieben Mandy und Pater Agnellus Schneider. Ihm zur Ehre ein Auszug aus dem ersten Buch des Mose:

„Die Erschaffung der Welt:

Im Anfang schuf Gott Himmel und Erde; die Erde aber war wüst und wirr, Finsternis lag über der Urflut, und Gottes Geist schwebte über dem Wasser.

Gott sprach: Es werde Licht. Und es wurde Licht. Gott sah, daß das Licht gut war. Gott schied das Licht von der Finsternis, und Gott nannte das Licht Tag, und die Finsternis nannte er Nacht. Es wurde Abend, und es wurde Morgen: erster Tag.

Dann sprach Gott: Ein Gewölbe entstehe mitten im Wasser und scheide Wasser von Wasser. Gott machte also das Gewölbe und schied das Wasser unterhalb des Gewölbes vom Wasser oberhalb des Gewölbes. So geschah es, und Gott nannte das Gewölbe Himmel. Es wurde Abend, und es wurde Morgen: zweiter Tag.

Dann sprach Gott: Das Wasser unterhalb des Himmels sammle sich an einem Ort, damit das Trockene sichtbar werde. So geschah es. Das Trockene nannte Gott Land, und das angesammelte Wasser nannte er Meer. Gott sah, daß es gut war. Dann sprach Gott: Das Land lasse junges Grün wachsen, alle Arten von Pflanzen, die Samen tragen, und von Bäumen, die auf der Erde Früchte bringen mit ihrem Samen darin. So geschah es. Das Land brachte junges Grün hervor, alle Arten von Pflanzen, die Samen tragen, alle Arten von Bäumen, die Früchte bringen mit ihrem Samen darin. Gott sah, daß es gut war. Es wurde Abend, und es wurde Morgen: dritter Tag.

Dann sprach Gott: Lichter sollen am Himmelsgewölbe sein, um Tag und Nacht zu scheiden. Sie sollen Zeichen sein und zur Bestimmung von Festzeiten, von Tagen und Jahren dienen; sie sollen Lichter am Himmelsgewölbe sein, die über die Erde hin leuchten. So geschah es. Gott machte die beiden großen Lichter, das größere, das über den Tag herrscht, das kleinere, das über die Nacht herrscht, auch die Sterne. Gott setzte die Lichter an das Himmelsgewölbe, damit sie über die Erde hin leuchten, über Tag und Nacht herrschen und das Licht von der Finsternis scheiden. Gott sah, daß es gut war. Es wurde Abend, und es wurde Morgen: vierter Tag.

Dann sprach Gott: Das Wasser wimmle von lebendigen Wesen, und Vögel sollen über dem Land am Himmelsgewölbe dahinfliegen. Gott schuf alle Arten von großen Seetieren und anderen Lebewesen, von denen das Wasser wimmelt, und alle Arten von gefiederten Vögeln. Gott sah, daß es gut war. Gott segnete sie und sprach: Seid fruchtbar, und vermehrt euch, und

bevölkert das Wasser im Meer, und die Vögel sollen sich auf dem Land vermehren. Es wurde Abend, und es wurde Morgen: fünfter Tag.

Dann sprach Gott: Das Land bringe alle Arten von lebendigen Wesen hervor, von Vieh, von Kriechtieren und von Tieren des Feldes. So geschah es. Gott machte alle Arten von Tieren des Feldes, alle Arten von Vieh und alle Arten von Kriechtieren auf dem Erdboden. Gott sah, daß es gut war. Dann sprach Gott: Laßt uns Menschen machen als unser Abbild, uns ähnlich. Sie sollen herrschen über die Fische des Meeres, über die Vögel des Himmels, über das Vieh, über die ganze Erde und über alle Kriechtiere auf dem Land. Gott schuf also den Menschen als sein Abbild; als Abbild Gottes schuf er ihn. Als Mann und Frau schuf er sie. Gott segnete sie, und Gott sprach zu ihnen: Seid fruchtbar, und vermehrt euch, bevölkert die Erde, unterwerft sie euch, und herrscht über die Fische des Meeres, über die Vögel des Himmels und über alle Tiere, die sich auf dem Land regen. Dann sprach Gott: Hiermit übergebe ich euch alle Pflanzen auf der ganzen Erde, die Samen tragen, und alle Bäume mit samenhaltigen Früchten. Euch sollen sie zur Nahrung dienen. Allen Tieren des Feldes, allen Vögeln des Himmels und allem, was sich auf der Erde regt, was Lebensatem in sich hat, gebe ich alle grünen Pflanzen zur Nahrung. So geschah es. Gott sah alles an, was er gemacht hatte: Es war sehr gut. Es wurde Abend, und es wurde Morgen: der sechste Tag.

So wurden Himmel und Erde vollendet und ihr ganzes Gefüge. Am siebten Tag vollendete Gott das Werk, das er geschaffen hatte, und er ruhte am siebten Tag, nachdem er sein ganzes Werk vollbracht hatte. Und Gott segnete den siebten Tag und erklärte ihn für heilig; denn an ihm ruhte Gott, nachdem er das ganze Werk der Schöpfung vollendet hatte.

Das ist die Entstehungsgeschichte von Himmel und Erde, als sie erschaffen wurden.“

Genesis 1,1-2,4a

Lebenslauf

Kibler, Eike Mathias Uno

Diplom-Biologe Univ.

* 14. 06. 1969 in Geislingen an der Steige

deutsch

ledig

- 1976 Einschulung in die Grundschule Döchtbühl – Bad Waldsee
- 1990 Allgemeine Hochschulreife am Salvatorkolleg Bad Wurzach;
Durchschnittsnote "eins.sieben"
- 1990 –
1997 Studium der Biologie an der Bayerischen Julius-Maximilians-
Universität Würzburg
- 1993 Diplom-Vorprüfung
- 1996 Mündliche Diplom-Abschlußprüfungen
Hauptfach: Genetik
Nebenfächer: Biochemie und Pflanzenphysiologie
- 1996 Diplomarbeit am Theodor-Boveri-Institut für Biowissenschaften /
Lehrstuhl für Genetik

Betreuer: Prof. Dr. M. Heisenberg / Dr. T. Raabe

Thema: „Molekulare Analyse des "*mushroom body defect*"-Genlokus
von *Drosophila melanogaster*“
- 1997 Abschluß als Diplom-Biologe Univ.; Gesamtnote "sehr gut"
- 1997-
2002 Promotion (Dr. rer. nat.) am Theodor-Boveri-Institut für
Biowissenschaften / Lehrstuhl für Genetik und Neurobiologie

Betreuer: Prof. Dr. M. Heisenberg / Prof. Dr. T. Raabe

Thema: „Casein-Kinase-2 β und neuronale Entwicklungsprozesse –
Untersuchungen am neurogenetischen Modellorganismus *Drosophila*
melanogaster“

Publikationsliste

Abstracts

Melzig, J., Prado, A., Kibler, E., Heisenberg, M. (1997). Genetic and molecular characterization of the *Drosophila mushroom body defect* gene. *Doe, Hall, 1997*: 126

Prado, A., Kibler, E., Blattner, D., Rein, K.-H., Heisenberg, M., Raabe, T. (1999). Molecular and genetic analysis of adult brain development of *Drosophila melanogaster*. *Europ. Dros. Res. Conf. 16*: 75

Kibler, E., Melzig, J., Heisenberg, M., Raabe, T. (2001). The X-chromosomal mutation *mbu* affects mushroom body development. *Bellen, Taylor, 2001*: 190

Akten, B., Kibler, E., Raabe, T., Jackson, F.R. (2002). Molecular and behavioural characterization of the *Drosophila* circadian clock mutant *andante*. *9th European Symposium on Drosophila Neurobiology, Dijon, France 2002* (submitted)

Publikationen

Feller, S.M., Wecklein, H., Lewitzky, M., Kibler, E., Raabe, T. (2002). SH3 domain-mediated binding of the Drk protein to Dos is an essential step in signaling of *Drosophila* receptor tyrosine kinases. *Mech. Dev.* (under revision)

Kibler, E., Melzig, J., Brkulj, M., Heisenberg, M., Raabe, T. (2002). Functional analysis of protein kinase CK2 β subunit during neural development in *Drosophila melanogaster*. (in preparation)

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Eike Mathias U. Kibler, daß ich diese Dissertation selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Weiterhin erkläre ich, daß die vorliegende Arbeit noch in keinem anderen Prüfungsverfahren in gleicher oder ähnliche Form vorgelegen hat.

Außer dem in meinem Zulassungsgesuch urkundlich belegten akademischen Grad habe ich keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, den

.....

Eike Mathias U. Kibler