

Funktionelle Charakterisierung von Daughter of Sevenless ein Adaptorprotein der Sevenless Signaltransduktions Kaskade

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

vorgelegt von
Burkhard Bausenwein
aus Würzburg

Würzburg 2000

Eingereicht am: 22. Februar 2000

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. Werner Göbel

Gutachter: Prof. Dr. Erich Buchner

Gutachter: Prof. Dr. Georg Krohne

Tag des Promotionskolloquiums: 26. Juli 2000

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	4
1.1 Augenentwicklung bei <i>Drosophila melanogaster</i>	4
1.2 Sevenless Signaltransduktion	5
1.3 Proteinmodule bei der Signaltransduktion	7
1.4 Dos, ein Multi-Adaptor-Protein	8
1.5 Problemstellung	12
2 Material und Methoden	13
2.1 Bakterien	13
2.2 Plasmide	13
2.3 Primer	13
2.4 Zelllinien	14
2.5 Fliegenstämme	14
2.6 Enzyme	15
2.7 Antikörper	16
2.8 Chemikalien	16
2.9 Kits	16
2.10 Geräte	16
2.11 Computerprogramme und Datenbanken	17
2.12 Standardmethoden	17
2.13 DNA Methoden	17
2.13.1 Präparation und Reinigung von Plasmid DNA	17
2.13.2 Isolierung genomischer DNA aus <i>Drosophila</i> Larven	17
2.13.3 DNA Mutagenese	17
2.13.4 DNA Sequenzierung	18
2.14 Proteinmethoden	18
2.14.1 ELISA	18
2.14.2 Westernblot	18
2.14.3 Immunpräzipitation	19
2.14.4 SDS-Gelladepuffer	19
2.15 Methoden zur Antikörpergewinnung	19
2.15.1 Fusion von Maus-Milz- mit Myeloma-Zellen	19
2.15.2 Subklonierung der Hybridomazellen	20
2.16 Keimbahntransformation	20
2.17 Fliegenzucht	20
2.18 Fliegenkreuzungen	21
2.19 Antikörperfärbung von Augenimaginalscheiben und Embryonen	21
2.20 Histologie	22
2.21 Epon Einbettmedium	22

2.22 Mikroskopie	22
3 Ergebnisse	23
3.1 Herstellung eines Antikörpers gegen das Dos Protein	23
3.2 Darstellung des Dos Proteins	24
3.3 Sequenzierung des <i>dos</i> ^{R31} Allels	28
3.4 <i>in vitro</i> Mutagenese von SH2-Domänen Bindungsstellen	31
3.5 Letalitätsassay der <i>sE/hsp-dos</i> Konstrukte	34
3.6 <i>sev</i> ^{S11} -Assay	37
3.7 Etablierung von genomischen <i>dos</i> Rescue Konstrukten	41
3.7.1 Konstrukte mit endogenem Enhancer/Promotor	42
3.7.2 Expression von <i>P[y⁺, genE-dos-GFP]</i> in Augenheiminalscheiben	45
3.7.3 Letalitätsassay der <i>genE-dos</i> Konstrukte	46
3.8 Etablierung eines <i>in vivo</i> Testsystems zur funktionellen Untersuchung der <i>genE-dos</i> Konstrukte	48
3.9 Immunpräzipitation von Csw als potentiellen Interaktionspartner von Dos	51
4 Diskussion	53
4.1 Ergebnisse zum Dos Protein	53
4.2 Molekulare Charakterisierung von <i>dos</i> ^{R31}	55
4.3 Das <i>genE-dos</i> Minigen als Voraussetzung für ein <i>in vivo</i> Testsystem	56
4.4 Dos - ein Multi-Adaptor-Protein?	58
4.5 Ausblick	61
5 Zusammenfassung	63
6 Conclusion	65
7 Literatur	67
8 Anhang	73
8.1 <i>dos</i> -cDNA Sequenz	73
8.2 Dos-Aminosäuresequenz	74
8.3 GFP-Sequenz	75
8.4 Hybridomaklone in Stickstoff	75
8.5 Hergestellte Transgene Fliegen	76
9 Curriculum Vitae	78
10 Publikationen	79
Danke sagen...	80
Erklärung	81

1 Einleitung

Jeder vielzellige Organismus entwickelt sich aus einer einzigen Eizelle. Im Laufe der Entwicklung müssen viele Prozesse kontrolliert ablaufen, um schließlich einen funktionierenden, komplexen Organismus entstehen zu lassen. Nicht nur Zellteilung, sondern auch Prozesse wie Determination und Differenzierung sind wichtig, damit die unterschiedlichen Zelltypen eines Lebewesens mit ihren unterschiedlichen Funktionen entstehen können.

Das Schicksal einer Zelle kann prinzipiell auf zwei Arten festgelegt werden: erstens durch ihre Herkunft, zweitens durch Zell-Zell Kommunikation und das Einwirken von diffusiblen Molekülen. In jedem Fall ist eine genaue Koordination der einzelnen Prozesse notwendig. Da bei den meisten Organismen die Zellen zunächst pluripotent sind, d.h. sie können sich zu jeder beliebigen Zelle entwickeln, ist für ihre Spezialisierung differentielle Genexpression von großer Bedeutung. Jede einzelne Zelle in einem Zellverband erhält so ihr bestimmtes Schicksal und eine spezifische Aufgabe.

Wie empfängt eine Zelle Signale von ihrer Umwelt, mit der sie in Kontakt steht, und wie werden diese Informationen in den Zellkern weitergeleitet und umgesetzt? Zur Untersuchung und zum Verständnis dieser komplexen Vorgänge benötigt man geeignete Modellsysteme.

Ein gut verstandenes Modellsystem ist die Entwicklung des Komplexauges von *Drosophila melanogaster*.

1.1 Augenentwicklung bei *Drosophila melanogaster*

Das Komplexauge von *Drosophila* besteht aus ca. 800 Ommatidien, die vollkommen identisch aufgebaut sind. Jedes Ommatidium besteht aus acht Photorezeptorzellen, die sich in sechs äußere (R1 bis R6) und zwei innere (R7, R8) aufteilen, und aus einer Anzahl von akzessorischen Zellen (4 Kegelzellen, 2 primäre, 6 sekundäre und 3 tertiäre Pigmentzellen) (Ready et al., 1976; Tomlinson and Ready, 1987; Wolff and Ready, 1991).

Die Zellcluster der zukünftigen Ommatidien entwickeln sich in der larvalen Augenimaginalscheibe, einem einschichtigen Epithel aus undifferenzierten Zellen. Ausgehend von klonalen Analysen wurde ein Modell über die Festlegung von Zellschicksalen während der Augenentwicklung abgeleitet. Man nimmt an, daß das Zellschicksal jeweils durch spezifische Zell-Zell Kontakte festgelegt wird. Für jede Zelle gibt es ein spezifisches Muster dieser Kontakte, welches ihr Entwicklungsschicksal bestimmt (Ready et al., 1976).

In der morphogenetischen Furche, die im dritten Larvenstadium von posterior nach anterior über die Imaginalscheibe wandert, beginnt die schrittweise Differenzierung der ommatidialen Zellen. Zunächst wird ein Präcluster aus fünf Photorezeptorzellen gebildet. Die R8 Zelle wird als erste determiniert, die äußeren Photorezeptorzellen folgen jeweils paarweise und in festgelegter Reihenfolge. R2/R5 und dann R3/R4 werden am posterioren Ende der morphogenetischen Furche rekrutiert. Posterior der Furche erfolgt eine letzte Mitose der noch undifferenzierten Zellen des Augenscheibenepithels. Dann werden die noch fehlenden drei Photorezeptorzellen, R1/R6 und schließlich R7 zu neuronalen Zellen determiniert und dem

Cluster zugefügt. Zuletzt werden die vier Kegelzellen, welche die Linse sekretieren, rekrutiert (Dickson and Hafen, 1993; Ready, 1989). Beim Übergang in das Pupalstadium werden jedem Cluster die noch fehlenden Pigmentzellen zugefügt. Sie bilden den Abschluß der ommatidialen Entwicklung und sorgen im späteren Komplexauge für die optische Isolierung der Einzelaugen. Die übriggebliebenen, undifferenzierten Zellen werden durch Apoptose entfernt und das Komplexauge erhält seine charakteristische, regelmäßige Form (Wolff and Ready, 1991).

Die Determinierung der Zellen bei dieser schrittweisen Rekrutierung erfolgt wahrscheinlich über Zell-Zell Kontakte. Bei diesem Modell werden undifferenzierte Zellen durch schon differenzierte Zellen induziert. Am besten ist die Determination der R7 Zelle durch die benachbarte R8 Zelle untersucht. Die R7 Zelle hat nur zwei Möglichkeiten für ihr Entwicklungsschicksal: sie wird zu einer neuronalen Zelle, wenn sie ein induktives Signal von der R8 Zelle erhält, oder zu einer Kegelzelle, wenn dieses Signal fehlt oder der Rezeptor das Signal nicht weiterleiten kann (Cagan et al., 1992; Reinke and Zipursky, 1988; Tomlinson and Ready, 1986; Wolff and Ready, 1993). Da hierbei nur zwei Zellen notwendig sind, eignet sich das Studium der R7-Zell Determination sehr gut für *in vivo* Untersuchungen der Signalwege, die hierfür verantwortlich sind. Durch viele Screens nach Mutationen die dieses System betreffen, konnte eine Vielzahl von Genen, die an dieser Signaltransduktion beteiligt sind, isoliert und ein Modell für die ablaufende Signaltransduktion erstellt werden (Basler et al., 1991; Dickson et al., 1996; Karim et al., 1996; Olivier et al., 1993; Simon et al., 1991).

1.2 Sevenless Signaltransduktion

Die Spezifizierung der R7 Zelle erfolgt durch die Sevenless (Sev) Rezeptor-Tyrosin-Kinase (RTK) vermittelte Signaltransduktion. Die Sev RTK wird in den Vorläuferzellen der R3/R4 und R7 Photorezeptorzellen, der Kegelzellen und der „mystery cells“ exprimiert (Tomlinson and Ready, 1987). Im Wildtyp wird der Sev Rezeptor in der R7 Zelle durch die Bindung von Bride of Sevenless (BOSS), dem in der benachbarten R8 Zelle exprimierten Liganden, aktiviert. Die Interaktion hat keinen Einfluß auf die Determinierung der R3/R4 Zellen, obwohl sie ebenfalls Kontakt zur R8 Zelle haben, da sie schon vorher zu äußeren Photorezeptorzellen determiniert wurden. Der Aktivierung des Sev Rezeptors folgt seine Dimerisierung und Autophosphorylierung. Über seine SRC homology 2 Domäne (SH2-Domäne) kann nun das Adaptorprotein Drk (Downstream of Receptor tyrosine kinase) an Phosphotyrosin 2546 in der cytoplasmatischen Domäne von Sev gebunden werden. Die SRC homology 3 Domänen (SH3-Domänen) am N-terminalen und C-terminalen Ende des Drk Proteins ermöglichen die Bindung des Guanin Nukleotid Austauschfaktors Son of Sevenless (SOS). SOS wird so an die Zellmembran gebracht und allosterisch aktiviert. Da sich SOS nun in unmittelbarer Nähe von Ras1 befindet kann es den Austausch von Ras1-gebundenem GDP nach GTP katalysieren und dadurch Ras1 aktivieren. Nun wird das Signal über die Serin-Threonin-Kinase Raf durch Phosphorylierung auf die Dsor1 MAPKK (mitogen activated protein kinase kinase) übertragen. Dsor1 ist eine dualspezifische, cytoplasmatische Kinase, die sowohl Threonin als

auch Tyrosin phosphorylieren kann. Sie gibt das Signal an die Rolled/MAPK (R1 mitogen activated kinase), eine cytoplasmatische Serin-Threonin Kinase, weiter. Nach der Aktivierung von R1/MAPK kann diese in den Zellkern wandern und durch Phosphorylierung die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren regulieren, die eine spezifische Genexpression einleiten und somit das neuronale Schicksal der R7 Zelle festlegen (Raabe, 1998; Simon, 1994; Zipursky and Rubin, 1994).

Die Signaltransduktion von RTK's über die sogenannte Ras/Raf/MAPK-Kassette stellt einen evolutiv hochkonservierten Prozeß dar (Marshall, 1994; McCormick, 1994), der bei *Drosophila* auch die Signaltransduktion der RTK's Torso und DER betrifft (Dickson and Hafen, 1994; Perrimon, 1993).

Lange hat man die Sevenless RTK vermittelte Signaltransduktion als linearen Prozeß betrachtet. In Vertebraten gibt es schon länger Hinweise darauf, daß bei der RTK-vermittelten Signaltransduktion viele verschiedene Komponenten ein komplexes Netzwerk aus Protein-Protein Interaktionen bilden (Kazlauskas, 1994; Pawson, 1995). Inzwischen existieren jedoch mehrere Hinweise darauf, daß auch bei *Drosophila* die Signaltransduktion aus einem Netz von möglichen Wegen besteht. Bei der Torso RTK vermittelten Signaltransduktion in Embryonen verursachen „loss of function“ Mutationen in *drk*, *Sos* und *Ras1* einen schwächeren Phänotyp, als Mutationen in *torso* und *raf*. Dies deutet auf eine alternative Signalübertragung von Torso zu Raf hin, die unabhängig von Ras1 funktioniert (Hou et al., 1995). Der Austausch einer Aminosäure Y2546 in einem konstitutiv aktivem Sev Rezeptor (Torso^{4021-sev}^{Y2546F}) verhindert die Bindung des Adaptorproteins Drk an den aktivierten Rezeptor. Dennoch kann durch diesen mutierten Sev Rezeptor die Entwicklung einer R7 Zelle induziert werden, wenngleich mit geringerer Häufigkeit gegenüber der nicht mutierten Version. Daraus wurde geschlossen, daß es neben der Signalübertragung über Drk noch mindestens eine weitere, von dieser Interaktion unabhängige Möglichkeit geben muß, den Ras/Raf/MAPK Signalweg zu aktivieren (Raabe et al., 1995; Raabe et al., 1996). Einen weiteren Hinweis auf einen nicht linearen Ablauf der Signaltransduktion lieferte die Tyrosin Phosphatase Corkscrew (Csw), die als Regulator sowohl ober- als auch unterhalb von Raf in der Sev und Torso vermittelten Signaltransduktion wirkt und die Signalübertragung durch ihre Phosphataseaktivität positiv beeinflusst (Allard et al., 1996; Perkins et al., 1992).

Das Bild von einer linearen Signaltransduktion muß also korrigiert werden. Offensichtlich gibt es Alternativwege, die in der Lage sind fehlende Proteinfunktion zu kompensieren oder eine Querverbindung zwischen verschiedenen Wegen der Signaltransduktion zu schaffen. Eine wichtige Rolle spielen hierbei Mitglieder aus der Familie der Multi-Adaptor-Proteine. Bei Vertebraten konnte durch die Isolierung der Proteine IRS1 und IRS2, Gab1 und Gab2 gezeigt werden, daß sie eine Rolle als zentrale Schaltstelle bei der Signaltransduktion verschiedener RTK's spielen, indem sie als Andockstelle für verschiedene SH2-Domänen Proteine fungieren (Gu et al., 1998; Holgado-Madruga et al., 1996; Ingham et al., 1998; Lehr et al., 1999; Sun et al., 1993; Sun et al., 1995). Die funktionelle Charakterisierung solcher Multi-Adaptor-Proteine in *Drosophila* kann zum weiteren Verständnis des komplexen Vorgangs der Signaltransduktion beitragen.

1.3 Proteinmodule bei der Signaltransduktion

Die Signaltransduktion stellt ein komplexes Netzwerk von vielen verschiedenen Protein-Protein Interaktionen dar. Um diese zu vermitteln, werden bestimmte, hochkonservierte Proteinstrukturen, sogenannte Proteindomänen verwendet. In einem Protein können nebeneinander viele verschiedene solcher Module für die Interaktion mit Bindungspartnern vorhanden sein und Module, die für die katalytische Aktivität notwendig sind. Wichtige Vertreter zur Vermittlung von Interaktionen sind SH2- und SH3-Domänen, sowie Pleckstrin homology Domänen (PH-Domänen).

PH-Domänen haben eine Größe von ungefähr 120 Aminosäuren. Sie besitzen keine einheitliche Primärstruktur, jedoch ist ihre Tertiärstruktur hochkonserviert: PH-Domänen bestehen aus zwei antiparallelen β -Faltblattstrukturen, die durch drei bzw. vier Peptidstränge, verbunden durch variable Loops, gebildet werden. Am C-terminalen Ende findet man immer eine amphipatische α -Helix, die ein konserviertes Tryptophan enthält, welches für Struktur und Stabilität der gesamten PH-Domäne wichtig ist (Lemmon et al., 1996; Shaw, 1996; Touhara et al., 1995). PH-Domänen können Phospholipide wie PtdIns(3,4)P₂ und PtdIns(3,4,5)P₃ binden und auf diese Weise mit der Zellmembran verankert werden. Phospholipide, als Produkte der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3Kinase), sind daher für die Membranlokalisierung von PH-Domänen Proteinen verantwortlich (Isakoff et al., 1998; Lemmon et al., 1996).

SH3-Domänen bestehen aus ungefähr 55 Aminosäuren, die eine β -Faltblattstruktur ausbilden, und binden an prolinreiche Sequenzabschnitte. Die Konsensus Sequenz der Zielpeptide (X-P-p-X-P) setzt sich aus zwei invarianten Prolinresten (P), zwei aliphatischen Aminosäuren (X) und meist einem weiteren Prolin (p) in Mittelstellung zusammen. SH3-Domänen können in beiden Orientierungen, N-C-terminal und C-N-terminal daran binden, wobei für die Spezifität der Bindung die benachbarten Sequenzabschnitte von Bedeutung sind (Feng et al., 1994; Pawson, 1995; Ren et al., 1993).

SH2-Domänen dienen zur Bindung an Phosphotyrosin im Zielprotein. Diese wird durch die Ausbildung einer hochkonservierten Bindungstasche, die von basischen Aminosäuren flankiert ist, vermittelt. In dieser Tasche ermöglicht ein konserviertes Arginin über Wasserstoffbrücken die Bindung an Phosphotyrosin. Von einem variablen Bereich neben dieser Tasche werden die benachbarten C-terminalen Aminosäuren des Tyrosins, die für die Spezifität der Bindung verantwortlich sind, erkannt (Songyang et al., 1993; Songyang et al., 1994). Die Interaktion von SH2-Domänen mit Phosphotyrosinen führt zur Aktivierung von katalytische Zentren in den SH2-Domänen Proteinen und/oder zur Veränderung ihrer Lokalisation innerhalb der Zelle (Cohen et al., 1995; Pawson, 1995). Die hohe Spezifität dieser Interaktionen und die Möglichkeit, durch gezielte Mutation das für die Bindung unverzichtbare Tyrosin zu entfernen, ermöglichen die Untersuchung von funktionellen Zusammenhängen der SH2-Domänen vermittelten Proteininteraktion bei der Signaltransduktion.

1.4 Dos, ein Multi-Adaptor-Protein

Das *daughter of sevenless* (*dos*) Gen wurde als Suppressor des rauhe Augen Phänotyps von konstitutiv aktiviertem *Sev*^{S11} (Basler et al., 1991) in einem Screen nach Modifikatoren dieses Phänotyps gefunden (Raabe et al., 1996). Eine konstitutiv aktivierte Form der Sev RTK (*Sev*^{S11}), unter der Kontrolle des *sevenless* Enhancers (sE), führt bei der Augenentwicklung zur Rekrutierung von zusätzlichen R7 Zellen aus Kegelvorgängerzellen. Das Auftreten von multiplen R7 Zellen in den Ommatidien führt zu einer rauhen Oberfläche des adulten Fliegenauges, wobei die Stärke des Phänotyps, also die Anzahl zusätzlicher R7 Photorezeptoren, durch die Gendosis des *sE-sev*^{S11} Transgens und durch die Veränderung der Gendosis von downstream Komponenten der Sev Signaltransduktions Kaskade moduliert werden kann (Basler et al., 1991). Dies ermöglichte das Erkennen von Mutationen in diesen Komponenten bereits in heterozygotem Zustand.

Um neue Komponente der Sev Signaltransduktions Kaskade zu finden, wurde sowohl eine P-Element als auch eine EMS (Ethylmethansulfonat) Mutagenese durchgeführt und im *Sev*^{S11} Hintergrund nach Modifikationen des Augenphänotyps gescreent. Außer Mutationen in bisher schon bekannten Komponenten der Kaskade wie Drk, SOS und Ras1 wurden zwei neue Allele, *dos*^{R31} und *dos*^{P115}, einer letalen Komplementationsgruppe gefunden, die den rauhe Augen Phänotyp supprimieren. Beide Allele sind homozygot letal im dritten Larvenstadium (Raabe et al., 1996). Der rauhe Augen Phänotyp von konstitutiv aktiven Formen der Signaltransduktions Komponenten Ras1^{V12} (Fortini et al., 1992) und Raf^{tor4021} (Dickson et al., 1992), unter der Kontrolle der *sevenless* Enhancer Sequenz, wurde durch *dos*^{R31} und *dos*^{P115} nicht unterdrückt. Dos wirkt unterhalb des Sev Rezeptors aber oberhalb oder parallel zu Ras1 und Raf (Raabe et al., 1996).

Anhand der P-Element Insertion in *dos*^{P115} konnte die *dos* Region in 62F auf den linken Arm des dritten Chromosoms kartiert werden. Das P-Element in der *dos*^{P115} Mutante inseriert im ersten großen Intron, weshalb gefolgert wurde, daß es sich um ein Nullallel handelt (Raabe et al., 1996).

Mit einer genomischen Probe aus diesem Bereich konnte aus embryonalen und larvalen cDNA Bibliotheken eine 3184 bp cDNA isoliert werden, was der Größe der Transkripte entsprach, die in frühen Entwicklungsstadien (Embryo bis in frühe Puppe) auf Northern Blots detektiert wurden (Raabe et al., 1996). Die genomische *dos* Organisation, sowie die Exon-Intron Struktur und die Insertion des P-Elements von *dos*^{P115} sind in Abbildung 1.1 A dargestellt. Der Pfeil am 5' Strich Ende von *dos* markiert den Beginn der Transkriptionseinheit eines benachbarten ribosomalen Gens.

Die klonierte cDNA wurde als *sE/hsp-dos* (duplizierte *sevenless* Enhancer Sequenz und *hsp70* Hitzeschockpromotor) Transgen in Fliegen transformiert und durch Hitzeschock exprimiert. Die Expression einer Kopie des Transgens war ausreichend um die Letalität der *dos*^{R31} und *dos*^{P115} Allele zu retten. Dies belegte, daß die Mutationen Allele des gefundenen Gens sind und daß die Suppression des rauhe Augen Phänotyps durch die Mutationen hervorgerufen wird.

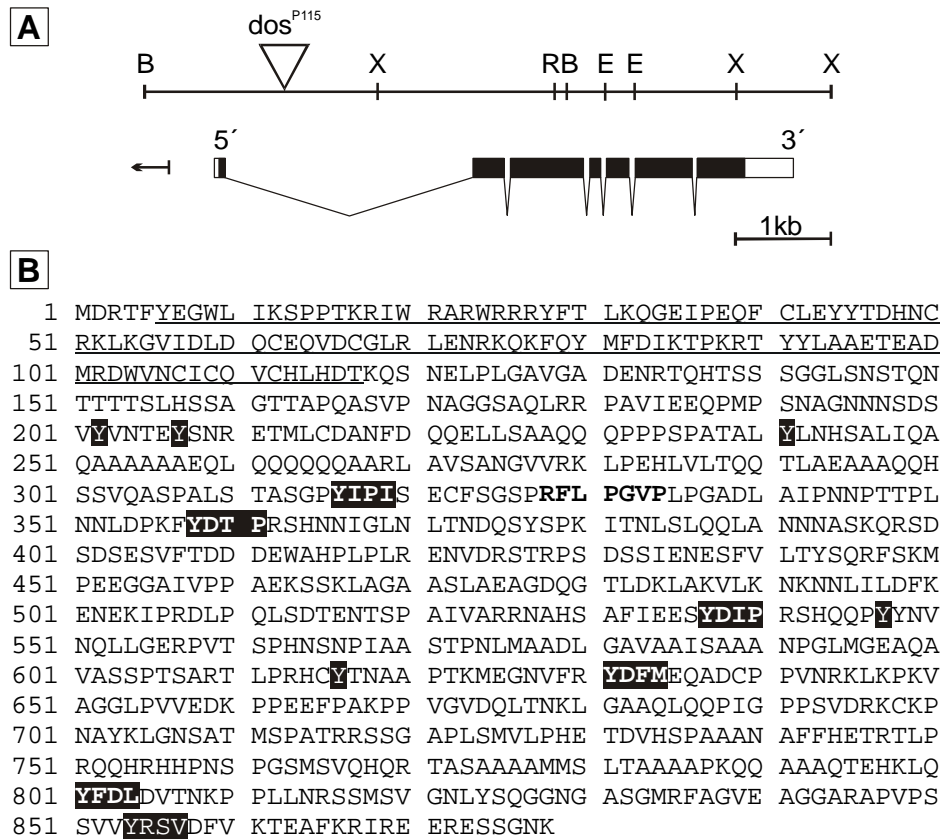


Abbildung 1.1.: Molekulare Charakterisierung des *dos* Gens. (A) Karte der genomischen *dos* Region. Die P-Element Insertion im ersten Intron von *dos*^{P115} ist eingezeichnet. Folgende Restriktionsschnittstellen sind markiert: *Bam*HI (B), *Eco*RI (E) und *Xho*I (X). Darunter ist die cDNA eingezeichnet. Schwarze Balken kennzeichnen den translatierten Bereich. (B) Aminosäuresequenz des Dos Proteins. Die Sequenz der PH-Domäne ist unterstrichen. Tyrosine in Konsensus Sequenzen zur Bindung von SH2-Domänen sind hervorgehoben (die in dieser Arbeit untersuchten, sind zusätzlich fett), und die Konsensus Sequenz zur Bindung von SH3-Domänen ist fett gedruckt.

Die Sequenzierung der cDNA ergab ein offenes Leseraster von 2634 bp, was einem Protein von 878 Aminosäuren entspricht (Abb.: 1.1. B). Die Analyse der Aminosäuresequenz ergab eine N-terminale PH-Domäne (Haslam et al., 1993; Mayer et al., 1993; Musacchio et al., 1993), ein RxxPxxP Motiv als mögliche Bindungsstelle von SH3-Domänen und eine größere Zahl von Tyrosinresten in potentiellen Bindungsstellen für SH2-Domänen Proteine (Pawson, 1995; Songyang et al., 1993; Songyang et al., 1994). Die Abbildung 1.2 zeigt eine schematische Darstellung des Dos Proteins mit seinen potentiellen Bindungsstellen.

Aufgrund der Konsensussequenzen wurden fünf SH2-Domänen Bindungsstellen für das Adaptorprotein Drk, zwei für die beiden PhospholipaseC- γ (PLC γ) SH2-Domänen und je eine SH2-Domänen Bindungsstelle für die regulatorische Untereinheit der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3Kinase), das SH2/SH3 Adaptorprotein Shc, und die Phosphotyrosin Phosphatase Corkscrew (Csw) vorhergesagt (Raabe et al., 1996). Zur Bindung von Csw SH2-Domänen konnte eine weitere Konsensussequenz, die eine zweite potentielle Bindungsstelle für Csw darstellt, gefunden werden (Huyer and Alexander, 1999). Bisher konnte nur eine einzige der

vorhergesagten Interaktionen, namentlich von Dos und Csw, experimentell nachgewiesen werden (Herbst et al., 1996).

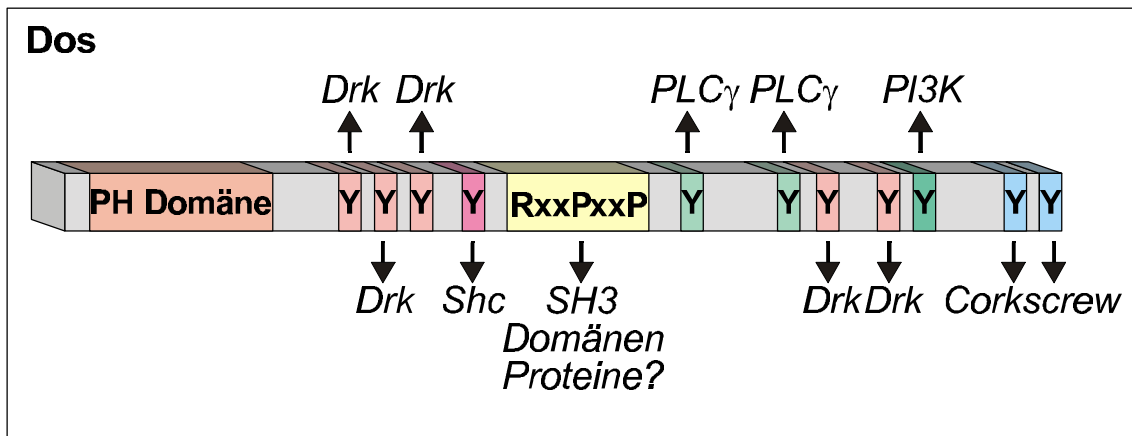


Abbildung 1.2.: Schematische Darstellung des Dos Proteins. Die N-terminale PH-Domäne ist links dargestellt. Phosphorylierbare Tyrosine der SH2-Domänen Bindungsstellen und mögliche Bindungspartner sind eingezeichnet, ebenso die mögliche SH3-Domänen Bindungsstelle mit der Konsensus Sequenz RxxPxxP (nach MacDougall and Waterfield, 1996).

Angesichts der strukturellen Eigenschaften kann das Dos Protein der Familie der Multi-Adaptor-Proteine zugerechnet werden. Diese zeichnen sich durch eine N-terminale PH-Domäne aus und besitzen eine Reihe von phosphorylierbaren Tyrosinresten in Konsensussequenzen zur Bindung von SH2-Domänen Proteinen. Multi-Adaptor-Proteine werden durch Rezeptor-Tyrosin-Kinasen phosphoryliert und aktiviert, und können dann unterschiedliche Protein-Protein Interaktionen vermitteln, die bei der RTK vermittelten Signaltransduktion benötigt werden. Zu dieser Familie gehören bei den Vertebraten die IRS (Insulin Rezeptor Substrat) Proteine, Gab1 und Gab2 (Gu et al., 1998; Holgado-Madruga et al., 1996; Sun et al., 1993; Sun et al., 1995; Yenush and White, 1997) und in *Drosophila* das IRS Homolog Chico (Boehni et al., 1999). Für das Dos Protein wurde eine Funktion bei der Signaltransduktion der RTK's Sevenless, DER und Torso gefunden (Herbst et al., 1996; Raabe et al., 1996).

Dos wurde auch parallel im Labor von M. Simon gefunden. Zur Untersuchung der Funktion von Corkscrew in der RTK vermittelten Signaltransduktion wurde mit zwei Ansätzen gearbeitet. Mit einer katalytisch inaktiven Form, der *csw^{CS}* Mutante unter der Kontrolle des *Aktin5C* Promotors, wurde nach phosphorylierten Substraten von Csw gesucht. Hierbei konnte ein 115 kD Protein aus Schneiderzellen, welche das *csw^{CS}* Transgen exprimierten, zusammen mit Csw koimmunpräzipitiert werden. Mikrosequenzierungen zeigten, daß es sich bei dem gefundenen Protein um Dos handelte. Für die Interaktion konnten die beiden SH2-Domänen von Csw verantwortlich gemacht werden, da ihr Fehlen keine Präzipitation von Dos erlaubte (Herbst et al., 1996). Der zweite Ansatz war ein genetischer Screen nach Mutationen, welche die Funktion von Csw beeinträchtigen. Hierfür wurde eine EMS-Mutagenese durchgeführt und nach Modulatoren des *sE/hsp-csw^{CS}* Phänotyps gescreent. Fliegen mit einem

sE/hsp-csw^{CS} Transgen haben leicht rauhe Augen, was durch das Fehlen der Photorezeptoren R3/R4 und R7 hervorgerufen wird. Die Expression von katalytisch inaktivem Csw^{CS} inhibiert endogenes Csw, was für die neuronale Differenzierung in diesen Zellen notwendig ist. Als Enhancer des Augenphänotyps wurden sieben Allele einer Komplementationsgruppe isoliert und Komplementationstests mit *dos^{R31}* und *dos^{P115}* ergaben, daß es sich hierbei um *dos*-Allele handelte (Allard et al., 1996; Herbst et al., 1996). Biochemische Experimente zeigten, daß Dos als Substrat von Csw dephosphoryliert wird, was durch die Expression von Csw^{CS}, welches endogene Csw Funktion inhibiert, und durch die Zugabe von Phosphatase-Hemmstoffen verhindert werden kann. Es konnte auch gezeigt werden, daß Csw durch den aktivierten Sev Rezeptor phosphoryliert wird (Herbst et al., 1996).

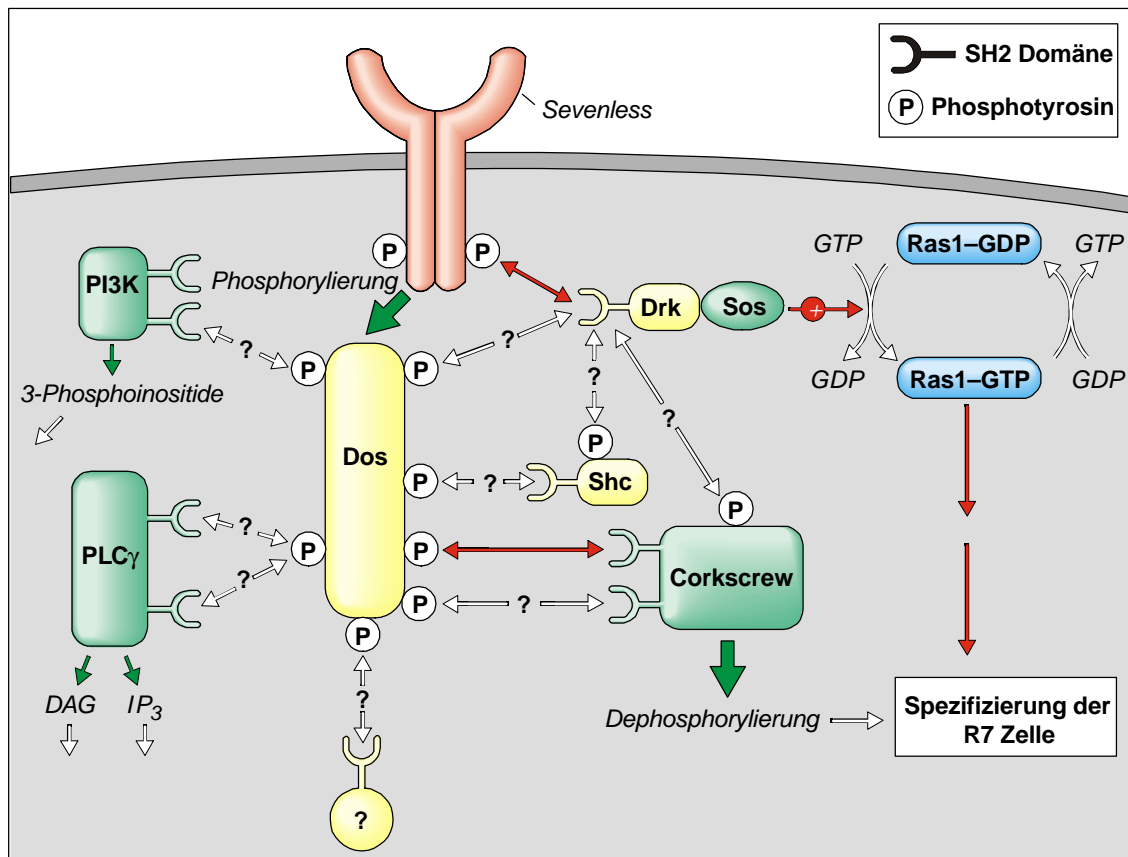


Abbildung 1.3.: Dos als mögliches Multi-Adaptor-Protein in der Sevenless Signaltransduktions Kaskade. Die Phosphorylierung von Dos durch die Sevenless RTK (Herbst et al., 1996) ist mit einem dicken grünen Pfeil markiert. Stattfindende Interaktionen sind durch rote Pfeile angezeigt (Drk-Sos (Olivier et al., 1993); Sos-Ras1 (Bonfini et al., 1992)), mögliche durch weiße Pfeile mit Fragezeichen. Adaptor Proteine sind gelb, Enzyme und deren Aktivität sind grün dargestellt. Das Ras1-GTP Austauschprotein ist blau dargestellt. P bezeichnet Phosphotyrosin. (nach MacDougall and Waterfield, 1996).

In Abbildung 1.3 ist das mögliche Netzwerk an unterschiedliche Bindungspartnern dargestellt. Dos könnte als Multi Adaptor unterschiedliche Signaltransduktionsproteine in die Nähe des Rezeptors und der Membran bringen und als wichtige Schaltstelle bei der Rezeptor-Tyrosin-Kinase vermittelten Signaltransduktion fungieren. Durch eine funktionelle Analyse der SH2-

Domänen Bindungsstellen in Dos und die Charakterisierung von Interaktionspartnern, kann das noch wenig verstandene Netzwerk von Protein-Protein Wechselwirkungen besser verstanden werden.

1.5 Problemstellung

Ziel der Arbeit war eine funktionelle Charakterisierung von Dos als potentielles Multi-Adaptor-Protein der Sevenless Signaltransduktionskaskade. Mittels molekularer, biochemischer, genetischer und histologischer Techniken sollte die Funktion von Dos in der Signaltransduktion genauer untersucht werden. Ein wichtiger Punkt hierfür war die Untersuchung der *in vivo* Funktion von verschiedenen SH2-Domänen-Protein Bindungsstellen, die aufgrund der Aminosäuresequenz von Dos vorhergesagt wurden. Darüber hinaus sollten mögliche Interaktionspartner von Dos gefunden werden.

Die Kernfrage lautete: Ist Dos ein Multi-Adaptor-Protein und eine zentrale Schaltstelle in der Rezeptor-Tyrosin-Kinase vermittelten Signaltransduktion und wenn ja, welche Interaktionspartner gibt es?

In einer Reihe von Einzelprojekten sollte versucht werden, eine Antwort auf diese Frage zu finden:

- ⇒ Herstellung eines monoklonalen Antikörpers gegen das Dos Protein für die durchzuführenden biochemischen Experimente und für Lokalisationsstudien.
- ⇒ Molekulare Charakterisierung des *dos*^{R31} EMS Allels.
- ⇒ *In vitro* Mutagenese von potentiellen SH2-Domänen Bindungsstellen und Herstellung von Konstrukten für die Keimbahntransformation.
- ⇒ Klonierung der endogenen *dos* Enhancer/Promotor Sequenzen zur Expressierung und Untersuchung der mutierten Transgene in Fliegen.
- ⇒ Etablierung eines *in vivo* Testsystems zur Untersuchung der Funktion von mutantem Dos Protein bei der Augenentwicklung in Abwesenheit endogener Dos Funktion.
- ⇒ Immun- und Koimmunpräzipitation von Interaktionspartnern des Dos Proteins aus Fliegenprotein.
- ⇒ Eventuell Charakterisierung von neuen Interaktionspartnern.

2 Material und Methoden

2.1 Bakterien

Zur Klonierung von Plasmid DNA wurden hitzekompetente *E. coli* DH5 α , XL1-Blue und XL2-Blue Zellen verwendet. Der Bakterienstamm DH5 α wurde nach dem Protokoll von Nishimura (Nishimura et al., 1990) behandelt, um Hitzeschock kompetente Zellen zu erhalten. Zur Haltung und Amplifikation der verwendeten λ GEM11 Phagen diente der Bakterienstamm *E. coli* NM539. Die vollständigen Genotypen sind im Sambrook Manual (Sambrook et al., 1989) beschrieben.

2.2 Plasmide

pPCR-Script Amp SK(+)	Klonierungs-Vektor (Stratagene)
pBluescript II KS(+)	Klonierungs-Vektor (Stratagene)
pUCh π Δ 2-3	Helferplasmid mit Transposase (Rio and Rubin, 1985)
pTH4	P-Element-Vektor mit <i>yellow</i> Marker (E. Hafen, Zürich, unveröffentlicht), pUC8 Derivat mit erweiterter Multiple Cloning Site und der genomischen <i>yellow</i> Sequenz von <i>D. melanogaster</i>
pBD749	pW8 P-Element-Vektor mit <i>white</i> Marker (Klemenz et al., 1987), zweifachem <i>sev</i> Enhancer und <i>hsp70</i> Promotor (Basler et al., 1991), erhalten von B. Dickson, Wien
pTW17	pBluescript II KS(+) mit vollständiger <i>dos</i> cDNA (Raabe et al., 1996)
pTW21	GST-Dos in pGEX 2T (Dos ohne N-terminal 38 AS)
pTW23	His-Dos in pET 16b (Dos ohne N-terminal ca. 300 AS)
pMS2II	pBluescript II KS(+) mit <i>dos</i> cDNA und GFP-tag (Schmidt, 1997)
pMS3II	pBluescript II KS(+) mit <i>dos</i> cDNA und Myc-tag (Schmidt, 1997)

2.3 Primer

Die verwendeten Primer wurden im Institut für Physiologische Chemie II synthetisiert (Bezeichnung: „Gen#“), oder von der Firma GIBCO Lifetechnologies bezogen. Die lyophilisierte DNA wurde in H₂O gelöst (100 μ l bis 200 μ l) und ihre Konzentration spektrometrisch bestimmt. Von diesen Stocklösungen wurden entsprechende Verdünnungen für PCR (20 μ M) und Sequenzierung (1 μ M oder 5 μ M) eingesetzt.

Bezeichnung	Sequenz (mit Position in der <i>dos</i> cDNA Sequenz)	Bemerkung
Y316F-1(Shc)	5' (C ₉₇₅ ACCGCATCCGGACCGTTCATACCCATCAGCGAGTG)	forward
Y316F-2	5' (C ₁₀₁₀ ACTCGCTGATGGGTATGAACGGTCCGGATGCGGTG)	revers
Y358F1(PLC γ)	5' (C ₁₀₉₈ AACTTGGATCCCAAGTTCTTCGATACGCCGCGTAGTCAT)	forward
Y358F2	5' (A ₁₁₃₇ TGACTACGCGCGTATCGAAGAAGTTGGGATCCAAGTTG)	revers

Y537F1(PLC γ)	5' (C ₁₆₃₇ TTTCATCGAGGAAAGCTTTGACATTCCAAGGTCCCACCA)	forward
Y537F2	5' (T ₁₆₇₆ GGTGGGACCTTGAATGTCAAAGCTTTCTCTCGATGAAAG)	revers
631Y-F1(PI3K)	5' (G ₁₉₁₇ GAGGGCAATGTTTTTCGATTTCGACTTCATGGAGCAGGCG)	forward
631Y-F2	5' (C ₁₉₅₆ GCCTGCTCCATGAAGTCGAATCGAAAAACATTGCCCTCC)	revers
801Y-F1(Csw)	5' (G ₂₄₂₇ ACTGAGCACAAAGCTGCAGTTCTTTGATCTGGATGTGACCAAC)	forward
801Y-F2	5' (G ₂₄₆₉ TTGGTCACATCCAGATCAAAGAACTGCAGCTTGTGCTCAGTC)	revers
W104A-f(PH)	5' (G ₃₄₀ CGGATATGCGCGACGCACTGAACTGCATCTGC)	forward
W104A-r	5' (G ₃₇₂ CAGATGCAGTTCACATGCGTTCGCGCATATCCGC)	revers
I-f	5' (CCCC GAATGTGGTTTGTTTATA)	genom.
I-r	5' (GGGTCGAGTTTTGCTTTAGT)	revers, genom.
II-f	5' (ATTCCACGACCCATTTTACATA)	genom.
Gen203	5' (A ₂₅₁ GGCCACAGTCCACCTGC)	revers
Gen251	5' (G ₃₃₉ GCGGATATGCGCGACTG)	forward
III-f	5' (T ₃₈₁ CACCTACACGACACAAAGCAA)	forward
II-r	5' (G ₄₈₈ TGGAGTTGCTTAGACCGCC)	revers
Gen250	5' (G ₁₀₀₅ CTGATGGGTATGTACGG)	revers
IV/V-f	5' (T ₁₁₀₇ CCCAAGTTCTACGATACGCCG)	forward
III-r	5' (G ₁₂₄₈ GAGTCGGAGCGTTGTTTACTA)	revers
Gen249	5' (A ₁₂₉₀ TGAGCCCACTCATCGTC)	revers
VI-f	5' (G ₁₅₀₁ CCAAGGTGCTGAAGAACAA)	forward
Gen246	5' (C ₁₅₇₈ TGCGGCAGATCGCGAGG)	revers
IV/V-r	5' (A ₁₅₉₆ TTTTCCGTATCCGACAGCTG)	revers
Gen244	5' (C ₁₉₂₂ CCTCCATCTTTGTGGGA)	revers
VII-f	5' (G ₂₁₂₈ ACAGGAAGTGCAAACCGAA)	forward
VI-r	5' (A ₂₂₁₉ TTGAGAGAGGGGCACCG)	revers
Gen242	5' (C ₂₂₃₈ GTTTCATGCGGCAGCAC)	revers
Gen221	5' (C ₂₂₂₈ GCATGAAACGGATGTACAC)	forward
Gen267	5' (G ₂₄₅₂ ATCTGGATGTGACCAAC)	forward
Gen243	5' (G ₂₇₉₃ TGGTCAGCTGAGGAGAG)	forward
VII-r	5' (C ₃₁₈₄ AGCTTGTGTGCGCACACG)	revers

2.4 Zelllinien

Für die Gewinnung von monoklonalem Antikörper gegen das Dos Protein wurden Hybridoma Zellen, Fusion von Myeloma- mit Milzzellen von immunisierten Mäusen, verwendet. Ein Teil der biochemischen Experimente wurde mit den Drosophila Zell-Linien Schneider's S2 und Echaliel und Ohanessian's Kc durchgeführt.

2.5 Fliegenstämme

Stamm

w¹¹¹⁸

Herkunft

Würzburg Stocksammlung (Lindsley and Zimm, 1992)

Literatur

<i>yw</i> ¹¹¹⁸	Würzburg Stocksammlung (Lindsley and Zimm, 1992)	
<i>w</i> ¹¹¹⁸ ; <i>Sco</i> / <i>SM6</i> , <i>CyO</i>	Würzburg Stocksammlung (Lindsley and Zimm, 1992)	
<i>yw</i> ¹¹¹⁸ ; <i>Sco</i> / <i>SM6</i> , <i>CyO</i>	diese Arbeit	
<i>w</i> ¹¹¹⁸ ; <i>TM3</i> , <i>Sb</i> , <i>e</i> / <i>TM6B</i> , <i>Tb</i> , <i>Hu</i> , <i>e</i>	Würzburg Stocksammlung (Lindsley and Zimm, 1992)	
<i>yw</i> ¹¹¹⁸ ; <i>TM3</i> , <i>Sb</i> , <i>e</i> / <i>TM6B</i> , <i>Tb</i> , <i>Hu</i> , <i>e</i>	diese Arbeit	
<i>yw</i> ¹¹¹⁸ ; <i>D</i> , <i>gl</i> / <i>TM3</i> , <i>Sb</i> , <i>Ser</i> , <i>e</i>	Zürich Stocksammlung	
<i>FM7a</i> , <i>B w</i> ^a / <i>FM7a</i> , <i>B w</i> ^a	Würzburg Stocksammlung (Lindsley and Zimm, 1992)	
<i>yw</i> ; <i>Sp</i> / <i>SM6</i> , <i>CyO</i> ; <i>MKRS</i> / <i>TM2</i> , <i>y</i> ⁺	Zürich Stocksammlung	
<i>w</i> ¹¹¹⁸ ; <i>D2-3</i> , <i>Sb</i> / <i>TM3</i> , <i>Ser</i>	Würzburg Stocksammlung	
<i>y</i> , <i>w</i> , <i>hsp-Flp1</i>		(Xu and Rubin, 1993)
<i>FRT80B-w</i> ⁺	Bloomington # 1940	
<i>w</i> ; <i>P</i> [<i>w</i> ⁺ , <i>sE/hsp-dos</i>]	Thomas Raabe	(Raabe et al., 1996)
<i>P</i> [<i>w</i> ⁺ , <i>sE-S11.5</i>]	K. Basler	(Basler et al., 1991)
<i>P</i> [<i>w</i> ⁺ , <i>sE-S11.1</i>]	K. Basler	(Basler et al., 1991)
<i>dos</i> ^{R31} / <i>TM3</i> , <i>Sb</i> , <i>Ser</i> , <i>e</i>	Thomas Raabe	(Raabe et al., 1996)
<i>dos</i> ^{R31} / <i>TM6B</i> , <i>Tb</i> , <i>Hu</i> , <i>e</i>	Thomas Raabe	(Raabe et al., 1996)
<i>dos</i> ^{P115} / <i>TM3</i> , <i>Sb</i> , <i>Ser</i> , <i>e</i>	Thomas Raabe	(Raabe et al., 1996)
<i>dos</i> ^{P115} ; <i>th</i> , <i>cu</i> , <i>sr</i> , <i>e</i> (Rek. 1) /		
<i>TM6B</i> , <i>Tb</i> , <i>Hu</i> , <i>e</i>	Thomas Raabe	(Raabe et al., 1996)
<i>dos</i> ^{P115} ; <i>th</i> , <i>cu</i> , <i>sr</i> (Rek. 5) /		
<i>TM6B</i> , <i>Tb</i> , <i>Hu</i> , <i>e</i>	Thomas Raabe	(Raabe et al., 1996)
<i>FRT80B-dos</i> ^{R31} / <i>TM6B</i> , <i>Tb</i> , <i>Hu</i> , <i>e</i>	Thomas Raabe	(Raabe et al., 1996)
<i>yw</i> ¹¹¹⁸ ; <i>FRT80B-dos</i> ^{R31} /		
<i>TM3</i> , <i>Sb</i> , <i>Ser</i> , <i>e</i>	diese Arbeit	
<i>yw</i> ¹¹¹⁸ ; <i>dos</i> ^{R31} / <i>TM3</i> , <i>Sb</i> , <i>Ser</i> , <i>e</i>	diese Arbeit	
<i>w</i> ; <i>P</i> [<i>w</i> ⁺ , <i>sE/hsp-dos-GFP</i>]	Marc Schmidt (DG38II)	(Schmidt, 1997)
<i>w</i> , <i>P</i> [<i>w</i> ⁺ , <i>sE/hsp-dos</i> ^{W104A} - <i>GFP</i>]	Marc Schmidt (PG1)	(Schmidt, 1997)
<i>w</i> ; <i>P</i> [<i>w</i> ⁺ , <i>sE/hsp-dos</i> ^{DI-117} - <i>GFP</i>]	Marc Schmidt (Del-DG4)	(Schmidt, 1997)
<i>w</i> ; <i>P</i> [<i>w</i> ⁺ , <i>sE/hsp-PH</i> ^{dos} - <i>GFP</i>]	Björn Mielke (PHD1)	(Mielke, 1999)
<i>w</i> ; <i>P</i> [<i>w</i> ⁺ , <i>sE/hsp-Torso</i> TM -		
<i>Dos</i> ^{DEL} - <i>GFP</i>]	Björn Mielke (TDD2)	(Mielke, 1999)
<i>w</i> ; <i>P</i> [<i>w</i> ⁺ , <i>sE/hsp-GAB</i> ^{PH} - <i>Dos</i> ^{DEL} - <i>GFP</i>]		Björn Mielke (GPH6)
	(Mielke, 1999)	

2.6 Enzyme

Restriktionsenzyme wurden von den Firmen New England Biolabs NEB, GIBCO Lifetechnologies, MBI Fermentas, Stratagene, Pharmacia und Boehringer bezogen. Die verwendete T4 DNA Ligase ist von der Firma GIBCO Lifetechnologies. Für PCR Reaktionen wurden Perkin Elmer AmpliTaq AS Polymerase und Stratagene Pfu DNA Polymerase verwendet.

2.7 Antikörper

<i>Bezeichnung</i>	<i>Verwendung</i>	<i>Herkunft</i>
Ziege anti-Maus IgG, AP gekoppelt	Western	Dianova
Anti-Maus-Biotin	ELISA	Vectastain
Ziege anti-Maus IgG, HRP gekoppelt	ECL	BIORAD
Ziege anti-Kaninchen IgG, HRP gekoppelt	ECL	Amersham
Ziege anti-Maus IgG Cy3 Konjugat	Fluoreszenz-Mikroskopie	Dianova
Normales Ziegen Serum	Blocken	Sigma
Maus anti-GFP IgG1	ECL, Antikörperfärbung	MoBiTec
Kaninchen anti-GFP Serum	ECL, Antikörperfärbung	MoBiTec
Maus anti-Dos (BB117/2) IgG	ECL, Antikörperfärbung	Hybridomazellen
Kaninchen anti-Csw (affinitätsgereinigt)	ECL, Immunpräzipitation	Liz Perkins

Die für die einzelnen Antikörper eingesetzten Verdünnungen sind im Ergebnisteil aufgeführt.

2.8 Chemikalien

Gebräuchliche Laborchemikalien wurden in p.a. Qualität von folgenden Firmen bezogen: Roth, Serva, GIBCO Lifetechnologies, Sigma, Merck und BIOzym.

2.9 Kits

QIAGEN Plasmid Mini/Midi/Maxi Kit	QIAGEN
QIAquick PCR Purification Kit	QIAGEN
QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN
QIAamp Blood/Tissue Kit	QIAGEN
ABI Prism™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit	PE Applied Biosystems
ECL Western blotting detection reagents	Amersham
QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene
pCR-Script™ Amp SK(+) Cloning Kit	Stratagene
Opti-Prime™ PCR Optimization Kit	Stratagene
Multiprime DNA Labelling System	Amersham
Vectastain ABC	Vector

2.10 Geräte

Hybaid Omnigene Thermocycler
Biometra Multi- und Maxi-Gel zur Proteinelektrophorese
Biometra Fast Blot für semi-dry Proteintransfer
Biometra Agarosegel Apparatur zur DNA Elektrophorese

2.11 Computerprogramme und Datenbanken

Oligo DNA Analysis Software 3.5	NBI
DNAsis 5.0	Pharmacia
Chromas	C. McCarthy, Griffith
University	
Adobe Photoshop 3.0	Adobe
CorelDRAW 8.0 und CorelPHOTO-PAINT 8.0	Corel
Word 7.0	Microsoft
EndNote 3.0.1	Niles Software
BCM Search Launcher	Internet-Datenbank
Medline	Internet-Datenbank

2.12 Standardmethoden

Molekularbiologische und biochemische Standardmethoden wurden nach den Angaben der Laborhandbücher „Current protocols“ (Ausubel et al., 1994), „Molecular cloning“ (Sambrook et al., 1989) und „Using antibodies“ (Harlow and Lane, 1999) durchgeführt. Modifikationen der Standardprotokolle werden separat beschrieben. Bei der Verwendung von Kits wurde nach den Angaben der Hersteller verfahren.

2.13 DNA Methoden

2.13.1 Präparation und Reinigung von Plasmid DNA

Die Präparation und Reinigung von Plasmid DNA wurde mit den Qiagen Plasmid Kits für Mini, Midi und Maxi Präparationen nach den Herstellerangaben durchgeführt. Minipräparationen zum Screen nach positiven Plasmiden wurden nach der Methode der alkalischen Lyse (Birnboim and Doly, 1979) durchgeführt und nicht über Säulen gereinigt.

2.13.2 Isolierung genomischer DNA aus *Drosophila* Larven

Die Isolierung von genomischer DNA aus zweiten und dritten Larven wurde mit dem QIAmp® Blood/Tissue Kit der Firma Qiagen durchgeführt. Es wurde nach dem im Produktmanual angegebenen „Protokoll für Insekten“ vorgegangen. Die Konzentration der isolierten und säulengereinigten DNA wurde durch Gelelektrophorese bestimmt.

2.13.3 DNA Mutagenese

Die *in vitro* Mutagenese von Plasmid DNA wurde nach der Methode der „site directed mutagenesis“ mit dem QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit durchgeführt. Mutagenese und Transformation erfolgte nach den Angaben im Produktmanual. Das Prinzip der Methode ist der Replikation bei Plasmiden sehr ähnlich: Ein zirkuläres Plasmid wird ausgehend von den Primern durch eine Polymerase amplifiziert. Durch den großen Überlappungsbereich der Primer werden auch ohne Ligation stabile, zirkuläre und

doppelsträngige neue Plasmide gebildet, die, nach Verdau der methylierten parentalen DNA durch *DpnI*, in Bakterien transformiert werden können. Das Ergebnis der PCR wurde zuerst mit Restriktionsenzymen verifiziert, da bei den meisten eingeführten Punktmutationen entweder eine neue Schnittstelle entstand oder eine bestehende wegfiel. Vor der weiteren Klonierung und Transformation in *Drosophila* Embryonen wurden die Plasmide zusätzlich sequenziert.

2.13.4 DNA Sequenzierung

Die Sequenzierung von Qiagen gereinigter Plasmid DNA erfolgte mit dem ABI Prism™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit. Der vom Hersteller angegebene Reaktionsansatz wurde jedoch halbiert. Nach der Ethanolpräzipitation wurde in 20µl TSR resuspendiert. Die Sequenzgelelektrophorese erfolgte entweder am Institut für Physiologische Chemie II oder am Institut für Zoologie I der Universität Würzburg.

2.14 Proteinmethoden

2.14.1 ELISA

Die ELISA Technik wurde verwendet, um die Hybridomaüberstände auf ihre Reaktivität mit den Dos-Fusionsproteinen zu screenen. Der TSP-Deckel (Transfer Solid Phase) einer 96er Kulturplatte wurde zur Adsorption des Antigens (10µg/ml in 50 mM Na₂CO₃ pH 10,5) mit 250µl/Napf über Nacht bei 4°C inkubiert. Danach wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur mit 1% Gelatine in 50 mM Na₂CO₃ pH 10,5 geblockt. Nach dem Waschen mit PBST (139 mM NaCl; 5,5 mM Na₂HPO₄; 1,14 mM NaH₂PO₄; 0,1% Tween 20) wurde eine Stunde mit 250µL Hybridomaüberstand 1:1 in PBS inkubiert. Der Signalnachweis erfolgte mit dem Vectastain ABC Kit. Hierzu wurde für eine Stunde mit dem darin enthaltenen, biotinylierten anti-Maus IgG inkubiert, mit PBST gewaschen und durch anschließende Zugabe des Biotin-Avidin-Komplexes in Gegenwart von Catechol und p-Phenylendiamin die Farbreaktion ausgelöst. Hat der erste Antikörper an das Antigen gebunden und wurde er vom biotinylierten Zweitantikörper erkannt, kommt es durch die Anwesenheit von Enzym und Substrat zu einem braunen Farbniederschlag.

2.14.2 Westernblot

Der Transfer von Proteinen nach der Gelelektrophorese auf Nitrocellulose erfolgte mit der Biometra Fast Blot Apparatur nach dem Prinzip des „Semi dry blotting“. Es wurde nach dem vom Hersteller angegebenen Protokoll gearbeitet. Die Quantität des Transfers konnte mit einem bei der Gelelektrophorese verwendeten vorgefärbten Protein-Marker überprüft werden. Die Membranen wurden über Nacht in 5% fettfreiem Milchpulver in TBST (10 mM Tris HCl pH 8,0; 150 mM NaCl; 0,05% Tween 20) bei 4°C geblockt.

Der Nachweis der Proteine mit Antikörpern wurde mit den ECL Western blotting detection reagents (Amersham) nach dem angegebenen Protokoll durchgeführt. Mit den Antikörpern

wurde eine Stunde inkubiert, die Waschschritte wurden auf dreimal 20 Minuten verlängert, um den Hintergrund zu minimieren.

Für den Test der Hybridomaüberstände auf ihre Reaktivität mit Homogenat von *Drosophila* Köpfen wurde der Signalnachweis mit Alkaliner Phosphatase in Gegenwart von NBT/BCIP durchgeführt.

2.14.3 Immunpräzipitation

Zur Immunpräzipitation und Koimmunpräzipitation wurden verschiedene Techniken ausgetestet. Die verwendeten Protokolle wurden der Produktinformation (Pharmacia), den „Current protocols“ (Ausubel et al., 1994) und „Using antibodies“ (Harlow and Lane, 1999) entnommen und teilweise modifiziert. Zur Homogenisierung von Larven und Fliegen wurden unterschiedliche Puffer verwendet: Homogenisierungspuffer (150 mM NaCl; 10 mM HEPES pH 7,4; 1 mM EGTA; 0,1 mM MgCl) wurde ohne Detergenz und Proteaseinhibitoren verwendet; der NP-40 Lysis Puffer (150 mM NaCl; 50 mM Tris pH 8,0; 1% NP-40) ebenfalls ohne Proteaseinhibitoren; der Lysis Puffer (150 mM NaCl; 50 mM Tris pH 7,4; 1% TritonX 100; 1 mM EDTA; 1 mM NaF; 1 mM DTT; 0,17mg/ml PMSF; 2µg/ml Leupeptin; $\frac{1}{100}$ w/v Aprotinin; 5 mM Benzamidin) enthält eine Reihe von Proteaseinhibitoren, wurde aber auch ohne verwendet.

2.14.4 SDS-Gelladepuffer

Für das Laden der Proteinproben wurde ein 5fach Puffer verwendet: 185 mM Tris pH 6,8; 50% Glycerol; 10% SDS; 625 mM DTT; 0,05% BPB.

2.15 Methoden zur Antikörpergewinnung

Die Gewinnung von monoklonalen Antikörpern und die Kultur der Hybridomazellen wurde wie bei T. A. Godenschwege (Godenschwege, 1995) beschrieben durchgeführt.

2.15.1 Fusion von Maus-Milz- mit Myeloma-Zellen

Die präparierte Milz der immunisierten Maus wurde in RPMI 1640 Medium (GIBCO) vorsichtig zerrieben. Die Milz-Zellsuspension wurde mit Myelomazellen (unsterbliche B-Lymphozyten-Tumor-Zellen, die keine eigenen Antikörper mehr bilden können) in 40 ml RPMI 1640 Medium vereinigt. Die Myelomazellen sollten sich für die Fusion in der Teilungsphase befinden und mußten daher schon zuvor im Brutschrank einige Tage in HT-Medium (70 ml RPMI 1640; 20 ml Medium 199; 1 ml Glutamax I; 2 ml HT-Supplement; 10 ml FKS) wachsen. Für die Fusion wurden die Zellen abzentrifugiert und in 1 ml PEG 4000 vorsichtig resuspendiert. Das Volumen der Suspension wurde anschließend schrittweise durch Zugabe von RPMI 1640 Medium auf 20 ml erhöht. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in 8 ml FKS aufgenommen und vorsichtig mit HT-Medium auf 40 ml aufgefüllt. Die Zellsuspension wurde nun auf 96er Platten (50µl/Napf) verteilt. Nach etwa sieben Tagen waren die ersten Hybridomaklone zu erkennen. Nachdem die Näpfe etwa zur Hälfte bewachsen waren wurden die Zellen in 24er Platten umgesetzt. Die Überstände aus diesen

Platten wurde mit ELISA und Westernblot Analyse auf ihre Reaktivität gegen das Dos Protein getestet. Von den einzelnen Zellklonen wurden jeweils mehrere Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren.

2.15.2 Subklonierung der Hybridomazellen

Die im ELISA und im Westernblot positiven Klone wurden subkloniert um sicher zu stellen, daß jeder Hybridoma Zellklon von einer einzelnen Zelle abstammt und somit ein monoklonaler Antikörper sezerniert wird.

Zunächst wurde die Lebend-Zellzahl der Hybridomaklone bestimmt und die Zellsuspension so weit mit HT-Medium verdünnt, daß etwa 5 Zellen/Napf in eine frische Platte mit Subklonierungsmedium (6 ml HT-Medium; 300 µl HECS; 100 µl ESG) getropft werden konnten. Nach etwa einer Woche waren einzelne Zellklone sichtbar. Es wurden nur diejenigen Hybridomaklone weiter getestet, die eindeutig von einer einzelnen Zelle abstammten. Die Überstände wurden mittels ELISA und Westernblot Analyse auf ihre Reaktivität gegen das Dos Protein getestet. Zur Gewinnung von größeren Mengen Hybridomaüberstand wurden die Hybridomazellen in 50 ml Kulturflaschen in HT-Medium gehalten. Die Überstände wurden bei -20°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

2.16 Keimbahntransformation

Die Keimbahntransformation von *Drosophila* Embryonen wurde wie bei T. Twardzik beschrieben (Twardzik, 1993) durchgeführt. Zur Transformation wurde Qiagen gereinigte DNA verwendet. 12µg P-Element-Vektor und 4µg pUCh π Δ 2-3 (Rio and Rubin, 1985) wurden gemischt und mit Ethanol präzipitiert. Das Pellet wurde in 20µl Injektionspuffer (5 mM KCl; 0,1 mM NaPO₄-Puffer pH 6,8) resuspendiert. Bis zu 30 Minuten alte Embryonen (entweder w^{1118} oder yw^{1118}) wurden für 90 Sekunden mit 7% Na-Hypochlorid dechorioniert, 30 Minuten über Silicagel getrocknet und mit Voltalev-Öl überschichtet. Die Injektion erfolgte unter dem Lichtmikroskop in den hinteren Bereich der Embryonen. Nach 48 Stunden bei 18°C wurden die geschlüpften Larven vorsichtig auf frische Breigläser transferiert. Die geschlüpften Fliegen wurden mit dem Ausgangsstamm (w^{1118} oder yw^{1118}) gekreuzt. In der F1 Generation wurde nach Transgen exprimierenden Fliegen gescreent (erkennbar am P-Element-Marker), diese wurden dann mit Balancer-Stämmen weiter gekreuzt, um den Insertionsort (nur Chromosom) der P-Elemente zu bestimmen. Für jedes Transgen wurden mindestens zwei voneinander unabhängige Linien etabliert.

2.17 Fliegenzucht

Die Haltung der Stämme erfolgte bei 18°C in einer Klimakammer bei konstanter Luftfeuchtigkeit und einem 12 stündlichem Hell-dunkel Rhythmus. Kreuzungen wurden bei 24°C und sonst gleichen Bedingungen durchgeführt. Die Expression von Transgenen unter dem *hsp70* Promotor erfolgte in einem Brutschrank im Dauerdunkel. Hierbei wurde viermal täglich für eine Stunde die Temperatur von 24°C auf 37°C erhöht.

2.18 Fliegenkreuzungen

Nach der Keimbahntransformation wurden für jedes Konstrukt (im folgenden Absatz allgemein: $P[w^+]$) mehrere voneinander unabhängige, transformante Linien etabliert. Hierzu wurden die aus den injizierten Embryonen geschlüpften Fliegen in Einzelkreuzungen mit w^{1118} Fliegen gekreuzt. In der F1 Generation wurde nach transgenen Fliegen mit roten Augen gescreent. Rotäugige Fliegen wurden dann einzeln mit w^{1118} Fliegen zurückgekreuzt. Der Insertionsort der P-Elemente auf Chromosomenebene wurde durch die Kreuzung mit Balancerstämmen festgelegt. In parallelen Kreuzungen wurden die P-Element Männchen der F2 Generation mit $w^{1118}; Sco / SM6, CyO$ bzw. $w^{1118}; TM3, Sb, e / TM6B, Tb, Hu, e$ Jungfrauen gekreuzt. $P[w^+]$ und $SM6, CyO$ F3 Männchen wurden mit $w^{1118}; Sco / SM6, CyO$ und F3 Männchen mit $P[w^+]$ und $TM3, Sb, e$ wurden mit $w^{1118}; TM3, Sb, e / TM6B, Tb, Hu, e$ weitergekreuzt. Anhand der erhaltenen Markerkombinationen wurden die P-Element Insertionen den Chromosomen 1 bis 3 zugeordnet. Zur Etablierung von stabilen Stämmen wurden die Fliegen abschließend homozygot gekreuzt ($P[w^+] / SM6, CyO$ mit $P[w^+] / SM6, CyO$ bzw. $P[w^+] / TM3, Sb, e$ mit $P[w^+] / TM3, Sb, e$). Für die Konstrukte mit *yellow* Marker wurden die entsprechenden Kreuzungen im yw^{1118} Hintergrund durchgeführt.

Die einzelnen Schritte der Kreuzungen sowie die Kreuzungsschemata für die durchgeführten Assays sind zur besseren Übersicht in den entsprechenden Kapiteln des Ergebnisteils dargestellt.

2.19 Antikörperfärbung von Augenimaginalscheiben und Embryonen

Augenimaginalscheiben von Larven im dritten Larvenstadium wurden mit Mundhaken präpariert und auf Eis in PBS (139 mM NaCl; 5,5 mM Na_2HPO_4 ; 1,14 mM NaH_2PO_4) bis zur weiteren Verwendung gelagert. Fixiert wurde mit Paraformaldehyd (720 μ l PFA; 60 μ l 1 M $NaPO_4$ -Puffer pH 6,8; 200 μ l Na-Perjodat; 1ml 150 mM Lysin) für 30 Minuten auf Eis. Anschließend wurde mindestens dreimal 15 Minuten mit PBT (PBS; 3% Triton X 100; 3% Normales Ziegen Serum) gewaschen. Die Inkubation mit dem ersten Antikörper (Maus anti-Dos BB117/2 in einer Verdünnung von 1:10 in PBT) erfolgte über Nacht bei 4°C. Nach mehrmaligem Waschen (siehe oben) wurde mit dem zweiten Antikörper (anti-Maus Cy3 1:300 in PBT) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert (ab hier abgedunkelt arbeiten, um das Ausbleichen des Fluoreszenz-Farbstoffs zu verhindern). Das Einbetten für die Fluoreszenz-Mikroskopie erfolgte ohne Mundhaken entweder in Vecta-Shield Mounting Medium oder in PBS mit 50% Glycerol und Phenylendiamin. Um das Austrocknen zu vermeiden wurden die Ränder der Deckgläser mit Nagellack abgedichtet.

Die *Drosophila* Embryonen wurden zunächst 90 Sekunden mit 7% Na-Hypochlorid dechorioniert und für 15 Minuten fixiert. Für die weitere Behandlung wurde wie bei der Augenscheiben-Färbung verfahren.

2.20 Histologie

Semidünnschnitte (1µm) von Fliegenaugen wurden mit dem Ultracut Mikrotom der Firma Reichelt und Jung hergestellt. Hierfür wurden auf Eis die Fliegenköpfe abgetrennt und Rüssel sowie die Luftsäcke entfernt ohne die Ommatidien zu verletzen. Bis zur anschließenden OsO₄-Fixierung wurden die Köpfe in Drosophila-Ringer-Lösung (1,28 M NaCl; 47 mM KCl; 19 mM CaCl₂) auf Eis aufbewahrt. In Coagulations-Glasröhrchen wurde für 30 Minuten in der Fixierlösung (1% OsO₄; 2% Glutaraldehyd; 50 mM Na-Cacodylat pH 7,3) auf Eis fixiert. Nach zweimaligem Waschen mit 0,2 M Na-Cacodylat pH 7,3 wurde für zwei Stunden bei 0°C in 2% OsO₄ nachfixiert. Entwässert wurden die Köpfe anschließend für je zehn Minuten bei Raumtemperatur in einer aufsteigenden Alkoholreihe (50%, 70%, 90%, 96%, 100%, 100%). Vor dem Überführen in ein 1:1 Epon-Propylenoxid-Gemisch wurde zweimal mit Propylenoxid für je 20 Minuten inkubiert. Nach dem Abdampfen des Propylenoxids wurden die Köpfe in reinem Epon eingebettet und einige Tage bei 60°C bis zur vollständigen Polymerisation getrocknet.

Die Augenschnitte wurden in einen Wassertropfen auf Objektträger transferiert und bei 60°C auf einer Heizplatte getrocknet. Zur Kontrastierung der Rhabdomere wurde für drei Minuten mit 1% Toluidinblau, 1% Borax gefärbt. Nach dem Trocknen wurden die Objektträger mit DePex® und Deckgläsern für die Mikroskopie eingedeckelt und über Nacht bei 60°C getrocknet.

2.21 Epon Einbettmedium

Gebrauchsfertiges Epon (Glycid Ether 100) mit einer mittleren Härte nach der Polymerisation wurde in größeren Mengen zusammen gemischt und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert um das Polymerisieren zu verhindern. Für die fertige Mischung wurden vier Teile Lösung A (42,6% Epon; 57,4% DDSA) und drei Teile Lösung B (52,5% Epon; 47,5% MNA) gut verrührt. Zum Schluß wurden 2% DMP-30 als Härter zugegeben. Alle hierfür verwendeten Chemikalien wurden von der Firma Serva bezogen.

2.22 Mikroskopie

Die Mikroskopie der Semidünnschnitte wurde mit einem Leitz Aristoplan Mikroskop unter normalem Durchlicht durchgeführt. Für die Herstellung von Diapositiven wurde ein Leitz Orthomat benutzt. Als Filmmaterial diente hierbei ein Kodak Select 160T Kunstlichtfilm.

Fluoreszenz-Mikroskopie von GFP und Antikörpern wurde an einem Konfokalen Laser Scanning Mikroskop der Firma Leitz durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Herstellung eines Antikörpers gegen das Dos Protein

Da für die funktionelle Charakterisierung von Proteinen spezifische Antikörper von großer Bedeutung sind, wurde versucht, einen monoklonalen Maus Antikörper gegen das Dos Protein herzustellen. Hierzu wurde zunächst die *dos*-cDNA in zwei verschiedene Expressionsvektoren kloniert und als Fusionsprotein exprimiert. Durch das Fehlen von geeigneten Restriktionsschnittstellen für die Klonierung wurde in beiden Fällen nicht die komplette cDNA Sequenz verwendet. Dem GST-Dos Fusionsprotein fehlen N-terminal 38 Aminosäuren, beim His-Dos Fusionsprotein fehlen ebenso N-terminal 353 Aminosäuren.

Die Expression der Fusionsproteine wurde durch Zugabe von 1 mM IPTG zur jeweiligen Bakterienkultur induziert. Der pGEX Vektor (GST-Dos) wurde in XL1-Blue, der pET16b Vektor (His-Dos) in BL21 gehalten. Die Expression der Proteine wurde durch Protein-Gelelektrophorese des Bakterienlysates und anschließender Coomassie-Färbung der Gele überprüft. Ein Maximum der Expression war drei Stunden nach der IPTG-Induktion sichtbar.

Die Aufreinigung der Proteine aus größeren Kulturvolumina wurde zunächst dadurch erschwert, daß die Fusionsproteine unlöslich in Form von „inclusion bodies“ vorlagen. Das Abtrennen des GST- bzw. His-tags funktionierte nicht und es konnten auf diese Art keine ausreichenden Mengen an Protein gereinigt werden.

Für die Immunisierung der Mäuse wurde das GST-Dos Protein schließlich durch Elution aus Acrylamidgelen gewonnen, das zunächst unlösliche His-Dos Protein konnte in einem aufsteigenden Harnstoffgradienten aus den „inclusion bodies“ gelöst werden. Die Hauptfraktion war in 7 M Harnstoff löslich und wurde ohne weitere Dialyse für die Immunisierung verwendet.

Tag	Schritt	Antigen	Mäuse
1	1. Immunisierung	GST-Dos	M1 - M3
14	2. Immunisierung	GST-Dos	M1 - M3
35	3. Immunisierung	His-Dos	M1 - M3
42	1. Abnahme der Antiseren		M1 - M3
48	4. Immunisierung	His-Dos	M3
50	5. Immunisierung	His-Dos	M3
52	Fusion (Milz-Myeloma), Abnahme von Antiserum		M3

Tabelle 3.1.: Immunisierungsplan zur Gewinnung von Dos Antikörpern.

Da bei den Fusionsproteinen der GST- bzw. His-Anteil noch vorhanden und die Proteine nicht vollständig gereinigt waren, wurde mit beiden immunisiert. Dieses Vorgehen sollte eine hohe Spezifität für den Dos Antikörper gewährleisten und sicherstellen, daß keine Antikörper gegen den GST- bzw. His-Anteil gebildet werden. Für die erste und zweite Immunisierung wurden

drei Mäuse (M1 - M3) mit je unterschiedlicher Menge GST-Dos Fusionsprotein (M1 → 1µg; M2 → 2,5µg; M3 → 5µg) injiziert. Ab der dritten Immunisierung der Mäuse wurde dann das His-Dos Fusionsprotein verwendet. Der Immunisierungsplan ist in Tabelle 3.1. dargestellt.

Zwischen der dritten und vierten Immunisierung wurde den Mäusen Antiserum entnommen und auf einem Westernblot getestet. Zum Test der Seren wurde Kopfhomogenat von *w*; *P[w⁺, sE/hsp-dos]* Fliegen (diese wurden zuvor für eine Stunde auf 37°C gehalten, um die Expression des Transgens zu induzieren) und das bakterielle His-Dos Fusionsprotein für den Westernblot verwendet. Das *sE/hsp-dos* Konstrukt (Raabe et al., 1996) beinhaltet die komplette *dos* cDNA unter der Kontrolle einer duplizierten *sevenless* Enhancer Sequenz und dem *hsp70* Promotor, was eine ektopische, ubiquitäre Expression des Dos Proteins ermöglicht. Bei allen drei Mäusen war die Immunisierung erfolgreich. Das Serum von Maus3 zeigte auf dem Blot den geringsten Hintergrund und die Bande für das Dos Protein aus Köpfen, sowie die für das Fusionsprotein waren sehr deutlich. Für die weiteren Immunisierungen wurde daher Maus3 verwendet.

Die Fusion von Maus Milzzellen und Myeloma Zellen wurde von A. Hofbauer durchgeführt. Anschließend wurden zunächst mehrere Hybridoma Zelllinien etabliert und deren Überstände mittels ELISA auf ihre Reaktivität mit beiden Fusionsproteinen getestet. Durch dieses doppelte Testverfahren konnte sichergestellt werden, daß die von den Hybridomazellen sekretierten Antikörper weder gegen den GST- noch gegen den His-Anteil der Fusionsproteine gerichtet sind. Die Epitope befinden sich folglich im Bereich der C-terminalen 525 AS des Dos Proteins. Vier Zelllinien, deren Überstände mit beiden Proteinen positiv waren, wurden zur Antikörpergewinnung weiter gehalten.

Die vier Zelllinien wurden subkloniert, um sicher zu stellen, daß monoklonale Hybridomalinien vorliegen, die je einen monoklonalen Antikörper produzieren. Die etablierten Subklone wurden wiederum wie oben beschrieben mittels ELISA gescreent. Zusätzlich wurden sie auf einem Westernblot mit Kopfhomogenat von *w*; *P[w⁺, sE/hsp-dos]* Fliegen (nach Hitzeschock) auf positive Reaktion getestet. Nur die in allen Tests eindeutig positiven Hybridomaüberstände wurden zur weiteren Antikörpergewinnung gehalten. Insgesamt konnten 34 monoklonale Zelllinien aus zwei der vier positiven Ausgangslinien etabliert werden. Die Hybridomalinie BB117/2 wurde zur Antikörpergewinnung in Großkultur gehalten und die restlichen Zelllinien wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren (siehe Anhang).

3.2 Darstellung des Dos Proteins

Das Dos Protein hat eine Länge von 878 Aminosäuren mit einem vorhergesagten Molekulargewicht von 96 kD. Die Westernblot Analysen für den Antikörper Screen ergaben jedoch eine geringere Mobilität bei der Polyacrylamid Gelelektrophorese, hier läuft das Protein bei ca. 115 kD. Das vom Molekulargewicht abweichende Laufverhalten kann man dadurch erklären, daß das Dos Protein durch aktivierte RTK's phosphoryliert werden kann (Herbst et al., 1996), was zu einem veränderten Laufverhalten beitragen könnte.

Mittels Westernblot Analyse wurde das Dos Protein genauer untersucht. Es wurden zunächst Vorversuche durchgeführt, um geeignete Antikörper Verdünnungen und Proteinmengen zu ermitteln. Die besten Ergebnisse brachten ein 1:10 Verdünnung des Hybridomaüberstandes BB117/2 und eine 1:7500 Verdünnung des HRP gekoppelten zweiten Antikörpers in TBST (10 mM Tris HCl pH 8,0; 150 mM NaCl; 0,05% Tween 20). Für den Nachweis von Hitzeschock induziertem Protein waren das Gesamtprotein von fünf Fliegenköpfen oder drei dritten Larven ausreichend. Der Nachweis von endogenem Dos war nur mit dem Gesamtprotein von zehn Köpfen möglich, da im Adultstadium die Expression sehr schwach ist. Die stärkere Expression im Larvenstadium ermöglichte den Nachweis von endogenem Dos mit drei bis fünf dritten Larven. Die genannten Mengen für die Westernblot Analyse sind die untere Grenze für die verwendete Nachweisreaktion und für die verwendete Gelgröße (11cm x 7cm). Eine größere Proteinmenge führte stets zu einem unerwünscht stärkeren Hintergrund.

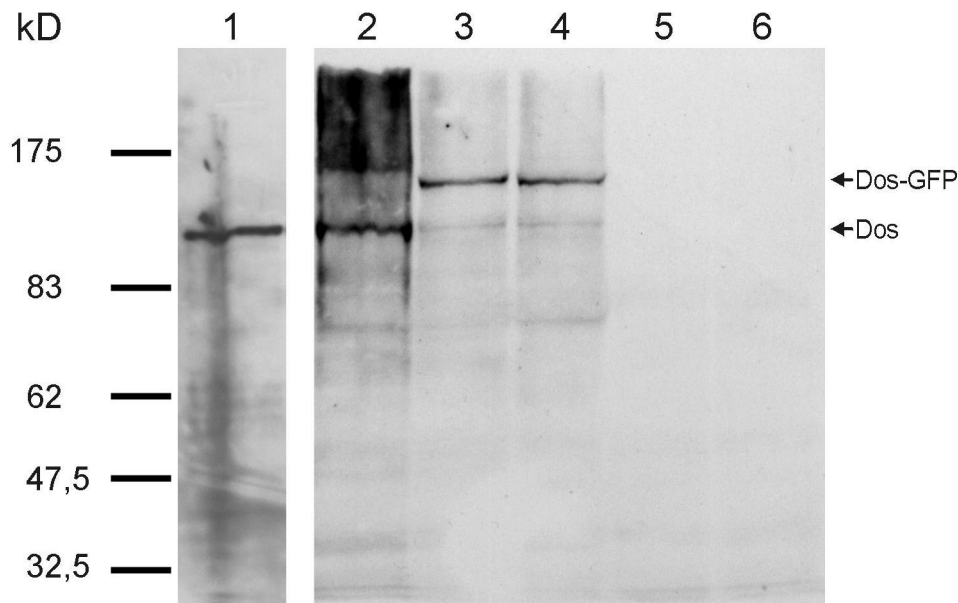


Abbildung 3.1.: Westernblot mit dem monoklonalen Maus anti-Dos (BB117/2) Antikörper. Aufgetragen wurde jeweils das Gesamtprotein von zehn dritten Larven (Spur 1), von fünf dritten Larven (Spuren 2 bis 4) und von acht zweiten Larven (Spuren 5 und 6), um Unterschiede in der Proteinmenge auszugleichen. Die Expression der Transgene in Spur 2 bis 4 wurden durch einen einstündigen Hitzeschock induziert. 1) w^{1118} ; 2) w ; $P[w^+, sE/hsp-dos]$; 3) und 4) w ; $P[w^+, sE/hsp-dos-GFP]$ (Linien DG21 und DG38II); 5) dos^{R31} ; 6) dos^{P115} .

Da für beide *dos* Allele (dos^{P115} und dos^{R31}) nicht bekannt war, ob es sich um „loss of function“ oder Protein-Nullallele handelt, wurde eine Westernblot Analyse durchgeführt. Bei der P-Element Linie dos^{P115} wurde davon ausgegangen, daß kein Protein mehr gebildet werden kann, da das P-Element im ersten Intron der *dos* Sequenz inseriert und dadurch eine Translation des Transkriptes mit P-Element Sequenz sehr unwahrscheinlich ist. Über die Mutation im EMS Allel dos^{R31} war noch nichts bekannt, so daß ein Westernblot einen ersten Aufschluß darüber geben konnte. Da beide Allele spätestens in der dritten Larve homozygot

letal sind, mußten zweite bis dritte Larven aus den Stämmen dos^{P115} oder dos^{R31} / *TM6B*, *Tb*, *Hu*, *e* gesammelt werden, die nicht den Marker *Tb* (kurze und dicke Larven) besitzen und somit homozygot für das jeweilige *dos* Allel sind.

Auf dem Westernblot (Abb.: 3.1.) erkennt man bei den als Positivkontrolle verwendeten w^{1118} und bei den Hitzeschock induzierten $w; P[w^+, sE/hsp-dos]$ Larven eine deutliche Bande für das Dos Protein bei ca. 115 kD. Bei den kleineren Banden handelt es sich offensichtlich um Abbauprodukte, da diese schwächer werden, wenn mit Zusatz von Proteaseinhibitoren gearbeitet wird. Die Expression des GFP getaggtten Dos Proteins in den $w; P[w^+, sE/hsp-dos-GFP]$ Larven (Schmidt, 1997) wurde ebenfalls durch einen einstündigen Hitzeschock induziert. Auf dem Blot erkennt man ein um den GFP-tag (241 Aminosäuren, DNA Sequenz siehe Anhang) vergrößertes Protein, welches bei ca. 155 kD läuft und eine sehr schwache Bande bei 115 kD, die das endogene Dos Protein repräsentiert. Bei den homozygoten Larven der beiden *dos* Allele dos^{P115} und dos^{R31} konnte kein Protein auf dem Blot nachgewiesen werden. Bei dos^{P115} handelt es sich offensichtlich um ein Nullallel, bei dos^{R31} könnte es sich aber auch um ein verkürztes Protein handeln, welches nicht erkannt wird, da das Epitop des Antikörpers im Bereich der C-terminalen 525 AS liegen muß. Hierauf wird in Punkt 3.3 näher eingegangen.

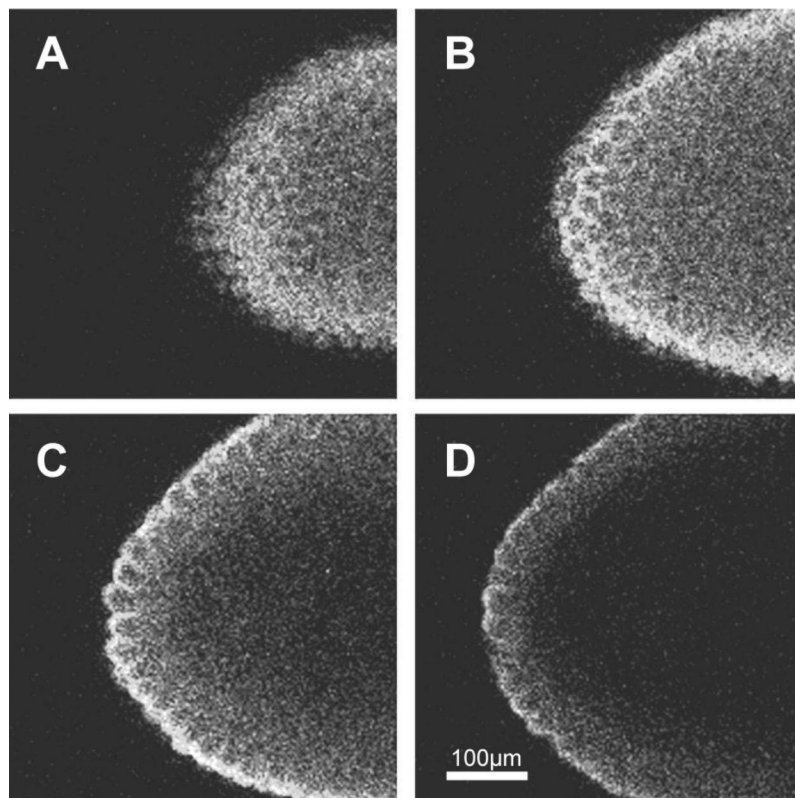


Abbildung 3.2.: Antikörperfärbung mit Maus anti-Dos an w^{1118} Embryonen. Als zweiter Antikörper wurde ein Cy3 gekoppelter Ziege anti-Maus verwendet. A) bis D) zeigen vier verschiedene Scan-Ebenen vom Vorderpol eines Embryos kurz vor dem Blastodermstadium. Die Zellmembranen beginnen sich gerade von außen nach innen einzuziehen. A) und B) zeigen die Aufsicht auf den Embryo, C) und D) Querschnitte. Das Dos Protein ist vorwiegend an den Membranen lokalisiert, nur wenig befindet sich frei im

Cytoplasma. Die Aufnahmen wurden mit dem Konfokalen Laser Scanning Mikroskop gemacht.

Die Lokalisierung des Dos Proteins wurde anhand von Antikörperfärbungen an Embryonen und Augenimaginalscheiben mit der Methode der konfokalen Laser Scanning Mikroskopie untersucht. Für die Färbungen erwies sich eine 1:10 Verdünnung des BB117/2 Hybridomaüberstandes in PBT (140 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 8,1 mM Na₂HPO₄ x 2H₂O; 1,5 mM KH₂PO₄; 3% TritonX 100) als geeignet. Als zweiter Antikörper wurde ein mit Fluoreszenzfarbstoff Cy3 gekoppelter Ziege anti-Maus IgG verwendet. Vor der Inkubation mit den Antikörpern wurde das Gewebe wie in 2.19 beschrieben fixiert, um das Eindringen der Antikörper zu ermöglichen.

In wildtypischen Embryonen findet man Dos fast ausschließlich im Cortex und nur sehr wenig ist diffus im Dotter verteilt. Beim Übergang in das Blastodermstadium (Abb.: 3.2.) findet man das Protein an den sich peripher einziehenden Membranen des Embryos. Die sehr früh in der Entwicklung beginnende Expression von Dos steht im Einklang mit Ergebnissen die zeigen, daß das Protein auch bei der Signaltransduktion der Torso RTK eine Rolle spielt, welche für die Entwicklung der Schwanz- und Kopfregeion des Embryos wichtig ist (Hou et al., 1995; Raabe et al., 1996).

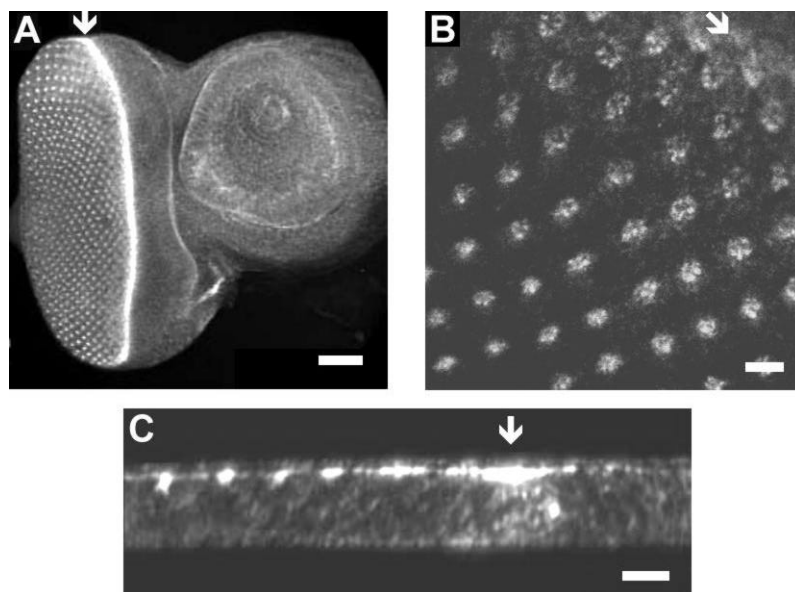


Abbildung 3.3.: Konfokale Aufnahme einer Augenimaginalscheibe von *w¹¹⁸* Larven im dritten Stadium gefärbt mit Maus anti-Dos. Posterior befindet sich links (links unten in B), die morphogenetische Furche ist jeweils durch einen Pfeil markiert. A) Übersicht der Imaginalscheibe, Dos wird vorwiegend in der morphogenetischen Furche und in den dahinter liegenden ommatidialen Clustern exprimiert. B) Ausschnittsvergrößerung der Reihen 1-10 hinter der Furche (rechts oben), Dos wird in den sich entwickelnden Photorezeptorzellen exprimiert. C) Der apikal-basal (unten) Schnitt zeigt eine apikale Dos Expression in der morphogenetischen Furche und in den ommatidialen Clustern. Die Größenmarker entsprechen 500µm in A) und 10µm in B) und C).

Bei der Färbung von *w¹¹⁸* Augenimaginalscheiben dritter Larven (Abb.: 3.3.) mit Maus anti-Dos findet man eine starke Expression in der morphogenetischen Furche und in den Zellen der

sich dahinter entwickelnden Ommatidiencluster. Die Photorezeptor Zellen füllen das ganze Cluster aus, eine genaue Zuordnung der Expression zu einzelnen Zellen ist daher nicht möglich. Offensichtlich jedoch wird *Dos* vorwiegend in den Photorezeptorzellen und deren Vorläufern exprimiert. Bei stärkerer Vergrößerung erkennt man, daß die gefärbten Cluster mit zunehmendem Abstand zur Furche größer werden, was mit der schrittweisen Determinierung der Photorezeptorzellen zusammenhängt. In einem Schnittbild von apikal nach basal erkennt man, daß *Dos* apikal in den ommatidialen Clustern in einer schmalen Region direkt unter der Oberfläche, in der sich die Adherens Junctions befinden, lokalisiert ist. In Übereinstimmung mit genetischen Experimenten, die zeigen, daß *Dos* für die Entwicklung aller Photorezeptoren benötigt wird, ist die Expression von *Dos* nicht auf die R7-Zelle beschränkt (Raabe et al., 1996).

3.3 Sequenzierung des *dos*^{R31} Allels

Das *dos*^{R31} Allel stammt aus einer EMS (Ethylmethansulfonat) Mutagenese. EMS bewirkt die Alkylierung von Guanin durch das Anhängen von Methyl- oder Ethylgruppen, was Fehlpaarungen bei der DNA Replikation (Transitionen von G-C nach T-A) zur Folge hat. Man kann deshalb davon ausgehen, daß es sich bei *dos*^{R31} um eine oder mehrere Punktmutationen handelt.

Da zu Beginn der Arbeit über das EMS-Allel *dos*^{R31} keine molekularen Informationen vorlagen, sollte die Sequenzierung Aufschluß über die Mutation/en geben. Das Allel ist homozygot letal und kann daher nur über Balancerchromosomen gehalten werden. Homozygote Individuen entwickeln sich maximal bis in das dritte Larvenstadium. Diese sind in ihrer Entwicklung stark zurückgeblieben. Sie sind wesentlich kleiner als Wildtyp Larven in vergleichbaren Stadien und ihre Imaginalscheiben sind stark unterentwickelt oder nur rudimentär vorhanden. Durch den dominanten, larvalen Marker *Tb* (kurze und dicke Larven) auf dem *TM6B* Balancerchromosom war eine Unterscheidung der Genotypen im Larvenstadium möglich, und es konnten homozygote *dos*^{R31} Individuen gesammelt werden.

Eine direkte Sequenzierung von genomischer DNA setzt größere Template Mengen voraus als die Sequenzierung von Plasmid-DNA oder PCR-Produkten. Der genomische *dos* Bereich sollte aus homozygoten *dos*^{R31} Larven durch PCR amplifiziert, subkloniert und anschließend sequenziert werden. Hierzu wurde zunächst in mehreren parallelen Ansätzen, um eine Kontamination mit wildtypischem *dos* vom *TM6B* Balancerchromosom auszuschließen, aus je zehn *dos*^{R31}/*dos*^{R31} Larven die DNA mit dem QIAmp® Blood/Tissue Kit isoliert. Die erhaltene, säulengereinigte genomische DNA eignete sich gut für die Amplifikation durch PCR.

Zur Amplifikation des genomischen *dos* Bereiches wurde ein Set von Primern zusammengestellt, die den kompletten kodierenden Bereich nach Exons in sechs Fragmente unterteilen (Abb.: 3.4. A). Da Exon vier und fünf sehr klein sind wurden diese zusammengefaßt. Die Primer für das Amplifikat I (= Exon 1) basieren auf benachbarten Intronsequenzen, was auch für den forward Primer von Amplifikat II (= Exon 2) gilt. Die

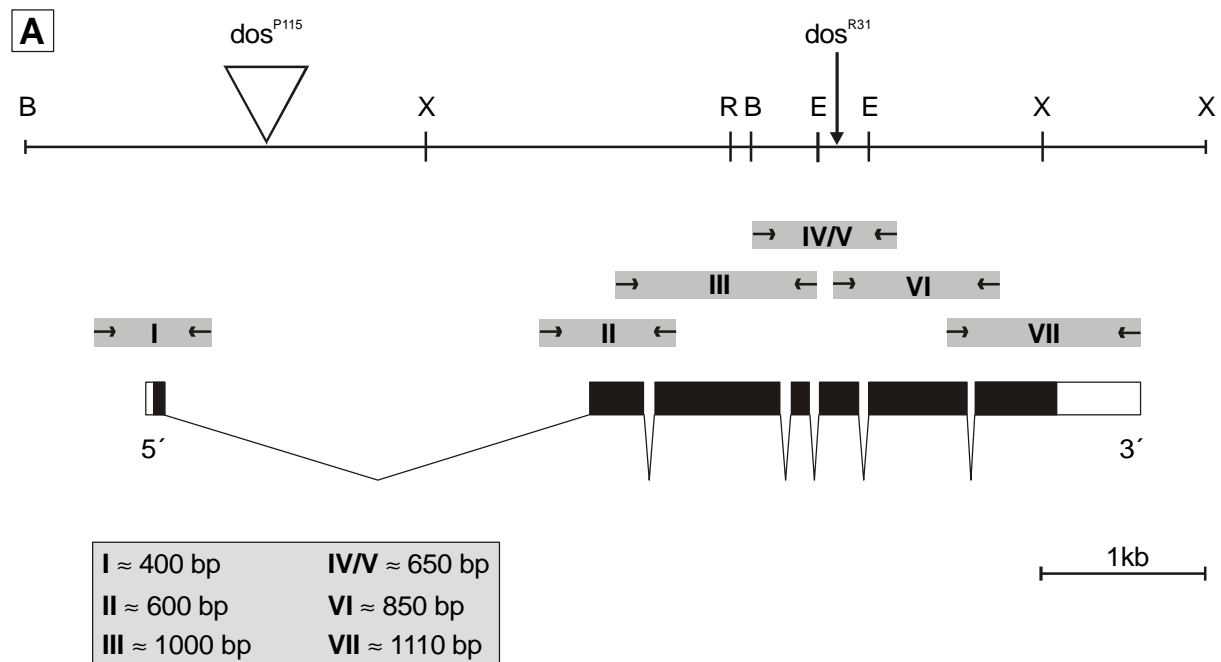
übrigen Primer wurden so gewählt, daß sich überlappende Fragmente ergaben, welche die Introns zwei bis sechs mit einschließen. Die Größe der Fragmente lag zwischen 400 bp und 1110 bp, was eine leichte und schnelle Amplifikation mit relativ geringer Fehlerrate ermöglichen sollte.

Im ersten Schritt wurden die Annealingtemperaturen und die MgCl₂ Konzentrationen für die einzelnen Primerpaare optimiert. Die optimale Annealingtemperatur lag für alle bei 55°C, die MgCl₂ Konzentration lag für Amplifikat II und III bei 1,6 mM und für IV/V, VI und VII bei 1,8 mM. Bis auf Amplifikat I konnten so für alle Primerkombinationen saubere Amplifikate gewonnen werden. Exon 1 konnte auch mit einem neuen Primerpaar und anderen Primersequenzen nicht amplifiziert werden, deshalb wurde nur mit den übrigen Produkten weiter gearbeitet.

Die Produkte der optimierten, genomischen PCR (Reaktionsansatz siehe Tabelle 3.2), die mit Taq Polymerase durchgeführt wurde, wurden mittels Gelelektrophorese auf ihre Größe überprüft und anschließend über Säulen aufgereinigt. Da die DNA Mengen für die Sequenzierung nicht ausreichend waren, wurde mit Pfu Polymerase (Reaktionsansatz siehe Tabelle 3.2) nachamplifiziert, um durch ihre „Proof-reading Aktivität“ die Fehlerrate bei der PCR möglichst gering zu halten und um glatte Enden bei den Produkten zu bekommen.

Genomische PCR mit Taq Polymerase		PCR mit Pfu Polymerase	
genom. DNA [0,4 - 0,5µg/µl]	2,5 µl	Primäramplifikat [0,1µg/µl]	1,0 µl
10 x Puffer	5,0 µl	10 x Pfu Puffer	10,0 µl
dNTP's [á 2 mM]	5,0 µl	dNTP's [á 25 mM]	0,8 µl
MgCl ₂ [16 bzw. 18 mM]	5,0 µl	Primer 1 [20 µM]	2,5 µl
á Primer [20 µM]	2,5 µl	Primer 2 [20 µM]	2,5 µl
H ₂ O	27,5 µl	H ₂ O	82,2 µl
Taq Polymerase	0,2 µl	Pfu Polymerase	1,0 µl
Gesamt	50,0 µl	Gesamt	100,0 µl

Tabelle 3.2.: Gegenüberstellung der unterschiedlichen Reaktionsansätze für PCR mit Taq und Pfu Polymerase.



B

Dos	1	MDRTFYEGWL	IKSPPTKRIW	RARWRRRYFT	LKQGEIPEQF	CLEYTTHNC	RKLKGVIDLD
R31	1	<u>MDRTFYEGWL</u>	<u>IKSPPTKRIW</u>	<u>RARWRRRYFT</u>	<u>LKQGEIPEQF</u>	<u>CFEYTDHNC</u>	<u>RKLKGVIDLD</u>
Dos	61	QCEQVDCGLR	LENRKQKFQY	MFDIKTPKRT	YLLAAETEAD	MRDWVNCICQ	VCHLHDTKQS
R31	61	QCEQVDCGLR	LENRKQKFQY	MFDIKTPKRT	YLLAAETEAD	MRDWVNCICQ	VCHLHDTKQS
Dos	121	NELPLGAVGA	DENRTQHTSS	SGGLSNSTQN	TTTTSLHSSA	GTTAPQASVP	<u>NAGCSAQLRR</u>
R31	121	NELPLGAVGA	DENRTQHTSS	SGGLSNSTQN	TTTTSLHSSA	GTTAPQASVP	<u>NVGGSAQLRR</u>
Dos	181	<u>PAVLEEQPMP</u>	SNAGNNNSDS	VYVNTTEYSNR	ETMCDANFD	QOELLSAAQQ	<u>QPPSPATAE</u>
R31	181	<u>PAVLEEQPMP</u>	SNAGNNNSDS	VYVNTTEYSNR	ETMCDANFD	QOELLSAAQQ	<u>QPPSPATAE</u>
Dos	241	YLNHSALIQ	QAAAAAAEQL	QQQQQAARL	AVSANGVVRK	LPEHLVLTQQ	TLAEAAAQQH
R31	241	YLNHSALIQ	QAAAAAAEQL	QQQQQAARL	AVSANGVVRK	LPEHLVLTQQ	TLAEAAAQQH
Dos	301	SSVQASPALS	TASGPYIPIS	ECFSGSERFL	PGVPLPGADL	AIPNNPTTPL	NNLDPKFYDT
R31	301	SSVQASPALS	TASGPYIPIS	ECFSGSERFL	PGVPLPGADL	AIPNNPTTPL	NNLDPKFYDT
Dos	361	PRSHNNIGLN	LTNDQSYSPK	ITNLSLQQLA	NNNASKQRSD	SDSESVFTDD	DEWAHPLPLR
R31	361	PRSHNNIGLN	LTNDQSYSPK	ITNLSLQQLA	NNNASKQRSD	SDSESVFTDD	DEWAHPLPLR
Dos	421	ENVDRSTRPS	DSSIENESFV	LTYSQRFASKM	PEEGGAIVPP	AEKSSKLAGA	ASLAEAGDQG
R31	421	ENVDRSTRPS	DSSIENESFV	LTYSQRFASKM	PEEGGAIVPP	AE*	
Dos	481	TLDKLAKVLK	NKNNLILDFK	ENEKIPRDLP	QLSDTENTSP	AIVARRNAHS	AFIEESYDIP
Dos	541	RSHQPPYYNV	NQLLGERPVT	SPHNSNPIAA	STPNLMAADL	GAVAAISAAA	NPGLMGEAQA
Dos	601	VASSPTSART	LPRHCYTNA	PTKMEGNVFR	YDFMEQADCP	PVNRKLPKPV	AGGLPVVEDK
Dos	661	PPEEFPKPP	VGVDQLTNKL	GAAQLQQPIG	PPSVDRKCKP	NAYKLGNSAT	MSPATRRSSG
Dos	721	APLSMVLPH	TDVHSPAAAN	AFFHETRTLP	RQQRHHPNS	PGSMVQHQ	TASAAAAMMS
Dos	781	LTAAAAPKQQ	AAAQTEHKLQ	YFDLVDVTKP	PLLNRSSMSV	GNLYSQGGNG	ASGMRFAGVE
Dos	841	AGGARAPVPS	SVVYRSVDFV	KTEAFKRIRE	ERESSGNK*		

Abbildung 3.4.: Sequenzierung von *dos*^{R31}. A) Schematische Darstellung der genomischen *dos* Region (oben), der Amplifikate (graue Balken) und der cDNA (schwarze und weiße Balken) im richtigen Größenverhältnis. Pfeile symbolisieren die Lage der Primer (5'-3' = forward, 3'-5' = revers). Die Größen der Fragmente sind in einem Kasten dargestellt. B) Vergleich der Aminosäuresequenzen von Dos und Dos^{R31}. Der nicht sequenzierte Bereich der N-terminalen 22 AS (Exon 1) ist kursiv und unterstrichen. Unterschiedliche Aminosäuren sind hervorgehoben, das Stopcodon (*) in Dos^{R31} ist mit einem Pfeil markiert.

Da eine direkte Sequenzierung der DNA nicht erfolgreich war und durch mehrfaches Nachamplifizieren potentielle Fehler akkumuliert werden, wurden die Fragmente zunächst mit dem pCR-Script™ Amp SK(+) Cloning Kit (Stratagene) subkloniert. Von jedem Fragment wurden anschließend mindestens zwei Amplifikate, die von unterschiedlichen genomischen *dos^{R31}/dos^{R31}* DNA Präparationen stammten, doppelsträngig sequenziert. Die erhaltenen Daten wurden mit dem DNAsis Computerprogramm ausgewertet, wobei nur die gegenüber der *dos* Sequenz veränderten Basen übernommen wurden, die in allen Sequenzen gleichzeitig auftraten. Veränderte Basen in Einzelsequenzen wurden auf Fehler der Polymerase zurückgeführt und nicht übernommen.

Anhand der Sequenzdaten konnte eine Aminosäuresequenz für Dos^{R31} erstellt werden. Da das erste Exon nicht amplifiziert werden konnte, fehlen für die ersten N-terminalen 22 Aminosäuren im Dos^{R31} Protein die entsprechenden Sequenzdaten. Die ermittelte Sequenz hat im Vergleich zum wildtypischen Dos Protein sechs veränderte Aminosäuren (Abb.: 3.4. B). Bei Ala¹⁷²→Val, Val¹⁸³→Phe und zweimal Leu²¹⁴⁺²⁴⁰→Phe bleibt der hydrophobe Charakter der Aminosäuren erhalten. Der Austausch von Ser¹⁷⁵→Phe ändert eine hydrophile in eine hydrophobe Seitengruppe, was Auswirkungen auf die Tertiärstruktur des Proteins haben könnte. Eine für die Proteinfaltung kritische Mutation ist der Austausch von Pro³²⁷→Gln, hier wird eine Iminosäure durch eine Aminosäure mit endständiger, ionisierbarer Aminogruppe getauscht. Mit Position 462 (Pfeil in Abb.: 3.4. B) endet das offene Leseraster durch ein Stopcodon in der *dos^{R31}* Sequenz, was zum Wegfall von 416 C-terminalen Aminosäuren führt. In dem fehlenden Bereich des Dos Proteins befinden sich drei potentielle SH2-Domänen Bindungsstellen. Zumindest für eine dieser Bindungsstellen konnte gezeigt werden, daß sie essentiell für die Dos Funktion ist (siehe Abschnitte 3.5, 3.7.3 und 3.8).

Die Ergebnisse zeigen, daß es sich bei *dos^{R31}* wahrscheinlich um ein „loss of function“ Allel handelt. Der Austausch von sechs Aminosäuren und der Verlust von drei möglichen Bindungsstellen für SH2-Domänen durch das Stopcodon könnte für die Letalität verantwortlich sein. Um die gefundenen Aminosäureaustausche eindeutig zu bestätigen, wäre zusätzlich der Vergleich mit den genomischen Sequenzdaten des zur Mutagenese verwendeten Ausgangsstammes notwendig.

3.4 *in vitro* Mutagenese von SH2-Domänen Bindungsstellen

Zur Untersuchung der potentiellen SH2 Domänen Bindungsstellen für Shc, PLCγ, PI3kinase und Csw im Dos Protein wurden durch *in vitro* Mutagenese jeweils die phosphorylierbaren Tyrosine in den Konsensussequenzen der Bindungsstellen gegen Phenylalanin ausgetauscht. Die fünf vorhergesagten Bindungsstellen für das Drk Protein wurden nicht näher untersucht.

Für den Austausch von Tyrosin gegen Phenylalanin mußte jeweils nur eine Base (Tyr: TA^{T/C} → Phe: TT^{T/C}) in der DNA Sequenz geändert werden. Die Mutagenese wurde mit dem QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) durchgeführt. Bei der Primersynthese wurde eine Länge von 36 bis 43 bp gewählt, um eine stabile Bindung an das Template zu ermöglichen (Primersequenzen siehe 2.3.).

Mutation	Bindungsstelle für:	Basentausch	Primer
Y316F	Shc	A ₉₉₂ →T	Y316F-1, Y316F-2
Y358F	PLCγ	A ₁₁₁₈ →T	Y358F-1, Y358F-2
Y537F	PLCγ	A ₁₆₅₅ →T	Y537F-1, Y537F-2
Y631F	PI3K	A ₁₉₃₇ →T	631Y-F1, 631Y-F2
Y801F	Csw	A ₂₄₄₇ →T	801Y-F1, 801Y-F2

Tabelle 3.3.: Übersicht über die durch *in vitro* Mutagenese eingeführten Mutationen.

Als Template diente das Plasmid pTW17, ein pBluescript II KS (+) in den die vollständige *dos* cDNA kloniert ist. Die Templatemenge betrug 50ng pro Ansatz, je Primer wurden 150ng eingesetzt. Da es für die Genauigkeit der Amplifikation noch keine Anhaltspunkte gab, wurde im Fall der Mutation der Csw Bindungsstelle (Y801F) die gesamte cDNA Sequenz überprüft. Die so erhaltenen Sequenzdaten wurden mit der cDNA Sequenz verglichen. Es traten keine Fehler bei der PCR auf, beide Sequenzen waren identisch bis auf die eingefügte Mutation A₂₄₄₇→T.

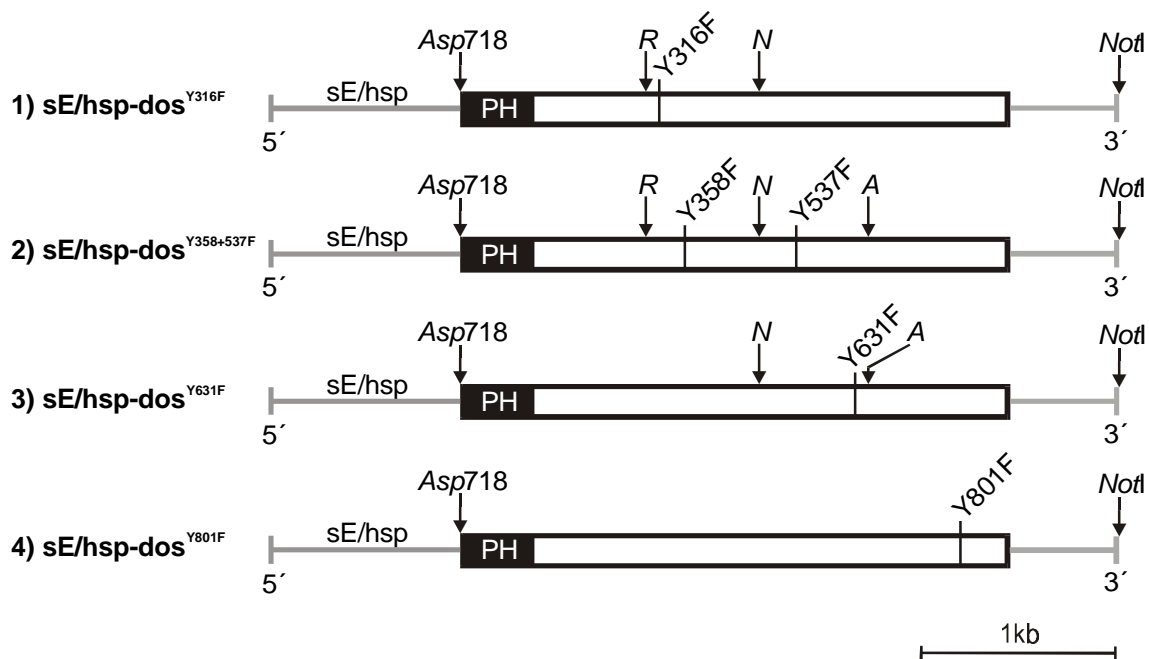


Abbildung 3.5.: Konstrukte mit mutierten SH2-Domänen Bindungsstellen. In grau sind die nicht translatierten 3' und 5' Regionen dargestellt. Das zur Genregulation benötigte sE/hsp-Element ist in den Transformationsvektor integriert, Asp718 und NotI wurden zur Klonierung der cDNA's in diesen Vektor verwendet. Die Mutationen von Konstrukt 1) bis 4) sind gekennzeichnet. Die Enzyme *RsrII* [R], *NheI* [N] und *AflIII* [A] wurden zur Subklonierung von mutierten Fragmenten bei Konstrukt 1) bis 3) verwendet.

Für die übrigen Punktmutanten wurde nach einer Möglichkeit gesucht den Umfang der Sequenzierungen zu minimieren. Drei Enzyme, die nicht im Vektor und nur einmal in der cDNA schneiden (*RsrII*, *NheI* und *AflIII*) waren dazu geeignet den Bereich der

Punktmutationen als kleine Fragmente (ca. 500 bis 800 bp) auszuschneiden. Die Fragmente konnten so, nachdem ihre Sequenz auf das Vorhandensein der eingeführten Punktmutation überprüft war, einfach in den Ausgangsvektor mit der verifizierten *dos* cDNA Sequenz (pTW17) getauscht werden. Alle Konstrukte sind in Abbildung 3.5. dargestellt.

Die Mutationen der Bindungsstellen für Shc, PI3Kinase und den zwei vorhergesagten PLC γ Bindungsstellen, die als Doppelmutation untersucht werden sollten, wurden nun nach folgendem Prinzip eingefügt. Zunächst wurde die *in vitro* Mutagenese mit dem QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit durchgeführt. Von jeweils mehreren unabhängigen Klonen mit der potentiellen Mutation wurde die DNA aufgereinigt und sequenziert. Für jede Mutation wurde mit einem positiven Klon weiter gearbeitet. Für *dos*^{Y316F} und *dos*^{Y358F} wurde der Bereich zwischen der *RsrII* und der *NheI* Schnittstelle doppelsträngig sequenziert, für *dos*^{Y631F} und *dos*^{Y537F} der Bereich zwischen *NheI* und *AfIII*. Anschließend wurden die Fragmente mit den entsprechenden Enzymen (Abb.: 3.5.) ausgeschnitten und im Austausch gegen die entsprechenden Bereiche in das pTW17 Plasmid kloniert. Für die PLC γ Doppelmutation *dos*^{Y358+537F} wurden zwei Fragmente im pTW17 Plasmid ausgetauscht. Dieses Konstrukt wurde komplett doppelsträngig sequenziert.

Für die Keimbahntransformation in Fliegenembryonen wurden die *dos* cDNA Konstrukte (*P[w⁺, sE/hsp-dos*]*, * bezeichnet die Position der getauschten Aminosäure) als *Asp718-NotI* Fragmente in einen modifizierten pW8 Vektor mit *white* Marker (Klemenz et al., 1987) kloniert (Abb.: 3.5.). In dem Transformationsvektor stehen die cDNA Konstrukte unter der Kontrolle des *hsp70* Promotors und eines duplizierten, 1,2 kb langen *sev* Enhancer Elements (Basler et al., 1991). Somit wird eine ubiquitäre Expression unter Hitzeschock und eine *sev* spezifische Expression in den *sev* exprimierenden Zellen der Augenimaginalscheibe ermöglicht.

Für jedes Konstrukt wurden mehrere voneinander unabhängige transformante Linien etabliert und der Insertionsort des P-Elementes auf Chromosomenebene bestimmt. Da *dos* auf dem dritten Chromosom liegt und die Funktion der Konstrukte in Abwesenheit von endogenem Dos Protein untersucht werden sollte, waren Insertionen auf dem dritten Chromosom für die weiteren Untersuchungen unbrauchbar.

Von den erhaltenen Transformanten P1 bis P21 wurden nur die homozygot vitalen und fertilen Linien aufgehoben und für die weiteren Untersuchungen verwendet. Eine Liste der Transformanten befindet sich im Anhang. Für die Mutation der PLC γ Bindungsstellen konnten nur Insertionen auf dem dritten Chromosom etabliert werden. Der Versuch durch Remobilisierung des P-Elementes neue Insertionen auf dem zweiten Chromosom zu erhalten blieb ohne Erfolg. Auf eine erneute Keimbahntransformation wurde verzichtet, da weitere Konstrukte getestet werden sollten (siehe 3.7.). Da für die *Csw* Mutation nur eine Insertion auf dem zweiten Chromosom gefunden werden konnte, wurden durch Remobilisierung der X-chromosomalen Linie P7 drei neue, unabhängige Insertionslinien etabliert (P3jo, P4jo und P11jo).

Mit Hilfe einer Westernblot Analyse (Abb.: 3.6.) wurde die Expression der Transgene überprüft. Für den Westernblot wurden je Konstrukt das Gesamtprotein von fünf

Fliegenköpfen nach einem einstündigen Hitzeschock auf ein Gel geladen. Als Kontrollen dienten Fliegenköpfe mit dem wildtypischen „Rescue Konstrukt“ $P[w^+, sE/hsp-dos]$ (Raabe et al., 1996) und Fliegenköpfe mit $P[w^+, sE/hsp-dos-GFP]$ der Linie DG38II (Schmidt, 1997). Der Blot wurde mit Maus anti-Dos (BB117/2) Antikörper inkubiert, der Signalnachweis erfolgte mit dem ECL Kit.

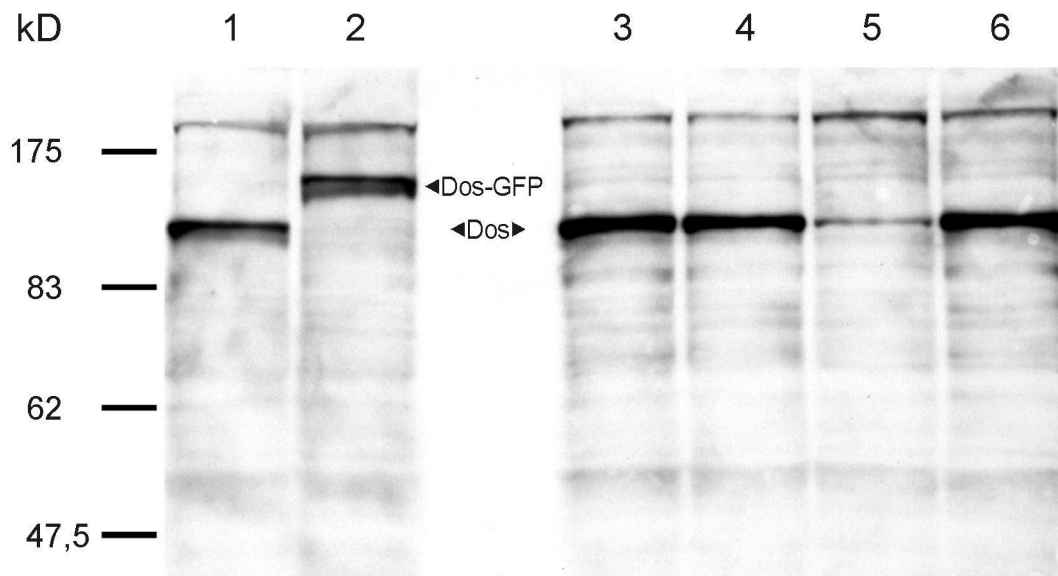


Abbildung 3.6.: Westernblot der $sE/hsp-dos$ Konstrukte. Die Fliegen wurden zunächst eine Stunde bei 37°C zur Hitzeschockinduktion gehalten, danach für drei Stunden bei 24°C, um die Expression der Transgene zu ermöglichen. Je Spur wurde das Gesamtprotein von fünf Köpfen aufgetragen.: (1) Linie 115T3 mit $P[w^+, sE/hsp-dos]$; (2) Linie DG38II mit $P[w^+, sE/hsp-dos-GFP]$; (3) Linie P10 mit $P[w^+, sE/hsp-dosY631F]$; (4) Linie P21 mit $P[w^+, sE/hsp-dosY316F]$; (5) Linie P12 mit $P[w^+, sE/hsp-dosY358+537F]$; (6) Linie P9 mit $P[w^+, sE/hsp-dosY801F]$.

Alle Transgene werden in den Fliegen exprimiert. Mit Ausnahme des Konstruktes für die PLC γ Bindungsstellen Mutante (Spur 5) -hier ist eine schwächere Bande zu sehen- ist die Stärke der Expression mit den Kontrollen (Spuren 1 und 2) vergleichbar. Die Menge an endogenem Dos Protein ist im Vergleich zur Transgen Expression sehr gering und ist nur als schwache Bande zu erkennen (Spur 2).

3.5 Letalitätsassay der $sE/hsp-dos$ Konstrukte

In einem ersten Assay sollte überprüft werden, ob die mutierten Transgene in der Lage sind, die Letalität der dos^{P115} und dos^{R31} Allele zu retten. Bei diesem sogenannten Letalitätsassay werden die Transgene in Abwesenheit von endogenem Dos durch Hitzeschock exprimiert. Hierfür darf das zu untersuchende P-Element nicht auf dem dritten Chromosom liegen. Durch das Auftreten von $P[w^+, sE/hsp-dos*]; dos^{R31} / dos^{R31}$, bzw. dos^{P115} / dos^{P115} Fliegen kann gezeigt werden, daß die mutierten Konstrukte ein für die Signaltransduktion funktionelles Dos Protein liefern. Treten solche Fliegen nicht auf, bedeutet die eingefügte Mutation den Verlust einer essentiellen Funktion des Dos Proteins. Das folgende Kreuzungsschema verdeutlicht die einzelnen Schritte des Assays.

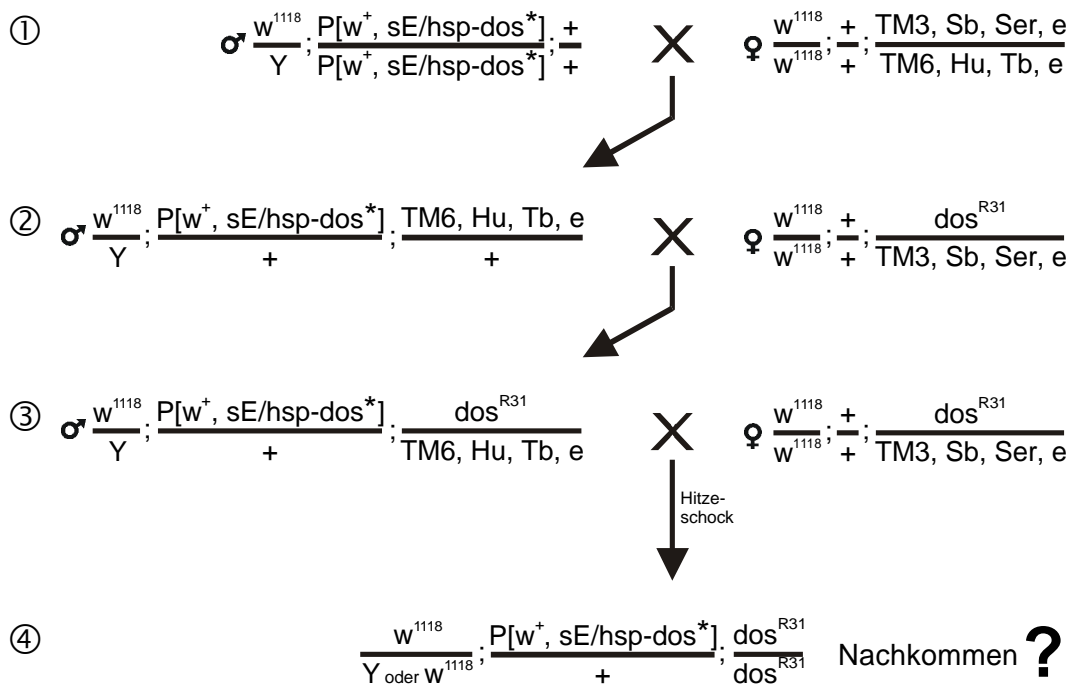


Abbildung 3.7.: Kreuzungsschema für den Letalitätsassay der $P[w^+, sE/hsp-dos^*]$ Konstrukte mit dos^{R31} . Auf der linken Seite sind die Genotypen der Männchen, auf der rechten die der verwendeten Jungfrauen dargestellt. Es sind nur die Chromosomen 1. bis 3. gezeichnet. Die Pfeile zeigen die Genotypen der Fliegen an, die weiter gekreuzt wurden. Nach Kreuzung 3 wurde ab dem Embryonalstadium viermal pro Tag für eine Stunde Hitzeschock gegeben.

Ausgehend von homozygoten, zweitchromosomalen Insertionslinien wurde zuerst ein Balancer für das dritte Chromosom eingekreuzt (Abb.: 3.7. 1). Die erhaltenen, für P-Element und TM6B-Balancer heterozygoten Fliegen wurden mit $dos^{R31} / TM3, Sb, Ser, e$ gekreuzt (Abb.:3.7. 2). Für die dritte Kreuzung wurden $P[w^+, sE/hsp-dos^*] / +; dos^{R31} / TM6B, Hu, Tb, e$ mit $dos^{R31} / TM3, Sb, Ser, e$ Fliegen gekreuzt (Abb.: 3.7. 3). Nach etwa zwei Tagen, wenn genügend Eier gelegt waren, wurden die Fliegen auf neue Gläser gesetzt. Die Gläser mit den Embryonen wurden in einem Brutschrank bei 24°C gehalten. Es wurde viermal am Tag für eine Stunde 37°C Hitzeschock gegeben, um die Transgene während der gesamten Entwicklung zu exprimieren. Durch drei- bis viermaliges Umsetzen der Fliegen nach der letzten Kreuzung wurde eine große Nachkommenszahl erreicht. Das letzte Breiglas der Kreuzungen wurde als Kontrolle bei 18°C gehalten. Da hier kein Hitzeschock gegeben wurde, wurden die Transgene hier nicht ubiquitär sondern nur in den Sev exprimierenden Zellen exprimiert. Da Dos nicht nur bei der Sevenless Signaltransduktion eine wichtige Rolle spielt, sondern auch bei der Torso und DER vermittelten Signaltransduktion in der Larval- und Embryonalentwicklung (Raabe et al., 1996), wurde davon ausgegangen, daß es bei den 18°C Kontrollen nicht zur Rettung der Letalität von dos^{R31} kommen kann.

Setzt man 100% Rettung für ein Transgen voraus, so erwartet man unter den rotäugigen Nachkommen der dritten Kreuzung 25% die homozygot für dos^{R31} sind. Die übrigen rotäugigen Fliegen sind entweder heterozygot für dos^{R31} (50%) oder $TM3, Sb, Ser, e / TM6B,$

Hu, Tb, e (25%). Für die Auswertung wurde die maximal zu erwartende Zahl der geretteten Fliegen gleich 100% Rettung gesetzt. Da *TM3, Sb, Ser, e / TM6B, Hu, Tb, e* Fliegen entweder gar nicht oder in viel zu geringer Anzahl (unter 1% des erwarteten Wertes) auftraten und für zwei Konstrukte mehr als 100% Rettung eintrat, wurde jeweils noch ein korrigierter Wert ermittelt, bei dessen Berechnung der *TM3, Sb, Ser, e / TM6B, Hu, Tb, e* Genotyp nicht mitgerechnet wurde. In der folgenden Tabelle sind die Ergebnisse zusammengefaßt.

Fliegenlinie	Konstrukt	Rettung gesamt	Rettung korrigiert
P1	P[w ⁺ , sE/hsp-dosY631F]	126,0%	95,0%
P3	P[w ⁺ , sE/hsp-dosY631F]	0,0%	0,0%
P10	P[w ⁺ , sE/hsp-dosY631F]	61,5%	46,3%
P20	P[w ⁺ , sE/hsp-dosY316F]	18,5%	14,4%
P21	P[w ⁺ , sE/hsp-dosY316F]	108,0%	81,0%
P9	P[w ⁺ , sE/hsp-dosY801F]	0,0%	0,0%
P3jo	P[w ⁺ , sE/hsp-dosY801F]	0,0%	0,0%
P4jo	P[w ⁺ , sE/hsp-dosY801F]	0,0%	0,0%
P11jo	P[w ⁺ , sE/hsp-dosY801F]	0,0%	0,0%

Tabelle 3.4.: Ergebnisse des Letalitätsassays. Rettung gesamt ist bezogen auf drei mögliche Genotypen für das dritte Chromosom bei rotäugigen Fliegen. Die maximal erwartete Anzahl (25%) geretteter Fliegen entspricht 100% Rettung. Rettung korrigiert rechnet den Doppel-Balancer Genotyp nicht mit ein. Hier beträgt die maximal erwartete Anzahl geretteter Fliegen 33% in der Nachkommenschaft und entspricht 100% Rettung in der Tabelle.

Der Letalitätsassay konnte nicht mit den $P[w^+, sE/hsp-dos^{Y358+537F}]$ Fliegen durchgeführt werden, da es nur Insertionen auf dem dritten Chromosom gab. Der Lethalitätsassay wurde jedoch zu einem späteren Zeitpunkt mit einem neuen Konstrukt durchgeführt (siehe 3.7.2.).

Das Ergebnis des Assays zeigt, daß die Mutation der Csw Bindungsstelle (Y801F) den Verlust der Proteinfunktion zur Folge hat. Bei keiner der vier getesteten Linien konnte eine gerettete Fliege beobachtet werden, die Rettung betrug somit 0,0%. Die übrigen Genotypen bei diesen Kreuzungen traten in völlig normalen Verhältnissen auf. Da es sich bei Fliegenstämmen P9, P3jo, P4jo und P11jo um unabhängige Insertionslinien handelt und die Ergebnisse der einzelnen Kreuzungen identisch sind, kann gesagt werden, daß die Bindung von Csw an Dos eine essentielle Funktion in der Rezeptor-Tyrosin-Kinase vermittelten Signaltransduktion besitzt. Der Verlust dieser Interaktion führt zur Letalität.

Von den Fliegenstämmen mit der Mutation der PI3Kinasen Bindungsstelle (Y631F) zeigten zwei (P1 und P10) Rettung der Letalität. Bei der Fliegenlinie P3 konnte keine Rettung beobachtet werden. Da sich für dieses Konstrukt Werte von 46,3% und 95% Rettung ergeben,

wurde der Interaktion zwischen der PI3Kinase und Dos keine essentielle Funktion bei der Signaltransduktion zugeschrieben. Die Tatsache, daß eine Linie im Test keine Rettung zeigte kann auf einen „second site“ Effekt, bedingt durch den Insertionsort des P-Elementes im Genom, zurückgeführt werden, oder darauf, daß das P-Element defekt ist. Die geretteten Fliegen aus den Kreuzungen mit P1 und P10 hatten keine phänotypischen Besonderheiten, sie waren völlig wildtypisch.

Beide Fliegenlinien mit der Mutation der Shc Bindungsstelle (Y316F) zeigten eine Rettung der Letalität von *dos^{R31}*. P20 zeigt 14,4% und P21 81% Rettung. Die geretteten Fliegen hatten einen wildtypischen Phänotyp und waren vital. Dieses Ergebnis zeigt, daß die Mutation der potentiellen Bindungsstelle für Shc Y316F keinen Einfluß auf die Funktion des Dos Proteins hat. Aufgrund der Ergebnisse für die Mutationen der Shc und PI3Kinasen Bindungsstellen kann eine mögliche Interaktion mit Dos nicht ausgeschlossen werden, sie zeigen nur, daß die Bindungsstellen für die Funktion von Dos nicht essentiell sind.

Der Letalitätsassay wurde auch mit *dos^{P115}* durchgeführt. Das Kreuzungsschema und die Durchführung wurden gegenüber den vorgenannten nicht verändert. Da sowohl die *sE/hsp-dos* Konstrukte als auch *dos^{P115}* einen *white* Marker tragen, mußten die Genotypen durch unterschiedlich intensive Pigmentierung der Augen unterschieden werden (kräftigeres Rot der Augen, je mehr *white* Kopien in den Fliegen sind). Hier wurden keine Fliegen ausgezählt, sondern nur auf Rettung geachtet. Für die einzelnen Konstrukte konnten die Ergebnisse mit *dos^{R31}* bestätigt werden.

3.6 *sev^{S11}*-Assay

Ein weiterer Assay sollte Aufschluß über die Funktionalität der *sE/hsp-dos* Konstrukte bei der Determination und Entwicklung der Photorezeptorzellen geben. Grundlage für diesen Test ist eine konstitutiv aktivierte Form des Sev Proteins, *Sev^{S11}* (Basler et al., 1991), die heterozygot in Fliegen einen „rauhe Augen“ Phänotyp durch die Rekrutierung von zusätzlichen R7 Zellen verursacht. Semidünnschnitte durch Augen von *sev^{S11} / +* Fliegen zeigen einen charakteristischen Multi R7 Phänotyp (Abb.: 3.9). In den meisten Ommatidien befinden sich statt nur einer, wie im Wildtyp, viele R7 Zellen, da durch die konstitutive Aktivierung des Sev Rezeptors nicht nur die R7 Vorläuferzellen, sondern auch eine unterschiedliche Anzahl von Vorläufern der Kegelzellen zu R7 Photorezeptorzellen determiniert werden.

Wie bereits erwähnt, wurden beide *dos* Allele *dos^{R31}* und *dos^{P115}* in einem Screen nach Suppressoren dieses raue Augen Phänotyps gefunden. Nimmt man Downstream-Komponenten der Signaltransduktionskaskade weg, oder verringert ihre Aktivität, kann der Multi R7 Phänotyp wieder revertiert werden (Abb.: 3.9). Die beiden Allele *dos^{R31}* und *dos^{P115}* unterdrücken im heterozygoten Zustand den *Sev^{S11}* Phänotyp. In den meisten Ommatidien findet man nur eine R7 Zelle (Raabe et al., 1996).

II-chromosomale Insertionen

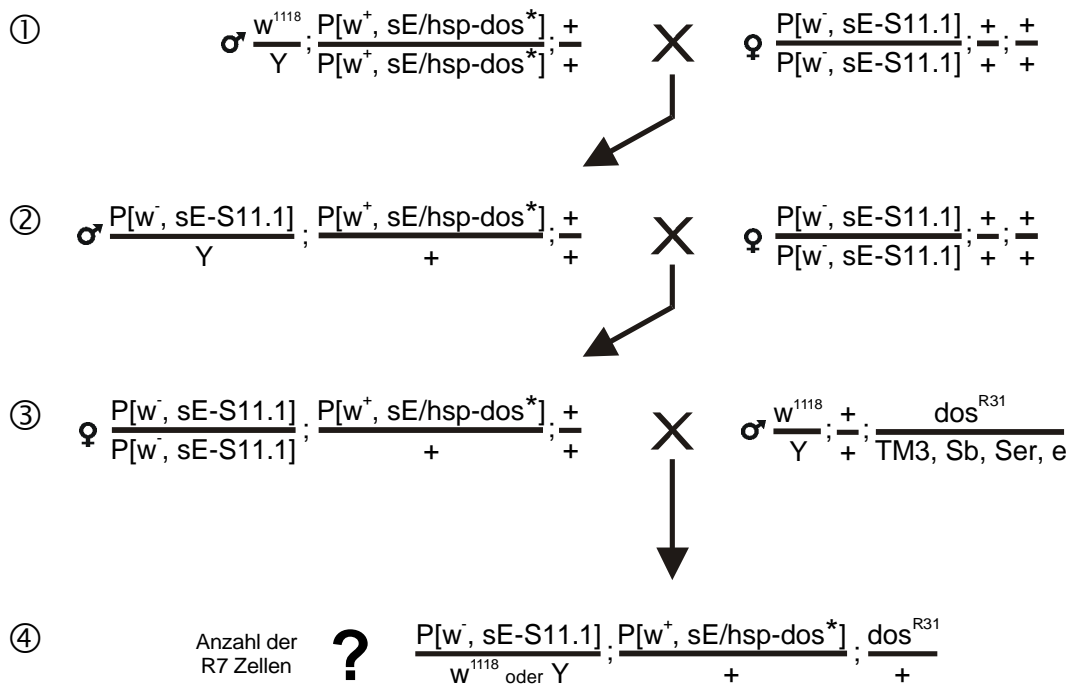


Abbildung 3.8.: Kreuzungsschema für den *sev^{S11}* Assay für zweitchromosomale P-Element Insertionen. Auf der linken Seite sind die Genotypen der Fliegen dargestellt die weiter gekreuzt wurden, rechts die Genotypen der eingekreuzten Fliegen. Weitere Erläuterungen im Text.

Im *sev^{S11}* Assay sollten Fliegen untersucht werden, die für *sev^{S11}*, *dos^{R31}* und *P[w⁺, sE/hsp-dos*]* jeweils heterozygot sind. Die Anzahl der R7 Zellen sollte ein Maß für die Funktionalität der getesteten Konstrukte in der Sevenless Kaskade sein.

Homozygote, männliche *P[w⁺, sE/hsp-dos*]* Fliegen wurden mit homozygoten Weibchen einer X-chromosomalen *P[w⁻, sE-S11.1]* Linie gekreuzt (Abb.: 3.8.). Dieser und der folgende Schritt sind für Insertionen von *P[w⁺, sE/hsp-dos*]* auf dem 2. oder 3. Chromosom gleich. Durch die zweite Kreuzung, wiederum mit homozygoten *P[w⁻, sE-S11.1]* Weibchen, wurden weibliche Nachkommen erzeugt, die homozygot für *P[w⁻, sE-S11.1]* und heterozygot für *P[w⁺, sE/hsp-dos*]* waren. Mit dem dritten Kreuzungsschritt wurde das *dos^{R31}* Allel eingekreuzt. Von den erhaltenen Nachkommen des Genotyps *P[w⁻, sE-S11.1]; P[w⁺, sE/hsp-dos*]; dos^{R31}* wurde mit Hilfe von Semidünnschnitten durch das Auge die Anzahl der R7 Zellen ausgewertet. Die Genotypen der einzelnen Kreuzungen, sowie der zur weiteren Untersuchung verwendeten Nachkommen ist in Abbildung 3.8. dargestellt. Bei diesem Assay wurde im Gegensatz zu oben beschriebenem Letalitätsassay kein Hitzeschock zur ubiquitären Expression der Transgene benötigt. Ihre durch die *sevenless* Enhancer Sequenzen getriebene Expression bei der Augenentwicklung ist ausreichend zur Beobachtung von Effekten der Transgene auf den Multi R7 Phänotyp von *sev^{S11}*.

Für die X-chromosomale Insertionslinie P1 mußte ein zusätzlicher Kreuzungsschritt durchgeführt werden, da in der letzten Kreuzung weibliche *P[w⁺, sE/hsp-dos*] / P[w⁻, sE-*

S11.1] Fliegen mit $P[w^-, sE-S11.1] / Y; +/+; dos^{R31} / TM3, Sb, Ser, e$ Männchen gekreuzt werden sollten. Somit wurde sichergestellt, daß alle weiblichen Nachkommen die $P[w^-, sE-S11.1]$ Insertion tragen.

Zur Auswertung des Assays wurden die Fliegenköpfe mit OsO_4 fixiert und in Epon eingebettet. Anschließend wurden Semidünnschnitte ($1\mu m$) von den Augen angefertigt und diese unter dem Lichtmikroskop untersucht.

Die Augenschnitte von $P[w^+, sE/hsp-dos^*]$ transgenen Fliegen, die jeweils noch eine Kopie $P[w^-, sE-S11.1]$ und dos^{R31} tragen, wurden mit den von Wildtyp, $P[w^-, sE-S11.1] / +$, $P[w^-, sE-S11.1] / + ; dos^{R31} / +$ und $P[w^-, sE-S11.1] / + ; P[w^+, sE/hsp-dos-GFP] / +$ Fliegen verglichen, um Aufschluß darüber zu bekommen, ob die verschiedenen SH2-Domänen Bindungsstellen eine essentielle Rolle für die Funktion des Dos Proteins spielen. Es wurden folgende Fliegenlinien in diesem Assay verwendet: P1 und P10 für die Mutation der putativen PI3Kinasen Bindungsstelle, P20 und P21 für die Shc-Mutation, P12 und P15 für die PLC γ Doppelmutation und P9 und P11jo für die Mutation in der Csw Bindungsstelle. Da die Ergebnisse für verschiedene Linien eines Konstruktes gleich waren, wird in der nachfolgenden Abbildung jeweils nur ein Schnitt pro Konstrukt dargestellt.

Der Schnitt durch das Wildtyp Auge (Abb.: 3.9. A) zeigt die regelmäßige Anordnung der Rhabdomere in den einzelnen Ommatidien, die durch die Pigmentgranula der Pigmentzellen deutlich voneinander abgegrenzt sind. Die äußeren Photorezeptorzellen R1 bis R6 (R1 liegt unten, R2 bis R6 schließen sich gegen den Uhrzeigersinn an) besitzen große Rhabdomere, die inneren Rezeptoren R7 und R8 haben kleinere Rhabdomere. Da die Rhabdomere der R7 und R8 Photorezeptoren in den Ommatidien so angeordnet sind, daß sie bei Betrachtung eines Längsschnittes durch ein Ommatidium genau übereinander liegen, kann man in Querschnitten durch das Auge nur jeweils sieben Rhabdomere erkennen. Die Schnittebene wurde daher stets so gewählt, daß man sich im Bereich der R7 Zelle befindet.

Der Multi R7 Phänotyp von sev^{S11} Fliegen, der zu einer rauhen Augenoberfläche führt, ist gut zu erkennen (Abb.: 3.9. B). In nahezu allen Ommatidien befinden sich zwei bis vier R7 Zellen. Die Stärke dieses Phänotyps ist abhängig von der Temperatur bei der Aufzucht (bei $25^\circ C$ mehr zusätzliche R7 Zellen als bei $18^\circ C$) und davon, ob die Fliegen homo- oder heterozygot sind (Basler et al., 1991).

In heterozygotem Zustand kann dos^{R31} den Multi R7 Phänotyp von sev^{S11} fast ganz unterdrücken. Es treten nur vereinzelt Ommatidien auf, die mehr als eine R7 Zelle besitzen (Abb.: 3.9. C), die Mehrzahl zeigt eine wildtypische Anordnung und Anzahl der Photorezeptorzellen (Raabe et al., 1996).

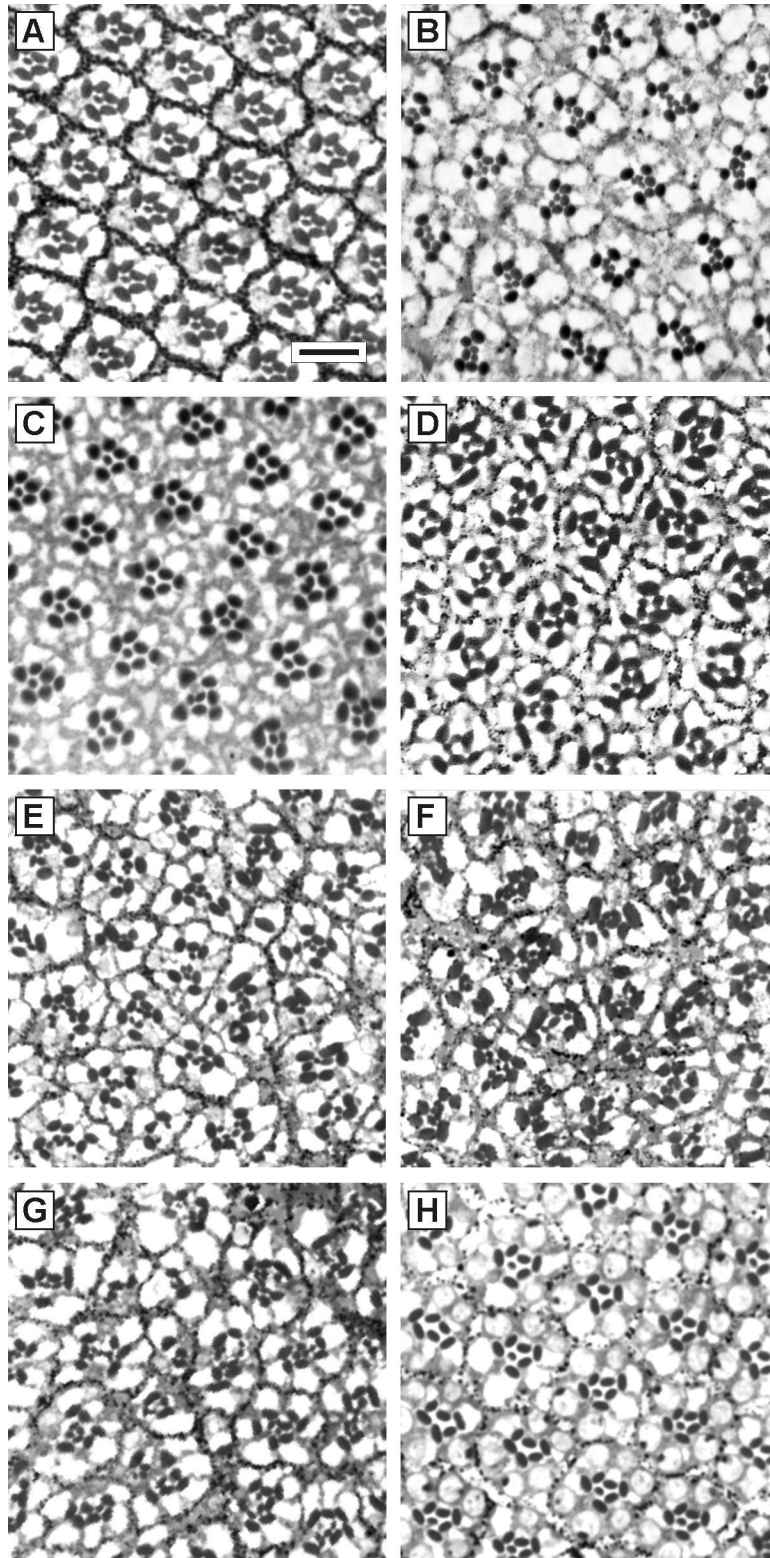


Abbildung 3.9.: Augenschnitte des *sev^{S11}* Assays. **A)** Wildtyp; **B)** $P[\bar{w}, sE-S11.1] / +$, **C)** $P[\bar{w}, sE-S11.1] / + ; dos^{R31} / +$, **D)** $P[\bar{w}, sE-S11.1] / + ; P[w^+, sE/hsp-dos-GFP] / +$, **E)** $P[\bar{w}, sE-S11.1] / + ; P[w^+, sE/hsp-dosY631F] / + ; dos^{R31} / +$, **F)** $P[\bar{w}, sE-S11.1] / + ; P[w^+, sE/hsp-dosY316F] / + ; dos^{R31} / +$, **G)** $P[\bar{w}, sE-S11.1] / + ; P[w^+, sE/hsp-dosY358+537F] / + ; dos^{R31} / +$, **H)** $P[\bar{w}, sE-S11.1] / + ; P[w^+, sE/hsp-dosY801F] / + ; dos^{R31} / +$. Der eingezeichnete Größenmarker entspricht 10 μ m.

Hat ein zu untersuchendes Transgen wildtypische Dos Funktion, so erwartet man in einem $P[w^-, sE-S11.1] / + ; dos^{R31} / +$ Hintergrund wieder einen Multi R7 Phänotyp, da in diesem Fall der Verlust einer Kopie des *dos* Gens ($dos^{R31} / +$) durch Expression des Transgens in allen Sev exprimierenden Zellen kompensiert wird. Für $P[w^+, sE/hsp-dos-GFP]$ wurde diese Annahme bestätigt (Abb.: 3.9. D). Die Linie DG38II (Schmidt, 1997) zeigte im *sevS11* Hintergrund zwei und mehr R7 Zellen je Ommatidium, d.h. es findet keine Suppression statt. Für die Mutationen in den PI3Kinasen, Shc und PLC γ SH2-Domänen Bindungsstellen (Abb.: 3.9. E bis G) wurde dasselbe Ergebnis beobachtet. In allen Ommatidien findet man mehr als eine R7 Zelle (teilweise bis zu sechs). Die Anordnung der äußeren Photorezeptoren ist stark beeinträchtigt, es konnte keine regelmäßige Anordnung mehr gefunden werden. In einigen Ommatidien kommt es jedoch auch zum Verlust von äußeren Photorezeptorzellen, was daher kommen könnte, daß deren Vorläuferzellen während der larvalen Augenentwicklung zu R7 Zellen determiniert wurden. Der Verlust der Bindungsstellen für PI3K Kinase Shc und PLC γ führt folglich nicht zum Verlust der Dos Funktion bei der Signalübertragung in der R7 Zellentwicklung.

Im Gegensatz hierzu führt die Mutation der Csw Bindungsstelle zum Verlust der Dos Funktion (Abb.: 3.9. H). Die durch $dos^{R31} / +$ verursachte Suppression des Multi R7 Phänotyps kann durch das $P[w^+, sE/hsp-dos^{Y801F}]$ Transgen nicht revertiert werden. Bei allen untersuchten Schnitten fanden sich keine Ommatidien die mehr als eine R7 Zelle besitzen. Hingegen traten hier Zellcluster auf, denen die R7 Zelle ganz fehlte (ungefähr 25% der Ommatidien), was auf einen dominant-negativen Effekt des mutierten Transgens schließen läßt, da die Suppression noch weiter verstärkt wird. Die Csw SH2-Domänen Bindungsstelle im Dos Protein hat also eine essentielle Funktion. Ihr Fehlen bewirkt die Suppression des Multi R7 Phänotyps, teilweise wird auch die Entwicklung einer R7 Zelle in Anwesenheit von konstitutiv aktiviertem Sev und heterozygotem Dos^{R31} verhindert. Die Ergebnisse der beiden Assays zeigen in guter Übereinstimmung, daß von den untersuchten, möglichen Bindungsstellen nur die Csw Bindungsstelle eine wichtige Funktion für das Dos Protein *in vivo* hat.

3.7 Etablierung von genomischen *dos* Rescue Konstrukten

Da bei den bisher verwendeten Assays mit Expression der Transgene unter der Kontrolle von *sevenless* Enhancer und *hsp70* Promotor nicht ausgeschlossen werden kann, daß die ubiquitäre, ektopische Expression Einfluß auf den beobachteten Phänotyp hat, wurde eine Möglichkeit gesucht, dieses Problem zu umgehen. Die Klonierung des endogenen *dos* Enhancer/Promotor Elements sollte eine Expression der Transgene entsprechend dem endogenen *dos* Gen ermöglichen. Deshalb sollten die Konstrukte mit den eingeführten Mutationen unter die Kontrolle der *dos* Regulationssequenzen gestellt werden.

3.7.1 Konstrukte mit endogenem Enhancer/Promotor

Ausgehend von der genomischen Organisation der *dos* Transkriptionseinheit und der Tatsache, daß die Transkriptionseinheit des 5' benachbarten Gens weniger als 500 bp von der des *dos* Gens entfernt liegt, wurde angenommen, daß sich alle regulatorischen Sequenzen in der kurzen intergenischen Region und im ersten, großen Intron befinden (Abb.: 3.10. A). Deshalb sollte ein Bereich ca. 500 bp vor dem 5' Ende des *dos* Gens bis ins dritte Exon als genomisches *Bam*HI Fragment mit dem 3' Rest der cDNA fusioniert werden. Genomische Klone, welche die gesamte *dos* Transkriptionseinheit umfassen, wurden aus einer λ GEM11 Phagen Bibliothek isoliert. Nach einem Präparativverdau der Phagen DNA mit *Bam*HI wurden die einzelnen Fragmente in einen pBluescript II KS(+) subkloniert. Der Plasmidklon mit einem 4,3 kb Fragment, welches den genomischen 5' Bereich der *dos* Region beinhaltet, wurde durch Southernblot Analyse bestimmt und zusätzlich von beiden Enden ansequenziert. Da für die Fusion der genomischen Sequenz mit der cDNA Sequenz wichtig war, daß die Klonierung im Leseraster und in der richtigen Orientierung erfolgt, wurde der genomische 5' *dos* Bereich als *Bam*HI-*Rsr*II Fragment im dritten Exon über die *Rsr*II Schnittstelle mit der cDNA aus pTW17 fusioniert. Das erhaltene Grundkonstrukt *genE-dos* wurde im Bereich der Fusion sequenziert, um Fehler auszuschließen.

Da das von diesem Konstrukt gebildete Protein in Fliegen nicht von endogenem Dos unterschieden werden kann, wurde ein GFP-tag angehängt. Hierzu wurde das genomische *Bam*HI-*Rsr*II Fragment in das *dos-GFP* (Schmidt, 1997) Grundkonstrukt kloniert. Das resultierende *genE-dos-GFP* Konstrukt (Abb.: 3.10. B) wurde ebenfalls durch Sequenzierung des Fusionsbereiches überprüft.

Die eingefügten Mutationen der SH2-Domänen Bindungsstellen (siehe 3.4.) sollten nun in das *genE-dos-GFP* Konstrukt eingeführt werden. Hierzu sollten wiederum nur kleinere Fragmente mit der entsprechenden Mutation ausgetauscht werden. Zum Einfügen der Shc-Mutation Y316F wurde ein *Rsr*II-*Nhe*I Fragment, für die PLC γ Doppelmutation Y358+537F ein *Rsr*II-*Afl*III Fragment und für die mutierte PI3Kinasen Bindungsstelle Y631F ein *Nhe*I-*Afl*III Fragment im *genE-dos-GFP* Konstrukt ausgetauscht (Abb.: 3.10. B). Die Plasmide wurden anschließend in Bakterien transformiert, durch Midipräparation gereinigt und sequenziert.

Für die Einführung der Csw Bindungsstellen Mutation Y801F mußte eine neue PCR zur Mutagenese durchgeführt werden, da die in der Abbildung eingezeichnete *Bg*III Schnittstelle (Schmidt, 1997) nur bei GFP-getaggten Konstrukten vorhanden ist und eine Klonierung als Fragment, durch das Fehlen einer geeigneten 3' Restriktionsschnittstelle, nicht möglich war. Als Template für die Mutagenese diente das *sE/hsp-dos-GFP* Konstrukt. Die Mutagenese wurde durch Sequenzierung überprüft, ehe das *Afl*III-*Bg*III Fragment mit der Y801F Mutation in das *genE-dos-GFP* Konstrukt ligiert wurde.

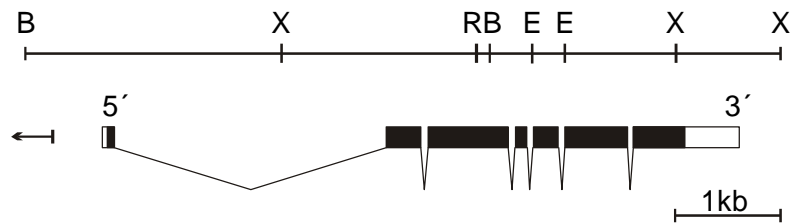
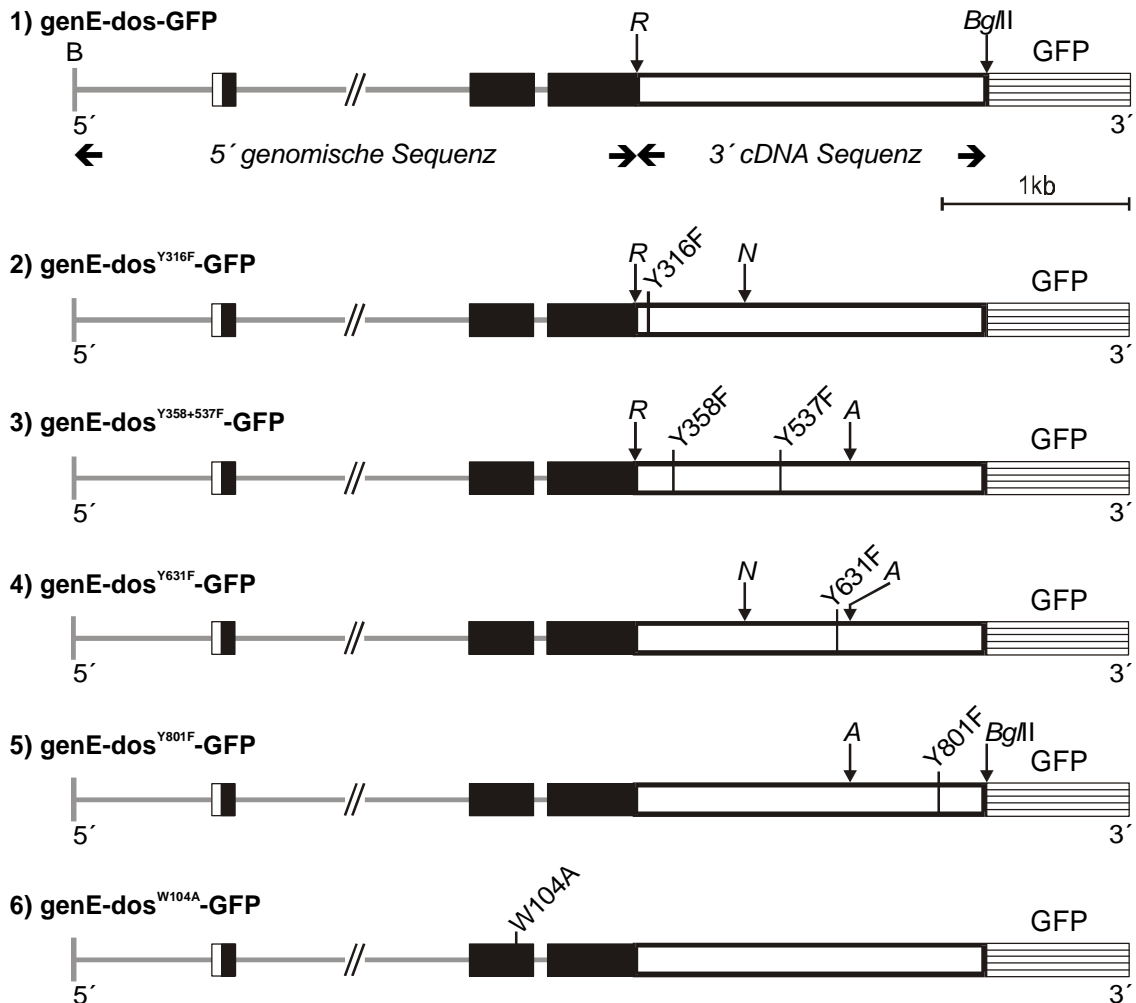
A**B**

Abbildung 3.10.: Darstellung der *genE-dos** Konstrukte. In A) ist die genomische *dos* Region (oben) und die Exon-Intron Struktur (darunter) des transkribierten Bereiches dargestellt. Die translatierten Bereiche sind durch schwarze Balken dargestellt. Ein Pfeil am 5' Ende markiert die Lage der benachbarten Transkriptionseinheit. B) Maßstabsgetreue Darstellung der Konstrukte. Der weiße dick umrandete Balken steht für den cDNA Anteil der Konstrukte, der GFP-tag ist gestreift. Der genomische Anteil der Konstrukte ist farblich wie unter A) dargestellt. Die genomische 5' Sequenz und die ersten beiden Introns sind als grauer Balken dargestellt. Der doppelte Schrägbalken steht für 1,5 kb nicht dargestellte Intronsequenz. Die Mutationen sind gekennzeichnet und die Schnittstellen der verwendeten Enzyme eingezeichnet. *AfIII* (A), *BamHI* (B), *BgIII*, *EcoRI* (E), *NheI* (N), *RsrII* (R) und *XhoI* (X).

Die Mutation W104A betrifft die PH-Domäne. Ein für die Tertiärstruktur wichtiges Tryptophan ist gegen ein Alanin ausgetauscht, dies hat möglicherweise Auswirkungen auf die Proteinfaltung. Die Expression von Transgenen mit dieser Mutation kann die Letalität der *dos* Allele nicht retten, und im *sev^{S11}* Hintergrund können die Transgene die Suppression des Multi R7 Phänotyps durch *dos^{R31}* / + nicht revertieren (Schmidt, 1997). Die Mutation sollte zur Ergänzung der bisher erhaltenen Ergebnisse zusätzlich unter der Kontrolle des endogenen *dos* Enhancer/Promotor Elements untersucht werden. Da eine Klonierung mit Restriktionsenzymen nicht möglich war, wurde sie durch eine Mutagenese PCR direkt in das *genE-dos-GFP* Konstrukt eingeführt. Das erhaltene Plasmid wurde im Bereich der Mutation sequenziert.

Für die Transformation in Fliegen mußten die Konstrukte in einen P-Element Vektor umkloniert werden. Hierzu wurde ein modifizierter pUC8 Vektor mit einem *yellow* Marker verwendet. Dieser wurde von E. Hafen (Zürich) zur Verfügung gestellt und besitzt keine regulatorischen Elemente, welche die Expression einklonierter Transgene steuern können. Da das *Asp718-NotI* Fragment, welches das komplette Konstrukt einschließt, eine Größe von ca. 7 kb besitzt und Klonierungen mit zunehmender Fragmentgröße schwieriger werden, wurde zunächst nur das Grundkonstrukt *genE-dos-GFP* in den Transformationsvektor ligiert. In dieses *P[y⁺, genE-dos-GFP]* Konstrukt wurden durch Austausch des *RsrII-BglII* Fragmentes die einzelnen Punktmutanten der SH2-Domänen Bindungsstellen eingefügt. Die PH-Domänen Mutante *genE-dos^{W104A}-GFP* wurde als *Asp718-NotI* Fragment in den Transformationsvektor kloniert, da hier ebenfalls keine geeigneten Schnittstellen gefunden wurden.

Zur Keimbahntransformation wurde Qiagen gereinigte Plasmid DNA verwendet. Die Transformation erfolgte in *yw¹¹¹⁸* Fliegenembryonen, um die Anwesenheit des Transgens am *yellow* Marker erkennen zu können. Der Insertionsort der P-Elemente wurde auf die Chromosomen bestimmt, die hierfür benötigten Balancerstämme für das 2. und 3. Chromosom mußten zunächst ebenfalls in einen *yw¹¹¹⁸* Hintergrund gekreuzt werden.

Im Rahmen der Arbeit wurden für die Konstrukte *P[y⁺, genE-dos]*, *P[y⁺, genE-dos-GFP]*, *P[y⁺, genE-dos^{Y358+537F}-GFP]*, *P[y⁺, genE-dos^{Y801F}-GFP]* und *P[y⁺, genE-dos^{W104A}-GFP]* jeweils mindestens zwei unabhängige Fliegenstämme etabliert. Da die weiteren Experimente im *dos^{R31}* und *dos^{P115}* Hintergrund durchgeführt werden sollten, waren drittchromosomale Insertionen unerwünscht und wurden verworfen. Eine Liste der transgenen Fliegenstämme befindet sich im Anhang.

Die Expression der Transgene wurde mittels Westernblot Analyse überprüft. Hierfür wurden je Konstrukt zehn Köpfe einer Fliegenlinie homogenisiert und das Gesamtprotein durch Gelelektrophorese aufgetrennt. Der Westernblot wurde mit Maus anti-Dos inkubiert und der Signalnachweis erfolgte mit dem ECL Kit.

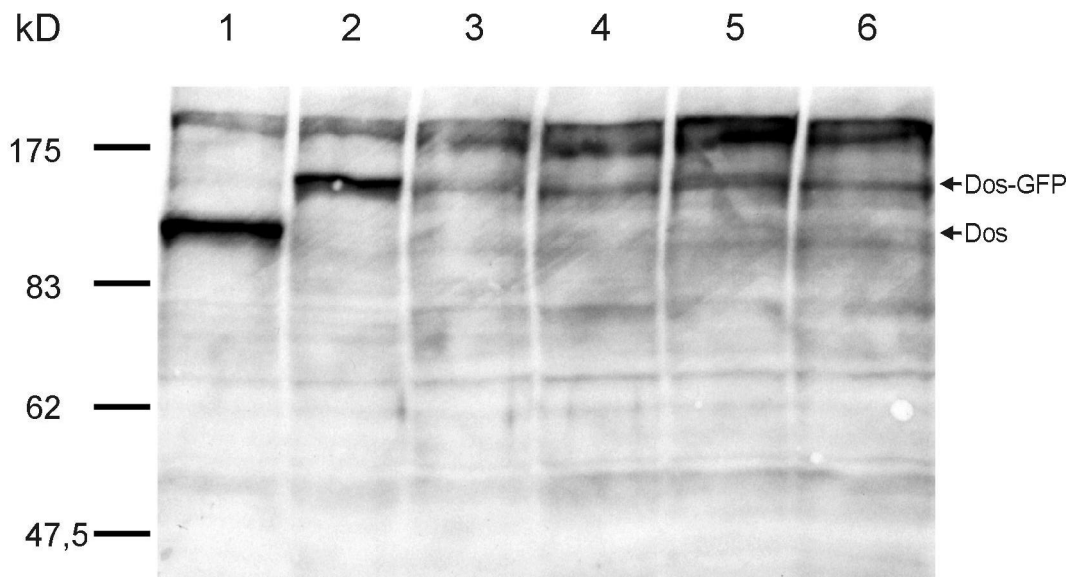


Abbildung 3.11.: Westernblot der *genE-dos*-GFP* Konstrukte. In den Spuren 1 und 2 sind zur Kontrolle je fünf Köpfe nach Hitzeschock von *P[w⁺, sE/hsp-dos]* (1) und Linie DG38II mit *P[w⁺, sE/hsp-dos-GFP]* (2) aufgetragen. In den Spuren 3 bis 6 ist das Gesamtprotein von je zehn Köpfen aufgetragen: (3) Linie P52 mit *P[y⁺, genE-dos-GFP]*; (4) Linie P66 mit *P[y⁺, genE-dosW104A-GFP]*; (5) Linie P36 mit *P[y⁺, genE-dosY358+537F-GFP]*; (6) Linie P64 mit *P[y⁺, genE-dosY801F-GFP]*.

Durch den Westernblot wurde gezeigt, daß die Transgene in den Fliegen exprimiert werden. Da die Expression von Dos in adulten Fliegen geringer als in Larven und Embryonen ist (Raabe et al., 1996), sind die Signale auf den Blot im Vergleich zu den Hitzeschock induzierten Kontrollen relativ schwach (Abb.: 3.11). Die Banden der GFP-getaggten Transgene (Ca. 155 kD) sind bei den getesteten Linien gut zu erkennen. Auf dem Blot sind die Banden für endogenes Dos nur sehr schwach zu erkennen. Zur Verifizierung des Ergebnisses wurde der Nachweis der Transgene auch mit einem Maus anti-GFP Antikörper durchgeführt (nicht gezeigt). Die GFP-getaggten Transgene konnten ebenso nachgewiesen werden. Aus der für die Transgene nachweisbaren Expression in adulten Fliegen wurde geschlossen, daß die Transgene entsprechend dem endogenen *dos* Gen exprimiert werden können.

Die durchgeführte Westernblot Analyse lieferte einen ersten Anhaltspunkt über die Funktionalität der klonierten, genomischen *dos* Enhancer/Promotor Sequenzen. Das *genE-dos-GFP* Minigen enthält offensichtlich alle notwendigen regulatorischen Bereiche zur Expression.

3.7.2 Expression von *P[y⁺, genE-dos-GFP]* in Augenimaginalscheiben

Als weiterer Nachweis für die korrekte Expression der klonierten *dos* Enhancer/Promotor Region, wurde die Lokalisation der Proteine in Augenscheiben mittels konfokaler Laser Scanning Mikroskopie untersucht. Das Dos Protein ist in den larvalen Augenscheiben apikal im Bereich der Adherens Junctions lokalisiert. Es wird vorrangig in der morphogenetischen Furche und in den sich dahinter entwickelnden ommatidialen Clustern exprimiert. Man geht davon aus, daß es sich hierbei um die Photorezeptorzellen und deren Vorläufer handelt.

Für diese Lokalisationsstudie wurde eine Maus anti-Dos Färbung an w^{1118} Augenimaginalscheiben durchgeführt und mit dem Expressionsmuster des $P[y^+, genE-dos-GFP]$ Transgens anhand seiner GFP Autofluoreszenz verglichen.

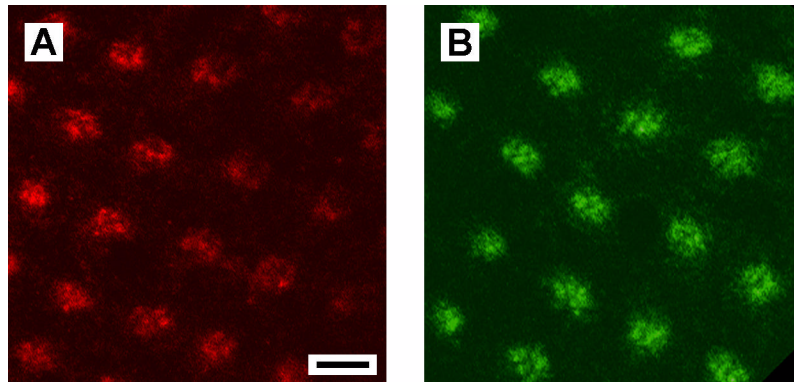


Abbildung 3.12.: Lokalisation von endogenem und transgenem Dos Protein in Augenimaginalscheiben. A) Maus anti-Dos Antikörperfärbung an w^{1118} , B) Autofluoreszenz des GFP-tags in $P[y^+, genE-dos-GFP]$ Augenscheiben. Dargestellt sind Ausschnitte der ommatidialen Cluster etwa 5 Reihen hinter der morphogenetischen Furche. Anterior ist rechts, der Größenmarker entspricht 10µm.

Die Lokalisationen des vom Transgen exprimierten Proteins und von endogenem Dos Protein sind identisch (Abb.: 3.12.). Das klonierte *genE-dos* Minigen zeigt das gleiche Expressionsmuster in larvalen Augenscheiben wie wildtypisches Dos.

3.7.3 Letalitätsassay der *genE-dos* Konstrukte

Für das $P[y^+, genE-dos]$ Konstrukt sollte der Letalitätsassay zunächst klären, ob das *dos* Minigen die Letalität der beiden Allele dos^{R31} und dos^{P115} ebenso retten kann wie das $P[w^+, sE/hsp-dos]$ Konstrukt. Damit würde gezeigt, daß der klonierte genomische Bereich alle notwendigen Regulationssequenzen für eine räumlich und zeitlich korrekte Expression enthält und ein funktionales Dos Protein gebildet wird. Die Untersuchung der Konstrukte mit den mutierten, potentiellen SH2-Domänen Bindungsstellen sollte weiteren Aufschluß über die Rolle dieser Bindungsstellen für die Funktion des Dos Proteins geben und die Ergebnisse der *sE/hsp-dos* Konstrukte ergänzen. Der Assay wurde nach folgendem Kreuzungsschema durchgeführt:

In homozygote, zweitchromosomale Insertionslinien wurde im ersten Schritt ein Balancer für das 3. Chromosom eingekreuzt. In einem zweiten Schritt wurde das dos^{R31} Allel eingekreuzt. In der dritten und letzten Kreuzung wurden $yw^{1118} / Y; P[y^+, genE-dos^*-GFP] / +; dos^{R31} / TM6B, Hu, Tb, e$ Männchen mit $yw^{1118} / yw^{1118}; + / +; dos^{R31} / TM3, Sb, Ser, e$ Weibchen gekreuzt (Abb.: 3.13.). Im Gegensatz zum Letalitätsassay mit den Hitzeschock Konstrukten wurden hier alle Kreuzungen konstant auf 24°C gehalten. Wenn die Fliegen nach der letzten Kreuzung genug Eier abgelegt hatten, wurden sie auf neue Brei gläser gesetzt, um eine möglichst hohe Zahl Nachkommen zu erhalten.

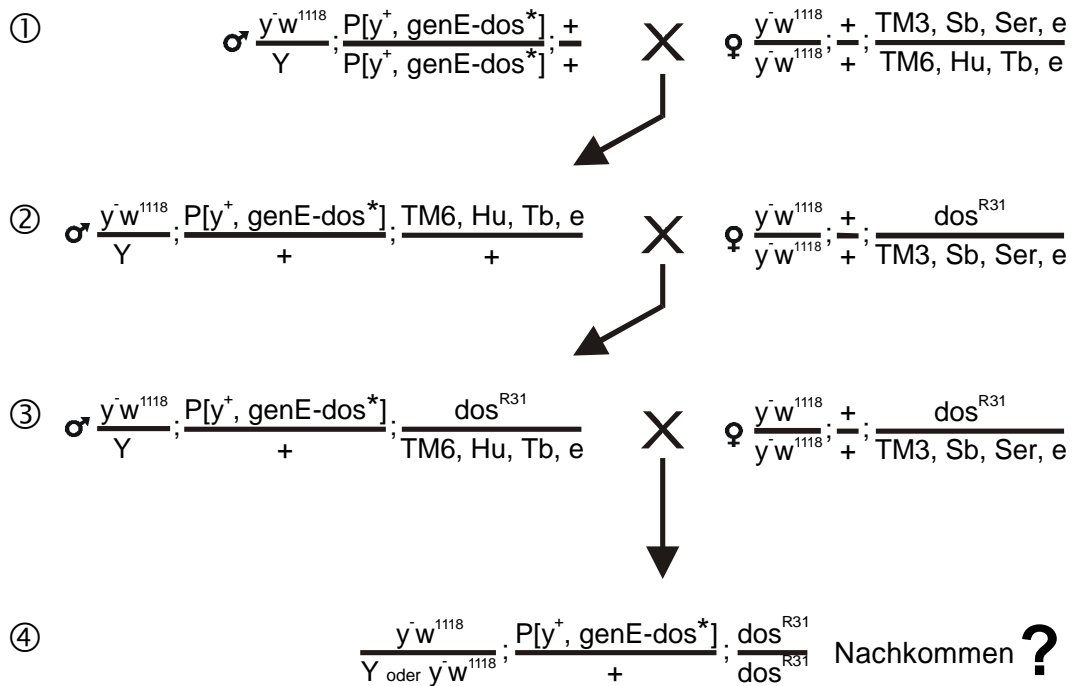


Abbildung 3.13.: Kreuzungsschema für den Letalitätsassay der $P[y^+, genE-dos^*-GFP]$ Konstrukte mit dos^{R31} . Auf der linken Seite sind die Genotypen der Männchen, auf der rechten die der verwendeten Jungfrauen dargestellt. Es sind nur die Chromosomen 1. bis 3. gezeichnet. Die Pfeile zeigen die Genotypen an, die weiter gekreuzt wurden.

Der Letalitätsassay wurde in gleicher Weise mit dem dos^{P115} Allel durchgeführt und lieferte die gleichen Ergebnisse. Die genaue Auswertung des Assays für die Insertionslinien des $P[y^+, genE-dos]$ Grundkonstruktes im dos^{R31} Hintergrund ergab eine Rettung von 95,4% (korrigierter Wert; den Doppelbalancer-Genotyp mit eingerechnet ergab 109,6% Rettung). Für die einzelnen Konstrukte wurde folgendes Ergebnis festgehalten, hierbei sind keine prozentualen Werte angegeben:

Der Letalitätsassay mit den genomischen Konstrukten konnte zeigen, daß die Transgene korrekt exprimiert werden, sonst wäre eine nahezu 100%ige Rettung der Letalität nicht möglich. Die beobachteten, geretteten Individuen waren vital und fertil, und zeigten keine phänotypischen Besonderheiten. Die Ergebnisse der untersuchten Punktmutationen stimmte mit den Ergebnissen der $sE/hsp-dos$ Konstrukte (siehe 3.3.) sehr gut überein. Der Verlust der Csw Bindungsstelle Y801F führte auch bei den $P[y^+, genE-dos^{Y801F}-GFP]$ Konstrukten zum vollständigen Verlust der Funktion des mutierten Transgens. Das Konstrukt $P[y^+, genE-dos^{W104A}-GFP]$ mit dem mutierten Tryptophan in der Dos PH-Domäne ist nicht in der Lage, die Letalität der dos Allele zu retten. Dagegen konnten durch ektopische Expression des $P[w^+, sE/hsp-dos^{W104A}-GFP]$ Konstruktes nur sehr wenig gerettete Fliegen beobachtet werden. Diese waren nicht lange lebensfähig und hatten Flügel- und Augendefekte (Schmidt, 1997).

Fliegenlinie	Konstrukt	<i>dos</i> ^{R31} Assay	<i>dos</i> ^{P115} Assay
P25	P[y ⁺ , genE-dos]	rettet	rettet
P27	P[y ⁺ , genE-dos]	rettet	rettet
P52	P[y ⁺ , genE-dos-GFP]	rettet	rettet
P53	P[y ⁺ , genE-dos-GFP]	rettet	rettet
P36	P[y ⁺ , genE-dosY358+537F-GFP]	rettet	rettet
P55	P[y ⁺ , genE-dosY358+537F-GFP]	rettet	rettet
P60	P[y ⁺ , genE-dosY801F-GFP]	rettet nicht	rettet nicht
P64	P[y ⁺ , genE-dosY801F-GFP]	rettet nicht	rettet nicht
P66	P[y ⁺ , genE-dosW104A-GFP]	rettet nicht	rettet nicht
P69	P[y ⁺ , genE-dosW104A-GFP]	rettet nicht	rettet nicht

Tabelle 3.5.: Ergebnisse des Letalitätsassays. Die nicht mutierten *dos* Konstrukte P25, P27, P52 und P53 zeigten mehr als 90% Rettung. Für P36 und P55 war der Wert geringer. Bei P60 bis P69 konnten keine geretteten Fliegen gefunden werden.

3.8 Etablierung eines *in vivo* Testsystems zur funktionellen Untersuchung der *genE-dos* Konstrukte

Durch die Klonierung des endogenen *dos* Enhancer/Promotor Elementes wurde es möglich einen weiteren, neuen Funktions-Assay durchzuführen. In den bisher verwendeten Letalitätsassays konnte nur gezeigt werden, ob eine bestimmte Aminosäure des Dos Proteins eine essentielle Funktion während der Entwicklung besitzt oder nicht. Nun sollte die Frage geklärt werden, ob die Konstrukte mit den mutierten, potentiellen SH2-Domänen Bindungsstellen die Funktion von fehlendem endogenem Dos Protein bei der Augenentwicklung ersetzen können. Die Induktion von homozygoten *dos*^{R31} Klonen im Auge hatte gezeigt, daß Dos eine wichtige Rolle bei der Augenentwicklung spielt, da in den klonalen Geweben die R7 Zelle und eine unterschiedliche Anzahl an äußeren Photorezeptorzellen fehlen (Abb.: 3.15. B) (Raabe et al., 1996). Ein klonales Testsystem sollte die funktionelle Untersuchung der mutierten Konstrukte in Abwesenheit von endogenem Dos Protein bei der Signaltransduktion von DER, dem *Drosophila* EGF Rezeptor Homolog, in der Augenentwicklung ermöglichen. Hierfür sollten durch das Flp/FRT Rekombinase System (Xu and Rubin, 1993) Klone im Auge induziert werden, die ein P[y⁺, *genE-dos-GFP*] Transgen exprimieren und denen gleichzeitig endogenes Dos fehlt. Mit den P[y⁺, *genE-dos*-GFP*] Konstrukten kann in klonalem Gewebe die Funktion des Transgens in Abwesenheit von

endogenem Dos untersucht werden. Das Testsystem ist in der folgenden Abbildung schematisch dargestellt.

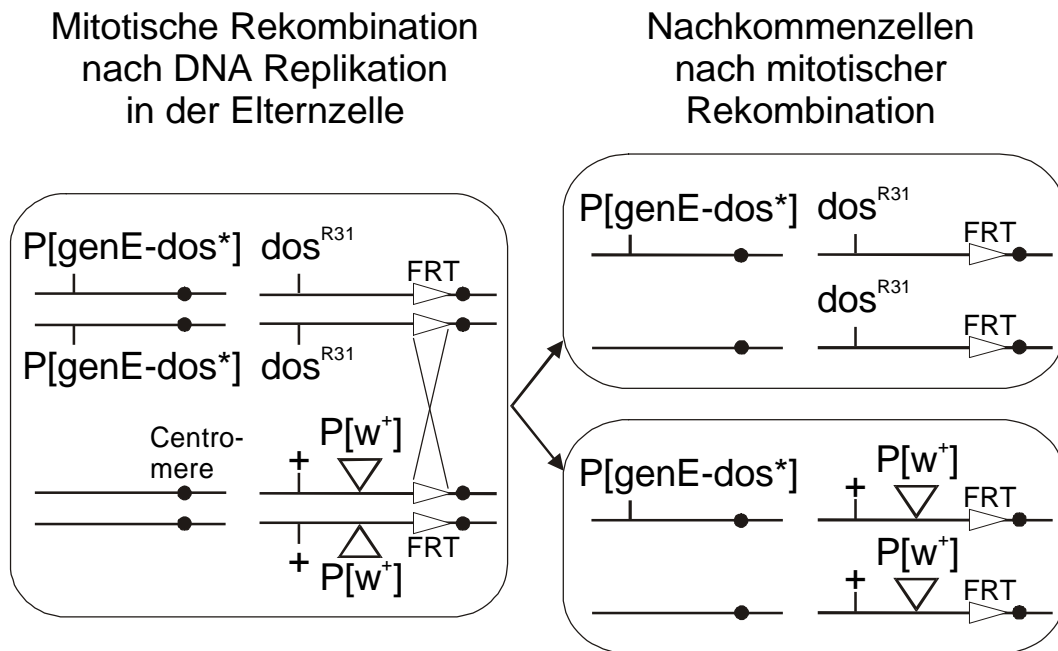


Abbildung 3.14.: Schematische Darstellung des Flp-Assays. Auf der linken Seite ist der Genotyp einer Elternzelle nach der Replikation dargestellt. Die Zelle ist heterozygot für ein $P[y^+, genE-dos^*-GFP]$ Transgen auf dem 2. Chromosom. Ein 3. Chromosom trägt die dos^{R31} Mutation und die Rekombinationssequenz $FRT80B$, das homologe Chromosom ein $P[w^+]$ als Marker und die $FRT80B$ Rekombinationssequenz. Das X Chromosom (hier nicht dargestellt) hat den Genotyp $yw, hsFlp1 / Y$ oder $+$ und liefert nach Hitzeschock Induktion die Flipase, welche die Rekombination zwischen den FRT-Sequenzen vermittelt. Rechts sind zwei der drei möglichen Genotypen (der nicht dargestellte entspricht dem parental) für die Tochterzellen gezeigt. Nach der Rekombination zwischen den FRT Sequenzen auf den homologen 3. Chromosomen, finden sich Zellen, die homozygot für das Marker P-Element sind und solche, die homozygot für dos^{R31} sind. In Abwesenheit von endogenem dos ist in diesen Zellen das Transgen auf dem 2. Chromosom die einzige Quelle für Dos Protein. Das klonale Gewebe ist am Fehlen des roten Augenpigmentes zu erkennen.

Für das genetische Testsystem wurden zunächst Fliegenstämme etabliert, die den Genotyp $yw^{1118} / yw^{1118}; P[y^+, genE-dos^*-GFP] / P[y^+, genE-dos^*-GFP]; dos^{R31}, FRT80B / TM3, Sb, Ser, e$ besaßen. Hierfür wurden die Fliegenstämme P52 und P53 mit $P[y^+, genE-dos^*-GFP]$, P36 und P55 mit $P[y^+, genE-dos^{Y358+537F}-GFP]$, P60 und P64 mit $P[y^+, genE-dos^{Y801F}-GFP]$ und P66 und P69 mit $P[y^+, genE-dos^{W104A}-GFP]$ verwendet. Zur Durchführung des Assays wurden Weibchen dieser Linien mit $yw^{1118}, hsFlp1 / Y; + / +; P[w^+], FRT80B / +$ Männchen gekreuzt. Erste Larven dieser Kreuzung wurden für eine Stunde auf $37^\circ C$ gehalten um die Expression der Flipase zu induzieren. Da die Rekombination nicht in allen Zellen stattfindet entstehen Mosaikindividuen. Je nachdem wie häufig sich eine Zelle nach der Rekombination noch teilt, entstehen mehr oder weniger große homozygote dos^{R31} Klone im Gewebe, die als einzige Quelle für das Dos Protein das $P[y^+, genE-dos^*-GFP]$ Transgen besitzen. Das klonale Gewebe wurde am Fehlen des roten Augenpigmentes erkannt. Weiblichen Nachkommen der

Kreuzungen wurden auf Klone im Auge untersucht. Es wurden nur Fliegen ausgewählt deren Klone größer als ein Ommatidium waren.

Von den ausgewählten Fliegen wurden die Köpfe mit OsO_4 fixiert und in Epon eingebettet. Anschließend wurden Semidünnschnitte ($1\mu\text{m}$) von den Augen angefertigt und unter dem Lichtmikroskop ausgewertet.

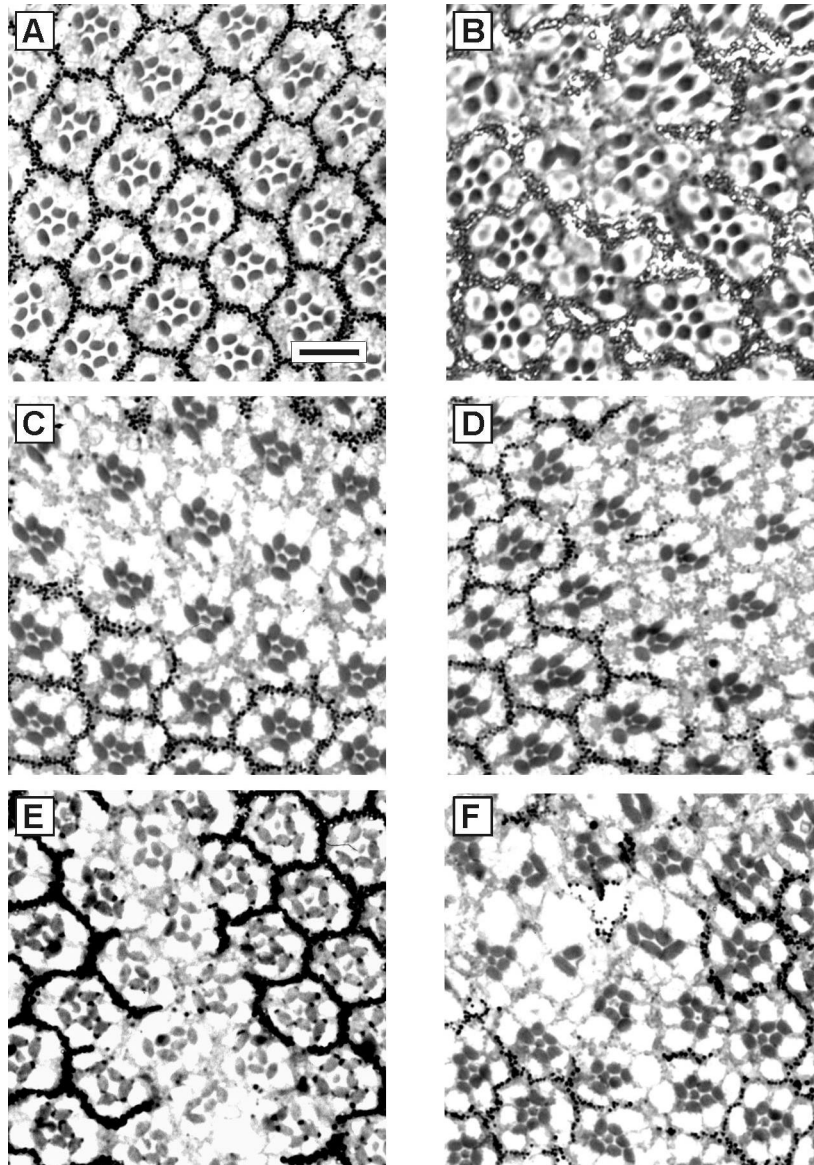


Abbildung 3.15.: Augenschnitte des Flp-Assays. **A)** Wildtyp. **B)** Homozygoter dos^{R31} Klon. In **C)** bis **F)** ist das klonale Gewebe stets homozygot für dos^{R31} , und heterozygot für **C)** $P[y^+, genE-dos-GFP]$, **D)** $P[y^+, genE-dosY358+537F-GFP]$, **E)** $P[y^+, genE-dosW104A-GFP]$, **F)** $P[y^+, genE-dosY801F-GFP]$. Der Größenmarker entspricht $10\mu\text{m}$. Erläuterungen im Text.

Bei der mikroskopischen Auswertung des Assays wurde für das $P[y^+, genE-dos-GFP]$ Transgen in homozygoten dos^{R31} Klonen (Abb.: 3.15. C) stets eine völlig wildtypische Anzahl und Anordnung der Photorezeptorzellen beobachtet, was aufgrund der bisherigen Ergebnisse erwartet wurde. Bereits eine Kopie des dos Minigens war in der Lage den Verlust von

endogenem *dos* zu kompensieren. Gleiches gilt für die Doppelmutation der PLC γ Bindungsstellen: Eine Kopie des *P[y⁺, genE-dos^{Y358+537F}-GFP]* Transgens konnte die fehlende endogene Dos Funktion ersetzen (Abb.: 3.15. D).

Im Gegensatz dazu wurden bei der PH-Domänen Mutation *P[y⁺, genE-dos^{W104A}-GFP]* in homozygoten *dos^{R31}* Klonen keine R7 Zellen ausgebildet, die Anzahl der äußeren Photorezeptoren war normal, jedoch ihre Anordnung nicht so regelmäßig wie beim Wildtyp (Abb.: 3.15. E). Für das *P[y⁺, genE-dos^{Y801F}-GFP]* Transgen mit der mutierten Csw Bindungsstelle wurde neben dem Fehlen von R7 Zellen das Fehlen von ein bis mehreren äußeren Photorezeptoren beobachtet (Abb.: 3.15. F). Dieses Bild ist dem bei homozygoten *dos^{R31}* Klonen beobachteten sehr ähnlich (Abb.: 3.15. B).

Aufgrund der Ergebnisse kann gesagt werden, daß die Csw Bindungsstelle Y801 für die Funktion des Dos Proteins während der Augenentwicklung notwendig ist. Sie spielt eine essentielle Rolle in der Sev und DER Rezeptor-Tyrosin-Kinasen vermittelten Signaltransduktion bei der Entwicklung der Photorezeptorzellen im *Drosophila* Auge. Die Mutation in der Dos PH-Domäne W104A zeigt, daß die PH-Domäne ebenfalls notwendig ist für die normale Dos Funktion.

3.9 Immunpräzipitation von Csw als potentiellen Interaktionspartner von Dos

In den genetischen Tests die bisher durchgeführt wurden konnte gezeigt werden, daß die SH2-Domänen Bindungsstelle für Csw Y801 eine wichtige Funktion für das Dos Protein besitzt. Die genetischen Daten sollten zusätzlich durch biochemische Untersuchungen bestätigt werden. In neueren Untersuchungen wurde die Interaktion von Dos mit Csw in Zellkultur nachgewiesen. Hierbei wurde gezeigt, daß die zwei SH2-Domänen von Csw und die phosphorylierten Tyrosine 801 und 854 im Dos Protein für die Bindung verantwortlich sind (Herbst et al., 1999).

Da die bisherigen biochemischen Daten in Zellkultur gewonnen wurden, sollte versucht werden durch Immunpräzipitation (IP) von Dos aus Fliegenprotein mögliche Bindungspartner wie Csw koimmun zu präzipitieren. In einem parallelen Ansatz sollte Dos mit Csw koimmun präzipitiert werden.

Die dritten Larven für die Proteingewinnung wurden, da keine Standardprotokolle zur Verfügung standen, mit verschiedenen Puffern homogenisiert.

Die Reinigung sollte über Protein G Sepharose Säulen erfolgen. Hierzu wurde nach dem Protokoll vom Hersteller (Pharmacia) verfahren. Zuerst wurde das Larvenhomogenat mit Maus anti-Dos bzw. mit Kaninchen anti-Csw für eine Stunde bei 4°C inkubiert. Dieses wurde dann auf die Protein G Säulen geladen (teilweise mehrmals nacheinander, um die Säulen abzusättigen). Nach dem Waschen wurde mit Glycin pH 3,0 eluiert. Durch Proteingelektrophorese wurden die einzelnen Wasch- und Elutionsfraktionen aufgetrennt und anschließend auf Nitrozellulose geblottet. Für den Westernblot wurden bei Immunpräzipitationen mit anti-Dos, Csw und bei Immunpräzipitationen mit anti-Csw, Dos Antikörper verwendet.

Trotz schrittweiser Veränderung verschiedener Parameter, wie Detergenzart und -menge, Verwendung von Proteaseinhibitoren, verschiedene Antikörperkonzentrationen und Puffermengen für Wasch- und Elutionsschritte, konnten aus dem Gesamtprotein von dritten Larven keine nachweisbaren Mengen an Proteinen immun und koimmun präzipitiert werden. Da zunächst angenommen wurde, daß dies an zu geringer Proteinmenge in wildtypischen Larven liegt, wurde die Experimente mit Larven von *P[w⁺, sE/hsp-dos]* nach einstündigem Hitzeschock durchgeführt, jedoch konnte auch hier kein Ergebnis erzielt werden.

4 Diskussion

4.1 Ergebnisse zum Dos Protein

Durch die Immunisierung von Mäusen mit zwei unterschiedlichen Dos Fusionsproteinen, GST-Dos und His-Dos, und die anschließende Gewinnung von monoklonalen Hybridoma Zelllinien konnte ein monoklonaler Maus anti-Dos Antikörper gewonnen werden. Das Epitop des Antikörpers befindet sich im Bereich der C-terminalen 525 Aminosäuren des Dos Proteins. Die für die optimale Konzentration in Westernblot Analysen und Antikörperfärbungen ermittelte sehr geringe Verdünnung von 1:10 ist nicht optimal, da Antikörper in Lösungen stabiler sind je höher ihre Konzentration ist (Harlow and Lane, 1999). Normalerweise enthalten Überstände von Zellkulturen 20-50µg/ml monoklonalen Antikörper. Zur Lagerung werden jedoch Konzentrationen von mehr als 1mg/ml empfohlen. Eine Reinigung des Dos Antikörpers aus den Hybridomaüberständen wäre deshalb sinnvoll. Für den Proteinnachweis durch Westernblot und die durchgeführten Antikörperfärbungen war die Verwendung der ungereinigten Hybridomaüberstände jedoch vollkommen ausreichend. Der gewonnene Antikörper besitzt eine gute Spezifität und Affinität zum Dos Protein *in vivo* und *in vitro*. Färbungen an larvalem und embryonalem Gewebe zeigen sehr wenig Hintergrund. Dieser wurde auf eine unspezifische Färbung zurückgeführt, könnte jedoch auch durch eine Kreuzreaktion hervorgerufen werden. Die bei der Westernblot Analyse stets gleichförmig auftretenden, zusätzlichen kleineren Banden können auf Abbauprodukte des Dos Proteins zurückgeführt werden, da sich durch den Zusatz von Proteaseinhibitoren bei der Proteingewinnung deren Stärke und Anzahl verringerte. Für den noch verbleibenden Hintergrund können unspezifische Kreuzreaktionen des bei der Zellkultur eingesetzten Serums mit Proteinen auf der Nitrozellulosemembran verantwortlich sein.

Im Westernblot wurde das native Dos Protein mit einer Größe von 115 kD nachgewiesen. Die Abweichung von der vorhergesagten Größe wird auf posttranslationelle Proteinmodifikation zurückgeführt. Die *in vitro* Dephosphorylierung durch Phosphatase könnte zeigen, welche Auswirkungen Phosphorylierungen auf das Laufverhalten des Dos Proteins haben. Einen Anhaltspunkt für weitere Modifikationen, welche die Mobilität bei der Gelelektrophorese beeinflussen, könnte der Vergleich von nativem Dos mit einem in Bakterien exprimiertem vollständigen Dos Protein liefern, da es in Bakterien keine Proteinmodifikationen wie in eukaryontischen Zellen gibt. Die Phosphorylierung von Dos Y801 und Y854, durch die aktivierte Sev RTK wurde bereits gezeigt und führt zu einer Verringerung der Mobilität bei der Proteingelektrophorese (Herbst et al., 1996; Herbst et al., 1999). Dos wird *in vivo* sehr schnell durch die Tyrosin Phosphatase Csw dephosphoryliert (Herbst et al., 1996), weshalb wahrscheinlich außer der Phosphorylierung von Tyrosinresten in potentiellen SH2-Domänen Bindungsstellen noch andere Modifikationen für das nachgewiesene Molekulargewicht verantwortlich sind.

In Westernblot Analysen konnte für die beiden *dos* Allele *dos*^{R31} und *dos*^{P115} kein Protein detektiert werden. Da das Epitop für den BB117/2 Antikörper jedoch im C-terminalen Bereich

des Proteins liegt ist es möglich, daß verkürzte Proteine gebildet werden, die der Antikörper nicht erkennen kann. Für das *dos*^{P115} Allel wäre aufgrund der Lage des P-Elementes im ersten Intron auch wahrscheinlich, daß durch das Entfernen des Introns zusammen mit dem P-Element beim Splicevorgang noch eine geringe Menge an Protein vorhanden ist. Die molekulare Analyse der beiden Allele deutet darauf hin, daß es sich um „loss of function“ Allele handelt. Beide sind im dritten Larvenstadium homozygot letal und wirken in heterozygotem Zustand als Suppressoren des Multi R7 Phänotyps von konstitutiv aktivem *Sev*^{S11}, indem sie die Anzahl der R7 Zellen in fast allen Ommatidien zum Wildtyp revertieren. Beides zeigt, daß die unter Umständen gebildeten Restproteine die Dos Funktion bei der Signaltransduktion nicht ersetzen können (Raabe et al., 1996). Das *dos*^{P115} Allel verhält sich in allen genetischen Assays wie die beiden „loss of function“ Allele *dos*^{1.46} und *dos*^{2.42}, wodurch die Annahme zusätzlich unterstützt wird (Herbst et al., 1999).

Die apikale Lokalisation des Dos Proteins in der morphogenetischen Furche und den sich dahinter entwickelnden Photorezeptorzellen in Augenimaginalscheiben korreliert mit der Lokalisation anderer Proteine, die bei der Sevenless Signaltransduktion beteiligt sind. So wird *Sev* in den Photorezeptorzellen R7 und R3/R4 sowie in den Kegelzellvorläufern (Tomlinson et al., 1987) und das Adaptorprotein *Drk* im apikalen Bereich der Augenscheibe in allen Zellen an der Membran exprimiert (Olivier et al., 1993). Da *Dos* bei der Signaltransduktion sowohl von *Sev* als auch von *DER* eine Rolle spielt (Raabe et al., 1996), entspricht eine Expression in allen Photorezeptorzellen den Erwartungen.

Es konnte gezeigt werden, daß die Membranassoziation von *Dos* nicht ausschließlich durch die PH-Domäne vermittelt wird, da ihre Deletion oder Inaktivierung auf die subzelluläre Lokalisation keinen Einfluß hat, sondern nur auf die Funktion des Proteins (Bausenwein et al., 2000; Mielke, 1999; Schmidt, 1997). Vielmehr muß es weitere Möglichkeiten für die Rekrutierung des Proteins an die Zellmembran geben. Für das Vertebraten Multi-Adaptor-Protein *Gab1* wurden mehrere unabhängige Mechanismen gefunden: Erstens, die Bindung an die Zellmembran über Phospholipide, Produkte der PI3Kinase. Zweitens, die direkte Bindung an ein Phosphotyrosin der intrazellulären Domäne der *Met* Rezeptor-Tyrosin-Kinase, die an einer Vielzahl von HGF (hepatocyte growth factor) stimulierten Signaltransduktionsprozessen beteiligt ist. Drittens die Bindung über *Grb2*, das Vertebratenhomolog zum *Drosophila* Adaptorprotein *Drk*, an die Rezeptor-Tyrosin-Kinase. Wie das *Dos* Protein, ist auch *Gab1* ohne seine PH-Domäne nicht funktionell (Maroun et al., 1999; Nguyen et al., 1997; Weidner et al., 1996). Für *Dos* sind ähnliche Mechanismen denkbar. Eine direkte Interaktion mit der *Sev* RTK und/oder eine Bindung von *Dos* via *Drk* an den *Sev* Rezeptor, wobei die PH-Domäne eine stabilisierende, oder für die sterische Molekülanordnung wichtige Rolle spielt. Die Möglichkeit der *Dos* PH-Domäne über Phospholipide an die Membran zu binden wurde mit einem Hefe-Testsystem nachgewiesen (Isakoff et al., 1998). Bisher konnte gezeigt werden, daß eine indirekte, SH2-Domänen abhängige Bindung von *Dos* über *Csw* an die *Sev* RTK zumindest in Zellkultur möglich ist (Allard et al., 1998).

4.2 Molekulare Charakterisierung von *dos*^{R31}

Die genomische Sequenzierung des EMS-Allels *dos*^{R31} sollte Aufschluß über den molekularen Defekt geben, der Ursache für die Letalität ist. Die amplifizierte Fragmente des genomischen *dos* Bereiches konnten erfolgreich sequenziert werden und der Vergleich mit der *dos* cDNA Sequenz ergab sieben eindeutige Veränderungen im Bereich von Exon II bis V.

Das Mutagen EMS erzeugt G-C nach A-T Transitionen in der DNA durch die Bildung von Methyl- bzw. Ethylguanin. So wird die Paarung von Guanin mit Thymin ermöglicht und führt bei der Replikation in einem Tochterstrang zur Transition. Für die Sequenz der *dos*^{R31} DNA wurden daher nur G-C nach A-T Änderungen erwartet. Die gefundenen Aminosäuresubstitutionen und das Stopcodon in Position 463 könnten somit auf EMS-induzierte Transitionen zurückgeführt werden. Dies ist jedoch nicht sehr wahrscheinlich, da die Anzahl der gefundenen Mutationen zu groß ist und für das gesamte Genom betrachtet, mehr als nur ein letales Allel die Folge sein müßte. Aufschluß darüber könnte nur der Vergleich der *dos*^{R31} Sequenz mit der genomischen Sequenz des zur Mutagenese eingesetzten Ausgangsstammes geben.

Bei den Substitutionen A¹⁷²→V, V¹⁸³→F und L²¹⁴⁺²⁴⁰→F wird keine drastische Veränderung in der Tertiärstruktur des Dos Proteins erwartet, da der hydrophobe Charakter der ursprünglichen Aminosäuren erhalten bleibt und die neuen Aminosäurenreste in ihrer Größe ähnlich sind. Die Substitutionen S¹⁷⁵→F und P³²⁷→Q hingegen können Auswirkungen auf die Proteinfaltung haben. Beim Austausch von S→F ändert sich der Charakter der Seitengruppe von hydrophil nach hydrophob. Die Iminosäure Prolin mit ihrer intramolekularen Ringstruktur ist häufig an Knicken von gefalteten Proteinen zu finden und stabilisiert die Struktur durch sterische Hemmung. Durch den Austausch in ein Glutamin geht diese Stabilisatorfunktion verloren und wird durch eine leicht ionisierbare Seitenkette ersetzt, die sich bei der Faltung des Protein anders verhält.

Die funktionell wichtigste Transition in der *dos*^{R31} Sequenz führt zu einem Stopcodon in Position 463 der Aminosäuresequenz. Dem verkürzten Dos^{R31} Protein fehlen somit C-terminal 416 Aminosäuren, wodurch die Ausbildung der Tertiärstruktur verhindert oder zumindest drastisch verändert wird. Darüber hinaus führt das Stopcodon zum Verlust von 6 potentiellen SH2-Domänen Bindungsstellen und verhindert dadurch die Interaktion von Dos mit anderen Proteinen der Signaltransduktionskaskade.

Für das *dos*^{R31} Allel konnte somit gezeigt werden, daß es sich um eine „loss of function“ Mutation handelt. Der Verlust der Csw SH2-Domänen Bindungsstellen Y801 und Y854 führt zum vollständigen Verlust der Proteinfunktion, was durch die Ergebnisse für die *dos*^{Y801F} Mutation (siehe 4.4) und durch Untersuchungen zur Interaktion zwischen den Csw SH2-Domänen und Dos (Herbst et al., 1999) gezeigt werden konnte. Da aber noch ein, wenn auch verkürztes Protein gebildet werden könnte, kann nicht ganz ausgeschlossen werden, daß dieses Restprotein mit den eingeführten *sE/hsp-dos** und *genE-dos** Transgenen unter Bildung von Di- und/oder Heteromeren interagiert und fehlende Funktionen dadurch ergänzt werden können. Erkennbar wäre dies an unterschiedlichen Ergebnissen für die Funktion von

Transgenen im *dos*^{R31} und *dos*^{P115} Hintergrund. Die erhaltenen Daten geben aber keinen Hinweis auf eine vorhandene Restfunktion des Dos^{R31} Proteins.

Die fehlenden Sequenzdaten für das erste Exon beeinflussen die Ergebnisse nur wenig. Zum einen codiert es nur für 22 Aminosäuren, zum anderen sind in diesem Bereich durch EMS-induzierte Transitionen nur Aminosäuresubstitutionen möglich. Eine genaue Betrachtung der Nukleotidsequenz im offenen Leseraster zeigt, daß kein G-C nach A-T Basentausch zu einem Stopcodon führen kann. Wie die Sequenz des überprüften Bereiches zeigen konnte, werden überwiegend ähnliche Aminosäuren substituiert und haben somit wenig oder keinen Einfluß auf die Tertiärstruktur des gesamten Proteins. Eine dramatische Änderung der Proteinstruktur wird daher in diesem Bereich nicht erwartet.

Die dargestellten Ergebnisse erklären auch die Tatsache, daß das Dos^{R31} Protein nicht mit dem monoklonalen Dos Antikörper BB117/2 im Westernblot erkannt werden kann. Wie bereits erwähnt, muß sich das Epitop für den Antikörper im C-terminalen Bereich des Dos Proteins befinden. Das Fehlen der C-terminalen 416 Aminosäuren bei Dos^{R31} und die Ergebnisse der Westernblot Analysen deuten darauf hin, daß sich das Epitop innerhalb dieser 416 Aminosäuren befindet.

4.3 Das *genE-dos* Minigen als Voraussetzung für ein *in vivo* Testsystem

Die ubiquitäre Expression von Transgenen durch Hitzeschockinduktion, wie dies bei den *sE/hsp-dos* Konstrukten der Fall ist, reflektiert nicht das endogene Expressionsmuster des *dos* Gens. Es besteht daher die Möglichkeit, daß beobachtete phänotypische Auswirkungen auch auf Fehlexpression der Transgene zurückgeführt werden können. Eine Aussage über die Funktion von mutierten Transgenen bei der Signaltransduktion ist deshalb nur bedingt möglich. Das etablierte und bisher zur Untersuchung von Signaltransduktionskomponenten verwendete Testsystem mit einer duplizierten *sevenless* Enhancer Sequenz und dem *hsp70* Promotor als regulatorische Einheit (Basler et al., 1991) zeigte, daß die untersuchten Tyrosinreste in den potentiellen SH2-Domänen Bindungsstellen mit Ausnahme von Tyrosin 801 nicht essentiell für die Funktion des Dos Proteins bei der Entwicklung sind.

Um die möglichen Probleme der ektopischen Expression mutierter Transgene zu umgehen, sollte ein *dos* Minigen kloniert werden, welches unter der Kontrolle der endogenen Enhancer/Promotor Einheit steht. Hierzu wurde ein genomisches Fragment, welches den gesamten 5' Bereich des *dos* Gens enthält, im dritten Exon über eine *RsrII* Schnittstelle mit der *dos* cDNA fusioniert. Die genomische Organisation von *dos*, mit einem großen ersten Intron und einem in unmittelbarer Nachbarschaft zum Startpunkt der Transkription liegenden ribosomalen Gen, legten die Vermutung nahe, daß sich in dem kurzen intergenischen Bereich und im ersten Intron die gesamten regulatorischen Sequenzen befinden müssen.

Zunächst wurde untersucht, ob das *genE-dos* Minigen im *dos*^{R31} Hintergrund die fehlende endogene Expression im korrekten, räumlich-zeitlichen Muster ersetzen kann. Die Ergebnisse des Letalitätsassays zeigten, daß bereits eine Kopie des *genE-dos* Minigens das Fehlen des endogenen Dos Proteins kompensiert. Es wurde im Durchschnitt 95% der rechnerisch

erwarteten, geretteten Fliegen gefunden. Die beobachteten geretteten Fliegen zeigten keine phänotypischen Besonderheiten und waren normal lebensfähig und fertil. Man kann folgern, daß das *genE-dos* Minigen voll funktionsfähig ist und alle notwendigen regulatorischen Sequenzen kloniert wurden.

Weiterhin wurde das Expressionsmuster des Minigens in larvalen Augenimaginalscheiben untersucht. Hierzu wurde eine anti-Dos Färbung an wildtypischen Imaginalscheiben mit der Autofluoreszenz von einem *genE-dos-GFP* Transgen verglichen. Das Muster der Expression war in beiden Fällen identisch, was das Ergebnis des Letalitätsassays bestätigt und für die Funktionalität der klonierten *dos* Enhancer/Promotor Kasette spricht.

Die erfolgreiche Klonierung des *genE-dos* Minigens war die Voraussetzung für die Etablierung eines klonalen Testsystems, mit dessen Hilfe die Auswirkungen von *in vitro* eingeführten Mutationen *in vivo* im Drosophila Auge untersucht werden können. Der bisher verwendete Letalitätsassay, mit der ektopischen, ubiquitären Expression der Transgene durch Hitzeschock während der gesamten Entwicklung, erlaubte nur eine generelle Aussage darüber, ob eine bestimmte Domäne des Dos Proteins wichtig ist für seine Funktion, oder nicht. Da Dos während der gesamten Entwicklung bei der Signaltransduktion von verschiedenen RTK's eine wichtige Rolle spielt, konnte die Rolle von Proteindomänen für die Dos Funktion in der Augenentwicklung mit dem vorhandenen Testsystem nicht untersucht werden, wenn die eingeführten Mutationen eine essentielle Proteinfunktion betrafen. Im Falle der mutierten SH2-Domänen Bindungsstelle Y801 konnten im Letalitätsassay keine geretteten Fliegen gefunden werden. Eine Aussage über die Funktion von Y801 in der Augenentwicklung war daher nicht möglich. Durch mitotische Rekombination kann man in für *dos^{R31}* heterozygoten Individuen Klone von Zellen erzeugen, die homozygot für das Allel sind. Da die Rekombination, hervorgerufen durch hitzeschockinduzierte Flipaseaktivität, nicht in allen Zellen stattfindet, hat die Letalität des *dos^{R31}* Allels keine Auswirkungen auf die gesamte Entwicklung. In klonalem Gewebe im Auge kann deshalb die funktionelle Rolle eines Transgens für die Augenentwicklung untersucht werden. Durch das in dieser Arbeit etablierte *genE-dos* Minigen konnten die Probleme mit der ektopischen Expression von Transgenen umgangen werden. Die beobachteten phänotypischen Effekte können dann direkt auf die untersuchten Mutationen zurückgeführt werden und geben somit Aufschluß über ihre Funktion. Die Einführung von somatischen Zellklonen im Auge basiert auf dem Flp/FRT Rekombinase System (Xu and Rubin, 1993). Die Idee war die Untersuchung von Zellklonen im adulten Fliegenauge, die homozygot für *dos^{R31}* sind und als einzige Quelle für das Dos Protein ein *genE-dos* Transgen besitzen.

Homozygote *dos^{R31}* Klone zeigen das Fehlen der R7 Zelle und einer unterschiedlichen Anzahl von äußeren Photorezeptorzellen, was ein Hinweis auf die Funktion von Dos bei der Signaltransduktion der DER RTK ist (Raabe et al., 1996). Bereits eine Kopie des *genE-dos* Minigens ist ausreichend, um in homozygoten *dos^{R31} / dos^{R31}* Ommatidien die wildtypische Anordnung und Anzahl der Photorezeptorzellen wieder herzustellen. Das Minigen kann also den Verlust von endogenem Dos vollständig kompensieren. Mit diesem Testsystem wird eine funktionelle Untersuchung von verschiedenen Mutationen in der Augenentwicklung möglich,

unabhängig von der Funktion von Dos in anderen Entwicklungsprozessen. Jede Bindungsstelle kann einzeln oder in Kombination mit anderen Mutationen auf ihre Funktionalität in der Sev und DER vermittelten Signaltransduktion untersucht werden.

Geht man von einem Netzwerk an Protein-Protein Interaktionen bei der Signalübertragung aus, so wird deutlich, daß der Verlust von Bindungseigenschaften nicht zwangsläufig in diesem klonalen Assay einen phänotypischen Effekt zeigen muß. Der Ausfall eines Proteins oder einer Proteininteraktion kann dazu führen, daß alternative Wege für die Signaltransduktion verwendet werden und den Verlust vollständig kompensieren können. Daneben erwartet man alle Zwischenstufen der genannten Extremsituationen. Eine Interaktion kann z.B. für nur eine RTK wichtig sein, oder es kommt zu einem Teilausfall der Funktion, wenn Alternativwege den Wegfall eines Weges nicht vollständig ersetzen können.

Um die mit diesem System erhaltenen *in vivo* Ergebnisse zu unterstützen, müssen noch auf biochemischer Ebene die postulierten Proteininteraktionen nachgewiesen werden. Erst die Kombination von biochemischen und genetischen Experimenten kann ein genaueres Bild der funktionellen Eigenschaften des Dos Proteins bei der Signaltransduktion liefern.

4.4 Dos - ein Multi-Adaptor-Protein?

Die Rolle von Dos als Multi-Adaptor-Protein sollte durch die Mutation der vorhergesagten Bindungsstellen für SH2-Domänen Proteine genauer untersucht und deren Funktion für die Signaltransduktion geklärt werden. Die Aminosäuresequenz des Proteins besitzt Tyrosinreste in potentiellen Bindungsstellen für Drk, Shc, PLC γ , PI3Kinase und Csw. Dos spielt eine wichtige Rolle bei der Signaltransduktion von Sev, DER und Torso. Nach der Aktivierung durch eine Rezeptor-Tyrosin-Kinase kann Dos das Signal auf verschiedene intrazelluläre Wege weitergeben. Für Gab1 und Gab2, sowie für die IRS Proteine, die verwandten Multi-Adaptor-Proteine bei Vertebraten, konnte gezeigt werden, daß sie von verschiedenen RTK's als Folge deren Aktivierung phosphoryliert werden und das Signal durch die Bindung an unterschiedliche Effektorproteine weiterleiten. Hierbei werden in den verschiedenen Signaltransduktionswegen unterschiedliche Bindungsstellen aktiviert, wodurch erreicht wird, daß downstream Komponenten gezielt rekrutiert und somit eine hohe Spezifität der Signalübertragung erreicht werden kann (Gu et al., 1998; Holgado-Madruga et al., 1996; Ingham et al., 1998; Lehr et al., 1999; Myers et al., 1998; Takahashi-Tezuka et al., 1998).

Die Ergebnisse der verschiedenen durchgeführten Assays konnten zeigen, daß nur die Funktion der Csw Bindungsstelle Y801 essentiell ist für die Funktion von Dos bei der Signaltransduktion von Sev und DER. Mutationen in den potentiellen Bindungsstellen für Shc, PI3Kinase und PLC γ SH2-Domänen hatten keine Auswirkungen auf die Funktionalität von Dos. Bei den durchgeführten Assays verhielten sich die Transgene mit den Y316F, Y631F und Y358+537F Punktmutationen jeweils wie die Kontrollen mit den nicht mutierten *dos* Transgenen. Für die RTK vermittelten Signaltransduktionen, welche Dos benötigen, spielt die Bindung dieser drei Proteine daher keine Rolle oder hat eine redundante Funktion.

Anders waren die Ergebnisse für die Mutation der Csw Bindungsstelle Y801. Das Fehlen führt zum vollständigen Funktionsverlust des Dos Proteins bei der Sev und DER Signaltransduktion. Mit dem klonalen Testsystem wurde gezeigt, daß der Verlust der Csw Bindungsstelle Y801 das Fehlen von Photorezeptorzellen verursacht, wobei stets die R7 Zelle und eine unterschiedliche Anzahl an äußeren Rezeptorzellen nicht entwickelt werden. Die Interaktion zwischen Dos und Csw ist also bei der Signaltransduktion von Sev und DER ein wichtiger Schritt. Dieses Ergebnis, das in allen durchgeführten Assays identisch war, stimmt mit den Beobachtungen überein, daß die Interaktion zwischen Dos und Csw durch SH2-Domänen vermittelt ist und Dos als Substrat der Phosphataseaktivität von Csw dephosphoryliert wird (Allard et al., 1998; Herbst et al., 1996). Für SHP-2, das Vertebraten Homolog von Csw, wurde gezeigt, daß es über seine zwei SH2-Domänen an jeweils zwei phosphorylierbare Tyrosine in den IRS, Gab1 und Gab2 Proteinen binden kann (Gu et al., 1998; Myers et al., 1998). Csw besitzt ebenso zwei SH2-Domänen, deren Verlust die Bindung an Dos verhindert. Ist hingegen nur eine der beiden SH2-Domänen deletiert, kommt es nur zu einem Teilverlust der Interaktion zwischen beiden Proteinen (Allard et al., 1998). Bei der Untersuchung der Dos Sequenz findet sich noch eine zweite potentielle Bindungsstelle für Csw SH2-Domänen. Der Aminosäurekontext von Tyrosine Y801 (LQY₈₀₁FDL) und Y854 (VVY₈₅₄RSV) entsprechen der Consensus Sequenz (V/LxYxxV/L) für Csw SH2 Bindungsstellen (Huyer and Alexander, 1999).

Parallel durchgeführte Arbeiten in der Arbeitsgruppe von M. Simon zeigen, daß Csw mit Dos über die beiden SH2-Domänen Bindungsstellen Y801 und Y854 interagiert, und daß deren Mutation zum Verlust der Dos Funktion führt. Es wurden verschiedene, *in vitro* mutierte Dos Proteine auf ihre Fähigkeit hin untersucht, mit Csw zu interagieren. Hierzu wurden folgende Konstrukte verwendet: Dos-Y801F und Dos-Y854F mit je einer einzelnen Mutation in den vorhergesagten Csw SH2-Domänen Bindungsstellen, Dos-Y801F+Y854F mit der Doppelmutation beider Bindungsstellen, Dos-YY mit Y801+854 als einzigen Tyrosinresten und Dos-0Y als Protein ohne Tyrosine. Mit Immunpräzipitationen aus *Drosophila* Schneiderzellen, welche die mutierten *dos* Transgene und ein Transgen mit der katalytisch inaktiven Form von Csw, *csw^{CS}*, exprimierten, konnte gezeigt werden, daß die beiden SH2-Domänen Bindungsstellen Y801 und Y854 für die Interaktion verantwortlich sind. Beide Tyrosinreste werden durch die aktivierte Sev RTK phosphoryliert. Genetische Experimente mit den mutierten Konstrukten zeigten, daß die Mutation der potentiellen Csw Bindungsstellen den Verlust der Dos Funktion zur Folge hat. Der rauhe Augen Phänotyp von *P[sE/hsp-csw^{CS}]* Fliegen, der durch das Fehlen von Photorezeptorzellen hervorgerufen wird, wurde durch das *Dos-0Y* und *Dos-Y801F+Y854F* verstärkt, beide wirken also wie „loss of function“ Mutationen im *dos* Genlokus. Die beiden Konstrukte sind auch nicht in der Lage den Multi R7 Phänotyp von *sev^{S11}* Fliegen zu revertieren. Die Mutation oder Deletion aller anderen potentiellen SH2-Domänen Bindungsstellen und der potentiellen SH3-Domänen Bindungsstelle im Dos Protein hatte hingegen keine Auswirkung auf die Funktion in der Sev und DER Signaltransduktion, wenn Y801 und Y854 vorhanden waren. Zusätzlich zu den biochemischen und genetischen Daten konnte durch Massenspektroskopie gezeigt werden,

daß es sich bei den Phosphotyrosinen Y801 und Y854 tatsächlich um die Bindungsstellen für die beiden Csw SH2-Domänen handelt (Herbst et al., 1999). Diese Daten stimmen gut mit den eigenen Ergebnissen überein und zeigen, daß bei der Sev und DER RTK vermittelten Signaltransduktion Dos mit Csw interagiert und die Signalübertragung positiv beeinflusst.

Die Tatsache, daß die Immunpräzipitation von Dos und Csw aus Fliegenlysaten kein Ergebnis gebracht hat, könnte daran liegen, daß die Dephosphorylierung von Dos durch Csw *in vivo* sehr schnell stattfindet und infolge dessen keine stabile Interaktion mehr möglich ist. Die Versuche in der Arbeitsgruppe von M. Simon wurden, um dieses Problem zu umgehen, in Anwesenheit der katalytisch inaktiven Form Csw^{CS} durchgeführt, wodurch die Dephosphorylierung von Dos verhindert werden konnte und die somit stabile Interaktion zwischen den beiden Proteinen eine Immunpräzipitation ermöglichte (Herbst et al., 1999). Die Versuche zur Immunpräzipitation müßten daher ebenso in Gegenwart der katalytisch inaktiven Form von Csw, oder in Anwesenheit von Phosphatase Hemmstoffen durchgeführt werden, um Dos im phosphorylierten Zustand zu erhalten und die Dos-Csw Interaktion zu ermöglichen.

Für die Funktion der Interaktion zwischen Dos und Csw bei der RTK vermittelten Signaltransduktion ist folgendes Modell denkbar: Die Bindung von Csw an Dos aktiviert die Phosphataseaktivität und ermöglicht so die Dephosphorylierung von Dos und anderen downstream gelegenen Signaltransduktionskomponenten. Die Interaktion sorgt für eine intrazellulär korrekte Lokalisation von Csw durch seine Rekrutierung an die Zellmembran in die unmittelbare Nähe des Rezeptors, und ermöglicht die Regulation des Phosphorylierungsgrades von einzelnen Komponenten in der Signaltransduktion. Das Zustandekommen eines positiven Signals durch diese Interaktion kann bisher jedoch nicht erklärt werden. Hierzu müßten weitere Untersuchungen zur Aufklärung der biochemischen Auswirkungen dieser Interaktion auf andere Signaltransduktionskomponenten durchgeführt werden.

Die Tatsache, daß nur zwei Tyrosine, Y801 und Y854, für die *in vivo* Funktion von Dos wichtig sind entspricht nicht den Erwartungen, da für die Vertebraten Multi-Adaptor-Proteine IRS, Gab1 und Gab2 eine Reihe von verschiedenen Interaktionen nachgewiesen werden konnten (Gu et al., 1998; Holgado-Madruga et al., 1996; Ingham et al., 1998; Lehr et al., 1999; Myers et al., 1998; Takahashi-Tezuka et al., 1998). Dies kann jedoch aufgrund der Daten auch für das Dos Protein nicht endgültig ausgeschlossen werden, da die Bindungsstellen für SHC, PI3Kinase und PLC γ eine redundante Rolle für die Dos Funktion besitzen könnten, d.h. der Verlust von Bindungseigenschaften kann durch Alternativwege kompensiert werden.

Für eine Interaktion bei der Sev und DER Signaltransduktion zwischen PLC γ und Dos gibt es genetische Hinweise. Das *Drosophila* PLC γ Gen, *small wing*, wirkt als negativ Regulator bei der RTK vermittelten Signaltransduktion. Mutationen im *small wing* Gen bewirken die Rekrutierung von vielen R7 Zellen bei der Augenentwicklung (Thackeray et al., 1998). Das PLC γ Protein besitzt unter anderem zwei SH2-Domänen und eine SH3-Domäne, diese könnten an Dos binden, da es hier zwei potentielle SH2-Domänen Bindungsstellen Y358 und

Y537 und eine mögliche SH3-Domänen Bindungsstelle gibt. In den Tests wurden nur die SH2-Bindungsstellen mutiert, was eine Interaktion über die SH3-Domäne immer noch ermöglichen könnte. Die Ergebnisse der Arbeitsgruppe von M. Simon konnten jedoch zeigen, daß auch die Deletion der putativen SH3-Domänen Bindungsstelle keinen Einfluß auf die Funktion des Dos Proteins hat (Herbst et al., 1999). Daher kann eine essentielle Funktion dieser Interaktion ebenfalls ausgeschlossen werden.

Die erhaltenen Ergebnisse zur Funktion der verschiedenen SH2-Domänen Bindungsstellen im Dos Protein konnten in Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus dem Labor von M. Simon (Herbst et al., 1999) zeigen, daß nur die SH2-Domänen vermittelte Bindung von Csw an Dos für die Dos Funktion bei der Signaltransduktion von RTK's essentiell ist. Die übrigen postulierten Bindungsstellen spielen keine essentielle Rolle bei der Funktion von Dos. Das eingangs aufgestellte Modell von einem Multi-Adaptor-Protein, welches als zentrale Bindungsstelle für viele unterschiedliche Proteine fungiert, konnte in dieser Form nicht bewiesen werden. Dos hat zumindest die Funktion eines, durch seine PH-Domäne membranassoziierten, Adaptors für Csw. Da eine Interaktion von Dos mit Drk beobachtet werden konnte (Herbst et al., 1999), ist es möglich, daß dies eine alternative Möglichkeit zur Aktivierung von Ras1 darstellt, neben der direkten Bindung von Drk an den aktivierten Rezeptor. Die Zuordnung von Dos zur Familie der Multi-Adaptor-Proteine kann bisher nur durch seine strukturellen Eigenschaften gerechtfertigt werden. Funktionell haben Dos und die Vertebraten Proteine Gab1 und Gab2, sowie die IRS Proteine die für die Membranassoziation verantwortliche PH-Domäne und die Interaktion mit einer Tyrosin Phosphatase gemeinsam. Für IRS-1 und Gab2 konnten je zwei Tyrosinreste charakterisiert werden, die eine Bindung der beiden SH2-Domänen von SHP-2, das Vertebraten Homolog von Csw, ermöglichen (Gu et al., 1998; Myers et al., 1998). Da bei Vertebraten mehrere Multi-Adaptor-Proteine vorkommen und in *Drosophila* bisher außer Dos nur ein weiterer Vertreter dieser Proteinfamilie, nämlich das für die IRS RTK wichtige Chico (Boehni et al., 1999), gefunden werden konnte, wäre es denkbar, daß noch weitere Proteine in *Drosophila* existieren.

4.5 Ausblick

Das Adaptorprotein Dos spielt eine wichtige Rolle bei der Rezeptor-Tyrosin-Kinase vermittelten Signaltransduktion der RTK's Sev, DER und Torso. Es konnte gezeigt werden, daß die SH2-Domänen vermittelte Bindung der Tyrosin Phosphatase Csw an Dos ein essentieller Schritt bei der Signaltransduktion ist. Werden die SH2-Domänen Bindungsstellen für Shc, PI3Kinase und PLC γ mutiert, so ist das Dos Protein dennoch funktionsfähig. Die bisherigen Ergebnisse lassen keine Aussage über die Rolle dieser Bindungsstellen für die Funktion von Dos bei der Torso RTK vermittelten Signaltransduktion zu. Bei der Signaltransduktion anderer RTK's während der Entwicklung haben diese Bindungsstellen keine essentielle Funktion für Dos, eine redundante Funktion kann aber nicht ganz ausgeschlossen werden. Dies ist ein Hinweis darauf, daß durch Phosphorylierung von unterschiedlichen Tyrosinresten eine Schalterfunktion entsteht, die eine spezifische

intrazelluläre Antwort ermöglicht und letztendlich Einfluß auf die spezifische Genexpression hat. Untersuchungen im Kontext anderer RTK's sind daher ein wichtiger Ansatzpunkt zur weiteren funktionellen Charakterisierung von Dos als Adaptorprotein.

Die Charakterisierung von Sequenzabschnitten, die eine Bindung an die aktivierte RTK ermöglichen, könnte weiteren Aufschluß über die Funktion von Dos geben, da bisher keine direkte Interaktion nachgewiesen werden konnte. Eingefügte Mutationen können mit dem klonalen Testsystem *in vivo* untersucht werden. Um die Ergebnisse zu vervollständigen sollten biochemische Experimente in Form von Immun- und Koimmunpräzipitationen folgen. Durch Koimmunpräzipitationen könnte auch nach weiteren Proteinen gesucht werden, die mit Dos interagieren und nachgewiesene Interaktionspartner könnten genauer charakterisiert werden.

Eine weitere Möglichkeit, die durch das klonale Testsystem eröffnet wird, ist die Charakterisierung von anderen Proteinregionen in Dos, die Protein-Protein Interaktionen ermöglichen, und deren Funktion bei der Sev und DER vermittelten Signaltransduktion in der Augenentwicklung von *Drosophila*.

5 Zusammenfassung

Ein Weg, der von Rezeptor-Tyrosin-Kinasen benutzt wird um Signale auf „downstream“ gelegene Effektormoleküle zu übertragen, erfolgt über Adaptorproteine, die Bindungsstellen für verschiedene Proteine zur Verfügung stellen. Das *daughter of sevenless (dos)* Gen wurde in einem Screen nach Downstream-Komponenten der Sevenless (Sev) Rezeptor-Tyrosin-Kinase gefunden. Dos besitzt eine N-terminale PH-Domäne und mehrere Tyrosinreste in Konsensussequenzen für SH2-Domänen Bindungsstellen von verschiedenen Proteinen. Die strukturellen Merkmale von Dos und Experimente, die zeigten, daß Tyrosine im Dos Protein nach der Aktivierung von Sev phosphoryliert werden, legen den Schluß nahe, daß Dos zur Familie der Multi-Adaptor-Proteine gehört. Zu dieser Familie werden die Insulin-Rezeptor-Substrat (IRS) Proteine, Gab1 und Gab2 gerechnet.

In dieser Arbeit wurde ein monoklonaler Maus anti-Dos Antikörper etabliert. Das Epitop dieses Antikörpers liegt im Bereich der C-terminalen 416 Aminosäuren des Dos Proteins. Mittels Westernblot Analysen wurde für Dos ein Molekulargewicht von 115 kD ermittelt. Antikörperfärbungen von wildtypischen Augenimaginalscheiben dritter Larven zeigten, daß das Dos Protein in Zellen in und posterior der morphogenetischen Furche exprimiert wird und in diesen Zellen apikal lokalisiert ist.

Zur Charakterisierung des homozygot letalen *dos^{R31}* Allels, wurde der genomische Bereich sequenziert und die erhaltenen Daten mit der cDNA Sequenz verglichen. Die so etablierte Aminosäuresequenz für das *Dos^{R31}* Protein hat sechs Aminosäuresubstitutionen, die möglicherweise die Tertiärstruktur beeinflussen. Zusätzlich wurde ein Stopcodon in Position 463 der Aminosäuresequenz gefunden. Bei *dos^{R31}* handelt es sich um ein „loss of function“ Allel, das nicht in der Lage ist, die normale Dos Funktion zu erfüllen.

Um die funktionelle Rolle der potentiellen SH2-Domänen Bindungsstellen für die Dos Funktion in der Rezeptor-Tyrosin-Kinasen vermittelten Signaltransduktion zu untersuchen, wurden mutierte *dos* Transgene in Fliegen exprimiert. Die potentiellen Bindungsstellen für die SH2-Domänen des SH2/SH3 Adaptorproteins Shc, der PhospholipaseC- γ (PLC γ), der regulatorische Untereinheit der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3Kinase) und der Corkscrew (Csw) Tyrosin Phosphatase wurden durch den Austausch des für die Bindung wichtigen Tyrosins gegen ein Phenylalanin mutiert. Die ektopische Expression der mutierten Konstrukte ohne Bindungsstellen für die Shc, PLC γ und PI3Kinasen SH2-Domänen konnte in Abwesenheit von endogenem Dos die fehlende Dos Funktion während der Entwicklung vollständig ersetzen. Im Gegensatz dazu ist das Tyrosin 801 als nachgewiesene Bindungsstelle für Csw SH2-Domänen essentiell für die Funktion von Dos.

Ektopische Expression von Transgene durch Hitzeschock kann zu phänotypischen Effekten führen, die nicht auf das Transgen zurückzuführen sind. Um dieses Problem zu umgehen wurde das endogene *dos* Enhancer/Promotor Element kloniert, damit die Funktion von mutierten Transgenen auch im endogenen Expressionsmuster untersucht werden konnte. Das klonierte *genE-dos* Minigen war in der Lage, den Verlust von endogenem Dos in *dos^{R31}* und

dos^{P115} Tieren vollständig zu ersetzen und zeigte eine völlig wildtypische Expression in Augenimaginalscheiben.

Zur Untersuchung, welche Rolle die mutierten SH2-Domänen Bindungsstellen bei der Dos Funktion in der Augenentwicklung spielen, wurde ein neues *in vivo* Testsystem basierend auf der Flp/FRT Flipase Rekombinase Technik etabliert. Dieses klonale Testsystem erlaubt die Expression mutierter Transgene unter der Kontrolle der *dos* Enhancer/Promotor Sequenzen in Klonen von Zellen, denen die endogene Dos Funktion fehlt. Die klonale Analyse der mutierten Konstrukte konnte zeigen, daß das Tyrosin 801, als Bindungsstelle für eine Csw SH2-Domäne, eine essentielle Rolle für die Dos Funktion spielt. Die Tyrosinreste in den potentiellen SH2-Domänen Bindungsstellen für Shc, PLC γ und PI3Kinase spielen hingegen keine essentielle Rolle für die Dos Funktion bei der Augenentwicklung.

Das etablierte klonale Testsystem kann allgemein zur Untersuchung der *in vivo* Funktion von potentiellen Protein-Protein Interaktionsregionen im Dos Protein bei der Augenentwicklung eingesetzt werden unabhängig von deren Erfordernis für andere Entwicklungsprozesse.

6 Conclusion

One mechanism used by receptor tyrosine kinases to relay a signal to different downstream effector molecules is to use adaptor proteins that provide docking sites for a variety of proteins. The *daughter of sevenless (dos)* gene was isolated in a genetic screen for components acting downstream of the Sevenless (Sev) receptor tyrosine kinase. Dos contains a N-terminally located PH domain and several tyrosine residues within consensus binding sites for a number of SH2 domain containing proteins. The structural features of Dos and experiments demonstrating tyrosine phosphorylation of Dos upon Sev activation suggested that Dos belongs to the family of multisite adaptor proteins that include the Insulin Receptor Substrate (IRS) proteins, Gab1, and Gab2.

In this work, a monoclonal mouse anti-Dos antibody was generated. The epitope of this antibody lies within the C-terminal 416 amino acids of the Dos Protein. Western Blot analyses of the Dos protein revealed a molecular mass of 115 kD. The staining of eye imaginal discs from wildtype third instar larvae with the monoclonal antibody showed that the Dos protein is expressed in cells in and posterior to the morphogenetic furrow. In this cells Dos localizes to the apical region.

For the molecular characterisation of the homozygous lethal *dos*^{R31} allele, genomic sequence analysis were performed and the sequences compared to the *dos* cDNA sequence. The established amino acid sequence of the Dos^{R31} protein showed six amino acid substitutions that potentially influence the tertiary structure of the protein. In addition, a stop codon in position 463 of the amino acid sequence was found. These results confirm that *dos*^{R31} is a loss-of-function allele which does not provide normal Dos function.

To study the functional requirements of the potential SH2 domain binding sites for the Dos function in receptor tyrosine kinase mediated signaling processes, mutated *dos* transgenes were expressed in flies. The putative binding sites for the SH2 domains of the SH2/SH3 adaptor protein Shc, PhospholipaseC- γ (PLC γ), the regulatory subunit of Phosphatidylinositol-3-kinase (PI3kinase) and the Corkscrew (Csw) tyrosine phosphatase were mutated by changing the invariant tyrosine within the consensus sites into phenylalanine. Ectopic expression of the mutated constructs lacking the binding sites for the Shc, PLC γ , and PI3kinase SH2 domains can substitute the loss of endogenous Dos function during development. In contrast, tyrosine 801, corresponding to a Corkscrew (Csw) SH2 domain binding site, is essential for Dos function.

Ectopic expression of transgenes upon heat shock induction may lead to phenotypic effects not caused by the transgene. To circumvent this problem, the endogenous *dos* enhancer/promotor element was cloned to study the function of the mutated transgenes expressed in a wildtype pattern. The cloned *genE-dos* minigene was able to fully substitute the loss of endogenous Dos function in *dos*^{R31} and *dos*^{P115} animals and shows wildtype like expression in eye imaginal discs.

To study the role of the mutated SH2 domain binding sites for Dos function in eye development, a new *in vivo* test system based on the Flp/FRT flipase recombinase system was

established. This clonal assay system allows the expression of the mutated transgenes under the control of the *dos* enhancer/promotor in clones of cells lacking endogenous Dos function. Expression of mutated transgenes in clones of cells lacking endogenous Dos function provided evidence that tyrosine residue Y801 that has been shown to bind a Csw SH2 domain is critical for Dos function. The tyrosine residues within the potential SH2 domain binding sites for Shc, PLC γ und PI3kinase do not play an essential role for the Dos function during eye development.

The established clonal test system is of general use for assaying the *in vivo* function of putative protein-protein interaction regions within the Dos protein for eye development irrespective of their requirement in other developmental processes.

7 Literatur

- Allard, J. D., Chang, H. C., Herbst, R., McNeill, H., and Simon, M. A. (1996). The SH2-containing tyrosin phosphatase Corkscrew is required during signaling by sevenless, Ras1 and Raf. *Development* 122, 1137-1146.
- Allard, J. D., Herbst, R., Carroll, P. M., and Simon, M. A. (1998). Mutational analysis of the SRC homology 2 domain protein-tyrosin phosphatase Corkscrew. *Journal of Biological Chemistry* 273, 13129-13135.
- Ausubel, F. A., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., and Struhl, K. (1994). *Current Protocols in Molecular Biology*, Volume Vol. 1 bis 3 (John Wiley & Sons Incorporation).
- Basler, K., Christen, B., and Hafen, E. (1991). Ligand-independent activation of the Sevenless receptor tyrosin kinase changes the fate of the cells in the developing *Drosophila* eye. *Cell* 64, 1069-1081.
- Bausenwein, B. S., Schmidt, M., Mielke, B., and Raabe, T. (2000). In vivo functional analysis of the Daughter of Sevenless protein in receptor tyrosine kinase signaling. *Mechanisms of Development* 90, 205-215.
- Birnboim, H. C., and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acid Res.* 7, 1513-1522.
- Boehni, R., Riesgo-Escovar, J., Oldham, S., Brogiolo, W., Stocker, H., Andruss, B. F., Beckingham, K., and Hafen, E. (1999). Autonomous control of cell and organ size by chico, a *Drosophila* homolog of vertebrate IRS1-4. *Cell* 97, 865-875.
- Bonfini, L., Karlovich, C. A., Dasgupta, C., and Banerjee, U. (1992). The Son of sevenless gene product: A putative activator of Ras. *Science* 255, 603-606.
- Cagan, R. L., Krämer, H., Hart, A. C., and Zipursky, S. L. (1992). The *bride of sevenless* and *sevenless* interaction: Internalization of a transmembrane ligand. *Cell* 69, 393-399.
- Cohen, G. B., Ren, R., and Baltimore, D. (1995). Modular binding domains in signal transduction proteins. *Cell* 80, 237-248.
- Cormack, B. P., Valdivia, R. H., and Falkow, S. (1996). FACS-optimized mutants of green fluorescent protein (GFP). *Gene* 173, 33-38.
- Dickson, B., and Hafen, E. (1993). Genetic dissection of eye development in *Drosophila*. In *the Development of Drosophila melanogaster*, M. Bate and A. Martinez-Arias, eds. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1327-1347.
- Dickson, B., and Hafen, E. (1994). Genetics of signal transduction in invertebrates. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 4, 64-70.

-
- Dickson, B., Sprenger, F., Morrison, D., and Hafen, E. (1992). Raf functions downstream of Ras1 in the Sevenless signal transduction pathway. *Nature* 360, 600-603.
- Dickson, B. J., van der Straten, A., Dominguez, M., and Hafen, E. (1996). Mutations modulating Raf signaling in *Drosophila* eye development. *Genetics* 142, 163-171.
- Feng, S., Chen, J. K., Yu, H., Simon, J. A., and Schreiber, S. L. (1994). Two binding orientations for peptides to the Src-SH3-Domain: Development of a general model for SH3-ligand interactions. *Science* 266, 1241-1247.
- Fortini, M. E., Simon, M. A., and Rubin, G. M. (1992). Signaling by the Sevenless protein-tyrosine kinase is mimicked by Ras1 activation. *Nature* 355, 559-561.
- Godenschwege, T. A. (1995). Herstellung und Charakterisierung monoklonaler Antikörper gegen ein Synapsin-ähnliches Protein aus *Drosophila melanogaster*. Diplomarbeit (Würzburg: Julius-Maximilian-Universität).
- Gu, H., Pratt, J. C., Burakoff, S. J., and Neel, B. G. (1998). Cloning of p97/Gab2, the major SHP-2 binding protein hematopoietic cells, reveals a novel pathway for cytokine-induced gene activation. *Mol. Cell* 2, 729-740.
- Harlow, E., and Lane, D. (1999). "Using Antibodies" a laboratory manual. (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Haslam, R. J., Koide, H. B., and Hemmings, B. A. (1993). Pleckstrin domain homology. *Nature* 363, 309-310.
- Herbst, R., Carroll, P. M., Allard, J. D., Schilling, J., Raabe, T., and Simon, M. A. (1996). Daughter of sevenless is a substrate of the phosphotyrosine phosphatase Corkscrew and functions during sevenless signaling. *Cell* 85, 899-909.
- Herbst, R., Zhang, X., Qin, J., and Simon, M. A. (1999). Recruitment of the protein tyrosine phosphatase CSW by DOS is an essential step during signaling by the Sevenless receptor tyrosine kinase. *EMBO J*, 18, 6950-6961.
- Holgado-Madruga, M., Emler, D. R., Moscatello, D. K., Godwin, A. K., and Wong, A. J. (1996). A Grb2-associated docking protein in EGF- and insulin-receptor signalling. *Nature* 379, 560-564.
- Hou, X. S., Chou, T.-B., Melnick, M. B., and Perrimon, N. (1995). The torso receptor tyrosine kinase can activate Raf in a Ras-independent pathway. *Cell* 81, 63-71.
- Huyer, G., and Alexander, D. R. (1999). Immune signalling: SHP-2 docks at multiple ports. *Current Biology* 9, 129-132.
- Ingham, R. J., Holgado-Madruga, M., Siu, C., Wong, A. J., and Gold, M. R. (1998). The Gab1 protein is a docking site for multiple proteins involved in signaling by the B Cell antigen receptor. *The Journal of Biological Chemistry* 273, 30630-30637.

-
- Isakoff, S. J., Cardozo, T., Andreev, J., Li, Z., Ferguson, K. M., Abagyan, R., Lemmon, M. A., Aronheim, A., and Skolnik, E. Y. (1998). Identification and analysis of PH domain-containing targets of phosphatidylinositol 3-kinase using a novel *in vivo* assay in yeast. *EMBO J*, 17, 5374-5387.
- Karim, F. D., Chang, H. C., Therrien, M., Wassarman, D. A., Lavery, T., and Rubin, G. M. (1996). A screen for genes that function downstream of Ras1 during *Drosophila* eye development. *Genetics* 143, 315-329.
- Kazlauskas, A. (1994). Receptor tyrosine kinases and their targets. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 4, 5-11.
- Klemenz, R., Weber, U., and Gehring, W. J. (1987). The white gene as a marker in a new P-element vector for transfer in *Drosophila*. *Nucleic Acids Research* 15, 3947-3959.
- Lehr, S., Kotzka, J., Herkner, A., Klein, E., Siethoff, C., Knebel, B., Noelle, V., Brüning, J. C., Klein, H. W., Meyer, H. E., Krone, W., and Müller-Wieland, D. (1999). Identification of tyrosin phosphorylation sites in human Gab-1 protein by EGF receptor kinase *in vitro*. *Biochemistry* 38, 151-159.
- Lemmon, M. A., Ferguson, K. M., and Schlessinger, J. (1996). PH domains: Diverse sequences with a common fold recruit signaling molecules to the cell surface. *Cell* 85, 621-624.
- Lindsley, D. L., and Zimm, G. G. (1992). *The genome of Drosophila melanogaster* (San Diego, California: Academic Press. Inc.).
- MacDougall, L. K., and Waterfield, M. D. (1996). Receptor signalling: To Sevenless, a daughter. *Current Biology* 6, 1250-1253.
- Marengere, L. E. M., Songyang, Z., Gish, G. D., Schaller, M. D., Parsons, J. T., Stern, M. J., Cantley, L. C., and Pawson, T. (1994). SH2 domain specificity and activity modified by a single residue. *Nature* 369, 502-505.
- Maroun, C. R., Holgado-Madruga, M., Royal, I., Naujokas, M. A., Fournier, T. M., Wong, A. J., and Park, M. (1999). The Gab1 PH domain is required for localisation of the Gab1 at sites of cell-cell contact and epithelial morphogenesis downstream from the Met receptor tyrosin kinase. *Molecular and Cellular Biology* 19, 1784-1799.
- Marshall, C. J. (1994). MAP-kinase kinase kinase. MAP-kinase kinase and MAP-kinase. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 4, 82-89.
- Mayer, B. J., Ren, R., Clark, K. L., and Baltimore, D. (1993). A putative modular domain present in diverse signaling proteins. *Cell* 73, 629-630.
- McCormick, F. (1994). Activators and effectors of ras p21 proteins. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 4, 71-76.

-
- Mielke, B. (1999). Genetische und funktionelle Charakterisierung von Komponenten der Sevenless-Signaltransduktions-Kaskade. Diplomarbeit (Würzburg: Julius-Maximilian-Universität).
- Musacchio, A., Gibson, T., Rice, P., Thompson, J., and Seraste, M. (1993). The PH-domain: a common piece in the structural patchwork of signaling proteins. *Trends Biochem. Sci.* *18*, 343-347.
- Myers, M. G., Mendez, R., Shi, P., Pierce, J. H., Rhoads, R., and White, M. F. (1998). The COOH-terminal tyrosine phosphorylation sites on IRS-1 bind SHP-2 and negatively regulate insulin signaling. *J. Biol. Chem.* *273*, 26908-26914.
- Nguyen, L., Holgado-Madruga, M., Maroun, C., Fixman, E. D., Kamikura, D., Fournier, T., Charest, A., Tremblay, M. L., Wong, A. J., and Park, M. (1997). Association of the multisubstrate docking protein Gab1 with the hepatocyte growth factor receptor requires a functional Grb2 binding site involving tyrosine 1356. *J Biol Chem* *272*, 20811-20819.
- Nishimura, A., Morita, M., Nishimura, Y., and Sugino, Y. (1990). A rapid and highly method for preparation of competent *Escherichia coli* cells. *Nucleid Acid Research* *18*, 6169.
- Olivier, J. P., Raabe, T., Henkemayer, M., Dickson, B., Mbamalu, G., Margolis, B., Schlessinger, J., Hafen, E., and Pawson, T. (1993). A *Drosophila* SH2-SH3 adaptor protein implicated in coupling the Sevenless tyrosine kinase to an activator of Ras guanine nucleotide exchange, SOS. *Cell* *73*, 179-191.
- Pawson, T. (1995). Protein modules and signalling networks. *Nature* *373*, 573-580.
- Perkins, L. A., Larson, I., and Perrimon, N. (1992). Corkscrew encodes a putative protein tyrosine phosphatase that functions to transduce the terminal signal from the receptor tyrosine kinase Torso. *Cell* *70*, 225-236.
- Perrimon, N. (1993). The Torso-receptor protein tyrosine kinase signalling pathway: an endless story. *Cell* *74*, 219-222.
- Raabe, T. (1998). Genetic Analysis of Sevenless Tyrosine Kinase Signaling in *Drosophila*. *Current Topics in Microbiology and Immunology* *228*, 343-361.
- Raabe, T., Olivier, J. P., Dickson, B., Liu, X., Gish, G. D., Pawson, T., and Hafen, E. (1995). Biochemical and genetic analysis od the DRK SH2-SH3 adaptor protein of *Drosophila*. *The EMBO Journal* *14*, 2509-2518.
- Raabe, T., Riesgo-Escovar, J., Liu, X., Bausenwein, B. S., Deak, P., Maröy, P., and Hafen, E. (1996). DOS, a novel pleckstrin homology domain-containing protein required for signal transduction between Sevenless and Ras1 in *Drosophila*. *Cell* *85*, 911-920.
- Ready, D. F. (1989). A multifaceted approach to neural development. *TINS* *12*, 102-110.
- Ready, D. F., Hansen, T. E., and Benzer, S. (1976). Development of the *Drosophila* retina, a neurocrystalline lattice. *Dev. Biol.* *53*, 217-240.

-
- Reinke, R., and Zipursky, S. L. (1988). Cell-cell interaction in the *Drosophila* retina: the bride of sevenless gene is required in photoreceptor cell R8 for R7 cell development. *Cell* 55, 321-330.
- Ren, R., Mayer, B. J., Cicchetti, P., and Baltimore, D. (1993). Identification of a ten amino acid proline-rich SH3 binding site. *Science* 259, 1157-1161.
- Rio, D. G., and Rubin, G. M. (1985). Transformation of cultured *Drosophila melanogaster* cells with a dominant selectable marker. *Mol. Cell. Biol.* 5, 1833-1838.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning, a laboratory manual*, Volume Vol. 1 bis 3 (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Schmidt, M. (1997). Funktionelle Charakterisierung der Pleckstrin Homology Domäne von Daughter of Sevenless im Sevenless-Signaltransduktionsweg. In Diplomarbeit (Würzburg: Julius-Maximilian-Universität).
- Shaw, G. (1996). The Pleckstrin homology domain: an intriguing multifunctional protein module. *Bioassays* 18, 35-46.
- Simon, M. A. (1994). Signal transduction during the development of the *Drosophila* R7 photoreceptor. *Dev. Biol.* 166, 431-442.
- Simon, M. A., Bowtell, D. L., Dodson, G. S., Laverty, T. R., and Rubin, G. M. (1991). Ras1 and a putative guanine nucleotide exchange factor perform crucial steps in signaling by the Sevenless protein tyrosine kinase. *Cell* 67, 701-716.
- Songyang, Z., Shoelson, S. E., Chaudhuri, M., Gish, G., Pawson, T., Haser, W. G., King, F., Roberts, T., Ratnofsky, S., Lechleider, R. J., Neel, B. G., Birge, R. B., Fajardo, J. E., Chou, M. M., Hanafusa, H., Schaffhausen, B., and Cantley, L. C. (1993). SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences. *Cell* 72, 767-778.
- Songyang, Z., Shoelson, S. E., McGlade, J., Olivier, P., Pawson, T., Bustelo, X. R., Barbacid, M., Sabe, H., Hanafusa, H., Yi, T., Ren, R., Baltimore, D., Ratnofsky, S., Feldmann, R. A., and Cantley, L. C. (1994). Specific motifs recognized by the SH2 domains of Csk, 3BP2, fps/fes, GRB2, HCP, SHC, Syk, and Vav. *Mol. Cell. Biol.* 14, 2777-2785.
- Sun, X. J., Crimmins, D. L., Myers, M. G., Miralpeix, M., and White, M. F. (1993). Pleiotropic insulin signals are engaged by multisite phosphorylation of IRS-1. *Mol. Cell. Biol.* 13, 7418-7428.
- Sun, X. J., Wang, L.-M., Zang, Y., Yenush, L., Myers, M. G., Glasheen, E., Lane, W. S., Pierce, J. H., and White, M. F. (1995). Role of IRS-2 in insulin and cytokine signalling. *Nature* 377, 173-177.
- Takahashi-Tezuka, M., Yoshida, Y., Fukada, T., Ohtani, T., Yamanaka, Y., Nishida, K., Nakajima, K., Hibi, M., and Hirano, T. (1998). Gab1 acts as an adapter molecule linking the cytokine receptor gp130 to ERK mitogen-activated protein kinase. *Molecular and Cellular Biology* 18, 4109-4117.

-
- Thackeray, J. R., Gaines, P. C. W., Ebert, P., and Carlson, J. R. (1998). small wing encodes a phospholipase C- γ that acts as a negative regulator of R7 development in *Drosophila*. *Development* 125, 5033-5042.
- Tomlinson, A., Bowtell, D. D., Hafen, E., and Rubin, G. M. (1987). Localization of the sevenless protein, a putative receptor for positional information, in the eye imaginal disc of *Drosophila*. *Cell* 51, 143-150.
- Tomlinson, A., and Ready, D. F. (1987). Cell fate in the *Drosophila* ommatidium. *Dev Biol* 123, 264-275.
- Tomlinson, A., and Ready, D. F. (1986). sevenless: a cell-specific homeotic mutation of the *Drosophila* eye. *Science* 231, 400-402.
- Touhara, K., Koch, W. J., Hawes, B. E., and Lefkowitz, R. J. (1995). Mutational analysis of the Pleckstrin homology domain of the β -Adrenergic Receptor Kinase. *J. Biol. Chem.* 270, 1700-1705.
- Twardzik, T. (1993). Charakterisierung des *giant-lens*-Gens von *Drosophila melanogaster* mittels Keimbahntransformation. Diplomarbeit (Würzburg: Julius-Maximilian-Universität).
- Weidner, K. M., Cesare, S. D., Sachs, M., Brinkmann, V., Behrens, J., and Birchmeier, W. (1996). Interaction between Gab1 and the c-Met receptor tyrosin kinase is responsible for epithelial morphogenesis. *Nature* 384, 173-176.
- Wolff, T., and Ready, D. F. (1991). The beginning of pattern formation in the *Drosophila* compound eye: The morphogenetic furrow and the second mitotic wave. *Development* 113, 841-850.
- Wolff, T., and Ready, D. F. (1993). Pattern formation in the *Drosophila* retina. In *the Development of Drosophila melanogaster*, M. Bate and A. Martinez-Arias, eds. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1277-1326.
- Xu, T., and Rubin, G. M. (1993). Analysis of genetic mosaics in developing and adult *Drosophila* tissues. *Development* 117, 1223-1237.
- Yenush, L., and White, M. F. (1997). The IRS-signalling system during insulin and cytokine action. *BioEssays* 19, 491-500.
- Zipursky, S. L., and Rubin, G. M. (1994). Determination of neuronal cell fate: lessons from the R7 neuron in *Drosophila*. *Annu. Rev. Neurosci.* 17, 373-397.

8 Anhang

8.1 *dos*-cDNA Sequenz

DOS 3184 bp

BASE COUNT: 837 A, 886 C, 808 G, 653 T

```
1 AGAGTGAAAT AAATCGAAGT AAATTGCGTC GAGCGCTGCA AAATAAATGGA TCGCACTTTC
61 TACGAGGGCT GGCTAATTAA GTCGCCGCC ACCAAGCGCA TTTGGCGAGC ACGCTGGAGG
121 CGTCGCTACT TCACGCTGAA GCAGGGCGAG ATACCGGAGC AGTTCTGCCT CGAATACTAC
181 ACCGACCACA ACTGCCGCAA GCTGAAGGGC GTTATCGATT TGGATCAGTG CGAGCAGGTG
241 GACTGTGGCC TGCGGCTGGA GAATCGCAAG CAGAAGTTTC AGTACATGTT CGATATCAAG
301 ACGCCCAAGC GCACCTACTA CCTGGCTGCA GAGACGGAGG CGGATATGCG CGACTGGGTG
361 AACTGCATCT GCCAGGTGTG TCACCTACAC GACACAAAGC AATCGAATGA GTTGCCATTA
421 GGAGCTGTGG GTGCAGACGA AAACCGCACC CAACACACGA GCTCCAGTGG CGGTCTAAGC
481 AACTCCACTC AAAATACGAC CACCACATCG TTGCACTCGT CGGCCGGAAC CACAGCGCCT
541 CAGGCTTCGG TCCCAAATGC TGGAGGATCT GCCCAGCTGC GACGACCGGC GGTCAATTGAA
601 GAGCAACCGA TGCCCTCGAA TGCCGGCAAC AATAACTCAG ACTCGGTGTA TGTCAACACG
661 GAGTACAGCA ATCGCGAGAC GATGCTCTGC GATGCCAATT TCGATCAGCA GGAAC TGCTC
721 TCGGCTGCCC AGCAGCAACC GCCTCCATCG CCGGCCACGG CTCTTTATCT AAACCACAGT
781 GCTTTGATCC AAGCTCAGGC GGCAGCTGCA GCCGCCGAGC AACTGCAACA GCAGCAGCAA
841 CAAGCTGCTC GCTTGGCGGT CAGTGCCAAC GGAGTAGTGC GCAAGCTGCC GGAGCATCTG
901 GTGCTCACGC AGCAGACCC TGGCGGAGGCA GCTGCCCAGC AACACAGCAG CGTACAGGCT
961 TCACCCGCTT TGAGCACCGC ATCCGGACCG TACATACCCA TCAGCGAGTG CTTCTCGGGC
1021 AGCCCGAGAT TCCTGCCCGG CGTTCCACTG CCCGGCGCAG ATTTGGCCAT ACCAAACAAC
1081 CCCACCACGC CGTTGAACAA CTTGGATCCC AAGTTCTACG ATACGCCGCG TAGTCATAAT
1141 AACATAGGTC TAAATCTGAC CAACGATCAA TCTTACTCAC CGAAGATAAC CAATTTGAGT
1201 CTGCAACAAT TGGCCAATAA CAATGCTAGT AAACAACGCT CCGACTCCGA TTCGAAAGC
1261 GTTTTCACCG ATGACGATGA GTGGGCTCAT CCTTTGCCCC TGCGCGAGAA TGTGGATCGC
1321 AGCACCCGAC CTTCGGATAG TTCCATTGAG AACGAATCAT TCGTGCTAAC GTACTCGCAG
1381 CGATTCTCTA AAATGCCCGA GGAAGGAGGA GCGATCGTGC CACCAGCTGA AAAGAGTTCC
1441 AAGCTAGCGG GAGCAGCATC TCTGGCAGAG GCTGGTGACC AGGGAACGCT GGATAAGCTG
1501 GCCAAGGTGC TGAAGAACAA AAATAATCTC ATATTGGACT TTAAGGAGAA TGAAAAAATT
1561 CCTCGCGATC TGCCGCGAGT GTCGGATACG GAAAATACTT CACCGGCCAT TGTGGCCCGC
1621 CGCAACGCGC ACTCCGCTTT CATCGAGGAA AGCTATGACA TTCCAAGGTC CCACCAGCAG
1681 CTTACTACA ACGTCAACCA GCTGCTGGGC GAGCGACCAG TCACCAGCCC GCACAATTCC
1741 AATCCCATTG CAGCATCCAC ACCGAATCTC ATGGCGGCCG ATCTGGGTGC AGTGGCCGCA
1801 ATTTTCAGCGG CAGCGAATCC CGGCCTGATG GGTGAGGCAC AGGCAGTCGC ATCATCGCCC
1861 ACCAGTGCGC GCACATTGCC TCGACACTGC TACACCAATG CAGCTCCCAC AAAGATGGAG
1921 GGCAATGTTT TTCGATACGA CTTTATGGAG CAGGCGGACT GCCCGCCGGT TAACCGGAAA
1981 CTTAAGCCAA AGGTGGCGGG TGGATTGCCA GTTGTAGAGG ACAAACCGCC GGAGGAGTTT
2041 CCTGCAAAGC CCCCAGGTGGG CGTAGATCAG TTAACCAATA AACTGGGTGC AGCCCAACTG
2101 CAGCAGCCCA TTGGACCGCC CAGTGTGGAC AGGAAGTGCA AACCGAATGC CTATAAGTTG
2161 GGCAATTCCG CTACCATGTC GCCGGCAACG CGACGTTCC TCCGGTGCCC TCTCTCAATG
2221 GTGCTGCCGC ATGAAACGGA TGTACTACTC CCGGCGGCAG CCAACGCTT CTTTACGAG
2281 ACCCGCACCC TGCCCTGCCA ACAGCATCGG CATCATCCGA ACAGTCCCAG CAGCATGTCCG
2341 GTACAACATC AGCGCACCGC CTCCGACGCG GCTGCCATGA TGAGCTTGAC GGCAGCAGCT
2401 GCTCCTAAGC AGCAAGCAGC GGCACAGACT GAGCACAAGC TGCAGTACTT TGATCTGGAT
2461 GTGACCAACA AACC GCCGTT GCTAAATCGA TCCAGCATGA GTGTGGGGAA TCTGTACTCA
2521 CAAGGCGGAA ATGGAGCTAG TGAATGCGA TTCGAGGCG TCGAAGCTGG CGGAGCTCGA
2581 GCGCCAGTGC CTAGCAGCGT GGTCTATAGA TCCGTGGACT TTGTCAAGAC GGAGGCATTT
2641 AAGAGGATTC GAGAGGAGCG CGAGAGCAGC GGCAACAAGT GAAACTGCTG GTTCAGCTGA
2701 ATGAAATCAT ATCTCCAGTA CATTTACTTG TCAACGTGCA ATAGCAAAGG AAGGACCATG
```

2761 TTGCTGATCC GAGATTTTCG TAGTGCCTAT TGGTGGTCAG CTGAGGAGAG CTGACCCCAT
 2821 CCAAAAACAG TGCAAATTC GAGTGGCTTT TACATTCCGT TAACATCGTC AAATTCATTA
 2881 TTCATTAAAC CACATATCTA GCTTGTAGGA CGGCACCAGC ATTTCTGTGT GCTGTTTTAA
 2941 ATCTGTAATC TGTAACCCGT ATCTGAATCT ATGTCGTATT CGTATTTAAA TCGTGCTTCC
 3001 AACACTTCCA TGTTTATTGT TAAGCTTCGG AATCAAAATG TAACCATGAC AAACGATCTT
 3061 AGTGCTAATT TTACAATGCA AACAATTATT TTATATACGC AAGCGAAATA TTTATATACA
 3121 CGAATTTTAT ATGGTAACAA ATTATTTACA ATTTATTAAT GTAACCTCGTG TCGGACACAA
 3181 GCTG

Darstellung 8.1.: Sequenz der *dos*-cDNA. Die Sequenz der PH-Domäne ist unterstrichen, das Start- und das Stopcodon sind fett gedruckt. Die durch *in vitro* Mutagenese veränderten Nukleotide sind fett und doppelt unterstrichen. Fett und kursiv ist das Stopcodon des EMS-Allels *dos*^{R31} dargestellt, das Adenin₁₄₃₂ ist gegen ein Thymin getauscht.

8.2 Dos-Aminosäuresequenz

>DOS 878 AMINO ACIDS

1 MDRTFYEGWL IKSPPTKRIW RARWRRRYFT LKQGEIPEQF CLEYYTDHNC
 51 RKLKGVIDL D QCEQVDCGLR LENRKQKFOY MFDIKTPKRT YYLAAETead
 101 MRD^WVNCICQ VCHLHDTKQS NELPLGAVGA DENRTQHTSS SGGLSNSTQN
 151 TTTTSLHSSA GTTAPQASVP NAGGSAQLRR PAVIEEQPMP SNAGNNNSDS
 201 VYVNTEYSNR ETMLCDANFD QQELLSAAQQ QPPSPATAL YLNHSALIQA
 251 QAAAAAAEQL QQQQQQAARL AVSANGVVRK LPEHLVLTQQ TLAEAAAQQH
 301 SSVQASPALS TASGP^YIPI^S ECFSGSPRFL PGVPLPGADL AIPNNPTTPL
 351 NNLDPKF^YYDT PRSHNNIGLN LTNDQSYSPK ITNLSLQQLA NNNASKQRS
 401 SDESSEVFTDD DEWAHPLPLR ENVDRSTRPS DSSIENESFV LTYSQRFKSKM
 451 PEEGGAIVPP AEKSSKLAGA ASLAEAGDQG TLDKLAQVLK NKNLILDFK
 501 ENEKIPRDLP QLSDTENTSP AIVARRNAHS AFIEES^YDIP RSHQQPYYNV
 551 NQLLGERPVT SPHNSNPIAA STPNLMAADL GAVAAISAAA NPGLMGEAQA
 601 VASSPTSART LPRHCYT^NAA PTKMEGNVFR ^YDFMEQADCP PVNRK^LKPKV
 651 AGGLPVVEDK PPEEFP^AAKPP VGVDQLTNKL GAAQLQQPIG PPSVDRKCKP
 701 NAYKLGNSAT MSPATRRSSG APLSMVLPHE TDVHSPAAAN AFFHETRTLP
 751 RQQRHHPNS PGSMVQHQ^R TASAAAAMMS LTAAAAPKQQ AAAQTEHKLQ
 801 ^YFDLDV^TNKP PLLNRSSMSV GNLYSQGGNG ASGMRFAGVE AGGARAPVPS
 851 SVVYRSVDFV KTEAFKRIRE ERESSGNK

Darstellung 8.2.: Aminosäuresequenz von Dos. Die PH-Domäne ist durch eine gestrichelte Linie gekennzeichnet. Das hochkonservierte Tryptophan₁₀₄ ist fett und kursiv gedruckt. Die potentiellen SH2-Domänen Bindungsstellen sind unterstrichen, wobei die mutierten und untersuchten Tyrosine fett gekennzeichnet sind.

8.3 GFP-Sequenz

```

1  AGATCTCGAT GAGTAAAGGA GAAGAACTTT TCACTGGAGT TGTCCCAATT CTTGTTGAAT
61 TAGATGGTGA TGTTAATGGG CACAAATTTT CTGTCAGTGG AGAGGGTGAA GGTGATGCAA
121 CATACGGAAA ACTTACCCTT AAATTTATTT GCACTACTGG AAAACTACCT GTTCCATGGC
181 CAACACTTGT CACTACTTTC gCGTATGGTC TTCAATGCTT TGCGAGATAC CCAGATCATA
241 TGAAACAGCA TGACTTTTTC AAGAGTGCCA TGCCCGAAGG TTATGTACAG GAAAGAATA
301 TATTTTTCAA AGATGACGGG AACTACAAGA CACGTGCTGA AGTCAAGTTT GAAGGTGATA
361 CCCTTGTTAA TAGAATCGAG TTAAAAGGTA TTGATTTTAA AGAAGATGGA AACATTCTTG
421 GACACAAATT GGAATACAAC TATAACTCAC ACAATGTATA CATCATGGCA GACAAACAAA
481 AGAATGGAAT CAAAGTTAAC TTCAAAATTA GACACAACAT TGAAGATGGA AGCGTTCAAC
541 TAGCAGACCA TTATCAACAA AATACTCCAA TTGGCGATGG CCCTGTCCCTT TTACCAGACA
601 ACCATTACCT GTCCACACAA TCTGCCCTTT CGAAAAGATCC CAACGAAAAG AGAGACCACA
661 TGGTCCTTCT TGAGTTTGTA ACAGCTGCTG GGATTACACA TGGCATGGAT GAACTATACA
721 AATAATCTAG A

```

Darstellung 8.3.: Sequenz des verwendeten GFP-tags. Die Schnittstellen für die Enzyme *Bgl*III (1-6) und *Xba*I (726-731) wurden zur Klonierung im Leseraster verwendet. Start- und Stopcodon sind fett gedruckt. Die Mutationen S65A, V68L und S72A zur Verstärkung der Fluoreszenz des GFP-Proteins (Cormack et al., 1996) sind fett und kursiv.

8.4 Hybridomaklone in Stickstoff

Ausgangsklon	Subklon	Anzahl der Aliquots
BB 99		4
	BB 99/1	2
	BB 99/2	2
	BB 99/3	2
	BB 99/4	2
	BB 99/5	2
	BB 99/6	2
	BB 99/7	2
	BB 99/8	2
	BB 99/9	2
	BB 99/10	2
	BB 99/12	2
BB 117		4
	BB 117/1	2
	BB 117/2	2
	BB 117/3	2
	BB 117/4	2
	BB 117/5	2
	BB 117/6	2
	BB 117/8	2
	BB 117/9	2
	BB 117/10	2
	BB 117/11	2

	BB 117/12	2
	BB 117/13	2
	BB 117/14	2
	BB 117/16	2
	BB 117/17	2
	BB 117/18	2
	BB 117/23	2
	BB 117/24	2
	BB 117/26	2
	BB 117/27	2
	BB 117/28	2
	BB 117/29	2
	BB 117/30	2

Tabelle 8.1.: Liste der in Stickstoff gelagerten Hybridomklone

8.5 Hergestellte Transgene Fliegen

Linie	Konstrukt	Mutation der Bnd.stelle für:	Lokalisierung	Sonstiges
P1	P[w ⁺ , sE/hsp-dosY631F]	PI3-Kinase	X	FM7a/P,
P3	P[w ⁺ , sE/hsp-dosY631F]	PI3-Kinase	II	homozygot
P10	P[w ⁺ , sE/hsp-dosY631F]	PI3-Kinase	II	homozygot
P7	P[w ⁺ , sE/hsp-dosY801F]	Csw	X	homozygot
P9	P[w ⁺ , sE/hsp-dosY801F]	Csw	II	homozygot
P3jo	P[w ⁺ , sE/hsp-dosY801F]	Csw	II	homozygot
P4jo	P[w ⁺ , sE/hsp-dosY801F]	Csw	II	homozygot
P11jo	P[w ⁺ , sE/hsp-dosY801F]	Csw	II	homozygot
P12	P[w ⁺ , sE/hsp-dosY358/537F]	PLC γ	III	homozygot
P15	P[w ⁺ , sE/hsp-dosY358/537F]	PLC γ	III	homozygot
P20	P[w ⁺ , sE/hsp-dosY316F]	Shc	II	homozygot
P21	P[w ⁺ , sE/hsp-dosY316F]	Shc	II	homozygot
P25	P[y ⁺ , genE-dos]		II	SM6, CyO/P, (homozygot vital aber steril)
P27	P[y ⁺ , genE-dos]		X	homozygot
P29	P[y ⁺ , genE-dos-Myc]		III	TM3/P, (homozygot vital aber steril)
P50	P[y ⁺ , genE-dos-GFP]		III	homozygot
P52	P[y ⁺ , genE-dos-GFP]		II	homozygot
P53	P[y ⁺ , genE-dos-GFP]		II	SM6, CyO /P, (homozygot vital aber steril)
P59	P[y ⁺ , genE-dosY801F-Myc]	Csw	II	SM6, CyO /P,
P60	P[y ⁺ , genE-dosY801F-GFP]	Csw	II	SM6, CyO /P,
P63	P[y ⁺ , genE-dosY801F-GFP]	Csw	X	homozygot,
P64	P[y ⁺ , genE-dosY801F-GFP]	Csw	X	homozygot,
P76	P[y ⁺ , genE-dosY801F-GFP]	Csw	II	SM6, CyO /P,
P36	P[y ⁺ , genE-dosY358/537F-GFP]	PLC γ	II	SM6, CyO /P,

P37	P[y ⁺ , genE-dosY358/537F-GFP]	PLCγ	III	homozygot,
P55	P[y ⁺ , genE-dosY358/537F-GFP]	PLCγ	II	verloren
P44	P[y ⁺ , genE-dosY358/537F-Myc]	PLCγ	II	SM6, CyO /P,
P46	P[y ⁺ , genE-dosY358/537F-Myc]	PLCγ	II	SM6, CyO /P,
P66	P[y ⁺ , genE-dosW104A-GFP]	PH-Domäne	II	SM6, CyO /P, (semiletal)
P67	P[y ⁺ , genE-dosW104A-GFP]	PH-Domäne	II	SM6, CyO /P,
P69	P[y ⁺ , genE-dosW104A-GFP]	PH-Domäne	II	SM6, CyO /P,

Tabelle 8.2.: Durch Keimbahntransformation erhaltene transgene Fliegen. Die fett hervorgehobenen P-Element Linien wurden in den beschriebenen Tests verwendet. Die drei mit P#jo bezeichneten Stämme sind „jump out“ Linien von Stamm P7.

9 Curriculum Vitae

Name: Bausenwein
Vorname: Burkhard
Adresse: Innerer Graben 18
97070 Würzburg
Tel.: 0931/571754
burkhard@mayn.de

Geburtsdatum: 19.10.1968
Geburtsort: Würzburg
Familienstand: ledig

Schulbildung:
September 1975 bis Juli 1978 Grundschole in Rimpar
September 1979 bis Juni 1988 Matthias-Grünewald-Gymnasium in Würzburg, Leistungskurse: Biologie und Musik, Abschluß: Allgemeine Hochschulreife

Wehrdienst:
Juli 1988 bis September 1989 Grundwehrdienst als Sanitäter beim Sanitätsbataillon 12 in der Bundeswehraphotheke

Berufliche Ausbildung:
Oktober 1989 bis August 1995 Studium der Biologie an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität in Würzburg, Abschluß: Diplom, Thema der Diplomarbeit: Vergleichende Untersuchungen zu kodierenden und Regulationssequenzen des Gens *optomotor-blind*
seit November 1995 Promotion am Institut für Genetik des Theodor-Boveri-Institutes für Biowissenschaften der Universität Würzburg. Thema der Dissertation: Funktionelle Charakterisierung von Daughter of Sevenless ein Adaptorprotein der Sevenless Signaltransduktions Kaskade

10 Publikationen

- **DOS, a novel pleckstrin homology domain-containing protein required for signal transduction between Sevenless and Ras1 in *Drosophila***; Thomas Raabe, Juan Riesgo-Escovar, Xiangdong Liu, Burkhard S. Bausenwein, Peter Deak, Peter Maröy, Ernst Hafen; *Cell* 85 (1996), 911-920
- **Isolation of a *Drosophila* *T-box* gene closely related to human *TBX1***; Matthias Porsch, Kerstin Hofmeyer, Burkhard S. Bausenwein, Stefan Grimm, Bernhard H. F. Weber, Raimond Miassod, Gert O. Pflugfelder; *Gene* 212 (1998), 237-248
- ***In vivo* functional analysis of the Daughter of Sevenless protein in receptor tyrosine kinase signaling**; Burkhard S. Bausenwein, Marc Schmidt, Björn Mielke, Thomas Raabe; *Mechanisms of Development* 90 (2000), 205-215

Danke sagen...

Vielen, vielen herzlichen Dank an Thomas Raabe, für die stete Unterstützung auf meinem Weg zur Promotion, für die Einführung in die Geheimnisse und Methoden der Drosi-Genetik und die Beschaffung der finanziellen Mittel für diese Arbeit. Ein herzliches Dankeschön an Erich Buchner, der die Aufgabe des Betreuers übernommen hat und stets ein offenes Ohr für Fragen hatte.

Danke an alle Raabe's für die ruhige und freundliche Arbeitsatmosphäre. Ein dickes Dankeschön an Danni und Anna, die es tapfer mit mir aushielten, auch wenn ich einmal schlechter Laune war. Ich möchte auch nicht vergessen den DKlern Christine, Natascha, Sonja und Christian für die ungezählten Kaffee- und Teepausen, die kulinarischen Mittagspausen, die Joe Penàs Abende und so manch lustige Fete zu danken.

Ein Dankeschön an Gerlinde und Dagmar für die exzellente technische Unterstützung. Vielen Dank an Kalle, dem Fachmann in Sachen Computer und „Confocal“, für sein stets offenes Ohr und seine Hilfsbereitschaft. Bei allen nicht namentlich erwähnten Mitarbeitern und -innen möchte ich mich für die angenehme Atmosphäre am Lehrstuhl bedanken.

Ein ganz herzliches Dankeschön gebührt meinen Eltern und meiner Schwester, die mit Interesse meine Arbeit verfolgt und mich immer bestärkt und unterstützt haben. Vielen Dank an Sabrina, denn es war sicher nicht immer leicht mit mir in den letzten Monaten.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig verfaßt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet habe.

Würzburg,

Burkhard Bausenwein