
4 ERGEBNISSE

4.1 PIPSQUEAK UND GAGA-FAKTOR

Wie in der Einleitung bereits erwähnt (1.2) hat Psq, wie der GAF, während der gesamten Entwicklung pleiotrope Funktionen: in der Oogenese, Embryogenese und während der Entwicklung zur adulten Fliege. Mutationen beider Gene führen zu Letalität und weiblicher Sterilität. Beide Faktoren scheinen also an einer Vielzahl von Prozessen beteiligt zu sein, wobei der Wirkungsmechanismus des GAF bereits eingehend untersucht wurde (1.1), während die Funktionsweise von Psq noch völlig unbekannt ist.

Zu Beginn dieser Arbeit lagen experimentelle Daten vor, daß sowohl Psq als auch GAF, zumindest *in vitro*, die gleiche DNA-Zielsequenz erkennen [Lehmann et al., 1998]. Während GAF eine Zinkfinger-Domäne als DNA-bindendes Motiv nutzt, konnte in diesen Experimenten gezeigt werden, daß Psq über die Psq-Domäne an DNA bindet. Somit wurde die Psq-Domäne (1.3) als eine neue DNA-Bindungsdomäne identifiziert.

Aus diesem Befund ergab sich die Frage, ob beide Proteine auch *in vivo* an gleiche Zielsequenzen, oder zumindest an eine Schnittmenge gemeinsamer Zielsequenzen binden. In *Drosophila* läßt sich diese Frage durch Kartierung von Protein-Bindungsstellen an polytären Speicheldrüsenchromosomen beantworten. Durch einen Vergleich der chromosomalen Bindungsstellen von Psq und GAF sollten Loci ermittelt werden, an denen beide Faktoren *in vivo* möglicherweise interagieren oder konkurrieren. Auf diese Weise sollten auch Hinweise auf putative Zielgene von Psq erhalten werden.

4.1.1 EXPRESSION VON Psq IN SPEICHELDRÜSEN

Um Immunfluoreszenzfärbungen an polytären Chromosomen durchführen zu können, mußte zunächst geprüft werden, ob Psq in larvalen Speicheldrüsenkernen exprimiert wird. Hierzu wurden Psq-Antikörper genutzt, um Speicheldrüsenewebe *in situ* zu färben. Als Positivkontrolle wurden parallel Ovariolen adulter Weibchen eingesetzt, für die mit diesen Antikörpern bereits gezeigt werden konnte, daß Psq ein kernlokalisiertes Protein ist. Außerdem konnte gezeigt werden, daß Psq sowohl in Keimzellen (Oocyte und Nährzellen) als auch in somatischen Follikelzellen während der gesamten Oogenese exprimiert wird [Horowitz and Berg, 1996]. Dieses Ergebnis konnte reproduziert werden (Abb. 5A). Ebenfalls durchgeführte Western-Blot-Analysen mit Ovarienlysaten bestätigten dieses Ergebnis ebenfalls (nicht gezeigt).

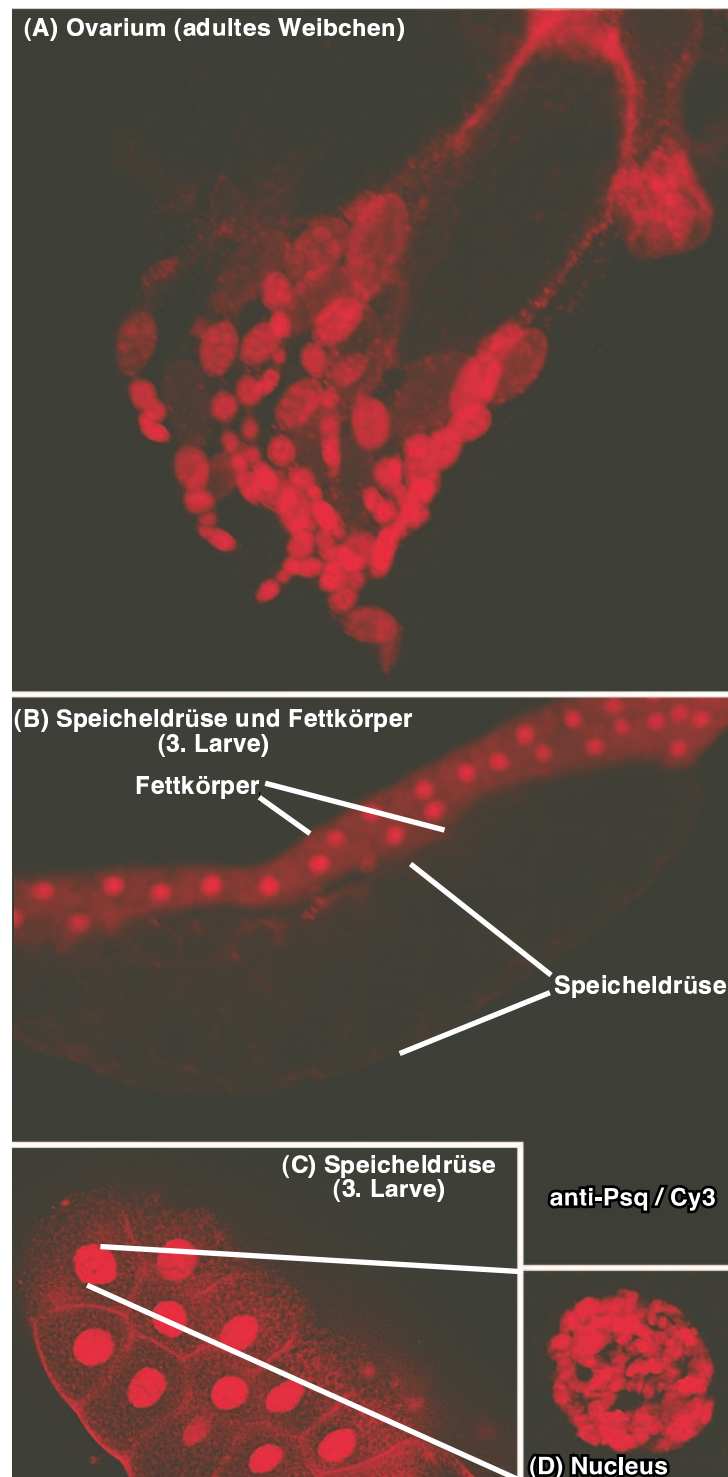


Abb. 5: In-situ-Immunfluoreszenzfärbungen von Wildtyp-Ovarien und -Speicheldrüsen mit Anti-Psq-Antikörpern. Ovariengewebe adulter Wildtypweibchen sowie Speicheldrüsen- und Fettkörpergewebe dritter Wildtyp-Larven wurden mit Anti-Psq-Antikörpern immungefärbt. Ein Cy3-gekoppelter Sekundärantikörper wurde verwendet (rot). (A), Ovariolen adulter Weibchen. Psq ist in den Zellkernen von somatischen Zellen und Zellen der Keimbahn lokalisiert. (B), Speicheldrüse und Fettkörper. Psq wird sehr stark in Zellen des Fettkörpers exprimiert und ist dort kernlokalisiert. In Zellen der Speicheldrüse läßt sich Psq nur sehr schwach kernlokalisiert nachweisen. (C), distaler Bereich einer Speicheldrüse. In seltenen Fällen lassen sich Speicheldrüsenkerne sehr stark anfärben. (D), Aufnahme am konfokalen Mikroskop eines Speicheldrüsenkerns. Bei konfokaler Betrachtung lassen sich viele distinkte Einzelbanden erkennen.

Diese Versuche wurden mit beiden Psq-Antikörpern, AS1 und AS2 (Tabelle 1), durchgeführt. Da beide Antikörper identische Ergebnisse ergaben, wurden im weiteren jedoch nur die Psq-Antikörper AS2 verwendet.

Mit den In-situ-Immunfluoreszenzfärbungen (3.2.7) wurde eine starke Expression von Psq in den Zellen des Fettkörpers nachgewiesen. Das Signal war vorwiegend im Zellkern lokalisiert, aber auch im Cytoplasma zu erkennen. In der angrenzenden Speicheldrüse konnte meist, wenn überhaupt, nur ein sehr schwaches Immunfluoreszenzsignal detektiert werden (Abb. 5B). In seltenen Fällen waren die Zellkerne der Speicheldrüsen jedoch sehr stark angefärbt; dann konnte auch Psq im Cytoplasma nachgewiesen werden (Abb. 5C). Bei stärkerer Vergrößerung konnten dann mit dem konfokalen Mikroskop einzelne Banden im intakten Zellkern aufgelöst werden (Ausschnitt in Abb. 5D).

Es war naheliegend zu vermuten, daß es sich bei dieser starken Färbung um ein stadienspezifisches Phänomen handelt. Detaillierte Untersuchungen verschiedener larvaler Stadien konnten diese Vermutung allerdings nicht bestätigen (nicht gezeigt). Während die Variabilität in der Färbbarkeit der Speicheldrüse keine klaren Schlußfolgerungen zuließ, ließ sich Psq durch Western-Analysen eindeutig in Speicheldrüsen nachweisen (nicht gezeigt und siehe 4.1.4). Ermutigt durch dieses Ergebnis wurden im folgenden Immunfluoreszenzfärbungen an polytänen Chromosomen durchgeführt.

4.1.2 BINDUNG VON Psq AN POLYTÄNE CHROMOSOMEN

Um die Bindungsstellen von Psq an polytänen Chromosomen zu kartieren, wurden Speicheldrüsenchromosomen mit Anti-Psq-Antikörpern gefärbt (3.2.8.1). Psq bindet an hunderte von euchromatischen Loci dieser Chromosomen (Abb. 6). Die Färbung zeigt, daß die Banden unterschiedliche Intensität aufweisen, wobei wenig oder keine Lokalisierung in heterochromatischen Regionen festzustellen ist. Diese Färbung polytärer Chromosomen wurde mit beiden Psq-Antikörpern AS1 und AS2 (Tabelle 1) durchgeführt und führte zu identischen Ergebnissen. In weiteren Experimenten wurde deshalb nur noch der Psq-Antikörper AS2 verwendet.

Wird dieses Psq-Bindungsmuster mit den Literaturdaten zur GAF-Bindung an polytäne Chromosomen verglichen [Raff et al., 1994; Tsukiyama et al., 1994; Granok et al., 1995; Benyajati et al., 1997], so fällt ein ähnliches Bindeverhalten beider Proteine auf. Eine erste Vermutung scheint bestätigt zu sein, daß beide Proteine zumindest an eine Schnittmenge gemeinsamer Loci binden. Um diese Hypothese

weiter zu prüfen, wurden im folgenden Doppelfärbungen an polytänen Chromosomen durchgeführt.

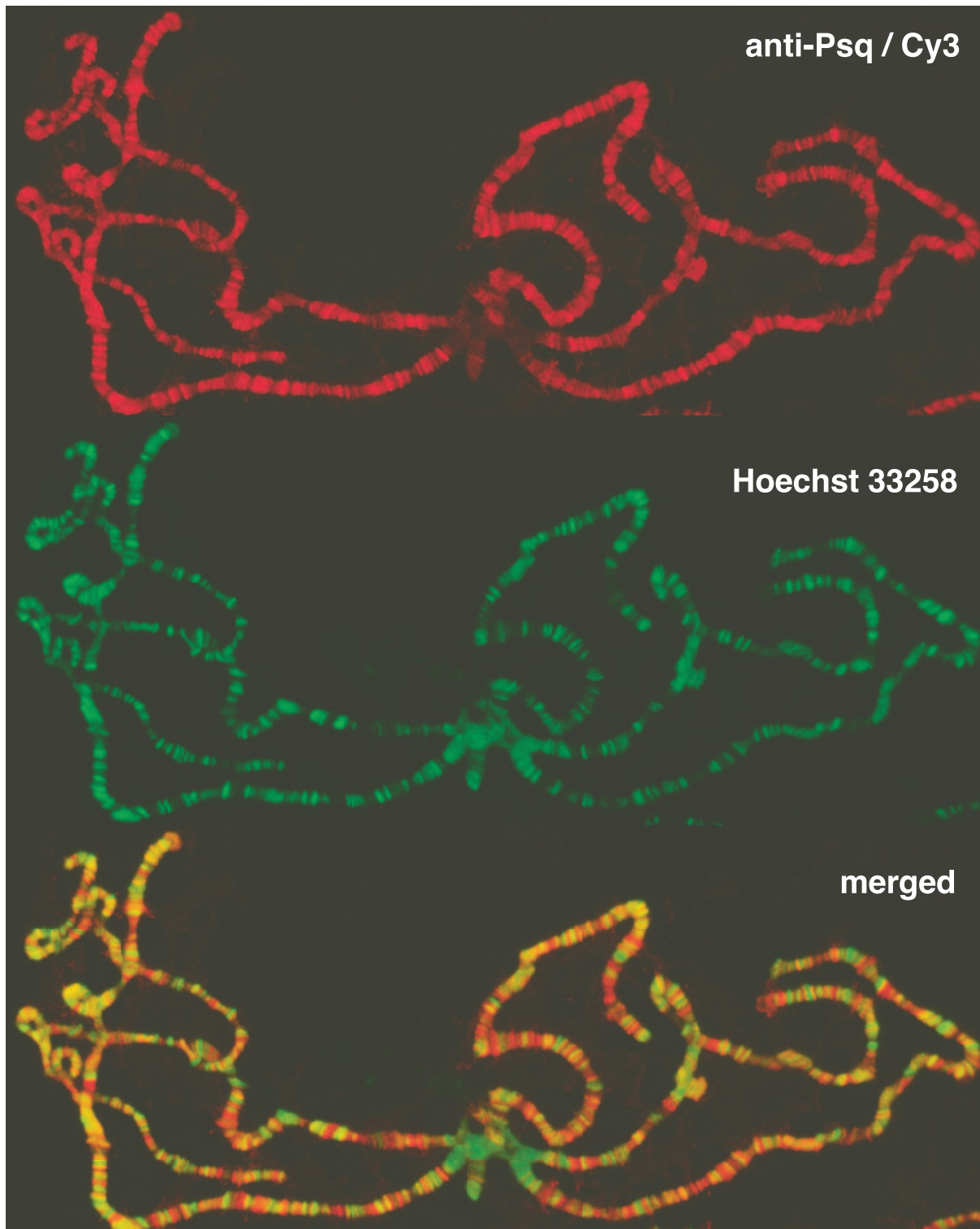


Abb. 6: Verteilung von Psq-Protein an polytänen Chromosomen. Polytäne Chromosomen aus Speicheldrüsen später dritter Wildtyp-Larven wurden mit Anti-Psq-Antikörpern (rot, Cy3-Sekundäntikörper) immungefärbt und mit dem DNA-Farbstoff Hoechst 33258 (grün) gegengefärbt.

4.1.3 BINDUNG VON Psq UND GAF AN POLYTÄNE CHROMOSOMEN

Um chromosomale Loci zu identifizieren, die sowohl Zielsequenzen von Psq als auch von GAF enthalten, wurden polytäne Chromosomen aus Speicheldrüsen mit Anti-Psq- und Anti-GAF-Antikörpern doppelgefärbt (3.2.8.1). Die GAF-Antikörper wurden, bevor sie in den hier beschriebenen Experimenten eingesetzt wurden, wie unter 3.2.5.3 beschrieben, affinitätsgereinigt.

Das Ergebnis dieser Doppelfärbung war überraschend: beide Antikörper zeigten ein identisches Färbemuster (Abb. 7). Kein einziger Locus war nur von einem der beiden Antikörper gefärbt. Es scheint, als ob mit beiden Antikörpern dasselbe Protein detektiert werden würde. Western-Analysen zeigten jedoch, daß dieses Ergebnis nicht auf eine Kreuzreaktion beider Antikörper zurückzuführen ist (Abb. 8). Die Färbemuster dieser doppelt gefärbten polytänen Chromosomen wurden mit einem konfokalen Mikroskop näher untersucht. Hierbei wurden fluoreszenzgekoppelte Sekundärantikörper eingesetzt, deren Emissionsspektren nicht überlappen, um sicherzustellen, daß die von beiden Antikörpern herrührenden Signale eindeutig separiert werden konnten. So konnte bestätigt werden, daß alle Loci, die von den GAF-Antikörpern gefärbt wurden, auch von den Psq-Antikörpern erkannt wurden und vice versa. Beide Proteine sind somit zu 100 % kolokalisiert.

Da eine Vielzahl verschiedener Bindungsloci des GAFs bereits bekannt sind, können diese durch die Ergebnisse der Doppelfärbung nun auch uneingeschränkt als Bindungsstellen von Psq genannt werden. So bindet Psq ebenso an eine Vielzahl von Genloci, die von Haushaltsgenen bis hin zu entwicklungsregulierten Genen reichen würden. Putative Zielgene von Psq sind auch induzierbare, regulierte Gene (z.B. die Hitzeschockgene *hsp26* und *hsp70*, H3/H4-Histongene [Gilmour et al., 1989]; *Adh* [Benyajati et al., 1992]; *E74* [Soeller et al., 1993]), Gene zur Musterbildung (z.B. *engrailed* [Soeller et al., 1993]; *even-skipped* [Read et al., 1990]; *fushi tarazu* [Soeller et al., 1993]; *Krüppel* [Croston et al., 1991]; *Ultrabithorax* [Biggin and Tjian, 1988]; *Polycomb* [Strutt et al., 1997]) sowie konstitutive Haushaltsgene (Bsp.: *actin-5C* [Biggin and Tjian, 1988]; α 1-tubulin [O'Donnell and Wensink, 1994]) [zusammengefaßt in Soeller et al., 1993; Becker, 1995; Granok et al., 1995].

4.1.4 Psq UND GAF SIND IN EINEM PROTEINKOMPLEX ASSOZIIERT

Eine Möglichkeit, die Kolokalisierung von Psq und GAF an Chromosomen zu erklären, besteht darin, daß beide Proteine in vivo in einem Proteinkomplex enthalten sind, der GAGA-Bindestellen erkennt. Um dies zu testen, wurden Speicheldrüsenkernextrakte hergestellt (3.2.3.1) und damit Immunpräzipitations-

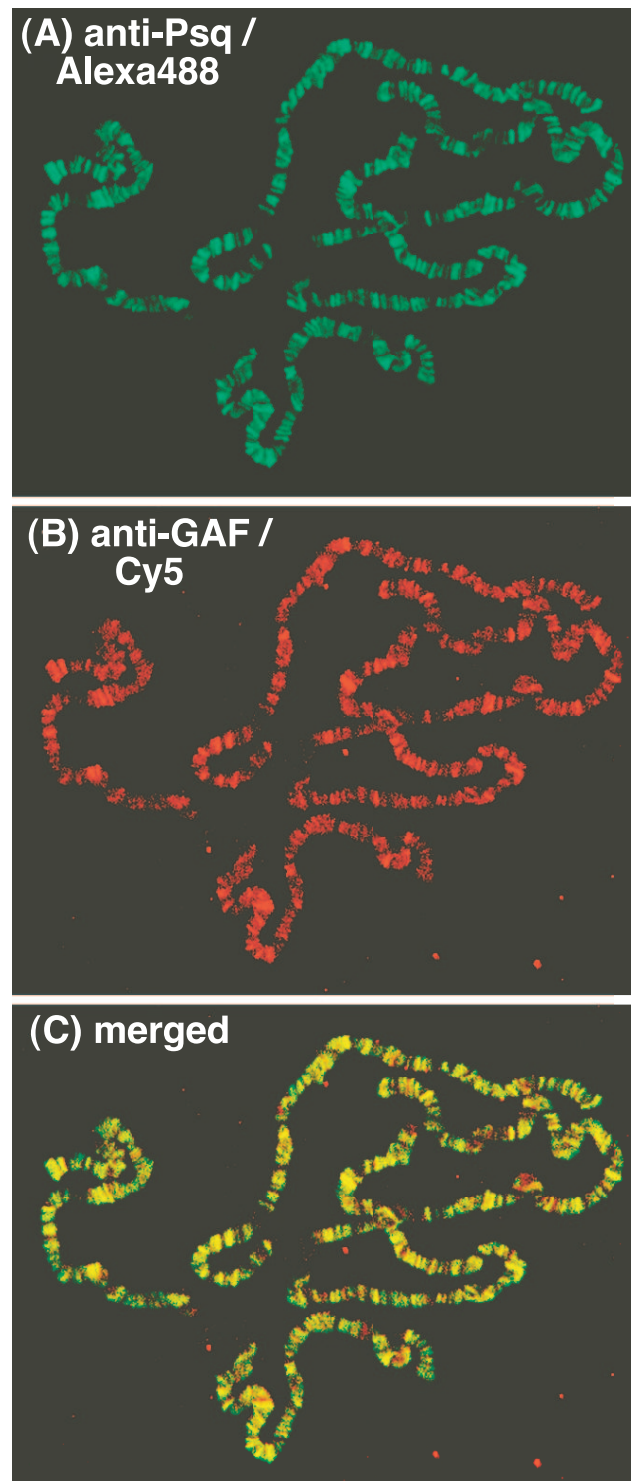


Abb. 7: Psq und GAF binden an viele identische Loci der polytären Chromosomen. Chromosomen von Speicheldrüsen später dritter Wildtyp-Larven wurden mit (A) Anti-Psq-Antikörpern (grün, Alexa fluor 488-Sekundärantikörper) und (B) Anti-GAF-Antikörpern (rot, Cy5-Sekundärantikörper) immungefärbt. In (C) wurden die Färbemuster beider Proteine übereinandergelagert. Loci, an denen beide Proteine kolokalisiert sind, erscheinen gelb. Bindungsstellen, an denen die Intensität beider Signale differiert, erscheinen leicht rot oder grün, je nachdem, welches Farbsignal überwiegt. Ein präziser Vergleich aller Banden in (A) und (B) legt nahe, daß die Färbemuster beider Muster identisch sind. Dieses Ergebnis wurde durch konfokale Mikroskopie bestätigt.

experimente (3.2.6.1) mit den Anti-Psq-Antikörpern durchgeführt (Abb. 8). Die Präzipitate wurden mittels Western Blot weiter analysiert. Mit den Psq-Antikörpern

konnte aus den Extrakten nicht nur Psq, sondern auch GAF effizient präzipitiert werden (Abb. 8A, Spuren 1 und 2). Um die Spezifität dieser Immunpräzipitation zu testen, wurden zwei Kontrollen durchgeführt. Zum einen wurde der gleiche Test in Abwesenheit der Psq-Antikörper durchgeführt. In diesem Fall kann weder Psq noch GAF detektiert werden (Abb. 8A, die beiden rechten Spuren). Zum anderen wurde geprüft, ob der Effekt der Koimmunpräzipitation spezifisch ist. Dazu wurde überprüft, ob zwei weitere Transkriptionsfaktoren (dAP-4 und BR-C) mit den Anti-Psq-Antikörpern kopräzipitieren würden. Es ist bekannt, daß beide Faktoren in Speicheldrüsen exprimiert werden [Emery et al., 1994; King-Jones et al., 1999; Renault et al., 2001]. Beide Faktoren konnten auch in den Kernextrakten, die in den Immunpräzipitationsexperimenten eingesetzt wurden, nachgewiesen werden (Abb. 8B, Spuren 3 und 4). Zudem enthalten alle Isoformen, die von BR-C kodiert werden, wie Psq und GAF, eine BTB/POZ-Protein-Interaktionsdomäne [Bardwell and Treisman, 1994; Ahmad et al., 1998]. Jedoch konnte mit den Anti-Psq-Antikörpern aus den Extrakten weder dAP-4 noch BR-C präzipitiert werden (Abb. 8B, Spuren 1 und 2). Daraus läßt sich schließen, daß die in den Immunpräzipitationsexperimenten beobachtete Interaktion zwischen Psq und GAF spezifisch ist.

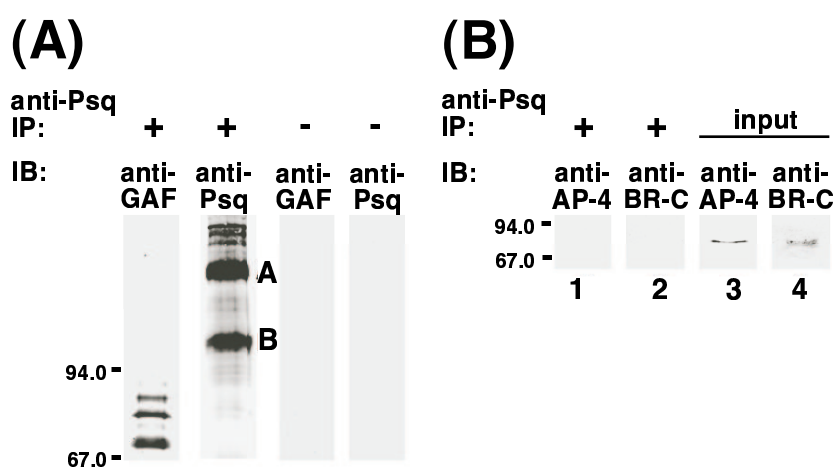


Abb. 8: Psq und GAF sind in vivo spezifisch in einem Proteinkomplex assoziiert. (A) Speicheldrüsenkernextrakte wurden mit Anti-Psq-Antikörpern immunpräzipitiert (IP) (Spuren 1 und 2), oder unter Weglassung der Antikörper scheinpräzipitiert (Spuren 3 und 4). Protein, das von den Antikörpern zurückgehalten wurde, wurde mit SDS-PAGE (Gel mit 7.5 % Polyacrylamidanteil) aufgetrennt und das Vorkommen von GAF und Psq im Präzipitat durch Immunoblots (IB) analysiert. Die GAF-Antikörper erkennen in Speicheldrüsen die gleichen Isoformen des GAF, wie sie bereits beschrieben wurden (Spur 1 und Fig. 7 in Benyajati et al. [1997]). Die Psq-Antikörper erkennen zwei starke Banden, die den Psq-Isoformen A und B entsprechen und in Horowitz und Berg [Horowitz and Berg, 1996] beschrieben wurden. In Spur 2 sind die beiden Isoformen PsqA und PsqB markiert. (B), gleiches Experiment wie in (A), jedoch wurde ein Gel mit 15 % Polyacrylamidanteil für SDS-PAGE verwendet und Anti-BR-C- und Anti-dAP-4-Antikörper wurden im Immunoblot eingesetzt (Spuren 1 und 2). Spuren 3 und 4 zeigen Western Blots mit Kernextraktprotein, das als Input in diesem Experiment eingesetzt wurde; der Immunoblot zeigt sowohl das Vorkommen von dAP-4 als auch von BR-C im Extrakt.

4.1.5 IN-VITRO-BINDUNG VON Psq AN GAF

Wie aus den Immunpräzipitationsexperimenten hervorging, sind Psq und GAF in vivo in einem Proteinkomplex assoziiert. Die Ergebnisse dieser Experimente würden sich durch eine direkte Bindung beider Proteine aneinander erklären lassen. Um diese Möglichkeit zu testen, wurden verschiedene rekombinante Formen von Psq und GAF (Abb. 9) bakteriell exprimiert und getestet, ob sie aneinander binden können.

Nachdem diese verschiedenen Psq- und GAF-Fragmente kloniert waren (3.2.2.5 und Tabelle 7), wurden sie zunächst in Tests (beschrieben unter 3.2.4) auf deren Expressionseigenschaften überprüft. Anschließend wurden die Fusionsproteine gereinigt (3.2.5) und schließlich vor ihrer Verwendung auf Identität im Western Blot (3.2.3.3) geprüft. Die Ergebnisse dieser Standardkontrollen sind hier nicht gezeigt. Erst dann wurden die Psq- und GAF-Fragmente in den nachfolgend beschriebenen Bindetests eingesetzt. GAF591 wurde wie unter 3.2.4.2 und 3.2.5.2 bakteriell exprimiert und gereinigt.

4.1.5.1 IN-VITRO-BINDUNG VON GAF AN VERKÜRZTE Psq-FORMEN

Zunächst wurden ein Psq-Protein mit vollständiger Länge sowie verkürzte Formen des Proteins als His-tag-Fusionsproteine exprimiert (Abb. 9A). Diese Proteine wurden jeweils an eine Ni²⁺-NTA-Säule gebunden (3.2.6.3). Eluate wurden anschließend im Western Blot analysiert (3.2.3.3). Es wurde nun getestet, ob die so immobilisierten Psq-Formen die GAF519-Isoform an der Säule zurückhalten können (Abb. 9B). Psq gesamter Länge (Psq1064) ist in der Lage, GAF519 effizient zu binden; GAF519 bindet hingegen nicht an das Polypeptid Psq221, das lediglich aus der Psq-Domäne besteht (Abb. 9B, Spuren 2 und 3). Wenn Psq1064 schrittweise C-terminal verkürzt wird, können alle daraus resultierenden Psq-Polypeptide (Psq651, Psq331 und Psq166) GAF519 binden; dies trifft selbst noch für das Polypeptid Psq166 zu, das im wesentlichen aus der BTB-Domäne besteht (Abb. 9B, Spuren 5, 7 und 8). Während GAF519 von Psq1064 und Psq651 gebunden wird, sind ähnliche Polypeptide, denen jedoch die BTB/POZ-Domäne fehlt (Psq942 und Psq528), zur Bindung nicht mehr in der Lage (Abb. 9B, Spuren 4 und 6). Eine auf gleiche Weise durchgeführte Negativkontrolle mit Säulenmaterial allein, ohne gebundenes Psq-Polypeptid, zeigt keine unspezifische Bindung von GAF519 (Abb. 9B, Spur 1). Die Ergebnisse dieses Bindetests belegen, daß die BTB-Domäne von Psq ausreicht, um an GAF zu binden.

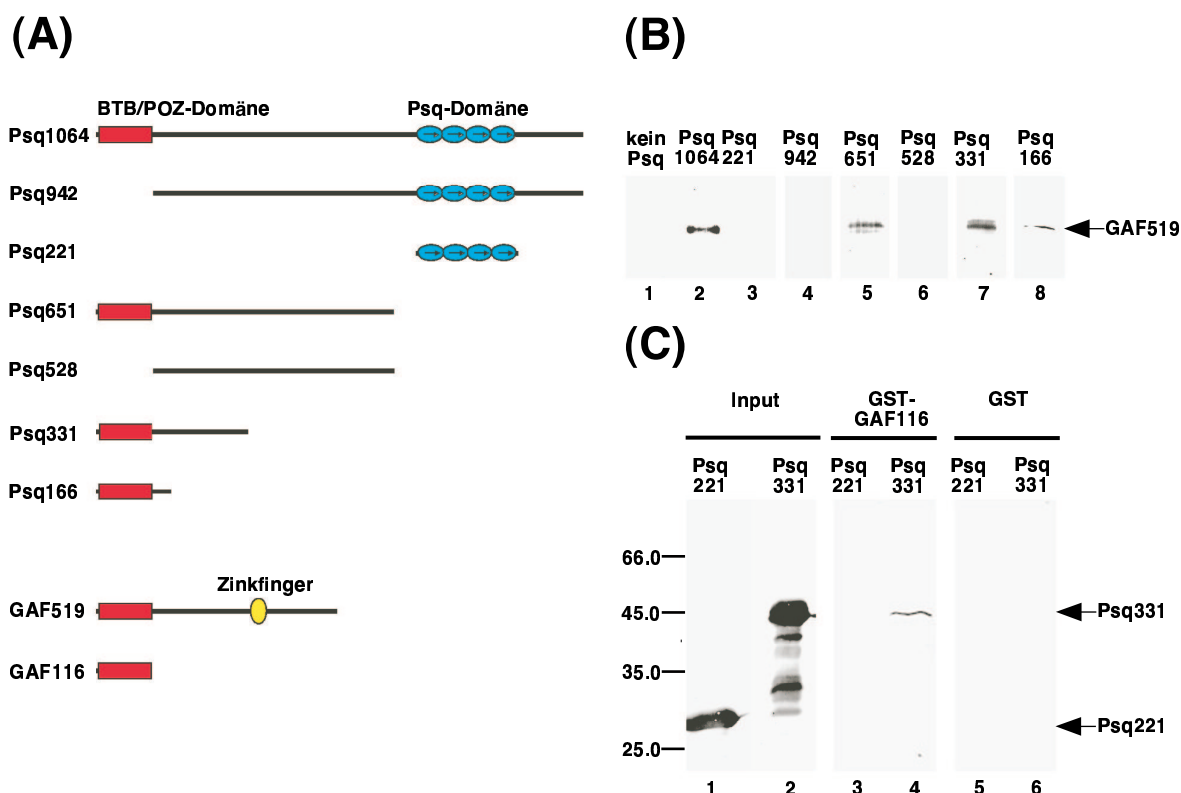


Abb. 9: Psq und GAF binden direkt in vitro über die jeweiligen BTB-Domänen aneinander. Psq und GAF gesamter Länge und verkürzter Formen, dargestellt in (A), wurden bakteriell exprimiert und daraufhin in (B) und (C) getestet, ob sie miteinander interagieren können. (B), die angegebenen Psq-Proteine wurden als His-tag-Fusionsproteine exprimiert und dann getestet, ob sie GAF519 (ohne His-tag) an einer Ni²⁺-NTA-Säule zurückhalten können. Nachdem ungebundene Proteine gewaschen wurden, wurden die Psq-Fusionsproteine und potentiell daran gebundene andere Proteine koeluiert. In einem Immunoblot mit dem Anti-GAF-Antikörper wurde das Eluat dann auf das Vorkommen von GAF519 getestet. (C), ein GST-GAF116-Fusionsprotein, bzw. als Negativkontrolle unfusioniertes GST, wurden jeweils an einer Glutathione-Matrix immobilisiert und daraufhin untersucht, ob sie Psq331 und Psq221 binden und somit zurückhalten können. Die Matrix wurde gewaschen, eluierte Proteine wurden mit SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und für den Immunnachweis wurden Anti-Psq-Antikörper verwendet (Spuren 3 bis 6). Dieser Antikörper erkennt beide im Bindungstest verwendeten His-tag-Fusionsproteine Psq221 und Psq331 (Spuren 1 und 2). Zusammenfassend zeigen (B) und (C), daß die BTB-Domänen von Psq und GAF ausreichen, um eine direkte Interaktion beider Proteine zu vermitteln.

4.1.5.2 IN-VITRO-BINDUNG VON Psq AN VERKÜRZTE GAF-FORMEN (GST-PULLDOWN)

Frühere Untersuchungen haben gezeigt, daß die BTB-Domäne eine Schnittstelle für Protein-Protein-Interaktionen darstellt [Bardwell and Treisman, 1994; Ahmad et al., 1998]. Diese Erkenntnis und die Ergebnisse des vorangegangenen Bindungstests weisen darauf hin, daß die Bindung von Psq und GAF über die BTB-Domäne beider Proteine vermittelt wird. Um nun auch zu prüfen, ob die BTB-Domäne von GAF für eine Bindung an Psq ausreicht, wurde ein GST-Fusionsprotein der BTB-Domäne von GAF (GST-GAF116, Abb. 9A) bakteriell exprimiert. Dieses Polypeptid wurde dann daraufhin getestet, ob es in der Lage ist, in einem GST-pulldown-Experiment (3.2.6.2) Psq331 zurückzuhalten. Psq331 ist ein Polypeptid, das etwa dem N-terminalen Drittel

von Psq entspricht und die BTB-Domäne enthält. Als Negativkontrolle wurde das Polypeptid Psq221 eingesetzt, das, wie bereits gezeigt wurde (4.1.5.1), nicht an GAF voller Länge (GAF519) binden kann. Abb. 9C (Spuren 3 und 4) zeigt, daß nur Psq331, nicht jedoch Psq221, von GST-GAF116 zurückgehalten wird. Als weitere Negativkontrolle wurde der Versuch mit reinem GST durchgeführt. Dabei konnte weder GST noch das restliche Matrixmaterial Psq331 oder Psq221 zurückhalten (Abb. 9B, Spuren 5 und 6).

Die Ergebnisse der beiden unabhängigen In-vitro-Bindungstests zeigen, daß Psq und GAF, vermittelt durch ihre BTB-Domänen, direkt aneinander binden können. Damit scheint es wahrscheinlich, daß auch die Assoziation von Psq und GAF in einem Proteinkomplex in vivo auf eine direkte Interaktion der BTB/POZ-Domänen beider Proteine zurückzuführen ist.

4.1.6 DIE BINDUNG VON PSQ UND GAF AN MITOTISCHE CHROMOSOMEN

Die bisher ermittelten Daten erhärten die Annahme, daß Psq und GAF als generelle Partner auftreten. Um die Richtigkeit dieser Vorstellung weiter zu testen, stellte sich die Frage, ob Psq auch an GA/CT-reiche Satelliten-DNA des centromeren Heterochromatins bindet. In *Drosophila* kommen zwei Tandem-repeats im Heterochromatin besonders häufig vor: AAGAG und AAGAGAG, die etwa 5.6 % bzw. 1.5 % der gesamten genomischen DNA ausmachen [Brutlag, 1980]. Die GA/CT-reichen Repeats sind im Heterochromatin in einem charakteristischen Muster verteilt. Diese kommen in centromeren Regionen aller Chromosomen vor, wobei jedoch die Anzahl der Repeats zwischen den einzelnen Chromosomen stark variiert. Die GA/CT-reichen Repeats sind zudem an den Telomeren des Y-Chromosoms, d.h. stark heterochromatischen Regionen, lokalisiert [Lohe et al., 1993].

In Metaphasechromosomen decken sich die Bindungsstellen des GAF mit diesen GA/CT-reichen Regionen [Raff et al., 1994; Platero et al., 1998]. Werden mitotische Chromosomen (3.2.8.2) larvaler Gehirne mit GAF-Antikörpern gefärbt, so werden starke Fluoreszenzsignale in pericentromeren Regionen beobachtet (Fig. 4B in Platero et al. [1998]). Ein gleiches charakteristisches und reproduzierbares Färbemuster ergaben auch Färbungen an Metaphasechromosomen aus Neuroblasten larvaler Gehirne mit den Anti-Psq-Antikörpern (Abb. 10A). So ist je eine kleine Menge Psq an der Spitze des X-Chromosoms und an einer Seite der primären Einschnürung des dritten Chromosoms lokalisiert. Eine große Menge ist über die gesamte Centromer-Region des zweiten Chromosoms verteilt. Am vierten

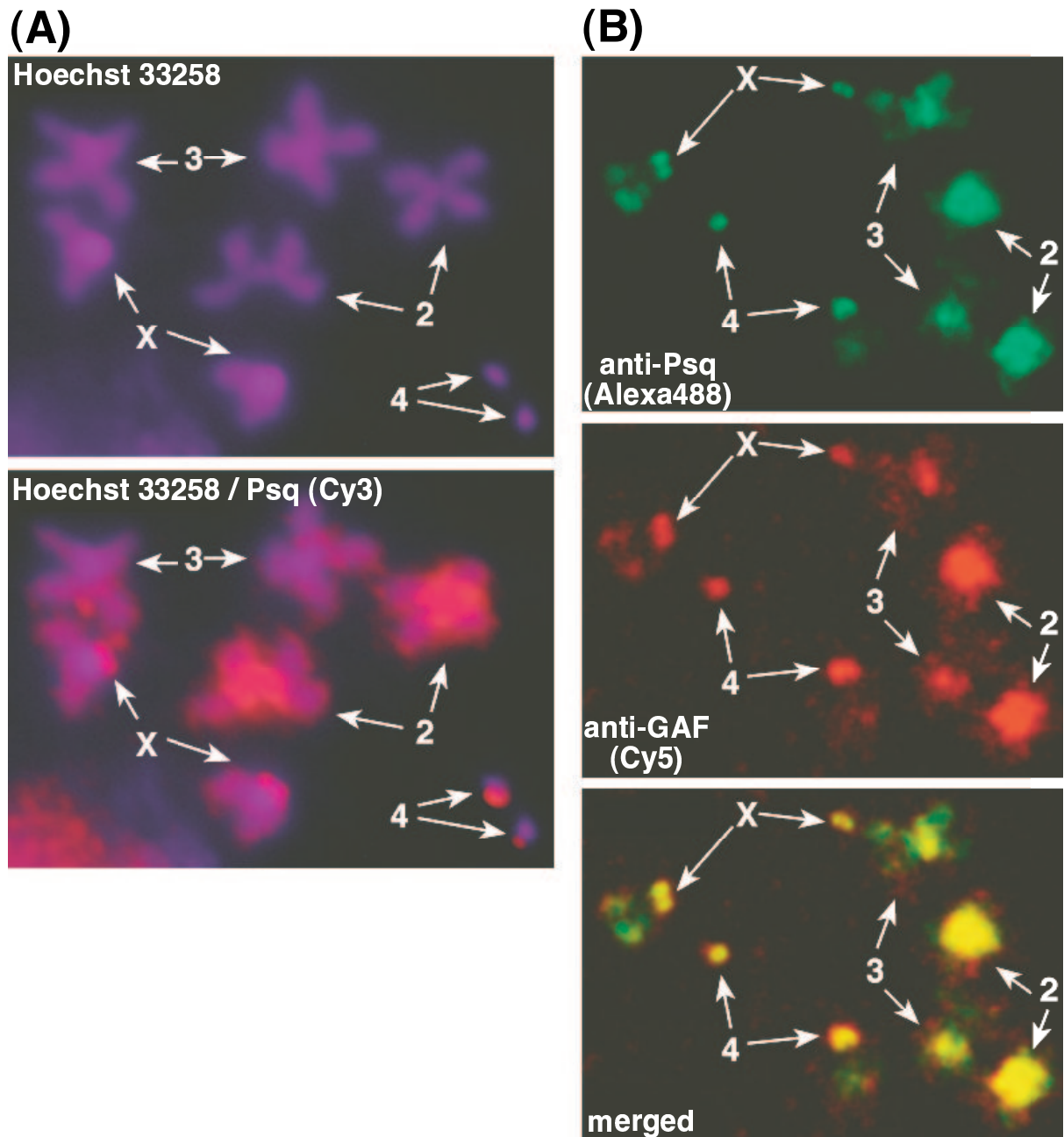


Abb. 10: Psq und GAF sind an Metaphase-Chromosomen kolokalisiert. Metaphasechromosomen wurden aus Neuroblasten larvaler Gehirne isoliert und mit Anti-Psq- und Anti-GAF-Antikörpern immungefärbt. (A) zeigt die Lokalisierung der Signale der Psq-Antikörper (rot, Cy3-Sekundärantikörper) an Chromosomen, die mit dem DNA-Farbstoff Hoechst 33258 (blau) gegengefärbt wurden. (B) zeigt eine Doppelfärbung mit Psq- und GAF-Antikörpern (grün, Alexa488-Sekundärantikörper respektive rot, Cy5-Sekundärantikörper). Psq bindet an gleiche Regionen centromeren Heterochromatins, an die auch GAF gebunden ist [Raff et al., 1994]. Die vier homologen Chromosomenpaare sind angegeben.

Chromosom findet sich Psq etwa im Zentrum wieder. Das Y-Chromosom (nicht gezeigt) ist schwach im Centromer-Bereich, stärker an den beiden Enden gefärbt.

Doppelfärbungen mit den Anti-GAF- und den Anti-Psq-Antikörpern ergaben folgendes Bild: die Bindungsstellen von Psq und GAF überlappen vollständig; die Färbemuster beider Antikörper lassen sich auch hier nicht unterscheiden (Abb. 10B).

Damit war das Ergebnis ähnlich dem der Doppelfärbung der polytären Chromosomen.

Die Verteilung von Psq an mitotischen Chromosomen scheint also, wie bereits für GAF gezeigt, mit der Verteilung der AAGAG- und AAGAGAG-Repeats übereinzustimmen.

Sowohl die Ergebnisse der Färbung polytärer als auch die Ergebnisse der Färbung mitotischer Chromosomen unterstützen das Modell, daß Psq und GAF als generelle Partner agieren. Gemeinsame Funktionen scheinen sich also nicht nur auf die Kontrolle von Zielgenen im Euchromatin zu beschränken, sondern auch auf Funktionen bei der Organisation des Heterochromatins und bei der Mitose erweitert zu sein.

4.1.7 UNTERSUCHUNG GENETISCHER INTERAKTIONEN

4.1.7.1 GENETISCHE INTERAKTIONEN ZWISCHEN psq UND Trl

Die Daten der vorangegangenen Experimente eröffnen die Fragen, ob Psq und GAF generelle Partner sind, ob beide Proteine funktionell aufeinander angewiesen sind, sich ergänzen, oder ob sie eher redundante Funktionen haben.

Ein Teil dieser Fragen wird dadurch beantwortet, daß sowohl psq - als auch Trl-Mutanten letale Phänotypen und maternale Effekte aufweisen [Weber et al., 1995; Bhat et al., 1996; Horowitz and Berg, 1996]. Beide Gene können sich nicht gegenseitig ersetzen, ihre Funktionen sind also nicht redundant.

Um nun zu prüfen, ob Psq und GAF an gleichen Prozessen beteiligt sind, ob also eine funktionelle Beziehung zwischen beiden Proteinen besteht, wurde getestet, ob die Allele psq und Trl eine mögliche direkte genetische Interaktion aufweisen. Dabei sollte auch deren Einfluß auf die Kontrolle homöotischer Genexpression verglichen werden (3.2.9).

Um eine mögliche direkte genetische Interaktion zwischen psq und Trl zu überprüfen, wurden Kreuzungen zwischen Trl^{R85} und $psq^{lola\Delta 18}$ sowie psq^{0115} bzw. psq^{RF13} durchgeführt (3.2.9.1). Es wurde untersucht, ob doppelt heterozygote Nachkommen Veränderungen des Phänotyps aufweisen. Es wurde außerdem geprüft, ob Nachkommen eine erhöhte Letalität und Sterilität aufweisen (3.2.9.1.1).

Tiere, die doppelt heterozygot für das Nullallel Trl^{R85} und die Allele psq^{0115} sowie psq^{RF13} oder $Df(2R)psq^{lola\Delta 18}$ sind, zeigten keine augenfälligen Defekte. So konnten weder Trl-Phänotypen, wie homöotische Transformationen, noch psq-Phänotypen [Weber et al., 1995] beobachtet werden. Insbesondere wurde darauf geachtet, ob das sechste in das fünfte Abdominalsegment transformiert worden ist.

Diese homöotische Transformation konnte bei Trl-Mutanten beobachtet werden [Farkas et al., 1994]. Außerdem wurde überprüft, ob die Augen, Flügel, Beine und Makrochaeten Defekte zeigen. Für diese Strukturen wurden psq-Phänotypen beschrieben [siehe 1.2 und Weber et al., 1995].

Bei den doppelt heterozygoten Tieren konnte zudem keine reduzierte Lebensfähigkeit festgestellt werden. So trat in jedem Stadium (erstes, zweites und drittes larvales Stadium, präpupales und pupales Stadium) der zu erwartende Prozentsatz doppelt heterozygoter Tiere von jeweils etwa 25 % auf.

Ebenso konnte keine reduzierte Fertilität festgestellt werden. Doppelt heterozygote Tiere wurden untereinander gekreuzt, und diese waren voll fertil.

Eine dominante genetische Interaktion zwischen psq und Trl konnte somit nicht beobachtet werden.

4.1.7.2 psq UND DIE KONTROLLE HOMÖOTISCHER GENEXPRESSION

4.1.7.2.1 psq UND GENE DER POLYCOMB GROUP

Kürzlich wurde gezeigt, daß Trl Eigenschaften eines PcG-Gens besitzt (siehe auch 1.1.2). So ist GAF Bestandteil einiger PcG-Komplexe [Horard et al., 2000], und GAGA-Bindestellen werden für die Aufrechterhaltung der Silencing-Aktivität der bxd- und iab-7-PREs (PRE des Drosophila-Gens Ultrabithorax (Ubx) respektive des Abd-B-Gens) benötigt [Horard et al., 2000; Mishra et al., 2001]. Die Rolle des GAF bei der Funktion von PREs wird auch dadurch deutlich, daß Trl-Allele den „extra sex combs“-Phänotyp von Pc-Mutanten verstärken [Strutt et al., 1997].

Eine ähnliche genetische Interaktion wurde auch für drei verschiedene psq-Allele gefunden. Hierzu wurden Kreuzungen zwischen Pc^3 und $psq^{lola\Delta 18}$ sowie psq^{0115} bzw. psq^{RF13} durchgeführt (3.2.9.2) und die Nachkommen auf den „extra sex combs“-Phänotyp hin untersucht. Wildtyp-Männchen haben lediglich an den beiden Beinen des ersten Beinpaars ein Geschlechtskamm. Bei Tieren, die doppelt heterozygot für das Allel Pc^3 und die Allele psq^{0115} sowie psq^{RF13} oder $Df(2R)psq^{lola\Delta 18}$ sind, ist der „extra sex combs“-Phänotyp von Pc-Mutanten deutlich verstärkt. Abbildung 11 zeigt beispielsweise ein Tier, das heterozygot für das Allel psq^{0115} und für das Pc^3 -Allel ist. Am zweiten Beinpaar, das normalerweise keinen Geschlechtskamm hat, trägt das Tier einen ektopischen Geschlechtskamm.

So ist in allen drei Kombinationen von psq-Allelen mit Pc^3 die Häufigkeit der Tiere mit ektopischen Geschlechtskämmen erhöht, verglichen mit Tieren, die nur das Pc^3 -Allel tragen (Tabelle 9 und Abb. 12). Teilweise wurden Tiere beobachtet, die an allen drei Beinpaaren Geschlechtskämme hatten. Die Penetranz des „extra sex

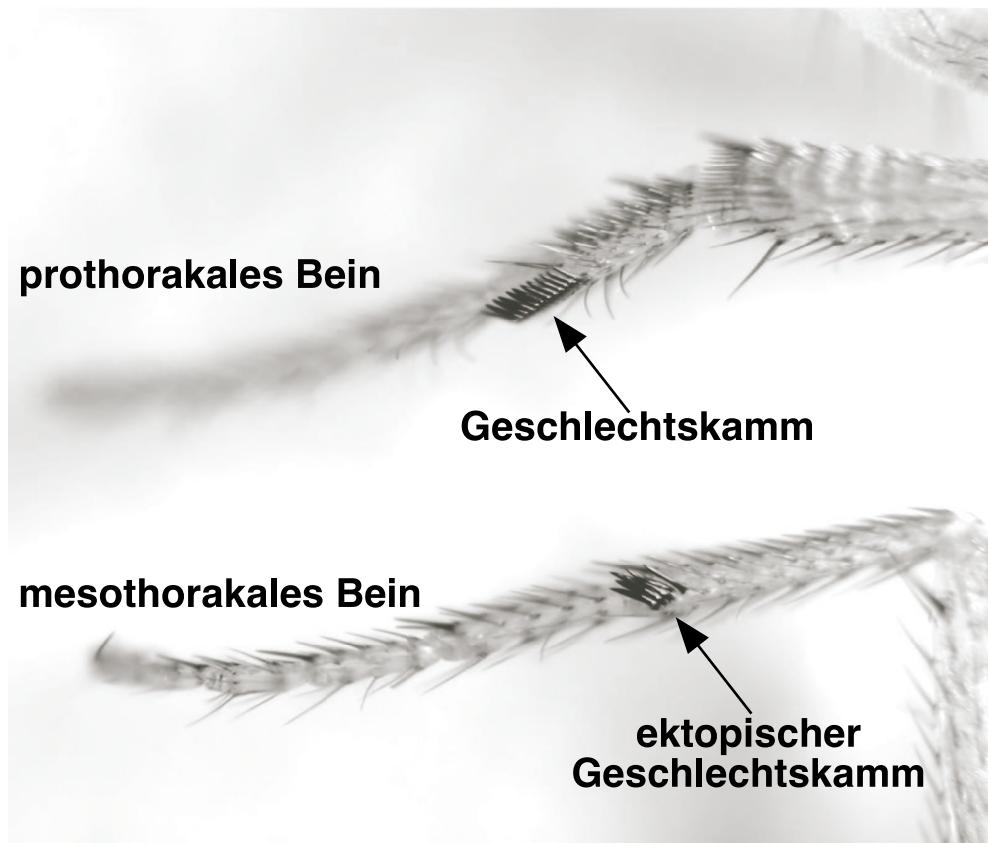


Abb. 11: psq interagiert mit Pc. Männliches Tier des Genotyps $psq^{0115}/+$; $Pc^3/+$ trägt am zweiten Bein (mesothorakales Bein) einen ektopischen Geschlechtskamm. Wildtyp-Männchen haben Geschlechtskämme nur an den Beinen des ersten Beinpaars (prothorakales Bein). Die Penetranz dieses Phänotyps ist deutlich erhöht (Tabelle 9), wenn Tiere doppelt heterozygot für das Allel Pc^3 und die Allele psq^{0115} sowie psq^{RF13} oder $Df(2R)psq^{lola\Delta 18}$ sind.

combs“-Phänotyps ist vier- bis zwölfmal verstärkt, je nachdem, welches psq -Allel getestet wird. Außerdem hängt die Penetranz deutlich von der Richtung des Kreuzungsansatzes ab. Dieselbe genetische Interaktion und die Interaktion zwischen ph (polyhomeotic) und psq wurde auch von anderen Autoren beobachtet [Hodgson et al., 2001]. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß Psq , wie auch schon für GAF gezeigt, am transkriptionellen Silencing homöotischer Loci durch PcG -Komplexe beteiligt ist. Psq und GAF scheinen also zusammen mit Pc an der Aufrechterhaltung der Repression homöotischer Genexpression beteiligt zu sein.

4.1.7.2.2 psq UND Ubx

Basierend auf der Interaktion mit Ubx und $Abd-B$ wurde Trl als Mitglied der $TrxG$ -Genfamilie identifiziert. $TrxG$ -Proteine werden zur Aufrechterhaltung der Expression homöotischer Gene benötigt [Farkas et al., 1994].

Halteren von $Ubx^{130}/+$ -Fliegen sind gegenüber denen von Wildtypfliegen leicht vergrößert (Farkas et al. [1994] und Abb. 13A). Fliegen, die doppelt heterozygot für Trl - und Ubx -Mutationen sind, haben größere Halteren als Fliegen, die nur die Ubx^{130} -Mutation tragen. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, daß die Expression des Ubx -

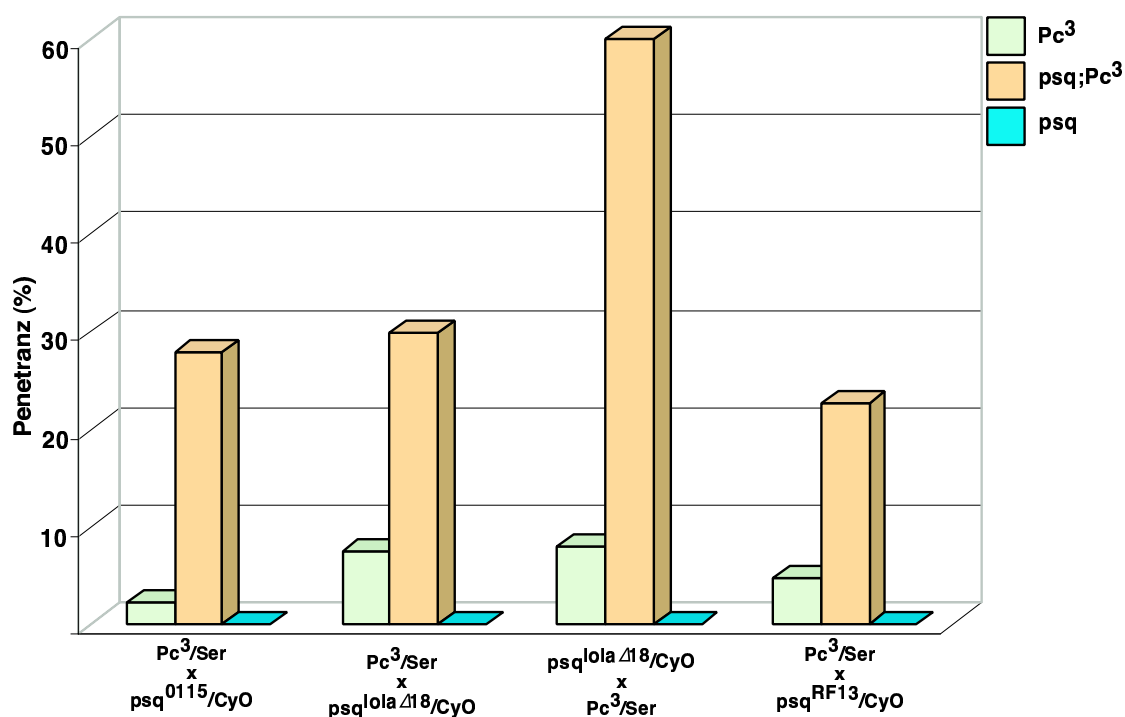


Abb. 12: Diagramm zur genetischen Interaktion von psq und Pc. Daten aus Tabelle 9. Aufgetragen sind die jeweiligen F₁-Genotypen der unter den Säulen angegebenen Kreuzungen mit der jeweiligen Penetranz (%) der Phänotypen mit ektopischen Geschlechtskämmen. Nähere Erläuterungen siehe Tabelle 9 und Abb. 11.

Tabelle 9: Genetische Interaktion zwischen psq und Pc. ^a

Genotyp	Durchschnitt, Penetranz (%), Anzahl (n) Pc x psq	Durchschnitt, Penetranz (%), Anzahl (n) psq x Pc
CyO/+; Pc ³ /+	2.1; 2.3 %; (33)	nicht bestimmt
psq ⁰¹¹⁵ /+; Pc ³ /+	3.1; 27.8 %; (45)	nicht bestimmt
psq ⁰¹¹⁵ /+; Ser/+	2.0; 0 %; (44)	nicht bestimmt
CyO/+; Pc ³ /+	2.3; 7.6 %; (36)	2.3; 8 %; (126)
psq ^{lolaΔ18} /+; Pc ³ /+	3.2; 29.8 %; (31)	4.3; 60 %; (138)
psq ^{lolaΔ18} /+; Ser/+	2.0; 0 %; (41)	2.0; 0 %; (195)
CyO/+; Pc ³ /+	2.2; 4.8 %; (57)	nicht bestimmt
psq ^{RF13} /+; Pc ³ /+	2.9; 22.7 %; (55)	nicht bestimmt
psq ^{RF13} /+; Ser/+	2.0; 0 %; (55)	nicht bestimmt

- a. Die Anzahl der Beine mit Geschlechtskamm von männlichen Nachkommen wurde gezählt. Wildtypmännchen haben nur an den prothorakalen Beinen Geschlechtskämme und deshalb 2.0 Beine mit Geschlechtskamm. Eine Fliege mit Geschlechtskamm an allen prothorakalen, mesothorakalen und metathorakalen Beinen hätte 6.0 Beine mit Geschlechtskamm, also 4.0 ektopische Geschlechtskämme. Die individuelle Zahl der Geschlechtskämme wurde bei jedem Tier bestimmt; angegeben sind der Durchschnitt der Beine mit Geschlechtskamm. Die Penetranz gibt den Prozentsatz der zweiten und dritten Beine an, bei denen ektopische Geschlechtskämme festzustellen waren. So wurden beispielsweise bei n=55 Tieren die durchschnittliche Zahl der Beine mit Geschlechtskamm pro Tier auf 2.9 ermittelt. Diese 55 Tiere haben also 160 Beine mit einem Geschlechtskamm, davon sind 50 Geschlechtskämme ektopisch. Deshalb tragen 22.7 % der 220 zweiten und dritten Beine einen ektopischen Geschlechtskamm.

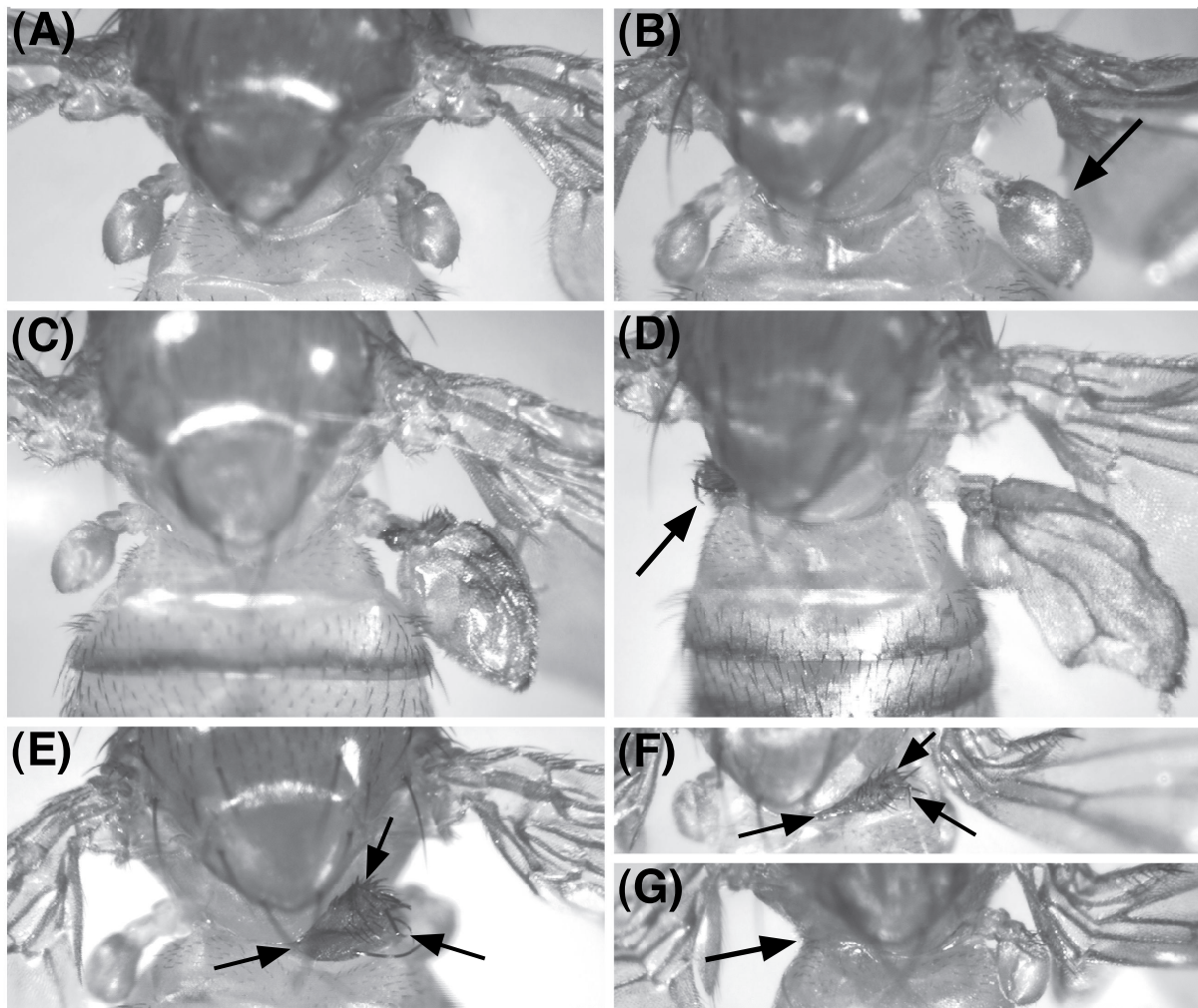


Abb. 13: psq-Mutanten verstärken die Penetranz der genetischen Interaktion zwischen Trl und Ubx. Die Halteren heterozygoter $Ubx^{130/+}$ -Fliegen ($Ubx^{130/+}$) sind relativ zu Wildtyphalteren durch den haplo-insuffizienten Charakter von Ubx vergrößert (A). Fliegen, die doppelt heterozygot für Trl- und Ubx-Mutationen sind (Trl^{R85}/Ubx^{130}), weisen unterschiedliche Transformationen auf: stark vergrößerte Halteren, Halterentransformationen zu Flügeltgeweben oder Transformationen des Postnotums (postnotales zu notales Gewebe) [hier nicht gezeigt, siehe Farkas et al., 1994]. Ähnliche Phänotypen werden in $psq^{F112/+}; Trl^{R85}/Ubx^{130}$ - bzw. $psq^{lola\Delta18/+}; Trl^{R85}/Ubx^{130}$ -Fliegen beobachtet, die Penetranz dieser Interaktion ist jedoch gegenüber Trl^{R85}/Ubx^{130} erhöht. Neben stark vergrößerten Halteren (B, Pfeil), notalen Transformationen (D, Pfeil; (E) und (F), kleine Pfeile) und Halteren-zu-Flügel-Transformationen (C und D) traten bei $psq^{F112/+}; Trl^{R85}/Ubx^{130}$ -Fliegen auch solche Fliegen auf, denen Halteren vollständig fehlten (G, Pfeil); bei Trl^{R85}/Ubx^{130} trat dieser Phänotyp nicht auf. Die Penetranz dieser genetischen Interaktion einzelner getesteter Allele ist in Tabelle 10 angegeben.

Genproduktes bei verminderter Trl-Gen dosis weiter reduziert wird. Darüberhinaus zeigen diese doppelt heterozygoten Tiere mit einer geringeren Penetranz und einer variablen Expressivität homöotische Transformationen der Halteren und des Postnotums. So sind Halteren teilweise zu Flügeln transformiert und das Postnotum entwickelt notales Gewebe [Farkas et al., 1994 Fig.1], was mit einer vollständigen Inaktivierung des Ubx-Gens erklärt wurde. Diese Phänotypen zeigten sich auch in den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit. Mit einer Penetranz von etwa 8 % (Tabelle 10) wiesen Tiere, die doppelt heterozygot für die Allele Trl^{R85} und Ubx^{130} waren, ebensolche Transformationen auf. Es ist zu beachten, daß alle Fliegen, die eine Ubx-

Mutation tragen, gegenüber Wildtypfliegen bereits leicht vergrößerte Halteren aufweisen. Dieser Phänotyp ging nicht in die Berechnung der Penetranz ein. Vielmehr gibt die Penetranz die Häufigkeit an, mit der ein verstärkter Ubx-Phänotyp beobachtet wurde. Dieser verstärkte Phänotyp beinhaltet Transformationen wie stark vergrößerte Halteren, Halterentransformationen zu Flügel oder Transformationen des Postnotums (postnotales zu notalem Gewebe).

Im folgenden sollte geprüft werden, ob auch psq-Allele zu einer veränderten Ubx-Expression führen. Um diese Möglichkeit zu prüfen, wurde ein Ubx¹³⁰-Stamm mit einem psq-Stamm (psq^{lolaΔ18}) bzw. mit doppelt heterozygoten psq; Trl-Stämmen (psq^{lolaΔ18}; Trl^{R85} oder psq^{F112}; Trl^{R85}) gekreuzt (3.2.9.3).

Im ersten Fall werden zwar auch ähnliche Transformationen bei Tieren beobachtet, die doppelt heterozygot für die Allele Df(2R)psq^{lolaΔ18} und Ubx¹³⁰ waren. Die Penetranz war jedoch im Vergleich zu den Effekten, die mit Trl erzielt wurden, viel geringer (siehe oberen Teil der Tabelle 10). Neben den bereits beschriebenen Phänotypen wie stark vergrößerte Halteren oder Haltere-zu-Flügel-Transformationen, traten aber auch einige Tiere auf, denen einzelne Halteren völlig fehlten (Abb. 13G).

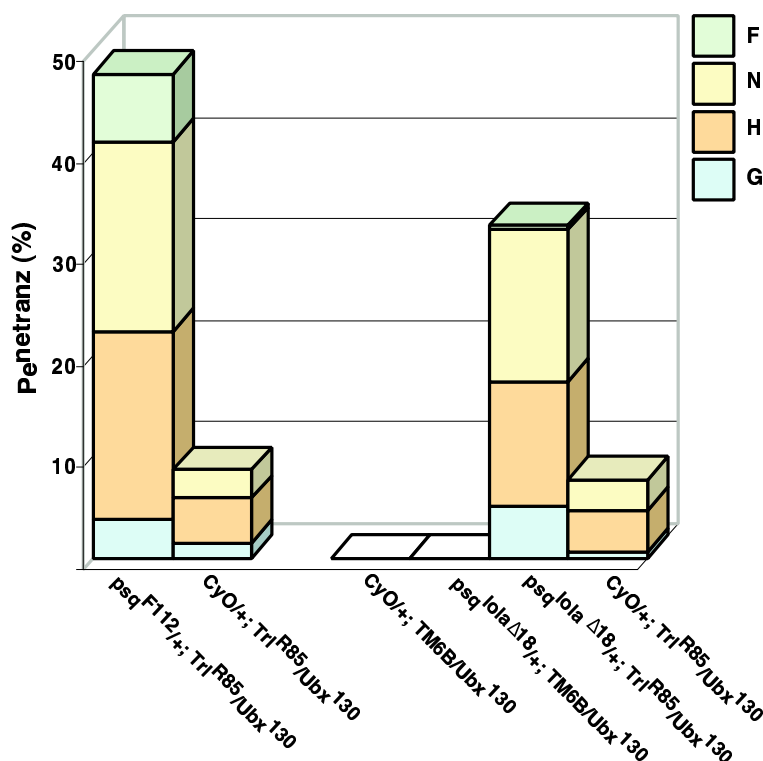


Abb. 14: Diagramm zur genetischen Interaktion von psq und Trl/Ubx. Graphische Darstellung der Penetranz der genetischen Interaktion. Daten aus Tabelle 10. Aufgetragen sind die Ergebnisse von Nachkommen der jeweils angegebenen Kreuzungen und die Penetranz (%) der jeweiligen Phänotypen. Die beobachteten verstärkten Ubx-Phänotypen sind in Transformationen der Halteren (stark vergrößerte Halteren: **G**; Halteren-zu-Flügel: **H**), notale Transformationen (**N**) sowie fehlende Halteren (**F**) unterteilt. Nähere Erläuterungen siehe Tabelle 10 und Abb. 13. Die in Tabelle 10 angegebene genetische Interaktion zwischen psq und Ubx ist hier nicht aufgetragen.

Tabelle 10: Genetische Interaktion von psq und Ubx sowie psq und Trl/Ubx. ^a

Genotyp	Penetranz (%), Anzahl (n)
CyO/+; Ubx ¹³⁰ /+	0 % (1034)
psq ^{lolaΔ18} /+; Ubx ¹³⁰ /+	1.4 % (779) G, H, N: 0.5 %, (F:1.4 %)
CyO/+; Trl ^{R85} /Ubx ¹³⁰	8.7 % (747); davon: G: 1.5 %, H: 4.4 %, N: 2.8 %
psq ^{F112} /+; Trl ^{R85} /Ubx ¹³⁰	47.8 % (863); davon: G: 3.9 %, H: 18.4 %, N: 18.7 %, (F: 6.7 %)
CyO/+; TM6B/Ubx ¹³⁰	0 % (287)
psq ^{lolaΔ18} /+; TM6B/Ubx ¹³⁰	0 % (341)
CyO/+; Trl ^{R85} /Ubx ¹³⁰	7.7 % (430); davon: G: 0.6 %, H: 4.1 %, N: 3.0 %
psq ^{lolaΔ18} /+; Trl ^{R85} /Ubx ¹³⁰	32.7 % (542); davon: G: 5.1 %, H: 12.3 %, N: 14.9 %, (F: 0.4 %)

a. Die Penetranz gibt die Häufigkeit an, mit der ein verstärkter Ubx-Phänotyp beobachtet wurde. Die jeweiligen Phänotypen sind in Transformationen der Halteren (stark vergrößerte Halteren: G; Halteren-zu-Flügel: H) und notale Transformationen (N) untergliedert. Der Phänotyp „fehlende Halteren“ (F) ist gesondert in Klammern angegeben. Unter 3.2.9.3 sind die Kreuzungen beschrieben, die zu Fliegen mit den angegebenen Genotypen führten.

Die Effekte, die bei doppelt heterozygoten psq; Ubx-Tieren beobachtet wurden, waren sehr gering, woraus eine genetische Interaktion nicht eindeutig abgeleitet werden kann. Deshalb sollte im folgenden der Einfluß von psq-Mutationen in einem Trl/Ubx-Hintergrund untersucht werden. Tiere mit diesem genetischen Hintergrund zeigen bereits häufig homöotische Transformationen. Dieser sensibilisierte genetische Hintergrund ermöglicht es, Effekte von psq-Mutationen leichter zu erkennen und so eine genetische Interaktion eindeutig ableiten zu können. Wenn in einen doppelt heterozygoten psq; Trl-Hintergrund eine Ubx-Mutation gekreuzt wird, tritt ein ähnliches Spektrum an Phänotypen auf (Abb. 13), jedoch ist der Anteil der Tiere, die den Ubx-Phänotyp aufweisen, gegenüber Trl/Ubx-Tieren etwa drei- bis fünffach erhöht (siehe Abb. 14 sowie die unteren beiden Teile von Tabelle 10). Die Erhöhung der Penetranz wurde bei zwei verschiedenen psq-Allelen beobachtet. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, daß die Expression von Ubx noch weiter reduziert wird, wenn nicht nur die Trl- sondern zusätzlich auch die psq-Gen dosis vermindert wird. Eine weitere Reduktion der Ubx-Expression führt so zur beobachteten Erhöhung der Penetranz homöotischer Transformationen.

Ein bisher noch nicht beschriebener Phänotyp trat im ersten Kreuzungsansatz (siehe oberen Teil der Tabelle 10) nur bei Fliegen mit dem Genotyp psq^{lolaΔ18}/+; Ubx¹³⁰/+, im zweiten Kreuzungsansatz nur bei Fliegen mit dem Genotyp psq^{F112}/+;

Trl^{R85}/Ubx¹³⁰ auf (siehe mittleren Teil der Tabelle 10). Dieser Phänotyp wurde auch im dritten Kreuzungsansatz (siehe unteren Teil der Tabelle 10) beobachtet, dann aber nur bei Fliegen des Genotyps psq^{lolaΔ18/+}; Trl^{R85}/Ubx¹³⁰ und nicht bei psq^{lolaΔ18/+}; TM6B/Ubx¹³⁰-Tieren. Bei diesen Fliegen konnten mit einer geringen Penetranz solche beobachtet werden, denen Halteren fehlen (Abb. 13G). Für doppelt heterozygote Trl/Ubx-Tiere wurde dieser Phänotyp nicht beschrieben. Die Penetranz dieses Phänotyps ist sehr gering (0.4 bzw. 0.9 %), bei Fliegen des Genotyps psq^{lolaΔ18/+}; TM6B/Ubx¹³⁰ des dritten Kreuzungsansatzes trat der Phänotyp „fehlende Halteren“ überhaupt nicht auf. Lediglich bei psq^{F112/+}; Trl^{R85}/Ubx¹³⁰-Fliegen scheint die Penetranz mit 6.7 % signifikant zu sein. Werden die Ergebnisse zu diesem beobachteten Phänotyp miteinander verglichen, so sind diese inkonsistent und lassen den Schluß nicht zu, daß die fehlenden Halteren auf das psq-Allel zurückzuführen sind. Es ist durchaus möglich, daß es sich dabei um eine second-site-Interaktion handelt und nicht mit dem psq-Allel in Verbindung steht.

4.1.7.3 DER EINFLUß VON psq AUF DIE PEV

Trl-Allele wurden als dominante Enhancer (E(var)) der Position effect variegation (PEV) identifiziert (1 und 1.1.1). Daraus ließ sich ableiten, daß die Funktionen des GAF vermutlich weit über die der Regulation euchromatischer Genloci hinausgehen. GAF scheint also auch eine Rolle bei der Organisation des Heterochromatins zu spielen. Deshalb wurde vermutet, daß GAF eine Chromatinkomponente ist, die ihre Wirkung durch Chromatindekondensation entfaltet [Reuter and Spierer, 1992; Farkas et al., 1994].

Die vorangegangenen Ergebnisse deuteten bereits darauf hin, daß Psq und GAF in ihren Eigenschaften weitgehend übereinstimmen. Deshalb wurde im folgenden geprüft, ob auch psq-Allele als dominante E(var) der PEV wirken können. Die Fähigkeit, die PEV zu verstärken oder abzuschwächen, wird in genetischen Studien dazu verwendet, Faktoren zu identifizieren, die dem Chromatin-vermittelten Gen-Silencing entgegenwirken oder dieses unterstützen [Wakimoto, 1998]. Um den Einfluß von psq-Allelen auf die PEV zu prüfen, wurde das unter 1 und 3.2.9.4 beschriebene System des In(1)w^{m4h}-Stammes eingesetzt.

Hierzu wurden zwei verschiedene Kreuzungsansätze verwendet, um jeweils möglichst sicherzustellen, daß die beobachteten Effekte nicht vom genetischen Hintergrund abhängen, der das labile In(1)w^{m4h}-System hätte beeinflussen können. Ziel war es, einen möglichst identischen genetischen Hintergrund zu schaffen, um so

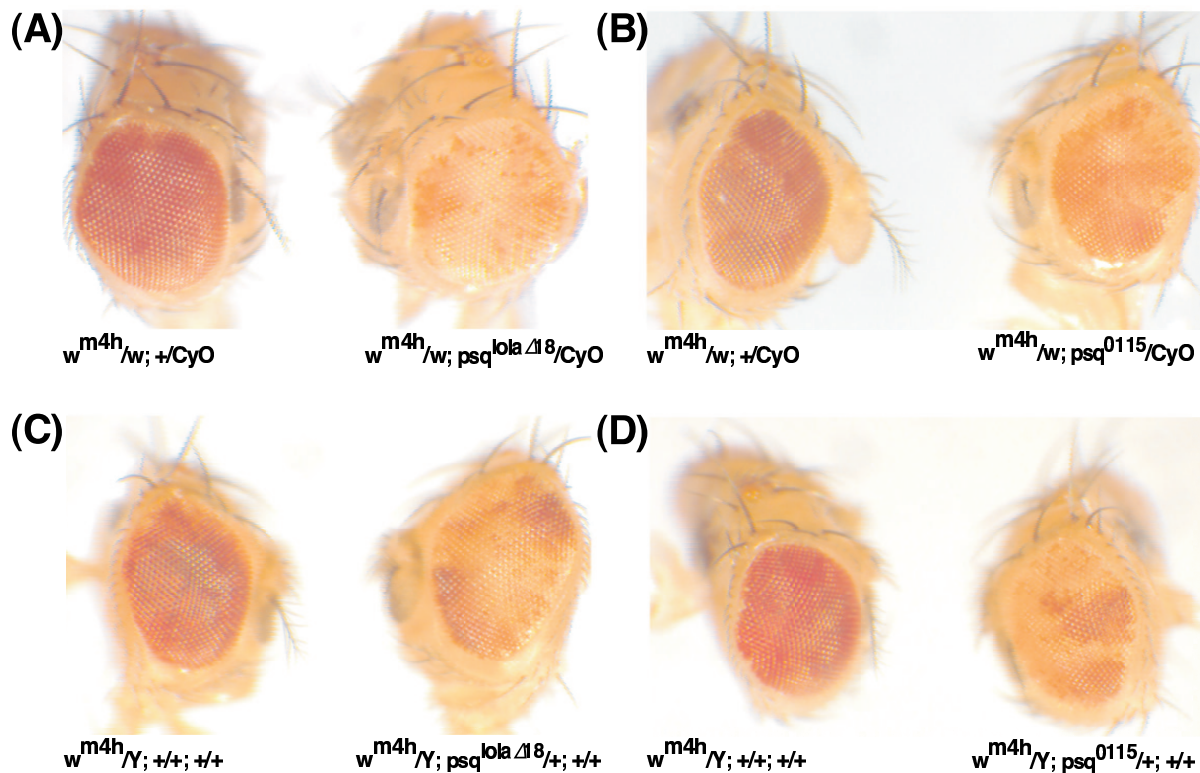


Abb. 15: psq ist ein dominanter Enhancer der PEV. Doppelt heterozygote Tiere für $In(1)w^{m4h}$ und das angegebene psq-Allel ($psq^{lola\Delta18}$ bzw. psq^{0115}) sind jeweils rechts dargestellt und zeigen eine Verstärkung der Scheckung der Augenfarbe, wenn dies mit Tieren des gleichen genetischen Hintergrundes verglichen wird, denen aber das psq-Allel fehlt (jeweils links dargestellt). Rote Bereiche sind Zellklone, die das white-Gen exprimieren, weiße Bereiche sind Zellklone, bei denen das white-Gen durch Heterochromatisierung inaktiviert wurde. Die Augen der Tiere, die heterozygot für ein psq-Allel sind, sind bedeutend heller und haben größere weiße Bereiche als Augen von Tieren ohne psq-Mutation. Das white-Gen ist häufiger durch Heterochromatisierung inaktiviert, was ein charakteristischer Effekt von Enhancer-Mutationen ist [Reuter and Spierer, 1992]. Die Kreuzungen (A) und (B), (C) und (D), die zu den angegebenen Genotypen führten, sind im Text unter 3.2.9.4 und 4.1.7.3 näher beschrieben. (A) und (B) zeigen Augen Weibchen, (C) und (D) Augen von Männchen.

mögliche Unterschiede auf das Vorkommen oder Fehlen der psq-Allele zurückführen zu können.

Kreuzungen (A) (für $psq^{lola\Delta18}$) und (B) (für psq^{0115}) führen jeweils zum Vergleich von $w^{m4h}/w; +/CyO$ - und $w^{m4h}/w; psq/CyO$ -Tieren, die einen ähnlichen genetischen Hintergrund aufweisen. Die zeitaufwendigeren Kreuzungen (C) (für $psq^{lola\Delta18}$) und (D) (für psq^{0115}) verfolgten das Ziel, schließlich Tiere mit identischem genetischem Hintergrund der Genotypen $w^{m4h}/Y; +/+; +/+$ mit $w^{m4h}/Y; psq/+; +/+$ vergleichen zu können. Diese Tiere unterscheiden sich ausschließlich durch das Vorkommen oder Fehlen eines psq-Allels. Die Kreuzungen (A), (B), (C) und (D) sind unter 3.2.9.4 detailliert beschrieben.

Wie bereits für Trl^{13C} gezeigt [Farkas et al., 1994], verstärken auch die psq-Allele $psq^{lola\Delta18}$ und psq^{0115} den variegierenden Augenphänotyp von $In(1)w^{m4h}$ -Fliegen (Abb. 15). Hierzu wurden einerseits $w^{m4h}/w; +/CyO$ -Tiere mit $w^{m4h}/w; psq/CyO$ -Tieren (aus Kreuzungen (A) für $psq^{lola\Delta18}$ und (B) für psq^{0115}) miteinander verglichen.

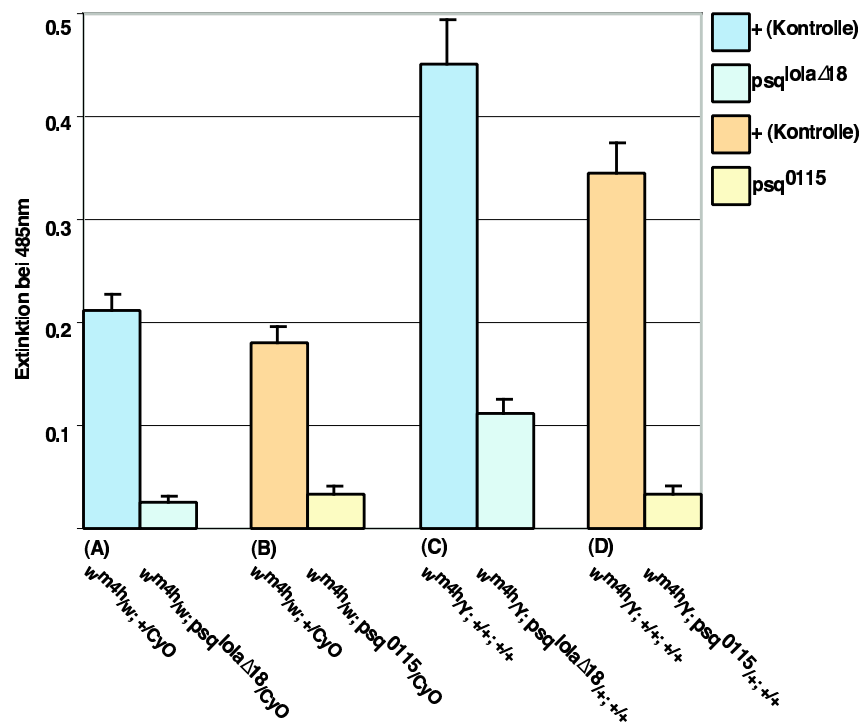


Abb. 16: Diagramm der Augenpigmentmessung zur Quantifizierung der PEV-Effekte. Graphische Darstellung der gemessenen Extinktion bei 485 nm der jeweils angegebenen Genotypen, die aus den beschriebenen Kreuzungen (A), (B), (C) und (D) hervorgegangen sind. Nähere Erläuterungen siehe Tabelle 11, Abb. 15 und im Text unter 4.1.7.3.

Andererseits ergaben die Kreuzungen (C) (für $psq^{loa\Delta18}$) und (D) (für psq^{0115}) Tiere der Genotypen $w^{m4h}/Y; +/+; +/+$ und $w^{m4h}/Y; psq/+; +/+$, die einander gegenübergestellt wurden. Die Abbildung zeigt, daß die Augen der jeweils rechts abgebildeten Tiere, die heterozygot für eine psq -Mutation sind, bedeutend heller sind als die links abgebildeten Augen von Tieren, die das psq -Allel nicht tragen. Außerdem weist die Scheckung der Augen viel größere Bereiche weißer Ommatidien auf; dies sind Zellklone, bei denen das white-Gen durch Heterochromatisierung inaktiviert wurde. Demgegenüber exprimieren die meisten Zellen der jeweils links dargestellten Augen der Kontrolltiere das white-Gen. Es ist zwar auch eine Scheckung der Augen zu erkennen, wobei die dunkelrote Augenfarbe jedoch lediglich durch einige hellere Ommatidien unterbrochen ist. Diese Phänotypen der Mutanten weisen darauf hin, daß die psq -Mutationen $psq^{loa\Delta18}$ und psq^{0115} im heterozygoten Zustand die Heterochromatisierung verstärken.

Durch ähnliche genetische Analysen wurde schon eine Vielzahl dominanter PEV-Modifikatoren identifiziert. Es wird angenommen, daß Suppressor-Loci bei Prozessen der Chromatinkondensation involviert sind, während Enhancer-Gene möglicherweise Chromatinkomponenten kodieren, die an der Dekondensierung des Chromatins beteiligt sind [Reuter and Spierer, 1992; Wakimoto, 1998]. Die Ergebnisse dieser genetischen Analysen weisen darauf hin, daß Psq chromatinverändernde

Eigenschaften besitzt und wie GAF [Farkas et al., 1994] an der Organisation des Heterochromatins beteiligt ist.

4.1.7.3.1 QUANTIFIZIERUNG DER PEV-EFFEKTE: PIGMENTMESSUNGEN

Um die PEV-Effekte zu bestätigen und zu quantifizieren, wurden Pigmentmessungen durchgeführt (3.2.9.4.1). Für jeden Meßwert wurden fünf Köpfe eingesetzt, die in 600 μ L 0.1% Ammoniaklösung und 600 μ L Chloroform homogenisiert wurden. Die in der wässrigen Phase enthaltenen Pigmentfarbstoffe wurden anschließend bei 485 nm gemessen (Tabelle 11) und die jeweilige Extinktion in Abbildung 16 graphisch dargestellt.

Tabelle 11: Der Einfluß von psq-Mutationen auf die Augenpigmentierung. ^a

Kreuzung	untersuchter Genotyp	Extinktion bei 485 nm (Mittelwert \pm Standardabweichung)	Anzahl der Messungen n
(A): psq ^{lolaΔ18}	w ^{m4h} /w; +/CyO	0.213 \pm 0.01	6
	w ^{m4h} /w; psq/CyO	0.026 \pm 0.004	7
(B): psq ⁰¹¹⁵	w ^{m4h} /w; +/CyO	0.180 \pm 0.01	8
	w ^{m4h} /w; psq/CyO	0.0330 \pm 0.008	4
(C): psq ^{lolaΔ18}	w ^{m4h} /Y; +/+; +/+	0.451 \pm 0.03	4
	w ^{m4h} /Y; psq/+; +/+	0.111 \pm 0.01	8
(D): psq ⁰¹¹⁵	w ^{m4h} /Y; +/+; +/+	0.350 \pm 0.03	4
	w ^{m4h} /Y; psq/+; +/+	0.032 \pm 0.006	8

- a. Die Extinktionswerte bei einer Wellenlänge von 485 nm sind mit ihren Standardabweichungen angegeben. Pro Messung wurden fünf Köpfe eingesetzt, die in 0.1% Ammoniaklösung und Chloroform homogenisiert und deren Augenpigmente darin extrahiert wurden. Angegeben ist auch die Bezeichnung der jeweiligen im Text unter 4.1.7.3 beschriebenen Kreuzung, aus der die untersuchten Genotypen hervorgegangen sind. Die Ergebnisse dieser Tabelle sind in Abb. 16 graphisch aufgetragen und exemplarische Augen zu den einzelnen Genotypen sind in Abb. 15 dargestellt.

4.2 PIEFKE (Pfk)

Neben der Analyse der Funktion von Psq bestand ein Teil dieser Arbeit darin, andere Proteine mit einer Psq-Domäne zu identifizieren und zu charakterisieren. Dies sollte dazu beitragen, weitere Informationen über die Psq-Familie, insbesondere über die DNA-Bindungseigenschaften der Psq-Domäne, zu gewinnen.

4.2.1 IDENTIFIZIERUNG UND KLONIERUNG VON piefke (pfk)

Hierzu wurde von Th. Sigmund das Drosophila-Genom auf Gensequenzen durchsucht, deren Produkte sowohl eine BTB/POZ-Domäne als auch Psq-Motive besitzen [Ergebnisse dieser Recherche in Sigmund and Lehmann, 2002 zusammengefaßt].

Werden die Proteine der BTB-Gruppe der Psq-Proteinfamilie (1.3) verglichen, so findet sich eines, das eine dem Psq-Protein sehr ähnliche Domänenstruktur aufweist (Abb. 19). Dieses Protein wird von einem bis dahin annotierten, aber unbeschriebenen Gen (CG 15812) kodiert, das bei 63B11-12 liegt und von uns piefke (pfk) genannt wurde [Schwendemann et al., 2001].

4.2.1.1 SEQUENZ DES cDNA-KLONS LD08856

Für die folgenden Experimente war die Kenntnis über die Sequenz dieses Gens erforderlich. Im Rahmen des Drosophila Genomprojekts (BDGP) sind 12 piefke-EST-Klone ansequenziert worden, die CG 15812 zugeordnet waren und unter Clot 2017 zusammengefaßt wurden (Tabelle 8). Diese cDNAs entstammen embryonalen, larvalen, pupalen und Schneiderzell-Banken, was auf eine breite Expression von piefke hindeutet. Das BDGP stellt diese EST-Klone als bakterielle cDNA-Kulturen zur Verfügung, wobei die cDNA direktional in einen EcoRI/XhoI-verdauten pBluescriptSK(+/-)-Vektor kloniert wurde. Sieben dieser piefke-EST-Klone (LD14503, LD08856, LD31577, LD10943, LD12813, LD14310 und LD20557) wurden näher analysiert. Das Plasmid pBluescriptSK(+/-)-LD08856 (Tabelle 3) wies das längste cDNA-Insert auf und wurde für die weitere Arbeit verwendet. Die 1954 bp-cDNA wurde vollständig sequenziert und mit EST-Sequenzen sowie dem genomischen Segment AC006489 verglichen. Daraus ergab sich, daß es sich bei der cDNA des Plasmids pBluescriptSK(+/-)-LD08856 um eine full-length-cDNA handelt (Abb. 17).

In der cDNA-Sequenz läßt sich ein ORF im Leseraster 3 von Nukleotid 84 bis 1640 vorhersagen, aus dem sich ein abgeleitetes Protein mit einer Länge von 518 AA ergibt (Abb. 17). Die Nukleotide um das Startcodon T₅**CAAGATGA** entsprechen an drei der fünf Positionen (durch Fettdruck hervorgehoben) der Konsensussequenz für

M N H L K W M G H S S T I 13

TAATGGACATCCAGCGCTCGCTGCGTAATGATAATCAGCACTGCGAGGTGGTGTGGCCT 180
M D I O R S L R N D N O H C E V V L A S 33

CCAGGGACGGCGTTGAGTGC GCGCCATCTATTCGTGCTAAGCACTTG CAGCGAACTGA 240
R D G V R V R A H L F V L S T C S E L M 53

TGCGCAACCTCCTGGTGGACGTTCCGCGCGGCCAGGAGGCAACCATAATGCTGCCCGACA 300
R N L L V D V P R G O E A T I M L P D I 73

TCCGCGGAGATTGCTGGAGTGCATGCTGTCTTCATTTACATGGGGGAGACTAGCCTGC 360
R G D L L E C M L S F I Y M G E T S L P 93

CCTCCGCGTTCGCTCCCCGAGTTCCTGGAGGCCATTAACCTCCTCGGCATCAAATCTGCCA 420
S A S L P E F L E A I N L L G I K S A I 113

TCAGCTTTGAGTGC AATCCATCGGCTAGTCCACCCAGTGTGATGTAGAGAACCATTGCT 480
S F E C N P S A S P P S V D V E N H S L 133

TAGCCGTGGAGTGC GCGCAAGTCCATTACAGGACTCCAATCGCTGAGGCCGAGCTGCTGG 540
A V E S A K S I T G L Q I A E A E L L D 153

ACGACGAGGAAGAGCCACATCCGATGGTCTCCGTCCAGCCACTACACTCGCGGGTTCTC 600
D E E E P H P M V S V P A T T L A G S Q 173

AACACCAGCCCAGCCATTCAGTCCGTCATTGGAGTACATTGATGTCTACGAGCCGCCGA 660
H Q P S H S S R S L E Y I D V Y E P P K 193

AGATCACCTACTCCATCGAGCACATGGACGGAAGTTCAGCGGCAACCAATTTATACTCA 720
I T Y S I E H M D G S S S G N Q F I L T 213

CCGAGAACACGGGCAC TTTACCATAACGCAGTCAAGTTCGAGTTTGTCCAAAATTGAGG 780
E N T G T F T I T Q S A S S L S K I E A 233

CAGATGAAACGGGTACCAGTGGCGCTGAAAGTGGACCTGGGCGATGATGACGTGGATGCGG 840
D E T G T S G A E V D L G D D D V D A D 253

ACCTTGCTGAGGATTCTGAGGAGCACGAATCACAAATGATCGACGAGGAGTTCGCGCAAG 900
L A E D S E E H E S Q M I D E E F A Q A 273

CCGATCCTCTTATGGA ACTAGAAGCTGGTACTGAAATGGACGACGATGACGACGTGCACG 960
D P L M E L E A G T E M D D D D V H D 293

ACCAACTTGTGGACGAGGAAATAGACGATAAGCCCCGCAAGTTGGGCGGGGAAAGACGC 1020
Q L V D E E I D D K P R K L G G G K T R 313

GAATCCGTCGCCCAT AAGTGC GAAGGCTGTCAAACGATTGTCGATTCGAAGCCAACGC 1080
I R R P I S A K A V K R L S D C K P T R 333

GAATCCAGCAGTTCCGAGCTCTGAAACGTGAGGTAAAAGACGATATCAACGATGCTTTGG 1140
I Q Q F A A L K R E V K D D I N D A L D 353

ATCTGGCGGCCGACGCGGTTATCATCGAGGGCTTAAGCCTACAAAAGGCCGCGACCGGT 1200
L A A D A V I I E G L S L Q K A A D R F 373

TTGATATCTCCAAGACAGTCCCTCTGGAGACGCTGCGCACTAATCCCGCCTACATGCGAA 1260
D I S K T V L W R R V R T N P A Y M R N 393

ACAATCGGGAACGACCATCCCTGCAAGAGGCTACGAGCGACTGAAGAATGGACATTCTT 1320
N R E R P S L Q E A Y E R L K N G H S L 413

TAAAGAGCATCAGCAGT GAGTTGCAAATCCCCATGTCCACGTTGCACAGACACAAGGTTCC 1380
K S I S S E L Q I P M S T L H R H K V R 433

GTCTGTCCGCCAGGGACGCTGCCCACTTCGTGTCTGCGCAAAGCGCGACAATACGC 1440
L S A Q G R L P H F V S C R K R D N T P 453

CCAAGGATGAGCTGCGGACAAATAGCCAAGGCGGTGCATGCCTGCCTGAATGAGGGAA 1500
K D E L R D K L A K A V H A C L N E G M 473

TGTCCAAAACCACGCGGCCAACCTCTTCGAGATCCCCAAGAGCACGCTCTGGAGACACC 1560
S Q N H A A N L F E I P K S T L W R H L 493

TGCAGCGACGACGAGCCAGAATAAAAAGGTCAAGAAGGAATTGAAGGCCAATTACG 1620
Q R R T T S O N K K V K K E L K A N Y G 513

GAGACGATATGCTAACTAGaaataagccttcggagttctggttttacaacgcttcagct 1680
D D M L N ● 518

ggaatcaataagttaccattaagaagccataagcatagggtttaacttcatggtgtccca 1740

Sequenz der pfk-cDNA LD08856. Abbildungsfortsetzung und Legende dazu auf der Folgeseite.

```

agcagcaagagatgctattctagaggtagttttgtagacttagttctatatgtagatacc 1860
attaccattttaactgctgctctttttattgttcactccatcgtaattgggttaattaaaata 1920
caacccaaaaattaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa 1954

```

Abb. 17: Sequenz der pfk-cDNA LD08856. Die 1954 bp lange DNA-Sequenz enthält einen offenen Leserahmen, der ein Protein mit 518 AA kodiert. Kodierende Sequenzabschnitte sind durch Fettdruck hervorgehoben. Die BTB/POZ-Domäne im N-terminalen Bereich der abgeleiteten Aminosäuresequenz (AA 2-116) ist unterstrichen. Die Psq-Domäne ist fettgedruckt und unterstrichen, wobei die Bereiche der Psq-Motive 1, 2 und 3 durch Pfeile gekennzeichnet sind. Ein mutmaßliches Polyadenylierungssignal (AUUAAA-Box) an Position 1912 der Nukleotidsequenz ist unterstrichen und kursiv-gedruckt. Der Pfeil weist auf die Position des Introns hin. Die Numerierung der AA-Sequenz ist fettgedruckt.

Translationsstartstellen von *Drosophila* T₅**CAaaAUGg** (der erweiterte Konsensus ist klein geschrieben) [Cavener and Ray, 1991]. Die Umgebung des Stopcodons **AACTAGAAAT** entspricht bis auf zwei Nukleotide dem erweiterten Konsensus **gacSTOPA/Gaau** [Cavener and Ray, 1991]. Stromabwärts von diesem Amber-Stopcodon läßt sich ab Nukleotid 1912 ein Polyadenylierungssignal erkennen, das perfekt dem Konsensus AUUAAA entspricht [Ohkubo et al., 1986; Mishima et al., 1992] (Abb. 17).

Die durch FlyBase vorhergesagte mRNA von CG15812 stimmt mit der hier ermittelten Sequenz und Struktur der piefke-cDNA überein. Damit konnte die vorhergesagte Genstruktur von pfk bestätigt werden.

4.2.1.2 GENOMISCHE ORGANISATION DES *Drosophila* pfk GENS

Aus der Sequenz der pfk-cDNA und der Sequenz des genomischen Segments



Abb. 18: Genomische Organisation des *Drosophila* pfk-Gens. Die Transkriptionseinheit von piefke (CG15812) ist auf dem linken Arm des dritten Chromosoms lokalisiert. Es wird von einem Gen (CG12079), das die 30 kDa Untereinheit der NADH Dehydrogenase (ubiquinone) kodiert und von einem Gen unbekannter Funktion (CG11495) flankiert. Exon-Intron-Strukturen (für CG11495 und CG12079 vom BDGP vorhergesagt, bzw. für CG15812 basierend auf der piefke-cDNA erstellt) sind angegeben. Schwarze Blöcke markieren kodierende, graue nicht-kodierende Exon-Sequenzen. Für CG11495 wurde bisher keine cDNA isoliert. Deshalb bleibt die Struktur dieses Gens, für das ein langes ORF (schraffierter Block) vorhergesagt ist, unbekannt. Das piefke-Gen umfaßt etwa 2 kb und wird durch ein 71 bp-Intron in zwei Exons getrennt. Das erste Exon, das nur aus dem Startcodon der Translation besteht, ist in dieser Abbildung überproportional gezeichnet.

AC006489 konnte die Exon-Intron-Struktur abgeleitet werden. Die Transkriptionseinheit von pfk hat eine recht einfache Struktur. Sie umfaßt etwa 2 kb und besteht aus nur zwei Exons, die durch ein 71 bp-Intron getrennt sind. Die Spleiß-

Stellen folgen dem GT-AG-Konsensus [Mount et al., 1992], wobei die Umgebung der 3'-Spleiß-Stelle der Konsensussequenz CAG entspricht. Das Genvorhersageprogramm GeneMark.hmm (3.2.10.2) bestätigt diese Struktur, basierend auf der Sequenz von AC006489.

piefke befindet sich auf dem Plusstrang des genomischen Segments AC006489 und ist auf dem linken Arm von Chromosom 3 (3L) in der Region 63B11-12 der zytogenetischen Karte des Drosophila-Genoms lokalisiert. pfk wird auf jeder Seite von einem Gen flankiert (CG 11495 und CG 12079). CG 11495 (lokalisiert auf dem Plusstrang) kodiert ein Produkt unbekannter Funktion, während CG 12079, das in die entgegengesetzte Richtung transkribiert wird, die 30 kDa Untereinheit der ubiquinone-NADH Dehydrogenase kodiert (Abb. 18). Kurios ist, daß das erste Exon von piefke allein aus dem Startcodon der Translation besteht.

4.2.1.3 STRUKTUR DES PIEFKE-PROTEINS

Die full-length-piefke-cDNA enthält einen offenen Leserahmen, der ein 518 AA-Protein kodiert (Abb. 17). Die Domänenstruktur von Pfk ist der von Psq sehr ähnlich (Abb. 19): neben der C-terminalen Psq-DNA-Bindungsdomäne enthalten beide Proteine eine N-terminale BTB/POZ-Domäne. Während die Psq-Domäne von Psq allerdings aus vier Psq-Repeats besteht, enthält Pfk nur drei Psq-Repeats.

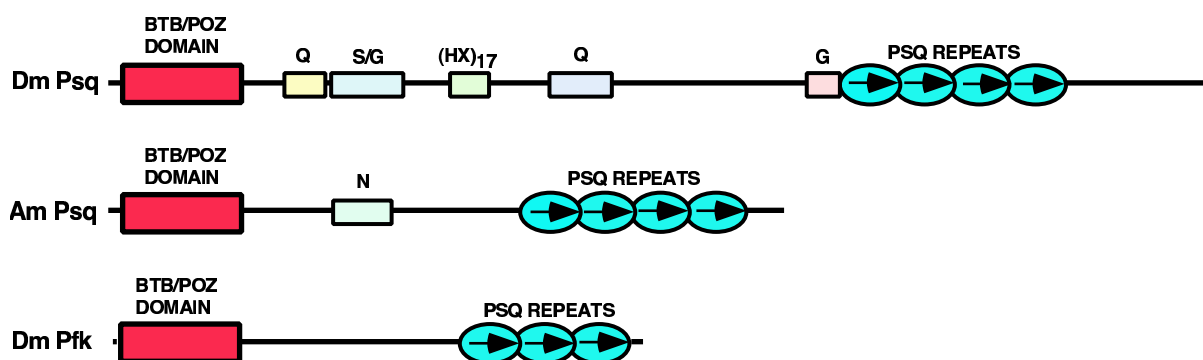


Abb. 19: Vergleich von Pfk und Psq-Proteinen. Domänenstruktur der Psq-Proteine von Drosophila (Dm Psq) und Apis (Am Psq) und des Pfk-Proteins von Drosophila. Die Strukturen wurden von publizierten cDNA-Sequenzen abgeleitet [Weber et al., 1995; Horowitz and Berg, 1996]. Die für Dm Psq gezeigte Struktur wird vom längsten ORF unter mehreren alternativen cDNAs kodiert. Blöcke zwischen der BTB/POZ- und der Psq-Domäne (Psq-Repeats) markieren Regionen, in denen bestimmte Aminosäuren gehäuft vorkommen. Die jeweiligen AA sind angegeben. Die (HX)₁₇-Box kennzeichnet eine Region mit 17 Histidinresten, die mit anderen Aminosäureresten alternieren.

Ein Abgleich der einzelnen Psq-Repeats zwischen Psq und Pfk zeigt jedoch, daß die Reihenfolge der Repeats innerhalb der jeweiligen Domäne konserviert ist; so ist Psq-Repeat 1 von Pfk dem Repeat 1 von Psq ähnlicher als allen anderen Repeats von Psq. Dies trifft ebenso für die Repeats an anderen Positionen zu (Abb. 20). Neben den Psq- und BTB/POZ-Domänen finden sich in Psq Sequenzen, die reich an bestimmten

Aminosäuren sind und die mit transkriptionsaktivierenden Funktionen in Zusammenhang gebracht werden (Poly-Glutamin-Bereiche und (HX)_n-Repeats) [1.1 und 1.2 sowie Janknecht et al., 1991; Agianian et al., 1999; Espinas et al., 1999; Wilkins and Lis, 1999; Vaquero et al., 2000; Greenberg and Schedl, 2001]. Solche Sequenzen konnten in Pfk nicht gefunden werden.

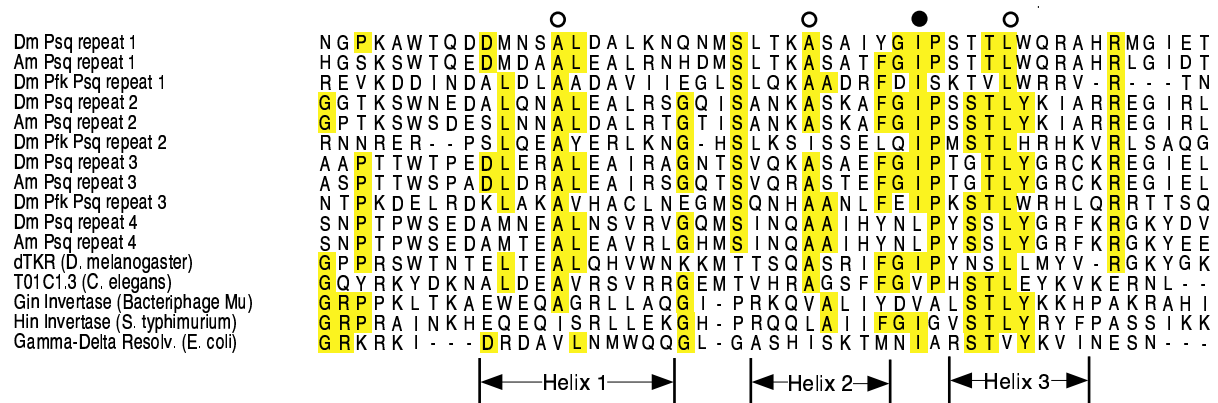


Abb. 20: Vergleich von Aminosäuresequenzen von Psq-Motiven und DNA-bindenden Domänen prokaryotischer Rekombinasen. Die Psq-Motive von *Drosophila* Psq (Dm Psq), *Apis mellifera* Psq (Am Psq), *Drosophila* Pfk (Dm Pfk), *Drosophila* TKR (tyrosine kinase-related protein, dTKR) und eines Polypeptids, das nach dem Cosmid T01C1 (T01C1.3) von *C. elegans* vorhergesagt ist, sind mit ausgewählten Rekombinase-Domänen verglichen. Die Rekombinasen katalysieren verschiedene sequenzspezifische Rekombinationsreaktionen in Prokaryoten. Positionen, die bei mindestens 40% der Sequenzen identisch sind, wurden gelb hinterlegt. Die Kokristallstrukturen von DNA und Hin Rekombinase bzw. $\gamma\delta$ -Resolvase [Feng et al., 1994; Yang and Steitz, 1995] zeigen, daß deren DNA-Bindungsdomänen aus drei α -Helices besteht, die von herausragenden Armen flankiert werden. Eine computergestützte Strukturanalyse sagt die gleiche helikale Struktur für die Psq-Motive vorher [Lehmann et al., 1998]. Die Position dieser drei α -Helices der DNA-Bindungsdomäne der Hin Rekombinase ist unter dem Sequenzvergleich dargestellt. Helix 3 ist die Erkennungshelix (recognition helix) und bildet zusammen mit Helix 2 ein helix-turn-helix-like-Motiv. Offene Kreise und der schwarze Kreis markieren Positionen, die von nicht-polaren AA-Resten in allen verglichenen Sequenzen besetzt sind. Offene Kreise markieren Reste, die den Teil eines hydrophoben Kerns der α -Helices der $\gamma\delta$ -Resolvase bilden, die auch in der DNA-Resolvase und Invertase-Familie konserviert sind [Yang and Steitz, 1995].

4.2.2 BAKTERIELLE EXPRESSION UND REINIGUNG VON Pfk

Um Fragen zur Expression und intrazellulären Lokalisierung von Pfk weiter nachzugehen, sollten Antikörper erzeugt werden, die gegen das Pfk-Protein gerichtet sind. Hierzu wurde zunächst der pfk ORF (der klonierte kodierende Abschnitt ist in Abbildung 17 hervorgehoben) in einen pET-Vektor kloniert (3.2.2.5), der eine bakterielle Expression des Pfk-Proteins als His-tag-Fusionsprotein nach Induktion mit IPTG ermöglicht (3.2.4.1). Erste Expressionsstudien ergaben, daß das rekombinante Protein sehr stark exprimiert wird und nach 3.5 h maximale Konzentration erreicht (Abb. 21A). Außerdem entspricht die Größe dieses bakteriell exprimierten Proteins (etwa 70 kDa) sehr gut der anhand der Sequenz errechneten Größe von Pfk (etwa 62 kDa). Ein Test der zellulären Verteilung (3.2.4.4) des bakteriell exprimierten Proteins ergab, daß es fast ausschließlich in Inclusion Bodies vorlag (Abb. 21B). Dieser

Umstand wurde ausgenutzt, indem zunächst die Inclusion Bodies aufgereinigt wurden (3.2.5.1.2). Anschließend wurde das His-tag-Fusionsprotein unter denaturierenden Bedingungen affinitätschromatographisch über eine Ni²⁺-NTA-Säule gereinigt (Abb. 21C). Das Eluat dieser Reinigung wurde dann mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Pfk-Proteinbande ausgeschnitten. Damit wurden zwei unabhängige, gegen das gesamte Pfk-Protein gerichtete, polyklonale Kaninchen-Antiseren hergestellt (3.2.5.1.2).

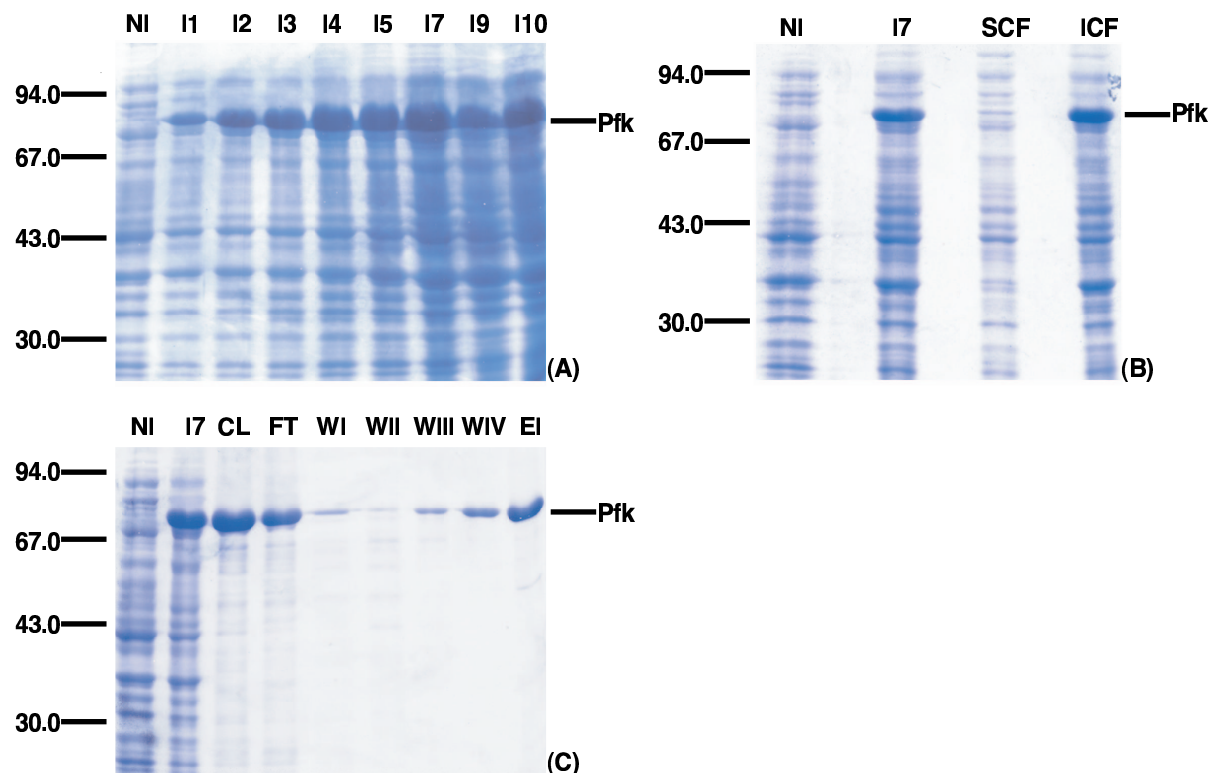


Abb. 21: Expression und Reinigung von rekombinantem Pfk-Protein. Proteine wurden durch SDS-PAGE getrennt und mit Coomassie gefärbt. (A), Zeitverlauf der Expression von rekombinantem 6xHis-Tag Pfk-Protein. Das totale Zelllysate einer bakteriellen Transformante BL21(DE3)-pET21b-pfk wurde vor Induktion mit IPTG (NI) und nach IPTG-Induktion (1 mM) analysiert. In 30 min Abständen wurden der Kultur Proben entnommen (I1 bis I10). (B), ein Test zur zellulären Verteilung der Proteinexpression ergab, daß Pfk ausschließlich in Inclusion Bodies akkumuliert. 3.5 h nach der Induktion wurde ein bakterielles Zelllysate hergestellt und in eine lösliche sowie unlösliche zytoplasmatische Fraktion (SCF und ICF) aufgetrennt. (C), Profil der Reinigung des rekombinanten Pfk-Proteins. Pfk wurde 3.5 h in BL21(DE3)-Zellen exprimiert und dann aus den Inclusion Bodies unter denaturierenden Bedingungen gereinigt. Die unlösliche zytoplasmatische Fraktion wurde in 6 M Harnstoff gelöst (cleared lysate, CL), auf eine Ni²⁺-NTA-Agarosesäule geladen und mit der angegebenen Imidazolkonzentration in Gegenwart von 6 M Harnstoff eluiert. Durchlauf (flow-through, FT); 5 mM- (WI); 20 mM- (WII); 40 mM- (WIII); 60 mM-Waschschritt (WIV); 1000 mM Elutionsschritt (EI).

4.2.3 WESTERN-BLOT-ANALYSE

4.2.3.1 ANTIKÖRPERTEST MIT GEREINIGTEM REKOMBINANTEM Pfk

Um die erfolgreiche Immunisierung der Kaninchen zu überprüfen, wurden die Antiseren zunächst daraufhin getestet, ob sie das zur Immunisierung eingesetzte

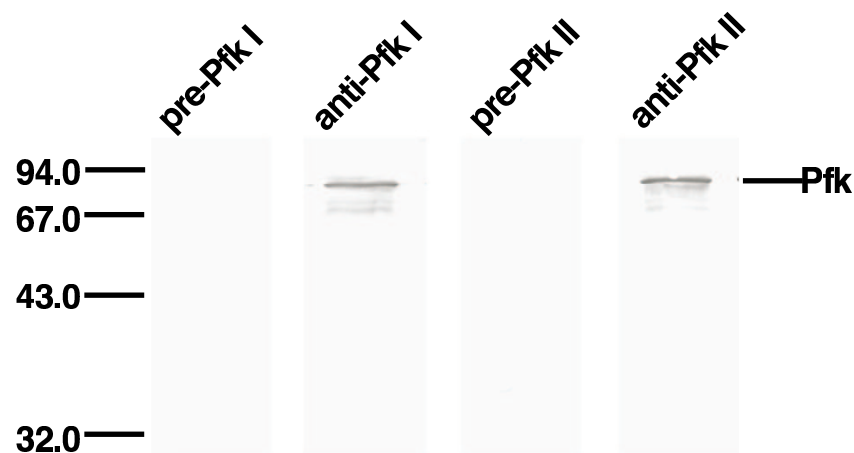


Abb. 22: Test der Antikörper im Western Blot. Zwei unabhängig entstandene Kaninchen-Antiseren, die gegen das gesamte Pfk-Protein gerichtet sind, wurden hergestellt (anti-Pfk I und anti-Pfk II). Um diese Antiseren zu testen, wurde rekombinantes Pfk-Protein (Eluat E1; Abb. 21C) mit einem 15 % SDS-PAGE-Gel aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Getrennte Streifen dieses Filters wurden mit diesen Antiseren und den entsprechenden Präimmunseren (pre-Pfk I und pre-Pfk II) inkubiert. Beide Antikörper, anti-Pfk I und anti-Pfk II, erkennen sowohl Pfk voller Länge als auch einige Abbauprodukte von Pfk.

gereinigtes Pfk-Protein erkennen. Hierzu wurde gereinigtes rekombinantes Pfk-Protein durch SDS-PAGE aufgetrennt (3.2.3.2), auf Nitrozellulosefilter transferiert und diese dann mit den Antiseren aus beiden Immunisierungen (anti-Pfk I und anti-Pfk II) inkubiert (3.2.3.3). Auf gleiche Weise fand eine Inkubation mit den jeweiligen Präimmunseren (pre-Pfk I und pre-Pfk II) statt. Beide Antikörper erkennen jeweils neben gereinigtem Pfk-Protein gesamter Länge (bei 70 kDa) auch einige Abbaubanden von Pfk, während die Präimmunseren dazu nicht in der Lage sind (Abb. 22).

4.2.3.2 Pfk-EXPRESSION IN SPEICHELDRÜSEN UND OVARIEN

Von Psq ist bereits bekannt, daß es in Ovarien adulter Weibchen und in Speicheldrüsen exprimiert wird. Deshalb sollte zunächst geprüft werden, ob Pfk in diesen Geweben ebenfalls exprimiert wird. Um die Expression von Pfk im Western Blot zu untersuchen, wurden deshalb Extrakte larvaler Speicheldrüsen, Ovarienextrakte adulter Weibchen und Speicheldrüsenkernextrakte hergestellt (3.2.3.1). Letztere wurden eingesetzt, um die Kernlokalisierung von Pfk zu überprüfen.

Sowohl der Antikörper anti-Pfk I als auch anti-Pfk II erkennt ein 70 kDa-Protein in allen getesteten Extrakten. Die Größe dieses Proteins stimmt mit der Größe des rekombinant exprimierten Pfk-Proteins überein (4.2.2). Dies entspricht nicht ganz der auf Sequenzdaten basierend berechneten Größe von Pfk, die 62 kDa wäre. Neben dieser Bande bei 70 kDa erkennen die Antikörper in den Extrakten von Gesamtgeweben mehrere kreuzreagierende Banden.

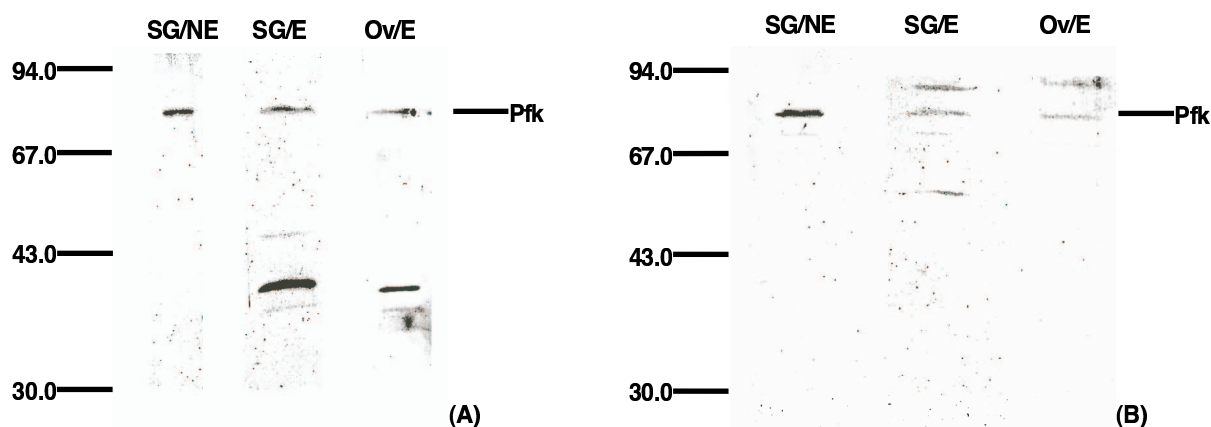


Abb. 23: Pfk ist ein kernlokalisiertes Protein und wird in Speicheldrüsen und Ovarien exprimiert. Eine Western Blot Analyse weist die Expression von Pfk in Speicheldrüsen und Ovarien nach. Proteine eines Speicheldrüsenkernextrakts (SG/NE), sowie eines Gesamtzellextrakts von Speicheldrüsen (SG/E) und Ovarien (Ov/E) wurden durch SDS/PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Die Filter wurden dann zum einen mit Antiserum anti-Pfk I (**A**) zum anderen mit anti-Pfk II (**B**) inkubiert. Beide Antikörper erkennen ein einziges 70 kDa großes Protein in Speicheldrüsenkernextrakten; dieses Protein wird auch in den Gesamtzellextrakten erkannt. Die Größe dieses Proteins entspricht der basierend auf Sequenzdaten berechneten Größe von 62 kDa des gesamten Pfk-Proteins. Zu beachten ist, daß beide Antiseren verschieden stark mit anderen Polypeptiden der Gesamtzellextrakte reagieren, die jedoch in Speicheldrüsenkernextrakten nicht detektiert werden. Die Präimmunsereen erkennen keine Proteine (nicht gezeigt).

In Speicheldrüsenkernextrakten erkennen die beiden Antikörper jedoch ausschließlich jeweils das 70 kDa-Protein (Abb. 23). Aus diesem Ergebnis läßt sich schließen, daß Pfk, wie von einem DNA-bindenden Protein erwartet, im Zellkern lokalisiert ist. Da in den Kernen der Speicheldrüsen nur ein einziges Protein erkannt wird, konnten die Antikörper im folgenden ohne weitere Reinigung für Immunfärbungen polytärer Chromosomen eingesetzt werden.

Ein mit den gleichen Proteinextrakten durchgeführter Western Blot mit den Präimmunsereen pre-Pfk I und pre-Pfk II ergab kein Signal (nicht gezeigt).

4.2.4 Pfk BINDET AN POLYTÄNE CHROMOSOMEN

Da Pfk in Speicheldrüsenkernextrakten durch Western-Blot-Analysen (4.2.3.2) nachgewiesen wurde, konnte bereits gezeigt werden, daß Pfk ein im Zellkern lokalisiertes Protein ist. Um zu prüfen, ob Pfk zudem eine Komponente des Chromatins ist, wurde die Bindung von Pfk-Protein an polytäre Chromosomen von Speicheldrüsen durch Immunfluoreszenzmikroskopie (3.2.8.1) getestet. Eine Färbung mit den Anti-Pfk-Antikörpern zeigte, daß Pfk an spezifische chromosomale Loci bindet, wobei beide Antikörper, anti-Pfk I und anti-Pfk II, das gleiche Färbemuster ergaben (Abb. 24). Im Unterschied zu den meisten Transkriptionsfaktoren, die bisher auf Bindung an polytäre Chromosomen untersucht wurden, zeigt Pfk nur an wenigen Loci eine starke Bindung. Dies wird besonders deutlich, wenn die Bindung von Pfk mit

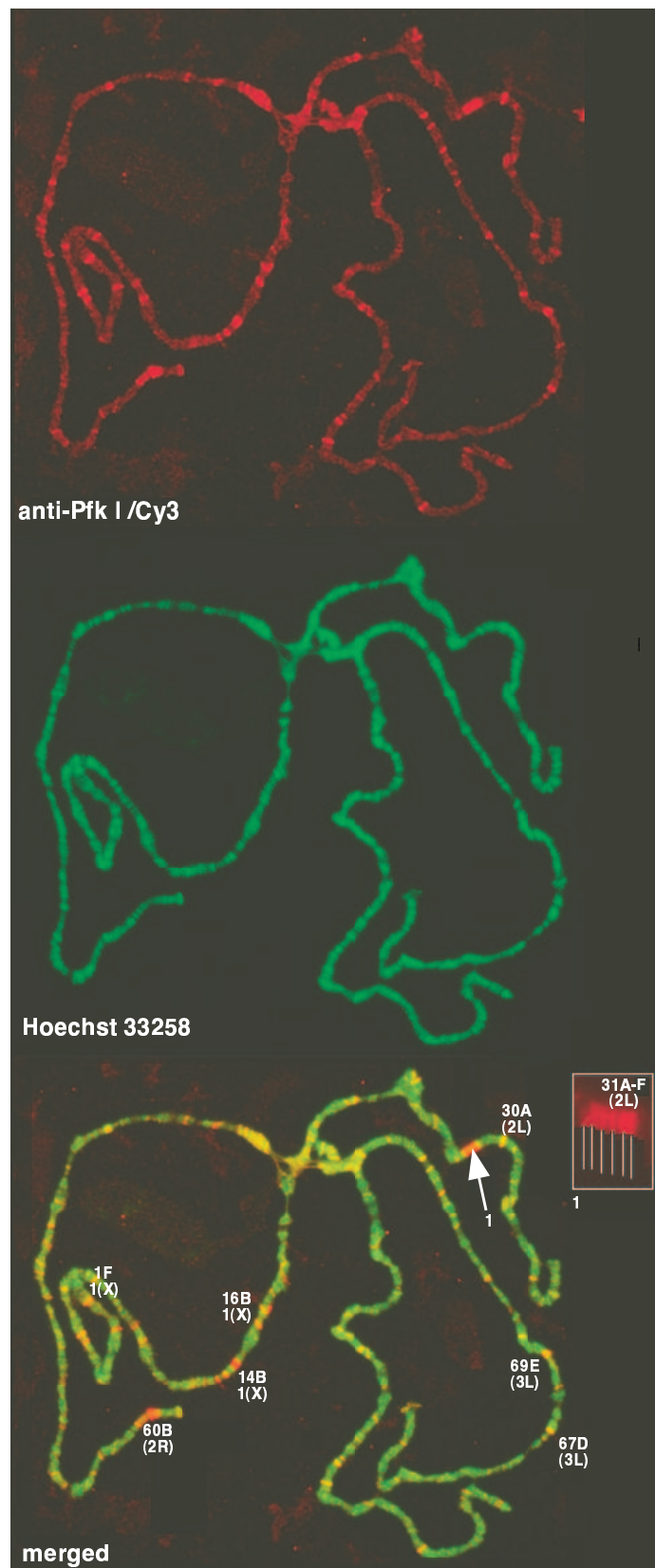


Abb. 24: Verteilung von Pfk-Protein an polytären Chromosomen. Polytäre Chromosomen aus Speicheldrüsen von dritten Wildtypplarven wurden mit Anti-Pfk I-Antiserum (rot; Cy3-Sekundärantikörper) immungefärbt und mit dem DNA-Farbstoff Hoechst 33258 (grün) gegengefärbt. Loci, die eine starke Pfk-Bindung zeigen, sind markiert. Die eingefügte Abbildung zeigt eine Vergrößerung der 31 A-F-Region; darin wird deutlich, daß sich das starke Fluoreszenzsignal in diesem Bereich aus eigentlich sechs Einzelbänden zusammensetzt. Ein gleiches Färbemuster ergibt das Anti-Pfk II-Antiserum. Die Präimmunseren ergeben keine Färbesignale (nicht gezeigt).

der von Psq und GAF an polytäre Chromosomen verglichen wird (Abb. 7). Neben diesen euchromatischen Loci bindet Pfk auch schwach im Bereich des Chromozentrums, jedoch nicht an den Telomeren. Ob die Bindung an das Chromozentrum spezifisch ist, läßt sich nicht mit Sicherheit sagen, da das Signal in diesem Bereich sehr schwach ist und sich nicht eindeutig von der beobachteten Hintergrundfärbung abhebt. Ein besonders starkes Immunfluoreszenzsignal wurde am linken Arm des zweiten Chromosoms in der Region 31 A-F beobachtet. Bei einer stärkeren Vergrößerung konnte diese Region starker Immunfluoreszenz in sechs Einzelbanden geringen Abstands aufgelöst werden. Dies könnte auf das Vorkommen repetitiver Pfk-Bindungsstellen in dieser Region hinweisen. Die Negativkontrolle zu diesem Versuch mit den entsprechenden Präimmunseren ergab keine Färbung (nicht gezeigt).

4.2.4.1 Pfk UND GAF AN POLYTÄNEN CHROMOSOMEN

Psq und Pfk weisen eine ähnliche Domänenstruktur auf (Abb. 19); neben einer BTB/POZ-Domäne besitzen beide Proteine eine Psq-DNA-Bindungsdomäne. Daraus ergibt sich die Frage, ob Psq und Pfk über diese DNA-Bindungsdomäne in vivo an gleiche oder zumindest an teilweise identische Zielsequenzen binden können. Immunfluoreszenzdoppelfärbungen konnten nicht durchgeführt werden, da die verfügbaren Antikörper, die gegen diese Proteine gerichtet sind, aus dem gleichen Wirtsorganismus stammen. Um diese Frage dennoch zu beantworten, wurde die Tatsache genutzt, daß Psq und GAF an polytären Chromosomen zu 100 % kolokalisiert sind (Abb. 7). Deshalb wurden Immunfluoreszenzdoppelfärbungen an polytären Chromosomen (3.2.8.1) mit den Anti-Pfk- und den GAF-Antikörpern durchgeführt (Abb. 25). An den meisten Loci läßt sich keine Kolokalisierung von Pfk und GAF erkennen. Durch die Vielzahl der GAF-Bindungsloci scheinen einige mit den Loci von Pfk zu überlappen. Ob es sich dabei allerdings um eine tatsächliche Kolokalisierung handelt, konnte nicht eindeutig bestimmt werden. Beim jetzigen Stand der Untersuchungen kann daraus gefolgert werden, daß Pfk und Psq, wenn überhaupt, nur eine kleine Zahl gemeinsamer Bindungsloci haben.

4.2.4.2 Pfk UND HP1 SIND AN POLYTÄNEN CHROMOSOMEN TEILWEISE KOLOKALISIERT

HP1 (siehe 1) spielt eine zentrale Rolle beim Aufbau des Heterochromatins. HP1 selbst besitzt keine eigene DNA-Bindungsdomäne. Dennoch ist HP1 Chromatin-assoziiert, vor allem im Chromozentrum, am vierten Chromosom, an den Telomeren

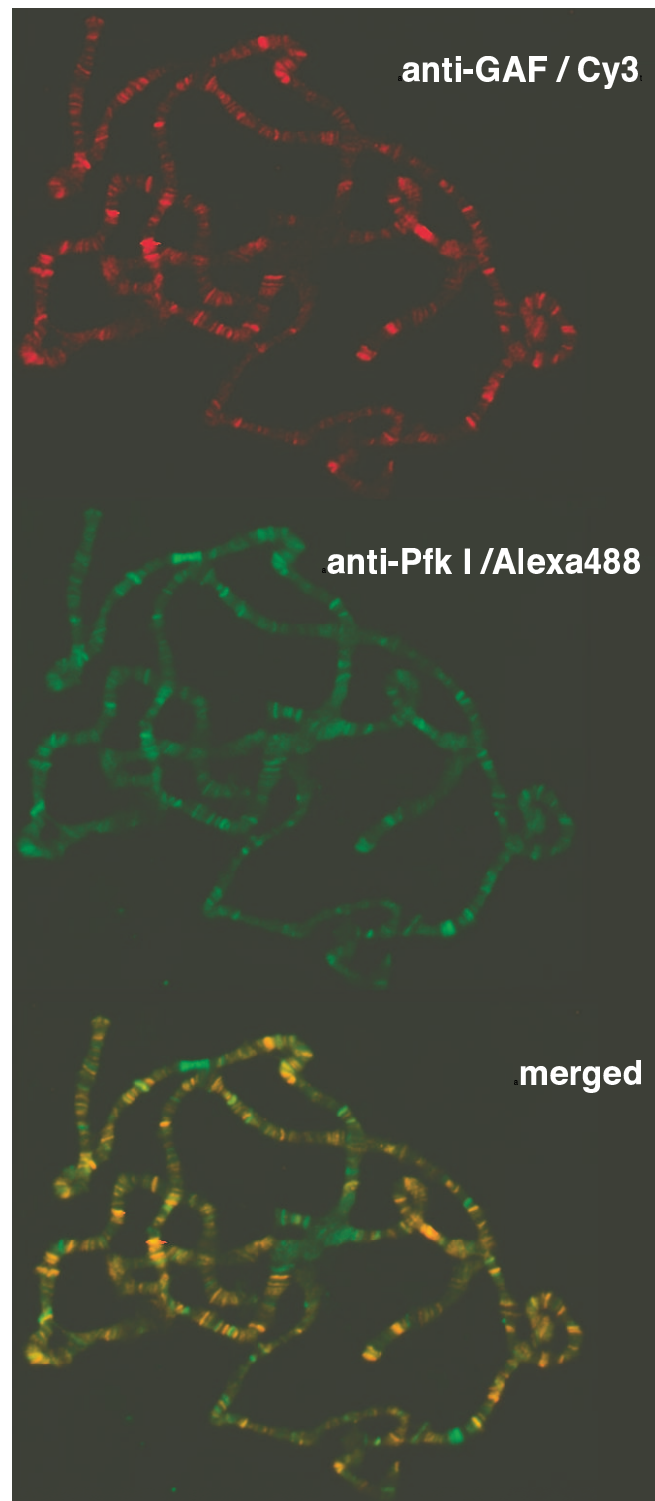


Abb. 25: Verteilung von Pfk-Protein und GAF an polytären Chromosomen. Polytäre Chromosomen aus Speicheldrüsen wurden mit Anti-Pfk I-Antiserum (grün, Alexa488-Sekundärantikörper) und mit Anti-GAF-Antiserum (rot, Cy3-Sekundärantikörper) gefärbt. Die Überlagerungen der Einzelfärbung ergibt, daß Pfk- und GAF-Protein, wenn überhaupt, nur wenige gemeinsame Bindungsloci haben.

und an vielen euchromatischen Loci [James et al., 1989]. Daneben zeigen sich auch 7 bis 8 starke Banden in Region 31, einer Region, in der auch Pfk sehr stark bindet (4.2.4 und Abb. 24). Um zu prüfen, ob Pfk und HP1 in Region 31 und anderen Regionen an gleiche Loci binden, wurde eine Kooperation mit der Arbeitsgruppe von

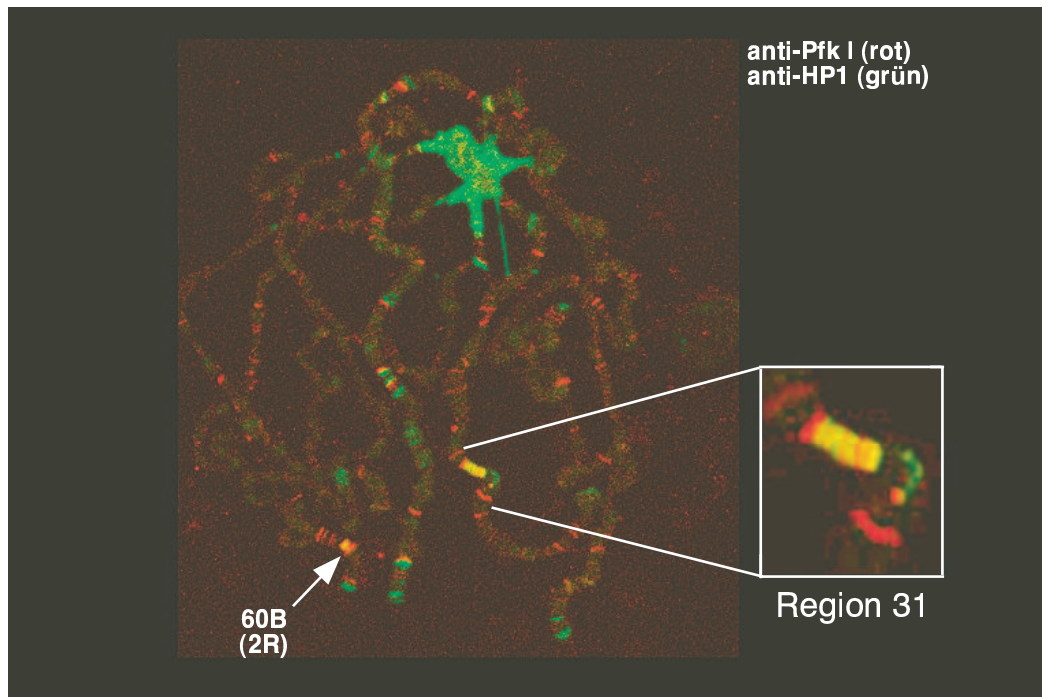


Abb. 26: Pfk und HP1 sind an polytären Chromosomen teilweise kolokalisiert. Polytäre Chromosomen aus Speicheldrüsen wurden mit Anti-Pfk I-Antiserum (rot) und mit Anti-HP1-Antiserum gefärbt. Die Doppelfärbung zeigt, daß Bindungsstellen von Pfk und HP1 nur dort überlappen, wo dies angegeben ist; eine besonders starke Kolokalisierung findet sich in der Region 31 (vergrößerter Ausschnitt).

Lori Wallrath (University of Iowa, Iowa City) initiiert, die seit vielen Jahren an der Funktion von HP1 interessiert ist und über einen HP1-Antikörper verfügt. Im Wallrath-Labor durchgeführte Doppelfärbungen polytärer Chromosomen mit dem HP1-Antikörper und unserem Pfk-Antikörper zeigten, daß beide Proteine nur an einem Locus am rechten Arm des zweiten Chromosoms bei 60B und sehr stark in Region 31 kolokalisieren (Abb. 26). Diese beiden Regionen der Kolokalisierung entsprechen exakt den Bindungsloci, die die stärksten Pfk-Immunfluoreszenzsignale zeigten (4.2.4). Obwohl auch Pfk am vierten Chromosom und an vielen euchromatischen Loci bindet, konnte dort keine Kolokalisierung mit HP1 festgestellt werden. Wie HP1 scheint auch Pfk im Chromozentrum zu binden, wobei die Bindung von Pfk viel schwächer zu sein scheint als die von HP1. Während HP1 auch an den Telomeren lokalisiert ist, bindet Pfk dort nicht.