

**Untersuchungen zur Funktion
von Pipsqueak und Piefke,
zwei Pipsqueak-Domänen-Proteine
von *Drosophila melanogaster***

Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
des Fachbereichs Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Alexander Schwendemann
2002

Im Rahmen dieser Dissertation entstandene Publikationen

Originalarbeit

Schwendemann, A. and Lehmann, M. (2002). Pipsqueak and GAGA factor act in concert as partners at homeotic and many other loci. Proc Natl Acad Sci U S A 99(20): 12883-8.

Vorträge und Abstracts

Schwendemann, A., Siegmund, T. and Lehmann, M. (2001). Piefke encodes a new member of the family of Psq-domain DNA-binding proteins. Drosophila Research Conference 42, Washington DC: 245B.

Schwendemann, A. and Lehmann, M. (2001). Pipsqueak and GAGA factor cooperate at homeotic and many other loci. Annual Meeting of the German Genetics Society, Halle.

Versicherung

Ich versichere, diese vorliegende Arbeit selbständig und mit keinen anderen als den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt zu haben.

Alexander Schwendemann, Berlin 04.11.2002

1. Gutachter: Prof. Dr. G. Korge, Institut für Biologie/ Genetik, FU Berlin
2. Gutachter: Prof. Dr. H. Kress, Institut für Biologie/ Genetik, FU Berlin

Tag der Disputation: 29.11.2002

DANKSAGUNG

Bei Herrn Prof. Dr. Günter Korge möchte ich mich für die freundliche Aufnahme an seinem Lehrstuhl und in seinem Labor bedanken. Seine konstruktive Kritik und die stets gewährte Unterstützung trugen maßgeblich zum Erfolg dieser Arbeit bei.

Mein besonderer Dank gilt Michael Lehmann. Er stellte nicht nur das spannende Thema und die finanziellen Mittel bereit, sondern gewährte mir durch eine engagierte Betreuung „auf Distanz“ eine für mich optimale Forschungsfreiheit. Seine ständigen Ideen, Anregungen und seine Intuition für die „richtigen“, zielgerichteten Experimente haben wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Thomas Siegmund danke ich für seine Hilfe bei meinen unzähligen großen und kleinen Computerproblemen, für seine Geduld, einen anfänglichen nicht-Drosophila-Genetiker in Fliegenkreuzungsexperimente einzuweihen und ebenso für die maßgebliche Unterstützung bei der Konfokalmikroskopie.

Bei Günther Roth, Annemarie Hofmann und allen anderen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe bedanke ich mich für die ständige Diskussionsbereitschaft und die konstruktiven Anregungen. Für die vielen großen und kleinen Hilfestellungen bei praktischen Fragen im Labor, dem Umgang mit den Fliegen und organisatorischen Angelegenheiten bedanke ich mich bei Karla Dünnbier, Ruth Lintermann, Madeleine Brünner, Eva Hafemann und Astrid Rodriguez. Für die Herstellung von Speicheldrüsenkernextrakten bedanke ich mich besonders bei Karla Dünnbier. Zu dem sehr angenehmen und freundlichen Arbeitsklima haben alle Mitarbeiter der Arbeitsgruppe beigetragen.

Cheeptip Benyajati, Celeste Berg, Marek Mlodzik, Ursula Weber und Shigeru Sakonju haben mir mit den Drosophila-Mutanten, Antiseren und Plasmiden wertvolles Material überlassen. Bei Lori Wallrath bedanke ich mich für die Durchführung der Antikörperdoppelfärbung mit den Anti-Pfk- und Anti-HP1-Antikörpern, bei Randolf Menzel dafür, daß ich das konfokale Mikroskop an seinem Lehrstuhl nutzen konnte.

Mein herzlicher Dank gilt meinen Eltern und Großeltern für die jahrelange Unterstützung, die nicht nur in unzähligen Kuchen-care-Paketen zum Ausdruck kam. Ebenso möchte ich mich bei meinen Freunden für Ablenkung und Inspiration fernab der Wissenschaft bedanken.

DANKE! 8 -)

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung	1
1.1	Der GAGA-Faktor (GAF)	7
1.1.1	GAF und die PEV	10
1.1.2	GAF und die Regulation homöotischer Genexpression	11
1.1.3	Die BTB/POZ-Proteinfamilie	12
1.2	Pipsqueak (Psq)	13
1.3	Piefke (Pfk) und die Pipsqueak-Proteinfamilie	16
2	Zielsetzung	20
3	Material und Methoden	22
3.1	Material	22
3.1.1	Antikörper	22
3.1.1.1	Primäre Antikörper	22
3.1.1.2	Sekundäre Antikörper	22
3.1.2	Plasmide	23
3.1.3	Oligonukleotide	23
3.1.4	Organismen	24
3.1.4.1	Stämme von <i>Drosophila melanogaster</i> und Aufzuchtbedingungen	24
3.1.4.2	Stämme von <i>Escherichia coli</i>	26
3.2	Methoden	26
3.2.1	Anzucht von Bakterienkulturen	26
3.2.2	DNA-Analyse	26
3.2.2.1	Analytische DNA-Präparation	26
3.2.2.2	Präparative DNA-Isolierung	27
3.2.2.3	Transformation von <i>Escherichia coli</i>	27
3.2.2.3.1	Hitzeschock	27
3.2.2.3.2	Elektrotransformation	27
3.2.2.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	27
3.2.2.5	Klonierung	28
3.2.2.5.1	Klonierung von PCR-Produkten	28
3.2.2.5.2	Beschreibung der verwendeten Klone	28
3.2.2.6	Sequenzierung	29
3.2.3	Proteinanalyse	29
3.2.3.1	Herstellung von <i>Drosophila</i> -Gewebeextrakten	29
3.2.3.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	30
3.2.3.2.1	Elektrophorese	30
3.2.3.2.2	Coomassie-Blue-Färbung von SDS-Polyacrylamid-Gelen	30
3.2.3.3	Western Blot	30
3.2.3.3.1	Transfer von Proteinen aus SDS-Polyacrylamidgelen auf Nitrozellulose	30
3.2.3.3.2	Immunfärbung von Proteinen	30
3.2.3.4	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	31
3.2.4	Bakterielle rekombinante Proteinexpression	31
3.2.4.1	Expression von Psq221, Psq1064, Psq651, Psq331, Psq166, Psq942, Psq528 und Pfk	31
3.2.4.2	Expression von GAF519	32
3.2.4.3	Expression von GST-GAF116 für GST-pulldown	32
3.2.4.4	Zelluläre Lokalisierung der Proteinexpression	32
3.2.5	Proteinreinigung	32
3.2.5.1	Ni ²⁺ -NTA-Säule (His-tag-Reinigung)	33
3.2.5.1.1	Reinigung von Psq221, Psq1064, Psq651, Psq331, Psq166, Psq942 und Psq528 unter nativen Bedingungen	33
3.2.5.1.2	Reinigung von Pfk unter denaturierenden Bedingungen und Vorbereitung für die Antikörperproduktion	33
3.2.5.2	Reinigung von GAF519 über Heparin-Sepharose	34

3.2.5.3	Affinitätsreinigung von Antikörpern	34
3.2.6	Analyse von Protein-Protein-Bindungen	35
3.2.6.1	In-vitro-Immunpräzipitation	35
3.2.6.2	GST-pulldown	36
3.2.6.2.1	GST-pulldown-Bindungstest	36
3.2.6.2.2	Herstellung eines E. coli-Extrakts (als komplexer Proteinbindungskompetitor)	36
3.2.6.3	Bindungstest an Ni ²⁺ -NTA-Säule	37
3.2.7	Immunfluoreszenz-Nachweis an larvalen und adulten Geweben	37
3.2.8	Chromosomenfärbungen	38
3.2.8.1	In-situ-Immunfärbung von polytären Chromosomen	38
3.2.8.2	In-situ-Immunfärbung von mitotischen Chromosomen	39
3.2.9	Analyse genetischer Interaktionen	39
3.2.9.1	Untersuchung einer möglichen genetischen Interaktion zwischen psq und Trl	40
3.2.9.1.1	Letalitätsanalyse und Sterilitätstest	40
3.2.9.2	Untersuchung einer möglichen genetischen Interaktion zwischen psq und Pc	40
3.2.9.3	Untersuchung zur genetischen Interaktion zwischen psq und Ubx	41
3.2.9.4	Untersuchung des Einflusses von psq auf die PEV	41
3.2.9.4.1	Messung der Augenpigmente zur Quantifizierung der PEV-Effekte	42
3.2.10	Bioinformatik und verwendete Computerprogramme	43
3.2.10.1	Datenbanken	43
3.2.10.2	Sequenzanalyse und -alignment	44
3.2.10.3	Bilderstellung und -bearbeitung	44
4	Ergebnisse	45
4.1	Pipsqueak und GAGA-Faktor	45
4.1.1	Expression von Psq in Speicheldrüsen	45
4.1.2	Bindung von Psq an polytäre Chromosomen	47
4.1.3	Bindung von Psq und GAF an polytäre Chromosomen	49
4.1.4	Psq und GAF sind in einem Proteinkomplex assoziiert	49
4.1.5	In-vitro-Bindung von Psq an GAF	52
4.1.5.1	In-vitro-Bindung von GAF an verkürzte Psq-Formen	52
4.1.5.2	In-vitro-Bindung von Psq an verkürzte GAF-Formen (GST-pulldown)	53
4.1.6	Die Bindung von Psq und GAF an mitotische Chromosomen	54
4.1.7	Untersuchung genetischer Interaktionen	56
4.1.7.1	Genetische Interaktionen zwischen psq und Trl	56
4.1.7.2	psq und die Kontrolle homöotischer Genexpression	57
4.1.7.2.1	psq und Gene der Polycomb group	57
4.1.7.2.2	psq und Ubx	58
4.1.7.3	Der Einfluß von psq auf die PEV	63
4.1.7.3.1	Quantifizierung der PEV-Effekte: Pigmentmessungen	66
4.2	Piefke (Pfk)	67
4.2.1	Identifizierung und Klonierung von piefke (pfk)	67
4.2.1.1	Sequenz des cDNA-Klons LD08856	67
4.2.1.2	Genomische Organisation des Drosophila pfk Gens	69
4.2.1.3	Struktur des Piefke-Proteins	70
4.2.2	Bakterielle Expression und Reinigung von Pfk	71
4.2.3	Western-Blot-Analyse	72
4.2.3.1	Antikörpertest mit gereinigtem rekombinantem Pfk	72
4.2.3.2	Pfk-Expression in Speicheldrüsen und Ovarien	73
4.2.4	Pfk bindet an polytäre Chromosomen	74
4.2.4.1	Pfk und GAF an polytären Chromosomen	76
4.2.4.2	Pfk und HP1 sind an polytären Chromosomen teilweise kolokalisiert	76
5	Diskussion	79
5.1	Pipsqueak und GAGA-Faktor	79
5.1.1	Chromosomale Bindung von Psq und GAF	80
5.1.2	Assoziation von Psq und GAF in einem Proteinkomplex	82
5.1.3	Direkte Interaktion von Psq und GAF	85
5.1.4	Genetische Interaktionsstudien	89

5.1.4.1	Genetische Interaktion zwischen psq und Trl	89
5.1.4.2	psq und die Regulation homöotischer Gene	89
5.1.4.2.1	Genetische Interaktion zwischen psq und Pc	90
5.1.4.2.2	Genetische Interaktion zwischen psq und Ubx sowie Ubx/Trl	91
5.1.4.2.3	psq und Trl haben eine duale Rolle bei der Regulation homöotischer Genexpression	92
5.1.4.3	Der Einfluß von psq auf die PEV	94
5.2	Piefke (Pfk)	96
5.2.1	Das Drosophila-Gen piefke	96
5.2.2	Piefke, ein Protein der Psq-Proteinfamilie	96
5.2.3	Expression von Pfk	97
5.2.4	Die Bindung von Pfk an polytäre Chromosomen	98
6	Zusammenfassung	101
6.1	Pipsqueak und GAGA-Faktor	101
6.2	Piefke	102
7	Literaturliste	103
8	Lebenslauf	117
9	Summary	118
9.1	Pipsqueak and GAGA-Factor	118
9.2	Piefke	119

ABKÜRZUNGEN

AA	Aminosäure(n)
Abd-B	Abdominal-B
Amp	Ampicillin
AP	alkalische Phosphatase
Am	Apis mellifera
Antp	Antennapedia
Bab	Bric à brac
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat
BDGP	Berkeley Drosophila Genome Project
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
BTB/POZ	Broad Complex, Tramtrack, Bric à Brac/ poxvirus and zinc finger
BX-C	Bithorax-Complex
bxd	bithoraxoid
Car	Carbenicillin
cDNA	complementary Desoxyribonucleic Acid
Ce	Caenorhabditis elegans
CENP-B	centromere protein B
CG	computed gene
Chl	Chloramphenicol
CyO	Curly of Oster
DEAE-Zellulose	Diethylaminoethyl-Zellulose
Dm	Drosophila melanogaster
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTB	2'-Desoxy-Nukleotid 5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure
EGTA	Ethylendioxybis(ethylenitrilo)tetraessigsäure
en	engrailed
EST	expressed sequence tags
ETP	enhancer of trithorax and Polycomb mutations
E(var)	Enhancer der PEV
Fab	Frontabdominal
g	Erdbeschleunigung
GA-reich	Guanin- und Adenin-reiche Sequenzen
GAF	GAGA-Faktor
GFP	green fluorescent protein
GST	Glutathione-S-Transferase
h	Stunde(n)
HDAC	histone deacetylase complex
His	Histidin
HP1	Heterochromatin Protein 1
Hs	Homo sapiens
HTH	helix-turn-helix
iab	infra-abdominal
ICF	insoluble cytoplasmic fraction

IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
Kg	Kugel
LB	Luria Bertani
Mg	Magnaporthe grisea
min	Minute(n)
Mm	Mus musculus
NBT	Nitrobluetetrazolium
Ni ²⁺ -NTA	Nickel-Nitrilotriacetic Acid
NURF	nucleosome remodeling factor
OD _x	optische Dichte bei der Wellenlänge x nm
ORF	offener Leserahmen (open reading frame)
Pc	Polycomb
PC	Polycomb Complex
PcG	Polycomb Group
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEV	position-effect variegation
pfk, Pfk	piefke, Piefke
ph	polyhomeotic
PHO	Pleiohomeotic
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PRE	Polycomb response element
PSE	pairing-sensitive element
psq, Psq	pipsqueak, Pipsqueak
Q-Domäne	glutaminreiche Domäne
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
Sb	Stubble
SCF	soluble cytoplasmic fraction
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
sec	Sekunde(n)
Ser	Serrate
Sp	Strongylocentrotus purpuratus
Su(var)	Suppressor der PEV
Tb	Tubby
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
Trl	Trithorax-like
trx	trithorax
trxG	trithorax Group
Ttk	Tramtrack
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
Ubx	Ultrabithorax
ÜN	über Nacht
w	white
Zn	Zinkfinger