

---

# 1 EINLEITUNG

---

Die DNA eukaryotischer Chromosomen bildet zusammen mit Histonen und anderen Nicht-Histon-Proteinen das Chromatin. Die Organisation des Chromatins umfaßt die Windung von DNA um Histon-Oktamere zur Bildung von Nukleosomen und die Faltung nukleosomaler DNA zu Strukturen höherer Ordnung [Luger and Richmond, 1998; Hayes and Hansen, 2001; Woodcock and Dimitrov, 2001]. Seit der Entdeckung dieser elementaren Prinzipien der Chromatinorganisation fragt man sich, wie eine solche Verpackung mit Reaktionen vereinbart werden kann, die mit dem „Lesen“ der DNA einhergehen. Viele Aspekte der Chromatinstruktur können durch die Interaktionen zwischen nukleosomalen Histonen und DNA, sowie zwischen benachbarten Nukleosomen und Nicht-Histon-Proteinen erklärt werden. Die Verpackung von DNA in Chromatin stellt also eine Barriere für Prozesse dar, die direkt auf die DNA zugreifen müssen. Die Überwindung der nukleosomalen Repression erfolgt über eine regulierte Veränderung der Chromatinstruktur, was durch den Begriff chromatin remodeling umschrieben wird [Kornberg and Lorch, 1999a; Aalfs and Kingston, 2000]. Veränderungen nukleosomaler Strukturen spielen eine kritische Rolle bei der normalen Regulation der Genexpression. Das Nukleosom rückt somit in den Brennpunkt der Regulation der Transkription [Kornberg and Lorch, 1999b]. Alle bekannten chromatinverändernden Komplexe (chromatin remodeling complexes) setzen deshalb zunächst am Nukleosom an, indem sie entweder die N-terminalen tails der Histone, die aus dem sonst eher kompakten Histon-Oktamer herausragen [Fletcher and Hansen, 1996], acetylieren oder deacetylieren oder aber die Histon-DNA-Interaktionen lockern. Andere Modifikationen, wie z. B. Methylierungen, scheinen auch eine wichtige Rolle zu spielen [Richards and Elgin, 2002].

Chromatin ist also eine hochdynamische Struktur, die als Antwort auf physiologische und entwicklungsbiologische Signale modifiziert wird und hat so kritischen Einfluß auf die Kontrolle der Genexpression [Kornberg and Lorch, 1999a; Wolffe and Matzke, 1999]. Die Genexpression wird im wesentlichen durch drei Aspekte der Chromatinstruktur beeinflusst: durch die Positionierung der einzelnen Nukleosome relativ zu regulatorischen Sequenzelementen, durch die Faltung in höhere Strukturen und durch die Schaffung funktioneller Domänen durch Kompartimentierung im Zellkern. Dabei scheint die Acetylierung von Nukleosomen der entscheidende Schalter zwischen permissiver und repressiver Chromatinstruktur zu sein. Deshalb ist die exakte Positionierung der Enzyme, die den Acetylierungsgrad

---

des Chromatins bestimmen, von zentraler Bedeutung bei der Genregulation [Eberharter and Becker, 2002].

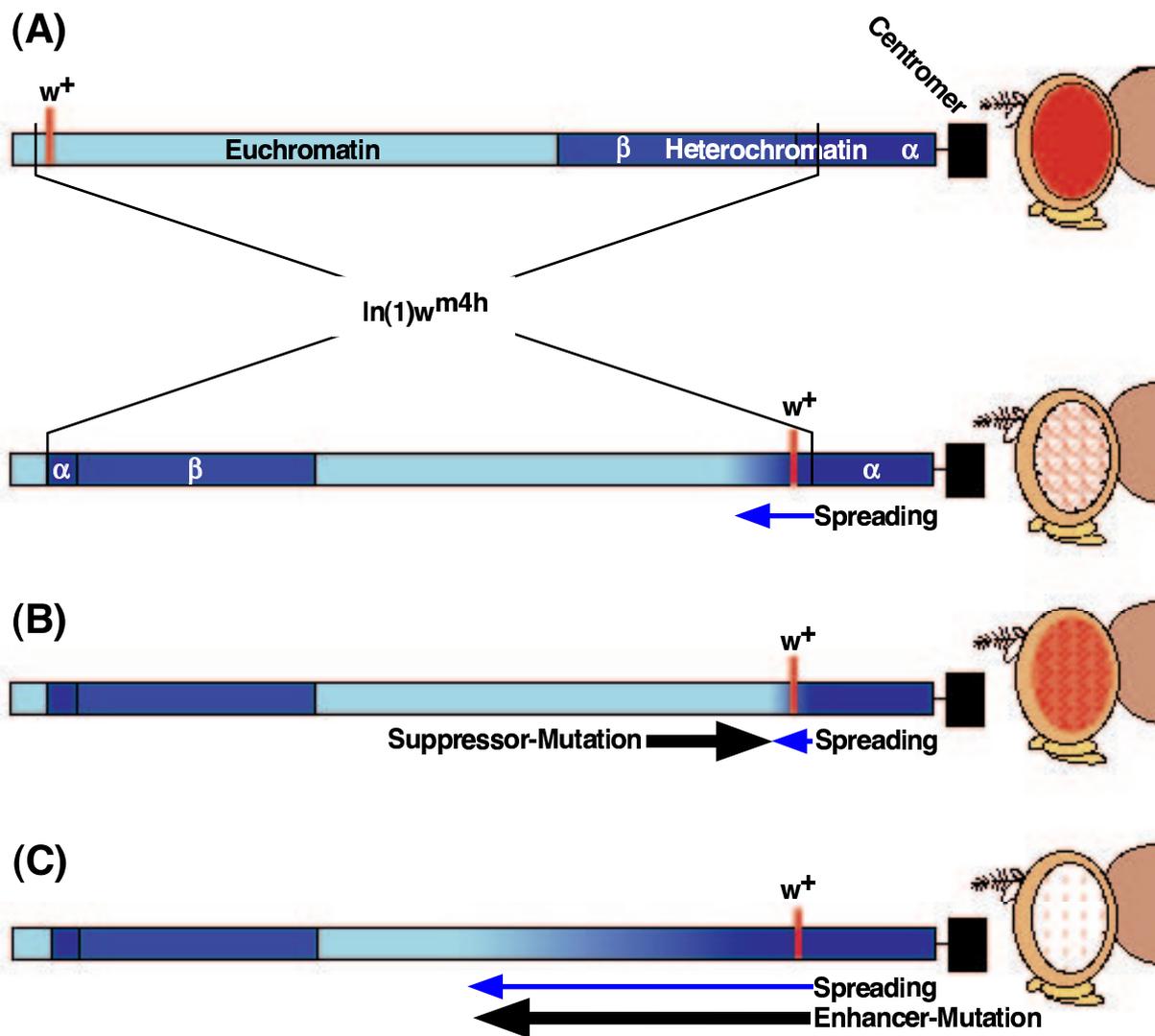
Bereits in früheren zytologischen Untersuchungen wurde eine Kompartimentierung von Chromatin im Zellkern in Euchromatin und Heterochromatin erkannt. Heterochromatin wird von Euchromatin dadurch unterschieden, daß es in der Interphase kondensiert bleibt [Heitz, 1928], spät im Zellzyklus repliziert [Holmquist, 1987], mit repetitiven DNA-Sequenzen angereichert [John and Miklos, 1979] und relativ genarm ist [Pimpinelli et al., 1986]. In *Drosophila* findet man Heterochromatin an den Centromeren und Telomeren der Chromosomen [Weiler and Wakimoto, 1995; Elgin, 1996; Wakimoto, 1998; Wallrath, 1998]. Heterochromatin läßt sich in distinkte Regionen unterschiedlicher Morphologie und verschiedenen Verhaltens unterteilen. So besteht  $\alpha$ -Heterochromatin primär aus Satelliten-DNA, während  $\beta$ -Heterochromatin mittelrepetitive und single-copy-DNA-Sequenzen beinhaltet [Rudkin, 1969; Miklos et al., 1988].  $\beta$ -Heterochromatin fungiert als natürliche Barriere zwischen  $\alpha$ -Heterochromatin und Euchromatin [Karpen, 1994].

Heterochromatin und Euchromatin repräsentieren zwei strukturell unterschiedliche Organisationen des Chromatins, die starke Effekte auf die Genexpression haben. Genaktivierbarkeiten stehen mit wenig kondensierten, euchromatischen Strukturen in Zusammenhang. Dagegen gibt es eine Reihe von Beobachtungen, die die Bildung von kondensierten heterochromatischen Strukturen mit Geninaktivierung in Verbindung bringen [zusammengefaßt in Elgin, 1996; Richards and Elgin, 2002]. Besonders deutlich wird der geninaktivierende Effekt von Heterochromatin, wenn ein euchromatisches Gen in die Nähe von Heterochromatin gebracht wird. Diese Veränderung der Expression des euchromatischen Gens ist verursacht durch das benachbarte Heterochromatin und kann die Gene benachbarter Zellen im unterschiedlichem Maße beeinflussen. Dieses Phänomen wird als position effect variegation (PEV) bezeichnet [Übersicht in Weiler and Wakimoto, 1995].

Ein häufig zur Untersuchung von PEV verwendetes System nutzt die variegierende Expression des *white*-Gens, dessen Wildtyp-Allel für die Ausbildung der roten Augenfarbe bei *Drosophila* benötigt wird (Abb. 1). Eine derartige Variegation mit daraus resultierenden gescheckten Augen ist beispielsweise beim  $\text{In}(1)\text{w}^{\text{m4h}}$ -Stamm zu finden. Wenn durch eine Inversion der normalerweise euchromatische *white*-Locus in die Nähe des Heterochromatins gebracht wird, wird das Gen in vielen, jedoch nicht in allen Zellen durch eine Ausbreitung des Heterochromatins in das Gen hinein reprimiert. Der so etablierte Status der Expression des *white*-Gens, entweder „an“ (euchromatisiert) oder „aus“ (heterochromatisiert), wird über Zellteilungen hinweg

aufrechterhalten. Daraus ergibt sich ein mosaikartiges Expressionsmuster, das sich in variegierender Augenpigmentierung manifestiert. Die Facettenaugen sind rot, wenn das white-Genprodukt vorhanden ist, sie sind weiß, wenn white nicht exprimiert wird. Wenn das Heterochromatin-Silencing stark ausfällt, dann ist das Komplexauge eher weiß, wenn das Silencing schwächer ist, dann finden sich mehr rote Facetten. Diese Charakteristika lassen sich leicht erkennen und wurden in genetischen Untersuchungen eingesetzt, um PEV-Suppressoren (Su(var)) oder Enhancer (E(var)) zu identifizieren [Dorn et al., 1993b; Weiler and Wakimoto, 1995; Elgin, 1996; Wallrath, 1998]. Suppressor-Faktoren sind solche Proteine, die white schwächer reprimieren und zu einem aktiven Chromatinzustand führen (wenn das Gen mutiert vorliegt). Hingegen sind Enhancer solche Faktoren, die eine Heterochromatisierung und somit eine Repression der white-Genaktivität bewirken (wenn das Gen mutiert vorliegt). Das intakte Suppressor-Genprodukt ist also an der Etablierung von Heterochromatin bzw. der Transkriptionsrepression beteiligt, wohingegen das intakte Enhancer-Genprodukt die Transkription über eine Chromatindekondensation fördert [Reuter and Spierer, 1992; Henikoff, 1996].

Unter den Nicht-Histon-Proteinen, die primär mit Heterochromatin assoziiert vorliegen, ist HP1 (Heterochromatin Protein 1) das wohl am besten charakterisierte. HP1 [Übersicht in Eissenberg and Elgin, 2000] wurde ursprünglich durch Immunlokalisationsanalysen als chromosomal gebundenes Nicht-Histon-Protein identifiziert, wobei in dieser Studie die Antikörper zunächst gegen nicht gereinigte Kernproteine hergestellt wurden [James and Elgin, 1986]. Die entsprechende cDNA wurde isoliert [James and Elgin, 1986] und Antikörperfärbungen zeigten, daß dieses Protein vorwiegend im Heterochromatin der Centromere und der Telomere sowie an einigen euchromatischen Loci vorliegt [James et al., 1989]. Molekulargenetische Untersuchungen [Eissenberg et al., 1990; Eissenberg et al., 1992; Eissenberg and Hartnett, 1993] ergaben, daß der Locus des HP1-kodierenden Gens identisch ist mit dem bereits als dominanter Suppressor der PEV identifizierten Gen Su(var)2-5 [Sinclair et al., 1983; Wustmann et al., 1989]. Su(var)2-5 genügt den genetischen Kriterien der Dosisabhängigkeit eines strukturellen Heterochromatinproteins [Locke et al., 1988]: HP1 ist ein haplo-suppressor mit triplo-Enhancer-Effekt. Das Fehlen einer Wildtypkopie unterdrückt die PEV, eine oder mehrere zusätzliche Wildtypkopien verstärken die PEV. Alle bekannten Su(var)2-5-Mutationen sind rezessiv letal, und somit ist HP1 ein essentielles Protein. Die bemerkenswerte evolutionäre Konservierung von HP1 deutet auf die fundamentale Rolle dieses Proteins bei der Organisation des Chromatins hin. Orthologe von HP1 wurden auch bei Vertebraten



**Abb. 1: Das  $In(1)w^{m4h}$ -System zur Selektion von Chromatin-Modifikatoren.** Die Inversion  $In(1)w^{m4h}$  ermöglicht die Untersuchung von PEV (A), wobei die Wirkung von (B) Suppressoren der PEV (Su(var)) und von (C) Enhancern der PEV (E(var)) anhand der unterschiedlich starken Pigmentierung der Augen erkannt wird. (A), die Inversion  $In(1)w^{m4h}$ , mit Bruchpunkten bei 3C1-2 und in 20F-h28, bringt das  $w^+$ -Gen in unmittelbare Nachbarschaft des  $\alpha$ -Heterochromatins, wodurch es abhängig vom Spreading, einer Ausbreitung des Heterochromatins, zellautonom durch Heterochromatisierung inaktiviert wird. (B), Suppressor (überwiegend rote Ommatidien). Mutation erlaubt Euchromatisierung von  $In(1)w^{m4h}$ , unterdrückt Spreading des  $\alpha$ -Heterochromatins. Daraus läßt sich schließen, daß das intakte Genprodukt an der Etablierung von Heterochromatin bzw. der Transkriptionsrepression beteiligt ist. (C), Enhancer (vorwiegend weiße Ommatidien). Mutation verstärkt Spreading und Heterochromatisierung von  $In(1)w^{m4h}$ . Daraus kann man interpretieren, daß das intakte Genprodukt die Transkription (über Chromatindekondensation) fördert. [Abbildung nach Karberg, 1996, modifiziert].

gefunden [Wreggett et al., 1994; Eissenberg and Elgin, 2000; Richards and Elgin, 2002].

Die Klonierung von Polycomb (Pc), einem Gen der Polycomb-Gruppe (PcG), das für die segmentspezifische Repression homöotischer Gene benötigt wird, führte durch den Vergleich mit HP1 zur Identifizierung einer Domäne, die beiden Proteinen gemein ist. Bei dieser Domäne handelt es sich um ein konserviertes N-terminales ca. 44 Aminosäure-Motiv, das Chromo-Domäne (für chromosome organization modifier)

---

genannt wurde [Paro and Hogness, 1991]. HP1 verfügt außerdem über eine C-terminale Chromo-shadow-Domäne. Mutationen in der Chromo-Domäne von HP1 oder Pc eliminieren die genetische Aktivität beim Gen-Silencing beider Proteine [Messmer et al., 1992; Platero et al., 1995]. An polytären Chromosomen binden HP1 und Pc fast ausschließlich an jeweils eigene Loci, wobei beide Proteine nicht direkt an DNA binden können. Experimente haben gezeigt, daß die Chromo-Domäne von HP1 und von Pc sowie die Chromo-shadow-Domäne von HP1 jeweils für deren unterschiedliche chromosomale Bindungsspezifität verantwortlich sind [Messmer et al., 1992; Powers and Eisenberg, 1993; Platero et al., 1995]. Ein chimäres Pc-HP1-Fusionsprotein (bei dem die Chromo-Domäne von HP1 gegen die von Pc ausgetauscht wurde) bindet sowohl an heterochromatische HP1- als auch an Pc-Bindestellen. Interessant ist, daß dieses chimäre Protein zudem endogenes HP1 an euchromatische Pc-Bindestellen und endogenes Pc an Heterochromatin fehllokalisiert [Platero et al., 1995; 1996]. Dieses Ergebnis weist darauf hin, daß die Chromo-Domäne von HP1 und die Chromo-shadow-Domäne von Pc Protein-Protein-Interaktionen vermitteln, und daß beide Proteine, HP1 und Pc, jeweils durch Protein-Protein-Interaktionen an deren Bindestellen rekrutiert werden.

Der Mechanismus, wie HP1 an der Etablierung von Heterochromatin beteiligt ist und dadurch ein Gen-Silencing auslöst, ist unbekannt. Neben der Funktion von HP1 bei der höheren Organisation von Chromatin im Zellkern könnte HP1 auch eine Rolle beim Schutz von Telomeren spielen [Fanti et al., 1998].

Die Bedeutung des Chromatinzustandes für eine Aktivierung bzw. Inaktivierung der Genexpression wird nicht nur bei PEV deutlich. Ebenso spielt die Struktur des Chromatins eine Schlüsselrolle bei der epigenetischen Kontrolle von Entwicklungsregulatoren, z.B. von homöotischen Genen. Eine epigenetische Regulation der Transkription führt zu einer über Zellgenerationen hin stabilen differentiellen Genexpression [Weiler and Wakimoto, 1995; Pirrotta, 1998; Lyko and Paro, 1999; Wolffe and Matzke, 1999]. Demnach wird eine epigenetische Markierung, daß also ein Gen transkribiert wird oder nicht, an die Zellnachkommen weitergegeben. Dieser Mechanismus stellt sicher, daß das entsprechende Genexpressionsmuster und der Zellphänotyp über viele Generationen erhalten bleibt. Dieser Prozeß wird mit cellular memory umschrieben. Eine derartige epigenetische Regulation, die über Veränderungen der Struktur des Chromatins erfolgt, findet man bei der Kontrolle der Expression homöotischer Gene. Die Expression dieser Gene wird durch Faktoren eines konservierten cellular-memory-Systems reguliert, die den aktivierten oder

---

inaktivierten Zustand der homöotischen Gene erhalten [Übersicht in Mahmoudi and Verrijzer, 2001].

Homöotische Gene erzeugen die morphologische Vielfalt der Körpersegmente in *Drosophila* und in anderen höheren Eukaryoten [Lewis, 1978; Duncan, 1987; McGinnis and Krumlauf, 1992]. In *Drosophila* wird schon sehr früh, etwa im Stadium des zellulären Blastoderms, die Identität sowohl larvaler als auch adulter Segmente determiniert. Diese Determinierung bleibt dann bis zu über zehn Zellteilungen erhalten, bevor eine Differenzierung einsetzt. Die Determinierung und der Erhalt der Segmentidentitäten in *Drosophila* erfordern die Aktivität von zwei Clustern homöotischer Gene, dem Antennapedia Complex [Kaufman et al., 1990] und dem Bithorax-Complex [Lewis, 1978; Duncan, 1987], die zusammen HOM-Gene genannt werden. Die homöotischen Gene dieser beiden Cluster kodieren Proteine mit einer konservierten DNA-Bindungsdomäne, der Homöodomäne. Sie kontrollieren die Entwicklung, indem sie an Kontrollelementen von Zielgenen binden, deren Transkription sie regulieren [Affolter et al., 1990; Hayashi and Scott, 1990].

Für einen korrekten Ablauf der gesamten Entwicklung ist die Expression homöotischer Gene in spezifischen Zellgruppen notwendig. In *Drosophila* werden die Domänen homöotischer Genexpression durch Aktivierung und Reprimierung der Transkription reguliert [Kennison, 1995; Paro and Harte, 1996]. Die Aktivierung und Reprimierung muß räumlich und zeitlich über die gesamte Entwicklung hin exakt erfolgen, da eine fehlerhafte Expression homöotischer Gene zu homöotischen Transformationen und zu Letalität führt [Busturia and Morata, 1988; Gonzalez-Reyes and Morata, 1990; Lamka et al., 1992; Castelli-Gair et al., 1994].

Die Etablierung aktivierter und reprimierter Bereiche hängt zunächst von der Funktion der Segmentierungsgene (Paarregel- und Lückengene) ab [Nüsslein-Volhard et al., 1987; Qian et al., 1991; 1993; Zhang et al., 1991]. Die Erhaltung dieses Zustandes während der gesamten weiteren Entwicklung hingegen erfordert den Übergang zu einem anderen Mechanismus, der von einem völlig anderen Proteinsatz getragen wird [Müller and Bienz, 1991; Qian et al., 1991; Zhang et al., 1991; Qian et al., 1993; Pirrotta et al., 1995; Kehle et al., 1998]. Die Gene der trithorax-Gruppe (*trxG*) werden für die Erhaltung eines aktiven Transkriptionsstatus homöotischer Gene benötigt [Kennison, 1995]. Diesen werden die Gene der Polycomb-Gruppe (*PcG*) gegenübergestellt, die für das Silencing verantwortlich sind [Paro and Harte, 1996; Brock and van Lohuizen, 2001].

*TrxG*- und *PcG*-Proteine binden an cis-regulatorische Elemente homöotischer Gene, sogenannte *trxG* response elements (TREs) bzw. *PcG* response elements

(PREs). Durch die Bindung der Proteine wird ein aktivierter bzw. reprimierter Zustand erhalten [Kennison, 1995; Brock and van Lohuizen, 2001]. Die Mehrzahl der PcG- bzw. TrxG-Proteine scheint selbst keine spezifische DNA-Bindungsaktivität zu besitzen. Lediglich drei Proteine sind bekannt, die sequenzspezifisch an DNA binden: das PcG-Protein Pleiohomeotic (PHO) und die TrxG-Proteine Zeste und GAF [Übersicht in Mahmoudi and Verrijzer, 2001].

Einer der ersten Faktoren, der im Verdacht stand, durch chromatin remodeling zu wirken, ist der GAGA-Faktor (GAF) von *Drosophila melanogaster* [Kerrigan et al., 1991; Lu et al., 1993; Farkas et al., 1994; Tsukiyama et al., 1994]. GAF, ein Mitglied der BTB/POZ(Broad Complex, Tramtrack, Bric à Brac/poxvirus and zinc finger)-Proteinfamilie, werden dabei Funktionen bei der Bildung und Erhaltung nukleosomfreier Chromatinregionen zugesprochen [Lu et al., 1993; Farkas et al., 1994; Tsukiyama et al., 1994].

## 1.1 DER GAGA-FAKTOR (GAF)

Der GAGA-Faktor (GAF) von *Drosophila melanogaster* ist ein sequenzspezifisch DNA-bindendes Protein, das bei verschiedenen Vorgängen chromosomaler Strukturveränderungen beteiligt ist [Granok et al., 1995; Read and Driscoll, 1997; Wilkins and Lis, 1997]. GAF bindet an DNA-Sequenzen mit einer GAGAGAG-Konsensussequenz [Granok et al., 1995; Omichinski et al., 1997]. Bei dieser Sequenz handelt es sich allerdings nicht um eine strenge Konsensussequenz. Es wurden sogar Trinukleotidsequenzen (GAG oder CTC) beschrieben, die für eine Bindung ausreichen [Wilkins and Lis, 1998]. Werden natürlich vorkommende Promotoren verglichen, an die GAF bindet, so wurde festgestellt, daß eine einzelne Konsensussequenz für die Bindung von GAF nicht auszureichen scheint. Vielmehr haben GAGA-Bindestellen die Tendenz, als Cluster aufzutreten [Biggin and Tjian, 1988]. Dies spiegelt auch wieder, daß GAF als Oligomer an multiple GAGA-Sequenzen bindet, die durch irrelevante Sequenzen variabel unterbrochen sind (weiter unten näher besprochen). Cluster von GAGA-Bindestellen scheinen für eine starke Aktivierung durch GAF erforderlich zu sein, eine oder zwei Bindestellen bewirken nur eine schwache Aktivierung [Soeller et al., 1993; Espinas et al., 1999; Katsani et al., 1999]. GAF wird von dem Gen *Trithorax-like* (Trl) kodiert [Farkas et al., 1994] und wurde zuerst als typischer transkriptioneller Aktivator identifiziert, der unter anderem Gene wie *Ultrabithorax* (Ubx) und *engrailed* (en) aktiviert. Außerdem wurde erkannt, daß GAF mit Promotoren und Enhancern von Hitzeschock- und Histongenen assoziiert ist [Biggin and Tjian, 1988; Soeller et al., 1988; Gilmour et al., 1989; Soeller

et al., 1993]. Darüberhinaus wird GAF für die Expression einer Reihe von Entwicklungsgenen, darunter homöotische Gene, benötigt [Farkas et al., 1994; Bhat et al., 1996]. Immunfluoreszenzaufnahmen polytärer Chromosomen zeigen, daß viele euchromatische Loci GAF-Bindungsstellen besitzen, was auf eine Rolle bei der transkriptionellen Kontrolle einer großen Zahl von Genen hinweist [Tsukiyama et al., 1994; Benyajati et al., 1997].

Wie ist GAF an der Genaktivierung beteiligt? Mehrere Befunde weisen darauf hin, daß GAF nicht wie ein typischer Transkriptionsaktivator wirkt, sondern als Antirepressor, der die reprimierende Wirkung von Nukleosomen aufhebt. So konnte gezeigt werden, daß GAF-Bindungselemente mit DNase-I-hypersensitiven Stellen von Promotoren übereinstimmen, was auf eine Chromatin-modulierende Funktion von GAF hinweist [Cartwright and Elgin, 1986; Lis and Wu, 1993; Lu et al., 1993; Shopland et al., 1995]. Biochemische Analysen belegen, daß GAF die Transkription durch die RNA Polymerase II aktiviert, indem es der reprimierenden Wirkung von Chromatin entgegenwirkt [Croston et al., 1991; Tsukiyama et al., 1994; Okada and Hirose, 1998]. Durch In-vitro-Experimente mit rekonstituiertem Chromatin konnte gezeigt werden, daß GAF Nukleosomen verschieben kann. Die lokale Veränderung der Nukleosomenanordnung ist auf GAF-Bindungsstellen beschränkt, wobei GAF, der selbst keine ATPase-Funktion besitzt, zusammen mit dem energieabhängigen chromatin remodeling-Multiproteinkomplex NURF (nucleosome remodeling factor) wirkt [Tsukiyama et al., 1994; Tsukiyama et al., 1995].

Die Funktion des GAF ist nicht nur auf die eines euchromatischen, genspezifischen Transkriptionsaktivators beschränkt. So weisen Untersuchungen darauf hin, daß GAF auch für Funktionen des Heterochromatins benötigt wird. Trl-Mutationen sind dominante Enhancer der PEV (siehe hierzu auch 1.1.1). Der Einfluß von GAF auf die PEV deutet darauf hin, daß GAF dem Silencing durch Heterochromatin entgegenwirkt [Farkas et al., 1994]. Immunlokalisationsstudien haben gezeigt, daß GAF mit GA-reichen Regionen des centromeren Heterochromatins in frühen Embryonen assoziiert ist [Raff et al., 1994]. Neuere Untersuchungen legen jedoch nahe, daß sich GAF in jedem Zellzyklus zwischen Hetero- und Euchromatin hin- und herbewegt, ausgelöst durch Chromatin-Kondensierung und Dekondensierung. So ist GAF während der Interphase an hochaffinen Bindestellen im Euchromatin lokalisiert, wohingegen GAF während der Metaphase mitosespezifisch mit GA-reicher Satelliten-DNA assoziiert ist. Es wird spekuliert, daß diese heterochromatische GA-reiche Satelliten-DNA als mitosespezifischer Speicher für GAF dienen könnte [Platero et al., 1998]. Diese

Beobachtung erklärt Kernteilungsdefekte, die bei Trl-Mutanten auftreten, und die auf eine Funktion von GAF bei der Kondensierung und Trennung der Chromosomen während der Mitose schließen lassen [Bhat et al., 1996]. GAF ist also ein multifunktionelles Protein, das nicht nur an der Regulation spezifischer Gene beteiligt ist, sondern auch eine übergeordnete Rolle bei chromosomalen Funktionen und bei der Organisation der Chromosomenstruktur spielt.

Es wurden verschiedene cDNAs isoliert, die unterschiedliche GAF-Isoformen kodieren [Soeller et al., 1993; Benyajati et al., 1997]. Durch alternatives Spleißen entstehen mindestens die zwei Isoformen GAF519 und GAF581 (Abb. 2), die sich im C-Terminus unterscheiden. Die Hauptform ist ein Polypeptid mit 519 Aminosäuren (GAF519) [Soeller et al., 1993]. Das GAF-Protein enthält drei funktionelle Domänen: eine N-terminale BTB/POZ-Domäne (1.1.3), eine in der C-terminalen Hälfte lokalisierte Zinkfinger-DNA-Bindungsdomäne und eine C-terminale glutaminreiche Domäne (Q-Domäne) (Abb. 2). Die beiden GAF-Isoformen GAF519 und GAF581 unterscheiden sich nur in dieser C-terminalen glutaminreichen Domäne, die zwischen beiden Formen in Länge und Sequenz erheblich variiert. Während die Funktionen der BTB/POZ- und der Zinkfinger-DNA-Bindungsdomäne gut definiert sind, ist die Funktion der Q-Domäne nicht eindeutig geklärt. Einige Untersuchungen deuten darauf hin, daß diese die transkriptionelle Aktivität erhöht [Agianian et al., 1999; Espinas et al., 1999; Vaquero et al., 2000]. Andere Untersuchungen legen nahe, daß die Q-Domäne weniger am chromatin remodeling und der Regulation der transkriptionellen Aktivität beteiligt ist, sondern eher an der Oligomerisierung von GAF, der Bindung an Einzelstrang-DNA und an einer lokalen Veränderung der Promotorstruktur [Wilkins and Lis, 1999]. Die beiden Isoformen haben zwar viele überlappende, jedoch nicht vollkommen identische Funktionen, wobei nicht eindeutig geklärt ist, ob die funktionellen Unterschiede auf die Q-Domänen zurückgeführt werden können [Greenberg and Schedl, 2001].

Röntgenstrukturanalysen der Zinkfinger-Domäne ergaben, daß ein Pentanukleotid (GAGAG) die minimale GAF-Bindungssequenz bildet. Dabei gibt es eine beträchtliche Variabilität in den GAF-Bindungssequenzen, bei denen allerdings nur das zentrale G essentiell ist. Zinkfingerproteine der Cys<sub>2</sub>His<sub>2</sub>-Klasse enthalten in der Regel mindestens zwei, GAF besitzt jedoch nur einen einzigen Zinkfinger. Dabei bindet dieser Cys<sub>2</sub>His<sub>2</sub>-Zinkfinger die ersten drei Basen, zwei N-terminal lokalisierte basische Regionen interagieren mit den verbleibenden zwei Basen der Konsensussequenz [Pedone et al., 1996; Omichinski et al., 1997]. Die DNA-Bindungsdomäne von GAF bindet als Monomer DNA und verändert die DNA-Struktur

dabei nicht wesentlich. Kontakte zur DNA erfolgen sowohl in der großen als auch in der kleinen Rinne und erstrecken sich über eine Windung der DNA-Helix.

Wie unter 1.1.3 beschrieben, stellt die BTB/POZ-Domäne eine Protein-Protein-Interaktionsdomäne dar, über die BTB/POZ-Proteine dimerisieren können. Die BTB/POZ-Domäne des GAF scheint *in vitro* Heterodimere, jedoch keine Homodimere zu bilden [Bardwell and Treisman, 1994]. Andere Untersuchungen haben hingegen gezeigt, daß viele GAF-Moleküle *in vivo* zu großen Komplexen oligomerisieren [Katsani et al., 1999]. Darüberhinaus zeigen jüngere Untersuchungen, daß eine GAF-Isoform *in vivo* multimerisiert, und daß verschiedene GAF-Isoformen *in vivo* homo- und heteromultimerisieren können [Benyajati et al., 1997; Espinas et al., 1999]. Die Anwesenheit einer BTB/POZ-Domäne hemmt die DNA-Bindung der BTB/POZ-Proteine Tramtrack, ZID und GAF um das 5-10fache. Die Reduktion der DNA-Bindung findet auch statt, wenn der Zinkfinger durch eine heterologe DNA-Bindungsdomäne ersetzt wird und ist somit nicht auf den Zinkfinger zurückzuführen [Bardwell and Treisman, 1994].

Die BTB/POZ-Domäne verhindert, daß ein GAF-Molekül einzelne GAGA-Bindestellen erkennt, wahrscheinlich indem sich die BTB/POZ-Domäne zurückfaltet und so die DNA-Bindungsdomäne blockiert. Eine GAF-Multimerisierung kann alternativ die Bindung an eine einzelne GAGA-Bindungsstelle verhindern, da sich die GAF-Moleküle innerhalb des Komplexes gegenseitig sterisch behindern. Jüngere Untersuchungen unterstützen hingegen ein Modell, wonach GAF gerade dann, wenn es in einem großen GAF-Komplex (der sich durch Selbst-Oligomerisierung mehrerer GAF-Moleküle bilden kann) vorliegt, an multiple unabhängige GAGA-Elemente binden kann, die über eine Region von einigen hundert bp verteilt sind (Abb. 27). Promotoren, die von GAF reguliert werden, sind durch das Vorkommen multipler GAGA-Bindungsstellen charakterisiert. Entsprechend diesem Modell wird die Bildung nukleosomaler Strukturen durch die gebeugte Konformation der Promotor-DNA um ein GAF-Multimer herum ausgeschlossen. So würde die DNA dieses Bereichs durch diesen DNA-Proteinkomplex weit zugänglicher sein als in einem nukleosomalen Komplex. GAF hätte so die Funktion eines Faktors, der konzertiert mit NURF Promotor-DNA reorganisiert (chromatin remodeling) und diese dann in einer offenen Konformation erhält [Espinas et al., 1999; Katsani et al., 1999].

### **1.1.1 GAF UND DIE PEV**

Die Funktionen des GAF scheinen also nicht nur auf die Regulation euchromatischer Genloci beschränkt zu sein. Wie bereits unter 1.1 beschrieben, gibt

es darüberhinaus Hinweise, daß GAF eine übergeordnete Rolle bei chromosomalen Funktionen und bei der Organisation der Chromosomenstruktur spielt [Farkas et al., 1994; Raff et al., 1994; Bhat et al., 1996; Platero et al., 1998]. So ist GAF auch im Heterochromatin lokalisiert und für die Kondensation und Trennung der Chromosomen während der Mitose notwendig. Ein wichtiges Indiz, das für die Rolle von GAF bei der Organisation des Heterochromatins spricht, ist dessen Einfluß auf die PEV. So konnte gezeigt werden, daß  $ln(1)w^{m4h}$ -Männchen, die außerdem heterozygot für die  $Trl^{13C}$ -Mutation sind, statt der für  $ln(1)w^{m4h}$  typischen rot-gescheckten Augen weiße Augen besitzen [Farkas et al., 1994]. Dies weist darauf hin, daß das white-Gen häufiger durch Heterochromatisierung inaktiviert wird, was ein charakteristischer Effekt von Enhancer-Mutationen ist [Reuter and Spierer, 1992]. Dies stützt die Modellvorstellung, daß GAF eine Chromatinkomponente ist, die ihre Wirkung durch Chromatindekondensation entfaltet.

### 1.1.2 GAF UND DIE REGULATION HOMÖOTISCHER GENEXPRESSION

Wie *trithorax* (*trx*) und andere TrxG-Gene ist *Trl*, das GAF-kodierende Gen, ebenfalls für die Erhaltung der Expression homöotischer Gene notwendig [Farkas et al., 1994]. So konnte gezeigt werden, daß *Trl* für die Expression des homöotischen Gens *Ubx* benötigt wird und daß *Trl* ein positiver Regulator des *Abd-B*-Gens des Bithorax-Complexes ist. Aufgrund dieser Interaktionen wurde *Trl* als TrxG-Gen klassifiziert [Farkas et al., 1994].

Ergebnisse neuerer Studien weisen überraschenderweise darauf hin, daß GAF auch für das transkriptionelle Silencing homöotischer Gene benötigt wird [Hagstrom et al., 1997; Strutt et al., 1997; Horard et al., 2000; Busturia et al., 2001; Hodgson et al., 2001; Mishra et al., 2001; Hur et al., 2002]. So wurde gezeigt, daß GAF mit vielen PcG-Proteinen an PREs kolokalisiert ist. Außerdem verstärken *Trl*-Mutanten den „extra sex combs“-Phänotyp von *Pc*-Mutanten, was auf eine Rolle des GAF beim Silencing durch PcG-Komplexe hinweist [Strutt et al., 1997]. *Trl*-Mutationen schwächen das Silencing durch das *Fab-7* PRE ab, was darauf hindeutet, daß GAF für das Silencing durch dieses PRE, einer cis-regulatorischen Domäne des Bithorax-Complex-Gens *Abdominal-B* (*Abd-B*), notwendig ist [Hagstrom et al., 1997]. Dazu passen auch die Ergebnisse aus Koimmunpräzipitationsexperimenten, die gezeigt haben, daß GAF mit PcG-Komplexen assoziiert vorliegt, die an das *bxd* PRE binden. Das *bxd* PRE ist eine cis-regulatorische Domäne des Bithorax-Complex-Gens *Ultrabithorax* (*Ubx*) [Horard et al., 2000]. Zudem wird GAF für die Aktivität zweier Silencer-PRE-Elemente des *Abd-B*-Gens, *iab-7* und *MCP*, benötigt [Busturia et al., 2001; Mishra et al., 2001].

Diese Ergebnisse unterstreichen, daß GAF nicht nur durch die Bildung einer offenen Chromatinstruktur wirken kann. Vielmehr scheint GAF ebenso am Silencing beteiligt zu sein, das, so wird angenommen, durch die Bildung einer geschlossenen, heterochromatinartigen Struktur erzielt wird [Orlando and Paro, 1993].

### 1.1.3 DIE BTB/POZ-PROTEINFAMILIE

GAF ist ein gut charakterisiertes Mitglied einer größeren Proteinfamilie, der BTB/POZ-Proteinfamilie. Die diesen Proteinen gemeinsame BTB/POZ-Domäne wird häufig in entwicklungsregulierten Transkriptionsfaktoren gefunden und oft mit der Regulation der Genexpression durch eine lokale Kontrolle der Chromatinkonformation in Verbindung gebracht [Albagli et al., 1995]. Mitglieder der BTB/POZ-Proteinfamilie sind an vielfältigen Prozessen wie der Metamorphose, der Oogenese, der Augen- und Extremitätenentwicklung, der Entwicklung des Nervensystems und der Steuerung des Sexualverhaltens beteiligt [Harrison and Travers, 1990; DiBello et al., 1991; Godt et al., 1993; Xiong and Montell, 1993; Xue and Cooley, 1993; Hu et al., 1995; Weber et al., 1995; Ryner et al., 1996].

Die BTB/POZ-Domäne ist eine evolutionär konservierte Protein-Protein-Interaktionsdomäne [Übersicht in Zollman et al., 1994; Albagli et al., 1995; Collins et al., 2001], die bei einer großen Zahl von Proteinen phylogenetisch weit entfernter Spezies, von der Hefe bis zum Menschen, gefunden wurde [Albagli et al., 1995]. Dieses immer N-terminale, 120 Aminosäuren große Sequenzmotiv wurde zuerst bei den Broad-Complex (BR-C)-, Tramtrack (Ttk)- und Bric à brac (Bab)-Proteinen von *Drosophila melanogaster* entdeckt und wurde deshalb zunächst BTB-Domäne genannt [Harrison and Travers, 1990; DiBello et al., 1991; Godt et al., 1993; Zollman et al., 1994]. Viele dieser Proteine sind DNA-bindende Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren der Cys<sub>2</sub>His<sub>2</sub>-Klasse [Klug and Schwabe, 1995]. Daneben wurde diese Domäne auch in nicht-DNA-bindenden Proteinen [z. B. bei Pockenviren; Bardwell and Treisman, 1994] entdeckt und erhielt so ihre alternative Bezeichnung: POZ-Domäne (für poxvirus/zinc finger). Zu den nicht-DNA-bindenden Proteinen gehören auch solche, die sogenannte Kelch-repeats haben, die eine Assoziation mit Actin vermitteln. Diese Bindung an Actin trägt z. B. beim *Drosophila* Kelch-Protein zur Organisation der Ringkanäle bei, die wiederum eine interzelluläre zytoplasmatische Verbindung zwischen den Nährzellen und der Oocyte bilden [Xue and Cooley, 1993; Robinson and Cooley, 1997].

Kürzlich wurde das Protein Batman identifiziert, das interessanterweise lediglich aus einer BTB/POZ-Domäne besteht. batman konnte als Mitglied der PcG/trxG

identifiziert werden, und Batman scheint häufig in einem Komplex mit GAF assoziiert zu sein (1.1). Auch sind beide Proteine an vielen Loci polytärer Chromosomen kolokalisiert [Faucheux et al., 2001 und Theodore, persönliche Mitteilung].

Es konnte kürzlich gezeigt werden, daß BTB/POZ-Proteine nicht nur Zinkfinger-Domänen, sondern auch einen besonderen Typ der Helix-turn-helix-Domäne für die DNA-Bindung verwenden. Diese Domäne wird als Psq-Domäne bezeichnet und definiert die Psq-Proteinfamilie, die unter 1.3 näher beschrieben wird [Siegmond and Lehmann, 2002].

Die BTB/POZ-Domäne stellt eine Protein-Protein-Interaktionsdomäne dar, die in einigen Faktoren funktionell mit einer transkriptionellen Aktivierung, in anderen Transkriptionsfaktoren jedoch mit einer reprimierenden Funktion in Verbindung gebracht wird [Deweindt et al., 1995; Chang et al., 1996; Seyfert et al., 1996; Kaplan and Calame, 1997]. BTB/POZ-Domänen können miteinander assoziieren, wobei dies wahrscheinlich über eine coiled-coil-artige Interaktion erfolgt [Ahmad et al., 1998]. Die Dimerisierung von BTB/POZ-Domänen ist spezifisch und auf bestimmte Kombinationen zwischen BTB/POZ-Proteinen beschränkt, wobei die Bildung von Hetero- und Homodimeren beobachtet wurde [Bardwell and Treisman, 1994]. Zudem konnte gezeigt werden, daß die BTB/POZ-Domäne in vitro die DNA-Bindungsfähigkeit des assoziierten Zinkfingers inhibieren kann, was vermutlich eine Folge der Oligomerisierung ist [Bardwell and Treisman, 1994]. Außerdem wurde gezeigt, daß die BTB/POZ-Domäne in vivo wichtig für die Affinität und Spezifität der DNA-Bindung ist [Katsani et al., 1999].

## 1.2 PIPSQUEAK (Psq)

Kürzlich konnte gezeigt werden, daß GAGA-DNA-Elemente neben GAF auch von einem zweiten Drosophila-Protein, Pipsqueak (Psq), erkannt werden können. Durch diese Entdeckung wurde eine neue DNA-Bindungsdomäne identifiziert. Während GAF über eine Zinkfinger-Domäne an DNA bindet, erfolgt die Bindung von Psq über eine neuartige DNA-Bindungsdomäne mit helix-turn-helix-Struktur, die Psq-Domäne [Lehmann et al., 1998].

Während der Wirkungsmechanismus von GAF bereits in vielfacher Hinsicht aufgeklärt wurde (1.1), ist über den Wirkungsmechanismus von Psq noch nichts bekannt. Informationen zur Funktion von Psq stützen sich in erster Linie auf die Untersuchung von psq-Mutanten. Allele von psq lassen sich in zwei Gruppen unterteilen: Bei der einen Gruppe sind die Tiere homozygot lebensfähig, die Weibchen oder deren Nachkommen sind jedoch steril. Die andere Gruppe von Allelen ist

---

semiletal, d.h. homozygote Tiere sind mit Ausnahme von wenigen Tieren, die das Adultstadium erreichen, nicht lebensfähig. Basierend auf der Untersuchung dieser psq-Mutanten konnten einige Hinweise auf die Funktionen von Psq gesammelt werden.

So ist Pipsqueak (Psq) an der Steuerung der Entwicklung und der Reproduktion von *Drosophila* beteiligt. Maternales psq wird bereits sehr früh in der Oogenese benötigt [Siegel et al., 1993; Horowitz and Berg, 1996]. Dabei ist psq für die Bildung der Eikammer notwendig. Psq spielt eine Rolle bei der Interaktion zwischen Keimzellen und somatischen Zellen. Zudem konnte gezeigt werden, daß einige psq-Mutanten Defekte der dorsoventralen Struktur der Eischale aufweisen [Horowitz and Berg, 1995]. Während der Metamorphose ist psq dann für die Ausbildung adulter Strukturen wie Ovarien [Siegel et al., 1993], Augen, Flügel, Beine und Makrochaeten notwendig [Weber et al., 1995]. So wird psq für die Differenzierung der äußeren Photorezeptoren R3 und R4 benötigt. Bei psq-Mutanten fehlen diese, und die Anordnung der Ommatidien ist unregelmäßig. Zudem sind bei psq-Mutanten die Flügel oft verkürzt und weisen Einkerbungen auf. Die Beine können verdreht sein. Die dorsalen Makrochaeten sind auf Kopf und Thorax oft geknickt, verzweigt oder fehlen ganz [Weber et al., 1995].

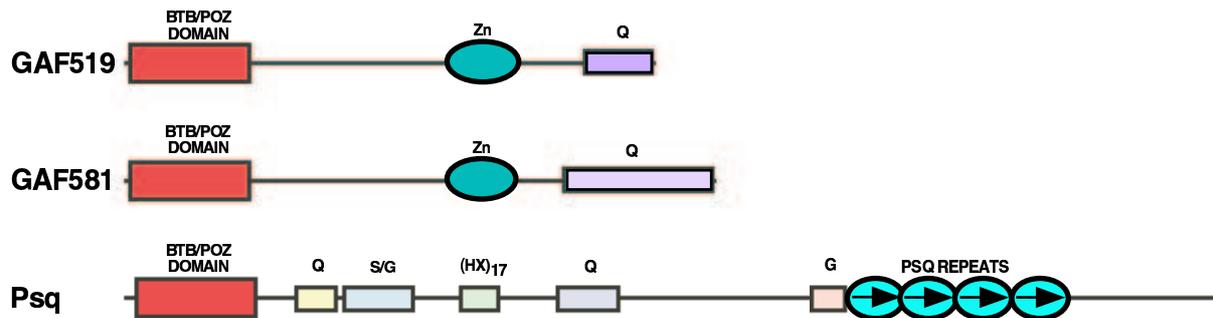
Da die Psq-Proteine im Zellkern lokalisiert sind, wird vermutet, daß sie wie andere BTB/POZ-Domänen-Proteine die Transkription von Zielgenen regulieren. Genetische Analysen deuten darauf hin, daß die Gene *vasa* und *gurken* Zielgene von Psq sind [Siegel et al., 1993; Horowitz and Berg, 1996]. *vasa* ist für die Entwicklung der Abdominal-Segmente und der Keimzellen notwendig, während *gurken* für die Festlegung der Dorsoventralachse des Embryos benötigt wird.

psq wird zu den posterior group-Genen gezählt und spielt eine Rolle bei der posterioren Musterbildung, wobei gezeigt werden konnte, daß psq maternal für die abdominale Segmentierung und die Bildung der Polzellen im Embryo benötigt wird. So wurde angenommen, daß embryonale Defekte bei der posterioren Musterbildung von psq-Mutanten durch eine unzureichende Expression des maternalen posterior group-Gens *vasa* verursacht werden [Siegel et al., 1993].

Darüber hinaus ist psq an der Lokalisierung des *gurken*-Produkts beteiligt [Horowitz and Berg, 1996]. Die Lokalisierung von *gurken*-mRNA in der sich entwickelnden Oocyte setzt Prozesse in Gang, die dann über Signale des *gurken*-Produkts eine Signalkaskade auslösen, die mit der korrekten Etablierung der Dorsoventralachse des Embryos enden [Schupbach and Roth, 1994; Anderson, 1995].

psq hat eine große und komplexe Transkriptionseinheit, dessen genomische Organisation nur unvollständig charakterisiert ist. Die Klonierung des Gens wurde in zwei unabhängigen Publikationen beschrieben [Weber et al., 1995; Horowitz and Berg, 1996]. Das Gen umfaßt >100 kb und besteht aus elf Exons mit drei alternativen 5'-Exons, woraus mindestens sechs verschiedene Spleiß-Varianten entstehen können. Es gibt dabei Unterschiede in Anzahl und Sequenz der veröffentlichten ovariellen [Horowitz and Berg, 1996] und embryonalen psq-Transkripte [Weber et al., 1995]. Auch die jeweils vorhergesagten Proteine unterscheiden sich nur geringfügig. Western-Blot-Analysen ergaben, daß mindestens zwei Psq-Isoformen existieren: PsqA mit einem Molekulargewicht von etwa 150 kDa und PsqB mit etwa 80 kDa [Horowitz and Berg, 1996]. Expressionsstudien zeigten, daß psq schon sehr früh exprimiert wird und während der gesamten embryonalen und larvalen Entwicklung vorhanden ist. In allen untersuchten Geweben ist Psq im Zellkern lokalisiert.

Das Psq-Protein (Abb. 2) besitzt N-terminal eine BTB/POZ-Domäne (1.1.3). Weiter C-terminal folgen 34 alternierende Histidinreste (HX)<sub>n</sub>, ein Motiv, das in einigen Drosophila-Proteinen, vor allem in Transkriptionsfaktoren gefunden wurde. Es wird angenommen, daß diese Histidin-Repeats an der Ausbildung von Protein-Protein-Interaktionen durch Koordinierung von Metallionen zwischen Proteinen mit diesen Repeats (histidine-metal-zipper) beteiligt sind [Janknecht et al., 1991]. C-terminal befindet sich die Psq-Domäne, die bei Psq aus vier Wiederholungen eines Psq-Motivs besteht. Zunächst konnte dieser Domäne keine biochemische Funktion zugeordnet werden [Weber et al., 1995; Horowitz and Berg, 1996]. Es wurde dann jedoch entdeckt, daß es sich dabei um eine DNA-Bindungsdomäne handelt (1.3) [Lehmann et al., 1998]. cDNA-Vergleiche deuten darauf hin, daß eine Isoform sowohl eine BTB/POZ- als auch eine Psq-Domäne enthält. Daneben scheint mindestens eine Isoform zu existieren, die zwar eine Psq-Domäne enthält, der aber die BTB/POZ-Domäne fehlt [Horowitz and Berg, 1996]. Obwohl auch Western-Blot-Analysen darauf hinweisen, daß solche Isoformen existieren könnten, ist über die Expression einzelner Isoformen während der Entwicklung von Drosophila nichts bekannt. Wie bereits erwähnt, hat Psq sowohl maternale als auch zygotische Funktionen. Eine naheliegende Vermutung ist, daß die pleiotropen Wirkungen des psq-Gens durch Interaktionen der Psq-Isoformen mit anderen BTB/POZ-Domänen-Proteinen zustande kommen, doch konnten derartige Wechselwirkungen bisher nicht nachgewiesen werden. Auch über mögliche Zielgene von Psq und seine Beteiligung an der Regulation der Expression dieser Zielgene ist, abgesehen von den Ergebnissen der oben erwähnten Mutanten-Analysen, wenig bekannt.



**Abb. 2: Domänenstruktur des Psq-Proteins und der GAF-Hauptisoformen (GAF519 und GAF581) von *Drosophila melanogaster*.** Die Strukturen wurden von publizierten cDNA-Sequenzen abgeleitet [Horowitz and Berg, 1996; Weber et al., 1995 für Psq und Benyajati et al., 1997 für GAF]. Die für Psq gezeigte Struktur wird vom längsten ORF von mehreren alternativen cDNAs kodiert. Kleinere Blöcke markieren Regionen, in denen bestimmte Aminosäuren gehäuft vorkommen. Die jeweiligen AA sind angegeben. Die (HX)<sub>17</sub>-Box kennzeichnet eine Region mit 17 Histidinresten, die mit anderen Aminosäureresten alternieren. Zn, Zinkfinger. [Abbildungen nach Lehmann et al., 1998, modifiziert; Greenberg and Schedl, 2001].

### 1.3 PIEFKE (Pfk) UND DIE PIPSQUEAK-PROTEINFAMILIE

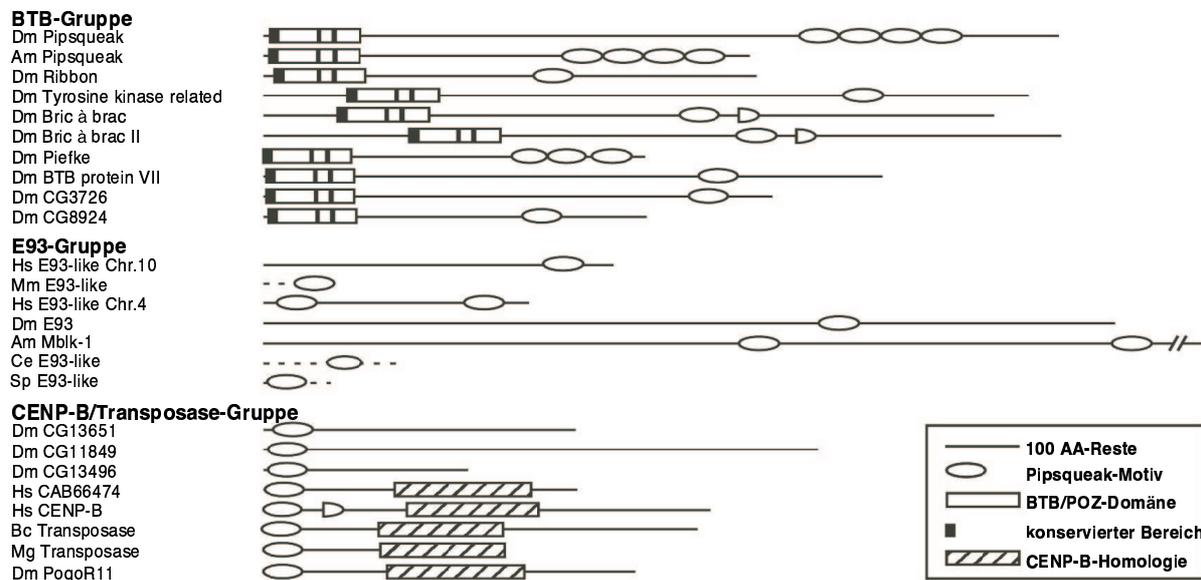
Wie bereits unter 1.2 erwähnt, konnte die Psq-Domäne von Psq kürzlich als eine neuartige DNA-Bindungsdomäne identifiziert werden. Die Psq-Domäne wurde im folgenden bei einer Reihe anderer Proteine gefunden, die zusammen eine neue Proteinfamilie definieren, die Pipsqueak-Proteinfamilie [Siegmond and Lehmann, 2002].

Mitglieder dieser Familie haben ein Psq-Motiv, eine Sequenz von 50 konservierten Aminosäuren, die als modular wiederholte Einheit eine Psq-Domäne mit einer unterschiedlichen Anzahl von Psq-Motiven bildet. Das Psq-Motiv zeigt starke Ähnlichkeiten zu DNA-Bindungsdomänen prokaryotischer Rekombinasen [Lehmann et al., 1998]. Strukturanalysen der Hin-Recombinase [Feng et al., 1994] und der  $\gamma\delta$ -Resolvase [Yang and Steitz, 1995] haben gezeigt, daß deren DNA-Bindungsdomäne aus drei  $\alpha$ -Helices besteht, wobei die C-terminale Erkennungshelix in die große Rinne der DNA-Doppelhelix inseriert und mit Helix 2 ein helix-turn-helix-Motiv bildet. Ein Vergleich mit der Sequenz der Psq-Motive (Abb. 4) legt die Vermutung nahe, daß die drei Helices eines jeden Psq-Motivs eine ähnliche Struktur annehmen könnten. Strukturanalysen hierzu liegen allerdings noch nicht vor [Lehmann et al., 1998].

Je nach Vorkommen weiterer konservierter Domänen, der Lokalisierung der Psq-Domäne und der Sequenzähnlichkeit (Abb. 3) lassen sich die Psq-Proteine in drei Untergruppen unterteilen (Abb. 3 und Abb. 4). Zur BTB-Gruppe gehören Proteine, die neben einer Psq-Domäne in der C-terminalen Hälfte des Proteins eine am N-Terminus lokalisierte BTB/POZ-Domäne besitzen.

Mitglieder der E93-Gruppe haben lediglich eine Psq-Domäne und enthalten keine weiteren konservierten Sequenzmotive.

Innerhalb der dritten Gruppe, der CENP-B/Transposase-Gruppe, ist die N-terminale Hälfte der Psq-Domäne besonders gut konserviert, und diese Domäne ist direkt am N-Terminus des Proteins lokalisiert.



**Abb. 3: Domänenstrukturen der Proteine der Psq-Familie.** Es werden drei Gruppen innerhalb der Psq-Proteinfamilie unterschieden. Diese Gruppen enthalten Proteine von *Apis mellifera* (Am), *Caenorhabditis elegans* (Ce), *Drosophila melanogaster* (Dm), *Homo sapiens* (Hs), *Magnaporthe grisea* (Mg), *Mus musculus* (Mm) und *Strongylocentrotus purpuratus* (Sp). Die konservierten Bereiche der BTB/POZ-Domäne sind spezifisch für die Tramtrack-(Ttk)-Untergruppe, einer Untergruppe der BTB/POZ-Proteinfamilie, die eine Zinkfinger-DNA-Bindungsdomäne haben. [Abbildung aus Siegmund and Lehmann, 2002, modifiziert].

In *Drosophila* gibt es mindestens 14 Mitglieder der Psq-Proteinfamilie, wobei neun davon auch eine N-terminale BTB/POZ-Domäne besitzen (Abb. 3). Drei Proteine der Psq-Familie sind bekannte wichtige Regulatoren der Entwicklung von *Drosophila*. E93 (ein Mitglied der E93-Gruppe) ist ein Schlüsselregulator des durch Steroidhormon ausgelösten programmierten Zelltods während der Metamorphose [Woodard et al., 1994; Baehrecke and Thummel, 1995; Lee et al., 2000; Thummel, 2001]. Bric à brac (Bab und BabII, gehören der BTB-Gruppe an) sind zwei Proteine mit homöotischen Funktionen, die eine Rolle in der Oogenese spielen und zudem die Morphologie abdominalen Segmente [Kopp et al., 2000] und die Segmentierung der Beine und Antennen kontrollieren [Godt et al., 1993; Godt and Laski, 1995]. Ribbon (Rib, entspricht CG7230) ist ein weiteres Protein der BTB-Gruppe, das mit epithelialer Morphogenese in Verbindung gebracht wird und eine Rolle bei der Zellmigration spielt [Jack and Myette, 1997; Blake et al., 1998; 1999; Bradley and Andrew, 2001; Shim et al., 2001]. Zwei weitere Proteine der Psq-Familie, Psq und Piefke, sind unter 1.2 bzw. 4.2 näher beschrieben.



Hinweise, daß ein weiteres Psq-Domänen-Protein, der Drosophila-Apoptoseregulator E93, DNA-bindende Eigenschaften hat, da dieses Protein an spezifischen Loci polytärer Chromosomen zu finden ist [Lee et al., 2000].

Die Identifizierung von Pfk bot insbesondere die Möglichkeit, ein weiteres Mitglied der Psq-Proteinfamilie näher zu charakterisieren und zu untersuchen, ob die Psq-Domäne von Pfk eine DNA-Bindungsaktivität besitzt. Da Pfk eine Domänenstruktur besitzt, die Psq unter allen anderen Mitgliedern der Psq-Familie am ähnlichsten ist (Abb. 3), lag diese Vermutung nahe. Während die Psq-Domäne anderer Mitglieder der Psq-Proteinfamilie nur aus einem Psq-Motiv besteht, ist die Psq-Domäne von Pfk und Psq aus drei bzw. vier Psq-Motiven aufgebaut. Die Ähnlichkeiten der Domänenstruktur beider Proteine könnte auf funktionelle Gemeinsamkeiten oder ähnliche DNA-Bindungsspezifitäten hinweisen. Die Charakterisierung von Pfk könnte somit einen Beitrag dazu leisten, die Wirkungsweise von Psq-Proteinen und funktionelle Besonderheiten der Psq-Domäne besser zu verstehen.