

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 MATERIAL

3.1.1 ANTIKÖRPER

3.1.1.1 PRIMÄRE ANTIKÖRPER

Die Wirtsspezies und Quellen der in den einzelnen Versuchen verwendeten primären Antikörper sind in Tabelle 1 aufgelistet. Die in den einzelnen Versuchen eingesetzte Konzentration der Antikörper ist den jeweiligen Versuchsbeschreibungen zu entnehmen (3.2.3.3.2, 3.2.6.1, 3.2.7, 3.2.8.1 und 3.2.8.2).

Tabelle 1: Primärantikörper

Antikörper	Wirtsspezies	Quelle und Beschreibung
anti-GAF: (anti-GAGA ^{BTB-ZF-C-ter519})	Ratte	[Benyajati et al., 1997]
anti-Psq: AS1 und AS2	Kaninchen	[Horowitz and Berg, 1996]
anti-dAP4: dAP4AK3, SA2720	Kaninchen	[King-Jones et al., 1999]
anti-BR-C: BR-C AK1 SA4256	Kaninchen	[Renault et al., 2001]
anti-Pfk: anti-Pfkl _f und anti-Pfkl _f	Kaninchen	beschrieben in dieser Arbeit unter 3.2.5.1.2

3.1.1.2 SEKUNDÄRE ANTIKÖRPER

Die eingesetzten sekundären Antikörper sind in Tabelle 2 zusammengefaßt. AP-konjugierte Antikörper wurden in Western-Blot-Analysen (3.2.3.3) verwendet. Cy3-, Cy5- und Alexa fluor 488-Konjugate wurden für Antikörperfärbungen an Geweben (3.2.7) sowie für Immunfärbungen polytärer Chromosomen (3.2.8.1) und mitotischer Chromosomen (3.2.8.2) eingesetzt.

Tabelle 2: Sekundärantikörper

Antikörper	Markierung	Wirtsspezies	Quelle
anti-Ratte IgG (H+L)	Cy5-Konjugat	Ziege	Jackson ImmunoResearch Inc.
anti-Ratte IgG (H+L)	Cy3-Konjugat	Ziege	Jackson ImmunoResearch Inc.
anti-Kaninchen IgG (H+L)	Cy3-Konjugat	Ziege	Jackson ImmunoResearch Inc.
anti-Kaninchen IgG (H+L)	Alexa fluor 488-Konjugat	Ziege	Molecular Probes
anti-Kaninchen IgG (H+L)	AP-Konjugat	Ziege	Jackson ImmunoResearch Inc.
anti-Ratte IgG (H+L)	AP-Konjugat	Kaninchen	Jackson ImmunoResearch Inc.

3.1.2 PLASMIDE

Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide sind in Tabelle 3 zusammengefaßt. Die Verwendung der Plasmide geht aus der Beschreibung hervor.

Tabelle 3: Plasmide

Plasmidbezeichnung	Größe (kb)	Beschreibung	Quelle
pBluescript KS(-)	2.9	Klonierungs- und Transkriptionsvektor	Stratagene
pCR2.1-TOPO	3.9	Vektor zur Klonierung von PCR-Produkten	Invitrogen
pET21a-d	5.4	T7-Tag-/His-Tag-Expressionsvektor	Novagen
pET3c	4.6	T7-Tag-Expressionsvektor	Novagen
pGEX2T	4.9	GST-Fusionsprotein-Expressionsvektor, GST abspaltbar durch Thrombinproteaseschnittstelle	Pharmacia
pARGAGA519	6.2	GAF519-Expressionsvektor	C. Benyajati [Soeller et al., 1993; Benyajati et al., 1997]
pHPT7-9	5.1	psq-A -gesamt-cDNA in pBluescriptKS(-)	C. A. Berg [Horowitz and Berg, 1996]
pBluescriptSK(+/-)-LD08856	4.9	pfk-gesamt-cDNA in pBluescriptSK(+/-)	Research Genetics [Research Genetics]; siehe auch Tabelle 8 und 4.2.1.1

3.1.3 OLIGONUKLEOTIDE

Alle Oligonukleotide wurden von TIB MOLBIOL bezogen. Es ist jeweils angegeben, welche Restriktionsschnittstelle durch PCR generiert wurde.

Für die Klonierung der psq-Fragmente, des Trl-Fragments und der kodierenden Sequenz von pfk wurden die in Tabelle 4 beschriebenen Primer eingesetzt.

Tabelle 4: Primer

Fragment	Primerbezeichnung	Primer	Generierte Schnittstelle
Psq221	psqfwdNde	5'-CCGCATATGGGCTCTGGCGAGAAAGGT-3'	NdeI
	psqrevXho	5'-CGGCTCGAGGTTGGCAACCACGTCGTA-3'	XhoI
Psq1064	psq1.5'End	5'-GGGGGGGGCGATCCGAGAACGCGGATGACC-3'	Sall
	psq3'Sal	5'-GCCGCCGTCGACACTACGCTCCGGCGTCCCGTG-3'	Sall
Psq651	psqfwdNde4	5'-GGGGCCATATGGCAGCGGTTTCGAGGA-3'	NdeI
	psq1953revHind	5'-CCCAAGCTTCCCGGAGGACATCATGTT-3'	HindIII
Psq331	psqfwdNde4	5'-GGGGCCATATGGCAGCGGTTTCGAGGA-3'	NdeI
	psq994revHind	5'-CCCAAGCTTGTCTCGGCGTCTGAATC-3'	HindIII
Psq166	psqfwdNde5	5'-GGGGGGGCCATATGGCAGCGGTTTCGAG-3'	NdeI
	psq499revHind	5'-CCCAAGCTTGTCTCGGCGTCTGAATC-3'	HindIII

Tabelle 4: Primer (Forts.)

Fragment	Primerbezeichnung	Primer	Generierte Schnittstelle
Psq942	psqdBTBfwd	5'-GGGGGGGCGGATCCGAGAACGCGGATGACC3'	BamHI
	psq3200dBTBrev	5'-CCCCCGCCTCGAGACTACGCTCCGGCGT-3'	XhoI
Psq528	psqdBTBfwd	5'-GGGGGGGCGGATCCGAGAACGCGGATGACC3'	BamHI
	psq1953dBTBrev	5'-CCCCCGCCTCGAGCCCGGAGGACATCAT-3'	XhoI
GAF116	GAGAfwdBam	5'-CCCCCGGATCCAATTTCGCTGTATTTCGCTC-3'	BamHI
	GAGArevHind	5'-CCCCCGAATTCCTCGCTGCGGTGCCAGTC-3'	HindIII
Pfk	pfkfwNde	5'-GGCCATATGAATCATCTTAAGTGGATG-3'	NdeI
	pfkrevHind	5'-CCCAAGCTTGTTTAGCATATCGTCTCC-3'	HindIII

3.1.4 ORGANISMEN

3.1.4.1 STÄMME VON *Drosophila melanogaster* UND AUFZUCHTBEDINGUNGEN

Die Haltung der Fliegenstämme und die Durchführung von Kreuzungen erfolgten nach Standardprozeduren der *Drosophila*-Genetik [Ashburner, 1989]. Die Zuchten wurden auf Standardmedium (Maismehl, Rübensirup, Agar, Bierhefe) bei 25 °C gehalten. Für die Untersuchung der PEV unter Verwendung des $\ln(1)w^{m4h}$ -Stammes wurde ein spezielles Futter verwendet; 650 mL dieses Futters enthielten 10.8 g Bierhefe, 60 mL Malzzucker, 6.5 g Agar, 38 g Maismehl und 6 mL 16 % Nipaginlösung. Die Bezeichnungen der verwendeten Fliegenstämme und ihre Genotypen sind in Tabelle 5 zusammengefaßt.

Tabelle 5: Fliegenstämme^a

Name	Genotyp	Herkunft/Literatur
Kochi R	Wildtypstamm Kochi R	Stammsammlung Korge
psq ^{lolaΔ18}	w; Df(2R)psq ^{lolaΔ18} /CyO [act-GFP] w ⁺	C. A. Berg [Horowitz and Berg, 1996]
psq ^{lolaΔ18} /CyO	w; Df(2R)psq ^{lolaΔ18} /CyO	A. Schwendemann
psq ⁰¹¹⁵	w; psq ⁰¹¹⁵ /CyO [act-GFP] w ⁺	C. A. Berg [Siegel et al., 1993; Horowitz and Berg, 1996]
psq ⁰¹¹⁵ /CyO	w; psq ⁰¹¹⁵ /CyO	A. Schwendemann
psq ^{RF13}	w; psq ^{RF13} /CyO [act-GFP] w ⁺	C. A. Berg [Horowitz and Berg, 1995; Horowitz and Berg, 1996]
psq ^{F112}	psq ^{F112} ; ry/SM5a:TM6B, Tb	U. Weber [Weber et al., 1995]
Pc ³	Pc ³ /TM3, Ser [act-GFP] w ⁺	S. Sakonju [Lewis, 1978]

Tabelle 5: Fliegenstämme^a

Name	Genotyp	Herkunft/Literatur
Trl ^{R85}	Trl ^{R85} /TM3, Ser [act-GFP] w ⁺	S. Sakonju [Farkas et al., 1994]
Trl ^{13C}	w ^{m4h} ; Trl ^{13C} /TM6, Tb	Stammsammlung Korge [Galloni et al., 1993; Farkas et al., 1994]
Ubx ¹³⁰ /Kg	Ubx ¹³⁰ /Kg(v) red(1) Sb (Sbd-1)	S. Sakonju [Kauffman, 1981]
Ubx ¹³⁰ /Sb	Ubx ¹³⁰ /TM3, Sb	M. Lehmann
Ubx ¹³⁰ /Tb	Ubx ¹³⁰ /TM6B (Tb, Ubi-GFP)	M. Lehmann
In(1)w ^{m4h}	In(1)w ^{m4h}	G. Korge [Übersicht in Reuter and Spierer, 1992]
psq ^{lolaΔ18} /CyO ; Trl ^{R85} /Ser	Df(2R)psq ^{lolaΔ18} /CyO; Trl ^{R85} /TM3, Ser	A. Schwendemann
psq ^{lolaΔ18} /CyO ; Trl ^{R85} /Tb	Df(2R)psq ^{lolaΔ18} /SM5; Trl ^{R85} /TM6B, Tb	M. Lehmann
psq ^{F112} /CyO ; Trl ^{R85} /Sb	psq ^{F112} /CyO [act-GFP]; Trl ^{R85} /TM3, Sb	M. Lehmann
Sp/CyO;Sb/TM3 Ser	Sp/CyO;Sb/TM3 Ser	Stammsammlung Korge
w ^Z ; Sp/CyO	w ^Z ; Sp/CyO	Stammsammlung Korge

a. Weitere Einzelheiten zu den Genotypen siehe Flybase unter <http://flybase.bio.indiana.edu>.

Kreuzungen zur Untersuchung möglicher genetischer Interaktionen unter Verwendung der hier angegebenen Stämme sind unter 3.2.9 beschrieben. Kreuzungen zur Etablierung bestimmter Stämme sind nachfolgend hier beschrieben:

Zur Untersuchung einer möglichen genetischen Interaktion zwischen Ubx¹³⁰ und psq/Trl mußte ein psq^{lolaΔ18}/CyO ; Trl^{R85}/Ser -Stamm etabliert werden. Dazu wurden zunächst parallel jeweils psq^{lolaΔ18}- bzw. Trl^{R85}-Männchen mit Weibchen des Stammes Sp/CyO;Sb/TM3 Ser gekreuzt. F₁-Männchen der Genotypen psq^{lolaΔ18}/CyO; +/TM5 Ser bzw. +/CyO; Trl^{R85}/TM5 Ser wurden jeweils erneut mit Sp/CyO;Sb/TM3 Ser-Weibchen gekreuzt. Daraus resultierende psq^{lolaΔ18}/CyO; Sb/TM5 Ser-Weibchen aus der einen bzw. Sp/CyO; Trl^{R85}/TM5 Ser-Männchen aus der anderen Kreuzung wurden miteinander gekreuzt und Nachkommen des gewünschten Genotyps psq^{lolaΔ18}/CyO ; Trl^{R85}/Ser selektiert.

Um PEV-Effekte (Kreuzungen dazu unter 3.2.9.4 beschrieben) mit Hilfe des In(1)w^{m4h}-Stammes überhaupt untersuchen zu können, mußten zunächst die CyO [act-GFP] w⁺-Balancer-Chromosomen der Stämme psq^{lolaΔ18} und psq⁰¹¹⁵ durch CyO-Balancer-Chromosomen, denen das w⁺-Allel fehlt, ersetzt werden. Dazu wurden jeweils Weibchen der beiden erwähnten psq-Stämme (w; psq^{lolaΔ18}/CyO [act-GFP] w⁺

bzw. w ; psq^{0115}/CyO [$act-GFP$] w^+) mit w^Z/Y ; Sp/CyO -Männchen gekreuzt und Nachkommen der gewünschten Genotypen w ; $psq^{loa\Delta18}/CyO$ bzw. psq^{0115}/CyO selektiert, die dann in den unter 3.2.9.4 beschriebenen PEV-Kreuzungen (A) und (B) eingesetzt wurden.

3.1.4.2 STÄMME VON *Escherichia coli*

Die in dieser Arbeit eingesetzten Bakterienstämme und deren Genotypen sind in Tabelle 6 zusammengefaßt. XL1-Blue-Zellen wurden für Standardklonierungszwecke transformiert (3.2.2.3.1). BL21(DE3)- und BL21(DE3)-pLysS-Zellen wurden zur Transformation eingesetzt (3.2.2.3.2), wenn Proteine bakteriell exprimiert werden sollten (3.2.2.5.2 und 3.2.4).

Tabelle 6: Bakterienstämme

Bakterienstamm	Genotyp
XL1-Blue	$supE44 hsdR17 recA1 emdA1 gyrA6thi relA1 lac^- F'[[proAB^+ lacI^q]lacZ\Delta M15 Tn10(tet^r)]$ [Bullock et al., 1987]
BL21(DE3)	$hsdS gal (\lambda clts857 ind1 Sam7 nin5lacUV5-T7 gene1)$ [Studier and Moffatt, 1986]
BL21(DE3)-pLysS	$hsdS gal (\lambda clts857 ind1 Sam7 nin5lacUV5-T7 gene1) pLysS$

3.2 METHODEN

3.2.1 ANZUCHT VON BAKTERIENKULTUREN

Alle Bakterien wurden zur Kultur bei 37 °C in LB-Medium (1 % Bacto-Pepton; 0.5 % NaCl; 0.5 % Bacto-Yeast-Extract) inkubiert oder auf Agarplatten (1.5 % Bacto-Agar in LB-Medium) ausgestrichen. Zur Selektion auf Plasmide mit Antibiotikaresistenz wurde dem Medium Ampicillin (Endkonzentration 100 µg/mL), Carbenicillin (Endkonzentration 50 µg/mL) und/oder Chloramphenicol (Endkonzentration 34 µg/mL) zugesetzt; dies wird im folgenden durch die Abkürzung LB/Amp, LB/Car bzw. LB/Chl deutlich gemacht. Bakterienstämme wurden nach Zusatz von 10 % DMSO zum Medium bei -70 °C gelagert.

3.2.2 DNA-ANALYSE

3.2.2.1 ANALYTISCHE DNA-PRÄPARATION

Diese Methode diente zur Aufarbeitung kleinerer Plasmidmengen [Birnboim and Doly, 1979, modifiziert]. Dabei wurden 3 mL LB/Amp-Medium (3.2.1) mit einer Bakterieneinzelkolonie angeimpft und ÜN bei 37 °C und 260 rpm geschüttelt (Lab-shaker, A. Kühner). Die Bakterien wurden 5 min bei 4000 rpm in der Heraeus-

Zentrifuge (Minifuge2, Heraeus Instruments) abzentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 200 μL Lösung 1 (50 mM Glucose; 25 mM Tris-HCl, pH 8.0; 10 mM EDTA, pH 7.5) resuspendiert. Nach Zugabe von 400 μL Lösung 2 (0.2 N NaOH; 1 % SDS) wurde kurz gemischt und 5 min auf Eis inkubiert. Dann wurden 300 μL vorgekühlte Lösung 3 (2.7 M Kaliumacetat, mit Eisessig auf pH 4.8 gebracht) zugegeben, kurz gemischt, 5 min auf Eis inkubiert und 5 min mit einer Eppendorf Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde nochmals zentrifugiert und die Plasmid-DNA mit Isopropanol (0.6faches Volumen) gefällt. Die DNA wurde 10 min zentrifugiert, das DNA-Pellet mit 70 % EtOH gewaschen, getrocknet und in 30 μL H_2O aufgenommen.

3.2.2.2 PRÄPARATIVE DNA-ISOLIERUNG

Zur Gewinnung größerer Plasmidmengen wurde das Jetstar Plasmid Midi Kit der Firma Genomed entsprechend der Anleitung eingesetzt.

3.2.2.3 TRANSFORMATION VON Escherichia coli

3.2.2.3.1 HITZESCHOCK

Standardtransformationen von XL 1-Blue-Zellen (3.1.4.2) durch Hitzeschock wurden nach Sambrook et al. [Sambrook et al., 1989] durchgeführt.

3.2.2.3.2 ELEKTROTRANSFORMATION

Wegen der geringen Effizienz der Transformation von BL21(DE3)- bzw. BL21(DE3)-pLysS-Zellen wurden diese mittels Elektroporation transformiert. Die Transformation wurde in einem Cellject Basic (Equibio) und mit einem Elektropuls von 2400 V durchgeführt. Die Zellen wurden zuvor entsprechend Herstellerangaben kompetent gemacht.

3.2.2.4 POLYMERASE-KETTENREAKTION (PCR)

Zur Amplifizierung von Plasmid-Inserts wurden 10-40 ng Plasmid-DNA (pHPT7-9 für psq-Fragmente; pARGAGA519 für Trl-Fragmente; siehe Tabelle 3 und Tabelle 7) als Template eingesetzt. Dieser DNA wurden je 1 μL der PCR-Primer (100 pmol/ μL in H_2O), 2 μL der dNTP-Lösung (so daß in 100 μL Endvolumen jedes Nukleotid in einer Konzentration von 40 μM vorlag), 10 μL des 10x Reaktionspuffers sowie 0.5 μL der Pwo-Polymerase (2.5 U/ μL , Eurogentec) zugegeben und mit H_2O auf ein Reaktionsvolumen von 100 μL ergänzt. Die Matrizen-DNA wurde zunächst für 4 min bei 94 °C denaturiert, dann erfolgte die eigentliche Amplifikationsreaktion mit einer Denaturierung bei 94 °C für 1 min. Einem 2 min Annealing bei einer Primer-spezifischen Temperatur schloß sich die Elongationsphase bei 72 °C für 1 min an. Die

Zahl der Zyklen betrug 32. Am Ende des letzten Zyklus wurde eine abschließende Elongationsreaktion bei 72 °C für 8 min ausgeführt, bevor die Reaktion durch Abkühlen auf 4 °C gestoppt wurde.

Es wurden Primer verwendet, denen neben kodierenden Sequenzabschnitten einzelne Basenpaare angehängt waren. Dadurch konnten für die entsprechende Klonierung passende Restriktionsschnittstellen eingefügt werden.

3.2.2.5 KLONIERUNG

Standardmethoden wie DNA-Fällung, Restriktionsverdau, Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren, DNA-Gelelektrophorese und Subklonierungsschritte (Dephosphorylierung von Vektoren, Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen mittels DEAE-Zellulose, Ligation mit der T₄-DNA-Ligase) wurden wie in Sambrook et al. [1989] beschrieben durchgeführt.

3.2.2.5.1 KLONIERUNG VON PCR-PRODUKTEN

Einige PCR-Produkte konnten nach dem Restriktionsverdau nicht erfolgreich direkt in den pET- bzw. pGEX2T-Vektor inseriert werden. Daher wurden diese PCR-Produkte zunächst in einen anderen Vektor (pCR2.1-TOPO) integriert, bevor das Insert daraus für weitere Klonierungsschritte über die eingefügten Restriktionsschnittstellen herausgeschnitten wurde.

Nach dem TOPOTMTA Cloning Kit-Protokoll (#K4550-40, Invitrogen) wurde das PCR-Produkt zunächst in den pCR2.1-TOPO Vektor kloniert. Da in den PCR-Reaktionen die Pwo-Polymerase verwendet wurde, die zwar eine proof-reading-Funktion besitzt aber keine A-Überhänge erzeugt, mußten, wie im Protokoll beschrieben, über eine der Ligation vorgeschaltete Reaktion A-Überhänge generiert werden.

3.2.2.5.2 BESCHREIBUNG DER VERWENDETEN KLONE

In Tabelle 7 sind alle in dieser Arbeit etablierten und verwendeten Bakterienklone aufgelistet. Aus der Tabelle geht hervor, welche Primer (Tabelle 4) zur Erzeugung der jeweiligen Inserts eingesetzt wurden. Die Inserts wurden wiederum in entsprechende Expressionsvektoren ligiert, die dann in bakterielle Expressionsstämme transformiert wurden. Tabelle 7 gibt außerdem das jeweilige exprimierte Protein an, das unter dieser Bezeichnung in den Versuchen verwendet wurde.

Tabelle 7: Bakterienklone

Rekombinant exprimiertes Protein	Klonbezeichnung	ligiert in Plasmid	Primer (Schnittstelle)	Plasmid-Template in PCR
Psq221	BL21(DE3)-pET21b-psq666	pET21b	psqfwdNde (NdeI) psqrevXho (XhoI)	pHPT7-9
Psq1064	BL21(DE3)-pET21a-psq3200	pET21a	psq1.5'End (Sall) psq3'Sal (Sall)	pHPT7-9
Psq651	BL21(DE3)-pET21b-psq1953	pET21b	psqfwdNde4 (NdeI) psq1953revHind(HindIII)	pHPT7-9
Psq331	BL21(DE3)-pET21b-psq994	pET21b	psqfwdNde4 (NdeI) psq994revHind(HindIII)	pHPT7-9
Psq166	BL21(DE3)-pET21b-psq499	pET21b	psqfwdNde5 (NdeI) psq499revHind (HindIII)	pHPT7-9
Psq942	BL21(DE3)-pET21a-psq2800	pET21a	psqdBTBfwd (BamHI) psq3200dBTBrev (XhoI)	pHPT7-9
Psq528	BL21(DE3)-pET21a-psq1585	pET21a	psqdBTBfwd (BamHI) psq1953dBTBrev (XhoI)	pHPT7-9
GAF116	BL21(DE3)-pLysS-pGEX2T-gaga120	pGEX2T	GAGAfwdBam (BamHI) GAGArevHind (HindIII)	pAR-GAGA519
Pfk	BL21(DE3)-pET21b-pfk	pET21b	pfkfwdNde (NdeI) pfkrevHind (HindIII)	pBluescriptKS(-)-LD08856

3.2.2.6 SEQUENZIERUNG

Die Sequenzierung von Plasmid-DNA wurde von MWG Biotech durchgeführt.

3.2.3 PROTEINANALYSE

3.2.3.1 HERSTELLUNG VON DROSOPHILA-GEWEBEEXTRAKTEN

Speicheldrüsen- und Ovarienextrakte für Western-Blot-Analysen (3.2.3.3) wurden wie folgt hergestellt. Um Speicheldrüsenextrakte herzustellen, wurden 25 Speicheldrüsen des dritten Larvalstadiums von Kochi R in PBS (130 mM NaCl; 7 mM Na₂HPO₄; 3 mM NaH₂PO₄) präpariert und nach Abnahme des PBS in 200 µL 2x Probenpuffer (3.2.3.2.1) gekocht.

Ovarienextrakte wurden aus 40 in PBS präparierten Ovarien adulter Kochi R-Tiere hergestellt. Die Ovarien wurden in 125 µL Homogenisierungspuffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5; 3 mM EDTA; 1 % NP-40; 0.1 % SDS; 100 µg/mL PMSF) überführt und mit einem Pistill auf Eis homogenisiert. Nach 20 min Zentrifugation bei 14000 x g, 4 °C,

wurde der Überstand abgenommen, 1:1 mit 2x Probenpuffer (3.2.3.2.1) versehen und gekocht.

Speicheldrüsenkernextrakte wurden wie in Lehmann und Korge [1995] beschrieben hergestellt. Diese wurden dann in Immunpräzipitationsreaktionen (3.2.6.1) oder nach Zugabe von 2x Probenpuffer im Verhältnis 1:1 zur Analyse im Western Blot (3.2.3.3) verwendet.

3.2.3.2 SDS-POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE (SDS-PAGE)

3.2.3.2.1 ELEKTROPHORESE

Die Proben wurden mit einem bestimmten Volumen 2x Probenpuffer (25 mM Tris-HCl; 2 % SDS; 0.001 % Bromphenol Blau; 10 % Glycerol; 1 % 2-Mercaptoethanol) versetzt und anschließend für 5 min gekocht. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte nach dem diskontinuierlichen System nach Laemmli [1970] mit einem Sammelgel mit 5 % sowie einem Trenngel mit 12 bzw. 15 % Polyacrylamid-Anteil. Die Gelkammer (Mighty Small II SE260; Hoefer/Pharmacia Biotech) wurde mit Laufpuffer (0.3 % Tris-HCl; 1.44 % Glycin; 0.1 % SDS, pH 8.8) gefüllt. Die Stromstärke betrug während des Laufs 25 mA. Als Proteinmarker wurde der peqGOLD Protein-Marker (14.4; 18.4; 25.0; 35.0; 45.0; 66.2; 116.0 kDa; peqlab) verwendet.

3.2.3.2.2 COOMASSIE-BLUE-FÄRBUNG VON SDS-POLYACRYLAMID-GELEN

Proteinbanden in SDS-Polyacrylamid-Gelen wurden mit 0.05 % Coomassie Brilliant Blue R250 in 25 % Isopropanol, 10 % Essigsäure ÜN gefärbt. Danach wurden die Gele mit 40 % Methanol, 10 % Essigsäure entfärbt. Vor dem Trocknen der Gele wurden diese mit 50 % Methanol entwässert.

3.2.3.3 WESTERN BLOT

3.2.3.3.1 TRANSFER VON PROTEINEN AUS SDS-POLYACRYLAMIDGELEN AUF NITROZELLULOSE

Durch SDS-PAGE aufgetrennte Proteine wurden nach der Semi-Dry-Technik von Towbin et al. [1979] in einer Fastblot-B43-Apparatur (Biometra) elektrophoretisch auf Nitrozellulosemembranen (Protran BA85, Schleicher & Schuell) übertragen. Der Transfer erfolgte 30 min bei konstantem Stromfluß (4mA/cm²).

3.2.3.3.2 IMMUNFÄRBUNG VON PROTEINEN

Die Nachweisreaktion erfolgte mittels alkalischer Phosphatase, die an den sekundären Antikörper gekoppelt ist. Das Enzym setzt BCIP (5-Bromo-4-Chloro-3-

Indolyl-Phosphat) und NBT (4-Nitroblue Tetrazolium Chlorid) in ein dunkelviolettes Präzipitat um. Nach dem Proteintransfer wurde die Markerspur abgeschnitten und die Protein-Banden mit schwarzer Tinte (Pelikantusche A17, schwarz) markiert.

Die Membran wurde für 2 h durch leichtes Schütteln bei RT in Blockierlösung (5 % Magermilchpulver in TBS, 20mM Tris-HCl, pH 7.5; 137 mM NaCl) abgesättigt. Danach erfolgte eine Inkubation über 2 h bei RT mit dem in Blockierlösung verdünnten (1:1000 bis 1:5000) primären Antikörper, anschließend eine weitere Inkubation ÜN bei 4 °C. Danach wurde der Filter 4x 5 min mit TBS gewaschen, bevor er für 1 h mit einer 1:5000 Verdünnung eines entsprechenden sekundären Antikörpers in Blockierlösung inkubiert wurde. Nach jeweils 2x 5 min Waschen in TBS und AP-Puffer (100 mM Tris-HCl, pH 9.5; 5 mM MgCl₂; 100mM NaCl) wurde die Farbreaktion in 30 mL AP-Puffer durch Zugabe von 200 µL NBT (50 mg/mL) und 250 µL BCIP (20 mg/mL) initiiert. Diese Reaktion wurde nach geeigneter Zeit durch TBS; 20 mM EDTA gestoppt.

3.2.3.4 KONZENTRATIONSBESTIMMUNG VON PROTEINEN

Proteinbestimmungen wurden nach der Methode von Bradford [1976] mit dem Coomassie Protein Assay Reagent (Pierce) unter Verwendung einer mit BSA als Standardprotein erstellten Eichgeraden vorgenommen und die Absorption der Proben bei 595 nm bestimmt.

3.2.4 BAKTERIELLE REKOMBINANTE PROTEINEXPRESSION

3.2.4.1 EXPRESSION VON Psq221, Psq1064, Psq651, Psq331, Psq166, Psq942, Psq528 UND Pfk

Die Histidin(His)-tag-Fusionsproteine Psq221, Psq1064, Psq651, Psq331, Psq166, Psq942, Psq528 und Pfk wurden wie folgt exprimiert: Eine 10 mL LB/Amp-Kultur wurde mit dem jeweiligen Klon (3.2.2.5.2) beimpft und ÜN bei 37 °C, 260 rpm inkubiert. Am Folgetag wurden 2 mL dieser Kultur zu 100 mL frischem LB/Amp gegeben und bei 37 °C, 260 rpm bis zu einer OD_{595 nm}=0.6 inkubiert. Durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration 1.0 mM) wurde dann die Induktionsphase gestartet, deren optimale Dauer jeweils experimentell bestimmt wurde. Die Induktionsphase erfolgte durch weitere Inkubation bei 37 °C, 260 rpm. Die induzierten Zellen wurden 15 min bei 4 °C und 6500 x g pelletiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Reinigung des Fusionsproteins (3.2.5.1) bei -80 °C gelagert.

Proben nicht-induzierter und induzierter Zellen wurden zur Kontrolle der Induzierbarkeit entnommen, pelletiert und wie unter 3.2.3.2 beschrieben analysiert.

Bei Bedarf an größeren Proteinmengen wurden die Ansätze mit entsprechend größeren Volumina durchgeführt.

3.2.4.2 EXPRESSION VON GAF519

Die Expression von GAF519 (in LB/Car/Chl-Medium) erfolgte mit dem Klon BL21(DE3)-pLysS-pAR-GAGA-519 (3.2.2.5.2) im wesentlichen wie unter 3.2.4.1 beschrieben, jedoch wurde bei lediglich 30 °C inkubiert und mit IPTG in einer Endkonzentration von 0.5 mM induziert (Induktionszeit 2 h).

3.2.4.3 EXPRESSION VON GST-GAF116 FÜR GST-PULLDOWN

Die Expression des GST-Fusionsproteins GST-GAF116 für die GST-pulldown-Experimente erfolgte unter Verwendung des Klons BL21(DE3)-pGEX2T-gaga120 (3.2.2.5.2) und wurde im wesentlichen wie unter 3.2.4.1 beschrieben durchgeführt. Das Kulturvolumen betrug jedoch 300 mL. Nach der Induktion mit IPTG in einer Endkonzentration von 1.0 mM erfolgte die Inkubation bei 30 °C, 260 rpm für 2 h. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 6500 x g, 4 °C wurde das Zellpellet resuspendiert und wie unter 3.2.6.2.1 beschrieben im GST-pulldown-Experiment eingesetzt.

3.2.4.4 ZELLULÄRE LOKALISIERUNG DER PROTEINEXPRESSION

Bevor die bakteriell exprimierten Proteine gereinigt und in weiteren Experimenten eingesetzt werden konnten, mußte geprüft werden, in welchem Ausmaß sie zytoplasmatisch gelöst oder ungelöst (als sogenannte Inclusion Bodies) vorlagen, um die anschließende Proteinreinigung darauf abzustimmen. Hierzu wurden die Zellen induziert (3.2.4.1), und nach der Induktionsphase wurden 40 mL der Kultur bei 6500 x g, 4 °C, pelletiert. Das Pellet wurde in 4 mL Resuspensionspuffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.5) resuspendiert und wie bei den Proteinreinigungen unter 3.2.5 beschrieben lysiert und sonifiziert. Von dem Bakterienlysat wurden 1.5 mL entnommen und 10 min bei 14000 x g, 4 °C, zentrifugiert. Von der löslichen zytoplasmatischen Fraktion (soluble cytoplasmic fraction oder SCF) wurde eine Probe entnommen. Das Pellet (insoluble cytoplasmic fraction oder ICF) wurde 2x in je 750 µL Resuspensionspuffer gewaschen. Die Inclusion Bodies wurden dann mit 1.5 mL 1 % SDS denaturiert. Eine Probe dieser Fraktion wurde zusammen mit der SCF-Probe in der SDS-PAGE (3.2.3.2) eingesetzt und ausgewertet.

3.2.5 PROTEINREINIGUNG

Im nachfolgenden sind die Reinigungen einzelner Proteine beschrieben, die über unterschiedliche Verfahren erfolgten. Bevor die gereinigten Proteine dann in den

jeweiligen Versuchen eingesetzt wurden, wurde deren Identität mit entsprechenden Antikörpern durch Western-Blot-Analysen (3.2.3.3) verifiziert.

3.2.5.1 Ni²⁺-NTA-SÄULE (HIS-TAG-REINIGUNG)

3.2.5.1.1 REINIGUNG VON Psq221, Psq1064, Psq651, Psq331, Psq166, Psq942 UND PSQ528 UNTER NATIVEN BEDINGUNGEN

Die induzierten Zellen (3.2.4.1) wurden 15 min auf Eis aufgetaut, das Zellpellet wurde in 2 mL 1x Bindungspuffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.9; 5 mM Imidazol; 0.5 mM NaCl) und 2 mL 1x Waschpuffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.9; 60 mM Imidazol; 0.5 mM NaCl) resuspendiert und 30 min auf Eis durch Zugabe von Lysozym (Endkonzentration 1 mg/mL) lysiert. Nach Sonifizieren des Zellextraktes (6x 10 sec bei 270 W) wurde das Lysat 20 min bei 39000 x g, 4 °C, zentrifugiert. Alle weiteren Reinigungsschritte wurden bei 4 °C durchgeführt. Der Überstand wurde auf eine Ni²⁺-NTA-Säule (mit einem 0.5 mL Säulenmatrixvolumen; His-Bind Resin von Novagen) geladen, die zuvor durch Waschen mit 1.5 mL H₂O, 2.5 mL Ladungspuffer (50 mM NiSO₄) und 1.5 mL Bindungspuffer vorbereitet wurde. Nichtbindende Proteine wurden durch nachfolgende Waschschrte mit 5 mL Bindungspuffer, 3 mL Waschpuffer und 3 mL Waschpuffer III (20 mM Tris-HCl, pH 7.9; 100 mM Imidazol; 0.5 mM NaCl) eliminiert. Die Elution der His-tag-Fusionsproteine erfolgte durch 3x 500 µL Elutionspuffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.9; 1000 mM Imidazol; 0.5 mM NaCl). Die Säule wurde anschließend mit 3 mL 1x Strippuffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.9; 100 mM EDTA; 0.5 mM NaCl) gewaschen, somit regeneriert und im gleichen Puffer bei 4 °C gelagert.

Die einzelnen Reinigungsschritte wurden durch Probenentnahme und Analyse mittels SDS-PAGE (wie unter 3.2.3.2 beschreiben) verfolgt.

3.2.5.1.2 REINIGUNG VON Pfk UNTER DENATURIERENDEN BEDINGUNGEN UND VORBEREITUNG FÜR DIE ANTIKÖRPERPRODUKTION

Die Reinigung von Pfk unter denaturierenden Bedingungen erfolgte bis zum Zentrifugationsschritt, bei dem lösliches von unlöslichem Material getrennt wird, wie unter 3.2.5.1.1 beschrieben; die Zentrifugation wurde jedoch bei nur 16000 x g, 4 °C, durchgeführt. Danach wurde der Überstand verworfen, das Pellet erneut in 20 mL 1x Bindungspuffer resuspendiert und bei 16000 x g, 4 °C, abzentrifugiert. Die im Pellet enthaltenen Inclusion Bodies wurden durch Zugabe von 20 mL 1x Bindungspuffer* (1x Bindungspuffer mit 6M Harnstoff) und 1 h Inkubation auf Eis denaturiert und so in Lösung gebracht. Nach Zentrifugation bei 16000 x g wurde der Überstand auf eine entsprechend vorbereitete Säule gegeben. Die Säulenchromatographie erfolgte dann wie unter 3.2.5.1.1 beschrieben, jedoch wurden alle verwendeten Puffer mit 6 M

Harnstoff supplementiert, und anstelle von Waschpuffer III wurde vor der Elution mit Waschpuffer IV (20 mM Tris-HCl, pH 7.9; 60 mM Imidazol; 0.5 mM NaCl) gewaschen. Diese im Vergleich zur nativen Proteinreinigung niedrigere Imidazolkonzentration ist notwendig, da denaturierte His-tag-Proteine bereits bei geringeren Imidazolkonzentrationen partiell eluieren. Die einzelnen Reinigungsschritte wurden durch Probenentnahme und Analyse mittels SDS-PAGE (wie unter 3.2.3.2 beschreiben) verfolgt.

Für die Antikörperproduktion wurden 840 μ g gereinigtes Pfk-Protein mit 2x Probenpuffer versehen und mittels SDS-PAGE (3.2.3.2) in einem Gel mit 10 % Polyacrylamidanteil aufgetrennt. Die Proteinbande wurde angefärbt (3.2.3.2.2), ausgeschnitten und an Eurogentec verschickt. Damit erfolgte die Antikörperproduktion mit zwei unabhängigen Kaninchen.

3.2.5.2 REINIGUNG VON GAF519 ÜBER HEPARIN-SEPHAROSE

Die wie unter 3.2.4.2 beschriebenen induzierten Zellen wurden auf Eis aufgetaut und in 20 mL HEMGN-0.125 (0.125 mM KCl; 25 mM HEPES-KOH, pH7.6; 0.1 mM EDTA, pH8.0; 12.5 mM $MgCl_2$; 10 % Glycerol; 0.1 % NP-40; 1 mM DTT; 0.1 mM PMSF; 0.1 mM Na-meta-bisulfite) resuspendiert. Die Zellen wurden durch Zugabe von Lysozym (Endkonzentration 1 mg/mL) 30 min auf Eis lysiert. Nach dem Sonifizieren (6x 10 sec bei 270 W) wurde das Lysat 20 min bei 39000 x g, 4 °C, zentrifugiert. Alle weiteren Reinigungsschritte wurden bei 4 °C durchgeführt. Der Überstand wurde dann auf eine mit 50 mL HEMGN-0.125 äquilibrierte Heparin-Sepharose-Säule (HiTrap Heparin Affinity Column; 5 mL Säulenmatrixvolumen; Amersham Pharmacia Biotech) gegeben (Flußrate 2 mL/min). Die Säule wurde mit 50 mL HEMGN-0.125 gewaschen. Die Elution erfolgte in 10 Schritten mit je 2 mL HEMGN-0.4 (wie HEMGN-0.125, jedoch 0.4 mM KCl). Die Säule wurde anschließend mit 10 mL HEMGN-1.0 (wie HEMGN-0.125, jedoch 1.0 mM KCl) gereinigt und nach Zugabe von 20 % EtOH bei 4 °C gelagert. Die einzelnen Reinigungsschritte wurden durch Probenentnahme und Analyse mittels SDS-PAGE (wie unter 3.2.3.2 beschreiben) verfolgt. So wurde auch die Fraktion der GAF519-Elution bestimmt.

3.2.5.3 AFFINITÄTSREINIGUNG VON ANTIKÖRPERN

Vor ihrer Verwendung wurden die Anti-GAF-Antikörper (3.1.1.1) wie folgt affinitätsgereinigt. Zunächst wurden 100 μ g gereinigtes GAF-Protein (3.2.5.2) an 2 cm^2 Nitrozellulosemembran (Protran BA85, Schleicher & Schuell) gebunden. Dies erfolgte durch 2 h leichtes Schütteln bei RT in 1 mL Transferpuffer (192 mM Glycin; 20 % Methanol; 25 mM Trisbase). Der Überstand wurde abgenommen, verworfen und

der Blot 2x mit 3 mL Transferpuffer gewaschen (GAF-Blot). Auf gleiche Weise wurde ein Blot mit Maltose Binding Protein (MBP2*; New England, BioLabs) hergestellt (MBP-Blot). Letzterem wurden 50 μ L des Anti-GAF-Serums und 950 μ L Puffer I (50 mM Trisbase; 150 mM NaCl; 5 mM EDTA; 0.25 % BSA; 0.05 % NP-40) zugegeben und 3 h bei RT inkubiert. Der MBP-Blot wurde dann entfernt und das so um Anti-MBP-Antikörper depletierte Serum für die weitere Affinitätsreinigung eingesetzt.

Der GAF-Blot wurde dann mit 4 mL Puffer I für 1 h inkubiert, 5 min in Puffer I' (50 mM Trisbase; 150 mM NaCl; 5 mM EDTA) gewaschen und dann exakt 2 min durch Zugabe von 1 mL Glycin-Puffer (200 mM Glycin-HCl, pH2.8) denaturiert. Der Überstand wurde abgenommen und der Denaturierungsschritt erneut mit 1 mL Glycin-Puffer für 2 min wiederholt. Der Blot wurde dann mit 5 mL PBS (130 mM NaCl; 7 mM Na₂HPO₄; 3 mM NaH₂PO₄) gewaschen und 1 h mit 3 mL Puffer I inkubiert. Zu diesem Blot wurde dann das Serum gegeben, das zuvor mit dem MBP-Blot behandelt worden war. Die Antigen-Antikörper-Reaktion erfolgte ÜN bei 4 °C.

Am Folgetag wurde das Serum mit den nicht-gebundenen Antikörpern entfernt, der Blot 20 min in 3 mL Puffer I, dann 20 min in Puffer I' gewaschen, und durch Zugabe von 550 μ L Glycinpuffer wurden die affinitätsgereinigten Anti-GAF-Antikörper eluiert. Der pH-Wert wurde sofort durch Zugabe von 1 N NaOH neutralisiert, mit 50 μ L 10x PBS (1300 mM NaCl; 70 mM Na₂HPO₄; 30 mM NaH₂PO₄) gepuffert und mit BSA (Endkonzentration 0.1 %) stabilisiert.

3.2.6 ANALYSE VON PROTEIN-PROTEIN-BINDUNGEN

3.2.6.1 IN-VITRO-IMMUNPRÄZIPITATION

Die Koimmunpräzipitationsreaktion wurde im wesentlichen wie bei Bardwell und Treisman [1994] beschrieben durchgeführt. Die Reaktion enthielt 100 μ L Speicheldrüsenkernextrakt (Herstellung siehe 3.2.3.1), 50 μ L Anti-Psq-Antiserum und 350 μ L RIPA-Puffer (modifiziert: 20 mM Tris-HCl, pH 8.0; 100 mM NaCl; 0.5 % Deoxycholat; 0.5 % NP-40; 0.05 % SDS; 10 % Glycerol; 10 mM EGTA; 0.1 mM PMSF; 5 mM MgCl₂). Nach einer Inkubation von 2 h bei 4 °C unter leichter Bewegung wurden 100 μ L Protein-A-Sepharose (#CL4B; Pharmacia; 1:1 in RIPA-Puffer) zugegeben und weitere 2 h inkubiert. Protein-A-Sepharose-Komplexe wurden kurz bei 10000 x g in einer Eppendorf Tischzentrifuge pelletiert und 4x mit 1000 μ L RIPA-Puffer gewaschen. Die Protein-A-Sepharose-Antigen-Antikörper-Komplexe wurden dann in 50 μ L 2x Probenpuffer gekocht und so zur weiteren Analyse in SDS-PAGE (3.2.3.2) und Western Blot (3.2.3.3) eingesetzt. Eine Negativkontrolle erfolgte auf gleiche Weise, jedoch wurden die Antikörper weggelassen.

3.2.6.2 GST-PULLDOWN

3.2.6.2.1 GST-PULLDOWN-BINDUNGSTEST

GST-GAF116 wurde wie unter 3.2.4.3 beschrieben exprimiert. Die induzierten, pelletierten Zellen wurden in GST-Bindungspuffer ohne Glycerol und NP-40 (20 mM Tris-HCl, pH 7.9; 125 mM NaCl; 5 mM MgCl₂; 0.1 mM PMSF; 0.5 mM DTT) resuspendiert. Durch Zugabe von Lysozym (Endkonzentration 1 mg/mL) wurden die Zellen 30 min auf Eis lysiert. Nach dem Sonifizieren (6x 10 sec bei 270 W) wurde das Lysat 20 min bei 39000 x g, 4 °C, zentrifugiert. Vor dem Zentrifugationsschritt wurden noch Glycerol (Endkonzentration 10 %) und NP-40 (Endkonzentration 0.1 %) zugegeben. Pro Ansatz wurden 2000 µL des Lysats in ein 2 mL Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben. Die Bindung von GST-GAF116 erfolgte durch 10 min Inkubation bei RT nach Zugabe von 100 µL 50 % Glutathione Sepharose 4B (Pharmacia). Nach kurzem Zentrifugieren in einer Eppendorf Tischzentrifuge wurden die Matrix und die gebundenen Proteine mit GST-Bindungspuffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.9; 125 mM NaCl; 5 mM MgCl₂; 10 % Glycerol; 0.1 % NP-40; 0.1 mM PMSF; 0.5 mM DTT) gewaschen. Nach Zugabe von 500 µL eines E. coli-Extrakts (als komplexer Proteinbindungskompetitor; Herstellung siehe 3.2.6.2.2) wurde zu jedem Ansatz gereinigtes Psq-Fragment zugegeben (Reinigung unter 3.2.5.1 beschrieben) und 1 h bei 4 °C unter leichtem Schütteln inkubiert. Nichtgebundenes Material wurde 3x mit 1 mL GST-Bindungspuffer gewaschen. Die Elution erfolgte mit 60 µL GST-Elutionspuffer (50 mM Tris-HCl, pH8.0; 5 mM Glutathione, reduziert). Eluate wurden dann in 2x Probenpuffer gekocht und so zur weiteren Analyse in SDS-PAGE (3.2.3.2) und Western Blot (3.2.3.3) verwendet. Anstelle von GST-GAF116 wurde als Negativkontrolle gereinigtes unfusioniertes GST-Protein auf gleiche Weise verwendet.

3.2.6.2.2 HERSTELLUNG EINES E. coli-EXTRAKTS (ALS KOMPLEXER PROTEINBINDUNGSKOMPETITOR)

Eine ÜN-Kultur von BL21(DE3) in 500 mL LB-Medium wurde pelletiert, mit 100 mL GST-Bindungspuffer gewaschen und in 5 mL GST-Bindungspuffer ohne Glycerol und NP-40 resuspendiert. Nach Sonifizieren (3x 1 min bei 270 W) wurde das Lysat 30 min bei 39000 g, 4 °C, zentrifugiert. Dem klaren Überstand wurden Glycerol (Endkonzentration 10 %) und NP-40 (Endkonzentration 0.1 %) zugegeben. Aliquote dieses Extraktes wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

3.2.6.3 BINDUNGSTEST AN Ni²⁺-NTA-SÄULE

Um die Bindungsfähigkeit von Psq mit voller Länge bzw. verkürzter Fragmente an GAF519 zu testen, wurde Psq in *E. coli* exprimiert (3.2.4.1). Das aufgetaute Zellpellet wurde in je 2 mL Bindungspuffer und Waschpuffer (Pufferzusammensetzungen siehe 3.2.5.1) resuspendiert. Das Lysat wurde wie unter 3.2.5.1 beschrieben hergestellt und nach Zentrifugation auf eine äquilibrierte Ni²⁺-NTA-Säule (mit einem 0.5 mL Säulenmatrixvolumen) gegeben. Alle Schritte des Bindungstests wurden bei 4 °C durchgeführt. Um alle Proteine ohne His-tag zu eliminieren, wurde die Säule mit 5 mL Bindungspuffer, 3 mL Waschpuffer und 3 mL Waschpuffer III gewaschen. Durch Waschen der Säule mit Bindetest-Bindungspuffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.9; 100 mM Imidazol; 125 mM NaCl; 5 mM MgCl₂; 10 % Glycerol) wurde ein Pufferwechsel vollzogen, um geeignete Bindungsbedingungen zu schaffen. Dann wurde gereinigtes rekombinantes GAF519 (Reinigung unter 3.2.5.2 beschrieben) auf die Säule gegeben, nachdem es 2x mit je 500 mL HEMGN0.4-Dialyse-Puffer (25 mM HEPES-KOH, pH 7.6; 0.4 M KCl; 12 mM MgCl₂ 2xH₂O; 10 % Glycerol; 0.1 % NP-40; 0.1 mM PMSF) bei 4 °C dialysiert worden war, um DTT und EDTA (beide Substanzen sind nicht mit Ni²⁺-NTA-Säulen kompatibel) zu eliminieren. Die Säule wurde dann mit sechzigfachem Säulenvolumen Bindetest-Bindungspuffer gewaschen, bevor gebundene Proteine mit 1 M Imidazol im gleichen Puffer eluiert wurden. Eluate wurden dann in 2x Probenpuffer gekocht und so zur weiteren Analyse in SDS-PAGE (3.2.3.2) und Western Blot (3.2.3.3) verwendet. Eine Negativkontrolle wurde auf gleiche Weise durchgeführt, jedoch wurde kein His-tag-Psq an die Matrix gebunden.

3.2.7 IMMUNFLUORESCENZ-NACHWEIS AN LARVALEN UND ADULTEN GEWEBEN

Die Antikörperfärbungen wurden sowohl an Speicheldrüsen von Larven des dritten Larvenstadiums als auch an Ovarien adulter Tiere (jeweils Kochi R) nach Ito et al. [1995] durchgeführt. Die Präparation erfolgte in PBS (130 mM NaCl; 7 mM Na₂HPO₄; 3 mM NaH₂PO₄). Die Gewebe wurden in 1.5 mL Eppendorf-Gefäße überführt und 1 h bei RT in 4 % Formaldehyd (EM Grade, Polysciences Inc.) in PEM (0.1 M PIPES, pH 7.0; 2 mM EGTA; 1 mM MgSO₄) fixiert, 4x 15 min in PBT (PBS mit 0.3 % Triton X-100) gewaschen, 1 h in 5 % Ziegen-Normalserum in PBT präinkubiert und anschließend jeweils ÜN mit geeigneten primären (1:500-Verdünnung) bzw. sekundären Antikörpern (1:200-Verdünnung) inkubiert. Nach jeder Antikörperinkubation erfolgten vier Waschschriffe von etwa 15 min in PBT. Nach dem letzten Waschschriff wurden die Präparate auf einen Objektträger in 87 % Glycerol überführt.

Aufnahmen wurden mit einem Zeiss-Axioplan-Fluoreszenzmikroskop und einer Fluoreszenzkamera von Photometrics (Quantix) erstellt und mit dem Programm IPLab Spectrum (Signal Analytics) dokumentiert. Die weitere Bildbearbeitung erfolgte wie unter 3.2.10.3 beschrieben.

3.2.8 CHROMOSOMENFÄRBUNGEN

3.2.8.1 IN-SITU-IMMUNFÄRBUNG VON POLYTÄNEN CHROMOSOMEN

Durch Immunfluoreszenz-Färbung unter Verwendung von Anti-GAF-, Anti-Psq- bzw. Anti-Pfk-Antikörpern wurden chromosomale Bindungsstellen der jeweiligen Proteine lokalisiert. Die Färbungen wurden wie in Lehmann und Korge [1996] beschrieben durchgeführt.

Dabei wurden Speicheldrüsen von Kochi R-Larven des dritten Larvenstadiums in 1x Puffer A (10x Puffer A: 150 mM Tris-HCl, pH 7.4; 600 mM KCl; 150 mM NaCl; 5 mM Spermidin; 1.5 mM Spermin) präpariert und für 25 sec in Lösung B (0.1 mL 10x Puffer A; 0.1 mL 10 % Triton X-100; 0.8 mL H₂O) fixiert. Die Drüsen wurden kurz in Lösung C (0.1 mL 10x Puffer A; 0.1 mL 10 % Triton X-100; 0.1 mL 37 % Formaldehyd; 0.7 mL H₂O) gewaschen, in einem Tropfen Lösung C auf ein Deckglas aufgebracht und nach 3.5 min auf einen Objektträger überführt. Die Chromosomen wurden gespreitet und gequetscht. Das Präparat wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und das Deckglas entfernt. Nach einer Inkubation in absolutem Ethanol wurde das Präparat 2x 10 min in KP-Puffer (140 mM NaCl; 10 mM Kaliumphosphat, pH 7.4) gewaschen. Danach erfolgte die primäre Antikörperinkubation bei 4 °C, ÜN, in einer feuchten Kammer. Der Antikörper wurde dazu 1:200 in KP-Puffer verdünnt; bei einer Doppelfärbung wurden gleichzeitig beide Antikörper in dieser Verdünnung eingesetzt. Nach erneutem Waschen in KP-Puffer erfolgte die sekundäre Antikörperinkubation bei RT für 2 h in einer Verdünnung von 1:400. Das Präparat wurde für 10 min in KP-Puffer gewaschen, 3 min in Hoechst-Lösung (1 mg/mL bis-Benzimide Hoechst (#33258, Sigma B2833)), die 1:10000 in PBS (130 mM NaCl; 7 mM Na₂HPO₄; 3 mM NaH₂PO₄) verdünnt wurde, gefärbt und anschließend in 2 % Propylgallate, 87 % Glycerin eingedeckt.

Die Aufnahmen wurden entweder mit einem Zeiss-Axioplan-Fluoreszenzmikroskop und einer Fluoreszenzkamera von Photometrics (Quantix) oder mit dem konfokalem Mikroskop Leica CLSM 4D erstellt. Die Dokumentation erfolgte mit dem Programm IPLab Spectrum (Signal Analytics). Die weitere Bildbearbeitung erfolgte wie unter 3.2.10.3 beschrieben.

3.2.8.2 IN-SITU-IMMUNFÄRBUNG VON MITOTISCHEN CHROMOSOMEN

Die Immunfluoreszenz-Färbung wurde ausgehend von Protokoll 1.9, Methode 2, beschrieben in Pimpinelli et al. [2000], für den Nachweis von GAF und Psq an mitotischen Chromosomen modifiziert. Dazu wurden aus Kochi R larvale Gehirne in 0.7 % NaCl präpariert und 1.5 h bei 25 °C in einer Colchicin-Lösung (0.05 mM Colchicin in 0.7 % NaCl) inkubiert. Danach wurden die Gehirne 3 min in einer hypotonischen Lösung (0.5 % Na-Citrat 2xH₂O) aufgequollen und dann 6 min in Fixierlösung II (Methanol:Essigsäure:H₂O im Verhältnis 4:4:2) auf einem Deckglas fixiert und dabei mit einer Nadel mechanisch fragmentiert. Nach Aufnahmen des Präparates mit einem Objektträger wurde dieses gequetscht, in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend 5 min in PBS (130 mM NaCl; 7 mM Na₂HPO₄; 3 mM NaH₂PO₄), 10 min in PTX (1 % Triton X-100 in PBS) und 30 min in Blockierlösung (1 % Magermilchpulver in PBS) jeweils bei RT gewaschen. Der primäre Antikörper wurde 1:200 in Blockierlösung verdünnt und ÜN bei 4 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Bei Doppelfärbungen wurden beide Antikörper im gleichen Verdünnungsverhältnis simultan eingesetzt. Die Präparate wurden 3x 5 min in PBS gewaschen. Die sekundäre Antikörperinkubation erfolgte 1 h bei RT in einer feuchten Kammer, wobei die sekundären Antikörper in einem Verhältnis 1:200 in Blockierlösung eingesetzt wurden. Nach 3x Waschen der Präparate in PBS wurden diese 5 min in Hoechst-Lösung (bis-Benzimide Hoechst (#33258, Sigma B2833) 1:20000 in PBS verdünnt) gefärbt und anschließend in 2 % Propylgallate, 87 % Glycerin eingedeckt.

Die Aufnahmen wurden entweder mit einem Zeiss-Axioplan-Fluoreszenzmikroskop und einer Fluoreszenzkamera von Photometrics (Quantix) oder mit dem konfokalem Mikroskop Leica CLSM 4D erstellt. Die Dokumentation erfolgte mit dem Programm IPLab Spectrum (Signal Analytics). Die weitere Bildbearbeitung erfolgte wie unter 3.2.10.3 beschrieben.

3.2.9 ANALYSE GENETISCHER INTERAKTIONEN

Die Bezeichnungen der verwendeten Fliegenstämme und ihre Genotypen sind Tabelle 5 zu entnehmen. Abbildungen wurden mit einem Binokular (Leica WILD M10) und mit einer digitalen Farbkamera vom Typ ProgRes 3012 (Kontron Elektronik) gemacht. Die weitere Bildbearbeitung erfolgte wie unter 3.2.10.3 beschrieben.

3.2.9.1 UNTERSUCHUNG EINER MÖGLICHEN GENETISCHEN INTERAKTION ZWISCHEN psq UND Trl

Um eine mögliche direkte genetische Interaktion zwischen psq und Trl zu überprüfen, wurden Kreuzungen zwischen Fliegen des Genotyps $Trl^{R85}/TM3$, Ser [act-GFP] w^+ mit Fliegen der jeweiligen Genotypen w ; $Df(2R)psq^{lola\Delta18}/CyO$ [act-GFP] w^+ sowie w ; psq^{0115}/CyO [act-GFP] w^+ bzw. w ; psq^{RF13}/CyO [act-GFP] w^+ durchgeführt. Doppelt heterozygote Nachkommen wurden auf veränderte Phänotypen hin untersucht. Es wurde außerdem geprüft, ob diese möglicherweise steril sind und eine erhöhte Letalität aufweisen (3.2.9.1.1).

3.2.9.1.1 LETALITÄTSANALYSE UND STERILITÄTSTEST

Um eine mögliche erhöhte Letalität der doppelt heterozygoten $psq/+$; $Trl/+$ -Tiere zu ermitteln, wurde eine Letalitätsanalyse durchgeführt. Dazu wurden in eine Petrischale zwei weiße Filter und darüber ein schwarzes Filterpapier gelegt und durchfeuchtet. Darauf verteilte Hefepaste wurde jeweils mit etwa 100 Eiern aus den oben genannten Kreuzungen (3.2.9.1) besetzt. In jedem Stadium (erstes, zweites und drittes larvales Stadium, präpupales und pupales Stadium) wurde der Prozentsatz der noch vorhandenen doppelt heterozygoten, d.h. nicht-GFP-markierten Tiere ermittelt. Bei unveränderter Letalitätsrate wären jeweils 25 % doppelt heterozygote Tiere zu erwarten. Um eine mögliche veränderte Fertilität der doppelt heterozygoten $psq/+$; $Trl/+$ -Tiere zu ermitteln, wurden diese miteinander gekreuzt und überprüft, ob diese unverändert fertil sind.

3.2.9.2 UNTERSUCHUNG EINER MÖGLICHEN GENETISCHEN INTERAKTION ZWISCHEN psq UND Pc

Um die Interaktion zwischen psq und Pc zu überprüfen, wurden Kreuzungen zwischen Fliegen des Genotyps $Pc^3/TM3$, Ser [act-GFP] w^+ und w ; $Df(2R)psq^{lola\Delta18}/CyO$ [act-GFP] w^+ sowie w ; psq^{0115}/CyO [act-GFP] w^+ bzw. w ; psq^{RF13}/CyO [act-GFP] w^+ durchgeführt. Unter den männlichen Nachkommen wurden für jeden in Tabelle 9 angegebenen Genotyp die Anzahl der Geschlechtskämme pro Tier bestimmt. Daraus wurde die durchschnittliche Anzahl der Beine mit Geschlechtskämmen sowie die Penetranz dieser genetischen Interaktion ermittelt. Die Penetranz gibt den Prozentsatz der zweiten und dritten Beine an, bei denen ektopische Geschlechtskämme festzustellen waren.

3.2.9.3 UNTERSUCHUNG ZUR GENETISCHEN INTERAKTION ZWISCHEN psq UND Ubx

Um eine mögliche dominante genetische Interaktion zwischen psq und Ubx zu erkennen, wurden Fliegen der Genotypen Df(2R)psq^{lolaΔ18}/CyO [act-GFP] w⁺ und Ubx¹³⁰/Kg(v) red(1) Sb (Sbd-1) miteinander gekreuzt. Es wurde untersucht, ob die Nachkommen homöotische Transformationen wie zum Beispiel stark vergrößerte Halteren, Halterentransformationen zu Flügel oder Transformationen des Postnotums (postnotales zu notalem Gewebe) aufweisen. Diese Transformationen werden als „verstärkter Ubx-Phänotyp“ bezeichnet, denn es ist zu beachten, daß alle Fliegen, die eine Ubx-Mutation tragen, gegenüber Wildtypfliegen bereits leicht vergrößerte Halteren aufweisen. Deshalb wurde nur die Anzahl der festgestellten Transformationen des verstärkten Ubx-Phänotyps gewertet.

Um den Einfluß von psq auf die dominante genetische Interaktion zwischen Trl und Ubx [Farkas et al., 1994] zu analysieren, wurden zunächst Stämme der Genotypen psq^{F112}/CyO [act-GFP]; Trl^{R85}/TM3, Sb sowie Df(2R)psq^{lolaΔ18}/SM5; Trl^{R85}/TM6B, Tb und Df(2R)psq^{lolaΔ18}/CyO; Trl^{R85}/TM3, Ser etabliert (3.1.4.1). Weibchen dieser Stämme wurden dann mit Männchen der Stämme Ubx¹³⁰/Kg(v) red(1) Sb (Sbd-1) sowie Ubx¹³⁰/TM3, Sb bzw. mit Ubx¹³⁰/TM6B (Tb, Ubi-GFP) (Ubx¹³⁰(Tb)) gekreuzt. Nachkommen wurden für jeden der in Tabelle 10 angegebenen Genotypen auf homöotische Transformationen (stark vergrößerte Halteren, Transformationen des Postnotums oder Halterentransformationen zu Flügel) untersucht und ausgezählt. Zu beachten ist, daß Ubx¹³⁰-Tiere, die als Balancer-Chromosom TM3 tragen, also Ubx¹³⁰-/TM3, Ser bzw. Ubx¹³⁰-/TM3, Sb sind, zu 100 % homöotische Halterentransformationen zu Flügelgewebe aufweisen und somit nicht zur Auswertung herangezogen werden konnten.

3.2.9.4 UNTERSUCHUNG DES EINFLUSSES VON psq AUF DIE PEV

Um einen möglichen Effekt der psq-Allele psq^{lolaΔ18} und psq⁰¹¹⁵ auf die PEV zu untersuchen, wurden vier verschiedene Kreuzungsansätze durchgeführt. Diese sind im folgenden mit Kreuzungen (A) und (B) bzw. Kreuzungen (C) und (D) gekennzeichnet.

Kreuzungen (A) (für psq^{lolaΔ18}) und (B) (für psq⁰¹¹⁵) führen 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^{lolaΔ18}) und (D) (für psq⁰¹¹⁵) verfolgten das Ziel, schließlich Tiere mit identischem genetischem Hintergrund der

Genotypen $w^{m4h}/Y; +/+; +/+$ und $w^{m4h}/Y; psq/+; +/+$ vergleichen zu können. Diese unterscheiden sich genetisch ausschließlich durch das Vorkommen oder Fehlen eines psq -Allels.

Bei den Kreuzungen (A) und (B) wurden zunächst die CyO [act-GFP] w^+ -Balancer-Chromosomen der Stämme $psq^{lola\Delta18}$ und psq^{0115} durch CyO -Balancer-Chromosomen, denen das w^+ -Allel fehlt, ersetzt (3.1.4.1) und die Stämme $psq^{lola\Delta18}/CyO$ und psq^{0115}/CyO etabliert (Genotypen der Stämme in Tabelle 5). Männchen dieser Stämme ($w/Y; psq/CyO; +/+$) wurden dann mit $ln(1)w^{m4h}$ -Weibchen ($w^{m4h}/w^{m4h}; +/+$) gekreuzt. $w^{m4h}/Y; +/CyO$ -Nachkommen wurden dann mit $w/w; psq/CyO$ -Weibchen des entsprechenden psq -Stammes rückgekreuzt. Aus dieser Kreuzung erhielt man dann Tiere mit einem CyO -Phänotyp des Genotyps $w^{m4h}/w; +/CyO$ - und $w^{m4h}/w; psq/CyO$. Diese ließen sich zwar nicht direkt unterscheiden, aber durch einen Vergleich mit $w^{m4h}/w; +/CyO$ -Fliegen aus der vorangegangenen Kreuzung (die uniform eine sehr dunkle rote Augenfarbe aufwiesen) konnten diese Weibchen in zwei Farbklassen sortiert werden. Etwa die Hälfte der Tiere hatte uniform dunkelrote Augen ($w^{m4h}/w; +/CyO$), die andere Hälfte verfügte über einen eindeutig helleren, gescheckten Augenphänotyp ($w^{m4h}/w; psq/CyO$).

Bei den Kreuzungen (C) und (D) wurden zunächst $w^{m4h}/w^{m4h}; Trl^{13C}/TM6, Tb$ -Weibchen mit Männchen der psq -Stämme $psq^{lola\Delta18}$ bzw. psq^{0115} gekreuzt. Unter den Nachkommen wurden dann Tiere des Phänotyps Tb/CyO ($w^{m4h}/w^{m4h}; +/CyO$ [act-GFP] $w^+; +/TM6, Tb$ bzw. $w^{m4h}/Y; +/CyO$ [act-GFP] $w^+; +/TM6, Tb$) selektiert und untereinander gekreuzt. Unter den Nachkommen aus dieser Kreuzung wurden die nicht- CyO /nicht- Tb -Tiere selektiert, die zudem w^{m4h}/w^{m4h} bzw. w^{m4h}/Y waren. So erhielt man für den jeweiligen psq -Stamm einen $w^{m4h}; +/+; +/+$ -Stamm. Weibchen aus diesem Stamm wurden dann schließlich mit $w/Y; psq/CyO$ [act-GFP] $w^+; +/+$ gekreuzt. Nicht- CyO -Tiere ($w^{m4h}/Y; psq/+; +/+$) daraus konnten dann mit $w^{m4h}/Y; +/+; +/+$ -Tieren mit sonst identischem genetischen Hintergrund aus der vorangegangenen Kreuzung verglichen werden.

3.2.9.4.1 MESSUNG DER AUGENPIGMENTE ZUR QUANTIFIZIERUNG DER PEV-EFFEKTE

Der PEV-Effekt kann quantitativ durch Messung des Pteridin-/Ommochromgehaltes der Augen beurteilt werden. Dazu wurde eine nach Evans und Howells [1978] modifizierte Methode verwendet. Die Fliegen wurden mit Äther betäubt und in einem Eppendorf-Gefäß in flüssigem Stickstoff gefroren. Durch Schütteln wurden die Köpfe von den Körpern getrennt. Fünf Köpfe pro Messung wurden in 50 μ L 0.1 % Ammoniaklösung und 50 μ L Chloroform mit einem Pistill homogenisiert und das Homogenat wurde mit jeweils 550 μ L 0.1 % Ammoniak und Chloroform verdünnt.

Nach einer Extraktionsphase von einer Stunde wurden die Zelltrümmer in einer Minizentrifuge bei 9000 x g 2 min abzentrifugiert. 500 μ L des wäßrigen Überstandes wurden photometrisch bei einer Wellenlänge von 485 nm gegen 0.1 % Ammoniak als Referenz gemessen.

3.2.10 BIOINFORMATIK UND VERWENDETE COMPUTERPROGRAMME

3.2.10.1 DATENBANKEN

Sämtliche Datenbankanalysen, die zur Identifizierung des *piefke*-Gens [p_{fk}, CG15812, Schwendemann et al., 2001] und entsprechender EST-Sequenzen (Tabelle 8) sowie zur Aufklärung der genomischen Struktur des *piefke*-Gens führten, wurden im wesentlichen von Th. Siegmund durchgeführt und sind in [Siegmund and Lehmann, 2002] näher beschrieben.

Für diese Arbeit wurden *Drosophila*-Sequenzdaten verwendet, auf die über FlyBase [FlyBase, 2002, <http://fly.ebi.ac.uk:7081/>] und die Datenbank GenBank [Benson et al., 2002, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>] zugegriffen wurde. Dabei wurden die Sequenzen des *Drosophila*-Genoms [Adams et al., 2000] und die Daten des BDGP EST-Projekts [Rubin et al., 2000, <http://www.fruitfly.org>] verwendet. Daraus wurde insbesondere das genomische Segment AC006489 und die ESTs des Clusters Clot 2017 genutzt. Die diesem Clot zugeordneten cDNAs von CG15812 [entspricht *piefke* in Schwendemann et al., 2001, siehe 5.2] sind in Tabelle 8 aufgelistet.

Tabelle 8: Liste der 12 EST-Sequenzen von Clot 2017. Für die cDNA-Herstellung wurde als mRNA-Quelle Embryos (für LD), Larven und Puppen (für LP) und Zellkultur-Schneider-Zellen (SD) eingesetzt. Die komplette cDNA LD08856 (in der Tabelle hervorgehoben; entspricht Plasmid pBluescriptSK(+/-)-LD08856 in Tabelle 3) wurde in dieser Arbeit sequenziert (Sequenz in Abb. 17) und darauf basierend für die folgenden Experimente verwendet.

EST	GenBankAccession-#	EST	GenBankAccession-#
SD04266.5prime	AI532678	LD14503.5prime	AA439827
LP09176.5prime	AI295517	LD20557.5prime	AA540755
LD08856.5prime	AA390797	LD22127.5prime	AA978835
LD10943.5prime	AA392009	LD31577.5prime	AA951224
LD12813.5prime	AA392431	LD34387.5prime	AA979674
LD14310.5prime	AA439678	LD38539.5prime	AAAI519119

Für die Suche nach homologen DNA- und Proteinsequenzen im *Drosophila*-Genom wurde WU-BLAST (Version 2.0) [Gish, 1996-2002, <http://blast.wustl.edu/>] verwendet. Für die Suche nach homologen Proteinsequenzen in GenBank wurde BLASTP (Version 2.2.2) [Altschul et al., 1997, <http://ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>] verwendet. Zudem wurden die Proteinsequenzdatenbanken Swiss-Prot (Release

40.14) und TrEMBL (Release 20.0) genutzt [Bairoch and Apweiler, 2000, <http://ca.expasy.org/sprot>]. Auch wurden die Daten der Signaturdatenbank Pfam (Release 7.0) [Bateman et al., 2002, <http://sanger.ac.uk/Software/Pfam>] verwendet.

3.2.10.2 SEQUENZANALYSE UND -ALIGNMENT

Die Analyse von DNA- und Protein-Sequenzen erfolgte mit dem Programmpaket MacMolly Tetra (Version 3.6, Soft Gene GmbH, Berlin). Die Genvorhersage in einem genomischen Segment wurde mit GeneMark.hmm [Lukashin and Borodovsky, 1998, <http://opal.biology.gatech.edu./GeneMark>] durchgeführt.

Das multiple Alignment von Proteinsequenzen erfolgte mit CLUSTALX (Version 1.63b, National Center for Biotechnology Information). Identitäten und Ähnlichkeiten von bestimmten Abschnitten der Proteinsequenzen wurden mit EMBOSS [Version 2.3.1, Rice et al., 2000] bestimmt.

3.2.10.3 BILDERSTELLUNG UND -BEARBEITUNG

SDS-Gele und Western Blots wurden gescannt und anschließend wie mikroskopische Abbildungen mit Photoshop (Version 5.0.2, Adobe) bearbeitet. Diagramme wurden mit Excel98 (Microsoft) erstellt. Die Nachbearbeitung der graphischen Darstellungen erfolgte mit Canvas (Version 6.0, Daneba Systems).