
5 DISKUSSION

5.1 PIPSQUEAK UND GAGA-FAKTOR

Erstmalig wurden von Horowitz and Berg [1996] die Domänenstruktur der Proteine Psq und GAF verglichen, denn beide Proteine enthalten eine BTB-Domäne. BTB-Domänen vermitteln Protein-Protein-Interaktionen, und die Mehrzahl der Proteine mit einer solchen Domäne sind entweder Zinkfingerproteine oder zumindest im Zellkern lokalisierte Proteine [Bardwell and Treisman, 1994]. Psq ist das erste näher charakterisierte im Kern lokalisierte BTB-Domänen-Protein ohne Zinkfinger [Weber et al., 1995; Horowitz and Berg, 1996]. Da Psq im Kern lokalisiert ist wurde vermutet, daß Psq ein genregulatorisches Protein ist, das durch Modifikation der Chromatinstruktur wirkt [Horowitz and Berg, 1996]. Diese Vermutung wurde durch die Beobachtung begründet, daß Psq in Nährzellen mit dem Chromatin assoziiert ist [Horowitz and Berg, 1996]. Zudem spricht dafür, daß die normale Dekondensierung des Chromatins von Nährzellen in psq-Mutanten gestört ist [Siegel et al., 1993]. Auch wurde angenommen, daß Psq nicht nur während der Oogenese, sondern auch in anderen Geweben eine übergeordnete regulatorische Rolle bei der Genexpression spielt, indem es die Chromatinstruktur beeinflusst. Eine solche Rolle kommt auch zwei weiteren BTB-Proteinen, E(var)3-93D und GAF [Croston et al., 1991; Dorn et al., 1993a], zu. Psq könnte über eine Interaktion mit BTB-Domänen anderer Proteine an der Modulierung der Chromatinstruktur beteiligt sein und so die pleiotropen Wirkungen des psq-Gens erklären [Weber et al., 1995; Horowitz and Berg, 1996]. Für derartige Wechselwirkungen gab es allerdings keine experimentellen Beweise.

In der vorliegenden Arbeit konnte die Kernlokalisierung von Psq bestätigt werden (Abb. 5). Besonders deutlich ist an den In-situ-Antikörperfärbungen von intakten Speicheldrüsenzellkernen zu erkennen, daß Psq tatsächlich chromatinassoziiert vorliegt (Abb. 5D). An konfokalmikroskopischen Aufnahmen lassen sich bereits distinkte Einzelbanden in den Zellkernen ausmachen. Daß Psq eine Chromatinkomponente ist, wird besonders durch die Antikörperfärbung polytärer Chromosomen in Abbildung 6 deutlich.

Die Entdeckung, daß Psq über eine neue DNA-Bindungsdomäne verfügt und mit dieser Domäne, der Psq-Domäne, direkt an DNA-Sequenzen bindet, die auch von GAF erkannt werden, legte die Vermutung nahe, daß eine funktionelle Beziehung zwischen Psq und GAF besteht [Lehmann et al., 1998]. Mit dieser Entdeckung stellte sich die Frage, ob Psq und GAF nicht nur eine ähnliche DNA-Bindungsspezifität gemein ist, sondern ob sie auch ähnliche oder möglicherweise antagonistische

Funktionen haben. Durch zytogenetische, genetische und biochemische Untersuchungen sollte geprüft werden, ob ein funktioneller Zusammenhang zwischen beiden Proteinen besteht.

5.1.1 CHROMOSOMALE BINDUNG VON Psq UND GAF

Psq bindet nicht nur *in vitro* direkt an DNA-Sequenzen, die GAF ebenfalls erkennt. Psq und GAF sind an polytänen Chromosomen kolokalisiert. Dieses Ergebnis (Abb. 7) ist durchaus überraschend, da gezeigt wurde, daß Psq und GAF zwar eine ähnliche DNA-Bindungsspezifität haben, jedoch unterschiedliche Anforderungen an ihre DNA-Bindungsorte stellen. So ist für eine Bindung von Psq ein etwa doppelt so langes Oligonukleotid notwendig wie für die Bindung von GAF [Lehmann et al., 1998]. Die meisten bisher identifizierten GAF-Bindestellen sind etwa 200 bp stromaufwärts des Transkriptionsstarts der jeweiligen Gene lokalisiert. Da sich diese GAGA-Bindungssequenzen sehr stark in Länge und Sequenz unterscheiden [Granok et al., 1995], wäre zu erwarten gewesen, daß Psq und GAF lediglich eine gemeinsame Schnittmenge von Zielsequenzen erkennen. Dennoch binden beide Proteine an polytänen Chromosomen ausnahmslos an identische Loci. Deshalb wird angenommen, daß entsprechende Promotorregionen multiple Bindestellen sowohl für GAF als auch für Psq haben. Diese Annahme stützt auch die Hypothese, daß mehrere GAF-Moleküle (und jetzt auch Psq-Moleküle) an multiple Bindestellen binden müssen, um ihre Wirkung, nukleosomale Strukturen aufzulösen, zu entfalten [Tsukiyama et al., 1994; Read and Driscoll, 1997]. Es wäre allerdings auch denkbar, daß ein präformierter Psq/GAF-Komplex einzelne Bindestellen erkennt, d.h. daß beide Proteine also nicht unabhängig binden. Wenn Psq und GAF in einem definierten Komplex binden, sollten sie in einem stöchiometrischen Verhältnis vorliegen. Dagegen spricht allerdings die Beobachtung, daß unterschiedlich starke Signale von Psq und GAF an den einzelnen Banden detektiert wurden (Abb. 7). Dies könnte damit erklärt werden, daß Psq und GAF nicht immer in einem stöchiometrischen Verhältnis 1:1 vorkommen, vielmehr dominiert mal das eine, mal das andere Protein. Ob Psq und GAF unabhängig oder in einem präformierten Komplex an DNA binden, wird unter Einbeziehung weiterer Ergebnisse unter 5.1.2 und 5.1.3 weiter diskutiert.

Die Ergebnisse der Doppelfärbung weisen darauf hin, daß beide Proteine gleiche Zielgene besitzen. Einige dieser Gene sind für GAF bereits bekannt [zusammengefaßt in Soeller et al., 1993; Becker, 1995; Granok et al., 1995]. Naheliegender ist, daß diese ebenfalls Zielgene von Psq sind. Der experimentelle Beweis hierfür steht allerdings noch aus.

Psq ist aber nicht nur an euchromatischen Loci polytärer Chromosomen, sondern außerdem an heterochromatischen Regionen vollständig kondensierter mitotischer Chromosomen zu finden (Abb. 10). Andererseits sind weder Psq noch GAF im heterochromatischen Chromozentrum von polytären Chromosomen detektierbar [Abb. 6 und Abb. 7, sowie Raff et al., 1994; Granok et al., 1995]. Demgegenüber steht eine prominente Bindung von Psq an heterochromatische Regionen mitotischer Chromosomen, die auch für GAF beobachtet wurde [Raff et al., 1994; Granok et al., 1995]. Diese Diskrepanz läßt sich zum einen durch die selektive Amplifikation von Euchromatin bei der Polytänisierung erklären, bei der einfache Sequenzwiederholungen (also auch die GA-reichen hochrepetitiven Sequenzen des Heterochromatins, an die GAF bindet) unterrepliziert bleiben [Granok et al., 1995]. Auch könnte es sein, daß GAF und somit Psq aktiv vom Chromozentrum polytärer Chromosomen ausgeschlossen werden [Raff et al., 1994]. Eine dritte Erklärungsmöglichkeit wäre, daß Psq nur während der Mitose an niederaffine AG-reiche Repeats der Satelliten-DNA bindet. Während Psq an dekondensierten Chromosomen an hochaffinen Bindestellen des Euchromatins lokalisiert ist, könnte eine Umverteilung von Psq durch die Kondensierung der Chromosomen bei der Mitose ausgelöst werden. Ein derartiger Mechanismus könnte die Bindung von Psq an niederaffine Satelliten-DNA mitotischer Chromosomen erklären. Experimentelle Daten lassen vermuten, daß GAF einem derartigen Mechanismus unterliegt. Dabei wurde eine heterochromatische AG-reiche Satelliten-DNA verwendet, die im distalen Bereich eines Chromosoms inseriert wurde. So konnte gezeigt werden, daß GAF während der Metaphase an diese Sequenz bindet, in der Interphase polytärer Chromosomen jedoch nicht detektiert werden kann [Platero et al., 1998].

Der Befund, daß Psq auch an Heterochromatin bindet, stützt die Hypothese, daß Psq eine eher generelle, übergeordnete Rolle bei der Genregulation spielt. Psq könnte also modulatorisch auf die Chromatinstruktur wirken. Nicht nur die heterochromatische Lokalisierung von Psq an mitotischen Chromosomen spricht dafür, sondern auch der Einfluß von psq-Mutationen auf die PEV (4.1.7.3 und 5.1.4.3). Es wurde bereits gezeigt, daß die normale Dekondensierung von Nährzell-Chromatin in psq-Mutanten gestört ist. Dieses bleibt während der gesamten Entwicklung in einem kondensierten Zustand. Die Nährzellen sind polyploid (Ploidiegrad 512 bis 1024), wobei normalerweise die Chromatin-Kopien bis zum Stadium 4 der Oogenese in einem polytären Zustand gepaart vorliegen. Dabei ist die DNA stark kondensiert. Danach findet ein Übergang zu einem sogenannten polyploiden Zustand statt, in dem die Paarung der Chromatin-Kopien aufgehoben ist. Das Chromatin liegt dann

dekondensiert vor und ist im Zellkern diffus verteilt. Dieser Übergang vom polytänen zum polyploiden Zustand scheint in psq-Mutanten blockiert zu sein [Siegel et al., 1993]. Durch die in dieser Arbeit beobachtete heterochromatische Lokalisierung von Psq an mitotischen Chromosomen kann erstmals der Phänotyp dieser Mutanten erklärt werden. Psq scheint also nicht nur an der Kontrolle der Genexpression beteiligt zu sein, sondern auch eine essentielle Rolle bei der chromosomalen Verpackung und der Chromatinorganisation zu spielen.

Interessanterweise hat auch GAF eine globale Aufgabe bei der Organisation der Chromosomenstruktur. GAF ist wie Psq ebenfalls heterochromatinassoziiert [Raff et al., 1994; Platero et al., 1998; Deuring et al., 2000], und Trl-Mutanten zeigen auch Defekte chromosomaler Kondensierung und Chromosomen-Trennung während der Mitose [Bhat et al., 1996]. GAF scheint also auch die Chromatinstruktur zu modulieren und wesentliche Funktionen bei der Organisation und damit verbundenen regulatorischen Prozessen von Heterochromatin zu haben.

Durch die vollständige Koloalysierung von Psq und GAF an mitotischen Chromosomen liegt die Vermutung nahe, daß beide Proteine ihre Funktionen konzertiert als Partner ausüben. Beide Proteine scheinen also eine gemeinsame Funktion bei der Etablierung von Hetero- und Euchromatin und beim chromatin remodeling zu haben. Dies wird zudem durch Ergebnisse deutlich, die zeigen, daß sowohl psq- als auch Trl-Mutationen einen Einfluß auf die PEV haben. Beide Proteine können das Ausbreiten von Heterochromatin in euchromatische Bereiche verhindern [Farkas et al., 1994 und 4.1.7.3 sowie 5.1.4.3]. Psq und GAF scheinen eine Funktion bei der Erhaltung (maintenance) eines bestimmten Chromatinzustandes zu haben. Dies zeigt sich auch darin, daß beide Proteine Einflüsse auf die Erhaltung eines aktivierten oder reprimierten Genstatus haben. Über derartige Mechanismen, unter Mitwirkung von Proteinen der trithorax-Gruppe und der polycomb-Gruppe, wird die Aufrechterhaltung der Expression homöotischer Gene kontrolliert. Sowohl GAF (1.1.2) als auch Psq (4.1.7.2 sowie 5.1.4.2.1 und 5.1.4.2.2) können dabei mit Funktionen dieser beiden Proteinklassen bei der Erhaltung homöotischer Genexpression in Verbindung gebracht werden.

5.1.2 ASSOZIATION VON Psq UND GAF IN EINEM PROTEINKOMPLEX

Die vorangegangenen Experimente haben gezeigt, daß Psq und GAF sowohl an polytänen als auch an mitotischen Chromosomen koloalysiert sind. Ergebnisse anderer Experimente deuten darauf hin, daß beide Proteine auch gemeinsame

Funktionen ausüben (5.1.4.2 und 5.1.4.3). Die Grundlage hierfür könnte sein, daß beide Proteine gemeinsam in einem Proteinkomplex assoziiert wirken.

Bisher ist relativ wenig bekannt über andere Kernproteine, die mit GAF direkt interagieren bzw. mit diesem in einem größeren Proteinkomplex vorliegen. Es konnte gezeigt werden, daß GAF direkte Interaktionen mit Tramtrack, einem anderen BTB/POZ-Protein, eingehen kann, wobei die biologische Relevanz dieser Interaktion unklar ist [1.1.3 und Bardwell and Treisman, 1994]. Außerdem interagiert GAF mit SAP18, einem Polypeptid, das eine Untereinheit des Sin3A-HDAC (switch-independent 3 histone deacetylase)-Corepressorkomplexes ist [Zhang et al., 1997; Espinas et al., 2000]. Es wird vermutet, daß GAF durch Interaktion mit SAP18 eine Repression oder ein Silencing vermittelt, indem es den Sin3-HDAC-Komplex an bestimmten Sequenzen rekrutiert. Der HDAC-Komplex würde daraufhin Histone modifizieren, was zu einem Silencing führt. Interessanterweise interagiert dSAP18 ebenfalls mit dem Drosophila-Protein Enhancer of zeste (E(z)), einem Mitglied der Polycomb-Gruppe transkriptioneller Repressoren [Wang et al., 2002].

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß Psq und GAF in vivo in einem Proteinkomplex vorliegt. Immunpräzipitationsexperimente wurden durchgeführt, und beide Proteine konnten gemeinsam aus Kernextrakten präzipitiert werden. Obwohl auch andere Transkriptionsfaktoren in den Extrakten enthalten waren, wurden diese nicht kopräzipitiert (Abb. 8). Dies spricht dafür, daß die Interaktion zwischen Psq und GAF spezifisch ist.

Es überrascht zunächst, daß Psq und GAF in einem gemeinsamen Proteinkomplex zu finden sind. Wie bereits erwähnt (1.1.2), wurde GAF sowohl in PcG- als auch in TrxG-Protein-Komplexen gefunden, die an PREs zusammenkommen, und so den reprimierten bzw. aktivierten Status homöotischer Gene erhalten. Die reprimierende Funktion von PREs wird durch mindestens drei Multiproteinkomplexe vermittelt, die jeweils aus mindestens 13 verschiedenen PcG-Proteinen zusammengesetzt sind [Mahmoudi and Verrijzer, 2001]. Unter den PcG/trxG-Proteinen haben lediglich das PcG-Protein Pleiohomeotic (PHO) und die TrxG-Proteine GAF und Zeste sequenzspezifische DNA-Bindungsaktivität [Biggin et al., 1988; Soeller et al., 1988; Brown et al., 1998; Mahmoudi and Verrijzer, 2001]. In den meisten PREs finden sich Bindestellen für GAF und PHO. Immer mehr Ergebnisse sprechen dafür, daß zur Rekrutierung dieser PcG-Multiproteinkomplexe an PREs verschiedene DNA-bindende Proteine konzertiert agieren müssen [Horard et al., 2000; Busturia et al., 2001; Hodgson et al., 2001; Poux et al., 2001a; 2001b; 2002]. In den Immunpräzipitationsexperimenten (4.1.4) der vorliegenden Arbeit konnte auch

Psq in einem Proteinkomplex mit GAF detektiert werden. Nicht nur dieses Ergebnis spricht dafür, daß auch Psq neben GAF in einem Komplex DNA-bindender Proteine enthalten und somit an der Rekrutierung der PcG/trxG-Proteinkomplexe beteiligt ist. Dafür spricht auch die Tatsache, daß Psq eine ähnliche DNA-bindende Aktivität wie GAF besitzt. Es ist vorstellbar, daß Psq und GAF gemeinsam eine „Plattform“ für PcG/trxG-Proteinkomplexe auf der DNA bilden.

GAF und Psq konnten zwar in dieser Arbeit als Komponenten eines gemeinsamen Proteinkomplexes identifiziert werden, dennoch ist zu bedenken, daß von beiden Proteinen jeweils mehrere Isoformen existieren [Weber et al., 1995 und siehe auch 1.1 sowie 1.2; Horowitz and Berg, 1996; Benyajati et al., 1997; Greenberg and Schedl, 2001]. Es ist möglich, daß verschiedene Proteinkomplexe eine unterschiedliche Zusammensetzung aus Psq- und GAF-Isoformen haben. Derartige Kombinationen könnten die vielfältigen Funktionen von GAF und Psq, nicht zuletzt die dualen, reprimierenden bzw. aktivierenden Wirkungen bei der Regulation homöotischer Gene, erklären. So könnte man sich vorstellen, daß unterschiedliche Isoformen jeweils andere Loci binden und so unterschiedliche Proteinkomplexe an verschiedene Loci rekrutieren. Gegen diese Hypothese sprechen allerdings Untersuchungen, die gezeigt haben, daß die Isoformen GAF519 und GAF581 an polytären Chromosomen vollständig kolokalisieren und funktionell nicht zu unterscheiden sind [Benyajati et al., 1997].

Kürzlich konnte gezeigt werden, daß GAF und das Protein Batman nicht nur partiell an polytären Chromosomen kolokalisieren. Beide Proteine scheinen auch direkt miteinander zu interagieren und in einem gemeinsamen Proteinkomplex vorzuliegen [Faucheux et al., 2001 und Theodore, persönliche Mitteilung].

Psq scheint also nicht nur zu 100 % chromosomal mit GAF kolokalisiert zu sein, sondern auch mit GAF in einem größeren Proteinkomplex vorzuliegen. Dies scheint auch teilweise für Batman zuzutreffen. Eine naheliegende Vermutung ist, daß alle drei Proteine als Proteinpartner häufig in einem gemeinsamen Proteinkomplex agieren. Gestützt wird diese Vermutung durch genetische Interaktionsstudien, die auf eine duale Funktion von Batman bei der Regulation homöotischer Gene hinweisen. Die Phänotypen von batman-Mutanten erlauben eine Zuordnung von Batman sowohl zur PcG als auch zur trxG transkriptioneller Regulatoren. Batman scheint also sowohl aktivierende als auch reprimierende Funktionen zu haben. Eine solche duale Funktion bei der Regulation homöotischer Gene konnte für Psq in dieser Arbeit auch nachgewiesen werden und wird unter 5.1.4.2 eingehend diskutiert. So sprechen zytogenetische, biochemische und funktionelle Daten dafür, daß beide Proteine, Psq

und GAF, kooperativ einem Proteinkomplex angehören, um so als Partner gleiche Funktionen auszuüben, wobei auch Batman in vielen Fällen daran beteiligt zu sein scheint.

5.1.3 DIREKTE INTERAKTION VON Psq UND GAF

In früheren Untersuchungen konnte bereits gezeigt werden, daß die BTB-Domäne eine Protein-Protein-Interaktionsschnittstelle darstellt [Bardwell and Treisman, 1994; Ahmad et al., 1998]. Die Ergebnisse der Immunpräzipitation und der In-vitro-Bindetests (4.1.5) legen nahe, daß Psq und GAF nicht nur in einem Proteinkomplex assoziiert sind, sondern auch darin direkt aneinander gebunden vorliegen. In den Versuchen dieser Arbeit konnte durch zwei verschiedene Ansätze die Bindungsspezifität jeweils auf die BTB-Domäne von Psq bzw. GAF zurückgeführt werden. Zum einen wurden Bindetests an einer Ni-NTA-Säule mit His-tag-Proteinen, zum anderen wurden GST-pulldown-Experimente durchgeführt. Dabei wurden die Proteine sukzessiv vom N-Terminus deletiert, ohne daß ein Ausbleiben der Bindungsfähigkeit beobachtet werden konnte. Wurde jedoch die BTB-Domäne deletiert, blieb die Bindung aus. Die BTB-Domänen von Psq und GAF reichen aus, um eine direkte Interaktion zwischen beiden Proteinen zu vermitteln. Außerdem wurde gezeigt, daß für diese die BTB-Domäne von Psq benötigt wird. Die Interaktion beider Proteine scheint also durch die BTB-Domäne von Psq und GAF vermittelt zu werden. Dieses Ergebnis belegt auch für Psq, wie für GAF bereits gezeigt, die Funktionalität dieser Domäne als Protein-Protein-Interaktionsmodul.

In anderen Publikationen wurde gezeigt, daß die BTB-Domäne von GAF eine Selbst-Oligomerisierung mehrerer GAF-Moleküle zu einem größeren GAF-Komplex vermitteln kann [Espinosa et al., 1999; Katsani et al., 1999 und siehe auch 1.1]. Diese Untersuchungen sprechen für ein Modell, wonach ein solcher GAF-Komplex multiple Bindestellen im Promotor-Bereich entsprechender Zielgene erkennt, die über eine Region von mehreren Hundert bp verteilt sind. Eine solche offene, zugängliche GAF-Komplex/DNA-Konformation steht einer viel kompakteren nukleosomalen DNA-Verpackung entgegen. Durch dieses Modell kann erklärt werden, daß diese GAF-Komplexe als strukturelle Chromatinfaktoren wirken könnten. Nachdem der Chromatin-remodeling-Multiproteinkomplex NURF (1.1) vorübergehend die DNA/Histon-Konformation gelockert hat, würden die GAF-Komplexe multiple GAGA-Bindestellen in der Promotor-DNA erkennen, daran binden und diese in einer offenen Konformation erhalten. In dieser offenen Konformation könnten dann spezifische

Transkriptionsfaktoren binden (illustriert in Abb. 27 A und B) [Katsani et al., 1999].

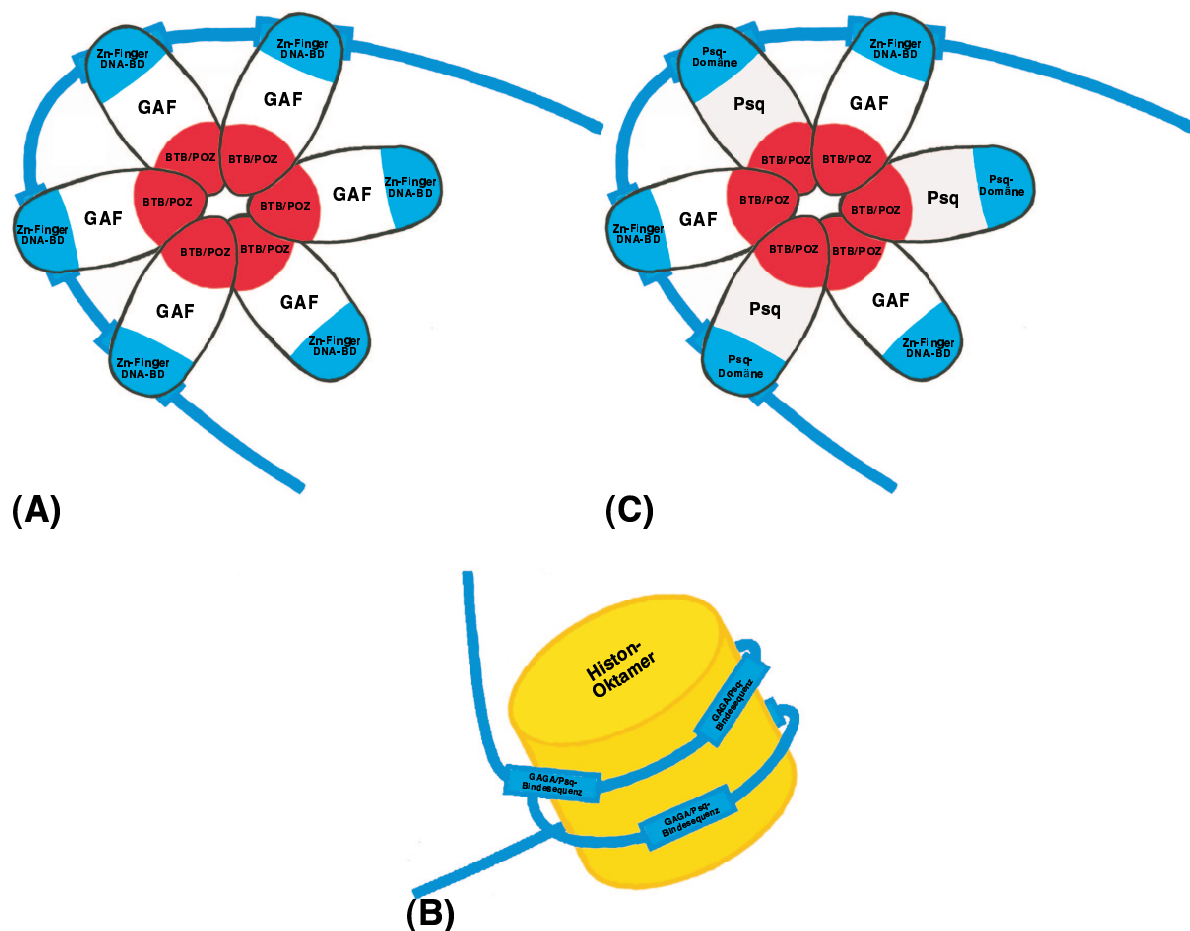


Abb. 27: Ein spekulatives Modell für die kooperative Bindung von Psq und GAF an einen Promotor. Die BTB-Domäne und die DNA-Bindungsdomäne von GAF und Psq sind angegeben. Hellblaue Kästen repräsentieren GAF/Psq-Bindestellen. In (A) ist das bisherige Modell dargestellt. Eine Oligomerisierung von GAF zu einem GAF-Komplex wird über die BTB-Domänen vermittelt. Die Bindung des GAF-Komplexes macht die DNA zwischen den GAF-Bindestellen zugänglicher, die DNA der Promotorregion ist gebeugt. Im Vergleich dazu ist in (B) die Promotor-DNA um ein Histon-Oktamer gewunden, wobei die Illustration zeigen soll, daß GAGA-Bindestellen (hier für den Ubx-Promotor dargestellt) etwa über die Länge von etwa 200 bp, wie die DNA um ein Nukleosom gewunden ist, verteilt sind; dabei wird deutlich, daß die DNA in engem Kontakt zu den Histonen steht [Modell nach Katsani et al., 1999, modifiziert]. Ergebnisse dieser Arbeit sprechen dafür, daß dieses Modell um die Beteiligung von Psq erweitert werden muß (dargestellt in (C)), wobei Psq dabei nicht nur über die Psq-Domäne an GAGA-Sequenzen bindet, sondern auch direkt mit GAF vermittelt durch die BTB-Domäne interagiert.

Dieses Modell kann aufgrund der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Ergebnisse entsprechend erweitert werden. Neben GAF dürfte auch Psq in diesen Komplexen enthalten sein und so als direkter Partner von GAF kooperativ an multiple GAGA-Elemente binden (Abb. 27 C). Für diese These sprechen nicht nur die Immunpräzipitationsexperimente, in denen nachgewiesen werden konnte, daß Psq und GAF in einem gemeinsamen Proteinkomplex vorliegen, sondern auch die direkte Protein-Protein-Interaktion von Psq und GAF. Zudem spricht auch die Tatsache dafür, daß Psq und GAF identische GA-reiche Sequenzen erkennen [Lehmann et al., 1998].

Außerdem wird die Hypothese, daß Psq und GAF als generelle Partner agieren, durch die vollständige Koloalisierung beider Proteine an hunderten chromosomaler Loci polytärer Chromosomen erhärtet (Abb. 7 und 4.1.3 sowie 5.1.1).

Das in Abbildung 27 dargestellte Modell macht keine Aussagen über das stöchiometrische Verhältnis von Psq und GAF in einem solchen Komplex. Es ist vorstellbar, daß ein solches multimeres Protein je nach DNA-Bindungslocus eine unterschiedliche Zusammensetzung von Psq und GAF haben kann. Außerdem wäre es auch, wie in Abbildung 27 angedeutet, möglich, daß nicht alle Psq- und GAF-Moleküle in diesen Multiproteinkomplexen DNA-bindende Funktionen übernehmen, sondern lediglich Protein-Protein-Interaktionen eingehen und so überbrückende Funktionen übernehmen.

Das in Abbildung 27 vorgestellte erweiterte Modell integriert bekannte Ergebnisse mit den zytologischen Lokalisationsstudien von Psq und GAF sowie den biochemischen Bindungstests und Immunpräzipitationsversuchen dieser Arbeit. Das Modell versucht, den kooperativen Charakter von Psq und GAF bei der Erkennung und Bindung von Promotoren und der dadurch ausgelösten lokalen Veränderung der Chromatinstruktur zu erklären.

Mittlerweile belegen erste Beispiele die Hypothese dieses Modells, daß Psq und GAF als kooperative Partner an konkreten Loci interagieren könnten. So konnte gezeigt werden, daß ein PcG-Komplex, der Psq und GAF enthält, sequenzspezifisch an poly-GA-Repeats des bithoraxoid (bx_d) PRE (genauer: einem Sequenzabschnitt darin, der MHS-70 genannt wird) bindet. Dieser größere Proteinkomplex enthält neben Psq und GAF zumindest ein weiteres PcG-Protein, Polyhomeotic (PH). Psq und GAF binden nicht nur an Sequenzen im PRE sondern sind dabei am PcG-abhängigen Silencing von Ubx beteiligt [Hodgson et al., 2001 und siehe auch 1.1.2]. Diese Ergebnisse lassen sich auch mit dem in Abbildung 27 gezeigten Modell erklären. Man könnte sich vorstellen, daß Psq und GAF zunächst an poly-GA-Sequenzen des MHS-70-Fragments binden und dann PcG-Proteine rekrutieren, um so dort einen reprimierenden Komplex zu bilden.

Dieses Modell wird auch durch die bereits unter 5.1.2 beschriebene Interaktion von GAF und SAP18 gestützt. SAP18 ist eine Untereinheit der Sin3A-HDAC. Es ist vorstellbar, daß GAF durch die Interaktion mit SAP18 eine Repression vermittelt, indem es den Sin3-HDAC-Komplex an bestimmten Sequenzen rekrutiert, der daraufhin Histone modifiziert.

Da GAF und Psq repressorischen Aktivitäten entgegenwirken, ist es andererseits überraschend, daß beide Proteine hier eine Rolle bei der Repression von

homöotischen Genen zu haben scheinen. Im Einklang mit dem Modell aus Abbildung 27 könnte dieser Widerspruch geklärt werden, indem beide Proteine *in vivo*, wie im Modell angedeutet, eine übergeordnete architektonische Funktion haben. Eine derart veränderte Chromatinstruktur könnte dann sowohl PcG- als auch TrxG-Proteinen den Zugang an die DNA ermöglichen. So könnte die duale Funktion beider Proteine, die sowohl aktivierende als auch reprimierende Wirkungen umfaßt, erklärt werden.

Ein weiteres Ergebnis, das für eine funktionelle Kopplung von Psq und GAF spricht, wird durch dieses Modell erklärt. Kürzlich wurde berichtet, daß PHO, das bisher einzig bekannte PcG-Protein mit spezifischen DNA-Bindungseigenschaften, und GAF an das MCP-Element der regulatorischen Region *iab-5* des *Abd-B*-Gens binden [Busturia et al., 2001]. Es wurde gezeigt, daß sich dieses MCP-Element wie ein PRE verhält und für das Silencing von *Abd-B* verantwortlich ist. Dabei ist die Bindung von GAF und PHO für die Erhaltung des reprimierten Zustandes notwendig [Busturia et al., 2001]. Neueste, noch nicht publizierte Daten, sprechen dafür, daß auch Psq kooperativ mit GAF an diesem Locus eine Rolle spielt (S. Sakonju, persönliche Mitteilung).

Neueste Untersuchungen geben Hinweise darauf, daß Psq- und GAF-Bindestellen, neben Bindestellen für das PcG-Protein Pleiohomeotic (PHO), in sogenannten PSE-Sequenzen (pairing-sensitive element) enthalten sind [Americo et al., 2002]. PSEs sind DNA-Fragmente, deren Aktivität für ein pairing-sensitive silencing benötigt wird. Pairing-sensitive silencing ist ein Phänomen, durch das ein Silencing von Reportergenen verstärkt wird, wenn bestimmte transgene, regulatorische DNA-Abschnitte homozygot vorliegen [Kassis, 1994]. Dieses Phänomen läßt sich durch einen Mechanismus erklären, der als Transvection bezeichnet wird [Übersicht in Pirrotta, 1999; Wu and Morris, 1999]. Dieser Begriff beschreibt die Tatsache, daß die Expression eines Gens durch das Allel auf dem homologen Chromosom beeinflusst werden kann [Korge, 1977]. Zum Beispiel kann so der Enhancer auf einem Chromosom den Promotor des homologen Chromosoms aktivieren. PSE-Sequenzen sind oft regulatorische Elemente von PcG-Genen. PSEs sind also oft mit PREs gleichzusetzen. Americo et al. [2002] nehmen an, daß beide Proteine, Psq und GAF, gemeinsam für das pairing-sensitive silencing notwendig sind und an bestimmte Sequenzbereiche innerhalb der PSE binden.

5.1.4 GENETISCHE INTERAKTIONSTUDIEN

Die Daten der biochemischen Interaktionsstudien sowie der Lokalisationsexperimente an mitotischen und polytären Chromosomen stützen die Vorstellung, daß Psq und GAF als generelle Partner agieren. Um dies weiter zu untermauern, wurden genetische Interaktionen zwischen Trl und psq analysiert. Auch wurde die Rolle beider Proteine bei der Kontrolle homöotischer Gene miteinander verglichen (1.1 und 1.1.2), und es wurde in genetischen Studien untersucht, ob psq, ähnlich wie für Trl bereits bekannt, einen Effekt auf Heterochromatin-vermitteltes Gen-Silencing hat.

5.1.4.1 GENETISCHE INTERAKTION ZWISCHEN psq UND Trl

GAF und Psq werden durch essentielle Gene kodiert, homozygote psq- und Trl-Mutanten sind nicht lebensfähig. Die Funktionen beider Proteine sind also nicht redundant [Weber et al., 1995; Bhat et al., 1996; Horowitz and Berg, 1996].

Doppelt heterozygote psq/+; Trl/+-Tiere zeigten keine offensichtlichen Defekte. Zudem war die Letalität dieser Tiere im Vergleich zu Kontrolltieren in keinem Entwicklungsstadium signifikant erhöht (4.1.7.1). Untersucht wurde auch, ob psq/+; Trl/+-Männchen und -Weibchen möglicherweise eine reduzierte Fertilität aufweisen. Es ist bekannt, daß homozygote Weibchen von Trl- und psq-Mutanten steril sind [Farkas et al., 1994; Weber et al., 1995]. Außerdem scheinen sowohl psq als auch Trl eine Funktion in der Oogenese zu haben [Siegel et al., 1993; Bhat et al., 1996; Horowitz and Berg, 1996]. Dennoch wiesen doppelt heterozygote psq/+; Trl/+-Tiere keine reduzierte Fertilität auf.

Für eine normale Entwicklung scheint demnach jeweils eine einzige intakte Kopie beider Gene und ein beträchtlicher Beitrag maternaler Trl- und psq-Genprodukte auszureichen. psq wurde als Gen mit maternalen Effekten eingestuft [Siegel et al., 1993]. Zudem ist bekannt, daß maternales psq schon sehr früh in der Oogenese benötigt wird [Horowitz and Berg, 1996]. Andererseits ist auch bekannt, daß Trl-Genprodukte ebenfalls bereits maternal während der Oogenese dem Ei beigegeben werden [Bhat et al., 1996].

5.1.4.2 psq UND DIE REGULATION HOMÖOTISCHER GENE

Genetische und molekulare Daten haben gezeigt, daß GAF sowohl eine aktivierende wie auch reprimierende Funktion bei der Regulation homöotischer Gene hat [Farkas et al., 1994; Strutt et al., 1997; Horard et al., 2000; Poux et al., 2001b]. Wenn Psq und GAF als Partner zusammenwirken, dann muß für Psq eine ähnliche

duale Rolle bei der Kontrolle homöotischer Gene gefordert werden. Nachfolgend diskutierte Daten der genetischen Interaktionsstudien weisen stark darauf hin, daß psq sowohl Charakteristika von PcG- als auch von TrxG-Genen hat [Brock and van Lohuizen, 2001].

5.1.4.2.1 GENETISCHE INTERAKTION ZWISCHEN psq UND Pc

Adulte Männchen, die heterozygot für das Pc³-Allel sind, weisen ektopische Geschlechtskämme auf. Solche homöotischen Transformationen lassen sich durch eine Deregulierung des homöotischen Gens Sex combs reduced (Scr), einem Gen des Antennapedia Complexes, erklären [Pattatucci and Kaufman, 1991]. Alle drei getesteten psq-Allele verstärken den „extra sex combs“-Phänotyp der Pc³-Mutante und führen zu einer Erhöhung der Anzahl an Transformationen mesothorakaler zu prothorakalen Beinen (4.1.7.2.1). Diese Resultate deuten darauf hin, daß psq und das PcG-Gen Pc interagieren und so für das Silencing homöotischer Gene verantwortlich sind. Psq scheint also eine Rolle beim Silencing durch PcG zu haben und somit ein Repressor des homöotischen Gens Scr zu sein. Das Ergebnis dieses Experiments könnte auch darauf hindeuten, daß psq die Expression von Pc kontrolliert.

Bei den untersuchten genetischen Interaktionen fällt auf, daß die Penetranz des „extra sex combs“-Phänotyps bei der reziproken psq x Pc-Kreuzung etwa doppelt so hoch ausfällt, wie bei der Kreuzung Pc x psq (Tabelle 9). Diese Diskrepanz läßt sich durch den höheren maternalen Beitrag von psq-Genprodukten (siehe dazu auch 5.1.4.1) in der zweitgenannten Kreuzung erklären.

psq scheint also Eigenschaften eines PcG-Gens zu haben. Es konnte kürzlich gezeigt werden, daß auch Trl Eigenschaften eines PcG-Gens hat. Entsprechend der Rolle von GAF bei der Funktion von PREs verstärken Trl-Mutationen ebenfalls den „extra sex combs“-Phänotyp von Pc-Mutanten [Strutt et al., 1997; Busturia et al., 2001]. GAF konnte als Komponente von PcG-Komplexen identifiziert werden [Horard et al., 2000], und GAGA-Bindestellen werden zur Erhaltung der Silencing-Aktivität der bxd, iab-7 und MRC PREs benötigt [Horard et al., 2000; Busturia et al., 2001; Mishra et al., 2001; Hur et al., 2002 und siehe auch 1.1.2]. Diese Befunde sprechen dafür, daß GAF eine Rolle beim Silencing homöotischer Gene spielt. Dabei scheint GAF ein Bestandteil von PcG-Komplexen zu sein, die an PREs binden. Durch diese Bindung scheint dann das Silencing zu erfolgen. Psq ist, entsprechend den Daten dieser Arbeit, perfekt mit GAF an polytären Chromosomen kolokalisiert. Außerdem interagiert Psq direkt mit GAF, und beide Proteine liegen in einem Proteinkomplex vor (5.1.1, 5.1.2 sowie 5.1.3). Diese Daten machen Psq zu einem guten Kandidaten, der neben GAF an GAGA-Bindestellen bindet und so kooperativ an der Repression homöotischer

Gentranskription beteiligt ist. Diese Hypothese wird durch die hier durchgeführten genetischen Interaktionsstudien zwischen psq- und Pc-Mutanten untermauert. Die Ergebnisse dieser Studie lassen vermuten, daß Psq ebenfalls eine Rolle beim PcG-vermittelten Silencing zukommt. Die Interaktion zwischen psq und Pc, sowie eine Interaktion zwischen polyhomeotic (ph) und psq wurde auch von anderen Experimentatoren beobachtet [Hodgson et al., 2001, sowie S. Sakonju, persönliche Mitteilung]. In der Arbeit von Hodgson et al. [2001] konnte außerdem gezeigt werden, daß beide Proteine, Psq und GAF, in einem PcG-Proteinkomplex vorliegen, der an Sequenzen bindet, die für die Funktion des bithoraxoid (bxd) notwendig sind.

Aus allen bisher vorliegenden Daten kann ein Modell abgeleitet werden, wonach die DNA-Bindungsproteine PHO, GAF und Psq an PRE-Sequenzen binden, PcG-Proteine rekrutieren und so einen Silencing-Komplex bilden. Dabei ist es vorstellbar, daß unterschiedliche PREs verschiedenartige Kombinationen DNA-bindender Proteine benutzen. Alternativ könnten die DNA-Bindeproteine erst als Teil eines präassemblierten Komplexes binden. Auch könnte ein gebundener Psq/GAF-Komplex zunächst über die Interaktion von GAF und SAP18 [Espinosa et al., 2000 und siehe auch 5.1.2 und 5.1.3] die Sin3- Histondeacetylase rekrutieren. Diese könnte daraufhin eine Veränderung der Chromatinstruktur auslösen, was die Bindung weiterer Proteine ermöglicht.

In jedem Fall würde die Bindung von GAF und Psq an PREs letzten Endes eine veränderte Chromatinstruktur generieren, die eine Etablierung eines stabilen PcG-Silencing-Komplexes ermöglicht.

5.1.4.2.2 GENETISCHE INTERAKTION ZWISCHEN psq UND Ubx SOWIE Ubx/Trl

Trl interagiert genetisch mit Ubx und wurde so als Mitglied der TrxG-Gene identifiziert, einer Gruppe von Genen, die für die Erhaltung der Expression homöotischer Gene benötigt wird [Shearn, 1989; Farkas et al., 1994]. Wildtyp-Ubx wird für die Spezifität einer metathorakalen statt einer mesothorakalen Segmententwicklung benötigt und ist somit für die Identität des dritten Thorakalsegments verantwortlich [Lewis, 1978; Struhl, 1982]. Ubx reprimiert die Expression des Antennapedia (Antp)-Gens, das im Wildtyp nur in Parasegment 4 und 5 exprimiert wird [Harding et al., 1989; Gonzalez-Reyes and Morata, 1990]. Wird die Expression von Ubx reduziert, kann sich die Aktivität von Antp über die Region erstrecken, in der normalerweise Ubx exprimiert wird. Die Folge ist eine homöotische Transformation des metathorakalen Segments, das eine mesothorakale Identität annimmt und so Flügel entwickelt.

Doppelt heterozygote Trl/Ubx-Fliegen zeigen vergrößerte Halteren, was darauf hinweist, daß die Expression des Ubx-Genproduktes bei verminderter Trl-Gendosis weiter reduziert wird. Mit geringer Penetranz (etwa 8 %; Tabelle 10) treten auch homöotische Transformationen auf, was durch eine vollständige Inaktivierung des Ubx-Gens erklärt wird [Farkas et al., 1994]. Dieses Ergebnis ist auch bei doppelt heterozygoten psq/Ubx-Tieren zu finden (Tabelle 10). Dies weist darauf hin, daß die Wildtypfunktion des psq-Gens für die Expression von Ubx notwendig ist. Jedoch ist die Penetranz deutlich geringer als bei der genetischen Interaktion von Trl und Ubx. Deutlicher wird dies, wenn die genetische Interaktion zwischen psq und Trl/Ubx betrachtet wird; dann ist die Penetranz homöotischer Transformationen vier- bis fünfmal erhöht (Tabelle 10). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, daß die Expression von Ubx noch weiter reduziert wird, wenn nicht nur die Trl- sondern zusätzlich auch die psq-Gendosis vermindert wird. psq-Mutationen erhöhen also die Wahrscheinlichkeit, daß die bereits limitierte Menge von GAF zu einer weiteren Reduktion der Ubx-Expression führt.

Daraus läßt sich schließen, daß psq ähnliche Funktionen wie Trl bei der Aktivierung und Erhaltung homöotischer Genexpression hat. Beide Proteine haben damit Eigenschaften, die für TrxG-Proteine charakteristisch sind.

Die Mehrzahl aller TrxG-Proteine hat keine DNA-Bindungsaktivität [Übersicht in Mahmoudi and Verrijzer, 2001]. Ausnahmen sind die Proteine GAF, Zeste und das Protein Psq, das, wie in dieser Arbeit gezeigt, ebenfalls Eigenschaften von TrxG-Proteinen besitzt. Interessanterweise ist auch Zeste für die Aktivität von Ubx notwendig und, zeste-Mutationen bewirken, wie Mutationen in psq, ebenfalls eine Verstärkung der genetischen Interaktion zwischen Trl und Ubx [Laney and Biggin, 1992; 1996; 1997].

5.1.4.2.3 psq UND Trl HABEN EINE DUALE ROLLE BEI DER REGULATION HOMÖOTISCHER GENEXPRESSION

Die Ergebnisse dieser Arbeit (5.1.4.2.1 und 5.1.4.2.2) deuten darauf hin, daß psq eine duale Rolle bei der Regulation homöotischer Genexpression hat. Ähnliches wurde auch für die Proteine GAF, Batman und Zeste berichtet und diskutiert [Busturia et al., 2001; Faucheux et al., 2001 und Faucheux, unpublizierte Daten; Hodgson et al., 2001; Hur et al., 2002; Poux et al., 2002]. Allen genannten Proteinen werden sowohl Eigenschaften von PcG- als auch von TrxG-Proteinen zugesprochen. Diese Proteine haben also sowohl aktivierende als auch reprimierende Funktionen bei der Regulation homöotischer Gene.

Dabei scheinen, wie bereits unter 5.1.2 diskutiert, die drei Proteine Psq, GAF und Batman diese duale Funktion als Partner auszuüben, wobei Batman nur partiell mit Psq/GAF zu kooperieren scheint. Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen auf eine enge Assoziation von Psq und GAF hin, beide haben eine DNA-bindende Aktivität, wobei Batman die Funktion eines modulierenden Cofaktors haben könnte.

Es ist bekannt, daß bei der epigenetischen Kontrolle von Entwicklungsregulatoren, wie z.B. den homöotischen Genen, Veränderungen der Chromatinstruktur eine Schlüsselrolle spielen. Eine derartige epigenetische Regulation der Transkription führt zu einer mitotisch stabilen Weitergabe differentieller Expression genetischer Information [Weiler and Wakimoto, 1995; Pirrotta, 1998; Lyko and Paro, 1999]. Eine epigenetische „Markierung“ (d.h. ein Gen ist „an“ oder „aus“) stellt sicher, daß ein entsprechendes Expressionsmuster und ein damit verbundener Zellphänotyp erhalten bleiben und an Zellnachkommen über viele Generationen hinweg weitergegeben werden. Für dieses zelluläre Gedächtnis, die Erhaltung eines aktiven oder inaktiven Zustands homöotischer Gene, sind zwei Proteinklassen wichtig: die PcG- sowie die TrxG-Proteine [zusammengefaßt in Mahmoudi and Verrijzer, 2001]. Eine Reihe von Ergebnissen sprechen dafür, daß diese Proteine früh in der Embryogenese einen bestimmten Genexpressionsstatus einschalten und diesen dann über viele Zellgenerationen beibehalten. Der Wirkungsmechanismus ist noch nicht gut verstanden, aber es wird angenommen, daß TrxG- und PcG-Proteine spezifisch die Chromatinstruktur verändern, um so den Expressionsstatus bestimmter Gene „einzufrieren“ [Tillib et al., 1999].

Wie ist es erklärbar, daß diese Gene sowohl zu positiven als auch zu negativen regulatorischen Gruppen gehören? Genetische Experimente deuteten darauf hin, daß einige TrxG-Proteine auch an einer PcG-Repression beteiligt sind [Wu et al., 1989; LaJeunesse and Shearn, 1996; Hagstrom et al., 1997; Gildea et al., 2000]. Deshalb wurde vorgeschlagen, solche Gene in einer neuen Gruppe zusammenzufassen: die Gruppe der ETP (enhancer of trithorax and Polycomb mutations)-Gene [Gildea et al., 2000]. Andere haben den Begriff „maintenance elements“ vorgeschlagen [Brock and van Lohuizen, 2001]. Aufgrund der genetischen und molekularen Daten sollte psq, wie bereits Trl, in die Gruppe der ETP-Gene eingeschlossen werden.

Es ist vorstellbar, daß der Proteinkomplex Psq/GAF eine übergeordnete chromatinstrukturelle Rolle übernimmt. Dieser Proteinkomplex könnte eine Veränderung der Chromatinarchitektur bewirken (ein mögliches Modell dazu in Abb. 27), die daraufhin sowohl PcG- als auch TrxG-Proteinen einen Zugang an die DNA erlauben. Alternativ wäre es auch möglich, daß Psq/GAF bereits eine Untereinheit von

aktivierenden oder reprimierenden Transkriptionskomplexen ist. Diese präassemblierten Komplexe könnten dann an die DNA binden, wobei Psq/GAF die Sequenzspezifität bestimmen würden. Weitere Experimente werden dazu beitragen müssen, diese Hypothesen zu prüfen.

5.1.4.3 DER EINFLUß VON psq AUF DIE PEV

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß psq ein dominanter Enhancer der PEV ist (4.1.7.3). Die PEV-Experimente deuten darauf hin, daß die Bildung von Heterochromatin verstärkt wird, wenn die Menge von Psq reduziert wird. Psq-Protein scheint also die Ausbreitung von Heterochromatin in benachbarte euchromatische Regionen zu vermindern. Auch Trl-Allele wurden als dominante Enhancer der PEV identifiziert [Farkas et al., 1994]. Somit scheinen beide Proteine dem chromatinvermittelten Gen-Silencing entgegenzuwirken. Psq und GAF scheinen also Proteine zu sein, die möglicherweise der Bildung einer geschlossenen Chromatinstruktur entgegenwirken.

GAF und Psq scheinen also chromatin remodeling-Funktionen zu haben. Beide Proteine scheinen einen bestimmten Chromatinzustand zu etablieren, der damit verbundene Zellphänotyp wird dann unverändert an Zellnachkommen weitergegeben. Ein derartiges zelluläres Gedächtnis wird auch bei der Erhaltung eines aktiven oder inaktiven Zustandes homöotischer Gene benötigt. Dort führt auch die Veränderung der Chromatinstruktur zu einer differentiellen Expression genetischer Information. Eine derartige epigenetische Markierung, die in der Chromatinstruktur begründet ist, bleibt stabil erhalten. Wie bereits unter 5.1.4.2.3 diskutiert, haben Psq und GAF sowohl Eigenschaften von PcG- als auch von TrxG-Proteinen. Dieser Befund bietet eine Möglichkeit, den Einfluß von psq und Trl auf die PEV mit der dualen Rolle beider Proteine bei der Regulation homöotischer Gene zusammenzubringen (5.1.4.2.3). Es gibt eine Reihe von Hinweisen darauf, daß beide Phänomene, die PEV und das epigenetische Silencing homöotischer Gene, mechanistisch verwandt sind. PcG- und TrxG-Gene werden häufig auch als Modifier der PEV identifiziert [zusammengefaßt in Pirrotta, 1997; Jacobs and van Lohuizen, 1999; Lyko and Paro, 1999; Mahmoudi and Verrijzer, 2001]. In beiden Fällen handelt es sich um epigenetische Phänomene, bei denen ein etabliertes Expressionsmuster von Zellgeneration zu Zellgeneration weitervererbt wird. Außerdem wurde gefunden, daß sich PcG-Proteine und Proteine, die an der Bildung von Heterochromatin beteiligt sind, gleiche Domänen besitzen. So haben beispielsweise die Proteine Polycomb und HP1 eine Chromo-Domäne (siehe auch 1). Andere Domänen, die sowohl bei einigen PcG- als auch einigen

Heterochromatin-Proteinen vorkommen, sind die SET-Domäne, die RING-Finger-Domäne und das SPM-Motiv [zusammengefaßt in Pirrotta, 1997]. Diese Beobachtungen stützen ein Modell, wonach PcG-Proteine durch Bildung heterochromatinartiger Strukturen wirken.

Beiden Mechanismen ist gemeinsam, daß ein Chromatinzustand, wenn er erst einmal etabliert ist, stabil erhalten bleibt. Dieses Modell wird durch die Erkenntnisse der Wirkungsweise von Psq und GAF weiter gestützt. Beide Proteine sind sowohl Komponenten des Heterochromatins als auch in PcG-Komplexen zu finden. Psq und GAF scheinen also gemeinsam an DNA zu binden (Modell in Abb. 27) und an der Modifikation der Chromatinstruktur beteiligt zu sein. Die Erhaltung eines bestimmten Chromatinzustandes würde dann im Falle der Regulation homöotischer Genexpression durch die Bindung von weiteren PcG- bzw. TrxG-Proteinen stabilisiert und aufrechterhalten werden. Die PEV-Experimente lassen die Schlußfolgerung zu, daß Psq und GAF möglicherweise die Chromatinstruktur verändern, was im differentiellen Expressionsmuster des white-Gens zum Ausdruck kommt. Auch dabei wird ein einmal etablierter Expressionsstatus erhalten und stabil weitergegeben. Offen bleibt, ob Psq und GAF dabei selbst diesen Status stabilisieren oder ob die Bindung anderer Proteine dazu notwendig ist.

Diese genetischen Daten, zusammen mit den biochemischen und zytogenetischen Ergebnissen dieser Arbeit, untermauern die Hypothese, daß Psq und GAF zusammen generell als Partner agieren und über ihre Rolle als wichtige Chromatinfaktoren an der Kontrolle homöotischer und vieler anderer Gene beteiligt sind.

5.2 PIEFKE (Pfk)

5.2.1 DAS DROSOPHILA-GEN piefke

Die Psq-Domäne des Drosophila-Proteins Psq konnte kürzlich als neuartige DNA-Bindungsdomäne identifiziert werden [Lehmann et al., 1998]. Zu diesem Zeitpunkt war das Vorkommen dieser Domäne bei keinem anderen Drosophila-Protein bekannt. Um weitere Informationen über die Funktion und Wirkungsweise der Psq-Domäne zu gewinnen, sollten weitere Proteine identifiziert werden, die diese Domäne enthalten. Dabei stieß man auf ein Gen, das ein Protein kodiert, das eine dem Psq-Protein sehr ähnliche Domänenstruktur aufweist. Die Ähnlichkeit beider Proteine spiegelt sich auch in der Namensgebung wieder. So wurde das neue Gen piefke genannt, was in etwa der Übersetzung von „pipsqueak“ ins Deutsche entspricht.

Bei diesen Datenbankanalysen konnte das bis dahin uncharakterisierte piefke-Gen (pfk) (Flybase:CG15812) von *D. melanogaster* identifiziert werden [Siegmond and Lehmann, 2002]. Eine Analyse von EST-Klonen ermöglichte die Identifizierung einer vollständigen piefke-cDNA (EST-Klon LD08856.5prime; Tabelle 8), deren 1958 bp lange Sequenz einen ORF enthält, aus dem sich ein Protein mit 518 Aminosäuren ableiten läßt (Abb. 17). Diese Aminosäure-Sequenz von Piefke stimmt mit dem vorhergesagten CG15812-Protein (Swiss-Prot:Q9VZU3) weitgehend überein, wobei der vorhergesagten Proteinsequenz die 17 N-terminalen Aminosäuren fehlen.

Anhand der genomischen Sequenz, die bis auf den Einschub des Introns mit der cDNA-Sequenz übereinstimmt, ließ sich für das pfk-Gen eine Länge von 2010 bp und zwei Exons mit konservierten Spleiß-Stellen vorhersagen (Abb. 18). Die vorhergesagte Exon-Intron-Struktur stimmt mit der Annotation der Flybase für CG15812 überein und wurde durch das Genvorhersageprogramm GeneMark.hmm bestätigt. Alle bisher isolierten und ansequenzierten EST-Klone (Tabelle 8) bestätigen dieses Ergebnis ebenfalls. piefke ist gemäß der Annotation der Flybase im genomischen Segment AC006489 auf 3L in der Region 63B11-12 lokalisiert, wobei diese Lokalisierung nicht experimentell nachgewiesen wurde.

5.2.2 PIEFKE, EIN PROTEIN DER Psq-PROTEINFAMILIE

Piefke gehört der Psq-Proteinfamilie an, Proteine, die sich durch das Vorkommen einer Psq-Domäne (bestehend aus ein bis vier Psq-Motiven) auszeichnen [Siegmond and Lehmann, 2002 und siehe auch 1.3]. Die Psq-Domäne von Pfk besteht aus drei Psq-Motiven. Auf eine mögliche Funktion der Psq-Domäne von Pfk wird unter 5.2.4 diskutiert.

In *D. melanogaster* existieren mindestens 14 Mitglieder der Psq-Proteinfamilie [Siegmund and Lehmann, 2002]. Neun dieser Proteine besitzen neben der Psq-Domäne eine BTB/POZ-Protein-Protein-Interaktionsdomäne. Zu diesen Proteinen gehört auch Pfk, bei dem die BTB/POZ-Domäne, wie bei allen anderen nukleären BTB/POZ-Proteinen von *Drosophila*, N-terminal lokalisiert ist (Abb. 3). Alle neun Proteine gehören zudem zur Tramtrack (Ttk)-Untergruppe (Abb. 3), deren Proteine innerhalb der BTB-Domäne drei konservierte Bereiche aufweisen, die der Dimerisierungsschnittstelle in Kristallstrukturen der BTB-Domäne eines humanen Proteins entsprechen [Ahmad et al., 1998; Siegmund and Lehmann, 2002]. Experimentelle Daten deuten darauf hin, daß BTB-Proteine der Ttk-Gruppe verschiedene heterologe Interaktionen untereinander eingehen könnten. So interagiert beispielsweise GAF sowohl mit Ttk [Bardwell and Treisman, 1994] als auch mit Psq (4.1.5). Für Pfk liegen keine Daten vor, die zeigen, daß es mit anderen Proteinen interagiert. Dennoch ist anzunehmen, daß Pfk, wie andere Proteine der Psq-Proteinfamilie, seine spezifische Funktionen durch Interaktion mit anderen Proteinen ausübt.

5.2.3 EXPRESSION VON Pfk

Im Rahmen des *Drosophila*-Genomprojekts (BDGP) sind 12 *piefke*-EST-Klone ansequenziert worden (Tabelle 8). Diese cDNAs entstammen embryonalen, larvalen, pupalen bzw. Schneiderzell-Banken, was auf eine breite Expression von *piefke* hindeutet. Mit den in dieser Arbeit erzeugten Antikörpern, die gegen Pfk gerichtet sind, wurden Western Blots durchgeführt, um weitere Informationen über die Expression von Pfk in *Drosophila* zu erlangen.

Pfk wird in Ovarien adulter Weibchen exprimiert (4.2.3.2) und könnte deshalb eine Funktion bei der Oogenese haben. Eine derartige Rolle konnte bereits für Psq, das auch in Ovarien exprimiert wird, nachgewiesen werden [Siegel et al., 1993; Horowitz and Berg, 1996]. Da Pfk unter allen Mitgliedern der Psq-Proteinfamilie eine Domänenstruktur aufweist, die Psq am nächsten kommt (Abb. 3 und Abb. 19), ist die Expression in Ovarien ein erster Hinweis, daß beide Proteine ähnliche Funktionen haben könnten.

Das Gen *piefke* wurde im Rahmen einer genomweiten Recherche entdeckt, die als Suchkriterium andere *Drosophila*-Proteine ermitteln sollte, die Psq-Domäne aufweisen [Siegmund and Lehmann, 2002]. In Western-Blot-Analysen konnte gezeigt werden, daß das *pfk*-Genprodukt kernlokalisiert vorliegt (4.2.3.2). Diese Kernlokalisierung muß für ein DNA-bindendes Protein gefordert werden. Dieses

Ergebnis war ein erster Hinweis darauf, daß die Psq-Domäne von Pfk ebenfalls DNA-bindende Eigenschaften besitzt und wurde durch die Bindung an polytäre Chromosomen erhärtet.

5.2.4 DIE BINDUNG VON Pfk AN POLYTÄNE CHROMOSOMEN

Piefke bindet an spezifische Loci larvaler polytärer Chromosomen (Abb. 24). Dieses Ergebnis ist ein weiterer Hinweis dafür, daß auch die Psq-Domäne von Pfk DNA-bindend ist. Für einige der Mitglieder der Psq-Proteinfamilie (Abb. 3) liegen experimentelle Daten vor, die belegen, daß die Psq-Domäne eine funktionelle DNA-Bindungsdomäne ist. So konnte gezeigt werden, daß die Psq-Domänen des humanen Proteins centromere Protein B (CENP-B) [Iwahara et al., 1998], der Pogo-Transposase [Wang et al., 1999] und des Psq-Proteins [Lehmann et al., 1998] DNA-bindende Eigenschaften haben. Es gibt Hinweise dafür, daß ein weiteres Psq-Domänen-Protein, der Drosophila-Apoptoseregulator E93, ein DNA-bindendes Protein ist, da es an spezifischen Loci polytärer Chromosomen zu finden ist [Lee et al., 2000]. Die Ergebnisse dieser Arbeit sprechen dafür, daß auch die Psq-Domäne von Pfk als DNA-Bindungsdomäne eingesetzt wird. Obwohl diese Bindung auch allein durch Protein-Protein-Interaktionen vermittelt sein könnte, scheint dies in Anbetracht der nachgewiesenen DNA-Bindungsfähigkeit anderer Psq-Domänen (siehe oben) unwahrscheinlich (Abb. 24 sowie 4.2.4 und 5.2.4). Es ist allerdings nicht bekannt, an welche DNA-Sequenz Pfk bindet.

Obwohl Pfk wie Psq eine Psq-Domäne besitzt, ist Pfk, wenn überhaupt, nur partiell mit Psq/GAF an polytären Chromosomen kolokalisiert (Abb. 25). Deshalb kann ausgeschlossen werden, daß Pfk an DNA-Sequenzen bindet, die dem GAGAG-Konsensus entsprechen. Dieses unterschiedliche Bindungsverhalten könnte damit erklärt werden, daß die Psq-Domäne von Psq aus vier Psq-Repeats, die von Pfk jedoch lediglich aus drei besteht (Abb. 19 und Abb. 20). Man kann vermuten, daß der Unterschied im jeweiligen Aufbau der Psq-Domäne die DNA-Bindungsspezifität der jeweiligen Proteine beeinflusst. Wahrscheinlicher ist es allerdings, daß die Zahl der Psq-Repeats weniger die Sequenzspezifität sondern eher die Länge der Sequenz bestimmt, die erkannt wird.

Es gibt einige Hinweise dafür, daß Psq-Proteine einen gemeinsamen Wirkungsmechanismus haben. So scheint eine Reihe von kernlokalisierten Proteinen, die eine BTB-Domäne besitzen, strukturelle Veränderungen des Chromatins auslösen zu können. Beispiele hierfür sind die Proteine Psq (siehe die vorliegende Arbeit), die Mod(mdg4)-Proteine, sowie GAF [Dorn et al., 1993a; Farkas et al., 1994; Tsukiyama

et al., 1994; Gerasimova et al., 1995]. Ob Pfk über einen ähnlichen Mechanismus wirkt, ist nicht bekannt. Die partielle Kolokalisierung von Pfk mit dem Protein HP1 an polytären Chromosomen liefert jedoch einen ersten Hinweis darauf, daß dies der Fall sein könnte (Abb. 26). Diese Kolokalisierung erstreckt sich auf das heterochromatische Chromozentrum sowie die euchromatische Region 31. Die Funktionen von HP1 sind gut untersucht (siehe 1). HP1 ist vornehmlich im Heterochromatin lokalisiert, und es wurde gezeigt, daß dieses Protein bei der Organisation und der Erhaltung heterochromatischer Strukturen eine Rolle spielt [Übersicht in Eissenberg and Elgin, 2000; Richards and Elgin, 2002]. Su(var)2-5, das HP1-kodierende Gen, wurde als Suppressor der PEV identifiziert, was darauf hinweist, daß HP1 Funktionen bei der Etablierung von Heterochromatin hat. Da HP1 selbst keine DNA-bindende Aktivität besitzt, müssen andere Proteine für die Lokalisierung von HP1 an entsprechende Loci verantwortlich sein. Eine solche Rolle könnte Pfk an den Loci der Kolokalisierung mit HP1 spielen.

Für eine Reihe von Drosophila-Proteinen der Psq-Familie konnte gezeigt werden, daß sie wichtige entwicklungsrelevante Regulatoren sind. Diese sind Bric à brac, Psq und Ribbon (aus der BTB-Untergruppe) sowie E93 (aus der E93-Untergruppe); die Funktionen dieser Proteine sind unter 1.3 besprochen. Ob Pfk als neues Mitglied der Psq-Proteinfamilie auch entwicklungsbiologische Funktionen übernimmt, ist noch nicht bekannt.

Um Fragen zur biologischen Funktion von Pfk zu klären, wird es in Zukunft wichtig sein, pfk-Mutanten zu isolieren und zu charakterisieren. Dazu soll zunächst getestet werden, ob pfk einer von mehreren beschriebenen Komplementationsgruppen der 63B-Region entspricht, die von Wohlwill und Bonner [1991] isoliert worden sind. Ergebnisse dieser Mutantanalysen könnten dann wichtige Hinweise auf die Funktion von Pfk geben.

Zukünftige Untersuchungen zur Aufklärung der Funktion von Pfk müssen auch die Interaktion mit anderen Proteinen in Betracht ziehen. Hier würden sich Immunpräzipitationsexperimente mit Pfk-Antikörpern anbieten. Dadurch könnten möglicherweise Proteine identifiziert werden, die mit Pfk interagieren. Dieses Ziel könnte auch durch Verwendung des yeast-two-hybrid-Systems erreicht werden. Diese Methode ist ein genetisches System, um spezifische Protein-Protein-Interaktionen zu detektieren.

Wichtig für das Verständnis der Wirkungsweise von Pfk wäre die Kenntnis der DNA-Sequenz, an die Pfk bindet. Diese könnte durch weiterführende Experimente, z. B. ChIP-Analysen (Chromatin Immunpräzipitation), identifiziert werden.

Insbesondere soll eine mögliche Interaktion zwischen HP1 und Pfk überprüft werden. Wenn eine Interaktion der beiden Proteine nachgewiesen werden kann, könnte dies entscheidende Informationen über die Funktion von Pfk liefern. Eine funktionelle Verbindung von Pfk und HP1 würde weitere Untersuchungen erleichtern, da die Funktion von HP1 sehr gut untersucht ist.

Die in dieser Arbeit hergestellten Anti-Pfk-Antikörper stellen ein hervorragendes Werkzeug dar, das in weiteren Experimenten entscheidend dazu beitragen kann, Fragen zur Funktion von Pfk zu beantworten.